

Aus dem  
Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers  
am Lehrstuhl für Physiologie

# **Transkriptomische Analyse der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Stefan Schmieder  
aus Überlingen

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof.Dr. Kaspers

Korreferent: Univ.-Prof.Dr. Korbel

Tag der Promotion: 12.02.2011

Für das große Chaos haben wir Computer.

Die übrigen Fehler machen wir von Hand.

# INHALTSVERZEICHNIS

## INHALTSVERZEICHNISS

## ABBILDUNGSVERZEICHNISS

## TABELLENVERZEICHNISS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNISS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Das Immunsystem des Huhns .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2.</b>	<b>Bursa Fabricii .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3.</b>	<b>Entwicklung der B-Lymphozyten des Huhns .....</b>	<b>7</b>
2.3.1.	präbursale Phase .....	7
2.3.2.	Bursale Phase .....	9
2.3.3.	Postbursale Phase .....	10
<b>2.4.</b>	<b>Molekulare Mechanismen in der B-Lymphozyten Reifung .....</b>	<b>11</b>
2.4.1.	VDJ-Rekombination.....	12
2.4.2.	Genconversion.....	13
2.4.3.	Somatische Hypermutation und Immunglobulin Klassenwechsel .....	15
<b>2.5.</b>	<b>Entwicklung der B-Lymphozyten bei anderen Species .....</b>	<b>16</b>
<b>2.6.</b>	<b>Regulation der B-Lymphozyten Reifung .....</b>	<b>17</b>
2.6.1.	Adhäsionsmoleküle .....	17
2.6.2.	Zytokine.....	18
2.6.3.	Chemokine.....	20
<b>3.</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>25</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.</b>	<b>Tiere und Tierhaltung.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.</b>	<b>Gewinnung von Organen und B-Lymphozyten.....</b>	<b>26</b>
4.2.1.	Gewinnung von Organen.....	27
4.2.2.	Gewinnung von B-Lymphozyten .....	27
<b>4.3.</b>	<b>RNA-Präparation .....</b>	<b>29</b>
4.3.1.	Reinheitsbestimmung der RNA mittels NanoDrop.....	30
4.3.2.	Natrium-Acetat Fällung.....	30
4.3.3.	Bestimmung der RNA Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer <sup>TM</sup> .....	31
<b>4.4.</b>	<b>cDNA Synthese für qRT-PCR.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5.</b>	<b>Erstellen von Primern .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6.</b>	<b>Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>33</b>

<b>4.7.</b>	<b>Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>34</b>
<b>4.8.</b>	<b>Aufreinigung und Sequenzierung des PCR Produktes.....</b>	<b>36</b>
<b>4.9.</b>	<b>Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT PCR) .....</b>	<b>36</b>
<b>4.10.</b>	<b>Mikroarray.....</b>	<b>39</b>
4.10.1.	Agilent Mikroarray.....	39
4.10.2.	Customarray .....	39
4.10.3.	Annotation.....	40
4.10.4.	cDNA Synthese .....	40
4.10.5.	cRNA Synthese .....	41
4.10.6.	Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität .....	42
4.10.7.	Fragmentierung der cRNA .....	42
4.10.8.	Hybridisierung der Arrays.....	43
4.10.9.	Waschen und Scan der Arrays.....	44
<b>4.11.</b>	<b>Programme zur Auswertung der Mikroarray.....</b>	<b>45</b>
4.11.1.	Agilent Feature Extraction Software v. 10.5.1.1 .....	45
4.11.2.	Bioconductor „R“ v2.9.1 .....	45
4.11.3.	Significance Analysis of Microarrays v3.08 (SAM).....	46
4.11.4.	Berechnung der Expressionsänderung (fold change).....	47
4.11.5.	Microsoft Office Access 2003 Datenbanksystem .....	48
4.11.6.	Pathway Express.....	48
4.11.7.	Expander.....	49
4.11.8.	Multi Experiment Viewer v4.5.1 (MEV) .....	50
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.</b>	<b>Annotation.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2.</b>	<b>Probenzeitpunkte und -entnahme.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3.</b>	<b>Genexpressions-Analyse .....</b>	<b>53</b>
5.3.1.	Feature Extraction QC Report.....	53
5.3.2.	Darstellung der Daten mittels Heat Map.....	54
<b>5.4.</b>	<b>„Two class, unpaired“ Signifikanz-Analyse mittels SAM .....</b>	<b>56</b>
5.4.1.	Funktionelle Analyse der Einzelvergleiche.....	57
5.4.2.	Pathway-Analyse.....	58
5.4.3.	Promotoranalyse.....	62
<b>5.5.</b>	<b>„Multiclass“ Signifikanz-Analyse mittels SAM.....</b>	<b>64</b>
5.5.1.	Funktionelle Analyse der Multiclass-Analyse .....	66
<b>5.6.</b>	<b>Spezielle Analyse von auffälligen Gengruppen.....</b>	<b>68</b>
5.6.1.	Zytokine.....	68
5.6.2.	Adhäsionsmoleküle .....	71
5.6.3.	Chemokine.....	73
<b>5.7.</b>	<b>Verifizierung der Arraydaten mittels qRT-PCR .....</b>	<b>75</b>
<b>5.8.</b>	<b>Vergleichende Analyse zwischen Gesamtbursa und isolierten B- Zellen</b>	

---

	<b>mittels qRT-PCR .....</b>	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
6.1.	<b>Agilent Mikroarray Technologie .....</b>	<b>81</b>
6.2.	<b>Bestimmung der Probezeitpunkte .....</b>	<b>81</b>
6.3.	<b>Validität der eingesetzten Methode .....</b>	<b>82</b>
6.4.	<b>Statistische Auswertungsmethoden .....</b>	<b>83</b>
6.5.	<b>Differenzierung der Bursa zu einem hochspezialisierten Organ .....</b>	<b>84</b>
6.6.	<b>Identifizierung von Kandidatengenomen .....</b>	<b>85</b>
6.6.1.	Zytokine in der Bursaentwicklung .....	85
6.6.2.	Adhäsionsmoleküle in der Bursaentwicklung .....	87
6.6.3.	Chemokine in der Bursaentwicklung .....	88
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>97</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>109</b>
<b>11.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>12.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>111</b>

## Abbildungsverzeichniss

Abb. 1 : Schematische Zeichnung des Aufbaus der Bursa Fabricii.....	5
Abb. 2: Schema einer VJ-Rekombination der leichten Immunglobulinkette.....	12
Abb. 3: Genconversion.....	14
Abb. 5:Schematische Darstellung des Einbaus von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden .....	41
Abb. 6: Aufbau eines Array-Gasket-Sandwich .....	44
Abb.7 Verteilung der Signalstärke über den Array-Querschnitt .....	53
Abb. 8: Heatmap der Arrays.....	55
Abb. 9: signifikant angereicherte Klassen zwischen Embryonaltag 10 und Embryonaltag 18....	58
Abb. 10: Ausschnitte aus dem Pathway .....	61
Abb. 11: Expander Promotoranalyse für den Vergleich zwischen ET 10 und ET 18.....	63
Abb. 13: Plot der 22.191 in SAM-Multiclass-Analyse.....	65
Abb. 14: MEV-Cluster Expressionsmuster der Multiclass-Analyse.....	67
Abb. 15: MEV-HeatMap der Zytokine .....	69
Abb. 16: Expressionsprofile für IL 7 (Interleukin 7) und IL 7-Rezeptor .....	70
Abb. 17: Expressionsprofil für BAFF und seine Rezeptoren BAFF-R und TACI.....	70
Abb.18: MEV-HeatMap der Adhäsionsmoleküle .....	72
Abb. 19: MEV-Expressionsprofile für ITGA 4 und CD93 .....	72
Abb.20: MEV-HeatMap der Chemokine .....	73
Abb. 21: MEV-Expressionsprofile für Cemokine und deren Rezeptoren.....	74
Abb. 22: Vergleich der Microarray und qRT-PCR Expressionswerte .....	76

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1: Klassifizierung der Chemokine.....</b>	<b>23</b>
<b>Tab. 2: Für das Huhn identifizierte Chemokin-Gene .....</b>	<b>24</b>
<b>Tab. 4: signifikant regulierte Spots der „two class unpaired“ Auswertung .....</b>	<b>56</b>
<b>Tab. 5: Biologisch relevant regulierte Pathways .....</b>	<b>59</b>
<b>Tab. 5: Die in SAM-Multiclass am stärksten regulierten Gene .....</b>	<b>65</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AA4.1	<i>monoklonalen Antikörper für CD93</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
AICDA	<i>Activation-Induced (Cytidine) Deaminase</i>
AID	<i>Activation-Induced (Cytidine) Deaminase</i>
APRIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
BAFF	<i>B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
BAFFR	<i>B-cell activating factor belonging to the TNF family receptor</i>
BCR	<i>B-Zellrezeptor (B cell receptor)</i>
BF	<i>Bursa Fabricii</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Bu1	<i>Typ I Glykoprotein, erstmals identifiziert auf bursalen B-Zellen von Eintagsküken</i>
ca.	<i>zirka</i>
CACNA1C	<i>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit</i>
CAM	<i>Cell adhesion molecules</i>
CASP3	<i>Caspase3</i>
CCL	<i>CC-Chemokin Ligand</i>
CCR	<i>CC-Chemokin Rezeptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy Desoxyribonukleinsäure</i>
CL	<i>C Chemokin Ligand</i>
CR	<i>C Chemokin Rezeptor</i>
cRNA	<i>copy Ribonukleinsäure</i>
cRNA	<i>copy Ribonukleinsäure</i>
CT	<i>cycle threshold</i>
CTP	<i>Cytosintriphosphate</i>
CX3CL	<i>CX3C Chemokin Ligand</i>
CX3CR	<i>CX3C Chemokin Rezeptor</i>
CXCL	<i>CXC-Chemokin Ligand</i>
CXCR	<i>CXC-Chemokin Rezeptor</i>
Cy3	<i>Cyanine3</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphate</i>
ErbB	<i>epidermal growth factor receptor (EGFR) family</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
ET	<i>Embryonaltag</i>
FAE	<i>Follikel assoziiertes Epithel</i>
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FDZD9	<i>frizzled homolog 9</i>
FITC	<i>Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat</i>
GALT	<i>Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (gut associated lymphoid tissue)</i>
GO	<i>gene ontology</i>
HIV	<i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ITGA4	<i>Integrin, alpha 4</i>
Jak	<i>Janus-Kinase</i>
kDa	<i>Kilo-Dalton</i>
LSL	<i>Lohmann's selected Leghorn</i>

---

MEV	<i>Multi Experiment Viewer</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MYH6	<i>myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha</i>
Okt4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBL	<i>periphere Blut Leukozyten</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PLC	<i>Phospholipase-C</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion</i>
RAG	<i>Recombination Activating proteins</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
rRNA	<i>ribosomale Ribonukleinsäure</i>
RSS	<i>recombination signal sequenz</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat</i>
SOTA	<i>Self Organizing Tree Algorithem</i>
SOX-2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
TH1/2	<i>T-Helferzelle 1/2</i>
TNF	<i>Tumor Nekrose Faktor</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VSN	<i>Variance Stabilization and Normalization</i>
Wnt	<i>Wingless Int-1</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

## 1. EINLEITUNG

Das adaptive Immunsystem beruht auf den Antikörper-produzierenden B- und den zytotoxischen bzw. Helferzellen des T-Lymphozytensystems. Sowohl B- als auch T-Zellen sind durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk kontrolliert und miteinander Verbunden. Dieses zweigleisige Prinzip aus humoraler und zellulärer Immunität ist in Säugern und Vögeln in annähernd gleicher Funktionalität ausgebildet, wodurch es möglich war, viele der heute grundlegenden Mechanismen und Prinzipien des spezifischen Immunsystems im Haushuhn zu entdecken. Dabei ist das aviäre T-Zellkompartiment in seiner Entwicklung weitestgehend mit dem von Säugern übereinstimmend, und auch molekulare Mechanismen in der Reifung, Aktivierung und Effektorfunktionen sind in gleicher Weise ausgebildet. Dem entgegen zeigt die B-Zellentwicklung bei Vögeln aufgrund spezieller Adaptationen des lymphatischen Systems erhebliche Unterschiede zum Säuger. Während bei Primaten die B-Zellreifung im Knochenmark erfolgt, dient Vögeln die Bursa Fabricii als zentraler Ort der B-Zellreifung bei Vögeln, und ist damit ein einzigartiges Kompartiment zur Differenzierung der B-Zellen.

In der frühen Embryonalphase wird die Bursaanlage durch bereits auf die B-Zelllinie festgelegte präbursale Stammzellen besiedelt. Nach der bursalen Entwicklungsphase verlassen die B-Zellen die Bursa und besiedeln die sekundär lymphatischen Organe der Peripherie, um sich dort nachdem das passende Antigen erkannt wurde zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle oder Gedächtniszelle zu differenzieren. Die Bursa selbst wird ähnlich dem Thymus zurückgebildet, und ist mit Erreichen der sexuellen Reife völlig verschwunden.

Um die Vielzahl an Pathogen als körperfremd erkennen zu können muss das Immunglobulinen während der B-Zellentwicklung für jede Zelle individuell diversifiziert werden, so dass ein Rezeptor-Repertoire von annähernd  $10^{11}$  Molekülen mit unterschiedlicher Spezifität entsteht.

Diese molekularen Vorgänge zur Generierung des Rezeptorreperoires sind inzwischen gut verstanden, weit weniger ist jedoch über die Regulation der gesamten Entwicklung der B-Lymphozyten in der Bursa bekannt. Zudem lassen sich Erkenntnisse aus der im Maussystem nur bedingt auf die phylogenetisch weit entfernte Klasse der Aves übertragen. Somit ist bis heute nur wenig darüber bekannt, wie B-Zellen in die Bursa gelockt werden, was sie dort hält und wie Überleben oder Apoptose reguliert werden, und schließlich welche Signale die Emigration aus der Bursa steuern. Ebenso wenig ist darüber bekannt wie nach der Bursa-Involution der periphere B-Zellpool aufrecht erhalten wird.

Mit der Veröffentlichung des Hünergenoms im Jahr 2004 hat sich die Möglichkeiten eröffnet

durch moderne funktionelle Genomanalysen orthologe Gene zu Mensch oder Maus zu identifizieren, und diese funktionell zu charakterisieren. Zum anderen wurden die Genomdaten genutzt, um aussagekräftige Microarrays zu entwickeln mit deren Hilfe Erkenntnisse über die Expression verschiedener Gene gewonnen werden können.

Gegenstand dieser Arbeit sollte es sein, mittels transkriptomischer Techniken weitere Kandidatengene zu identifizieren, die in der B-Zellentwicklung regulatorische Funktionen ausfüllen.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Das Immunsystem des Huhns

Das Immunsystem des Huhns gliedert sich wie bei allen Vertebraten in einen angeborenen und einen erworbenen Anteil. Beide enthalten sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten, die den Organismus vor Infektionen und anderen schädlichen Faktoren schützen.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers dar, so dass eine schnelle aber unspezifische Immunantwort eingeleitet wird. Dafür bedient sich das Immunsystem einer Reihe von genetisch fest angelegten Rezeptoren („*pattern recognition receptors*“, PRR) die körperfremde Strukturen („*pathogen-associated molecular patterns*“, PAMPs) erkennen können.

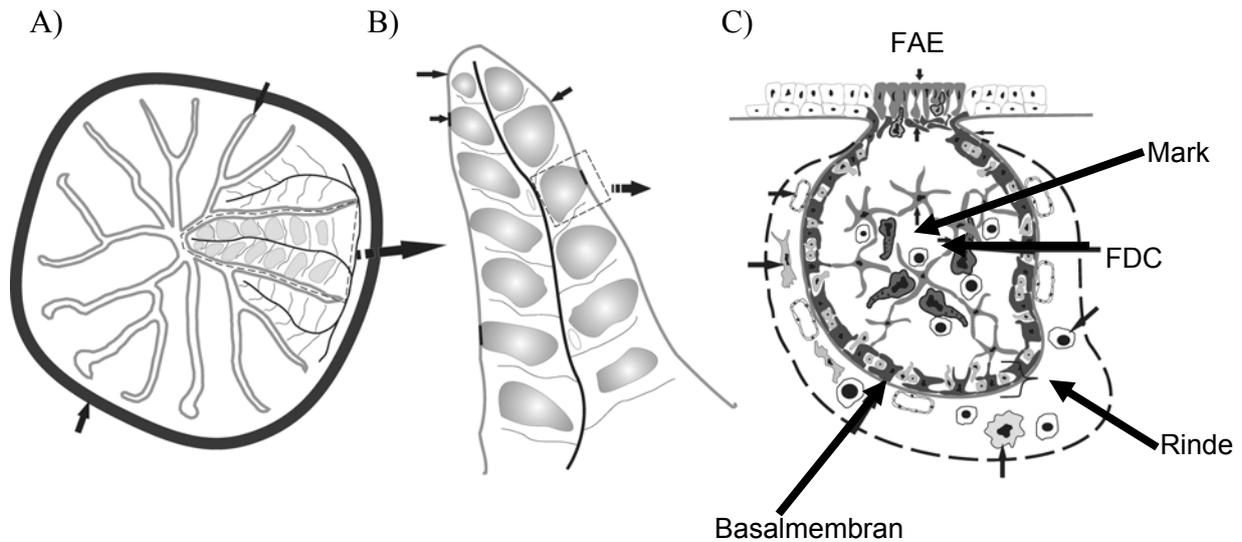
Das adaptive Immunsystem beruht auf den Zellen der lymphoiden Zellreihe, den B- und T-Lymphozyten. Diese Zellen sind antigenspezifisch, was bedeutet, dass jede Zelle ein einziges Epitop eines Erregers, mittels eines für diese Zelle spezifischen Rezeptors, erkennt. Bei Kontakt zu einem Pathogen wird diese Zelle durch klonale Expansion und Selektion vermehrt und zu einer antigenspezifischen Effektorzelle heranreifen. Die von den B-Lymphozyten gebildeten Antikörper (Immunglobuline) stellen dabei den humoralen Teil der adaptiven Immunantwort, die T-Lymphozyten den zellulären Anteil. Eine Besonderheit sind die Gedächtniszellen, welche nach einer überstandenen Infektion gebildet werden und bei erneutem Kontakt zu dem Erreger eine schnelle und gezielte Immunantwort bewirken können.

Während das T-Zell-System des Huhns dem der Säuger weitestgehend gleicht zeigt, die B-Zell-Entwicklung drastische Unterschiede zum Menschen oder Mausmodell [1]. Während man lange annahm, dass die B-Zell-Entwicklung bei allen Säugern im Knochenmark erfolgt, weiß man heute, dass auch einige der Haustierrassen sich der „gut associated lymphoid tissue“ (GALT) Strukturen zur Diversifizierung ihres B-Zellrezeptor-Repertoires bedienen (siehe 2.6).

## 2.2. Bursa Fabricii

Die Bursa Fabricii (Bursa) ist ein für Vögel einzigartiges Hohlorgan, das der Kloake (Proktodäum) anliegt und über einen dünnen Stiel eine offene Verbindung zu dieser hat. Embryonal wird die Bursa als Ausstülpung der dorsalen Kloakenwand angelegt (ET 4) [2] und gehört damit zu den GALT Geweben. Etwa 8-10 Wochen nach dem Schlupf der Küken erreicht die Bursa ihre maximale Größe (in etwa die Ausmaße einer Haselnuss), um dann ähnlich dem Thymus zu degenerieren. Diese Involution ist mit dem Eintreten in die Geschlechtsreife (im Alter von ca. 6-7 Monaten) abgeschlossen [2].

In das Lumen der BF ragen ca. 15-20 longitudinale Falten (Plicae), die mit einem einfachen zylindrischen Epithel überzogen sind (s. Abb. 1A). Durch diese Falten wird der Hohlraum auf einen Spalt begrenzt. Die ersten Follikelanlagen erscheinen in der Bursa zwischen Embryonaltag (ET) 11 und 12. Dabei bilden sich in den Plicae kleine dendro-epitheliale Knospen, die über aus dem Blut einwandernde B-Lymphozyten-Vorläuferzellen besiedelt werden. Durch rasche Proliferation der Lymphozyten kommt es zur Formierung von Follikeln (ET 14-15) [3], wobei man davon ausgeht, dass jeder Follikel aus nur wenigen pre-B-Zellen entsteht. Eine reife Bursa enthält zirka 8.000 bis 12.000 Follikel, von denen jeder eine eigene Blutversorgung hat und während der embryonalen Entwicklung zur Rinde der reifen Follikel homolog ist. Zu den Zellen eines solchen Follikels zählen neben den B-Zellen die bursalen Dendritischen-Zellen (luminale sekretorische Dendritische-Zellen), Makrophagen sowie das dem Follikel assoziierte Epithel (FAE) (s. Abb. 1C). Zum Zeitpunkt des Schlupfes kommt es zu einer Umstrukturierung der Follikel in eine Rinden- und Markzone. Die Rinde der Bursafollikel ist von einer Kapsel umgeben und durch eine dünne Basalmembran vom Mark getrennt. Eine kollagenreiche extrazelluläre Matrix und die Abwesenheit von bursalen Dendritischen-Zellen unterscheiden den Rinden- vom Markanteil der Bursafollikel [4].



**Abb. 1 : Schematische Zeichnung des Aufbaus der Bursa Fabricii (Quelle: Avian Immunology)**

A: Gesamt-Organ im Querschnitt; B: Plika des Bursa; C: Aufbau eines reifen bursalen Follikels

Erstmal beschrieben wurde die Bursa Fabricii von ihrem Namensgeber „Hieronymus Fabricius von Aquapendente“ im Jahr 1621. Dabei beschrieb er die Bursa als einen zum After durchlässigen Sack der vermutlich zur Aufnahme und Speicherung von Spermien dient. Die tatsächliche Funktion der Bursa blieb jedoch noch bis ins 20ste Jahrhundert unbekannt und legte bei ihrer Entdeckung einen Meilenstein der Immunologie. Dieser Durchbruch geschah dabei eher durch Zufall durch die Zusammenarbeit von Bruce Glick und Timothy S. Chang, in den 50iger Jahren [5]. Das eigentliche Experiment von B. Glick war eine Studie über den Einfluss der BF auf das Wachstum von Hühnern. Um dies zu ermitteln wurde jungen Hühnern die BF chirurgisch entfernt. Zum selben Zeitpunkt bereitete Timothy S. Chang einen Kurs für Studenten vor, in dem er die Produktion von Antikörpern, anhand von Hühnern die gegen *Salmonella species* „O“ Antigen immunisiert wurde, demonstrieren wollte. Dabei stellte sich heraus dass nur die Hühner von B. Glick zur Verfügung standen. In den durchgeführten Serumtests zeigte sich, dass einige der Hühner keine oder nur geringe Antikörperreaktion aufwiesen. Nach Rücksprache mit B. Glick stellte sich heraus, dass alle Tiere die keine Antikörper produzierten zu der bursektomierten Gruppe zählten und die Abwesenheit der BF somit die fehlende Antikörperproduktion verantwortet. Durch weitere Experimente konnte Glick beweisen, dass die Immundefizienz in Hühnern sich umso extremer offenbart, je früher die Tiere bursektomiert werden, die Entfernung der BF nach dem Schlupf jedoch die

Antikörper-Produktion nicht vollständig unterbinden kann. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bursektomie (chirurgisch, chemisch oder durch Strahlung) zeigte sich dasselbe Muster von mehr oder weniger vollständigem B-Zell-Verlust und einer Agammaglobulinämie [6]. Eine Behandlung mit Cyclophosphamid zwischen ET 15 und 17 führt zu einer fast vollständigen Elimination der B-Zellen [7]. Die Bursa besteht nach dieser Behandlung nur noch aus dem epithelialen Anteil der durch eine Transplantation von intakten B-Zellen jedoch wiederbesiedelt werden kann [8]. Durch eintauchen der Bruteier in eine Testosteronopiat-Lösung kann dagegen die Entwicklung der epithelialen Komponente der Bursa inhibiert werden. In diesem Fall ist die Anzahl an B-Zellen nicht reduziert, aber aufgrund der fehlenden Reifung in der Mikroumgebung der Bursa sind diese B-Zellen zu keiner normalen Immunantwort befähigt. Dem entgegen sind Immunreaktionen wie Transplantatabstoßung oder „graft-versus-host“ von der Entwicklung der Bursa gänzlich unabhängig, da sie auf T-Zell vermittelter zellulärer Immunität beruhen. Die einzigartige Rolle der BF im Immunsystem des Haushuhns, als ein zentrales lymphoides Organ in der Entwicklung der B-Zellen zeigte sich bereits durch diese ersten Experimente und, dass sowohl die epithelialen als auch die lymphoiden Anteile für eine normale Entwicklung essentiell sind.

Ein weiteres Merkmal der Bursaentwicklung ist die perinatale Differenzierung der Follikel in eine Rinden- und Markzone. Dabei migrieren Lymphozyten durch die Basalmembran und bilden durch massive Proliferation den Follikelcortex, während die Zellen im Mark nur noch geringe Teilungsaktivität zeigen [9-10]. Durch reverse peristaltische Reflexe können exogene Antigene aus dem Darm in das Lumen der Bursa gelangen und dort aktiv durch das Follikel-assoziierte Epithel ausschließlich in die Medulla transportiert werden [11-12]. Die genaue Funktion der Antigene in der Bursa ist nicht bekannt, doch zeigt eine Ligation der Verbindung zwischen Bursalumen und der Kloake eine deutlich verringerte Teilungsaktivität der IgM positiven Zellen in den Follikeln [13-14]. Deshalb wird vermutet, dass die Aufnahme von Antigenen aus dem Darm einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Zellen hat. Vermutlich werden die Antigene dabei über maternales IgY auf den FDCs gebunden und über binden dieser Immunkomplexe erhalten die B-Lymphozyten für die Entwicklung wichtige Signale [10, 15].

## **2.3. Entwicklung der B-Lymphozyten des Huhns**

B-Lymphozyten stellen den humoralen Teil des erworbenen Immunsystems. Durch die Produktion von Antikörpern kann eine Vielzahl verschiedenster Pathogene erkannt und eliminiert werden. Um diese Vielfalt zu gewährleisten, muss das adaptive Immunsystem nicht nur körpereigene von körperfremden Substanzen unterscheiden, sondern auch die Fülle von Pathogenen erkennen und bekämpfen. Die B-Zell-Funktionen des Huhns sind dabei denen bei Menschen und Mäusen sehr ähnlich, trotz der erheblichen Unterschiede in der Struktur des lymphatischen Systems und der Reifung der B-Zellen.

Embryonal werden hämatopoetische Vorläuferzellen angelegt, die sich über mehrere Entwicklungsstufen bis zur hochspezialisierten Antikörper produzierenden Plasmazelle entwickeln. Diese Entwicklungsstadien sind durch die Umordnung der Immunglobulingene (Rearrangement) und die Expression von B-Zell charakteristischen Genen gekennzeichnet. Während bei Menschen und Mäusen die Generierung neuer B-Zellen einen lebenslangen Prozess darstellt [16], ist nach der Involution der Bursa beim Haushuhn nicht bekannt wo diese speziellen Mikroklimata zum Erhalt des B-Stammzellpools lokalisiert sind. Aufgrund der speziellen Bedeutung der Bursa Fabricii wird die Entwicklung der B-Zellen beim Haushuhn in eine prä-bursale, bursale und eine post-bursale Phase unterteilt [17].

### **2.3.1. präbursale Phase**

In der prä-bursalen Phase werden hämatopoetische Vorläuferzellen in verschiedenen Orten der Hämatopoese gebildet und auf die B-Zelllinie festgelegt [2]. Mittels Bursektomie konnte dabei nachgewiesen werden, dass die BF auf diesen Entwicklungsschritt keinen Einfluss hat [18]. Als frühesten Ort der Lymphopoese wurde der Dottersack (ET 5-6) nachgewiesen, im weiteren Verlauf der embryonalen Entwicklung aber auch die Milz, Knochenmark und den para-aortischen Regionen [19-20]. Diese Orte der frühen B-Zell Entwicklung konnten anhand der Expression von Immunglobulinen identifiziert werden [21].

Bereits in diesem Zeitfenster kommt es zur Neuordnung des B-Zell-Rezeptors (BCR) durch den als „VDJ-Rearrangement“ bezeichneten Prozess [22]. Für einige Tierarten wie die Maus oder auch beim Menschen ist dieses Rearrangement der entscheidende Schritt zur Generierung einer großen BCR-Vielfalt und findet im Knochenmark statt. Im Genom dieser Tiere finden sich mehrere funktionelle Gene (beim Menschen ca. 40 Gene für die V Region) für die V-, D-

und J-Segmente des variablen Anteil des BCR, die durch Schneiden und Religation der DNA zufällig miteinander kombiniert werden [23]. Hühner zeigen dagegen nur eine geringe Anzahl dieser funktionellen Gen-Segmente, weshalb ein erfolgreicher Rearrangement in allen B-Zellen zu einem nahezu identischen BCR führt. So sind für die V- und J-Segmente sowohl für die leichte als auch die schwere Kette jeweils nur ein funktionelles Gen zu finden [24-25], lediglich für das D-Segment sind 15 Kopien auf dem Locus der schweren Kette zu finden [26]. Bereits zum Embryonaltag 5-6 können erste rearrangierte DJ-Segmente der schweren Kette im Dottersack und wenig später auch in der Milz nachgewiesen werden [22, 27]. An der Zelloberfläche wurden Immunglobuline frühestens zwischen Embryonaltag 10 und 15 nachgewiesen [28]. Ein weiterer Unterschied zum Menschen ist die Reihenfolge der Immunglobulin-Neuanordnung. Beim Menschen findet immer zuerst das VDJ-Rearrangement der schweren Immunglobulin-Kette statt, die dann mit einer „surrogate light chain“ als prä-B-Zellrezeptor an der Zelloberfläche exprimiert wird. Erst über diesen prä-BCR wird der Zelle das Signal zur Rearrangierung der leichten Kette übermittelt. Im Vergleich dazu findet das Rearrangement der schweren und leichten Kette beim Huhn im selben Zeitfenster statt, und ein prä-BCR kann auf Grund des fehlenden Gens für die „surrogate light chain“ nicht produziert werden [29].

Nach einer erfolgreichen VDJ-Rekombination wird der bis dahin invariable BCR als Rezeptorkomplex mit dem Heterodimer aus *CD79a* und *CD79b* ( $I\alpha/I\beta$ ) auf der exprimiert [30].

Die Verfolgung dieser frühen B-Zellstadien war unter anderem durch das Zelloberflächenmolekül *Bu-1*, oder auch *chB6* genannt, möglich [28]. Bislang konnte kein homologes Molekül im Säuger-Genom nachgewiesen werden, weshalb es als ein einzigartiger B-Zellmarker unbekannter Funktion beim Huhn gilt [31-32]. Aufgrund der Untersuchungen mit Hilfe dieses B-Zellmarkers auf zellulärer Ebene sowie Genexpressions-Analysen auf Transkriptionsebene konnte die Spaltung in B- und T-Zellvorläufer noch vor Besiedelung der primären lymphatischen Organe nachgewiesen werden [32-33].

### 2.3.2. Bursale Phase

Die Besiedelung der Bursa-Anlage erfolgt, im Gegensatz zu der 3phasigen Einwanderung der T-Zellen in den Thymus (ET 15, 21 und Tag 6) [34-35], durch eine einzige Welle von prä-bursalen Stammzellen zwischen Embryonaltag 8 und 14 [2]. Wie unter 2.3.1 beschrieben haben sind die in die Bursa einwandernden Zellen durch das VDJ-Rearrangement bereits auf die B-Lymphozyten-Linie festgelegt. Durch Parabiose-Experimente, in denen die Blutkreislaufsysteme von 2 Tieren verbunden wurden, konnte gezeigt werden, dass die Zellen die die BF besiedeln aus dem Blut stammen [36]. Unklar erscheint jedoch, wie das Bursamesenchym selektioniert welche Zellen einwandern können und welche nicht.

Im Folgenden kommt es zur Proliferation der B-Zellen, wodurch die Anzahl der Zellen pro Follikel bis zum Alter von 3-5 Wochen von wenigen auf bis ca.  $10^5$  ansteigt [37]. Auf Grund der Tatsache, dass zum Zeitpunkt des Schlupfs die Bursafollikel aus 90-95% IgM+ Lymphozyten bestehen ist davon auszugehen das nur B-Zellen die ein erfolgreiches Rearrangement des BCR erfahren haben zur weiteren Teilung angeregt werden [22]. Indessen wird die Mehrzahl (ca. 95%) an Lymphozyten mit einem nicht produktiven Rezeptor durch Apoptose von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen [38]. Diese positive Selektion stellt einen wichtigen Kontrollpunkt dar, so dass nur B-Zellen die einen funktionellen BCR tragen eine weitere Differenzierung erfahren können. Die Hypothese dass der BCR selbst die Überlebenssignale ins Zellinnere leitet wurde lange angenommen, jedoch zeigten Experimente mit einem genetisch verkürzten BCR das die Erkennung eines Liganden durch den Rezeptor keinen Einfluss auf die Entwicklung der Zellen hat. Vermutlich ist eher die gemeinsame Oberflächenexpression des gesamten BCR-Komplexes (BCR, Ig $\alpha$ , Ig $\beta$ ) ähnlich wie bei Mensch oder Maus für die Entwicklung wichtig, da eine Ig $\alpha$ - oder Ig $\beta$ -Defizienz zu erheblichen Störungen des B-Zellsystems führt [27].

Im Verlauf der bursalen Entwicklungsphase wird der BCR durch einen Prozess, der Genconversion, modifiziert [25]. Dabei werden einzelne Sequenzabschnitte der variablen Ig-Anteile durch Sequenzen aus sogenannten Pseudogenen ersetzt (siehe 2.4). Die durch die Genconversion resultierenden Varianzmöglichkeiten übertreffen dabei mit  $10^{11}$  noch die des Menschen [23].

### 2.3.3. Postbursale Phase

Mit der Emigration der B-Lymphozyten aus der Bursa und der Besiedelung der peripheren lymphatischen Organe beginnt die postbursale Entwicklungsphase. Bereits kurz vor dem Schlupf beginnen zunächst wenige B-Zellen die Bursa zu verlassen. Im Alter von 3 Wochen erreicht die Auswanderungsrate ihr Maximum von 1% der peripheren B-Zellen pro Stunde [39]. Wie und wo der Pool an B-Zellen nach der Involution der Bursa aufrecht erhalten wird ist bisher unklar. Vermutlich ist eine kleine Population an postbursalen Stammzellen dafür verantwortlich, deren Ursprung ebenfalls noch unbekannt ist [40].

Im peripheren Blut lassen sich nach dem Schlupf 3 Populationen an B-Lymphozyten unterscheiden, die sich besonders in ihrer Lebensspanne deutlich unterscheiden. Die erste Population besteht aus sehr kurzlebigen Zellen, mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten die jedoch den größten Anteil von 60-70% der peripheren B-Zellen darstellt. Für diese Zellen wurde gezeigt, dass sie aus dem Cortex der Bursafollikel stammen und die Bursa vermutlich über extrafollikuläre Lymphgefäße oder das dichte cortiko-medulläre Kapillarnetz verlassen. Somit handelt es sich um naive B-Zellen, die noch keinen Kontakt zu einem spezifischen Antigen hatten. Die zweitgrößte Population stellt eine Gruppe von B-Zellen mit einer mittleren Überlebenszeit von ca. 12 Tagen. Diese Zellen haben einen Anteil von 35% der gestammten peripheren Blut-B-Lymphozyten und stammen evtl. aus dem Follikelmark, wo sie nach dem Kontakt zu antigenpräsentierenden FDCs zu langlebigeren Zellen gereift sind [39]. Im Vergleich stellen damit die Zellen der ersten Population den Hauptteil der die Bursa verlassenden B-Lymphozyten, nur ca. 4% der emigrierenden Zellen lassen sich der Gruppe 2 zuordnen. Die dritte Population zeichnet sich durch eine sehr hohe Überlebenszeit von 100 Tagen aus, macht jedoch im Alter von 2-3 Wochen auch den kleinsten Bestandteil der PBL, von 5%, aus. Aufgrund ihrer extremen Langlebigkeit nimmt die prozentuale Menge im weiteren Alter jedoch stark zu. Zudem konnte man zeigen, dass die Teilungsfähigkeit dieser Zellen auch außerhalb der Bursa erhalten bleibt. Fraglich ist jedoch noch, ob die Zellen dieser dritten Population eventuell die Vorläufer der extrabursalen Stammzellen sind oder ob eine weitere Gruppe von Bursa-unabhängigen B-Zellen den peripheren B-Zell-Pool nach Involution der Bursa aufrecht erhält [39, 41-42].

Die Entwicklung der Lymphozyten in den zentralen (oder auch primären) lymphatischen Organen, wie BF oder Thymus, dient der Reifung der Zellen bis zum Stadium des naiven Lymphozyten. Durch die Differenzierungsschritte wird die Rezeptorvielfalt generiert. Um in die Peripherie zu gelangen, müssen multiple Kontrollmechanismen zu bestanden werden. Lymphozyten die während der Entwicklung eine Autoreaktivität entwickeln oder die Fähigkeit

Immunglobuline auf der Oberfläche zu exprimieren werden durch gezielte Apoptose eliminiert (negative und positive Selektion). So können nur ca. 5% der in der Bursa gebildeten Zellen diese auch verlassen [38, 43].

Die Besiedelung der peripheren (oder auch sekundären) lymphatischen Organe dient dazu, eine regulierte Aktivierung durch Antigenkontakt zu steuern. Im Gegensatz zu Mensch und Maus weisen die sekundären lymphatischen Organe beim Huhn keine Primärfollikel auf, in denen eingewanderte aktivierte B-Zellen in der Germinalen Zentrums-Reaktion proliferieren und durch Affinitätsreifung und Immunglobulin-Klassenwechsel zu hochaffinen Antikörperproduzierenden Plasma- und Gedächtniszellen werden [44]. Trotz dem findet man bei Hühnern ähnlich den Säugern Germinal-Zentren In lymphatischen Geweben [45-46]. Diese liegen jedoch in den T-Zellregionen an einer Arteriole und sind von einer Bindegewebskapsel umgeben.

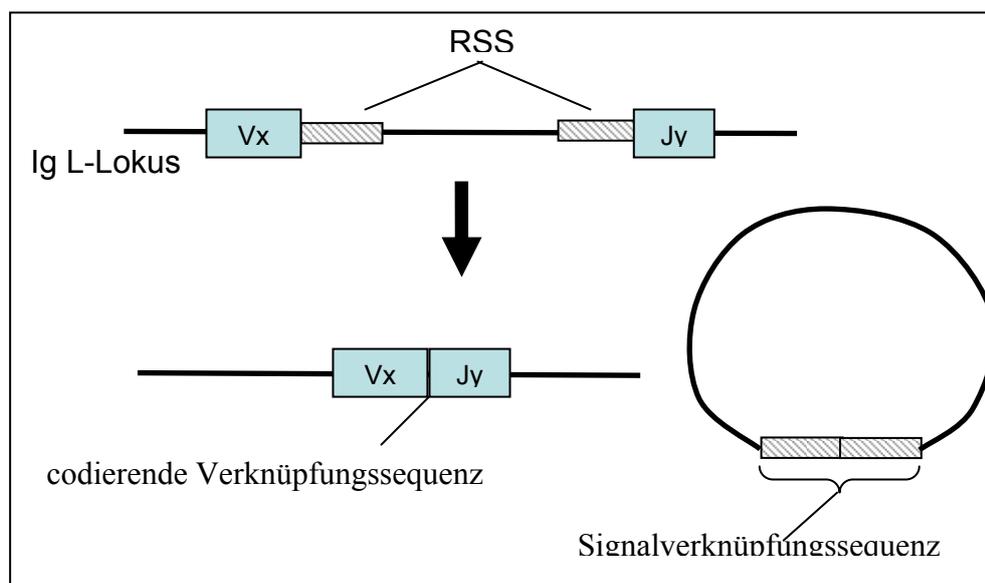
Als Folge einer T-Zellabhängigen Antigenspezifischen B-Zellantwort kommt es in der germinalen Zentrums-Reaktion zu weiteren Veränderungen des BCR durch somatische Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel.

## **2.4. Molekulare Mechanismen in der B-Lymphozyten Reifung**

Während der Reifung von Lymphozyten kommt es zur molekularen Umgestaltungen des Rezeptors auf genetischer Ebene. Das stellt eine Besonderheit dar weil ein Organismus ansonsten auf die Unveränderlichkeit des genetischen Materials angewiesen ist, und mannigfache Reparaturmechanismen das Erbgut ständig überwachen. Erstaunlicherweise sind es gerade diese genetischen Veränderungen der Rezeptorgene auf denen das Funktionsprinzip des adaptiven Immunsystems beruht. Nur durch die variablen Änderungen, die für jede B-Zelle einzigartig sind, und der Selektion auf vorteilhafte Modifikationen kann die enorme Rezeptorvielfalt ( $10^{11}$ ) generiert werden um der Masse an Pathogenen entgegen zu wirken.

### 2.4.1. VDJ-Rekombination

Die VDJ-Rekombination stellt die erste genetische Änderung während der Entwicklung einer B-Zelle dar. Wie bereits unter 2.3.1. beschrieben stellt dieser Mechanismus für einige Tierarten und den Menschen die Grundlage für die Rezeptorvarianz. Dem Huhn fehlt jedoch auf Grund der beschränkten Anzahl an funktionellen Genen die Möglichkeit eine ausreichende Vielfalt des variablen Immunglobulin-Bestandteils zu generieren. Nichts desto trotz ist die VDJ-Rekombination auch bei Hühnern die Grundlage für eine weitere Entwicklung der B-Zellen [19]. Eine weitere Eigenheit des Huhns ist, dass das Genom nur eine leichte Kette enthält, während Mäuse und Primaten einen  $\kappa$  und  $\lambda$  Locus haben. Diese Leichte Kette entspricht dabei aufgrund ihrer Struktur und der Anordnung der Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) eher der  $\lambda$ - als der  $\kappa$ -Kette. Der variable Anteil der schweren (H) und leichten (L) Immunglobulinketten setzt sich aus verschiedenen Gensegmenten zusammen, die H-Kette enthält ein V (variable), D (diversity) und J (joining) Segment, die L-Kette dagegen nur ein V und J [23]. Während bei Primaten und Mäusen für jedes dieser Segmente mehrere Varianten für die Rekombination zur Verfügung stehen ist beim Huhn für das V- und J-Segment nur ein funktionelles Segment vorhanden. Lediglich für die schwere Kette wurden 15 D-segmente nachgewiesen, die jedoch nur eine geringe Diversität zeigen. Jedes dieser Segmente wird von hochkonservierten Rekombinations-Signal-Sequenzen flankiert. Während der Rekombination werden die RSS von 2 Gen-Segmenten (z.B. V- und J- Segment) in räumliche Nähe zueinander gebracht, geschnitten und durch Ligation der Gensegmente neu angeordnet (s. Abb.2). Gensegmente zwischen den beiden neu angeordneten Genen werden ausgeschnitten und die freien Enden zur Signalverknüpfungssequenz verknüpft [19].



**Abb. 2:** Schema einer VJ-Rekombination der leichten Immunglobulinkette

Der Mechanismus der Rekombination scheint zwischen Vögeln und Säugern hochkonserviert zu sein und wird maßgeblich durch den Rekombinase-Enzymkomplex gesteuert. Als essentielle Bestandteil dieses Komplexes dienen die Produkte der RAG1 und RAG2 Gene, die nur in Lymphozyten im Zeitraum des Rearrangements exprimiert werden [47]. Neben diesen Proteinen sind auch weitere Enzyme am Komplex beteiligt, die jedoch ubiquitär vorhanden sind und vor allem den DNA-Reparatur-Mechanismen zugeordnet werden. RAG-Moleküle erkennen RSS, lagern sich an die DNA-Abschnitte an und ordnen sie nebeneinander an. Durch diese Komplexierung wird die Endonukleaseaktivität der RAG-Enzyme aktiviert und es entstehen zwei Einzelstrangbrüche an den 5'-Enden der gebundenen RSS, durch Hydrolyse der 3'-Enden kommt es zu einem glatten Doppelstrangbruch. Die freien DNA-Enden werden durch die assoziierten Reparaturenzyme miteinander verknüpft und die freien Enden der ausgeschnittenen DNA-Sequenz werden an den RSS zur Signalverknüpfungssequenz und als ringförmiges Molekül freigesetzt. Damit gehen diese Informationen dem Genom unwiderruflich verloren. Säuger zeigen zudem eine relativ ungenaue Verknüpfung zwischen den beiden Gen-Segmenten wobei durch die terminale Deoxyribonukleotidyl-Transferase zusätzliche „non-template“ (N) oder pallindrom (P) Nukleotide an der Verknüpfungsstelle eingefügt oder einzelne Nukleotide durch Exonukleasen entfernt werden. Somit entsteht bei jeder Rekombination eine codierende Verknüpfungssequenz, wodurch die Varianz zusätzlich erhöht wird die als „junktionale diversity“ bezeichnet wird. Vögel zeigen zwar Nukleotiddeletionen und P-Nukleotide, dagegen jedoch keine Anzeichen von N-Nukleotiden im Verknüpfungsbereich der Gen Segmente.

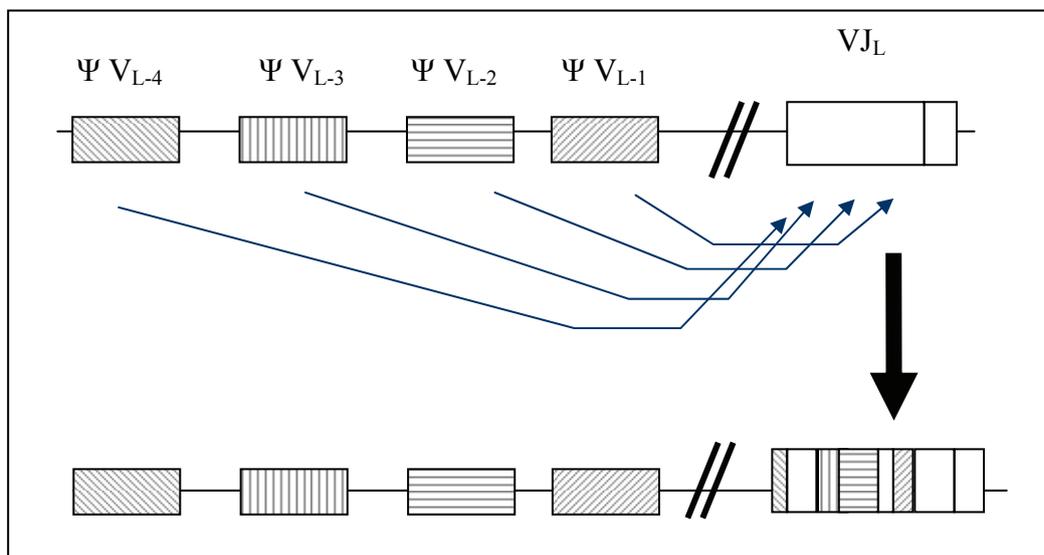
Begründet in diesem willkürlichen Mechanismus ist die Ineffizienz des Rearrangements. So liegt ca. 2/3 aller Neuaneordnungen außerhalb des Leserasters und erzeugt damit kein funktionelles Immunglobulin.

#### **2.4.2. Genconversion**

Durch das VDJ-Rearrangement kann in Hühner-B-Zellen nur eine minimale Vielfalt der variablen Immunglobulin-domäne gebildet werden, so dass alle B-Zellen einen nahezu identischen Rezeptor tragen. Tatsächlich zeigten Sequenzanalysen der leichten Kette jedoch eine weitaus größere Varianz. Diese Sequenzen zeigen dagegen Übereinstimmungen mit Regionen die sich strangaufwärts des funktionellen V-Lokus befinden. Diese Familie von Sequenzen die eine strukturell hohe Homologie zu dem variablen Teil der leichten Kette hat, enthalten jedoch keine Promotorsequenzen und RSS und wurden somit als nicht-funktional

klassifiziert [9, 48]. Dennoch konnte durch diese Entdeckung das Prinzip der Genconversion erarbeitet werden und somit den Mechanismus zur Generierung der Antikörpervielfalt bei Vögeln erklären [49].

Diese als Pseudo-V-Gene ( $\psi V$ ) bezeichneten Bereiche dienen während der Zellteilung als Donor für den Austausch von Sequenzen mit dem rearrangierten BCR (s. Abb.3), wobei der Austausch einen individuellen, nicht reziproken Prozess darstellt und die Länge des ausgetauschten Abschnittes stark variiert. Dabei zeigt sich, dass  $\psi V_L$  die dichter am rearrangierten V-Gen liegen häufiger verwendet werden, der Abschnitt jedoch unabhängig von der Lage des Pseudogens von 10 bis 300 Nukleotiden schwanken kann und Pseudogene die näher am Ig-Lokus und in Antisense-Orientierung liegen häufiger verwendet werden[50]. Die Bursa Fabricii bietet den B-Zellen das geeignete Mikroklima für eine rasche klonale Expansion und somit die Möglichkeit, während der Zellteilung den BCR zu Diversifizieren. Man weiß heute, dass nicht jede Teilung zu einem Genconversions-Ereignis führt sondern nur alle 10 bis 15 Zyklen wodurch während der bursalen Entwicklung einer Zelle 4 bis 10 Substitutionen auftreten können [50].



**Abb. 3: Genconversion:** Austausch von Gensequenzen des rearrangierten Immunglobulins mit  $\psi V$ -Genen führt zu individueller Diversität der B-Zellen

Auch für die schwere Kette konnte gezeigt werden, dass die Genconversion den entscheidenden Mechanismus darstellt, wobei sowohl  $\psi V_H$  als auch  $\psi D_H$  Sequenzen verwendet werden. Theoretisch kann durch den Prozess der Genconversion eine Varianz von  $10^{11}$  verschiedenen Antikörpern erzielt werden [51-52].

Eine wichtige Erkenntnis in der Erforschung des Genconversions-Mechanismen stellt die Identifizierung der „activation-induced cytidine deaminase“ (AID) als einen essentieller Faktor dar [53]. Ursprünglich wurde die AID durch humane Immundefizienzen entdeckt die durch eine Abwesenheit von somatischer Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel in peripheren B-Zellen gekennzeichnet sind [54]. Durch Deletion der AID in der Hühner-B-Zelllinie (DT40) konnte gezeigt werden, dass es bei fehlender AID-Aktivität zu einer kompletten Blockierung der Genconversion kommt. Durch die AID kommt es in einzelsträngiger DNA durch Methylierung zu einer Cytosin- zu Uracil- Transversion [55]. Dieses falsche Uracil wird durch DNA-Reparaturmoleküle als falsch erkannt und durch ein weiteres Enzym, die „uracil DNA glykosylase“ (UNG) ausgeschnitten, wodurch eine Lücke im Phosphat-Zucker-Rückgrat der DNA entsteht. Diese Lücken scheinen nicht nur die Grundlage für die Genkonversion sondern auch somatische Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel zu bilden [56]. Der Vorgang des Segmentaustauschs zwischen den DNA-Strängen scheint dabei, ähnlich den „crossing over“ während der meiotischen Zellteilung, durch parallele Anlagerung der Stränge zu beruhen.

Die Tatsache, dass nur einzelsträngige DNA als Substrat der AID dient, kann dabei auch erklären weshalb Genkonversion nur in rearrangierten V-Regionen die transkribiert werden vorkommt. Erst durch die bei der Transkription entstehende Transkriptionsblase wird die DNA entwunden und der nicht abgelesene Strang für die AID zugänglich [57]. Unklar ist dagegen, wieso die AID selektiv im Bereich des Immunglobulin-Lokus aktiv ist und andere Gene die transkribiert werden nicht beeinflusst werden.

### **2.4.3. Somatische Hypermutation und Immunglobulin Klassenwechsel**

Während der Differenzierung der peripheren B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen kann der B-Zellrezeptor durch weitere Mechanismen verändert werden. Neben der optimalen Anpassung der B-Zellrezeptoren an das Antigen durch den Prozess der Affinitätsreifung kommt es zur Induktion des Immunglobulin-Klassenwechsels. Für diese Prozesse spielt die AID ähnlich der Genconversion eine entscheidende Rolle [54, 58-59].

## 2.5. Entwicklung der B-Lymphozyten bei anderen Spezies

Lange Zeit wurde angenommen dass die im Mausmodell generierten Erkenntnisse über die Reifung von B-Lymphozyten als Dogma für alle Säuger gelten. Inzwischen konnte dagegen gezeigt werden, dass bei einigen unserer Haustierrassen die GALT-Gewebe als primär lymphatisches Reifungsorgan für B-Zellen dienen. Zu diesen als GALT-Species bezeichneten Tierarten zählen Kaninchen [60-61], Schafe [9, 51, 62], Rinder [63-64] sowie Schweine [65]. Hiermit zeigt sich, dass das Immunsystem des Huhns nicht nur aufgrund seiner wirtschaftlichen Bedeutung, sondern auch als Modellorganismus für andere Tierarten von erheblichem Interesse ist. B-Zell-Diversifikation in GALT-Gewebe wurde zuerst für Hühner beschrieben, wobei die nur für Vögeln beschriebene Bursa Fabricii der zentrale Ort der B-Zellreifung ist. In Säuger GALT-Spezies führt das VDJ-Rearrangement nur zu einer geringen Diversität des Immunglobulins. Zur Generierung des primären Antikörperrepertoires bedienen sich daher anderer lymphoider Strukturen des Darms.

Kaninchen nutzen die lymphoiden Strukturen des Sacculus rotundus, des Appendix und der Peyerschen Platten (PP) zur Diversifizierung des Immunglobulins mittels Genkonversion. Besonders der Appendix junger Kaninchen zeigt dabei auffallend strukturelle und funktionelle Homologien zur BF der Hühner. Während die BF in der früher Embryonalphase durch eine einzelne Welle von präbursalen Stammzellen besiedelt wird, kommt es bei Kaninchen erst kurz nach der Geburt zur Besiedelung des Appendix. Dabei wurde neben dem auch im Huhn beschriebenen „Sialyl-Lewis-X“ das Lymphknoten Addressin „PNAd“ und sein Rezeptor CD62L als essentieller Faktor zur Steuerung der Immigration der B-Zellen nachgewiesen [66].

Auch bei Schafen und Rindern wurde gezeigt, dass Darm-assoziiertes Lymphgewebe als zentraler Ort der B-Zellreifung fungiert. Die ersten IgM<sup>+</sup> Zellen lassen sich im Rind zum Embryonaltag 68-70 in den Peyerschen Platten des terminalen Ileums nachweisen, und ab ET 75 sind erste Follikel sichtbar. Zur Geburt sind bis zu 25-40 PP im Bereich des Ileums aufzufinden. Für Schafe scheint die Entwicklung analog zu verlaufen, jedoch sind erste Follikel erst ab der Mitte der Gestation nachweisbar (ET 61). Zur Generierung der primären Antikörpervielfalt kommen in Rind und Schaf verschiedene Mechanismen zum Einsatz. So zeigen sowohl der Locus der schweren als auch der leichten Kette die Möglichkeit der Genkonversion, allerdings finden sich besonders für die leichte Kette 64 verschiedene VL-Gene für das Rearrangement zur Verfügung stehen. Daher wird vermutet dass die Diversität im Fall der schweren Kette durch Genkonversion und somatische Hypermutation, während die Varianz der leichten Kette zu einem größeren Anteil durch die VDJ-Rekombination entsteht [67].

## **2.6. Regulation der B-Lymphozyten Reifung**

Während die molekularen Ereignisse der B-Zellrezeptor-Diversifizierung beim Huhn gut untersucht sind [25, 48], ist über jene Signale die Zelltod, Überleben und B-Zellentwicklung regulieren wenig bekannt. Seit Verfügbarkeit der EST-Datenbanken und Publikation des Hühnergenoms sind Informationen zugänglich die die Untersuchung der Phylogenie, Struktur und Funktion des aviären Immunsystems und eben jener regulatorischen Signale erleichtern [68].

Eine große Gruppe immunregulatorischer Moleküle bilden dabei die Zytokine. Diese sind Peptide die als extrazelluläre Signale zwischen den an der immunologischen Entwicklung oder Immunantwort beteiligten Zellen agieren. Sie können Immunantworten auslösen oder regulieren.

Einige der beim Säuger bekannten Zytokine und Chemokine konnten zwischenzeitlich auch beim Huhn identifiziert werden. Dabei zeigte sich das die Vertreter der TNF-Superfamilie „B-cell activating factor belonging to the TNF-family“ (BAFF) [69] und CD40-Ligand [70] wichtige Funktionen in der Entwicklung von B-Zellen haben. BAFF ist ein, von B-Zellen selbst produziertes, Zytokin für das eine entscheidende Rolle im Bezug auf B-Zellreifung, Überleben in der Peripherie sowie für einen CD40 unabhängigen Ig-Klassenwechsel bestätigt wurde.

Bereits in den 80er Jahren wurde ein Hormon-ähnliches Tripeptid (Lys-His-Gly-NH<sub>2</sub>) beschrieben das in der Bursamedulla und unter dem interfollikulären Epithel nachgewiesen wurde. Dieses als Bursin bezeichnete Peptid kann sowohl Hühner als auch Mäuse B-Zellen zur Differenzierung anregen und scheid Einfluss auf die Diversifikation des BCR und auch Ig-Klassenwechsel zu nehmen [71], wurde jedoch in den letzten Jahrzehnten nicht weiter untersucht.

### **2.6.1. Adhäsionsmoleküle**

Die spezifische Adhäsion von Zellen untereinander oder deren Anheftung an die extrazelluläre Matrix ist eine grundlegende Voraussetzung für die Zellerkennung und Prozesse der Zellmigration. Neben der Funktion bei morphologischen Ereignissen während der Entwicklung wird dadurch auch in den adulten Organen die normale Organisation von Geweben bestimmt. Sie ist Grundlage für so vielfältige Prozesse wie das Überleben von Zellen, Apoptose,

Zelldifferenzierung, Proliferation, Homöostase oder Wundheilung. Bei diesen Phänomenen zeichnet sich die Adhäsion durch Spezifität (Interaktionen von Rezeptoren mit ihren Liganden), Dynamik (Veränderung der Expression und / oder der Affinität von Adhäsionsmolekülen) und Informationsgehalt (Veränderung von Phänotyp, Zellform, Stadium der Zelldifferenzierung oder Position im Zellzyklus) aus. Zelladhäsionsmoleküle lassen sich unterschiedlichen Familien von Zelloberflächen-Rezeptoren zuordnen: Selektine, Immunglobulin-Superfamilie, Integrine verschiedene, sowie eine Reihe nicht miteinander verwandter Oberflächenmoleküle mit adhäsiven Fähigkeiten.

Aus der Gruppe der Selektinliganden ist „Sialyl-Lewis-X“ als Faktor für die Migration der Stammzellen in die Bursa beschrieben [72]. Sialyl-Lewis-X wird nur von präbursalen und bursalen B-Zellen exprimiert. Vermutlich können B-Zellen über diesen Selektinliganden an einen bislang unbekanntem Rezeptor in den Gefäßendothelien in der Bursa binden, wodurch die Leukozyten in die Bursa migrieren können. In Laufe der bursalen B-Zell-Phase kommt es zu einer Änderung der Glykosilierungsmusters zu Lewis-X, wodurch die Oberflächenexpression von Sialyl-Lewis-X abnimmt. Zum Zeitpunkt des Schlupfes kommt es zu einer deutlichen Herunterregulierung der Lewis-X Expression, was evtl. eine Auswanderung der B-Zellen aus der Bursa erst ermöglicht [73].

### **2.6.2. Zytokine**

Zytokine sind hormonähnliche, zellregulatorischen Peptide oder Glycopeptide mit einem Molekulargewicht von <60 kDa. Sie sind bereits in femtomolaren Konzentrationen wirksam. Wegen ihrer kurzen Halbwertszeiten (Sekunden bis Minuten) werden sie meist nur vorübergehend produziert. Deshalb können sie hochspezifisch sein und schnell z.B. auf das Vorhandensein von Fremdkörpern reagieren. Dabei bilden sie zusammen mit anderen Zell-zu-Zell-Signalstoffen ein Kommunikationsnetzwerk, das sowohl die Aktivierung immunkompetenter Zellen untereinander als auch die Regulation nicht immunassoziierter Gewebe (z.B. Endothelzellen) ermöglicht. Das Netzwerk ist parakrin, endokrin und autokrin wirksam. Des Weiteren zeigen Zytokine meist eine pleiotrope Wirksamkeit, die deren Effizienz zusätzlich steigert. Hinzu kommt, dass unterschiedliche Zytokine auch die gleiche Signaltransduktionskaskade aktivieren können. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Zytokine in der Lage, Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose der Zielzellen zu nehmen. Auch sind Interaktionskaskaden möglich, bei denen ein Zytokin die

Sekretion weiterer Zytokine induziert. Die Wechselwirkungen von Zytokinen können also in der Summe additiv, synergistisch oder sogar antagonistisch sein. Entscheidend dabei ist die Reihenfolge, in der die Zellen den Zytokinmediatoren ausgesetzt sind.

Zu den Zytokinen werden Interleukine, Chemokine, Interferone und Wachstumsfaktoren gezählt. Je nach Ursprung wurden sie zunächst als Monokine oder Lymphokine bezeichnet. Diese Terminologie suggeriert eine klare Zuordnung zu einem Zelltyp oder Wirkungsort. Viele Zytokine werden jedoch sowohl von Lymphozyten als auch Monozyten gebildet. Chemokine sind chemotaktisch wirksame Zytokine, die Leukozyten an einen gewünschten Ort lotsen, und sie dort aktivieren (s. 2.6.3). Die Bezeichnung Interleukine wird für Zytokine verwendet, die hauptsächlich Zellinteraktionen der Leukozyten steuern. Je nach Wirkung werden Zytokine auch häufig in pro- und antiinflammatorische sowie immunregulatorische Zytokine unterteilt. Zu den proinflammatorischen Zytokinen wird z. B. IL-8 gezählt, zu den antiinflammatorischen IL-10 und zu den immunregulatorischen IL-2, IL-6 und IFN- $\gamma$ .

Die große Bedeutung der TNF Rezeptor und TNF Liganden Familien für die Ausbildung eines intakten Immunsystems wurde erkannt, als man eine Mauslinie mit deletiertem LT- $\alpha$ -Gen erzeugt hatte und feststellte, dass diese Mäuse keinerlei Lymphknoten ausbildeten und eine veränderte Milzarchitektur aufwiesen [74]. Die B-Zellen betreffend sind als wichtige Vertreter hierbei CD40L, BAFF und APRIL [75-76] zu nennen. „B-cell activating factor belonging to the TNF-family“ (BAFF) ist von größter Wichtigkeit für das Überleben der B-Zellen in der Peripherie, für die B-Zellreifung, sowie für einen CD40L unabhängigen Ig-Klassenwechsel [77-78]. Bis auf wenige Ausnahmen bindet ein TNF Ligand nur an einen bestimmten TNF Rezeptor. Eine Ausnahme hiervon ist BAFF, welches in der Lage ist an drei verschiedene Rezeptoren zu binden: BAFF-R, BCMA und TACI [79].

Das Interleukin 7 (IL-7) spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der T-Zellen und deren periphere Homöostase [80]. Die Eigenschaft das IL-7 das Wachstum unreifer B-Lymphozyten induzieren kann wurde in verschiedenen Experimenten nachgewiesen [81-82]. Zudem konnte in IL-7 defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die Abwesenheit von IL7 zu einem Entwicklungsstopp von der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle führt [83].

### 2.6.3. Chemokine

Eine Untergruppe der Zytokine sind die Chemokine, die eine umfassende Aufgabe in der Zellverständigung haben. Chemokine sind chemotaktische Proteine mit einem Molekulargewicht von 8–10 kDa. Sie übernehmen regulatorische Tätigkeiten im Hinblick auf z.B. Wundheilung, Entzündung, Angiogenese wie auch Angiostase, Steuerung von Immunantworten, Migration von Zellen, Entwicklung von TH1/TH2- Lymphozyten, Entwicklung von lymphoiden Organen aber auch Metastasierung bei malignen Erkrankungen [84].

Dementsprechend existieren für die einzelnen Chemokine auch spezielle Rezeptoren, sogenannte Chemokinrezeptoren. Diese Chemokinrezeptoren kommen auf vielen Zellen des Körpers vor, besonders auf Immunzellen wie T- oder B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen/Mikroglia, Monozyten aber auch auf gewebeständigen Zellen wie Endothelzellen oder Astrozyten. Bestimmte Chemokine können auf mehrere Rezeptoren wirken und durch diese auch unterschiedliche Reaktionen hervorrufen, daher ist die Expression der jeweiligen Rezeptoren von der Zellart und auch deren Lokalisation im Organismus abhängig, je nachdem, welche Aufgabe die Zelle hat, ob also z.B. eher immunmodulatorische Signale vermittelt werden sollen oder Zellmigration induziert werden soll [85]. Auch einige Infektionskrankheiten, insbesondere durch das Humane-Immundefizienz-Virus verursachte Erkrankungen, können mit Chemokinrezeptoren in Verbindung gebracht werden, da die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf aktivierten T-Lymphozyten dem Virus als Eintrittspforte in die Zelle dient oder auch CXCR5 das eine Rolle in der Immunpathologie der HIV-Erkrankung spielt [86-88].

Chemokine präsentieren spezifische Cysteinemotive in ihrer Aminosäuresequenz. Die meisten Chemokine haben vier charakteristische Cysteinbausteine und abhängig von ihrem Aufbau in den ersten beiden Cysteinen unterscheidet man CXC ( $\alpha$ ), CC ( $\beta$ ), C ( $\gamma$ ), and CX3C ( $\delta$ ) Chemokinklassen. Einzig die gamma-Klasse besitzt nur zwei Cysteine statt vier. CXC- und CX3C-Chemokine haben zwischen den ersten beiden Cysteinbausteinen Aminosäuren, bei der CXC- Familie ist es eine Aminosäure, bei der CX3C Familie sind es drei Aminosäuren. Die Nomenklatur hängt an die jeweiligen Chemokin-Familien ein L und eine Nummer für die Liganden (Chemokine). Chemokinrezeptoren sind G-Proteingekoppelte, Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren (GPCR), entsprechend der Rhodopsin-Typ-Familie. Basierend auf der bindenden Klasse der Chemokine werden die Chemokinrezeptoren in CXCR1-5 (bindet CXC-Chemokine), CCR1-10 (bindet CC-Chemokine), XCR1 (bindet C-

Chemokine bzw. Lymphotactin) und CX3CR1 (bindet CX3C-Chemokine bzw. Fraktalkin) unterteilt.

Die CC-Chemokine bilden die größte der vier Chemokinfamilien. Generell leiten CC-Chemokine mononukleäre Zellen in Regionen chronischer Entzündung. Das am ausführlichsten charakterisierte CC-Chemokin ist das „monocyte chemoattractant protein“ (MCP)-1 (CCL2). Hierbei handelt es sich um einen starken Agonisten für Monozyten, dendritische Zellen, Gedächtnis- T- Zellen sowie basophile Granulozyten [89-90]. Die Familie der CXC-Chemokine, enthält einige Mitglieder in der Lage sind, polymorph-kernige Leukozyten an Orte akuter Entzündung zu dirigieren. IL-8 (CXCL8), der am besten untersuchte Vertreter dieser Gruppe, kann unter anderem Monozyten und Granulozyten aktivieren [91]. CXC- Chemokine scheinen außerdem wichtige Mediatoren der Angiogenese zu sein [92]. Eine Untergruppe der CXC- Chemokine trägt zusätzlich zum CXC-Motiv die charakteristische Aminosäuresequenz Glutaminsäure- Leucin- Arginin (ELR) nahe ihrem N-Terminus. Diese ELR+ CXC- Chemokine (u.a. IL-8) sind chemotaktisch für Neutrophile und tragen positiv zur Wundheilung bei. Die Produktion von ELR+ CXC-Chemokinen wird durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  oder bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) induziert [84]. Eine besondere Stellung unter den CXC-Chemokinen nimmt CXCL16 ein, da es, ebenso wie das CX3C-Chemokin CX3CL1 (s. u.) primär als membrangebundenes Molekül vorkommt, welches über eine mehrfach O-glykosylierte, mucin-ähnliche Domäne in der Membran verankert ist und durch limitierte Proteolyse in seine lösliche Form überführt werden kann [93-94].

Die Familie der CX3C-Chemokine besteht bis zum heutigen Zeitpunkt aus nur einem Mitglied, dem Chemokin Fraktalkin (CX3CL1; Neurotactin) [95] und besitzt drei Aminosäuren zwischen den N-terminalen Cysteinen. Neben dem bereits erwähnten CXCL16 ist CX3CL1 das zweite bekannte Chemokin, welches als membrangebundenes Molekül ebenso wie als löslicher Mediator vorkommen kann [96]. In seiner membrangebundenen Form wirkt es als Zelladhäsionsmolekül, während es in Lösung als Chemoattraktant für Lymphozyten wirken kann. Die Lymphotactine Ltn- $\alpha$  (XCL1) und Ltn-  $\beta$  (XCL2) sind bisher die einzigen Mitglieder der Familie der XC-Chemokine mit nur einem konservierten Cystein am N-Terminus. Ltn-1 ist ein starker chemotaktischer Stimulus für T- Lymphozyten, allerdings nicht für Monozyten [97].

Neben der Einteilung nach strukturellen Merkmalen in die vier genannten Familien lassen sich Chemokine auch nach ihren physiologischen Merkmalen wie Umstände und Ort ihrer Produktion ebenso wie der zellulären Verteilung ihrer Rezeptoren einteilen. So unterscheidet man zwischen inflammatorischen (induzierbaren) Chemokinen und homöostatischen (konstitutiven) Chemokinen [98]. Chemokine, die sowohl inflammatorisch als auch homöostatisch wirken können, werden als duale Chemokine bezeichnet. Inflammatorische Chemokine sind solche, die eine Rekrutierung von Effektor- Leukozyten (Monozyten, Granulozyten, Effektor- T- Zellen) an den Ort akuter Entzündung, Infektion oder Gewebeerletzung steuern. Homöostatische Chemokine hingegen steuern die Leukozytenmobilisierung oder deren Lokalisierung während der Hämatopoese in primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus) ebenso wie in sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Peyersche-Platten) und kontrollieren den kontinuierlichen, entzündungsunabhängigen Verkehr der Leukozyten durch gesundes, peripheres Gewebe. Dieser Vorgang wird auch als Immunüberwachung bezeichnet [99]. Homöostatische Chemokine sind auch an der Architektur sekundärer, lymphatischer Organe beteiligt [100]. Dazu zählen unter anderem das CXCR5-CXCL13 Paar, das essentielle Funktionen in der Entwicklung von B-Zell-Follikeln in Lymphknoten und Peyerschen-Platten zeigt. Defizienzen weisen morphologische Veränderungen der Primärfollikel auf, was die Bedeutung von CXCR5 für die korrekte Positionierung der Zellen im Gewebe und der Aufrechterhaltung der Mikroanatomie zeigt [101-102]. Der Einfluss von CXCR5 auf die B-Zellen zeigt sich auch in der Regulation der B-Zellwanderung zusammen mit CXCR4 in den germinalen Zentren zwischen der hellen und dunklen Zone [103]. Für den Rezeptor CXCR4 konnte zudem auch gezeigt werden, dass er für die Retention von B-Zellen im Knochenmark wichtig ist [104].

Der Rezeptor CCR7 spielt mit seinen Liganden CCL19 und CCL21 eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung von T-Zellen und Dendritischen-Zellen in die T-Zell-Areale der sekundär lymphatischen Organe [102, 105]. Ein beim Huhn bislang nicht beschriebenes Chemokin, Lymphotoxin, ist ein weiterer Faktor der in der Entwicklung von lymphatischen Strukturen beteiligt ist. Dabei hat Lymphotoxin nicht nur auf die Expression von Adhäsionsfaktoren regulatorische Wirkung sondern auch auf die Differenzierung von Zellen die in den Geweben die Gerüstmatrix bilden [106].

CC-Chemokine		CXC-Chemokine	
CCL2 (MCP-1)	CCR2	CXCL8 (IL-8)	CXCR1
CCL8 (MCP-2)	CCR5	CXCL6 (GCP-2)	CXCR2
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	CCR1	CXCL1-3 (GRO- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	CXCR4
CCL5 (RANTES)	CCR3	CXCL12 (SDF-1 $\alpha/\beta$ )	CXCR7
CCL11 (Eotaxin)	CCR4	CXCL13 (BCA-1)	CXCR5
CCL17 (TARC)	CCR6		
CCL19 (SLC)	CCR7		
CCL20 (MIP-3 $\alpha$ )	CCR8		
CCL21 (SLC)			
CCL1 (I-309)			
CX3C-Chemokine		C-Chemokine	
CX3CL1 (Frakaltine)	CX3CR1	XCL1 (Lymphotactin)	XCR1

**Tab. 1: Klassifizierung der Chemokine.** Basierend auf der relativen Anordnung des ersten bzw. der ersten beiden Cystein (C)-Aminosäurereste in der Chemokindomäne werden klassischerweise vier Gruppen von Chemokinen unterschieden (CXC, CC, CX3C und C). Die Nomenklatur der Rezeptoren (R) richtet sich nach der Gruppenzugehörigkeit ihrer Liganden (L). Innerhalb jeder Gruppe werden die Rezeptoren fortlaufend nummeriert. Eine andere Einteilung der Chemokine berücksichtigt ihre physiologischen Eigenschaften, wobei man zwischen inflammatorischen (rot) und homöostatischen (blau) Chemokinen sowie solchen mit dualen Funktionen (grün) unterscheidet. CX3CL1 und Lymphotactin sind die einzig bekannten Mitglieder ihrer Gruppen. Für die CXC- und die CC- Chemokine ist eine Auswahl bekannter Vertreter aufgeführt.

Um ihre vielfältigen Funktionen ausüben zu können, binden Chemokine an G-Proteingekoppelte Rezeptoren auf ihren Zielzellen, was zur Auslösung spezifischer Signale und Zellantworten wie Chemotaxis oder Differenzierung führt. Außerdem können diese Rezeptoren Homo- und Heterodimere bilden, dass eine wichtige Funktion bei der Differenzierung der Funktion hat [107-108].

Die Aktivierung des Rezeptors kann durch unterschiedliche Effektormoleküle, wie die Adenylat-Cyclase und die Phospholipase-C (PLC) „second messenger“ Molekülen bilden die Signale in den Zellkern weiterleiten [109-110]. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität wird der Rezeptor-Ausgangszustand wieder hergestellt. Inhibiert man die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren, etwa mit dem Pertussis-Toxin aus Bordatella pertussis, verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Chemotaxis [111]. Auf Ligandenbindung und Signaltransduktion erfolgt eine Phosphorylierung der intrazellulären Serin- und Threoninreste des Rezeptors, was zur Internalisierung führt. So von der Oberfläche entfernte Rezeptoren werden entweder degradiert und erneut exprimiert oder nach Dephosphorylierung wieder an die Oberfläche der Zelle gebracht [112-113].

Die Identifikation des Hühner-Chemokin-Lokus zeigte neben einer generellen Reduktion der Anzahl an Chemokinen ein Set an paralogen Genen die für eine dynamische Evolution der Chemokin-Genfamilie spricht. Besonders die CC-Chemokin-Familie ist deutlich vermindert während für CXCL13 drei paraloge Gene identifiziert wurden (s.Tab.2) [114].

CC Chemokine	CXC Chemokine	C Chemokine	CX3C Chemokine
CCL1	CXCL1	XCL1	CX3CL1
CCL2	CXCL2		
CCL3	CXCL3		
CCL4	CXCL4		
CCL5	CXCL5		
CCL7	CXCL6		
CCL8	CXCL7		
CCL11	CXCL8		
CCL13	CXCL12		
CCL15	CXCL13 L1		
CCL16	CXCL13 L2		
CCL17	CXCL13 L3		
CCL18	CXCL14		
CCL19			
CCL20			
CCL21			

**Tab. 2: Für das Huhn identifizierte Chemokin-Gene**

Von diesen identifizierten Chemokinen bestehen bisher jedoch nur wenige Erkenntnisse über die Funktionalität im Huhn. ChCXCR4 zeigt eine hohe Homologie zum humanen Ortholog (71% Übereinstimmung) und konnte in verschiedenen Organen wie Bursa, Gehirn, Darm sowie in peripheren Blut-Leukozyten nachgewiesen werden. Durch eine Klonierung und Expression von CXCR4 in CHO-K1-Zellen konnte jedoch keine Chemotaxis auf Stimulation mit humanem CXCL12 gesehen werden, was evtl. auf größere Unterschiede zwischen humanem und aviärem CXCL12 zurückzuführen ist [115]. In einer weiteren Studie konnte jedoch gezeigt werden das CXCR12 kloakale Muskel-Vorläuferzellen in ihrer Migration dirigiert [116].

Als weiteres Chemokin-Rezeptor-Paar konnte bereits CCL20 und CCR6 kloniert werden. Sowohl chCCL20 (51%) als auch chCCR6 (55%) zeigen eine hohe Homologie zu den humanen Orthologen, und konnte in Knochenmark, sekundär lymphatischen Organen und mukösen Oberflächen nachgewiesen werden [117].

### **3. ZIELSETZUNG**

Aufgrund der erheblichen anatomischen und molekularen Unterschiede der B-Zell Entwicklung zwischen Primaten/Maus und dem Huhn sind Erkenntnisse über die Regulation die vor allem im Mausmodell generiert wurden nicht direkt auf das Huhn übertragbar. Während die molekularen Vorgänge der Immunglobulin-Diversifizierung gut erforscht sind, ist über die regulatorischen Mechanismen in der Reifung von B-Zellen wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Kandidatengene zu identifizieren die im Bezug auf Emigration und Imigration der B-Zellen in bzw. aus der Bursa Fabricii, sowie während der bursalen Entwicklungsprozesse regulatorische Funktionen aufweisen. Hierzu sollte eine arraybasierte Analyse des Bursa-Transcriptoms zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, die markanten Reifungsstadien der B-Zellen entsprechen, durchgeführt werden um differentiell exprimierte mRNAs zu identifizieren. Nachfolgende Analysen der signifikanten Pathways und Gengruppen ermöglichten eine die Identifizierung von Genen die für die Migration und Entwicklung der B-Zellen eine Rolle spielen könnten.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. Tiere und Tierhaltung

Für die Gewinnung aller Proben wurde die Hühnerlinie LSL (Lohmann's selected Leghorn) verwendet. LSL-Eier wurden von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven zur Verfügung gestellt.

Die Eier wurden am Institut ausgebrütet und die Tiere anschließend in Gruppen in Gitterrostkäfigen oder Volieren gehalten. Gefüttert wurde handelsübliches Alleinfuttermittel, Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

### 4.2. Gewinnung von Organen und B-Lymphozyten

#### Material

##### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

8,00g Natriumchlorid (NaCl) <sup>1</sup>

1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) <sup>1</sup>

0,2g Kaliumchlorid (KCl) <sup>1</sup>

0,2g Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) <sup>1</sup>

ad 1000ml Aqua dest.

Einstellen des pH mit HCl und NaOH auf 7,2

Für Arbeiten in der Zellkultur autoklaviert

##### Ficoll Separating Solution <sup>15</sup>

##### Trypanblau-Lösung <sup>15</sup>

##### Heparinlösung (500 U/ml) <sup>2</sup>

1ml Heparin-Natrium 20.000

ad 40ml RPMI 1640 mit stabilem Glutamin

(“Glutamax”, im Folgenden RPMI 1640)

RNAlater<sup>3</sup>

### 4.2.1. Gewinnung von Organen

Für die Organentnahme der Bursen zum Zeitpunkt Embryonaltag 10, wurden für jedes biologische Replikat je 12 Eier stündlich versetzt in die Brüter eingelegt und bei der Entnahme in gleicher Reihenfolge wieder entnommen. Für die Entwicklungszeitpunkte Embryonaltag 18, Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf wurden jeweils 9 Eier gemeinsam eingelegt.

Zur Organentnahme der Bursa-Embryonalstadien wurden die Embryonen nach Eröffnen des Eies durch einen Scherenschlag dekapitiert. Die Küken 2 und 28 Tage nach dem Schlupf wurden nach mechanischer Betäubung durch Blutentzug getötet.

Zum Zeitpunkt Embryonaltag 10 wurden je 10 Bursen zu einem Pool vereinigt, für Embryonaltag 18 und Tag 2 nach dem Schlupf wurde je eine Bursa verwendet. Am Tag 28 nach dem Schlupf eine Plika einer Bursa.

Innerhalb weniger Minuten nach der Gewebeentnahme kommt es zu einer rasch fortschreitenden Destabilisierung der RNA durch zelleigene RNAsen. Daher wurden die Organe direkt nach dem Entnehmen in 1,5ml Cups mit 1ml RNAlater überführt. RNAlater ist eine Hochsalzlösung zur Stabilisierung von RNA in Geweben.

Zur vollständigen Fixierung der Proben in RNAlater wurden die Proben für 12 Stunden bei 4°C und danach bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### 4.2.2. Gewinnung von B-Lymphozyten

#### Material

##### Leukozytensuspension

Anti chB6-FITC (Klon AV20<sup>16</sup>), 1:200 in Fluo-Puffer

##### PBS

##### Fluo-Puffer

5g bovines Serum Albumin (BSA)<sup>1</sup>

50mg Natrium Acid (NaN<sub>3</sub>)<sup>1</sup>

Ad 500ml PBS

Lagerung bei 4°C

**RPMI Medium (10% FBS, 1% P/S)**

**Filkon-Filter (150 $\mu$ m)<sup>17</sup>**

**15ml Reagierröhrchen**

**5ml Rundboden Probenröhrchen**

Für die Gewinnung von B-Lymphozyten aus Bursae wurden die Organe sofort nach der Entnahme in 4°C kaltes PBS überführt und auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Bursen mit einem sterilen Spritzenstempel durch ein in PBS stehendes, autoklaviertes Sieb gepresst (Maschenweite 0,75x0,75mm). Die daraus erhaltene Organsuspension wurde in 50ml Zentrifugations-Röhrchen für 3 Minuten zur Sedimentation der großen Gewebstücke auf Eis gestellt. Danach wurde der Überstand abgenommen und bei 4°C und 225xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10ml PBS resuspendiert und auf 10 ml einer Ficoll-Separations-Lösung geschichtet. Nach 12-minütiger Dichtezentrifugation bei RT mit 650xg, wurden die an der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette abgenommen und mit kaltem PBS gewaschen.

Zur Gewinnung von B-Zellen aus peripherem Blut wurden die für die Blutentnahme benötigten Spritzen unter sterilen Bedingungen mit ca. 0,2ml Heparinlösung beschichtet. Es wurden Kanülen der Größe 0,5 x 40mm verwendet. Entnahmestelle war die Vena jugularis dextra. Das Blut wurde danach 1:1 mit PBS verdünnt und die Lymphozyten mittels Dichtezentrifugation (s.o.) von den restlichen Blutbestandteilen separiert.

Die gewonnenen Einzelzellsuspensionen ( $6-9 \times 10^7$  Zellen) wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 225xg pelletiert und anschließend in 2-3ml Antikörperlösung ( $3 \times 10^7$  Zellen pro ml) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 4°C unter Lichtschutz. Um überschüssige Antikörper zu entfernen wurde das Reaktionsröhrchen mit Fluo-Puffer aufgefüllt und anschließend bei 225xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert ( $2-3 \times 10^7$  Zellen pro ml) und durch einen Filcon Filter in ein 5ml Probenröhrchen filtriert. Durch Zugabe von PBS wurde die Zelldichte auf ca.  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml eingestellt. Der Sort erfolgte im FACS-AriaII (BD, 85 $\mu$ m Nozzle, Kühlung der Probenkammer und Proben auf 4°C) in ein 15ml Reagierröhrchen.

### 4.3. RNA-Präparation

Zur Isolierung der RNA wurde eine Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt.

#### Material

**Trizol Reagenz**<sup>8</sup>

**Chloroform ad analysis**<sup>1</sup>

**Aqua bidest, nukleasefrei**

**Isopropanol**<sup>4</sup>

**70% Ethanol**

70 ml Ethanol absolut<sup>1</sup>

30ml Aqua bidest, nukleasefrei

#### Durchführung

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von RNAase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Arbeitsgeräte, Arbeitsflächen und Handschuhe wurden vor Arbeitsbeginn mit 10% SDS-Lösung behandelt. Volumenangaben beziehen sich auf 1ml Trizol zur RNA-Isolation aus maximal 100mg Gewebe bzw.  $1 \times 10^7$  Zellen.

Um die Gesamt-RNA aus Gewebe zu isolieren wurde dieses in 1ml gekühltes Trizol je 100mg überführt, und mittels PreCellys Homogenisator aufgeschlossen. Die Proben wurden in einem Intervall 10 Sekunden bei 5000rpm homogenisiert. Wurde das Gewebe bei diesem ersten Durchlauf nicht vollständig aufgeschlossen, folgte nach einer Pause zur Kühlung der Probe ein weiteres Intervall. Für Die Isolation von RNA aus Zellen wurde das Zellpellet in 1ml Trizol pro  $1 \times 10^7$  Zellen durch auf und ab pipettieren resuspendiert.

Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde die Probe 15 Sekunden lang stark geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt (12.000xg, 6°C, 15 Minuten) kam es zur 3-phasigen Auftrennung der Suspension. Am Grund des Gefäßes befand sich die milchig-rosane organische Phase, vorwiegend aus Proteinen, darüber die weiße Interphase mit der DNA und darüber die wässrige Phase mit darin enthaltener RNA. Nach vorsichtiger Abnahme der wässrigen Phase wurde diese in ein neues Gefäß überführt und 500µl Isopropanol zugegeben. Innerhalb der folgenden 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kam es zur Ausfällung der RNA. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000xg, 6°C, 10 Minuten) wurde der Überstand

vorsichtig entfernt, das Pellet in 1ml 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 Minuten bei 7.500xg und 6°C zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstands wurde das RNA-Pellet getrocknet und je nach Pelletgröße in 20-600µl nukleasefreiem Aqua bidest. aufgenommen.

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### **4.3.1. Reinheitsbestimmung der RNA mittels NanoDrop**

Als Voraussetzung für die weitere Verwendung der RNA ist eine hohe Reinheit der Probe essentiell. Durch Kontaminationen mit Phenol oder chaotropen Salze (in Trizol Reagenz enthalten) können Enzyme, die bei der cDNA-Synthese oder dem Fluoreszenzlabeling verwendet werden inhibiert werden.

Zur Kontrolle der RNA Reinheit wurden die Absorption der RNA bei 230-280 nm bestimmt. Reine RNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260nm, während Phenolrückstände bei 270nm absorbieren und Guanidinisothiocyanat bei 230nm. Anhand des Absorptionsverhältnisses von 260nm zu 230nm und 260nm zu 280nm können Kontaminationen erkannt werden. Als Grenzwert wurde ein 260/280 Verhältnis von 1,9-2,0 und 260/230 Wert über 2,0 angesetzt.

#### **4.3.2. Natrium-Acetat Fällung**

Kontaminierte Proben wurden durch eine Natrium-Acetat Fällung aufgereinigt.

#### **Material**

**Natrium-Acetat, nukleasefrei**<sup>1</sup>

**Isopropanol**<sup>4</sup>

**Aqua bidest, nukleasefrei**

**70% Ethanol**

70 ml Ethanol absolut<sup>1</sup>

30ml Aqua bidest, nukleasefrei

## Durchführung

Die in Wasser gelöste RNA (bei geringem Volumen auf 100µl mit nukleasefreiem Aqua bidest aufgefüllt) wurde mit 1 Volumen Isopropanol und  $\frac{1}{10}$  Volumen NaOAc versetzt. Durch vorsichtiges Mischen und eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA ausgefällt. Nach Zentrifugation (12.000xg, 6°C, 10 Minuten) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1ml 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend nochmals bei 7.500xg, 6°C, 5 Minuten zentrifugiert. Das nach Entfernen des Überstandes getrocknete Pellet wurde erneut in Aqua bidest gelöst.

Abschließend erfolgte eine nochmalige Messung der Absorptionen im NanoDrop zur Evaluierung der 260/230 und 260/280 Werte.

### 4.3.3. Bestimmung der RNA Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer™

Für einen korrekten quantitativen mRNA Nachweis, in der qRT-PCR oder in Mikroarray-Experimenten, ist die Intaktheit der RNA eine wichtige Grundvoraussetzung. Nukleasen, Hitze oder Scherkräfte können RNA Moleküle abbauen oder Strangbrüche hervorrufen. Demzufolge ist keine cDNA Synthese über die gesamte Länge der mRNA Sequenzen möglich, wodurch quantitative Aussagen über das Expressionsverhalten verfälscht werden. Aus diesem Grund wurde alle RNA-Proben einer Qualitätskontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer unterzogen.

Der Agilent 2100 Bioanalyzer führt eine chip-basierte Kapillar-Gelelektrophorese durch. RNA-Moleküle werden dabei ihrer Größe nach aufgetrennt und in digitaler Form in einem Elektroferogramm wieder gegeben. Zur standardisierten Beurteilung der RNA Qualität errechnet die „Agilent 2100 Expert“ Software die RNA-Integrity-Number (RIN). Dieser Wert von 1 (vollständig degradierte RNA) bis 10 (intakte RNA) wird durch einen Algorithmus kalkuliert der sich aus mehreren Eigenschaften der RNA zusammensetzt, Verhältnis 18S zu 28S rRNA Peaks, 5S rRNA und Grundlinie des Elektroferogramms.

Die zu analysierenden RNA-Proben wurden nach Angaben des Herstellers aufgetragen und mittels 'Agilent 2100 Expert' Software ausgewertet.

Für nachfolgende Versuche wurde nur RNA eingesetzt deren RIN über 9,4 war.

## 4.4. cDNA Synthese für qRT-PCR

### Material

SuperScript III, First-Strand Synthesis System for RT-PCR <sup>5</sup>

DNase I, RNase free <sup>7</sup>

Aqua bidest, nukleasefrei

### Durchführung

Durch den Einsatz einer Reversen Transkriptase und geeigneten Primern (Random Hexamer Primer) wurde Gesamt-RNA in eine komplementäre 'copy' DNA (cDNA) umgeschrieben, welche als Matrize für die qRT-PCR eingesetzt werden konnte.

Random Hexamer Primer sind eine Mischung aus einzelsträngigen Nukleotidhexameren die aus allen möglichen Kombinationen von Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin bestehen ( $4^6 = 4096$ ). Deren Einsatz führt zum umschreiben sowohl von mRNA als auch von rRNA, wodurch die Verwendung der 18s rRNA als „Housekeeping-Gen“ möglich war.

Um eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen wurde vor der Synthese der cDNA ein DNaseI Verdau durchgeführt.

Alle Arbeitsschritte wurden in einer durch ultraviolettes Licht dekontaminierten PCR Workstation durchgeführt, zur Inibierung von Nukleasen wurden alle Arbeitsflächen mit 10%iger SDS Lösung behandelt.

Es wurden für jede Probe 400ng Gesammt-RNA nach Angabe des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

## 4.5. Erstellen von Primern

Primer für die quantitative Polymerase Kettenreaktion wurden mit Hilfe der Primer Express Software von Applied Biosystems generiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer eine einheitliche Anealing-Temperatur von 59°C und eine Amplikongöße von 80 bis 150 Nukleotiden haben. Die Primer sollen eine Länge von ca. 20 Nukleotiden aufweisen und keine Sekundärstrukturen (hair pins) oder Selbst- oder Kreuz-Dimere bilden.

Die Spezifität der Primer wurde durch Blasten der Primersequenz auf das Hüneregenom und durch eine Sequenzierung des Amplikons überprüft. Für jedes in der qRT-PCR verwendete Primerpaar wurde zunächst die Effizienz berechnet. Hierzu wurde für jedes dieser Primerpaare eine Standardkurve aus 8 log<sub>10</sub> Verdünnungsstufen erstellt. Als Template diente ein PCR Produkt des selben Primerpaares. Anschließend wurde die Effizienz E über eine lineare Regression aus der Steigung m der Standardtkurve nach der Formel  $E=10^{(-1/m)}$  berechnet.

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Primer	Primersequenz
18s rRNA sense	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA
18s rRNA antisense	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA
CXCR4 sense	CTCAAGAGCAACAGCAAGCAA
CXCR4 antisense	GCCCTTAACGTTCTACCCTTGA
CXCR12 sense	CTCAAGAGCAACAGCAAGCAA
CXCR12 antisense	GCCCTTAACGTTCTACCCTTGA
CCL20 sense	AAGGAGCACTCATTGGAGCATAG
CCL20 antisense	CAGCAGAGAAGCCAAAATCAAAC
CCR6 sense	GGCAAGAACGCTCGCATAC
CCR6 antisense	AGGAACTGGAGATTAATAAGCCG

#### 4.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die konventionelle PCR wurden mit einer Taq-Polymerase nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

Initialerhitzungsphase		1x	95°C, 10 Minuten
Amplifikationsphase	Denaturierung	40x	94°C, 15 Sekunden
	Annealing		59°C, 30 Sekunden
	Extention		72°C, 30 Sekunden

#### Material

**HotFirePol-DNA Polymerase** <sup>12</sup>

**10x Polymerase Puffer B** <sup>12</sup>

**dNTP 2mM** <sup>7</sup>

**MgCl<sub>2</sub> Lösung 25mM** <sup>12</sup>

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**Primer 1 pmol/ µl** <sup>13</sup>

Lagerung aller Reagenzien bei -20°C.

## Durchführung

*Ansatz für eine PCR-Reaktion:*

- 5 µl sense-Primer
- 5 µl antisense-Primer
- 2,5 µl Polymerase-Puffer B
- 2 µl MgCl<sub>2</sub> Lösung
- 2,5 µl dNTP
- 0,2 µl HotFirePol-DNA Polymerase, Endkonzentration 1 U
- 1 µl cDNA oder Aqua bidest, nukleasefrei für Negativkontrolle
- ad 25 µl Aqua bidest., nukleasefrei

Bei mehreren Ansätzen wurde zunächst aus diesen Reagenzien ohne die cDNA ein Mastermix bereitet und auf die einzelnen Ansätze verteilt. Die Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese.

## 4.7. Agarose-Gelelektrophorese

### Material

#### **EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)**

186,1g Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)-Dinatrium-Dihydrat  
(C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O) <sup>1</sup>

20g Natriumhydroxid (NaOH) <sup>1</sup>

ad 700ml Aqua dest.

pH 8,0 mit NaOH eingestellt, Lagerung bei Raumtemperatur

#### **5xTBE Puffer**

54g Tris(hydroxymethyl)aminomethan <sup>1</sup>

27,5g Borsäure <sup>1</sup>

20ml EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)

ad 1l Aqua dest., Lagerung bei Raumtemperatur

#### **0,5x TBE-Puffer**

1:10 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

**1% Agarose**

0,5g Agarose<sup>1</sup>  
50ml 0,5x TBE Puffer  
kurz vor Gebrauch ansetzen

**6x Loading Dye Solution (Ladepuffer)<sup>7</sup>**

**GeneRuler™50bp DNA Ladder plus<sup>7</sup>**

**oder DNA-Ladder-Mix (Marker)<sup>7</sup>**

**Ethidiumbromid-Stammlösung**

10mg Ethidiumbromid<sup>3</sup>  
ad 1ml Aqua dest.  
bei 4°C lagern  
Gebrauchslösung: 1:1000 in Aqua dest. verdünnt

**Durchführung**

Die 0,7 bis 2%igen Agarosegele wurden jeweils unmittelbar vor Verwenden gegossen. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 0,5x TBE-Puffer gekocht bis eine klare homogene Flüssigkeit ohne Schlieren entstanden war. Nach Abkühlen der Gel-Lösung auf ca. 60°C wurde die Elektrophoreseapparatur mit eingesetztem Probenaschenkamm blasenfrei befüllt. Nach Aushärten der Agaroselösung wurde der Probenaschenkamm entfernt und das Gel mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. Die zu separierenden DNA-Lösungen wurden 6:1 mit einem gefärbten Ladepuffer (Loading Dye) versetzt (5µl Probe mit 1µl 6x Loading Dye) und in die Probenaschen geladen. Als Referenzgröße diente ein ebenso aufgetragener und gefärbter Marker.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 Volt bis die Proben ausreichend weit im Gel aufgetrennt waren, wobei der mitgeführte Loading Dye der Orientierung diente. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel 30 min lang in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung geschwenkt und anschließend unter UV-Licht photographiert.

#### 4.8. Aufreinigung und Sequenzierung des PCR Produktes

Zur Aufreinigung von PCR Produkten wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean Up System Kit <sup>11</sup> gemäß den Herstellerangaben verwendet.

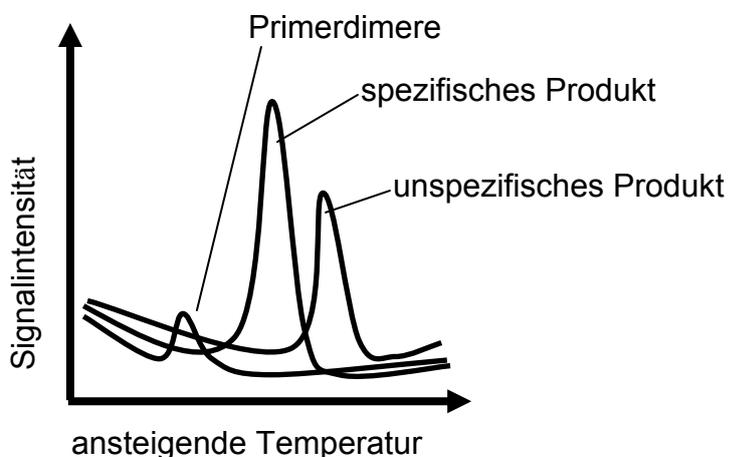
Zur eindeutigen Bestätigung der Spezifität des Primerpaares wurde das Amplikon sequenziert. Dazu wurde das aufgereinigte PCR Produkt auf 10 – 50ng pro  $\mu\text{l}$  eingestellt und 30 $\mu\text{l}$  dieser Lösung in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Als Sequenzier-Primer wurde von dem in der PCR eingesetzten Primerpaar ein Primer, in einer Konzentration von 10pmol/ $\mu\text{l}$  verwendet.

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech, Konstanz.

#### 4.9. Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT PCR)

Die qRT-PCR beruht auf den Prinzipien der herkömmlichen PCR, nur dass sie eine zusätzliche Quantifizierung der entstandenen DNA ermöglicht. Zum Nachweis der doppelsträngigen DNA wurde SYBR Green, ein in die DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, verwendet. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem PCR-Zyklus ermittelt ('Real Time' Messung) und nimmt proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu.

SYBR Green interkaliert in jede doppelsträngige DNA. Um unspezifische Signale, hervorgerufen durch Primerdimere oder unspezifische PCR-Produkte auszuschließen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse

Unspezifische Produkte und Primerdimere unterscheiden sich in der Schmelztemperatur vom eigentlichen Amplikon.

Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam von 57°C auf 95°C erhöht wird. Dabei trennen sich die Doppelstrangstrukturen auf so dass die DNA nach dem Schmelzen als Einzelstrang vorliegt. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, was in einer Abnahme der Fluoreszenz gemessen werden kann. Je nach Länge und GC-Gehalt weist jedes Amplikon eine spezifische Schmelztemperatur auf. Dies macht eine Unterscheidung zwischen Amplikon, Primerdimeren und unspezifischen Produkten möglich.

## Material

**SYBR Green MasterMix**<sup>9</sup>

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**qPCR Primer (5pmol/µl)**<sup>13</sup>

## Durchführung

Jeder Ansatz wurde als Duplikat pipettiert. Alle Arbeitsschritte wurden in einer durch ultraviolettes Licht dekontaminierten PCR-Workstation durchgeführt. Zur Inibierung von Nukleasen wurden alle Arbeitsflächen mit 10%iger SDS Lösung behandelt.

Aus folgenden Reagenzien wurde ein Mastermix hergestellt:

	Einzel-Ansatz
SYBR Green MasterMix	12,5 µl
H2O	8,5 µl
Primer sense (s)	1,5 µl
Primer antisense (as)	1,5 µl
cDNA	1 µl
Gesamtmenge	25 µl

Nach vorsichtigem Mischen wurden die PCR-Ansätze in eine 96-Loch-qPCR-Platte pipettiert, und mit einer durchsichtigen selbsthaftenden Folie abgedichtet.

Für die qRT-PCR wurde eine 'HotStart'-Polymerase eingesetzt, welche erst durch eine initiale Erhitzung aktiviert wird. Daher wurde die qRT-PCR nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

Initialerhitzungsphase		1x	95°C, 15 Minuten
Amplifikationsphase	Denaturierung	40x	94°C, 15 Sekunden
	Anealing		59°C, 30 Sekunden
	Extention		72°C, 30 Sekunden
Schmelzkurve		1x	95°C, 15 Sekunden
			57°C, 30 Sekunden
			95°C, 15 Sekunden

### Auswertung

Die qRT-PCR Daten wurden einer relativen Quantifizierung mittels  $\Delta$ CT-Methode unterzogen. In den ersten Zyklen ist die Menge des Amplikons so gering das kaum Fluoreszenz gemessen werden kann, im weiteren Verlauf gelangt die Reaktion in einen Bereich in dem es zu einem exponentiellen Anstieg der Amplikonmenge und damit auch an Fluoreszenzintensität kommt. Gegen Ende der Amplifikationsphase geht die Reaktion in ein Plateau über. Hier haben sich so viele Produkte angesammelt (Pyrophosphat, DNA, Monophosphatnukleotide) das die weitere Reaktion gehemmt wird.

Zur einheitlichen und vergleichbaren Erhebung von Expressionsdaten wird der CT-Wert ('threshold cycle'), in der exponentiellen Phase ermittelt (threshold 0,2). Geringe Mengen an Template führen zu einem späteren Erreichen der exponentiellen Phase, und somit zu höheren CT Werten.

Nach Mittelung der CT-Werte, der Duplikate erfolgte die Normalisierung der CT-Wert auf das Housekeeping-Gens (18S rRNA) dessen Ct-Werte von den Proben-CT-Wert abgezogen wurde.

$$\Delta CT = \text{Proben-CT} - 18s\text{-rRNA-CT}$$

Zum Erhalt eines zur Expression direkt proportionalen positiven Wertes wird dieser  $\Delta$ CT von der maximalen Zykluszahl abgezogen,  $40 - \Delta$ CT.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung ist die Berechnung des  $\Delta\Delta$ CT-Wertes. Dabei wird einer der Zeitpunkte als Kalibrator definiert (z.B. der Embryonaltag10), und dessen  $\Delta$ CT-Werte von den anderen Probezeitpunkten  $\Delta$ CT-Werten subtrahiert. Der  $\Delta\Delta$ CT-Wert gibt die relative Expressionsänderung im Vergleich zum Kalibrator wieder.

Zur Berechnung der n-fachen Expression E des Gens (im Vergleich zum Standard) kann die Formel  $E = 2^{-\Delta\Delta CT}$  verwendet werden.

## **4.10. Mikroarray**

Mikroarrays ermöglichen die parallele Untersuchung von mehreren tausend mRNA Einzelnachweisen, bei sehr geringer Menge von Probenmaterial. Dabei kommen hauptsächlich zwei Arten von DNA Mikroarrays zum Einsatz, "Spotted Microarrays" und "Oligonukleotid Microarrays". In beiden Systemen dienen spezifische Sequenzen, die auf ein Trägermaterial gedruckt werden, als Sonden für die zu untersuchenden mRNAs. Für die spotted Arrays kommen dabei cDNA oder PCR-Produkt Fragmente als Sonden zum Einsatz, während Oligonukleotid Arrays auf synthetisch hergestellten Oligonukleotiden beruhen.

Zur Analyse wird die extrahierte RNA in cRNA umgeschrieben, wobei Fluoreszenzfarbstoffe eingebaut werden. Bei der Hybridisierung binden diese markierten einzelsträngigen cRNA Fragmente an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array.

Zur Analyse unserer Proben wurden die Agilent Oligonukleotid Mikroarrays verwendet.

### **4.10.1. Agilent Mikroarray**

Die von Agilent hergestellten Arrays können in unterschiedlichen Formaten produziert werden. Für die vorliegende transkriptomische Untersuchung wurde der „Agilent 4x44 K chicken-Genom“ Katalog-Array verwendet. Dieser erlaubt die gleichzeitige Analyse von 4 Arrays mit je 44.000 Spots. Jeder Spot (Feature) repräsentiert eine aus 60 Nukleotiden (auch Oligonukleotid oder 60mer genannte) bestehende Sequenz, die mit einem speziellen Druckverfahren auf einen Glasträger synthetisiert wurde.

### **4.10.2. Customarray**

Die Agilent-Arrays bieten die Möglichkeit, den vorgefertigten Katalogarray, der einen Querschnitt aller bekannter Hünergenomsequenzen umfasst, selbst weiter zu entwickeln. Somit kann der Array individuellen Fragestellungen angepasst werden.

In ein online verfügbares Programm 'eArray' werden GenIDs oder Nukleotidsequenzen der Gene geladen, und durch spezielle Algorithmen für das Gen spezifische Oligonukleotide berechnet.

Für die Gestaltung unseres Chicken-Immun-Arrays wurden 1699 zusätzliche Gene, die speziell Funktionen im Bereich des Immunsystems erfüllen, auf den Array gespottet.

### 4.10.3. Annotation

Für jeden Spot auf dem Array wurde von Agilent eine Nummer, die ProbeID, vergeben. Über diese Nummer kann jedem dieser Spots eine Oligonukleotidsequenz zugeordnet werden. Nur für ca. 6000 der Spots waren von Agilent auch Genom- oder Protein-IDs als Information vorliegend.

Um funktionelle Aussagen über die Genregulation zu treffen, muss der ProbeID jedoch eine Genbeschreibung bzw. – funktion zugeordnet werden.

Für die Annotation der Arrays wurde eine Nukleotid-Blastsuche in verschiedene Datenbanken, wie NCBI und Ensembl durchgeführt. Eine eigens für das Projekt AvImmun entwickelte Blast-Software, AvI-Blast, ermöglichte den Abgleich der Oligosequenzen mit der NCBI Huhngenom Datenbank.

Genom- und Protein-IDs wurden über online ID-Converter in offizielle Gensymbole umgewandelt (DAVID, Babelomics, g:Profiler).

### 4.10.4. cDNA Synthese

#### Material

**One-Color Spike-In-Kit**<sup>10</sup>

**Quick Amp Labeling Kit, one color**<sup>10</sup>

#### Durchführung

Zur positiv Kontrolle des gesamten Arbeitsablaufs bis zur Hybridisierung der Arrays wurden der RNA sogenannte Spike-In-RNAs zugesetzt. Diese bestehen aus 10 definierten Transkripten mit minimaler Selbst- und Kreuz-Hybridisierung (in vitro synthetisierte, polyadenosinierte Adenovirus E1A Gen Derivate). Diese RNA Fragmente wurden mit der zu untersuchenden RNA weiter prozessiert (cDNA und cRNA Synthese) und binden bei der Hybridisierung an spezifischen Spike-In-Probes welche speziell entwickelt wurden, so dass sie keine komplementären Sequenzen zu biologischen Replikaten aufwiesen.

Die benötigte Gesamt-RNA (500ng) wurde nach Angaben des Herstellers mittels einer rekombinanten reversen Transkriptase 1:1 in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkriptase wurden T7-Promotor-Primer eingesetzt. Diese Primer binden an poly-Adenosin RNA Abschnitte (poly-A-Schwanz der mRNA), wodurch nur der mRNA-Anteil in cDNA umgeschrieben wird. Gleichzeitig enthalten diese Primer auch eine Promotorsequenz für die in der cRNA-Synthese verwendete T7-RNA Polymerase.

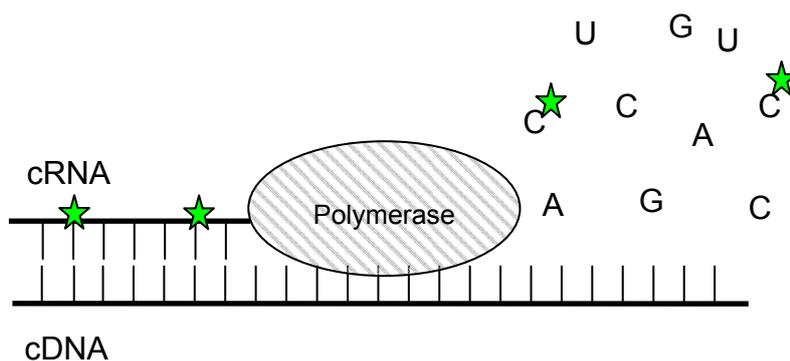
#### 4.10.5. cRNA Synthese

##### Material

**Quick Amp Labeling Kit, one color**<sup>10</sup>

Während der cRNA Synthese kam es neben der Umschreibung von cDNA in cRNA auch zu einer Amplifikation durch die T7-RNA Polymerase. Dabei wurden in die neu synthetisierte cRNA spezielle Nukleotide eingebaut, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. In unserem Versuch wurden Cytosintriphosphate (CTP) verwendet, die mit einem Polymethin-Farbstoff, dem Cyanine3 (Cy3), gekoppelt wurden.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, lediglich die Inkubations-Zeit bei 40°C wurde von 2 Stunden auf 2 ½ Stunden erhöht.



**Abb. 5:**Schematische Darstellung des Einbaus von fluoreszenzmarkierten Nucleotiden in die cRNA

#### 4.10.6. Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität

##### Material

RNeasy Mini Kit <sup>10</sup>

Um Rückstände aus den vorausgegangenen Reaktionen (Pyrophosphate, Enzyme, nicht gebundene Cy3-CTP) aus den Proben zu entfernen, wurde nach den Angaben des Herstellers eine Silikatmembran basierte Aufreinigung der cRNA durchgeführt.

Zur Bestimmung der Gesamt-cRNA Ausbeute und der spezifischen Cy3-Aktivität wurden die jeweiligen Absorptionen der Proben im NanoDrop gemessen. Die gemessene Cy3 Konzentration (in pmol/ $\mu$ l) wurde zur Gesamt cRNA Menge (in  $\mu$ g) ins Verhältnis gesetzt (spezifische Cy3 Aktivität). Als Ausschlusskriterium für die weitere Verwendung der cRNA wurde eine cRNA-Gesamtmenge von mindestens 1,65 $\mu$ g und eine spezifische Cy3 Aktivität von über 9,0 pmol Cy3 pro  $\mu$ g cRNA festgelegt.

#### 4.10.7. Fragmentierung der cRNA

##### Material

Gene Expression Hybridisation Kit <sup>10</sup>

##### Durchführung

Zur Optimierung der Hybridisierungskinetik müssen die cRNA Stränge Angaben des Herstellers fragmentiert werden. Um dies standardisiert zu erreichen, wurde jeder Probe (1,65 $\mu$ g cRNA) einzeln ein Fragmentationspuffer zugegeben und exakt 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Durch Zufügen des Hybridisierungspuffers wurde die Fragmentation gestoppt und die Probe in ein geeignetes Medium für die Hybridisierung überführt.

## 4.10.8. Hybridisierung der Arrays

### Material

Gasketslides<sup>10</sup>

### Durchführung

Zur Hybridisierung wurden 100µl der Hybridisierungsflüssigkeit mit dem Array inkubiert.

Für alle Arbeitsschritte mit Array-oder Gasketsildes galten hohe Ansprüche an Sauberkeit und Präzision. Alle Arbeitsschritte wurden mit puderfreien Handschuhen durchgeführt, Slides durften nur seitlich berührt werden und die Luftexposition der Arrays wurde durch rasches Arbeiten minimiert.

Zunächst wurde in eine Hybridisierungskammer ein Gasketslide eingelegt, dabei handelt es sich um einen Glasträger auf den ringförmige Gummidichtungen aufgebracht sind (entsprechend dem Arrayformat, 4x44K). Die Hybridisierungsflüssigkeit wurde mittig in diesen Gummiring pipettiert, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass der Dichtungsring keinen Kontakt zur Flüssigkeit hatte. Durch Auflegen eines Arrayslide entstand zwischen den beiden Glasträgern ein durch den Gummiring abgedichteter Raum (Gascet-Array-Sandwich). Nach dem Schließen der Hybridisierungskammer wurde kontrolliert, ob die gesamte Arrayfläche vollständig benetzt war und keine immobilen Luftblasen die gleichmäßige Hybridisierung behinderten. Die Arrays wurden 17 Stunden in einem Hybridisierungssofen bei 65°C und 10 rpm inkubiert wobei durch eine einzelne mobile Luftblase und die gleichmäßige Drehung der Arrays während der Hybridisierung eine kontinuierliche Durchmischung der Hybridisierungsflüssigkeit gewährleistet wurde.

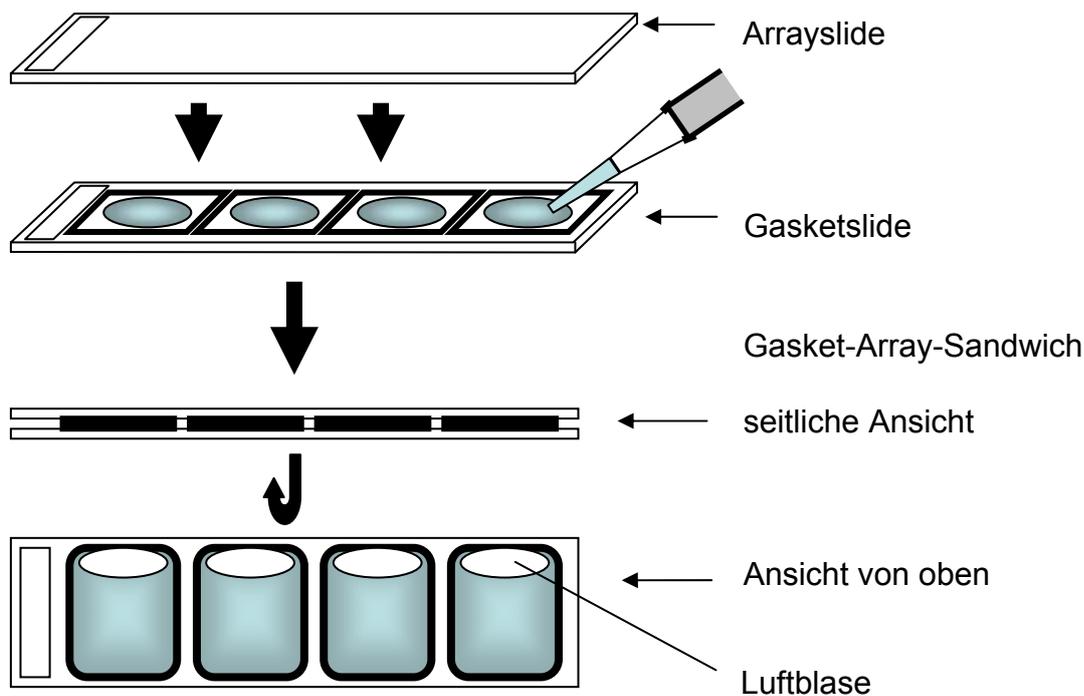


Abb. 6: Aufbau eines Array-Gasket-Sandwich

#### 4.10.9. Waschen und Scan der Arrays

##### Material

Gene Expression Wash Buffer1<sup>10</sup>

Gene Expression Wash Buffer2<sup>10</sup>

Triton X-102<sup>10</sup>

Die Waschschritte dienen der Entfernung von nicht gebundenen cRNA Fragmenten. Aufgrund der speziellen Oberflächeneigenschaften der Glasträger ist keine weitere Behandlung, wie Trocknen oder Fixieren notwendig.

Nach Entnahme der hybridisierten Arrays aus dem Hybridisierungsofen wurde das Array-Gasketslid-Sandwich aus der Hybridisierungskammer gehoben und in ein Bad mit 500ml Waschpuffer 1 (Raumtemperatur) verbracht. Mit einer Pinzette wurden Array und Gasketsilde voneinander getrennt. Danach wurden die Arrayslides in einen Glasträgerhalter gestellt, der sich bereits in einem Bad mit 500ml Waschpuffer1 (Raumtemperatur) befand. Diese Schritte wurden für 3 weitere Arrayglasträger wiederholt. Der Glasträgerhalter mit den Arrays wurde daraufhin für 1 Minute in ein Bad mit 500ml Waschpuffer2 (31°C) gegeben. Anschließend wurde der Glasträgerhalter langsam aus der Flüssigkeit herausgezogen, so dass durch

gleichmäßiges Abfließen Waschpufferrückstände vermieden werden konnten.

Nach Einlegen der Arrays in spezielle Halterungen wurden diese im Agilent G2505C Scanner bei einer Auflösung von 3µm gescannt.

## **4.11. Programme zur Auswertung der Mikroarray**

### **4.11.1. Agilent Feature Extraction Software v. 10.5.1.1**

Die Feature Extraction Software wurde zum einlesen und prozessieren der Bilddatei des Scans genutzt, so dass die Daten den weiteren Analysen zugänglich wurden. Durch ein Raster das auf jeden Array gelegt wurde konnte jedem „Feature“ die Agilent Probe Identifikator (ProbeID) zugeordnet werden. Zudem ermittelte die Software die Feature-Signalintensität und rechnete diese in einen Zahlenwert um. Features, die ein abnormes Muster zeigten wurden erkannt und somit für weiterfolgende Analysen ausgeschlossen. Durch die mitgeführten RNA Spike-Ins berechnete das Programm für jeden Array einen Qualitätsreport. Dieser Report ermöglichte den gesamten Arbeitsablauf, von der Probenpräparation, Fluoreszenzmarkierung bis hin zur Hybridisierung, bezüglich der Qualität und Reproduzierbarkeit zu evaluieren (Probendegradation, Waschartefakte oder Ozonexposition). Ebenfalls über die Spike-In-Probes wurde der lineare Bereich der Quantifikation sowie die Nachweisgrenze und der Punkt der Sättigung errechnet.

### **4.11.2. Bioconductor „R“ v2.9.1**

Das Programm „R“ bietet eine Programmiersprache und umfangreiche statistische Ausstattung zur Datenanalyse und graphischen Auswertung. Durch ergänzende Erweiterungspakete wurde das Programm speziell an die Analysevoraussetzungen von Mikroarraydaten angepasst.

Mittels „R“ wurden die Daten einer VSN (Variance Stabilization and Normalization) Normalisierung unterzogen. Anschließend erfolgte durch das Genplotter-Paket eine erste graphische Darstellung der Arrays in einer Heatmap. Die VSN Normalisierung basiert auf der Annahme, dass Mikroarraydaten auf Grund der Signalintensität variieren, und eine Transformation gefunden werden kann nach der die Varianz annähernd konstant ist. Diese Transformation gleicht im oberen Bereich der Signalintensität einer logarithmischen

Anpassung, bei niedrigen Signalstärken dagegen einer annähernd linearen und im Bereich dazwischen jedoch kaum interpoliert. Durch die VSN Normalisierung werden die Expressionsdaten logarithmiert (natürlicher Logarithmus).

Als Eingabedatei wurde eine tabstop getrennte Textdatei, mit den gProcessedSignal Werten von allen Arrays verwendet.

### **4.11.3. Significance Analysis of Microarrays v3.08 (SAM)**

SAM ist eine statistische Technik, um in Mikroarrayexperimenten signifikante Gene in einer Menge zu finden. Durch wiederholte Permutationen der Daten wurde bestimmt ob die Expression eines Gens im Vergleich zu einem anderen Entwicklungszeitpunkt signifikant verändert ist. Das Limit der Signifikanz wurde auf Basis der „False Discovery Rate“ (FDR) festgelegt.

Anhand der „Respons variable“ wurden die Arrays entsprechend dem experimentellen Ansatz in Gruppen eingeteilt. In unserem Experiment wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Analyse ausgewählt.

Mittels der ‘Two class, unpaired’ Auswertung konnten zwei Gruppen mit unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden. Zum Beispiel ein Entwicklungszeitpunkt mit einem anderen (two class), wobei jeder dieser Zeitpunkte mehrere biologische Replikate umfasste (unpaired). Eine ‘Two class, unpaired’ Auswertung wurde für Embryonaltag 10 gegen Embryonaltag 18, Embryonaltag 18 mit Tag 2 und Tag 2 mit Tag 28 nach dem Schlupf durchgeführt.

Eine ‘Multiclass’ Analyse bietet die Möglichkeit, signifikante Probes in mehreren Gruppen zu finden, wobei auch hier ungepaarte Proben eingesetzt wurden. Für unsere Experimente wurde eine ‘Multiclass’ Analyse über alle vier Entwicklungszeitpunkte durchgeführt.

Als Eingabedatei diente ein Exceltabellenblatt mit dem Probe-Identifikator und den normalisierten gProcessedSignal Werten. Zudem wurde in der zweiten Zeile eine Kennzeichnung der ‘Respons variable’ eingefügt. Für ‘Two class, unpaired’ wurden die zu vergleichenden Gruppen als 1 und 2 beziffert, in der ‘Multiclass’ Analyse mit 1, 2, 3 und 4.

#### 4.11.4. Berechnung der Expressionsänderung (fold change)

Der fold change (FC) ist eine mathematische Operation, die wiedergibt wie stark zwei Variablen voneinander differieren. Dabei wurden die Expressionsdaten einer Gruppe 2 (Embryonaltag18) ins Verhältnis zu einer Gruppe 1 (Embryonaltag10) gesetzt womit die Expressionsänderung von Gruppe 2 relativ zur Gruppe 1 dargestellt werden konnte.

Die Berechnung des FC erfolgte in einem Microsoft Excel Tabellenblatt. Als Ausgangswerte wurden die normalisierten (und damit logarithmierten) gProcessedSignale in eine Tabelle eingefügt. Zum Errechnen des FC wurde folgende Formel verwendet:

$$FC = \text{EXP}(\text{MITTELWERT}(\text{Gruppe2}) - \text{MITTELWERT}(\text{Gruppe1}))$$

Ein Wert von 1 bedeutet, dass keine Unterschied zwischen den Zeitpunkten besteht. Werte über 1 stehen für eine höhere Expression in der Gruppe 2, während ein Wert unter 1 eine Herunterregulation gegenüber der Gruppe 1 indiziert.

Zur besseren Interpretation der herunter regulierten FC-Werte wurde folgende Excel Funktion durchgeführt:

$$= \text{WENN}(FC < 1; -1/FC; FC)$$

Eine WENN-Funktion gliedert sich in drei sogenannte Argumente.

**Prüfung:** steht für die Bedingung → WENN der FC kleiner 1 ist.

**Dann-Wert:** Was tun, wenn die Prüfung stimmt? → Nehme -1 geteilt durch den FC-Wert.

**Sonst-Wert:** Was tun, wenn die Prüfung nicht stimmt? → Belasse den FC-Wert unverändert.

Als Ergebnis bleiben FC-Werte größer oder gleich 1 unverändert, während bei Werten kleiner 1 der negative Kehrwert des FC gebildet wurde. Damit entsprach ein FC von 0,5 nach der Umrechnung:

$$X = -1/0.5 = -2$$

Also einer 2fachen herunter Regulation des Genes.

#### **4.11.5. Microsoft Office Access 2003 Datenbanksystem**

Microsoft Access wurde verwendet um Daten aus verschiedenen Analysen in direktem Vergleich gegenüber zu stellen und Eingabedateien für weitere Analysen zu erstellen.

Als Beispiel wurden die Ergebnisse der Signifikanzanalyse (SAM), der berechneten Expressionsänderung (fold change) und den normalisierten Expressionsdaten (R) in einer Abfrage kombiniert. Durch Anlegen von Filterfunktionen konnten aus dieser Abfrage neue Tabellen generiert werden, in welcher nur Gene mit einem mindest fold change von x und einer False discovery rate von y% aufwiesen. Durch Kombination dieser Daten mit den normalisierten Expressionswerten wurden Eingabedateien für weitere Analysen anfertigt.

#### **4.11.6. Pathway Express**

Das online Programm Pathway Express (Intelligent Systems and Bioinformatic Laboratory, Department of Computer Science, Wayne State University, Detroit) kann Gene darauf prüfen, ob sie in einem bekannten Signalweg vorkommen. Dazu greift das Programm auf die KEGG Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) zu.

Als Eingabedatei („input file“) wurde eine Textdatei mit dem ortologen humanen Gensymbol und dem FC von allen signifikant regulierten Genen erstellt. Die Referenzdatei („referenz file“) enthielt alle ortologen humanen Gensymbole die auf dem Array vorhanden sind.

Über ein Internet Portal wurden die Daten in das Programm geladen. Die Ergebnisse wurden als textformatierte Dateien gespeichert.

Der Impact Faktor der zu jedem Signalweg angegeben wurde spiegelt die Eindeutigkeit der enthaltenen Gene und deren Lage im Signalweg wieder. Aus der errechneten Signifikanz der Signalwege (p-value), dem FC und dem Impact Factor berechnete das Programm einen corrected gamma p-value. Als Grenzwert für die biologische Relevanz des Signalwegs wurde ein corrected gamma p-value von kleiner 0,25 festgelegt.

Die Graphiken zu den Signalwegen wurden über die Webseite der KEGG Datenbank abgerufen.

#### 4.11.7. Expander

Die Expander Software ist eine auf Java basierende Anwendung zur Analyse von Genexpressionsdaten. Im Besonderen wurden Clusteranalysen und weiter folgende Anreicherungs-Analysen, wie Gene-Ontology und Transkriptionsfaktorenanalyse in diesem Programm durchgeführt.

Folgende Analysen wurden immer vergleichend zwischen 2 Entwicklungszeitpunkten durchgeführt.

Als Eingabedatei wurde eine tabstop getrennte Textdatei erstellt. Dafür wurden die ProbeID von allen auf dem Array vorhandenen Features mit den jeweils dazu gehörenden normalisierten gProcessedSignal und dem entsprechenden Gensymbol aufgelistet. Die Konversionsdatei wurde aus allen ProbeID und den zu diesen zugeordneten Ensembl Gene IDs erstellt.

Zunächst wurden die Daten einer Medianisierung unterzogen (Mean 0 and Variance 1), und ein t-Test auf Basis der False Discovery Rate durchgeführt (p-value kleiner 0,01).

Durch eine Clusteranalyse wurden Gene die ein ähnliches Expressionsverhalten zeigten in Gruppen (Cluster) unterteilt. Ein gutes Cluster sollte 2 Kriterien erfüllen, eine hohe Homogenität der Gene im Cluster, und eine klare Abgrenzung zu anderen Clustern.

Zur funktionellen Analyse wurden die Gene der Cluster, anhand der Esemble Gene ID, in funktionelle Gruppen unterteilt (Gene Ontology, GO). Für diese Analyse wurde die TANGO Software von Expander eingesetzt, die für jede funktionelle Gruppe einen empirischen p-Wert berechnet.

Mittels der Promotoranalyse wurden Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt die in den gegebenen Clustern signifikant überexprimiert waren. Hierbei führte die PRIMA Software (Promotor Integration in Microarray Analysis) eine statistische Analyse auf die Streuung der Transkriptionsfaktormotive der Promotoren von allen in den Cluster enthaltenen Genen durch.

#### 4.11.8. Multi Experiment Viewer v4.5.1 (MEV)

Die MEV Software bietet die Möglichkeit mehrere in einem Experiment erstellte Gruppen gemeinsam auszuwerten. Mittels MEV wurden Clusteranalysen über alle 4 Entwicklungszeitpunkte erstellt und graphisch ausgewertet.

In die Analyse wurden die in SAM Multiclass signifikant regulierten Gene eingesetzt die einen FC von mindestens +/-2 zeigten. Für eine korrekte Darstellung der Expressionswerte wurden diese über alle Entwicklungszeitpunkte gemittelt. Die normalisierten und logarithmierten gProcessedSignal Werte wurden mit dem zugehörigen ProbeID in einem Excel Tabellenblatt (Tabelle1) zusammengestellt. Ein zweites Tabellenblatt wurde nur mit den Überschriften und den ProbeIDs erstellt. Im ersten Datenfeld des zweiten Tabellenblatts wurde folgende Formel eingegeben:

*=Tabelle1!B2-MITTELWERT(Tabelle1\$B2:\$x2)*

(wobei x der letzten Datenspalte in der ersten Tabelle entspricht)

Dadurch wird der Mittelwert aller gProcessedSignals eines Features von jedem Einzelwert dieses Features subtrahiert (ein negativer Wert bedeutet dass die Signalintensität unter dem Durchschnitt aller Signalintensitäten dieses Features liegt). Diese Formel wurde auf den gesamten Datenbereich kopiert.

Als Eingabedatei wurde eine tabstop getrennte Textdatei erstellt die die ProbeID mit Gensymbol und die nun auch gemittelten gProcessedSignals enthielt.

Zunächst wurde eine hierarchische Cluster-Analyse (Hierarchical Clustering HLC, sample tree) der Probenarrays durchgeführt (Metrik: Pearson correlation, Iterationen: 100). Anhand der resultierenden Graphik lies sich abschätzen wie ähnlich sich die Proben innerhalb eines Zeitpunktes beziehungsweise die Zeitpunkte zu einander sind. Die baumartige Darstellung zeigt je nach Entfernung der Knotenpunkte zueinander, wie eng sich die Beziehung zwischen den verglichenen Proben darstellt.

Um Gene mit ähnlichen Expressionsmuster zu clustern, wurde eine Self Organizing Tree Algorithm (SOTA) Analyse durchgeführt (Metrik: Pearson correlation). SOTA erstellt ein Dendrogramm (binärer Baum) in welchem jeder Endpunkt einem Cluster gleichsteht. Die Einstellungen des Programms müssen dabei abhängig von Anzahl der Gene und deren Diversität angepasst werden. Die Option 'max. Cycles' repräsentiert die maximale Anzahl an Iterationen die erlaubt sind, die Anzahl der erhaltenen Cluster entspricht der „max. Cycle“ +1. Die 'max. Cell Diversity' gibt die maximal erlaubte Diversität in einem Cluster an. Ergänzend

---

gibt 'min. Epoch Error Improvement' einen Grenzwert für den Beginn eines neuen Zyklus und damit der Aufspaltung in ein neues Cluster an.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Annotation

Damit funktionelle Aussagen über die Gene auf dem Array gemacht werden können, muss jedem Spot bzw. jeder Oligosequenz ein entsprechendes Gen zugeordnet werden. Nach dem Design des Arrays waren von Agilent nur 5.844 der 44.000 Spots mit einer entsprechenden Geninformation korreliert. Zudem waren über die 1.699 Spots die mittels Custom-Design zugefügt wurden Informationen vorhanden. Mittels der unter 4.10.3. genannten Programme konnten insgesamt 24.515 Probes ihrem entsprechenden Gen zugeordnet werden. Dies entspricht, abzüglich der duplizierten Spots, 13.353 Genen die damit in Genexpressions-Analysen ausgewertet werden können.

Eine Auflistung der annotierten Gene ist auf der beiliegenden CD in der Excel-Tabelle „Annotation“ zu finden.

### 5.2. Probenzeitpunkte und –Entnahme

Um die für Immigration, Entwicklung und Emigration regulatorischen Gene identifizieren zu können wurden 4 Zeitpunkte zur Entnahme der Organe definiert. Dabei wurde berücksichtigt, dass auf transkriptomischer Ebene zum Zeitpunkt der Wirkung eines Proteins die mRNA unter Umständen bereits wieder abgebaut sein kann. Daher wurden die Entnahmezeiten in Phasen der Entwicklung gelegt, die markante Entwicklungsstadien zeigen und zu denen ein aktives Signal zu erwarten ist.

Folgende Zeitpunkte wurden gewählt:

Embryonaltag 10: Die B-Zellen beginnen die Bursa zu besiedeln. Daher werden in dieser Phase solche Gene vom Bursamesenchym und den einwandernden B-Zellen exprimiert die die Einwanderung in die Bursa steuern.

Embryonaltag 18: Zu diesem Entwicklungszeitpunkt ist die Einwanderung der B-Lymphozyten abgeschlossen, die B-Zellen haben die Bursa aber noch nicht verlassen. Diese Phase ist geprägt durch anhaltende Expansion der B-Zellen, und die Diversifizierung des Rezeptorrepertoires mittels Genkonversion.

Tag 2: Nach dem Schlupf hat die Auswanderung der B-Lymphozyten bereits begonnen, während die Vorgänge in der Bursa weiterhin durch Proliferation, Apoptose und Genkonversion geprägt sind. Besonders im Vergleich zu Embryonaltag 18 sind Expressionsänderungen zu erwarten die den Zellen ermöglichen die Bursa zu verlassen.

Tag 28: Eine voll ausdifferenzierte Bursa Fabricii, mit in Rinde und Mark unterteilten Follikeln ist 28 Tage nach dem Schlupf zu finden.

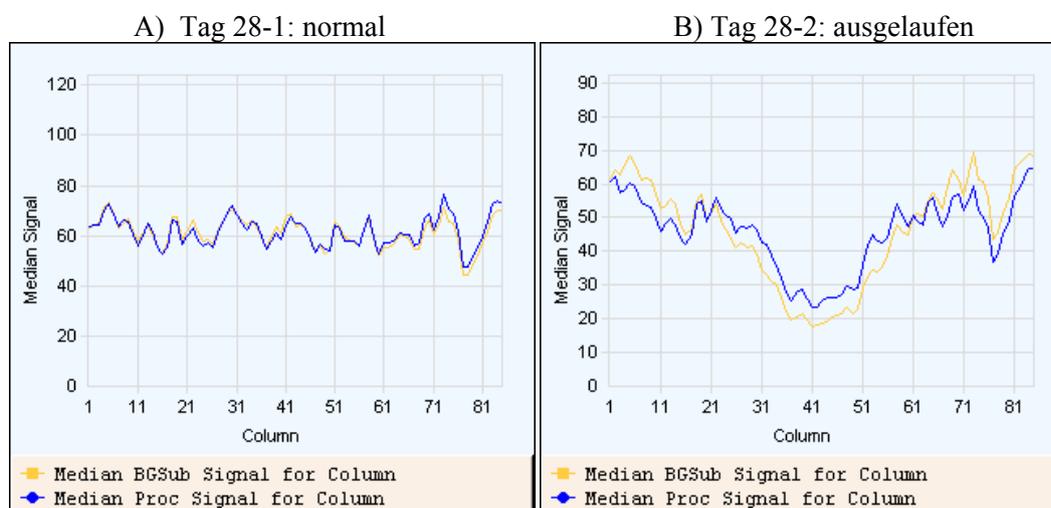
Für jeden Zeitpunkt wurden 7 biologische Probenreplikate gewonnen.

### 5.3. Genexpressions-Analyse

Nach RNA-Isolation wurden die 5 besten Replikate anhand der RIN ( $>9,4$ ) und RNA-Reinheit ( $260/230 > 2,0$ ;  $260/280 > 1,8$ ) ausgewählt. Die Hybridisierung der Proben erfolgte auf den „customized“ chicken Agilent 4x44k Array.

#### 5.3.1. Feature Extraction QC Report

Nach Hybridisierung und Scann der Arrays wurden die einzelnen Arrays zunächst auf technische Mängel und Reproduzierbarkeit mittels der Agilent-Feature-Extraction Software überprüft. Dabei zeigte die Probe Tag 28-2 ein stark abweichendes Signalmuster (s. Abb.7), das auf technische Probleme bei der Hybridisierung zurück zuführen war. Daher wurde die Arrayprobe Tag 28-2 von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



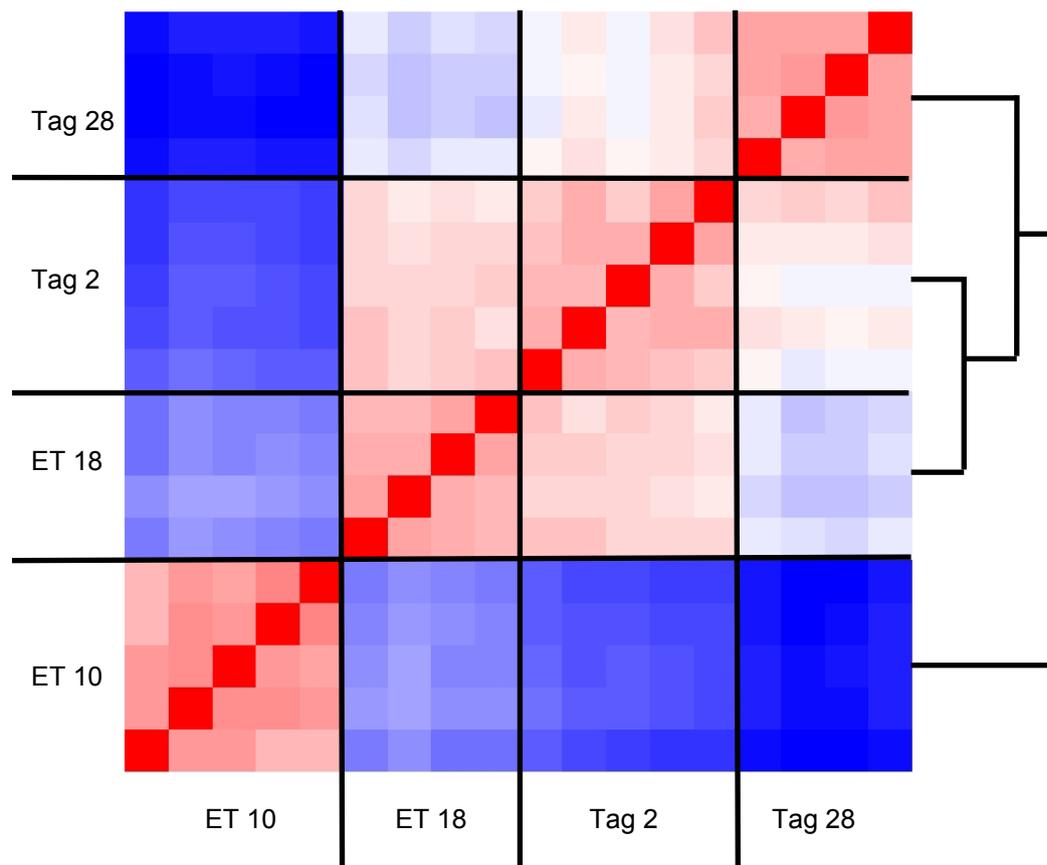
**Abb.7 Verteilung der Signalstärke über den Array-Querschnitt.** Dargestellt sind die Signalstärke einer normalen hybridisierten Probe (A) sowie die Probe mit mangelhafter Hybridisierung (B).

### 5.3.2. Darstellung der Daten mittels Heat Map

Mittels des Bioconductor „R“-Pakets *GENPLOTTER* (Version 2.9.1, The R Foundation for Statistical Computing) wurden die VSN-normalisierten Daten in einer Heat-Map und einem Distance-Plot graphisch dargestellt (s. Abb.8). Diese Darstellungsformen der Daten ermöglichten eine erste Abschätzung der Homologie innerhalb eines Datensets, sowie der Differenz zwischen verschiedenen Probengruppen. Identische Arrays werden in der Heatmap in roter Farbe dargestellt, je verschiedenartiger die verglichenen Proben sind, desto schwächer wird diese Farbe bis sie schließlich ins Blaue umschlägt. Eine Darstellung in Blau bedeutet dass die verglichenen Arrays ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster zeigen. Die Daten wurden ohne Zuteilung zu einer Gruppe eingespeist, so dass die Gruppierung der Arrays durch das Programm alleine auf der Ähnlichkeit der Signalintensitäten beruht.

Ein Distance-Plot stellt mittels eines Dendrogramms die verwandtschaftlichen Beziehungen der identifizierten Probengruppen dar. Je näher die Knotenpunkte zueinander liegen desto ähnlicher sind die Gruppen zueinander.

Eine erste Darstellung zeigte, dass die Probe ET 18-1 sich der Gruppen zuzuordnen war. Solch Arrayproben können die Expressionsdaten bei einer gruppenorientierten Auswertung, wie der Berechnung des FC oder beim Mitteln der Expressionsstärke verfälschen. Aufgrund dieser nicht möglichen Zuteilung der Probe zu einem Entwicklungszeitpunkt wurde diese von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



**Abb. 8: Heatmap der Arrays.** Kombinierte Darstellung von Heat-Map und Distance-Plot der Arrays, erstellt mittels R“-Paket *GENPLOTTER* (Version 2.9.1). Gegeneinander aufgetragen sind die Einzel-Arrays, je ähnlicher sich die gegenübergestellten Arrays sind desto stärker rot werden die Felder angezeigt, stark unterschiedliche Arrays dagegen in blau. Das Dendrogramm rechts außen zeigt die verwandtschaftliche Beziehung der Probezeitpunkte zueinander.

Die Abb.8 zeigt, dass die Arrays der einzelnen Entwicklungszeitpunkte homogene Gruppen bilden, in denen die Arrays des jeweiligen Zeitpunkts eine hohe Gleichartigkeit zueinander aufweisen. Zudem sind die Entwicklungszeitpunkte untereinander klar abgrenzbar und lassen deutliche Diskrepanzen zueinander erkennen. Daraus lässt sich folgern, dass das Protokoll zur Probenentnahme eine zuverlässige Erhebung von Expressionsdaten unter standardisierten Bedingungen gewährleistet. Zum anderen zeigen die Unterschiede der Probezeitpunkte zueinander, dass es sich um Entwicklungsstufen der Bursa handelt, die sich auch auf transkriptomischer Ebene unterscheiden.

Auch anhand des Dendrogramms ist ersichtlich, dass ET 10 die größte Abweichung zu den anderen Zeitpunkten aufweist. ET 18, Tag 2 und Tag 28 bilden damit ein von ET 10 abgetrenntes „Cluster“. Innerhalb der anderen 3 Zeitpunkte zeigen ET 18 und Tag 2 ein ähnliches Expressionsprofil während Tag 28 wiederum deutlichere Unterschiede aufweist.

Nur durch diese stabile Gruppierung der Proben ist es möglich im Folgenden weiterführende gruppenorientierte Analysen durchzuführen.

#### 5.4. „Two class, unpaired“ Signifikanz-Analyse mittels SAM

Eine stringente statistische Aufarbeitung der Expressionswerte bietet eine weitere Grundlage, um Gene zu identifizieren, die zwischen den definierten Entwicklungszeitpunkten hoch- oder herunter-reguliert sind. Mittels SAM (significance analysis of microarrays) wurden die Expressionsdaten auf Grundlage der „false discovery rate“ (FDR) einer Signifikanzanalyse unterzogen. Der „fold change“ (FC) gibt die Höhe der Expressionsänderung eines Gens im Vergleich zwischen 2 Zeitpunkten an, und stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Anzahl der differentiellen Spots auf diese einzugrenzen, die ein Mindestmaß an Regulation zeigen.

Mittels einer „two class, unpaired“-Auswertung werden die signifikant differentiell regulierten Gene zwischen 2 Zeitpunkten ermittelt. Für Embryonaltag 10 gegenüber Embryonaltag 18, Embryonaltag 18 gegenüber Tag 2 und Tag 2 gegenüber Tag 28 nach dem Schlupf wurde eine vergleichende Analyse durchgeführt.

Tab.3 gibt die signifikant differentiell regulierten Spots der Einzelvergleiche zwischen den Zeitpunkten, sowie den Anteil der hochregulierten (positiv) und herunter regulierten (negativen) Spots an. Als Grenzwert der Signifikanz wurde eine FDR von kleiner 1 % angesetzt und um diese Anzahl an differentiellen Spots weiter einzuschränken wurde ein mindest FC von kleiner -2 und größer 2 Angelegt.

	signifikant regulierte Spots	positiv	negativ	Gen-Anzahl
ET 10 / ET 18	10,549	4,347	6,202	4,410
ET 18 / Tag 2	1,497	169	1,328	708
Tag 2 / Tag 28	3,782	712	3,070	2,239

**Tab. 4: signifikant regulierte Spots der „two class unpaired“ Auswertung**, bei einer FDR von <1% und einem FC von mindestens +/- 2. Spalte 2 zeigt die Anzahl an Spots mit einem positiven FC, Spalte 3 entspricht Spots mit negativem FC. Die „Gen-Anzahl“ gibt die von den differentiellen Spots annotierten Gene an.

Eine komplette Auflistung aller signifikant differentiell regulierten Gene mit dem FC ist in der beiliegenden CD in Tabelle „Two class unpaired“ beigefügt.

Diese Ergebnisse der „two class unpaired“-Auswertung spiegeln die Erkenntnisse aus der Heatmap-Analyse deutlich wieder. Wie in Abb.8 bereits zu sehen zu sehen war, zeigt auch die „Two class unpaired“-Auswertung die größten Unterschiede mit 4.410 differentiellen Genen zwischen ET 10 und ET 18. Die geringsten Unterschiede zeigen ET 18 zu Tag 2 (708 Genen), während die Anzahl der differentiellen Genen zwischen Tag 2 und Tag 28 wieder auf 2.239 ansteigt.

Ebenfalls bemerkenswert erscheint die deutlich höhere Anzahl an herunter regulierten Genen in allen 3 Vergleichen. Zwischen ET 10 und ET 18 sind ca. 50% mehr Spots herunter reguliert als hochreguliert, für ET 18 zu Tag 2 sogar fast 8mal so viele und für Tag 2 zu Tag 28 die 4fache Anzahl an Spots mit einer verminderten Expression.

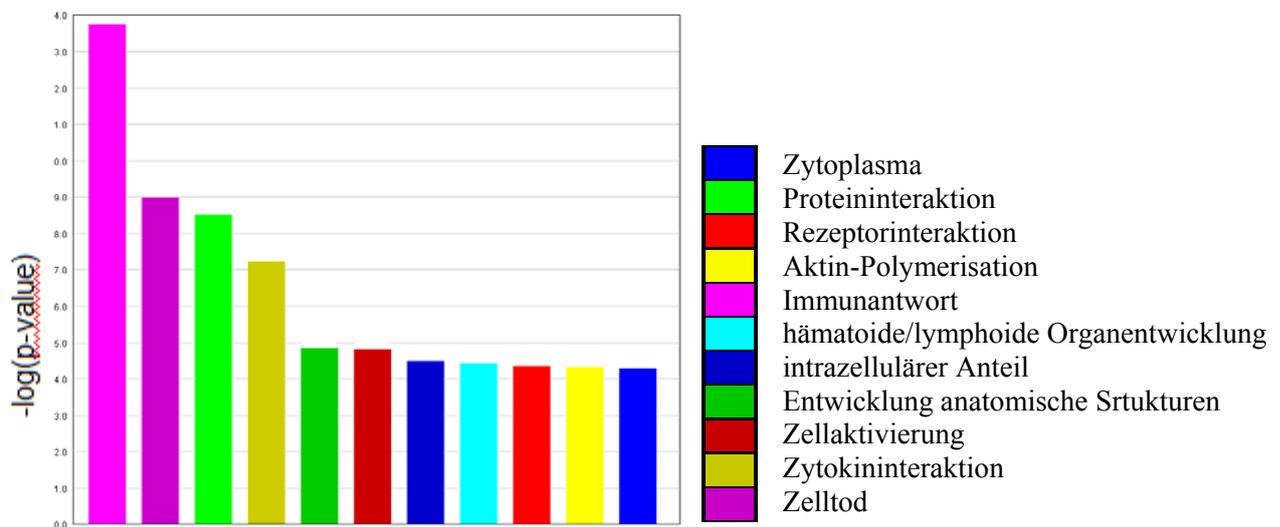
#### **5.4.1. Funktionelle Analyse der Einzelvergleiche**

Besonders zwischen ET 10 und ET 18, aber auch für die anderen „two class, unpaired“ Ergebnisse zeigte sich eine hohe Zahl an differentiellen Genen. Um funktionell bedeutsame Kandidatengene zu identifizieren, wurden die in der „two class, unpaired“-Analyse differentiell regulierten Spots weiteren Analysen unterzogen.

##### **5.4.1.1. Gene-Ontology-Analyse**

Eine Einteilung in funktionelle Gen-Gruppen („gene ontology“, GO) mittels „Expander“ (4.11.7) erleichtert das Erkennen von Mustern in einem gegebenen Datensatz von differentiellen Genen.

Für den Vergleich zwischen ET 10 und ET 18 konnten 6.266 der differentiellen Spots über die Ensembl Gene ID in funktionelle Gruppen eingeteilt werden.



**Abb. 9: signifikant angereicherte Klassen zwischen Embryonaltag 10 und Embryonaltag 18, die Höhe der Balken entspricht der Signifikanz der funktionellen Klasse als  $-\log(p\text{-value})$**

In Abb.9 sind die signifikant regulierten funktionellen Klassen zwischen ET 10 und ET 18 gezeigt. Für mehrere der funktionellen Gen-Klassen, wie *hämatoide/lymphoide Organentwicklung*, *Immunantwort*, *Entwicklung anatomische Strukturen*, *Zytokininteraktion* und *Zelltod*, kann ein eindeutiger Zusammenhang mit der Entwicklung eines lymphoiden Organs erkannt werden.

Für die Vergleiche ET 18 zu Tag 2 und Tag 2 zu Tag 28 wurden keine signifikanten Klassen mit Bezug zur Entwicklung der B-Zellen gefunden. Eine Liste aller gefunden Klassen und den darin enthaltenen Genen findet sich in der Tabelle „*GenOntology*“ auf der beiliegenden CD.

### 5.4.2. Pathway-Analyse

Mittels „Pathway Express“ wurden signifikante Signalwege innerhalb eines Sets von differentiellen Genen ermittelt. Insgesamt waren für ET 10-ET 18 42 Pathways, für ET 18-Tag 2 33 und für Tag 2-Tag 28 38 Pathways signifikant mit einem „corrected gamma p-value“ von kleiner 0,25 reguliert. Tab.5 zeigt die biologisch relevant regulierten Pathways der Einzelvergleiche, die im Bezug auf das Immunsystem und Entwicklung von Bedeutung sind.

ET10 vs ET18	ET18 vs Tag2	Tag2 vs Tag28
B cell receptor signaling pathway	Leukocyte transendothelial migration	Leukocyte transendothelial migration
Cell adhesion molecules (CAMs)	Cell adhesion molecules (CAMs)	Cell adhesion molecules (CAMs)
Cytokine-cytokine receptor interaction	Phosphatidylinositol signaling system	Adherens junction
Hematopoietic cell lineage	Adherens junction	ECM-receptor interaction
Leukocyte transendothelial migration	Hematopoietic cell lineage	Focal adhesion
Phosphatidylinositol signaling system	ECM-receptor interaction	Cytokine-cytokine receptor interaction
Antigen processing and presentation	Cytokine-cytokine receptor interaction	Hematopoietic cell lineage
Toll-like receptor signaling pathway	Gap junction	Phosphatidylinositol signaling system
ECM-receptor interaction	Tight junction	Gap junction
Jak-STAT signaling pathway	Focal adhesion	TGF-beta signaling pathway
Calcium signaling pathway	Calcium signaling pathway	Jak-STAT signaling pathway
T cell receptor signaling pathway	Antigen processing and presentation	Calcium signaling pathway
Adherens junction	TGF-beta signaling pathway	Tight junction
Tight junction	Regulation of autophagy	Antigen processing and presentation
Regulation of actin cytoskeleton	MAPK signaling pathway	Wnt signaling pathway
Focal adhesion	mTOR signaling pathway	ErbB signaling pathway
Fc epsilon RI signaling pathway	Jak-STAT signaling pathway	
Hedgehog signaling pathway	Apoptosis	

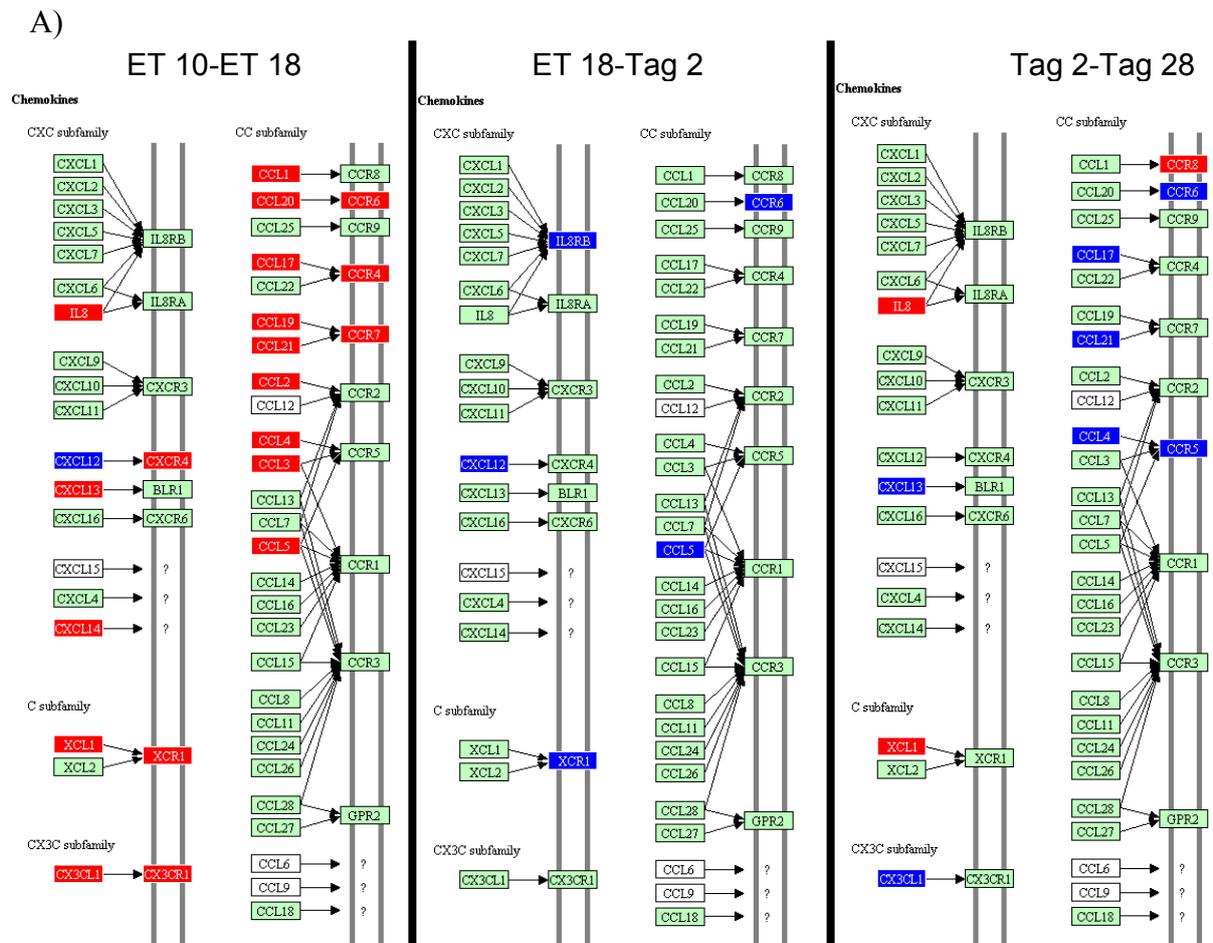
**Tab. 5: Biologisch relevant regulierte Pathways der Einzelvergleiche.** Die Tabelle gibt die, mittels Pathway Express erschlossenen, biologisch relevant regulierten Signalwege mit einem corrected gamma p-value von  $<0,25$  wieder. Die Reihenfolge der Pathways ist absteigend nach dem corrected gamma p-value. Farblich hervorgehoben sind Pathways die in allen 3 Vergleichen vorkommen. In Rot sind die Pathways dargestellt die im Zusammenhang mit Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion stehen.

Bereits die Anzahl der relevant regulierten Signalwege bestätigt nochmals die in den ersten Analysen gewonnenen Erkenntnisse, dass die drastischsten Veränderungen zwischen ET 10 und ET 18 stattfinden, und ET 18 und Tag 2 sich in ihrem transkriptomischen Profil am meisten gleichen.

Einige der Signalwege fallen dadurch auf, dass sie in allen 3 Vergleichen als relevant reguliert auftauchen. Dazu zählen ins besondere Pathways im Zusammenhang mit Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion wie *Cell adhesion molecules (CAMs)*, *ECM-receptor interaction*, *Adherens junction* oder auch *Leukocyte transendothelial migration*. Andere interessante Signalwege in allen Vergleichen sind im Bereich der Signaltransduktion anzusiedeln, *Phosphatidylinositol signaling system* oder *Jak-STAT signaling pathway*. Ebenfalls in allen Vergleichen ist der Signalweg *Cytokine-cytokine receptor interaction* (S. Abb.10) signifikant reguliert in dem Chemokine, die TNF-Superfamilien-Mitglieder, Interleukine sowie TGF-Mitglieder erfasst sind und die besonders viele differentiell regulierte Gene beinhaltet.

Spezifisch für den Einzelvergleich ET 10 zu ET 18 allen als erstes der *B cell receptor signaling pathway* aber auch der *Antigen processing and presentation* und der *Fc epsilon RI signaling pathway* auf, was auf die enorme Zunahme der B-Zellen zwischen diesen Entwicklungsstadien zurückzuführen ist. Der Vergleich zwischen ET 18 und Tag 2 zeigt als einziger die Pathways *Apoptosis* und *Regulation of autophagy* als biologisch relevant

reguliert, was in diesem Zeitraum wichtige Prozesse in der Regulation der B-Zellentwicklung widerspiegelt. Tag 2 zu Tag 28 offenbart eine Auffälligkeit in den Pathways die für Entwicklung und Steuerung von Zellzyklus beschrieben sind, wie *Wnt signaling pathway* und *ErbB signaling pathway*, wobei die enthaltenen Gene vor allem eine verminderte Expression aufweisen. Dieser Befund scheint im Zusammenhang mit der abgeschlossenen Differenzierung der Bursa zu einem lymphoiden Organ an Tag 28 zu stehen.





**Abb. 10: Ausschnitte aus dem Pathway *Cytokine-cytokine receptor interaction*.** Dargestellt ist ein Ausschnitt des Mittels Pathway Express als signifikant (corrected gamma p-value <0,25) erkannten *Cytokine-cytokine receptor interaction* Pathway. A) Chemokine; B) TNF-Familien-Mitglieder. In rot sind hochregulierte Gene unterlegt, in blau solche mit einer verminderten Expression zwischen den beiden verglichenen Entwicklungszeitpunkten, in grün sind nicht signifikant regulierte oder nicht auf dem Array annotierte Gene.

Die Abb. 10 zeigt Ausschnitte aus dem Pathway *Cytokine-cytokine receptor interaction*. Insgesamt waren 131 der 263 in dem Pathway bekannten Gene auf dem Array enthalten. Zwischen ET 10 und ET 18 waren 60 Gene signifikant mit einem FC von mindestens +/- 2 reguliert, wovon 49 Gene eine erhöhte und 11 eine verminderte Expression an ET 18 zeigen. 19 Gene zeigten zwischen ET 18 und Tag 2 eine differentielle Regulation, mit 16 Genen die an Tag 2 vermindert und 3 Gene die höher exprimierten waren. Im Vergleich Tag 2 zu Tag 28 waren 44 der differentiiell regulierten Gene im *Cytokine-cytokine receptor interaction* Pathway enthalten, von denen 34 eine reduzierte und 10 eine verstärkte Expression aufwiesen. Insgesamt kann man somit eine zu der Heatmap (Abb.8) ähnliche Regulation sehen, die die

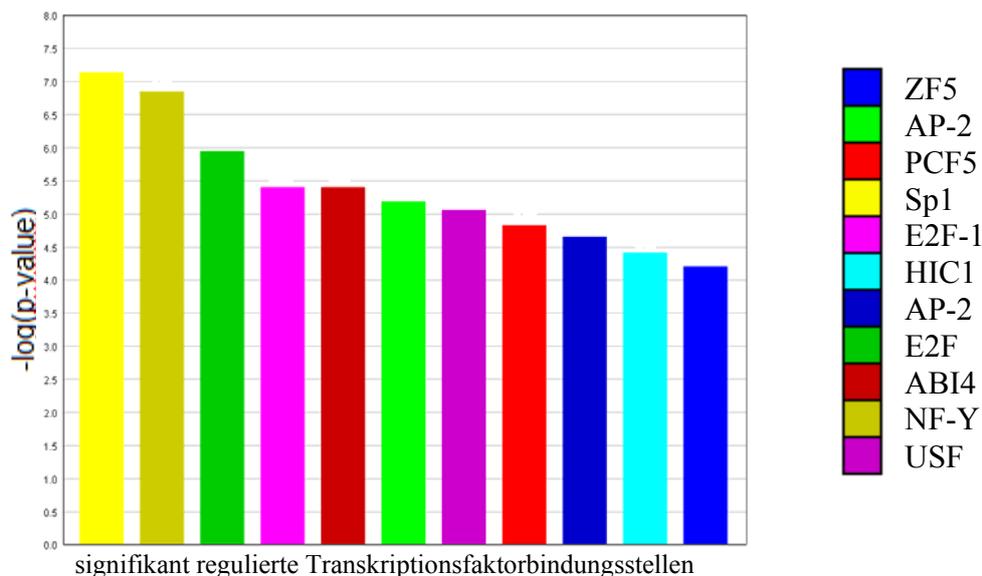
größten Unterschiede für ET 10 zu den weiteren Zeitpunkten, sowie die geringeren Differenzen zwischen ET 18 und Tag 2 und wiederum ein höheres Maß an Regulation zwischen Tag 2 und Tag 28 zeigt. Zudem zeigt sich eine verstärkte Aktivierung von Genen zwischen ET 10 und ET 18, während zu Tag 2 und Tag 28 die Mehrzahl der differentiell regulierten Gene eine verminderte Expression zeigen.

Ein zu ET 18 stark hochreguliertes Gen (FC= 482) im *Cytokine-cytokine receptor interaction* Pathway ist BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family), das für die Entwicklung der B-Zellen als essentieller Überlebensfaktor beschrieben ist.

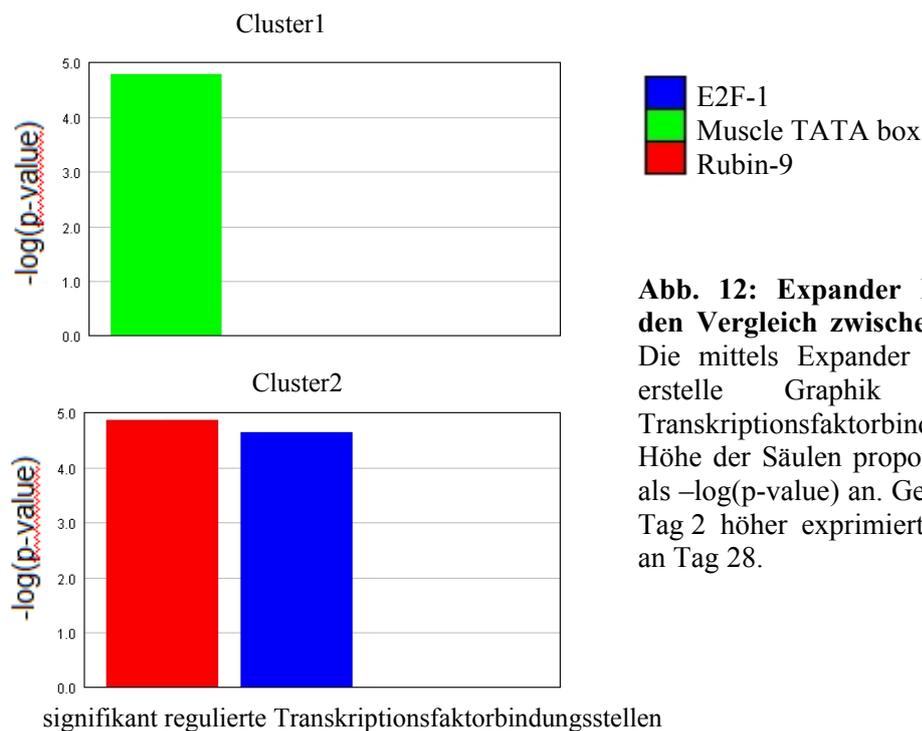
Eine Liste aller signifikanten Pathways sowie deren Graphiken sind im Ordner „*Pathways*“ auf der beiliegenden CD zu finden.

### **5.4.3. Promotoranalyse**

Mittels der Expander Promotor-Analyse wurde untersucht ob unter den Genen Gruppen sind die durch denselben Transkriptionsfaktor aktiviert werden. Diese Analyse wurde nur für die Einzelvergleiche erstellt, um Transkriptionsfaktoren zu erkennen die für einzelne Entwicklungszeitpunkte spezifisch aktiv sind. Für den ET 18 zu Tag 2 Abgleich waren keine signifikant unterschiedlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen aufzufinden, für ET 10/ET 18 zeigte eine Cluster mit hochregulierten Genen die in Abb.13 dargestellten Faktoren. Im Vergleich von Tag 2 zu Tag 28 konnten 2 Cluster mit signifikanten Transkriptionsfaktorbindungsstellen nachgewiesen werden, Cluster 1 enthielt Gene, die zu Tag 2 höher exprimiert waren, Cluster 2 dagegen Gene mit Hochregulation zu Tag 28 (s. Abb.14).



**Abb. 11: Expander Promotoranalyse für den Vergleich zwischen ET 10 und ET 18.** Die mittels Expander für ET 10 zu ET 18 erstelle Graphik der signifikanten Transkriptionsfaktorbindungsstellen zeigt die Höhe der Säulen proportional zur Signifikanz als  $-\log(p\text{-value})$  an.



**Abb. 12: Expander Promotoranalyse für den Vergleich zwischen Tag 2 und Tag 28.** Die mittels Expander für Tag 2 zu Tag 28 erstelle Graphik der signifikanten Transkriptionsfaktorbindungsstellen zeigt die Höhe der Säulen proportional zur Signifikanz als  $-\log(p\text{-value})$  an. Gene in Cluster 1 sind an Tag 2 höher exprimiert, Gene des Clusters 2 an Tag 28.

Der Transkriptionsfaktor *E2F-1* kommt in beiden Vergleichen (ET 10 / ET 18 und Tag 2 / Tag 28) vor, und ist ein wichtiger Aktivator des Zellzyklus. Zu den regulierten Genen zählen vor allem DNA-Polymerasen und andere Proteine die an der DNA-Replikation beteiligt sind. Andere Mitglieder der *E2F-Familie* sind sowohl als positiv als auch negative Regulatoren des Zellzyklus, der Apoptose oder der DNA-Reparatur beteiligt. Der am signifikantesten

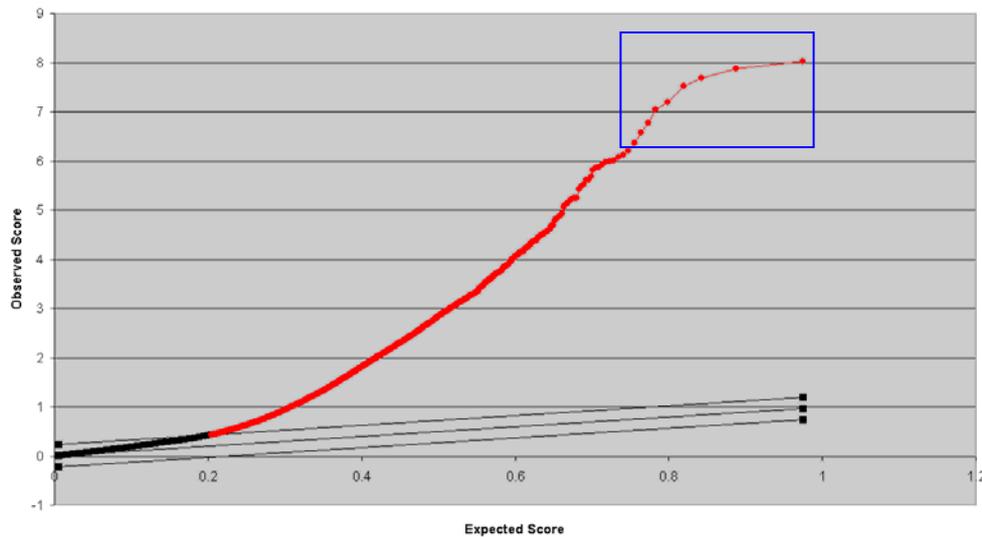
regulierte Transkriptionsfaktor *Sp1* ist ähnlich dem *SPF5*, *AP-2* an verschiedenen embryonalen Entwicklungsprozessen von Hämatopoese, Skelett-, Leber- und Lungenentwicklung beteiligt. *NF-Y* sowie *HIC1* sind Transkriptionsfaktoren die regulatorisch an der Transkription von RNA-polymerase II und DNA-Reparatur beteiligt sind.

Die Expander Transkriptionsfaktorenanalyse zeigt somit eine Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren die vor allem Bereiche der Zell- und auch Gewebsentwicklung betreffen. Dieses Ergebnis spiegelt somit die erwarteten Änderungen in Zusammenhang mit der Entwicklung der Bursa und der starken Proliferation der B-Zellen wieder.

### **5.5. „Multiclass“ Signifikanz-Analyse mittels SAM**

In der „two class unpaired“-Analyse wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, was eine gute Statistik für den direkten Vergleich von zwei Entwicklungszuständen ermöglicht. Allerdings kann kein direkter Vergleich zwischen mehreren Probengruppen gleichzeitig erfolgen, so dass das Expressionsverhalten über mehrere Zustände eine eigene Statistik erfordert.

Durch die „Multiclass“-Analyse wurde daher über alle 4 Entwicklungsstadien hinweg die Signifikanz der differentiell regulierten Spots berechnet. Bei einer FDR von kleiner 1 % waren 22.191 der insgesamt 44.000 Spots signifikant differentiell reguliert (s. Abb.8) Über Filterfunktionen wurden Spots ausgewählt, die mindestens beim Vergleich der Zeitpunkte einen FC von kleiner -2 und größer 2 zeigten. Nach Anlegen dieser Kriterien ergaben sich noch 6.510 signifikant differentiell regulierte Spots, die 4.372 annotierten Genen entsprechen. Dies entspricht einer deutlich geringeren Anzahl an Genen als sie insgesamt in der „two class unpaired“-Analyse mit 5.225 differentiellen Genen gefunden wurden, was durch die generell unterschiedliche Statistik der „Multiclass“-Analyse bestätigt.



**Abb. 13: Plot der 22.191 in SAM-Multiclass-Analyse.** Die Graphik der SAM Multiclass-Analyse zeigt die signifikant regulierten Spots bei einer FDR von <1%, die 9 markierten Spots zeigen sich deutlich abgesetzt zu den anderen.

Die Darstellung der signifikanten Spots zeigte eine auffällige Abgrenzung von 9 Spots, die in der Abb.8 markiert sind. Bei einer genaueren Analyse konnten diese über alle 4 Zeitpunkte am stärksten regulierten Gene identifiziert werden (s. Tab.5).

GenSymbol	GenBeschreibung	ET10 vs ET18	ET18 vs Tag2	Tag2 vs Tag28
SLC12A4	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4 [Gallus gallus]	29332.1	1.1	1.7
CD72	CD72 molecule [Gallus gallus]	8659.2	1.9	-1
AICDA	activation-induced cytidine deaminase	5739.3	1.1	1.2
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	5679.8	1.5	-1.2
SLC23A1	Zebrafink: solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1	1668.6	1.5	1.4
SCL23	Mus musculus: solute carrier family 23	1017.7	1.5	1.8
IPI00818073.1	BLAST: Homo sapiens chromosome 18 open reading frame 34 (C18orf34)	734.9	2.8	1.1
CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta	693.3	1.3	-1.1
COL22A1	collagen, type XXII, alpha 1 [Gallus gallus]	-28.1	-29.5	-1.8

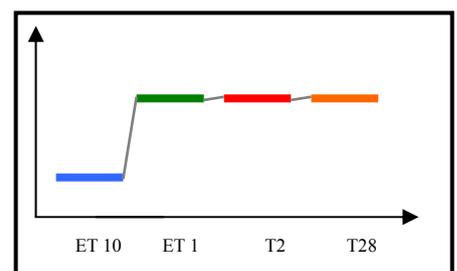
**Tab. 5: Die in SAM-Multiclass am stärksten regulierten Gene.** Die aufgelisteten Gene entsprechen den in Abb.13 markierten Probes mit den entsprechenden FC-Werten, die über alle 4 Zeitpunkte die signifikanteste Regulation zeigten.

Die FC dieser Gene zeigen die stärkste Regulation zwischen ET 10 und ET 18, was die in der Heatmap-Analyse gezeigten dramatischen Änderungen widerspiegelt. Besonders für die Gene *AICDA*, *CD72* und *CD79B* besteht eine eindeutige Korrelation zum B-Zell-Rezeptor-Komplex bzw. für *AICDA* (AID, Activation-Induced (Cytidine) Deaminase), als ein essentielles Enzym der Genkonversion, zur B-Zell-Entwicklung. Dies kann durch die starke Zunahme der B-Zellen in der Bursa erklärt werden. Auffallend waren dagegen die 3 Ionen Transporter *SCL12A4*, *SCL23A1* und *SCL23* die zu den am stärksten regulierten Genen zählen, von denen *SCL12A4* sogar das am höchsten differentiell regulierte Gen ist. Ein Bezug dieser Transporter zu B-Zellen ist bislang nicht bekannt, doch ist die Vermutung dass sie in B-Zellen exprimiert werden durch die enorme Hochregulation in der Phase der B-Zelleinwanderung gegeben. Nur das Gen *COL22A1* zeigt eine negative Regulation und zeigt damit an ET 10 die höchste Expression zu allen anderen Zeitpunkten.

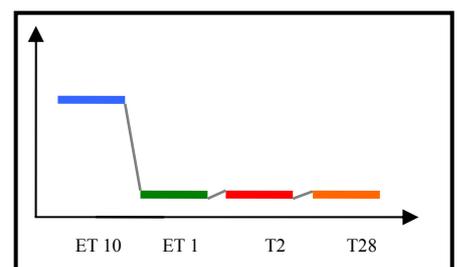
### 5.5.1. Funktionelle Analyse der Multiclass-Analyse

Durch die Multiclass-Analyse wurden die signifikant Gene für alle untersuchten Zeitpunkte berechnet, so dass in dem Genset ein breites Spektrum an Expressionsmustern enthalten ist. Daher wurden die Gene bevor sie einer weiteren Analysen unterzogen wurden mittels MEV in Cluster unterteilt. In einem Cluster sind Gene mit ähnlichen Expressionsmuster zusammengefasst, so dass die in Abb.12 gezeigten 5 Gruppen von Regulationsprofilen entstanden.

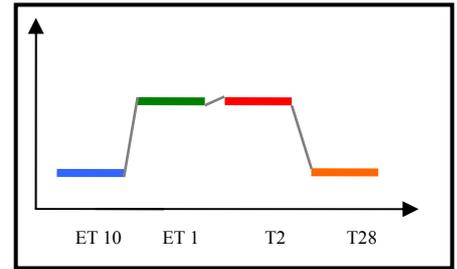
Cluster 1	Spots	Gene	Enthält Gene die zum ET 10 eine niedrige Expression zeigen dann ansteigen und über ET 18, Tag 2 und Tag 28 eine hohe Expression beibehalten
	1.516	1.109	



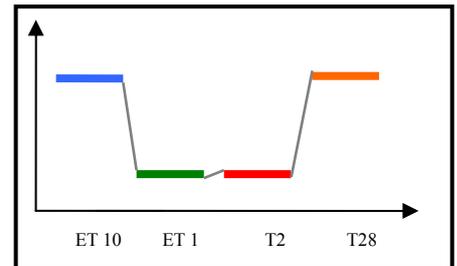
Cluster 2	Spots	Gene	Genen mit einem zum Cluster 1 entgegengesetzten Expressionsmuster, die also zum Zeitpunkt ET 10 höher exprimiert sind als zu allen anderen Zeitpunkten
	2.129	1.467	



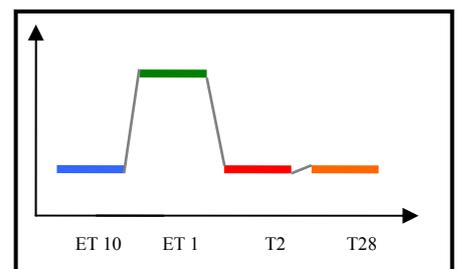
Cluster 3	Spots	Gene	Genen die nur an ET 18 und Tag 2 hoch-exprimiert sind, nicht jedoch an ET 10 und Tag 28
	271	225	



Cluster 4	Spots	Gene	Gene die an ET 18 und Tag 2 ein geringeres Expressionsniveau zeigen als an ET 10 und Tag 28.
	145	118	



Cluster 5	Spots	Gene	Genen die nur an ET 18 im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten eine hohe Expression zeigten
	147	121	



**Abb. 14: MEV-Cluster Expressionsmuster der Multiclass-Analyse.** Die in der Multiclass-Analyse signifikanten Gene wurden mittels MEV (multi experiment viewer) anhand ihrer Expressionsmuster in 5 Gruppen unterteilt. Die Graphiken stellen den Expressionsverlauf der enthaltenen Gene schematisch dar.

Die Analyse zeigt Gensets die über die untersuchten Zeitpunkte ähnliche Expressionsverläufe aufweisen. Dies zeigt dass in den betrachteten Entwicklungszeitraum mehrere Gene eine parallele Regulation erfahren, und somit für die entsprechenden Zeitpunkte spezifische Aktivierung bzw. Deaktivierung zeigen.

Eine Liste mit den jeweiligen Genen der Cluster ist in der Tabelle „Multiclass-Cluster“ in der beiliegenden CD enthalten.

## **5.6. Spezielle Analyse von auffälligen Gengruppen**

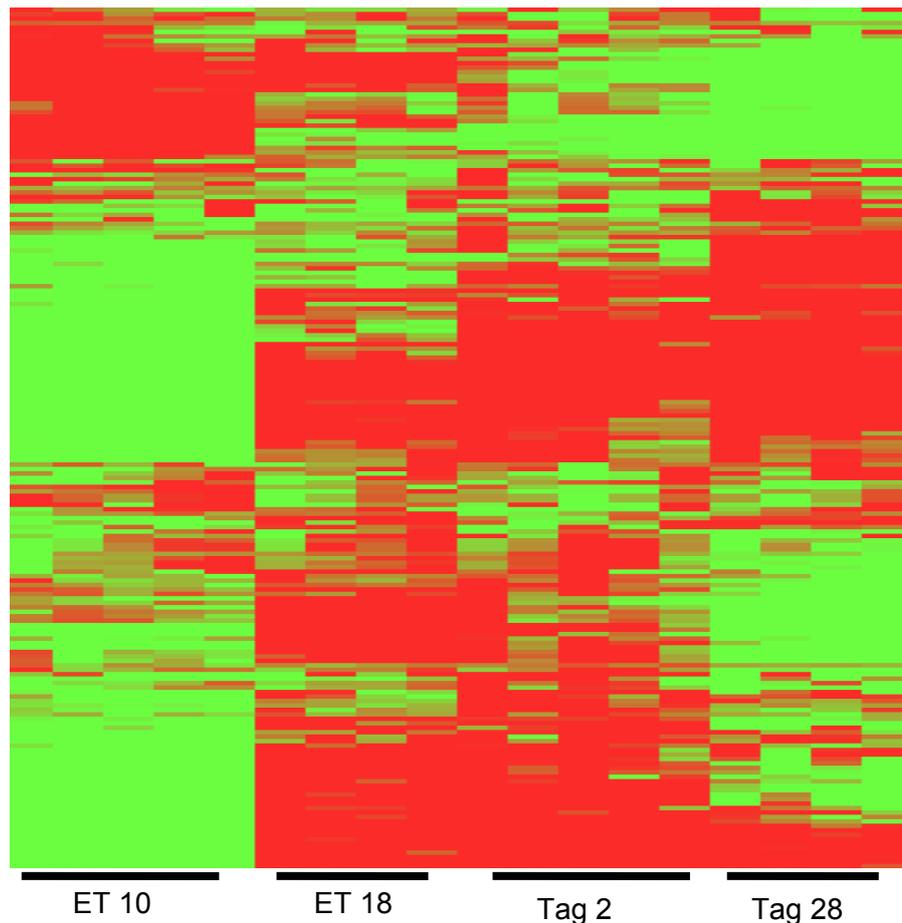
Die vorausgegangenen Analysen zeigten, dass innerhalb der betrachteten Entwicklungszeitpunkte zum Teil erhebliche Expressionsänderungen mit unterschiedlichen Mustern zu finden sind. Dabei offenbarte sich in der GeneOntology als auch in den gefundenen Pathways auffallend häufig signifikante Hinweise auf Chemokin- und Zytokinaktivität. Zudem sind auch in den Pathwayanalysen Signalwege im Zusammenhang mit Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktion oft als signifikant aufgefallen.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden spezielle Analysen für Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle durchgeführt worden.

Eine Aufführung aller Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Chemokine mit differentiellen Expressionsprofilen sind in der Tabelle „Gengruppen-Analyse“ auf der beigelegten CD zu finden.

### **5.6.1. Zytokine**

Für die Gruppe der Zytokine wurden Expressionsprofile mittels MEV-Clusteranalyse angelegt. Zu den untersuchten 91 Genen die auf dem Array vertreten waren zählen die Interleukine, TNF-Superfamilien-Mitglieder sowie Interferone und Wachstumsfaktoren. Davon zeigten 66 Gene zwischen den Zeitpunkten ein differentielles Expressionsmuster (Abb. 15).

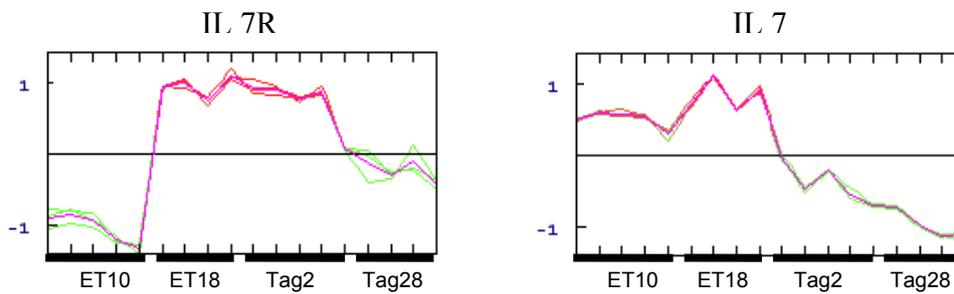


**Abb. 15: MEV-HeatMap der Zytokine.** Für die 91 untersuchten Zytokin-Gene wurde mittels MEV in einer hierarchischen Clusteranalyse eine Heatmap erstellt. Die Expressionsdaten sind als medianisiertes Proccesed-Signal abgebildet. In rot sind Gene dargestellt die im Vergleich zum durchschnittlichen Expressionswert des Gens eine höhere Expression zeigen, in grün werden Gene mit geringerer Expression abgebildet.

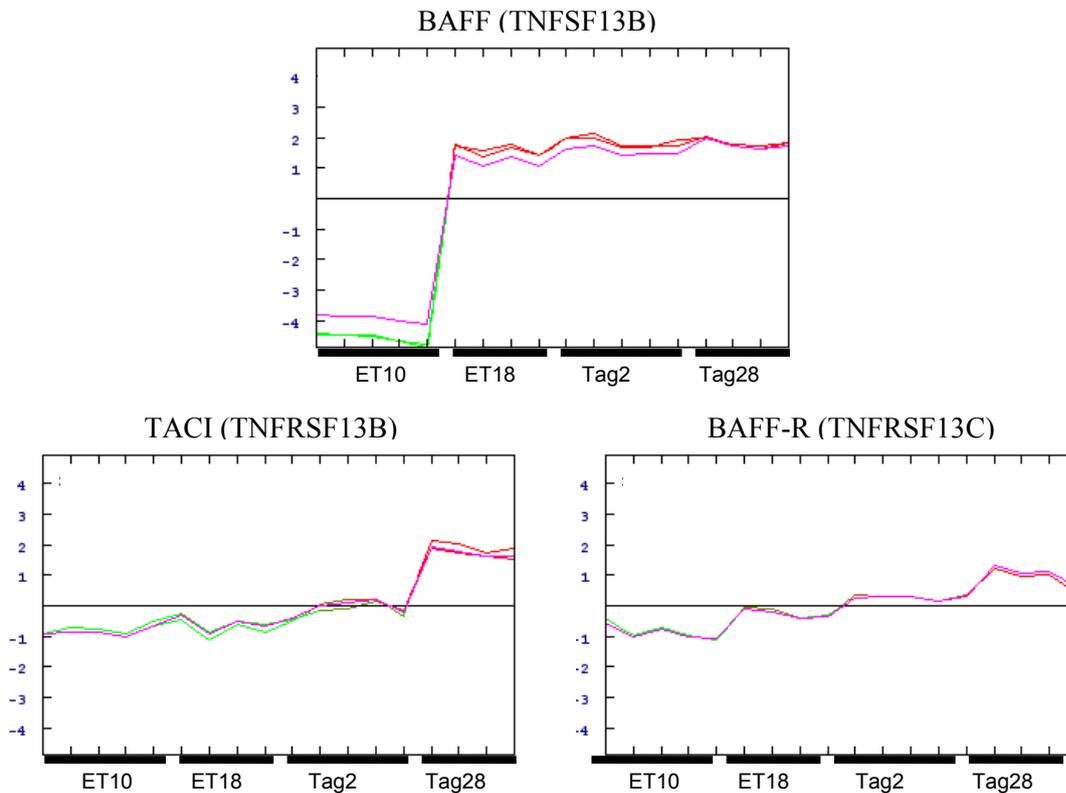
Die HeatMap der Zytokine (Abb.15) zeigt das auch auf Ebene der stark selektierten 91 Gene eine eindeutige Einteilung der Array zu den entsprechenden Zeitpunkten möglich war. Zudem sind innerhalb der HeatMap einzelne Gen-Gruppen mit unterschiedlichen Expressionsmuster zu sehen. Eine der Gruppen unterscheidet sich zu den anderen Genen durch eine hohe Expression an ET 10 und einer Herunterregulation an den anderen Zeitpunkten, in dieses Muster zählt z.B. TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) und TNFRSF11B (Osteoprotegrin). In einer weiteren Gruppe zeigt sich ein Profil das zu ET 18 eine gesteigerte Expression aufweist, die über die weiteren Entwicklungsstadien auf diesem hohen Niveau bleibt. Zu diesen Genen zählt das Zytokin BAFF (s. Abb. 17) und das Interleukin 18. Als weiteres Expressionsmuster zeigen sich Gene mit einer gesteigerten Expression an ET 2 und Tag 2, zu denen der Interleukin-7-Rezeptor zählt (s. Abb. 16)

Durch eine MEV-Cluster-Analyse wurden Gene einzeln nach ihrem Expressionsverlauf in

Gruppen eingeteilt und weiter durch Einbezug der FC zwischen den Entwicklungszeitpunkten aufgearbeitet.



**Abb. 16: Expressionsprofile für IL 7 (Interleukin 7) und IL 7-Rezeptor.** Mittels MEV wurden die Zytokine einzeln dargestellt. Die Werte sind als medianisiertes Processed-Signal gezeigt.



**Abb. 17: Expressionsprofil für BAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family, TNFSF13B) und seine Rezeptoren BAFF-R (TNFRSF13C) und TACI (TNFRSF13B).** Mittels MEV wurden die Zytokine einzeln dargestellt. Die Werte sind als medianisiertes Processed-Signal gezeigt.

Für BAFF (Abb. 17) zeigt sich eine starke Expressionssteigerung zwischen ET 10 und ET 18 um das 482fache, die über die weiteren Zeitpunkte auf einem annähernd gleichen Niveau

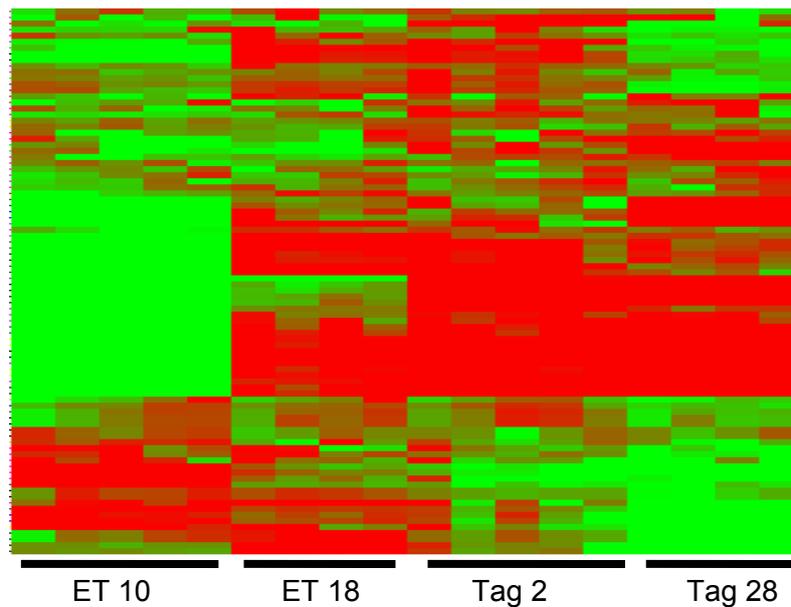
erhalten bleibt. Die BAFF-Rezeptoren TACI und BAFFR zeigen dagegen nur zwischen Tag 2 und TAG 28 eine differentielle Expression, wobei BAFFR nur einen FC von 1,8 zeigt, TACI dagegen um das 6,9fache hochreguliert ist.

Die Abb.13 und Abb.14 zeigen die Expressionsmuster von IL 7 und IL 7-Rezeptor bzw. BAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family, TNFSF13B) und seiner Rezeptoren BAFF-R (TNFRSF13C) und TACI (TNFRSF13B). Das Expressionsprofil von IL 7 zeigt eine deutliche Herunterregulation zwischen ET 18 und Tag 2, was einem FC von -3,4 entspricht. Der IL 7-Rezeptor zeigt dagegen eine erhöhte Expression an den Zeitpunkten ET 18 und Tag 2, was einer 7,2fach gesteigerten Expression zwischen ET 10 und ET18 sowie einer um das 2fache verminderten Expression zwischen Tag 2 und Tag 28 entspricht. Somit scheint die IL7-Wirkung durch die Herunterregulation des Rezeptors vor allem in der embryonalen Phase von Bedeutung zu sein.

Eine Auflistung aller differentiellen Zytokine ist in der Datei „Zytokine“ auf der beiliegenden CD.

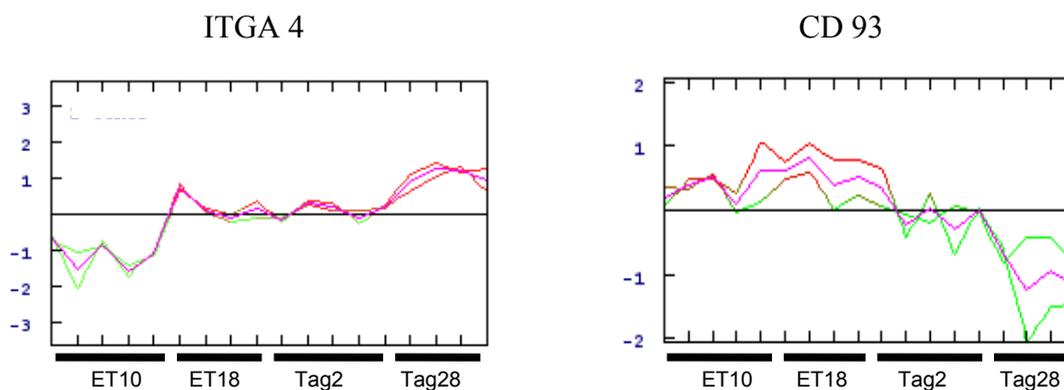
### **5.6.2. Adhäsionsmoleküle**

Die Gruppe der Adhäsionsmoleküle und deren Rezeptoren umfasst ein sehr breites Spektrum an Proteinen die an Zell-Zell-Kontakten und -Interaktionen beteiligt sind. Daher wurden 42 Gene für die detaillierte Analyse selektiert, die bereits im Mausmodell oder für den Menschen im Zusammenhang mit der B-Zell-Reifung beschrieben wurden. Für 30 dieser Gene wurden Expressionsmuster mit einer differentiellen Expression zwischen den Zeitpunkten festgestellt.



**Abb.18: MEV-HeatMap der Adhäsionsmoleküle.** Für die 42 untersuchten Adhäsionsmoleküle wurde mittels MEV in einer hierarchischen Clusteranalyse eine Heatmap erstellt. Die Expressionsdaten sind als medianisiertes Proccesed-Signal abgebildet. In rot sind Gene dargestellt die im Vergleich zum durchschnittlichen Expressionswert des Gens eine höhere Expression zeigen, in grün werden Gene mit geringerer Expression abgebildet.

Auch innerhalb der untersuchten Adhäsionsmoleküle war eine korrekte Zuordnung der Arrays zu den entsprechenden Entwicklungszeitpunkten möglich und zeigt Gene die sich mittels Cluster-Analyse in Gruppen mit unterschiedlichen Expressionsprofilen einteilen ließen.



**Abb. 19: MEV-Expressionsprofile für ITGA 4 (Integrin, alpha 4; CD49d) und CD93 (Cluster of Differentiation 93),** Mittels MEV wurden die Zytokine einzeln dargestellt. Die Werte sind als medianisiertes Proccesed-Signal gezeigt.

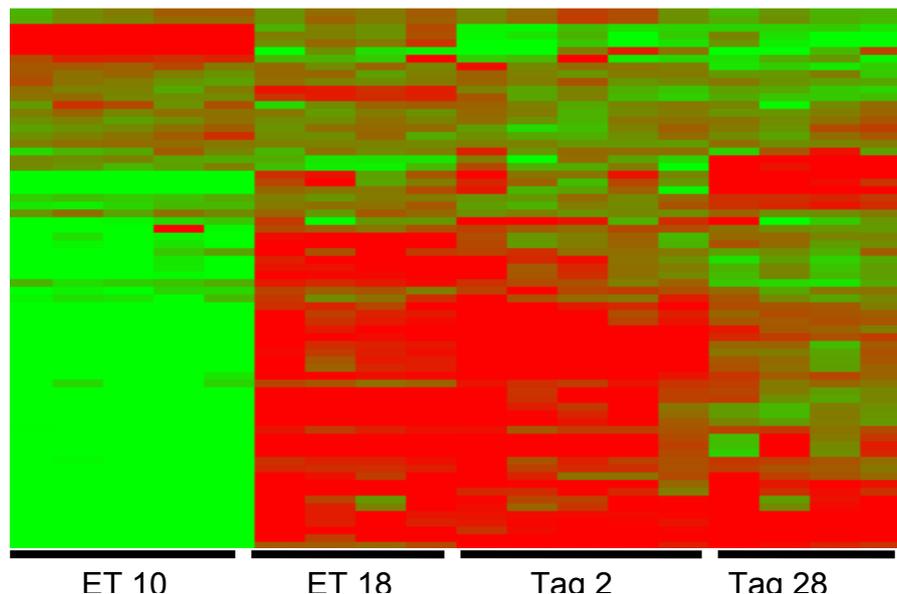
ITGA 4 gehört zur Familie der Integrine, die an der Signaltransduktion ins Zellinnere und Zelladhäsion beteiligt sind. In der frühen Embryonalphase (ET 10) zeigt sich nur eine geringe Expression, die während ET 18 und Tag 2 auf ein moderates Niveau ansteigt (FC = 3,9) und

schließlich nochmals zum Tag 28 nach dem Schlupf um das 2,7fache ansteigt. Das Oberflächenmolekül CD93 zeigt in der embryonalen Entwicklungsphase eine stärkere Expression in der Bursa als zu den späteren Zeitpunkten. Zwischen ET 18 und Tag 2 zeigt sich eine 2,4fache Herunterregulation der Expression, und zu Tag 28 nochmals um das 2,9fache.

Eine Auflistung aller differentiellen Adhäsionsmoleküle ist in der Datei „*Adhäsionsmoleküle*“ auf der beiliegenden CD.

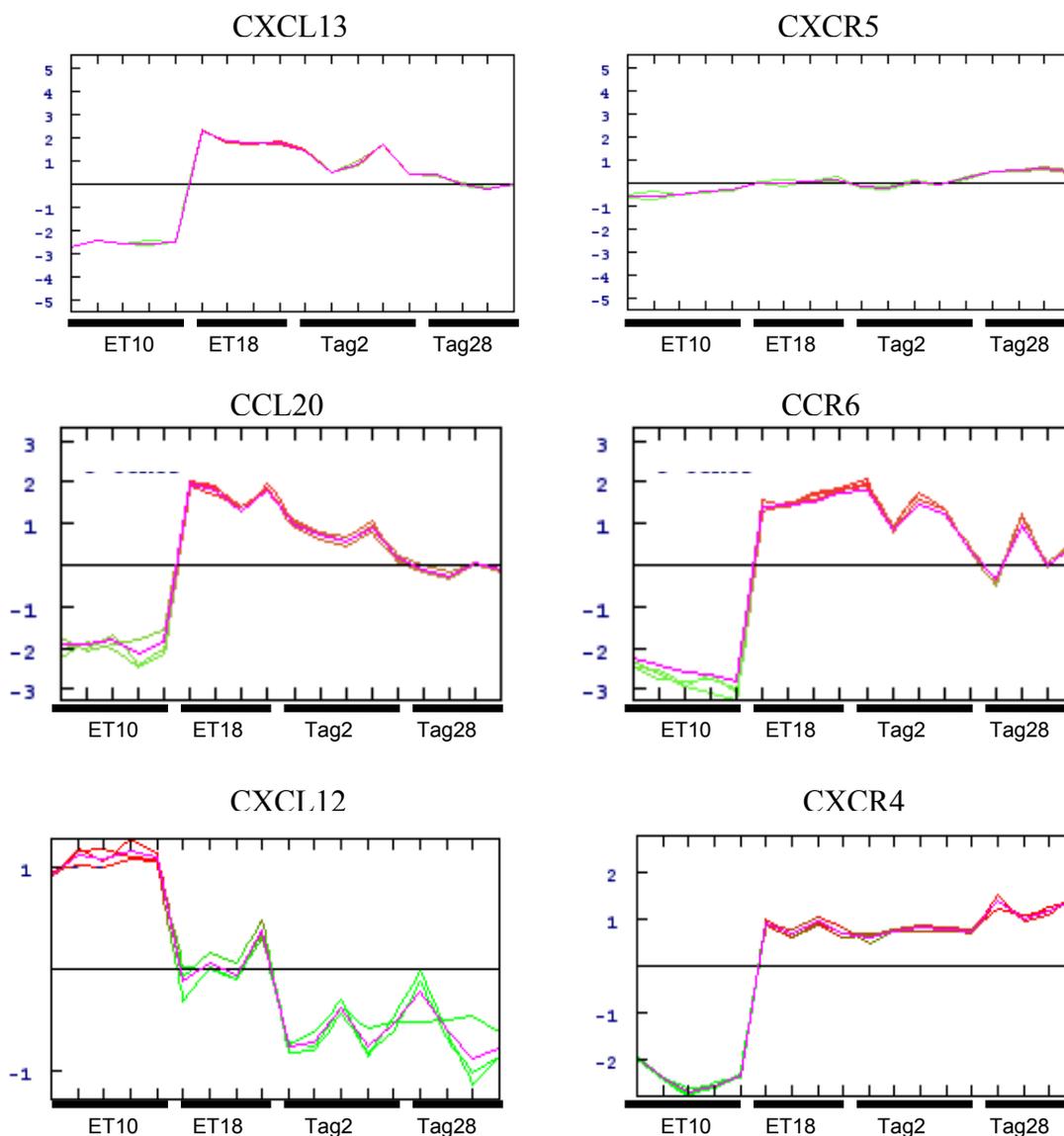
### 5.6.3. Chemokine

Auf den verwendeten Arrays waren insgesamt 13 Chemokine und 12 Chemokin-Rezeptoren annotiert. Diese Gene wurden einer gezielten Clusteranalyse unterzogen um Chemokine bzw. deren Rezeptoren zu erkennen die im Zusammenhang mit der B-Zellentwicklung stehen. Unter Einbeziehung der „fold change“ von mindestens +/-2 wurde ein Grenzwert für eine Mindestregulation angelegt. 22 der 25 Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren zeigten eine differentielle Regulation innerhalb der Zeitpunkte.



**Abb.20: MEV-HeatMap der Chemokine.** Für die 25 untersuchten Chemokine- und Chemokinrezeptor-Gene wurde mittels MEV in einer hierarchischen Clusteranalyse eine Heatmap erstellt. Die Expressionsdaten sind als medianisiertes Prozess-Signal abgebildet. In rot sind Gene dargestellt die im Vergleich zum durchschnittlichen Expressionswert des Gens eine höhere Expression zeigen, in grün werden Gene mit geringerer Expression abgebildet.

Wie auch für die Zytokin- und Adhäsionsmolekül-Analyse war die korrekte Zuordnung der Arrays zu den Entwicklungszeitpunkten, ohne eine vorausgehende Einteilung möglich. Die Heatmap zeigt deutliche Gengruppen die über die untersuchten Entwicklungszeitpunkte unterschiedliche Regulationsmuster zeigen (s. Abb. 21). Diese Profile beinhalten Gene die nur an ET 10 eine hohe Expression zeigen (CXCL12), sowie solche die nur zum Tag 28 hochreguliert sind (CCR8). Andere Gene zeigen eine hohe Expression an ET 18 und Tag 2 (CCL20), sowie Muster mit einer Hochregulation nach ET 10 (CXCR4).



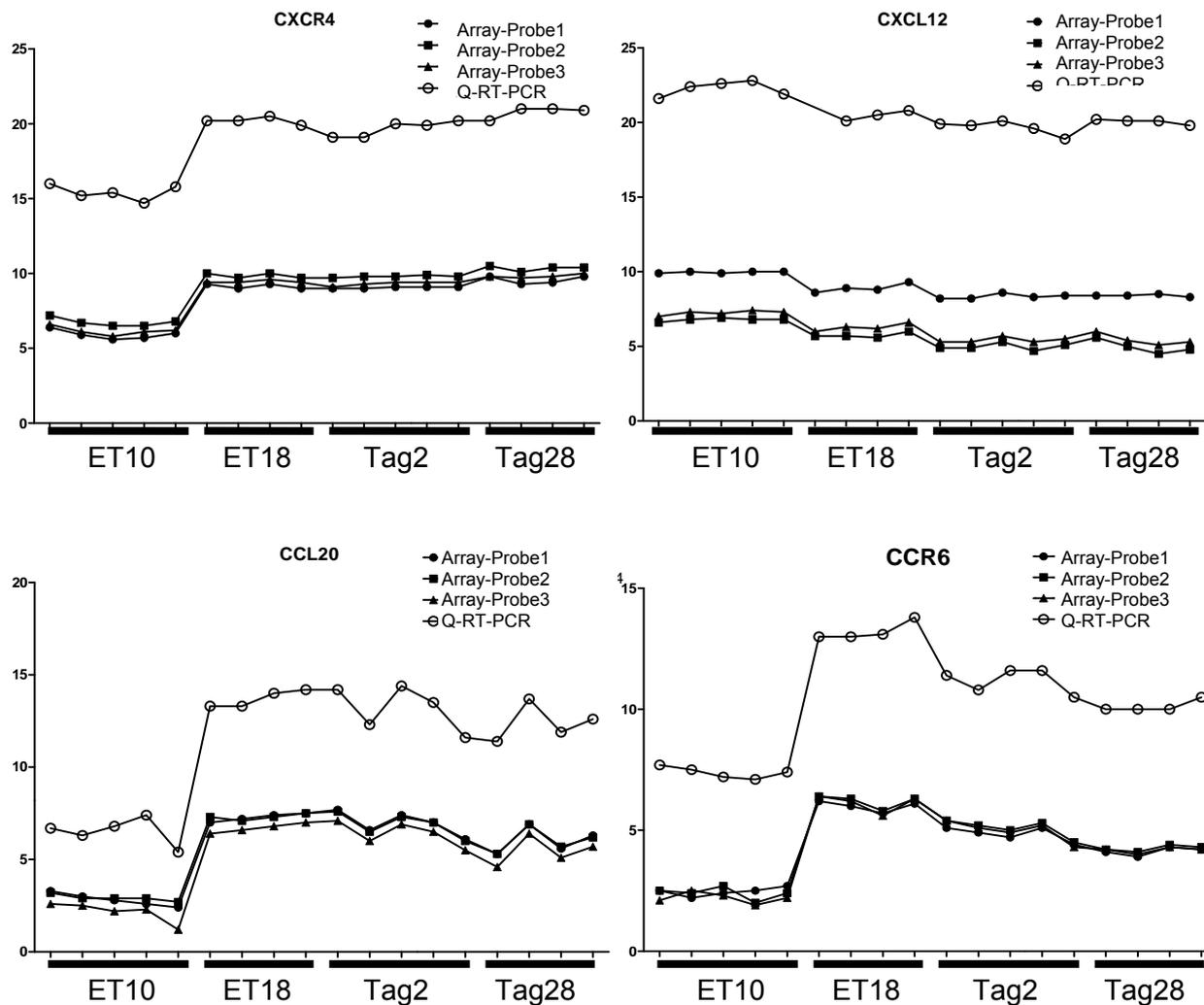
**Abb. 21: MEV-Expressionsprofile für Chemokine und deren Rezeptoren,** Mittels MEV wurden die Zytokine einzeln dargestellt. Die Werte sind als medianisiertes Processed-Signal gezeigt.

Das Chemokin CXCL13 weist beim Huhn 3 unterschiedliche Isoformen auf, diese zeigen zwischen ET 10 und ET 18 eine starke Expressionssteigerung (CXCL13L3 FC=382, CXCL13L1 FC=142, CXCL13L2 FC=84), während der Rezeptor CXCR5 über alle Zeitpunkte keine signifikanten Änderungen aufweist. Das Chemokin/Chemokin-Rezeptor-Paar CCL20/CCR6 zeigt einen parallelen Expressionsverlauf, der zuerst einen starken Anstieg (FC von CCL20 = 86, CCR6 = 45) zwischen ET 10 und ET 18 zeigt und zu Tag 2 und Tag 28 wieder absteigt. CXCL12 weist dagegen zu seinem Rezeptor CXCR4 ein entgegengesetztes Regulationsmuster. Die Expression von CXCL12 nimmt von ET 10 aus über die anderen Zeitpunkte ab, während CXCR4 eine 24fache Hochregulation zwischen ET 10 und ET 18 zeigt und für Tag 2 und Tag 28 auf diesem hohem Niveau bleibt.

Eine Auflistung aller differentiellen Chemokine ist in der Datei „*Chemokine*“ auf der beiliegenden CD.

## **5.7. Verifizierung der Arraydaten mittels qRT-PCR**

Für ausgewählte Gene wurde eine Verifizierung der in den Arrays erstellten Expressionswerte mittels qRT-PCR vorgenommen. Die Abb.22 zeigt, dass die Werte aus der qRT-PCR und die Array-Expressionsdaten sehr gut miteinander korrelieren. Abgebildet sind die 40-CT qRT-PCR Werte mit verschiedenen Array-Probes desselben Gens.



**Abb. 22: Vergleich der Microarray und qRT-PCR Expressionswerte, Microarray-Daten der auf dem Array vertretenen Probes als normalisierte, logarithmierte Werte, qRT-PCR Daten als 40-CT dargestellt. Array- und qRT-PCR-Daten zeigen einen nahezu identischen Kurvenverlauf.**

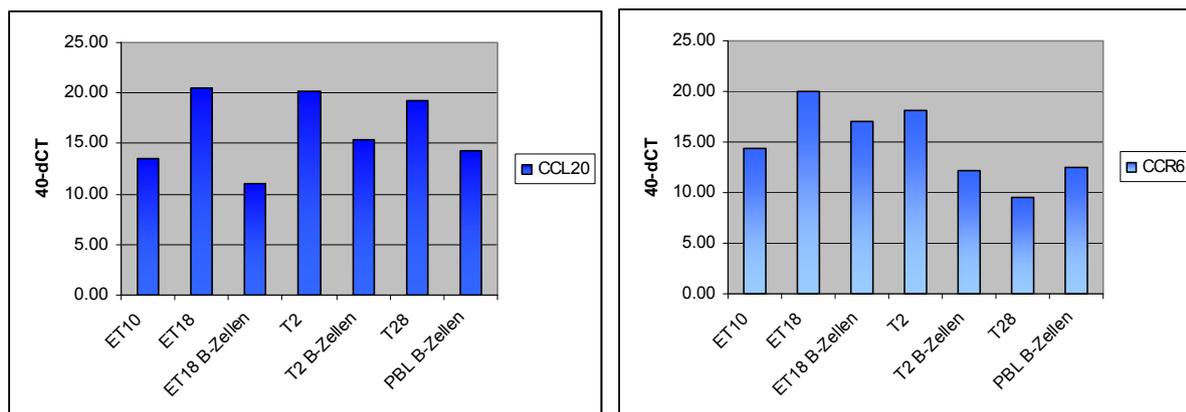
Diese Kurvenverläufe zeigen dass die für den Array erstellten Expressionsprofile nachvollziehbar sind, und damit verlässliche Aussagen über den zeitlichen Expressionsverlauf erlauben.

### 5.8. Vergleichende Analyse zwischen Gesamtbursa und isolierten B-Zellen mittels qRT-PCR

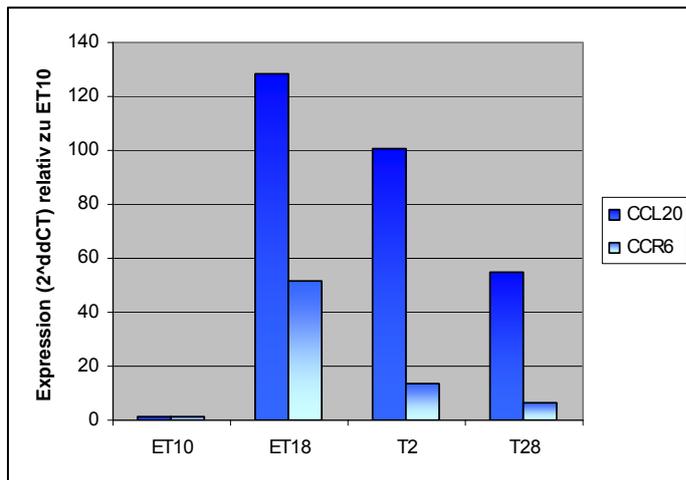
Die Gewebezusammensetzung der Bursa verändert sich während des untersuchten Zeitraums durch die Zunahme der B-Zellzahl stark. Diese Veränderungen sind besonders am Vergleich

von ET 10 und ET 18 zu sehen. Während die Bursa in der frühen Embryonalphase nur eine sehr geringe Anzahl an B-Zellen enthält, ändert sich dies bis zum Tag 28 nach dem Schlupf auf drastische Weise so das die Bursa zu fast 90-95 % aus Lymphozyten besteht. Um die mRNA-Abundanz in den B-Zellen selbst bestimmen zu können, wurden aus ET 18- und Tag 2-Bursen B-Zellen sortiert. Als weitere Vergleichsprobe wurden kurz nach dem Schlupf B-Zellen aus dem Blut isoliert. Diese entsprechen zu 90 % B-Zellen, die die Bursa gerade verlassen haben.

Wie B-Zellen nach dem Schlupf die Bursa verlassen können um die peripheren Organe zu besiedeln ist eine Frage dieser Arbeit. Eine Änderung in der Expression von Oberflächenmolekülen ist dabei wahrscheinlich ein wichtiger Faktor damit die B-Zellen die Bursa verlassen zu können. Um dies zu beantworten wurde ein Vergleich von peripheren B-Zellen zu dem bursalen Tag 2-B-Zellen angelegt.

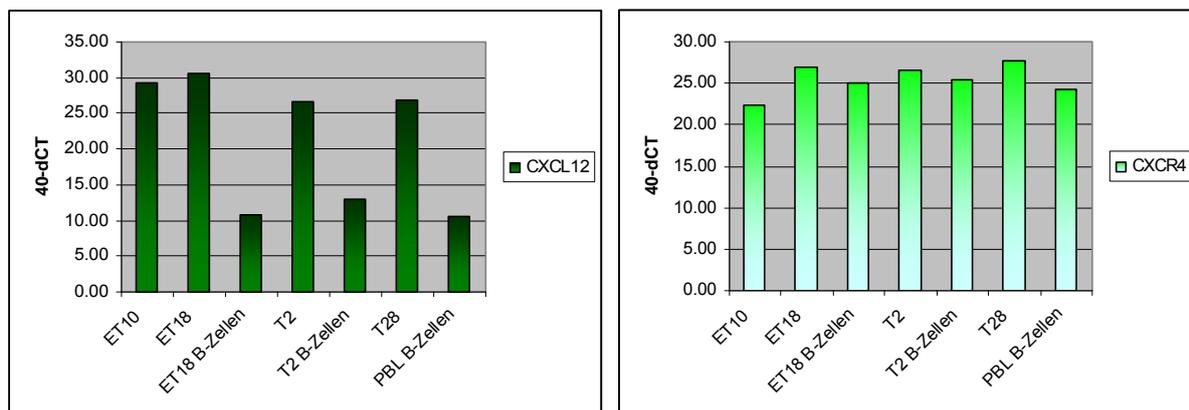


**Abb. 23: q-RT-PCR für CCL20 und CCR6 auf Gesamtbursa und isolierten B-Zellen.** Die Werte sind als  $40-\Delta\text{CT}$  dargestellt.



**Abb. 24: q-RT-PCR für CCL20 und CCR6.** Dargestellt ist die Expression an ET 18, Tag 2 und Tag 28 relativ zu ET 10.

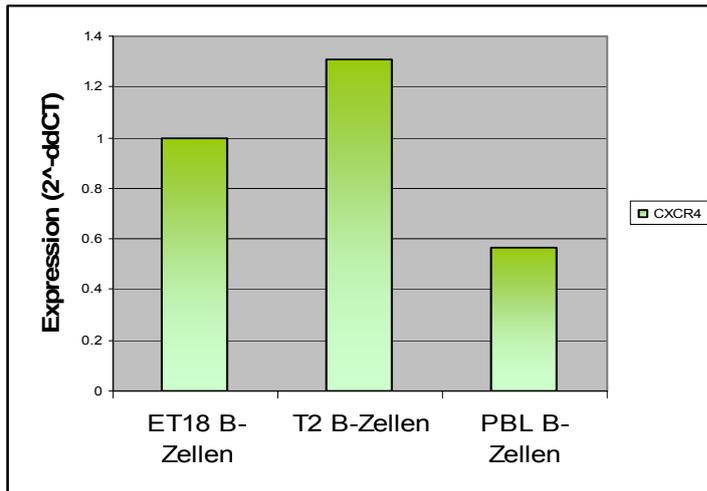
Die in Abb. 23 dargestellten q-RT-PCR-Daten der Gesamtbursaproben zeigen ein identisches Bild zu den in Abb. 21 gezeigten Array-Daten. So zeigt sich für CCL20 und CCR6 eine gesteigerte Expression zwischen ET 10 und ET 18, die über die weiteren Zeitpunkte wieder absinkt, wobei die verminderte Expression des Rezeptors CCR6 deutlicher zu sehen ist (s. Abb. 24). Für die isolierten B-Zellen zeigt sich dagegen eine zwar insgesamt niedrigere Expression, die jedoch entgegen den Bursaproben von ET 18- zu Tag 2-B-Zellen ansteigt (s. Abb. 23).



**Abb. 25: q-RT-PCR für CXCL12 und CXCR4 auf Gesamtbursa und isolierten B-Zellen.** Die Werte sind als 40- $\Delta$ CT dargestellt.

Die Abb. 25 zeigt, dass die Expression für CXCR4 sich zwischen ET 10 und ET 18 um 5 CT-Werte ansteigt während sich im Vergleich von Gesamtbursa-Proben und den isolierten B-Zellen nur geringe Unterschiede zeigen. Die stärksten Expressionsunterschiede zwischen

Gesamtorgan und sortierten Zellen sind für CXCL12 zu erkennen, dass in isolierten Zellen eine deutlich geringere Expression zeigte als in den Organen (s. Abb. 23). Der relative Expressionsunterschied zwischen ET 18-Gesamtorgan und ET 18-B-Zellen entspricht einer um das ca. 380.000fach verminderten Expression.



**Abb. 26: Expression von CXCR4 der Tag 2- und Blut-B-Zellen relativ zu den ET 18-B-Zellen.**

Die Expression von CXCR4 erscheint in den peripheren Blut-B-Zellen um die Hälfte vermindert.

Direkte Vergleiche zwischen Tag 2 bursalen B-Zellen und Blut-B-Zellen zeigten sich in Abb. 24 durch eine verminderte Expression von CXCR4 und CCL20. Die relativen Expressionsunterschiede für CXCR4 in Abb. 26 verdeutlichen den Unterschied zwischen ET 18- und den Blut-B-Zellen der einer Reduktion um fast die Hälfte entspricht.

## 6. DISKUSSION

Die Erkenntnisse über die Entwicklung des B-Zellsystems stammen zum größten Teil aus dem Mensch- oder Mausmodell. Dabei konnten einige der wichtigsten Grundlagen des Immunsystems im Huhn entdeckt werden, wie z.B. die Dichotomie des Immunsystems und die Ontogenese lymphatischer Organe [33, 118]. Da zwischen Säuger und Hühner erhebliche Unterschiede in der B-Zellentwicklung bestehen, die bei Mensch und Maus im Knochenmark statt findet in Vögeln dagegen in der Bursa Fabricii, einem „gut associated lymphoid tissue“ (GALT) [119]. Erkenntnisse aus der Maus-Forschung lassen sich deshalb nur eingeschränkt auf das Huhn übertragen. Lange Zeit wurde angenommen, dass die B-Zellreifung für alle Säuger identisch im Knochenmark lokalisiert ist, während heute bekannt ist das einige der bedeutendsten Haussäugetiere, wie Kaninchen [66], Rind [120] und Schwein [121] ebenfalls GALT-Organen als Ort der B-Zellentwicklung heranziehen. Damit ist das Huhn das am besten charakterisierte B-Zellentwicklungs-Modell für die sogenannten GALT-Species. Die bislang bekannten Erkenntnisse über die B-Zellentwicklung stammen zum großen Teil aus der im bursalen Stadium arretierten Hühner-B-Zelllinie DT40 [122] und Chimären aus Hühnern und Wachteln [34, 123]. Wobei vor allem die molekularen Mechanismen der B-Zellreifung zur Generierung der primären Diversität der Antikörperspezifität erforscht wurden. Über die Signale, die diese Prozesse induzieren und in eine bestimmte Richtung leiten, ist jedoch bislang wenig bekannt. Mit der Veröffentlichung des Hühnergenoms [124] und der Identifizierung zahlreicher zum Säuger homologer Sequenzen, hat sich die Möglichkeit eröffnet molekulargenetische Techniken zur funktionellen Analyse von Prozessen anzulegen. Im Besonderen wurden Chemokine und Zytokine klassifiziert die aus dem Mausmodell bekannte Funktionen im Rahmen der B-Zellreifung zeigen. Für die Zytokine BAFF und CD40-Ligand konnte bereits *in vitro* und *in vivo* Daten über deren Funktion in der Reifung von B-Zellen gezeigt werden [69, 125-127].

Durch Genexpressionsanalysen kann die Umsetzung von Geninformationen mittels molekularbiologischen Methoden von tausenden Genen gleichzeitig gemessen werden. Mittels Mikroarrays erstellt Expressionsprofile liefern neue Informationen, wie sich Gene unter verschiedenen Bedingungen verhalten. In Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren (Zellzusammensetzung, Tageszeit, Zellzyklus, ...), kann beurteilt werden ob ein Gen „ein- oder ausgeschaltet“ ist. Basierend auf diesen Erkenntnissen können neue biologische Hypothesen aufgestellt werden. Daher wurde für die Identifizierung neuer Kandidatengene die regulatorische Funktionen in der frühen B-Zellentwicklung in der Bursa des Huhns

zeigen, in der vorliegenden Arbeit mittels Mikroarrays eine transkriptomische Analyse verschiedener Entwicklungsphasen der Bursa Fabricii des Huhns erstellt.

## **6.1. Agilent Mikroarray Technologie**

Für die Analyse des Bursa-Transkriptoms wurde die Mikroarraytechnologie von Agilent gewählt. Agilent Mikroarrays ermöglichen die Untersuchung von tausenden Transkripten bei einer hohen Empfindlichkeit und Flexibilität. Als Format wurden die 4x44k Variante gewählt die die gleichzeitige Hybridisierung von 4 Arrays mit je 44.000 Probes ermöglicht. Eine Besonderheit der Agilenttechnologie ermöglichte es zudem, das bestehende Katalogarray, das einen Querschnitt aller bekannter DNA-Sequenzen des Hühnergenoms enthält, mit weiteren 1.699 Probes zu erweitern die eine individuelle Anpassung des Arrays an die Fragestellung ermöglichte. Um die funktionellen Untersuchungen der Arrayexpressionsdaten zu gewährleisten wurden den Probes die entsprechenden Gene zugeordnet. Die Annotation des Katalog- und Custom-Arrays ergab dabei eine aktuelle Gesamtzahl von 24.515 Probes die ihrem entsprechenden Gen zugeordnet wurden, was abzüglich der duplizierten Spots, 13.353 Genen entspricht. Schätzungen über den Umfang des Hühnergenoms gehen von einer dem Menschen ähnlichen Anzahl von ca. 20.000 bis 22.000 Genen aus, denen jedoch zu einem erheblichen Teil noch keine funktionelle Annotation zugeordnet werden konnte.

Somit bildet der erstellte Array eine gute Übersicht des bekannten Hühnergenoms, die die Erstellung von genomweiten Expressionsprofilen ermöglicht.

## **6.2. Bestimmung der Probezeitpunkte**

Um geeignete Kandidatengene zu bestimmen ist Probengewinnung unter standardisierten Bedingungen, sowie eine exakte Charakterisierung der Zeitpunkte essentiell. Die Auswahl der Probezeitpunkte stellte somit die Anforderungen, dass die Probenentnahme definierte Gewebe zu charakteristischen Entwicklungsstadien ergeben die klare Unterschiede zueinander aufweisen. Die gewählten Entwicklungszeitpunkte Embryonaltag 10, Embryonaltag 18 sowie Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf stellen sich in der gesamten Analyse innerhalb der Probengruppen homogen dar, und zeigen dabei klare Grenzen zueinander. Dies zeigte sich sowohl in der mittels „R“ erstellten Heatmap in Abb.8, als auch die für die Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Chemokine erstellten HeatMaps (Abb.15, 18, 20). Nur durch diese

stabile Gruppierung der Arrays konnten gruppenbasierende Analysen zum erstellen von Expressionsprofilen durchgeführt werden. Zudem zeigt die stabile Gruppierung der Proben zu ihrem entsprechenden Entwicklungszeitpunkt, dass die Probenentnahme und die Durchführung der Experimente den Anforderungen entsprechen. Die Abgrenzung der Zeitpunkte zueinander belegt, dass die Zeitpunkte richtig gewählt wurden und deutliche Expressionsunterschiede zwischen den Zeitpunkten bestehen.

### 6.3. Validität der eingesetzten Methode

Während die Bursa in der frühen Embryonalphase nur eine sehr geringe Anzahl an B-Zellen enthält, ändert sich dies bis zum Tag 28 nach dem Schlupf auf drastische Weise, so dass die Bursa zu fast 90-95 % aus Lymphozyten besteht [22].

Wie zu erwarten sind auf transkriptomischer Ebene daher die stärksten Unterschiede zwischen ET 10 und ET 18 zu sehen, was die Tatsache widerspiegelt das die Gewebszusammensetzung sich durch die Einwanderung der B-Zellen drastisch ändert. Dies zeigt sich bereits in der mittels „R“ erstellten HeatMap, in der erhebliche Unterschiede von ET10 zu allen anderen Zeitpunkten bestehen. Zudem ist sowohl die Anzahl der differentiell regulierten Gene als auch die Zahl der daraus resultierenden signifikanten Pathways zwischen ET 10 und ET 18 deutlich höher als an allen anderen Zeitpunktvergleichen. Dabei sind die am stärksten regulierten Gene wie *CD72*, *CD79B* und *AID* Bestandteile des B-Zell-Rezeptors oder stehen im Zusammenhang mit der Diversifizierung des Rezeptors. Dem entgegen sind die Unterschiede an ET 18 zu Tag 2 deutlich geringer und beweisen damit wiederum anhand der differentiellen Genanzahl, dass zwischen diesen Zeitpunkten keine wesentlichen Umgestaltungen der Bursamorphologie statt findet. Tag 2 zu Tag 28 weist größere Differenzen auf, was durch die erheblicheren Umgestaltungen der Bursa, mit in Rinde und Mark differenzierten Follikeln bezogen werden kann. Aber nicht nur die Anzahl der differentiellen Gene entsprechen den erwarteten Werten sondern auch die gefundenen Pathways und funktionellen GeneOntologys weisen Fakten auf die, im Rahmen der Entwicklung der Bursa zu erwarten waren. So zeigt die Pathwayanalyse den „*B cell receptor signaling pathway*“ als signifikantesten Signalweg zwischen ET 10 und ET 18, was auf die Einwanderung und Vermehrung der B-Zellen zwischen diesen Zeitpunkten bezogen werden kann. Auch die GO zeigt als signifikanteste Genklassen die „*Immunantwort*“ und „*Zelltod*“, die beide eine Vielzahl an Genen enthalten die in Zusammenhang mit B-Zellen (BAFF, CD40) stehen bzw. die Gene die im Rahmen der positiven Kontrolle der Genkonversion die

Apoptose oder Überleben der B-Zellen steuern (FAS, CASP3).

Das TNF-Superfamilienmitglied BAFF stellte sich durch eine besonders stark erhöhte Expression zwischen ET 10 und ET 18 dar. Diese starke Expressionssteigerung kann im Zusammenhang mit der Einwanderung der B-Zellen zwischen diesen Zeitpunkten gesehen werden, da aviäre B-Zellen in der Lage sind BAFF selbst zu synthetisieren [128] und den für BAFF im Northern-Blot gezeigten Daten exakt entspricht [69].

Somit beweisen die Auswertungen, dass die ausgewählten Zeitpunkte unterschiedliche Entwicklungsstadien der Bursa widerspiegeln und die standardisierte Probengewinnung eine zuverlässige Genexpressionsanalyse ermöglicht. Die Unterschiede zwischen den Entwicklungszeitpunkten zeigen dabei zu erwartende Verhältnisse und weisen signifikant differentielle Gene auf, die in Zusammenhang mit den bekannten Ereignissen in der Bursa assoziiert sind.

#### **6.4. Statistische Auswertungsmethoden**

Um die Auswertung auf einer statistischen Grundlage auszuführen, wurden die Daten mittels SAM einer Signifikanzanalyse unterzogen. Die durchgeführten „two class unpaired“ und „Multiclass“ Analysen stellen somit die Grundlage für 2 mögliche Betrachtungsweisen der Mikroarrayauswertung. In der „two class unpaired“ Signifikanzbestimmung werden 2 Gruppen einander gegenübergestellt, so dass die direkten Expressionsunterschiede als „Fold Change“ (FC) dargestellt werden können. Dies ermöglicht die Evaluierung der Gene, die zwischen den verglichenen Entwicklungszeitpunkten eine differentielle Expression zeigen. Aus diesen Gegenüberstellungen konnten funktionell genomische Untersuchungen, wie Signalweganalysen und die Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen, durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Auswertungen zeigen dabei nicht nur für die einzelnen Vergleiche charakteristisch regulierte Signalwege sondern auch solche, die in jedem der drei angesetzten Gegenüberstellungen signifikant differentiell reguliert waren.

Dem entgegen gibt die „Multiclass“-Signifikanzanalyse die statistische Grundlage für die Betrachtung des Genexpressionsverlaufs über alle vier Zeitpunkte. Die signifikanten Gene wurden in Clusteranalysen gefiltert und in Expressionsprofile eingeteilt, so dass Gene mit ähnlichem Verhalten in Gruppen eingeteilt wurden. Anhand dieser Profile können Gene die an bestimmten Zeitpunkten aktiv sind, in Zusammenhang mit der B-Zell-Differenzierung gesehen werden. Die Größe der erstellten Cluster (Cluster 1 und 2) stellt die bereits in den

Einzelvergleichen gewonnenen Erkenntnisse wieder. Gene in den beiden größten Clustern zeigten eine Regulation zwischen ET 10 und ET 18, wobei die Anzahl der herunterregulierten Gene im Cluster 2 deutlich höher liegt, als die hochregulierten in Cluster 1.

Diese Analysen erlauben, in unserem experimentellen Design mit 4 Zeitpunkten, die Entwicklung der Bursa transkriptomisch darzustellen. Die „two class unpaired“-Auswertung gibt die Grundlage für die Gegenüberstellung von 2 Zeitpunkten, während durch die „Multiclass“-Signifikanzanalyse die Betrachtung über den gesamten Zeitraum erlaubt.

## 6.5. Differenzierung der Bursa zu einem hochspezialisierten Organ

Nicht nur in den Einzelvergleichen sondern auch der Multiclass-Analyse zeigt sich, dass die Mehrzahl an Genen während der Organentwicklung herunter reguliert werden, wohingegen die am stärksten regulierten Gene jedoch zu den hochregulierten zählen. Diese Feststellung kann auf die zunehmende Spezialisierung des Gewebes bezogen werden, so dass z.B. B-Zell spezifische Gene wie CD79B oder AID durch die höhere B-Zell Abundanz und Aktivität eine sehr stark erhöhte Expression im Verlauf der Entwicklung zeigen. Die hohe Anzahl der herunter regulierten Gene lässt sich ebenfalls durch die zunehmende Spezialisierung des Gewebes und die Deaktivierung von unspezifischen Genen erklären. Dieses Phänomen konnte auch in transkriptomischen Studien zur Differenzierung von humanen und murinen embryonalen Stammzellen festgestellt werden [129-130]. Zu diesen als „pluripotent specific genes“ bezeichneten Genen zählen molekulare Marker der Pluripotenz, wie Okt4 (*Octamer binding transcription factor 4*), SOX-2 (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) und FZD9 (*frizzled homolog 9*) [131-132]. Für diese Gene konnte auch in der Bursa eine signifikant verminderte Expression während des betrachteten Zeitraums gefunden werden. Weitere Gene die im Verlauf der zunehmenden Differenzierung herunter reguliert werden, stellen eine Anpassung an die im Vergleich zu den pluripotenten Stammzellen eingeschränkte Entwicklungsmöglichkeit dar. Zu diesen Genen zählen unter anderem Marker für andere Differenzierungsverläufe oder eine generelle Deaktivierung von nicht benötigten Genen [133]. Gene des Cluster 2 der Multiclass-Analyse (s. 5.5.1) zeigen eine Herunterregulation von ET 10 gegenüber den restlichen Zeitpunkten. Auffallend sind dabei ganze Gengruppen die in diesem Cluster vertreten sind wie die „bone morphogenetic protein“-Familie (BMPs) die als Wachstumsfaktoren die Knochenbildung bei Vertebraten anregen [134]. Andere Gene

zeigen eine Spezifität für andere Gewebe, wie z.B. CACNA1C (*calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit*) oder MYH6 (*myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha*) die eine charakteristische Expression im Herz zeigen [135-136]. Diese Expressionsänderungen spiegeln somit die Differenzierung der Bursa zu einem lymphoiden Organ wieder.

## 6.6. Identifizierung von Kandidatengen

Ziel dieser Arbeit war es Kandidatengene zu identifizieren, die in weiteren funktionellen Untersuchungen auf ihren Einfluss in der B-Zellreifung charakterisiert werden können. Synergistisch aus der Pathwayanalyse, GenOntology und den Expressionsverläufen wurden Gengruppen ausgewählt die im Bezug auf differentielle Regulation während der untersuchten Zeitpunkte auffällig erschienen. Zu diesen auffälligen Genen zählen die Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Chemokine, für die gesonderte Expressionsanalysen in Form einer Heatmap angelegt wurden.

### 6.6.1. Zytokine in der Bursaentwicklung

Die Klasse der Zytokine setzt sich aus sehr heterogenen Genen zusammen. Zytokine nehmen eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen, bei der Immunantwort auf Infektionen und der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase ein [137-138]. Das Spektrum der Zytokine umfasst neben den hier gesondert dargestellten Chemokinen die Interleukine, die Mitglieder der TNF-Superfamilie sowie verschiedene Wachstumsfaktoren. Die Darstellung der Zytokine in einer Heatmap (Abb.15) zeigt Untergruppen mit unterschiedlichen Expressionsmuster.

BAFF wurde für Säuger-B-Zellen als essentieller Überlebensfaktor in den peripheren lymphatischen Organen beschrieben [139-140], während für Hühner-B-Lymphozyten auch eine bedeutende Rolle für das Überleben während der bursalen Entwicklung nachgewiesen wurde [128]. Dieser massiven Expressionssteigerung von BAFF von ET 10 zu ET 18 entgegen steht die Regulation der für das Huhn beschriebenen Rezeptoren für BAFF, BAFF-R und TACI. Die moderate Hochregulation des BAFF-R über alle Zeitpunkte kann ebenfalls auf die gesteigerte Abundanz der B-Zellen bezogen werden, die jedoch gerade im Vergleich

zu der enormen BAFF Expressionssteigerung sehr gering erscheint. TACI erfährt dagegen erst in der reifen Bursa Fabricii (Tag 28) eine gesteigerte Expression, was den bereits bekannten qRT-PCR Expressionsdaten für TACI entspricht, in denen ebenfalls ein Anstieg der Expression zwischen Tag 3 und Tag 14 nach dem Schlupf gezeigt wurde [141]. Bisherigen Ergebnisse über die Wirkung von BAFF als B-Zell-Überlebensfaktor sprechen dafür, dass diese durch den BAFF-R vermittelt ist. Die Funktion von TACI, als weiteren Rezeptor für BAFF neben BAFF-R wird dagegen kontrovers diskutiert [142]. So konnte bei der Maus nach Aktivierung von TACI durch agonistische Antikörper eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von B-Zell gezeigt werden [143]. Die Hochregulation von TACI in der reifen Bursa kann somit mit der Differenzierung der Bursa in ein sekundär lymphatisches Organ gesehen werden, welche Funktion TACI in diesem Zusammenhang zukommt ist bislang jedoch noch unklar.

Ein weiteres Gen-Rezeptor-Paar mit einem auffälligen Muster war IL7 und IL7-Rezeptor. IL7 zeigte in der embryonalen Phase eine signifikant höhere Expression als in den späteren Phasen nach dem Schlupf, während der IL7-Rezeptor erst zum ET 18 eine höhere Abundanz zeigte und schließlich zwischen Tag 2 und Tag 28 wieder herunter reguliert wird. Anhand dieser Muster kann vermutet werden, dass der Rezeptor für IL7 auf den B-Zellen sitzt, da die Abundanz mit der Zunahme der B-Zellen in der Bursa ansteigt, während das Zytokin IL7 von bursalen Stromazellen während der embryonalen Phase produziert wird. Die Bedeutung von IL7 für die frühe B-Zell Entwicklung wurde bereits 1988 als ein Wachstumsfaktor für murine pre-B-Zellen im Knochenmark beschrieben [144]. Neuere Studien konnten auch den Einfluss von IL7 auf die Differenzierung lymphoider Vorläuferzellen auf die B- und T-Zelllinie bei Kaninchen belegen [145-146]. Durch gezielte Mutation des zytoplasmatischen Anteil des IL7-Rezeptors konnte bei Mäusen zudem gezeigt werden das IL7 einen Einfluss auf die weitere Differenzierung von B-Zellen hat [147]. Um die funktionelle Bedeutung des IL7 und IL7-Rezeptors für die Entwicklung der B-Zellen in der Bursa weiter zu untersuchen können verschiedene Wege beschritten werden. Eine Charakterisierung der Oberflächenexpression des Rezeptors mittels des bereits beschriebenen Antikörpers (8F10E11) [148] kann genauere Erkenntnisse über die Expression zu den unterschiedlichen Stadien zeigen und somit eine weitere Möglichkeit darstellen, die B-Zell-Populationen in der Bursa anzusprechen. Durch Klonierung und Expression des IL7 können *in vivo* Untersuchungen die Wirkung des IL7 auf B-Zellen näher aufzeigen.

## 6.6.2. Adhäsionsmoleküle in der Bursaentwicklung

Für die Migration und die Zell-Zell-Kommunikation spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Verschiedene Gene die im Zusammenhang mit B-Zell-Migration beschrieben wurden, zeigten zwischen den Entwicklungszeitpunkten eine signifikant differentielle Regulation die mittels einer Heatmap-Darstellung in Expressionsprofile einteilen ließen.

Aus der Gruppe der Selektinliganden wurde das Tetrasaccharid „Sialyl-Lewis-X / Lewis-X“ als Faktor für die Migration der Stammzellen in die Bursa bereits beschrieben [72]. Sialyl-Lewis-X wird nur von präbursalen und bursalen B-Zellen exprimiert. Vermutlich können B-Zellen über diesen Selektinliganden an einen bislang unbekanntem Rezeptor in den Gefäßendothelien in der Bursa binden, wodurch die Leukozyten in die Bursa migrieren können. Im humanen Modell konnte E-Selektin als Rezeptor des „Sialyl-Lewis-X“ nachgewiesen werden [149], das in der Analyse jedoch keine signifikante Expressionsänderung zeigte. Allerdings konnte für ein zweites Selektin, das P-Selektin (CD62) ebenfalls gezeigt werden das es „Sialyl-Lewis-X“ binden kann [150]. Dieses P-Selektin zeigte eine gesteigerte Expression zwischen ET 10 und ET 18 und kommt somit als potentieller Rezeptor des „Sialyl-Lewis-X“ in Frage. Mittels einer immunhistologischen Untersuchung des P-Selektins könnte die Lokalisierung in der Bursa überprüft werden. Weiter könnte durch die Blockierung des P-Selektins mittels eines Antikörpers der Einfluss auf die Einwanderung der B-Zellen in die Bursa getestet werden.

Zu den Adhäsionsmolekülen mit differentieller Expression zählt unter anderem das Integrin ITGA4, mit einer Hochregulation zwischen ET 10 und ET 18 und einer nochmaligen Steigerung zwischen Tag 2 und Tag 28. Integrine sind Transmembranproteine die sowohl Zell-Zell-Interaktion als auch im Rahmen der Signalübermittlung Funktionen aufweisen [151]. Das ITGA4 (CD49d,  $\alpha 4\beta 1$  lymphocyte homing receptor) bildet zusammen mit VLA4 den Rezeptor für den endothelialen Liganden VCAM1 (Vascular cell adhesion protein 1). Auch der Ligand VCAM1 zeigt eine differentielle Expression die eine Steigerung zwischen ET 10 und ET 18 um das ca. 20fache zeigt. Die Bedeutung von VCAM1 in der Lymphozytenentwicklung wurde in Mäusen durch Injektion von Antikörpern gezeigt, die gegen das VCAM1 gerichtet sind. Dabei zeigte sich, dass die normale Aggregation der hämatopoetischen Zellen an die Knochenmark-Stromazellen nicht vollständig, aber zumindest partiell inhibiert werden konnte [152]. Vermutlich spielen daher mehrere Moleküle in der Kommunikation und Adhäsion der B-Zellen und Stromazellen zusammen. Ob diese Adhäsionsfaktoren eventuell in der Bursa ebenso an den Zell-Zell-Kontakten zwischen B-Zellen und Stromazellen beteiligt sind könnte analog zu den in Mäusen durchgeführten

Experimenten durch Blockierung des Rezeptors mittels Antikörper untersucht werden.

Das C-Typ Lektin CD93 zeigt in der Bursa eine verminderte Expression nach dem Schlupf. Erstmals wurde CD93 durch den monoklonalen Antikörper AA4.1 als Marker von frühen humanen B-Zellen beschrieben. Inzwischen wurde jedoch gezeigt, dass CD93 auch auf einer Population von frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird [153]. Zudem konnte auch nachgewiesen werden, dass CD93 in Pax5-defizienten pro-B-Zellen mit anderen B-Zell spezifischen Genen eine verminderte Expression zeigt [154]. In der weiteren Entwicklung der B-Zellen konnte bei Mäusen keine CD93 Expression nachgewiesen werden (naive B-Zellen, Gedächtnis- und Germinale Zentrums-B-Zellen). Dagegen konnte gezeigt werden, dass es in der Plasmazell-Differenzierungsphase zu einer Reexpression auf Plasmablasten, Plasmazellen und den langlebigen Plasmazellen im Knochenmark kommt [155]. Zudem wurde in CD93-defizienten Mäusen gezeigt, dass die Anzahl der Antikörper sezernierenden Plasmazellen im Knochenmark reduziert ist, was die Annahme zulässt, dass die CD93 Expression für die Aufrechterhaltung des Plasmazell-Pools in den Knochenmarknischen von Bedeutung ist [155]. Die signifikante Herunterregulation zwischen ET 18 und Tag 2 könnte somit ein andeuten das CD93 beim Huhn ebenfalls auf B-Zellen exprimiert wird und an der Retention der Zellen beteiligt ist. Um abzuklären ob und zu welchen B-Zellstadien CD93 beim Huhn exprimiert wird, kann durch die Generierung eines Antikörpers gegen CD93 eine Charakterisierung der Oberflächenexpression mittels in FACS-Analysen erzielt werden. In welcher Weise CD93 an der B-Zellreifung oder auch in der Aufrechterhaltung des Plasmazellpools beim Huhn beteiligt ist könnte über die Blockierung des CD93 durch Antikörper gezeigt werden.

### **6.6.3. Chemokine in der Bursaentwicklung**

Chemokine spielen im Immunsystem wichtige Funktionen für die Regulation der Homöostase, den Verlauf von Infektionen sowie die Entwicklung lymphatischer Organe. In der für die Chemokine und deren Rezeptoren erstellten Analyse zeigte die Heatmap (Abb.20) deutliche Expressionsunterschiede zwischen den Entwicklungszeitpunkten. Einzelne Chemokine bzw. Rezeptoren wiesen dabei ein für die B-Zellreifung interessante Muster auf.

Das CC-Chemokin CCL20 und sein Rezeptor CCR6 zeigen zunächst einen parallelen Expressionsverlauf mit einer Hochregulation zwischen ET 10 und ET18. Während für CCR6

nach dem Schlupf ein signifikanter Abfall der Expressionsstärke zu sehen ist, zeigt die CCL20 Expression erst zum Tag 28 eine geringe Senkung (s. Abb. 24). CCL20 gehört zu den Chemokinen mit inflammatorischen und homöostatischen Eigenschaften. Im Gegensatz zu vielen anderen Chemokinen wurde für CCL20 nur ein Rezeptor nachgewiesen, CCR6, der auf B- und T-Zellen und Dendritischen-Zellen exprimiert wird [156-157]. Für diesen Rezeptor wurde zudem nachgewiesen, dass humane  $\beta$ -Defensine CCR6 ebenfalls aktivieren können, allerdings mit einer deutlich geringeren Affinität und im Vergleich zu CCL20 auch eine signifikant geringere chemotaktische Wirkung entfalten. Dies erscheint dadurch erklärbar, dass CCL20 den Defensinen strukturell ähnlich ist und vermutlich selbst antimikrobielle Eigenschaften hat. Auf humanen B-Zellen wurde der CCR6 zu verschiedenen Entwicklungsstufen nachgewiesen, einzig Germinale-Zentrum-B-Zellen und Plasmazellen zeigten keine Oberflächenexpression. Während dieser B-Zellstadien konnte CCR6 aber immer noch auf mRNA-Level und intrazellulär nachgewiesen werden [158]. Im Mausmodell konnte zudem der essentielle Einfluss des CCR6 Rezeptors auf die Entwicklung von GALT-Strukturen, und die Rekrutierung von B-Zellen in isolierte Follikel und die Peyerschen Platten des Darms gezeigt werden. Das knockout Mausmodell (CCR6<sup>-/-</sup>) zeigte neben einer deutlich geringeren Größe der Peyerschen Platten eine signifikante Reduktion der lymphoiden Follikel [159].

Das in der Bursa gefundene Expressionsmuster für CCR6 könnte somit vermuten lassen, dass CCR6 im Huhn evtl. ähnliche Funktionen wie im Mausmodell zukommen, wie der Rekrutierung und Positionierung der B-Zellen in der Bursa. CCR6 exprimierende B-Zellen könnten damit über einen CCL20 Gradienten in die Bursa gelockt werden und durch ein anhaltendes Signal während der bursalen Entwicklung in den Follikeln gehalten werden. Die Herunterregulation des Rezeptors konnte in der Gesamtbursa eindeutig gezeigt werden, während dieses in den isolierten B-Zellen nicht der Fall war, was die Frage offen lässt wie die B-Zellen die Bursa nach dem Schlupf verlassen können. Eine mögliche Erklärung dieses Befundes kann die im Mausmodell gefundene mRNA für CCR6 bei fehlender Oberflächenexpression geben, so dass eine direkte Regulation des Rezeptors evtl. über Internalisierung oder andere posttranskriptionale Prozesse gesteuert wird. Eine wichtige Aussage über die Funktion von CCR6 wäre demnach die Charakterisierung der Zelloberflächenexpression mittels gegen CCR6 gerichteter Antikörper in FACS-Analysen oder der Immunhistologie.

In der Analyse des Chemokins CXCL13 (B lymphocyte chemoattractant, BLC) und seines Rezeptors CXCR5 (Burkitt lymphoma receptor 1, BLR1) konnte für den Liganden ein

signifikant differentielles Expressionsmuster erkannt werden, während für CXCR5 keine signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Entwicklungszeitpunkten zu sehen ist. Dabei weist CXCL13 die Besonderheit beim Huhn auf, dass 3 unterschiedliche Isoformen beschrieben wurden, CXCL13L1, CXCL13L2 und CXCL13L3. Die Arraydaten zeigen für alle Isoformen einen ähnlichen Expressionsverlauf, unterscheiden sich jedoch enorm in der Stärke der Expressionsänderung. Alle zeigen dabei von ET 10 zu ET 18 eine starke Hochregulation und bleiben über die weiteren Zeitpunkte auf diesem hohen Niveau. Dabei zeigt CXCL13L3 die höchste initiale Expressionssteigerung (FC=382) gefolgt von CXCL13L1 (FC=142) und CXCL13L2 (FC=84).

Für humanes CXCR5 konnte nachgewiesen werden, dass es auf muren B-Zellen exprimiert wird, während der Ligand CXCL13 in Lymphknoten und Peyerschen Platten eine hohe Expression zeigt [160]. In Maus und Menschen konnte durch gezielte Ausschaltung von CXCR5 und CXCL13 gezeigt werden, dass dieses Chemokin eine essentielle Funktion in der Rekrutierung von B-Zellen in Lymphknoten und Peyersche Platten hat, und dabei speziell die Organisation der B-Zellfollikel-Mikroanatomie reguliert [161]. Im Appendix des Kaninchens konnten zudem hohe CXCR5 Expressionslevel in den B-Zellen bestimmt werden, was einen Unterschied zu den peripheren Blut-B-Zellen darstellt, die CXCR5 auf einem geringeren Niveau exprimieren. Eine CXCL13 Expression in den B-Zellfollikel des Appendix konnte über einen humanen Antikörper nicht gezeigt werden, was jedoch wahrscheinlich auf eine unzureichende Kreuzreaktivität des humanen Antikörpers zurückzuführen ist [162]. Dennoch scheint die unterschiedliche Expression zwischen den Blut-B-Zellen und den B-Zellen im Appendix auf eine Beteiligung des CXCR5 an der Einwanderung und Retention der B-Zellen in der Reifung der B-Lymphozyten zu haben.

Die massive Hochregulation der CXCL13 Expression in der Bursa weist auf eine Beteiligung der CXCR5/CXCL13-Achse in der bursalen Entwicklung hin. Dabei ist jedoch die nicht signifikante Expressionsänderung des CXCR5 auffallend, da besonders im Zeitraum zwischen ET 10 und ET 18 durch die gesteigerte Abundanz der B-Zellen auch eine Expressionssteigerung eines auf den B-Zellen exprimierten Rezeptors zu erwarten wäre. Ob daher CXCR5 als Wegweiser für die B-Zellen in die Bursa dient und welche Funktion dabei die verschiedenen Isoformen des CXCL13 aufweisen, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Mittels qRT-PCR könnte ein Vergleich zwischen den bursalen B-Zellen und peripheren Blut-B-Zellen Aufschluss geben, ob eine differentielle Expression des CXCR5 einen Einfluss auf die Auswanderung der B-Zellen hat. Ebenso kann der Vergleich zwischen Gesamtbursa und isolierten bursalen B-Zellen in einer CXCL13 qRT-PCR weiter Abklären,

welche Zellen (B-Zellen oder Bursastroma) das CXCL13 produzieren.

Ein weiteres Chemokin-Rezeptor-Paar mit interessantem Expressionsmuster konnte als CXCL12/CXCR4 identifiziert werden. Das Chemokin CXCL12 (Stromal cell-derived factor 1, pre-B cell growth-stimulating factor) selbst zeigte dabei nur ein gering verminderte Regulation zwischen ET 10 und ET 18 (s. Abb. 25) und bleibt weitgehend konstant exprimiert, während der Rezeptor CXCR4 durch eine starke Hochregulation zwischen ET 10 und ET 18 auffällt. Bemerkenswert ist dabei für CXCL12 die deutlich geringere Expression in isolierten B-Zellen gegenüber der Gesamtbursa, während CXCR4 keine signifikanten Unterschiede zwischen Bursa und isolierten B-Zellen zeigt (s. Abb. 25).

Die ebenso starke Expression des CXCR4 in der Gesamtbursa und in den isolierten B-Zellen lässt darauf schließen dass der Rezeptor auf den B-Zelloberfläche exprimiert ist. Für CXCL12 findet sich dagegen eine deutlich geringere Expression (ca. 400.000fach) in den isolierten B-Zellen, so dass das Chemokin höchstwahrscheinlich von bursalen Stromazellen produziert wird.

CXCL12 wurde zuerst als „pre-B cell growth-stimulating factor“ beschrieben, was bereits die proliferative und antiapoptotische Wirkung im Mausmodell beschreibt. Zudem wurde auch die chemotaktische Wirkung sowohl für B- und T-Zellen [163-165] als auch die wichtige Funktion bei der Kolonisation des Knochenmarks durch hämatopoetische Vorläuferzellen gezeigt [166-167]. Das in den Knochenmark-Stromazellen hochexprimierte CXCL12 wirkt dabei chemotaktisch auf CD34+ hämatopoetische Vorläuferzellen, B-Zellvorläuferzellen und auch mature B-Zellen [165] und kann über die anhaltende Expression die Zellen im Knochenmark halten. Die beschriebenen Funktionen der CXCL12/CXCR4 Achse auf B-Zellen und deren Entwicklung konnte durch gezielte Ausschaltung der Gene im Mausmodell gezeigt werden [104]. Zudem zeigen Mäuseembryonen die mit CXCR4 defizienten Leberzellen rekonstituiert wurden eine signifikant reduzierte Zahl an B-Zellen im Knochenmark und zeigen dagegen stark erhöhte Zahlen an pro- und pre-B-Zellen im Blut. Daraus wurde geschlossen, dass CXCR4 auf B-Zellen für die Zurückhaltung der Zellen im Knochenmark verantwortlich ist [104].

Aufgrund der Expressionsmuster von CXCR4 und CXCL12 lässt sich vermuten, dass dieses Chemokin-Rezeptor-Paar ähnliche Funktionen im Huhn aufweist wie im Säuger. Die Daten zeigen, dass B-Zellen den Rezeptor exprimieren und somit auf einen in der Bursa gebildeten CXCL12-Gradienten in die Bursa dirigiert werden könnten. Die anhaltende konstante Expression von CXCL12 in der Bursa kann zudem als wichtiges Signal für die Retention der

B-Zellen während der bursalen Entwicklung gesehen werden, dass durch die verminderte CXCR4-Expression in den B-Zellen nach dem Schlupf aufgehoben wird und die B-Zellen zur Emigration befähigt. Um diese Vermutungen verifizieren zu können muss die Abhängigkeit der B-Zellentwicklung von CXCR4 und CXCL12 in weiteren Experimenten gezeigt werden. Eine Möglichkeit besteht dabei in der gezielten Blockierung von CXCR4, wie es bereits in verschiedenen Versuchen im Mausmodell mittels antagonistischen Peptiden und Antikörper gezeigt wurde [168].

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass zwischen den ausgewählten Entwicklungszeitpunkten deutliche Unterschiede in der Expression von mRNAs bestehen. Durch weiterführende funktionell genomische Analysen konnten Zytokinpaare, Adhäsionsfaktoren und Chemokin-Rezeptor-Paare, als erste mögliche Regulationsfaktoren der B-Zellentwicklung identifiziert werden.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Veröffentlichung des Hühnergenoms im Jahr 2004 haben sich umfangreiche Möglichkeiten eröffnet durch moderne funktionelle Genomanalysen orthologe Gene zu Mensch oder Maus zu identifizieren und diese funktionell zu charakterisieren. Diese genomischen Daten können genutzt werden um aussagekräftige Microarrays zu entwickeln mit deren Hilfe Erkenntnisse über die Expression verschiedener Gene gewonnen werden können. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe transkriptomischer Expressionsstudien neue Kandidatengene zu identifizieren, die eine Rolle für die Differenzierung der B-Zellen in der Bursa Fabricii, dem besonderen Organ der B-Zellentwicklung der Vögel spielen.

Die eingesetzte Agilent Mikroarray-Technologie bietet neben einer hohen Sensitivität und Reproduzierbarkeit die Möglichkeit das untersuchte Geneset individuell an Fragestellungen anzupassen. Daher wurden dem bestehenden Agilent 4x44K Chicken-Genom-Array weitere 1699 Gene hinzugefügt, die in Säugermodellen regulatorische Funktionen in der B-Zellentwicklung zeigten. Nachdem wir zusätzlich eine umfangreiche Annotation des Arrays durchgeführt haben, kann nun eine Gesamtzahl von 13.353 Genen angesprochen werden, wodurch ein guter Überblick für die derzeit beim Huhn bekannten Genen ermöglicht wird.

Für die transkriptomische Analyse wurden vier für die Organentwicklung repräsentative Untersuchungszeitpunkte gewählt: Embryonaltag 10, Embryonaltag 18 sowie Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf gewählt. Die Auswertung der Expressionsdaten zeigte, dass die gewählten Entwicklungszeitpunkte eindeutig voneinander unterscheidbar sind und auch auf transkriptomischer Ebene verschiedene Entwicklungsabschnitte der Bursa repräsentieren. Weitere Auswertungen zeigten, dass sich die bekannten morphologischen Änderungen der Bursa während ihrer Entwicklung auch im Transkriptom widerspiegeln. So zeigen sich die stärksten transkriptomischen Veränderungen zwischen ET 10 und ET 18, was mit der drastischen Umwandlung der Zellzusammensetzung durch die Einwanderung und Proliferation der B-Zellen zwischen diesen Zeitpunkten korreliert. Die höhere Abundanz der B-Zellen wird auch vom Expressions-Niveau einzelner Gene gespiegelt. So sind einige der am stärksten differentiell exprimierten Gene wie CD79B oder CD72 direkt mit dem B-Zell-Rezeptor gekoppelt.

Insgesamt konnten über alle vier Zeitpunkte hinweg 4.372 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Diese wurden in weiterführenden Analysen einzelnen Genclustern zugeordnet, die Gene enthalten welche I) im frühen Embryo hoch exprimiert sind und danach

herunterreguliert werden, II) erst nach dem Schlupf hochreguliert werden oder III) nur an den Zeitpunkten um den Schlupf hochreguliert bzw. IV) herunterreguliert sind. Viele der Gene mit interessanten Expressionsmustern konnten dabei den Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Chemokine zugeordnet werden, Molekülgruppen, deren Mitglieder beim Säuger bereits als wichtige Regulatoren der B-Zellentwicklung beschrieben wurden. Hierbei zeigten bei den Zytokinen besonders IL7 und der IL7-Rezeptor ein auffälliges Expressionsmuster. Bei den Chemokinen und ihren Rezeptoren wurden sowohl für CCL20 und CCR6 also auch für CXCL12/CXCR4 interessante Expressionsmuster identifiziert. Diese konnten mittels q-RT-PCR bestätigt und durch Untersuchungen von aufgereinigten B-Zellpräparationen ergänzt werden. Die Daten weisen darauf hin, dass diesen Chemokin-Chemokinrezeptorpaaren in der Entwicklung der Bursa Fabricii eine wichtige Rolle zukommen könnte.

Die durchgeführten transkriptomischen Analysen haben damit die Identifikation einer Vielzahl neuer Kandidatengene ermöglicht. Ihre weitere funktionelle Charakterisierung und der umfangreiche, nun für weitere Analysen zur Verfügung stehende Datenpool bilden die Grundlage für umfassende Untersuchungen des aviären B-Zellsystems.

## 8. SUMMARY

The first release of the chicken genome sequence provided extensive opportunities to identify and characterize genes orthologous to human and mouse genes and the opportunity to apply functional genomic analysis in chicken. These genomic data can be employed for the generation of conclusive microarrays, which are helpful tools to study expression levels of a multitude of genes. The aim of this study was to perform transcriptomic expression studies in order to identify candidate genes, which might be important for the development and differentiation of chicken B cells in the Bursa of Fabricius, the bird's unique organ of B cell development.

The applied Agilent microarray technology provides high sensitivity and reproducibility and the option to customize the gene sets according to the study design. Hence we supplemented the Agilent 4x44K chicken-genome-array with 1.699 genes with known regulatory functions for B cell development in human and mouse. We also performed extensive array annotation, resulting in a total number of 13.353 Genes which can now be addressed and which provide a sound overview of to date known chicken genes.

Samples were taken at four representative stages of B-cell differentiation, (embryonic day 10 (ED10), embryonic day 18 (ED18), day 2 and day 28 after hatch) and subjected to transcriptome analysis. First evaluation of obtained array data revealed that selected developmental stages could be clearly discriminated by means of gene expression. Further analysis showed that known morphological changes during bursa development are well reflected in the transcriptome. Most intense transcriptomic differences were detected between ED10 and ED18, which correlate with drastic changes in tissue composition caused by the immigration and proliferation of B cells between these time points. Several of the genes showing the highest up regulation like CD79B and CD72 are molecules directly linked to the B cell receptor, thus also reflecting the increasing number of B cells.

Over all four time points 4.372 differentially expressed genes were identified. These could be assigned to distinct expression patterns consisting of I) genes highly expressed in the early embryonic stage and down regulated at later stages, II) genes, with low initial expression but up regulation after hatch, III) genes unregulated or IV) down regulated solely around hatch. Many of the genes with interesting expression patterns were identified as cytokines, adhesion molecules and chemokines, gene families, with known importance for B cell development in mammals. For example noticeable expression profiles were found for the cytokine IL7 and its

---

receptor IL7R. Among the chemokines and chemokine receptors interesting expression patterns were identified for CCL20 and CCR6 as well as CXCL12 and CXCR4. These data were confirmed by means of q-RT-PCR and supplemented with expression analysis in purified B cell preparations, suggesting a regulating function of these chemokines for B cell development in the chicken bursa.

In summary, the performed transcriptome analysis allowed the identification of a multitude of new candidate genes for further functional characterization and obtained an extensive pool of data, which will serve as valuable base for further studies on avian B cell development.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Rast, J.P., et al., *alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny*. *Immunity*, 1997. **6**(1): p. 1-11.
2. Houssaint, E., M. Belo, and N.M. Le Douarin, *Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras*. *Dev Biol*, 1976. **53**(2): p. 250-64.
3. Ratcliffe, M.J., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. *Dev Comp Immunol*, 2006. **30**(1-2): p. 101-18.
4. Betti, F., et al., *Development of the cloacal bursa in the domestic fowl. II. A quantitative and fine structural analysis of the follicular cortex and medulla*. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1991. **23**(4): p. 613-28.
5. Glick, B., *The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis*. *Int Rev Cytol*, 1977. **48**: p. 345-402.
6. Chang, T., Glick B, Winter AR, *The significance of the bursa of Fabricius of chickens in antibody production*. *Poultry Sci*, 1955.
7. Lerman, S.P. and W.P. Weidanz, *The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens*. *J Immunol*, 1970. **105**(3): p. 614-9.
8. Moriya, C., *Review of studies on the immunological capacity in the bursectomized chick*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1987. **16**(1-2): p. 77-84.
9. Reynolds, J.D., *Mitotic rate maturation in the Peyer's patches of fetal sheep and in the bursa of Fabricius of the chick embryo*. *Eur J Immunol*, 1987. **17**(4): p. 503-7.
10. Ekino, S., *Role of environmental antigens in B cell proliferation in the bursa of Fabricius at neonatal stage*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(3): p. 772-5.
11. Sorvari, R. and T.E. Sorvari, *Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ. Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological importance*. *Immunology*, 1977. **32**(4): p. 499-505.
12. Sorvari, T., et al., *Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius*. *Nature*, 1975. **253**(5488): p. 217-9.
13. Ekino, S., et al., *Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli*. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1980. **58**(3): p. 289-96.
14. Ekino, S., et al., *Role of environmental antigen in the development of IgG+ cells in the bursa of fabricius*. *J Immunol*, 1995. **155**(10): p. 4551-8.

15. Yasuda, M., et al., *A comparative study of gut-associated lymphoid tissue in calf and chicken*. Anat Rec, 2002. **266**(4): p. 207-17.
16. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 595-621.
17. Pink, J.R., M.J. Ratcliffe, and O. Vainio, *Immunoglobulin-bearing stem cells for clones of B (bursa-derived) lymphocytes*. Eur J Immunol, 1985. **15**(6): p. 617-20.
18. Lassila, O., et al., *B cell precursors in chick embryos surgically bursectomized at 72 h of incubation*. Eur J Immunol, 1988. **18**(11): p. 1867-70.
19. Reynaud, C.A., et al., *Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo*. Embo J, 1992. **11**(12): p. 4349-58.
20. Dieterlen-Lievre, F. and C. Martin, *Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development*. Dev Biol, 1981. **88**(1): p. 180-91.
21. Ratcliffe, M.J. and K.A. Jacobsen, *Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development*. Semin Immunol, 1994. **6**(3): p. 175-84.
22. McCormack, W.T., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 838-47.
23. Janeway, C., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Fourth Edition ed. 1999: Current Biology Publications / Garland Publishing.
24. Reynaud, C.A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-91.
25. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
26. Reynaud, C.A., et al., *Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region*. Cell, 1989. **59**(1): p. 171-83.
27. Sayegh, C.E., et al., *The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 187-200.
28. Houssaint, E., E. Diez, and J.R. Pink, *Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen*. Immunology, 1987. **62**(3): p. 463-70.
29. Ratcliffe, M.J., et al., *Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event*. Eur J Immunol, 1986. **16**(2): p. 129-33.
30. Pike, K.A., et al., *The cytoplasmic domain of Ig alpha is necessary and sufficient to*

- support efficient early B cell development.* J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2210-8.
31. Tregaskes, C.A., et al., *Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure.* Immunogenetics, 1996. **44**(3): p. 212-7.
  32. Nieminen, P., J. Liippo, and O. Lassila, *Pax-5 and EBF are expressed in committed B-cell progenitors prior to the colonization of the embryonic bursa of fabricius.* Scand J Immunol, 2000. **52**(5): p. 465-9.
  33. Houssaint, E., A. Mansikka, and O. Vainio, *Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo.* J Exp Med, 1991. **174**(2): p. 397-406.
  34. Le Douarin, N.M. and F.V. Jotereau, *Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras.* J Exp Med, 1975. **142**(1): p. 17-40.
  35. Dunon, D., et al., *Renewal of thymocyte progenitors and emigration of thymocytes during avian development.* Dev Comp Immunol, 1998. **22**(3): p. 279-87.
  36. Benatar, T., et al., *Expression of immunoglobulin genes in the avian embryo bone marrow revealed by retroviral transformation.* Eur J Immunol, 1991. **21**(10): p. 2529-36.
  37. Pink, J.R., O. Vainio, and A.M. Rijnbeek, *Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius.* Eur J Immunol, 1985. **15**(1): p. 83-7.
  38. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius.* Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
  39. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood.* Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 96-102.
  40. Toivanen, P. and A. Toivanen, *Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics.* Eur J Immunol, 1973. **3**(9): p. 585-95.
  41. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius.* Eur J Immunol, 1994. **24**(2): p. 458-63.
  42. Jalkanen, S., et al., *Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 hr of incubation: surface immunoglobulin and B-L (La-like) antigen-bearing cells.* J Immunol, 1983. **130**(5): p. 2038-41.
  43. Motyka, B. and J.D. Reynolds, *Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection.* Eur J Immunol, 1991. **21**(8): p. 1951-8.
  44. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: II. Accumulation of apoptotic cells within the germinal center.* Cell Tissue Res, 2003. **314**(2): p. 215-21.

45. Olah, I. and B. Glick, *Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies*. Poult Sci, 1979. **58**(1): p. 195-210.
46. Vainio, O., M.K. Viljanen, and A. Toivanen, *Early ontogeny of germinal center formation in the chicken*. Dev Comp Immunol, 1978. **2**(3): p. 493-504.
47. Fugmann, S.D., *The origins of the Rag genes--from transposition to V(D)J recombination*. Semin Immunol, 2010. **22**(1): p. 10-6.
48. Thompson, C.B. and P.E. Neiman, *Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment*. Cell, 1987. **48**(3): p. 369-78.
49. McCormack, W.T. and C.B. Thompson, *Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity*. Genes Dev, 1990. **4**(4): p. 548-58.
50. Carlson, L.M., et al., *Templated insertions in the rearranged chicken IgL V gene segment arise by intrachromosomal gene conversion*. Genes Dev, 1990. **4**(4): p. 536-47.
51. Reynaud, C.A., et al., *Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches*. Cell, 1991. **64**(5): p. 995-1005.
52. Reynaud, C.A., V. Anquez, and J.C. Weill, *The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire*. Eur J Immunol, 1991. **21**(11): p. 2661-70.
53. Arakawa, H., J. Hauschild, and J.M. Buerstedde, *Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion*. Science, 2002. **295**(5558): p. 1301-6.
54. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.
55. Bransteitter, R., et al., *Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4102-7.
56. Martin, A. and M.D. Scharff, *AID and mismatch repair in antibody diversification*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 605-14.
57. Parvari, R., et al., *Somatic diversification of chicken immunoglobulin light chains by point mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(8): p. 3072-6.
58. Shokat, K.M. and C.C. Goodnow, *Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses*. Nature, 1995. **375**(6529): p. 334-8.

59. Gascan, H., et al., *Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 747-50.
60. Weinstein, P.D., R.G. Mage, and A.O. Anderson, *The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit*. Adv Exp Med Biol, 1994. **355**: p. 249-53.
61. Weinstein, P.D., A.O. Anderson, and R.G. Mage, *Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 647-59.
62. Reynaud, C.A., et al., *Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process*. Cell, 1995. **80**(1): p. 115-25.
63. Meyer, A., et al., *Immunoglobulin gene diversification in cattle*. Int Rev Immunol, 1997. **15**(3-4): p. 165-83.
64. Parng, C.L., et al., *Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5478-86.
65. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 119-30.
66. Sinha, R.K., C. Alexander, and R.G. Mage, *Regulated expression of peripheral node addressin-positive high endothelial venules controls seeding of B lymphocytes into developing neonatal rabbit appendix*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **110**(1-2): p. 97-108.
67. Yasuda, M., et al., *The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development*. Vet Res, 2006. **37**(3): p. 401-15.
68. Furlong, R.F., *Insights into vertebrate evolution from the chicken genome sequence*. Genome Biol, 2005. **6**(2): p. 207.
69. Kothlow, S., et al., *Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken*. Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-15.
70. Tregaskes, C.A., et al., *Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate*. Dev Comp Immunol, 2005. **29**(4): p. 361-74.
71. Otsubo, Y., et al., *Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius*. Dev Comp Immunol, 2001. **25**(5-6): p. 485-93.
72. Varki, A., *Selectin ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7390-7.
73. Masteller, E.L., et al., *Chicken B cells undergo discrete developmental changes in*

- surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis.* Development, 1995. **121**(6): p. 1657-67.
74. Gruss, H.J., J. Duyster, and F. Herrmann, *Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease.* Ann Oncol, 1996. **7 Suppl 4**: p. 19-26.
75. Vogel, L.A. and R.J. Noelle, *CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family.* Semin Immunol, 1998. **10**(6): p. 435-42.
76. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations.* J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
77. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL.* Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.
78. Castigli, E., et al., *TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells.* J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 35-9.
79. Bossen, C. and P. Schneider, *BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling.* Semin Immunol, 2006. **18**(5): p. 263-75.
80. Namen, A.E., D.E. Williams, and R.G. Goodwin, *Interleukin-7: a new hematopoietic growth factor.* Prog Clin Biol Res, 1990. **338**: p. 65-73.
81. Goodwin, R.G., et al., *Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(1): p. 302-6.
82. Laky, K., et al., *Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of gammadelta T cells and Peyer's patches.* J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1569-80.
83. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine.* J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1519-26.
84. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.* N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
85. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
86. Wu, Y. and A. Yoder, *Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis.* PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000520.
87. Singh, A., et al., *Functional and genetic analysis of coreceptor usage by dualtropic HIV-1 subtype C isolates.* Virology, 2009. **393**(1): p. 56-67.

88. Cagigi, A., et al., *Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4401-10.
89. Charo, I.F. and M.B. Taubman, *Chemokines in the pathogenesis of vascular disease*. Circ Res, 2004. **95**(9): p. 858-66.
90. Takebayashi, K., et al., *Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients*. J Diabetes Complications, 2006. **20**(2): p. 98-104.
91. Houck, J.C. and C.M. Chang, *The purification and characterization of a lymphokine chemotactic for lymphocytes--lymphotactin*. Inflammation, 1977. **2**(2): p. 105-13.
92. Strieter, R.M., et al., *Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis*. Eur J Cancer, 2006. **42**(6): p. 768-78.
93. Abel, S., et al., *The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6362-72.
94. Matloubian, M., et al., *A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 298-304.
95. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
96. Tsou, C.L., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44622-6.
97. Kelner, G.S., et al., *Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine*. Science, 1994. **266**(5189): p. 1395-9.
98. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 108-15.
99. Moser, B. and K. Willmann, *Chemokines: role in inflammation and immune surveillance*. Ann Rheum Dis, 2004. **63 Suppl 2**: p. ii84-ii89.
100. Hase, K., et al., *The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 43-51.
101. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
102. Ohl, L., et al., *Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and*

- organization of secondary lymphoid organs*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1199-204.
103. Allen, C.D., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 943-52.
104. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 463-71.
105. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
106. Randall, T.D., D.M. Carragher, and J. Rangel-Moreno, *Development of secondary lymphoid organs*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 627-50.
107. Vila-Coro, A.J., et al., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1699-710.
108. Wilson, S., G. Wilkinson, and G. Milligan, *The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities*. J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28663-74.
109. del Pozo, M.A., et al., *Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK*. Embo J, 2000. **19**(9): p. 2008-14.
110. Schraufstatter, I.U., J. Chung, and M. Burger, *IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(6): p. L1094-103.
111. Spangrude, G.J., et al., *Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin*. J Immunol, 1985. **135**(6): p. 4135-43.
112. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
113. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-34.
114. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 467-84.
115. Liang, T.S., et al., *Cloning, mRNA distribution, and functional expression of an avian counterpart of the chemokine receptor/HIV coreceptor CXCR4*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(2): p. 297-305.
116. Rehim, R., et al., *A novel role of CXCR4 and SDF-1 during migration of cloacal muscle precursors*. Dev Dyn, 2010. **239**(6): p. 1622-31.

117. Munoz, I., et al., *Cloning, expression and functional characterization of chicken CCR6 and its ligand CCL20*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 551-9.
118. Langman, R.E. and M. Cohn, *A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system: the consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit*. Res Immunol, 1993. **144**(6-7): p. 422-46.
119. Masteller, E.L. and C.B. Thompson, *B cell development in the chicken*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 998-1011.
120. Hirano, A., W.C. Brown, and D.M. Estes, *Cloning, expression and biological function of the bovine CD40 homologue: role in B-lymphocyte growth and differentiation in cattle*. Immunology, 1997. **90**(2): p. 294-300.
121. Takamatsu, H., et al., *Establishment of long-term CD154-dependent porcine B-cell cultures*. Immunology, 1999. **97**(2): p. 211-8.
122. Winding, P. and M.W. Berchtold, *The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments*. J Immunol Methods, 2001. **249**(1-2): p. 1-16.
123. Le Douarin, N.M., et al., *Ontogeny of the avian thymus and bursa of Fabricius studied in interspecific chimeras*. Ann Immunol (Paris), 1976. **127**(6): p. 849-56.
124. Wallis, J.W., et al., *A physical map of the chicken genome*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 761-4.
125. Kothlow, S., *Characterization of chBAFF as an important regulator of B-cell function in the chicken*, in *Dissertation. Institute of Animal Physiology*. 2004, LMU: Munich.
126. Kothlow, S., et al., *Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo*. Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1619-28.
127. Kothlow, S., et al., *CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1015-26.
128. Koskela, K., et al., *Chicken B-cell-activating factor: regulator of B-cell survival in the bursa of fabricius*. Scand J Immunol, 2004. **59**(5): p. 449-57.
129. Sato, N., et al., *Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse*. Dev Biol, 2003. **260**(2): p. 404-13.
130. Sperger, J.M., et al., *Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13350-5.
131. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.

132. Trubiani, O., et al., *Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol, 2010. **225**(1): p. 123-31.
133. Dvash, T., et al., *Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies*. Hum Reprod, 2004. **19**(12): p. 2875-83.
134. Wutzl, A., et al., *Bone morphogenetic proteins 2, 5, and 6 in combination stimulate osteoblasts but not osteoclasts in vitro*. J Orthop Res, 2010. **28**(11): p. 1431-9.
135. Wang, D., et al., *Highly variable mRNA expression and splicing of L-type voltage-dependent calcium channel alpha subunit 1C in human heart tissues*. Pharmacogenet Genomics, 2006. **16**(10): p. 735-45.
136. Bon, E., et al., *Proteomic analyses of the developing chicken cardiovascular system*. J Proteome Res, 2010. **9**(1): p. 268-74.
137. Kopf, M., M.F. Bachmann, and B.J. Marsland, *Averting inflammation by targeting the cytokine environment*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(9): p. 703-18.
138. Chizzolini, C., J.M. Dayer, and P. Miossec, *Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance?* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. 246.
139. Schneider, P., et al., *BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1747-56.
140. Gross, J.A., et al., *TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 995-9.
141. Reddy, S.K., et al., *The BAFF-Interacting receptors of chickens*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1076-87.
142. Yan, M., et al., *Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1547-52.
143. Seshasayee, D., et al., *Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BlyS receptor*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 279-88.
144. Namen, A.E., et al., *B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 988-1002.
145. Kalis, S.L., et al., *Suppression of B lymphopoiesis at a lymphoid progenitor stage in adult rabbits*. Int Immunol, 2007. **19**(6): p. 801-11.
146. Siewe, B.T., et al., *A novel functional rabbit IL-7 isoform*. Dev Comp Immunol, 2010. **34**(8): p. 828-36.

147. Corcoran, A.E., et al., *The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis*. *Embo J*, 1996. **15**(8): p. 1924-32.
148. van Haarlem, D.A., et al., *Characterisation and expression analysis of the chicken interleukin-7 receptor alpha chain*. *Dev Comp Immunol*, 2009. **33**(9): p. 1018-26.
149. Phillips, M.L., et al., *ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex*. *Science*, 1990. **250**(4984): p. 1130-2.
150. Polley, M.J., et al., *CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(14): p. 6224-8.
151. Evans, E.A. and D.A. Calderwood, *Forces and bond dynamics in cell adhesion*. *Science*, 2007. **316**(5828): p. 1148-53.
152. Funk, P.E., P.W. Kincade, and P.L. Witte, *Native associations of early hematopoietic stem cells and stromal cells isolated in bone marrow cell aggregates*. *Blood*, 1994. **83**(2): p. 361-9.
153. Yamane, T., et al., *Expression of AA4.1 marks lymphohematopoietic progenitors in early mouse development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(22): p. 8953-8.
154. Rolink, A.G., et al., *The potential involvement of Notch signaling in NK cell development*. *Immunol Lett*, 2006. **107**(1): p. 50-7.
155. Chevrier, S., et al., *CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(10): p. 3895-900.
156. Baba, M., et al., *Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 14893-8.
157. Greaves, D.R., et al., *CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells*. *J Exp Med*, 1997. **186**(6): p. 837-44.
158. Schutyser, E., S. Struyf, and J. Van Damme, *The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(5): p. 409-26.
159. Williams, I.R., *CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1072**: p. 52-61.
160. Muller, G., U.E. Hopken, and M. Lipp, *The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity*. *Immunol Rev*, 2003. **195**: p. 117-35.
161. Legler, D.F., et al., *B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed*

- in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5.* J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 655-60.
162. Sinha, R.K. and R.G. Mage, *Developing neonatal rabbit appendix, a primary lymphoid organ, is seeded by immature blood-borne B cells: evidence for roles for CD62L/PNAd, CCR7/CCL21, alpha4beta1 and LFA-1.* Dev Comp Immunol, 2004. **28**(7-8): p. 829-41.
163. Nagasawa, T., K. Tachibana, and K. Kawabata, *A CXC chemokine SDF-1/PBSF: a ligand for a HIV coreceptor, CXCR4.* Adv Immunol, 1999. **71**: p. 211-28.
164. Nagasawa, T., H. Kikutani, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2305-9.
165. D'Apuzzo, M., et al., *The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4.* Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1788-93.
166. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1.* Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
167. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
168. Fanoni, D., et al., *New monoclonal antibodies against B-cell antigens: possible new strategies for diagnosis of primary cutaneous B-cell lymphomas.* Immunol Lett, 2010.

## **10. ANHANG**

### **Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden integriert.

- 1) Applichem, Darmstadt
- 2) Ratiopharm, Ulm
- 3) Sigma, Deisenhofen
- 4) Roth, Karlsruhe
- 5) Invitrogen, Karlsruhe
- 6) Macherey-Nagel, Düren
- 7) Fermentas, St. Leon-Rot
- 8) Peqlab, Erlangen
- 9) Qiagen, Hilden
- 10) Agilent, Böblingen
- 11) Promega, Mannheim
- 12) Solis BioDyne, Tartur, Estland
- 13) MWG, Ebersberg
- 14) Sigma, Deisenhofen
- 15) Biochrom, Berlin
- 16) Serotec, Düsseldorf
- 17) BD Biosciences, Heidelberg

### Geräte in alphabetischer Reihenfolge

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Homogenisator	peqlab, precellys 24	Peqlab, Erlangen
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer Software: Bioanalyzer 2100 Expert	Agilent, Böblingen
Gel-Dokumentation	Image Quant 300 Software: Image Quant Capture 300	GE Healthcare, Garching
Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad München
Hybridisierungssofen	G2545A	Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius
Microarrayscanner	Agilent G2505C Scanner	Agilent, Böblingen
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Power-Supply	Power Pac 300	Biorad, München
qPCR-System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sicherheitswerkban k	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
PCR workstation	UV sterilizing PCRWorkstation	Peqlab, Erlangen
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Thermocycler	MJ Mini	Biorad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Köln

## 11. DANKSAGUNG

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers und Frau Dr. Sonja Härtle für die Überlassung des Dissertationsthemas und die stets freundliche und hervorragende fachliche Betreuung. Nur durch ihre kollegiale Zusammenarbeit und fachliche Kompetenz konnte diese Arbeit gelingen.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Blum im Genzentrum. Besonderen Dank an Herrn Dr. Stefan Bauersachs und Karin Gross die mir immer bei meinen Arrayexperimenten zur Seite standen.

Den „Guten Feen“ Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl und Marina Kohn möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima, aber auch die entspannenden Raucherpausen danken. Vielen Dank dass ihr immer ein offenes Ohr hattet, für Probleme aller Art.

Dr. Susanne Schwarz gebührt mein Dank für die Einführung in die qPCR Technik, unschätzbare Hilfe beim Erstellung der Arrays und deren Auswertung und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Auch bei meinen Mitdoktoranden möchte ich mich an dieser Stelle für das freundliche Miteinander bedanken. Besonderen Dank an Ute, Kathrin, Julia und Jana für die Montag-Treffen um halb 9 im „Grünen“.

Für die Betreuung der Tiere danke ich Fritz Meggendorfer, Hedi Opitz und Thomas Hoschka.

Allen Institutsmitgliedern danke ich für das freundliche Arbeitsklima und für ihre stete

Hilfsbereitschaft.

Ein Dankeschön auch an die Rechnerbetriebsgruppe, die mir bei vielen technischen Problemen weiterhelfen konnte und die meinen Rechner und mich bestimmt nicht so schnell vergessen werden.

Einen großen Dank geht an meine Mitbewohnerin Marion, und an Heike Müller. Danke dass ihr mich motiviert und mich ab und zu auch auf andere Gedanken gebracht habt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir immer alle Optionen offen ließen und durch ihre finanzielle Unterstützung das Studium erst ermöglichten. Auch meine beiden Brüdern Bernd und Markus, sowie dessen Ehefrau Christine und meinem Neffen Elias möchte ich dafür danken das sie mich immer in meinem Tun bestärkt haben. Ein besonderer Dank geht auch an meine Tante Gertrud meinem Onkel Klaus und meiner Cousine Kathrin, die immer an meine Ziele geglaubt haben.