

**Untersuchungen
zur Rolle der Rac1-GTPase
für die Entwicklung und Funktion
von B-Lymphozyten**

Adam Nopora



München 2005

**Untersuchungen
zur Rolle der Rac1-GTPase
für die Entwicklung und Funktion
von B-Lymphozyten**

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Adam Nopora
aus Beuthen O/S

München, 22. Juni 2005

Erstgutachter:

Prof. Dr. E. Weiß

Zweitgutachter:

Prof. Dr. M. Schleicher

Betreuer der Arbeit:

Prof. Dr. T. Brocker (Sondergutachter)

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Oktober 2005

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit flossen in folgende Publikation ein:

Nopora, A. und Brocker, T. (2005). "The role of the small Rho-GTPases Rac1 Cdc42 in B cell development and function."; *Manuskript in Vorbereitung*

INHALTSVERZEICHNIS

1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	13
2 ZUSAMMENFASSUNG	17
3 EINLEITUNG	20
3.1 Das Immunsystem	20
3.1.1 Die Entwicklung der T-Zellen	21
3.1.2 Die zelluläre Immunantwort	23
3.1.3 Die Entwicklung und Funktion der B-Zellen	25
3.1.3.1 Der B-Zellrezeptor	25
3.1.3.2 Die Entwicklung der B-Zellen	29
3.1.3.3 Die humorale Immunantwort	33
3.1.3.4 B-Zelldefekte	35
3.2 Die Familie der Rho-Proteine	37
3.2.1 Funktionsweise und Regulation der Rho-GTPasen	39
3.2.2 Effektorproteine	41
3.2.3 Die biologische Aktivität der Rho-GTPasen	42
3.2.3.1 Zellmorphologie und Adhäsion	42
3.2.3.2 Zellbewegung	44
3.2.3.3 Endozytose und Sekretion	44
3.2.3.4 Proliferation und Proteinexpression	46
3.2.3.5 Besondere Aspekte der Funktion der Rac-GTPasen in Zellen des Immunsystems	46
3.3 Zielsetzung der Arbeit	48
4 MATERIAL UND METHODEN	51
4.1 Material	51
4.1.1 Chemikalien	51
4.1.2 Geräte	51
4.1.3 Verbrauchsmaterialien	51
4.1.4 Proteine und Oligonukleotide	52
4.1.5 Antikörper	52
4.1.6 Versuchstiere	54
4.1.7 Pufferlösungen und Medien	55
4.2 Methoden	59

4.2.1 Molekularbiologische Methoden	59
4.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien	59
4.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	60
4.2.1.3 DNA Agarose-Gelelektrophorese	61
4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden	62
4.2.2.1 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut	62
4.2.2.2 Serumgewinnung aus peripherem Blut	63
4.2.2.3 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension	63
4.2.2.4 Herstellung einer Einzelzellsuspension mit Stromazellen	64
4.2.2.5 Erythrozytenlyse in der Milzzellsuspension	65
4.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl	65
4.2.2.7 Oberflächenfärbung von Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern	65
4.2.2.8 Intrazelluläre Färbung von Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern	66
4.2.2.9 Durchflußzytometrie (FACS Analyse)	66
4.2.2.10 Generierung von Knochenmarkschimären	67
4.2.2.11 Magnetische Zellseparation (MACS)	67
4.2.2.12 Nachweis von Apoptose und Nekrose	68
4.2.2.13 Adoptiver Transfer von CFSE markierten B-Zellen	69
4.2.2.14 Histologie	70
4.2.2.15 <i>In vitro</i> Proliferationsnachweis mittels [³ H] Thymidin-Einbau in die DNA	70
4.2.2.16 <i>In vivo</i> Proliferationsnachweis mittels BrdU-Einbau in die DNA	71
4.2.2.17 <i>In vitro</i> Migration entlang eines Chemokingradienten	72
4.2.2.18 Nachweis induzierter Aktin-Polymerisation	73
4.2.2.19 Nukleare Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB	74
4.2.2.20 Immunisierung mit Hühner-Ovalbumin (OVA) im kompletten Freund'schen Adjuvans	76
4.2.2.21 Intraperitoneale Immunisierung mit TNP-Ficoll und TNP-KLH	76
4.2.2.22 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)	76
4.2.3 Biochemische Methoden	78
4.2.3.1 Herstellung von Zellysaten	78
4.2.3.2 SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)	78
4.2.3.3 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran, Western-Blot	79
4.2.3.4 Proteindetektion auf der Nitrozellulosemembran	79
4.3 Statistik	80
5 ERGEBNISE	82
5.1 Expression des Transgens Myc/Rac1-N17	82
5.1.1 Western-Analyse	82
5.1.2 Durchflußzytometrische Analysen	83
5.2 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Entwicklung der B-Lymphozyten	90

5.2.1 Größen der B Lymphozyten-Populationen in lymphatischen Organen und peripherem Blut	90
5.2.2 Einfluß der Rac1-N17 exprimierenden, nicht-hämatopoietischen Zellen auf die B-Zellentwicklung	93
5.2.3 Zelltod	95
5.2.4 <i>In vitro</i> Proliferation von B-Lymphozyten	97
5.2.5 <i>In vivo</i> Proliferation von B-Lymphozyten	98
5.2.6 Histologische Untersuchungen der Struktur lymphatischer Organe	100
5.3 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Funktion der B-Lymphozyten	101
5.3.1 Antikörper im Normalserum	101
5.3.2 Humorale Immunantwort	102
5.3.2.1 Thymus-unabhängige Immunantwort vom Typ 2	103
5.3.2.2 Thymus-abhängige Immunantwort	104
5.3.3 <i>In vivo</i> Migrationsverhalten	106
5.3.4 Induktion einer Lymphozytopenie im peripheren Blut	109
5.3.5 Migrationsverhalten von B-Lymphozyten entlang eines Chemokingradienten <i>in vitro</i>	113
5.3.6 Aktinpolymerisation	114
5.3.7 Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern	115
6 DISKUSSION	118
6.1 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Entwicklung der B-Lymphozyten	118
6.2 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Funktion der B-Lymphozyten	123
6.2.1 Antikörperproduktion	123
6.2.2 Zellbewegung	125
6.2.3 Aktin-Polymerisation und Genregulation	127
6.2.4 Transkriptionskontrolle	128
7 AUSBLICK	131
8 LITERATURVERZEICHNIS	134
9 LEBENS LAUF	164
10 DANKSAGUNG	167

1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Einheiten wurden mit dem international gebräuchlichen SI-System abgekürzt. Für Aminosäuren und Nukleotide wurde der Einbuchstabenkode verwendet. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter wurde gemäß Duden verfahren.

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) oder Allophycocyanin
BCR	B-Zellrezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BIO	Biotin
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridin
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
Cdc42	GTPase (<i>cell division cycle 42</i>)
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans (<i>complete freund's adjuvant</i>)
CLP	gemeinsamer Lymphozyten-Vorläufer (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	gemeinsamer myeloider Vorläufer (<i>common myeloid progenitor</i>)
cpm	gezählte Ereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CRIB	Cdc42/Rac bindende Domäne (Cdc42/Rac interactive binding domain)
Cy-5	Cyanin-5
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ds	doppelsträngig
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
ELP	frühester lymphoider Vorläufer (<i>earliest lymphoid progenitor</i>)

ETP	frühester T-Zell-Vorläufer (<i>earliest T cell progenitor</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FBS	Fötale Kälberserum (<i>foetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTPase	Guanosin 5'-triphosphat spaltendes Enzym
h	Stunde (<i>hour</i>)
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
hi	hoch (<i>high</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horsreddish-peroxidase</i>)
HSC	Hämatopoietische Stammzelle (<i>haematopoietic stem cell</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p., i.v., i.z.	intrapertoneal, intravenös, intrazellulär
INF	Interferon
int	intermediär
kb	Kilobase
KLH	Hämocyanin der Schlüssellochschnecke <i>Megathura crenulata</i> (<i>keyhole limpet hemocyanin</i>)
LCA	<i>leukocyte common antigen</i> (CD45.1)
lo	niedrig (<i>low</i>)
LPS	<i>Escherichia coli</i> -Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minuten
MPP	multipotente Vorläuferzelle (<i>multipotent progenitor</i>)
Myc	Myc-Marker (humanes c-myc, Aminosäuren: 409-419)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF-κB	<i>nuclear factor of κB</i>
OD	Optische Dichte
OVA	Hühner-Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

pAPC	professionelle antigenpräsentierende Zelle (<i>professional antigen presenting cell</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a Protein
PJ	Propidiumjodid
Poly I:C	Polyinosin-Polycytidyl-Säure
Rac	GTPase (<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>)
Ras	GTPase (<i>rat sarcoma virus</i>)
Rho	GTPase (<i>ras homolog</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sek	Sekunden
s.k.	subkutan
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
tg ^{hi}	Myc/Rac1-N17 hochexprimierende Mäuse
tg ^{lo}	Myc/Rac1-N17 niedrigexprimierende Mäuse
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNP	2,4,6-Trinitrophenol
v/v	Volumen pro Volumen
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrom
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
wt	Wildtyp (C57BL/6, oder PCR-negative Vertreter beider transgenen Zuchtlinien)
×	mal

2 ZUSAMMENFASSUNG

Kleine GTPasen regulieren in allen eukaryotischen Zellen ein breites Spektrum zellulärer Prozesse. Diese reichen von der Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Zellbewegung bis hin zur Gentranskription.

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnten neben vielfältigen Steuerungsmechanismen und den dabei beteiligten Molekülen auch spezifische Zielmoleküle und Funktionsweisen für einzelne GTPasen in diversen Organismen und verschiedenen Zelltypen detailliert beschrieben werden.

Rac1 stellt eines der am besten untersuchten Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen dar. In Säugern ist es bereits während der Embryonalentwicklung unerlässlich. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaft ist es nicht möglich, entsprechende Rac1 defiziente Versuchstiere zu generieren, um die Funktion dieser GTPase *in vivo* studieren zu können. Ein anderer *in vivo* Ansatz stützt sich auf die besondere Eigenschaft der dominant-negativen Rac1-N17-Mutante. Diese bindet mit hoher Affinität die für ihre Funktion notwendigen Kofaktoren (GEF), ohne dabei selbst aktiviert zu werden. Wird Rac1-N17 transgen exprimiert, so unterdrückt es durch den verursachten Mangel an GEF die Funktion des Rac1 in der Zelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein transgener Mausstamm verwendet, der Rac1-N17 unter der Kontrolle des humanen CD19-Promotors exprimiert. Damit war es erstmals möglich, die Rolle von Rac1 für die B-Zellentwicklung und Funktion *in vivo* detailliert zu untersuchen.

Nachdem zuerst die Expression des transgenen Konstrukts untersucht wurde, befaßten sich die Analysen im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit mit der Rolle von Rac1 für die B-Zellentwicklung. Es konnte gezeigt werden, daß Rac1 insbesondere für reife B-Zellen von großer Bedeutung ist. Deren Populationsgrößen waren in CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen verringert. Obwohl die durch verschiedene Stimuli induzierte *in vitro* Proliferation von B-Zellen CD19/Rac1-N17 transgener Mäuse durchweg vermindert war, lieferten weder die Ergebnisse der *in vivo* Proliferationsversuche noch die jeweils dem nichttransgenen Wildtyp entsprechende Apoptose und Nekrose eine Erklärung hierfür. Ebenso hatten die verminderten B-Zellzahlen keine feststellbaren Auswirkungen auf die Struktur lymphatischer Organe wie Milz und Lymphknoten.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluß von Rac1 auf verschiedene Aspekte der B-Zellfunktion detailliert analysiert. Zunächst konnte festgestellt werden, daß Rac1 keinen erkennbaren Einfluß auf Antikörpertiter im Serum, sowohl in nicht-immunisierten Mäusen,

als auch im Verlauf von Thymus-unabhängigen und Thymus-abhängigen humoralen Immunantworten hat. Als weitere wichtige funktionelle Eigenschaft wurde die Migrationsfähigkeit von B-Zellen ausführlich untersucht. Rac1-N17 transgene B-Zellen zeigten sowohl in verschiedenen Chemokingradienten *in vitro*, als auch nach Zelltransfer *in vivo* ein vermindertes Migrationsvermögen. Entsprechend war auch der Umfang einer induzierten Lymphozytopenie im peripheren Blut weitaus geringer als beim nichttransgenen Wildtyp. In weiteren Untersuchungen wurden neben der verminderten Fähigkeit Rac1-N17 transgener B-Zellen, filamentöses Aktin zu bilden, auch die Einschränkung der Aktivierbarkeit von Transkriptionsfaktoren am Beispiel von NF- κ B dokumentiert.

Damit liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal detaillierte Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle der Rac1-GTPase für die Entwicklung und Funktion der B-Lymphozyten *in vivo*.



3 EINLEITUNG

3.1 Das Immunsystem

Bei den Säugetieren ist das Immunsystem eine komplexe Funktionseinheit aus zellulären und molekularen Bestandteilen, deren Aufgabe es ist, den Körper unter anderem vor Parasiten, Infektionen, pathogenen Substanzen und entarteten, körpereigenen Zellen zu schützen. Die Immunantwort beinhaltet zwei grundsätzliche Ereignisbereiche: das Erkennen und die Bindung von Strukturen, (Antigenen, Ag¹), die eine Reaktion erfordern und zweitens die Reaktion selbst. Um eine geordnete Effektorfunktion zu gewährleisten, müssen potenziell gefährliche Ag von körpereigenen Strukturen eindeutig unterscheidbar sein. Normalerweise führt das Erkennen von Fremd-Ag zur Immunität, während körpereigene Ag immunologische Toleranz hervorrufen. Die grundsätzliche Bedeutung dieser Unterscheidungsfähigkeit wird am deutlichsten beim Auftreten von Fehlfunktionen der beiden Wirkungsweisen. Pathogene, die nicht erkannt werden, beziehungsweise keine adäquate Immunantwort hervorrufen, können im Körper persistieren oder sich ausbreiten, vitale Funktionen stören und somit fatale Folgen haben. Umgekehrt können jedoch auch körpereigene Strukturen vom Immunsystem fälschlicherweise erkannt und angegriffen werden. Dies führt zu Autoimmunerkrankungen. Eine weitere bedeutende Art von Fehlfunktionen des Immunsystems stellen Allergien dar. Hier werden körperfremde Strukturen erkannt, die eigentlich harmlos sind. Die stattfindende Immunantwort ist hier unnötig und für den Organismus vielfach schädlich.

Das Immunsystem läßt sich gleichzeitig sowohl phylogenetisch, ontogenetisch, als auch funktionell grob in zwei Bereiche einteilen: das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem ist in vielen seiner Bestandteile das phylogenetisch ältere. Selbst die einfachsten rezenten Wirbeltiere verfügen über Immunabwehrmechanismen, die zu dieser Kategorie gehören. Auch steht das angeborene Immunsystem jedem einzelnen Individuum sofort zur Verfügung; die Effektormechanismen müssen nicht erst erworben werden. Der unmittelbaren Wirkung gegenüber steht deren relative Unspezifität. Diese ist unter anderem im begrenzten Spektrum vorhandener Erkennungsmoleküle begründet.

¹ Als Antigen wird jede Struktur bezeichnet, die von Rezeptoren des Immunsystems erkannt werden kann und eine Immunantwort hervorrufen könnte.

Die erste Barriere gegen von außen eindringende Pathogene bilden die Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute. Neben physikalischen Faktoren, die der Anhaftung und dem Eindringen von Mikroorganismen entgegenwirken, bilden antimikrobielle Substanzen, welche die Epithelzellen bedecken, einen zusätzlichen chemischen Schutzwall. Weitere Reaktionsebenen des angeborenen Immunsystems umfassen diverse Plasmaproteine, besonders die Proteine des Komplementsystems und nicht zuletzt den zellulären Arm, bestehend aus phagozytotisch aktiven Zellen wie Neutrophile und Makrophagen sowie den natürlichen Killer-Zellen.

Das adaptive Immunsystem unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem durch mehrere Eigenschaften. Es verfügt vor allem über die Fähigkeit der Anpassung und Ausbildung einer hohen Affinität und Spezifität für ein Ag im Verlauf einer Immunantwort, die mit jedem weiteren Aufeinandertreffen mit demselben Ag noch weiter erhöht werden können. Zum anderen ist das adaptive Immunsystem durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses ausgezeichnet. Das heißt, bei einem späteren erneuten Zusammentreffen wird das Ag bereits spezifisch erkannt, die stattfindende Immunantwort kann schneller und effizienter verlaufen. Ein weiteres Charakteristikum, das die adaptive Immunreaktion auszeichnet, ist der zeitliche Verlauf. Da der Mechanismus im Falle eines neuen Ag durch dieses sowie weitere zusätzliche Signale erst induziert werden muß, stehen die Effektorfunktionen des adaptiven Immunsystems erst mit einigen Tagen Verzögerung zur Verfügung.

Die Wirkungsweisen des adaptiven Immunsystems lassen sich unterteilen in die humorale Immunität, die durch von B-Zellen sezernierte Antikörper (Ak) vermittelt wird und die zelluläre Immunität, die auf Effektorfunktionen von T-Zellen beruht.

3.1.1 Die Entwicklung der T-Zellen

Thymusabhängige Lymphozyten (T-Zellen) entwickeln sich aus Vorläuferzellen des Knochenmarks. Diese wandern in den Thymus, in dem sie weitere Entwicklungs- und Differenzierungsschritte durchlaufen. Neben spezifischen, zeitlich-räumlichen Verteilungsmustern verschiedener Entwicklungsstadien der Thymozyten auf definierte Kompartimente des Thymus, kann deren Reifung auch anhand der Oberflächenexpression sogenannter Korezeptormoleküle (CD4 und CD8) in mehrere Abschnitte unterteilt werden. Die Oberflächenexpression von CD4 und CD8 korreliert zeitlich mit Thymozyten-

spezifischen Genrearrangement-Ereignissen, deren Abschluß die Expression der T-Zell-Rezeptormoleküls (*T cell receptor*, TCR) bildet.

Im ersten Stadium werden die Thymozyten als doppelt-negativ bezeichnet. Sie exprimieren weder CD4 noch CD8. In diesem Stadium beginnen die Genrearrangements und die anschließende Expression der TCR- β -Kette. Nur wenn diese Ereignisse erfolgreich ablaufen, eine funktionelle β -Kette und damit ein Prä-TCR exprimiert werden, kann die Entwicklung der Thymozyten voranschreiten (von Boehmer, H. und Fehling, H. J. 1997). Der darauffolgende Entwicklungsschritt ist durch die Expression von sowohl CD4, als auch CD8 gekennzeichnet. Man spricht von doppelt-positiven Thymozyten. Hier erfolgen Genrearrangements der α -Kette des TCR. Sind diese erfolgreich, kann der vollständige TCR exprimiert werden. Die Aufgabe des TCR besteht darin, Peptide, die von Ag-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) im Kontext von Haupthistokompatibilitätsmolekülen (*major histocompatibility molecule*, MHC) präsentiert werden, spezifisch zu binden und dadurch eine Signalleitung zu ermöglichen. Im Prozeß der positiven Selektion wird die Bindungsfähigkeit des TCR getestet. Ist der TCR funktionell und damit der Thymozyt in der Lage ein Peptid-MHC-Komplex zu erkennen, kann die zweite Stufe des Selektionsprozesses beginnen. Durch die Prozesse der Genumlagerungen der α und β Kette, gekoppelt mit der kombinatorischen Vielfalt beider Ketten, können theoretisch bis zu 10^{15} - 10^{18} verschiedene Spezifitäten des TCR erzeugt werden (Nikolich-Zugich, J. *et al.* 2004). Dadurch wird gewährleistet, daß der T-Zellpool in der Peripherie in der Lage ist, ein sehr breites Spektrum von Ag wahrnehmen zu können. Die ungerichtete Rekombination läßt allerdings auch TCR entstehen, die in der Lage sind ein selbst-Ag zu erkennen. Diese Zellen könnten daher, körpereigene Zellen und Gewebe angreifen. Dieser grundsätzlichen Gefahr beugt ein Prozeß vor, der „negative Selektion“ genannt wird. Hierbei werden Autoantigen erkennende Thymozyten durch Induktion von Apoptose eliminiert (Sebzda, E. *et al.* 1999). Die den beiden Selektionsprozessen zugrunde liegenden Mechanismen sind bis heute nicht vollständig erforscht. Da sowohl die positive, als auch die negative Selektion prinzipiell mit Hilfe desselben Selbstantigen-MHC Verbundes erfolgen können, wird angenommen, daß der Unterschied in der Signalleitung bei den heranreifenden Thymozyten liegt. Auch konnten innerhalb der Entwicklungszeit keine unterschiedlichen Signalleitungskaskaden, beziehungsweise daran beteiligte Moleküle zwischen dem negativen und dem positiven Selektionsschritt gefunden werden. Das derzeit wahrscheinlichste Modell geht davon aus, daß die jeweilige Signalstärke eine entscheidende Rolle spielt. Wird das vom TCR des Thymozyten erkannte Ag in hoher

Konzentration präsentiert, beziehungsweise hat der TCR eine hohe Affinität, bekommt der Thymozyt ein starkes Signal und wird eliminiert (Ashton-Rickardt, P. G. *et al.* 1994; Sebzda, E. *et al.* 1994; Cook, J. R. *et al.* 1997; Fukui, Y. *et al.* 1997). Ist hingegen das Signal schwach, oder wird das Ag nur in niedrigen Konzentrationen präsentiert, wird der Thymozyt positiv selektioniert (Sprent, J. *et al.* 1988; Ashton-Rickardt, P. G. und Tonegawa, S. 1994; Williams, O. *et al.* 1997). Ein weiteres Indiz für dieses Modell ist die mit der fortschreitenden Entwicklung des Thymozyten einhergehende Zunahme der Expressionsstärke des TCR. Etwa 25% aller Prä-TCR exprimierenden Thymozyten, die sowohl positive, wie negative Selektion überstanden haben, entwickeln sich zu einfach-positiven, entweder CD4 oder CD8 exprimierenden Zellen. Dieser Entscheidungsprozeß wird durch die Spezifität des Thymozyten bestimmt. Thymozyten, die Peptide im Kontext des MHC I Moleküls erkennen, exprimieren CD8, während Thymozyten, die Peptide im Kontext von MHC II binden, CD4 auf ihrer Oberfläche tragen (Zinkernagel, R. M. und Doherty, P. C. 1974). Diese reifen Thymozyten können den Thymus verlassen und den naiven T-Zellpool in der Peripherie bilden.

3.1.2 Die zelluläre Immunantwort

Im Verlauf einer Immunantwort werden in besonderen Regionen peripherer lymphatischer Organe den T-Zellen Fremdartigene im Kontext der entsprechenden MHC Moleküle präsentiert. Bei dem Ag handelt es sich um durch Proteolyse erzeugte Peptidfragmente. Über MHC I werden hauptsächlich intrazelluläre Ag präsentiert, während MHC II extrazelluläre Ag binden. Hierbei spielen sogenannte professionelle Ag-präsentierende Zellen (*professional antigen presenting cells*, pAPC) eine wichtige Rolle. Zu dieser Gruppe zählen Makrophagen, B-Zellen sowie dendritische Zellen. Makrophagen gelangen im Entwicklungsstadium der Monozyten über den Blutstrom in nahezu jedes Organ des Körpers. Makrophagen sind in der Lage, infektiöse Partikel zu phagozytieren und zu vernichten. Desweiteren exprimieren sie, wie andere pAPC auch MHC II und können damit im Unterschied zu anderen Körperzellen auch Ag extrazellulären Ursprungs präsentieren (Steinman, R. M. und Cohn, Z. A. 1973; Debrick, J. E. *et al.* 1991; Kovacsovics-Bankowski, M. *et al.* 1993). Eine weitere wichtige Funktion der Makrophagen ist die Zytokinproduktion, die sowohl der Regulation anderer Zellen des Immunsystems dient, als auch die Immunantwort durch lokale aber auch generelle Beeinflussung der Gewebe

beziehungseweise Organe moduliert. Mit ihren breitgefächerten Funktionsspektren sind Makrophagen ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und gleichzeitig ein potentes und vielseitiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem. B-Zellen können ebenfalls extrazelluläres Ag internalisieren und präsentieren (Ke, Y. und Kapp, J. A. 1996). Die Aufnahme erfolgt primär durch spezifische B-Zellrezeptor (*B cell receptor*, BCR) vermittelte Endozytose. B-Zellen sind ebenfalls in der Lage, andere Lymphozyten zu aktivieren. Ihre Hauptfunktion liegt jedoch in der Antikörperproduktion. Die Entwicklung und die Funktion der B-Zellen werden in einem späteren Abschnitt detailliert betrachtet. Eine weitere Art der pAPC stellen dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) dar. Dabei handelt es sich um eine heterogene Population, die jedoch über eine Palette gemeinsamer Funktionen verfügt. Ähnlich wie Makrophagen findet man DC in fast allen Geweben, mit einer Häufigkeit von etwa 1-2% aller Zellen (Banchereau, J. und Steinman, R. M. 1998). In diesem unreifen Stadium internalisieren sie sehr effizient extrazelluläres Ag. Haben die DC in der Peripherie pathogenes Ag aufgenommen, durchlaufen sie einen Entwicklungs- und Differenzierungsprozess mit grundlegenden morphologischen und funktionellen Veränderungen (Mellman, I. und Steinman, R. M. 2001; They, C. und Amigorena, S. 2001). Die Internalisierung von extrazellulärem Material nimmt ab, die DC wandern von den Orten der Antigenaufnahme in sekundäre lymphatische Organe, exprimieren verstärkt MHC I und MHC II sowie kostimulatorische Moleküle. Auch die Zelloberflächenstruktur wird differenzierter. Es bilden sich die typischen Fortsätze (Dendriten). Damit sind reife DC besonders gut befähigt, mit T-Zellen in Kontakt zu treten und diese gegebenenfalls antigenspezifisch zu aktivieren (Hartgers, F. C. *et al.* 2000).

Mit ihren Eigenschaften können pAPC Ag sowohl extrazellulären, als auch intrazellulären Ursprungs effizient prozessieren und präsentieren. Daneben können sie T-Zellen zusätzliche Signale, die sogenannten Kostimulationssignale, übermitteln, die zur Differenzierung und Aktivierung naiver T-Zellen und deren Effektorfunktionen führen (Schmidt, C. S. und Mescher, M. F. 1999; Hernandez, J. *et al.* 2002).

CD8 exprimierende T-Zellen sind nach ihrer Aktivierung in der Lage, in der Peripherie infizierte Körperzellen anhand der MHC I-Fremdantigenexpression mit Hilfe der TCR Bindung zu erkennen und deren Zerstörung einzuleiten. Die Effektorfunktion richtet sich damit vor allem gegen intrazellulär mit Viren oder anderen Pathogenen infizierte aber auch entartete Körperzellen. Bei der antigenspezifischen MHC II restringierten Aktivierung von CD4 exprimierenden T-Zellen wird deren Funktion und Phänotyp zusätzlich durch das herrschende Zytokinmilieu beeinflusst (Sallusto, F. *et al.* 1998). So entstehen in Gegenwart

von IL-12 und INF- γ vorzugsweise sogenannte Th1, wohingegen die Anwesenheit von IL-4 zur Ausbildung des Th2-Phänotyps führt. Der Phänotyp der CD4 Zellen hat einen entscheidenden Einfluß auf den Verlauf der adaptiven Immunantwort. Während Th1 Zellen hauptsächlich Makrophagen aktivieren, sind vor allem Th2 Zellen in der Lage, B-Zellen Signale zu übermitteln, die neben der Ag-Erkennung für die vollständige Aktivierung notwendig sind. Da in dieser Arbeit die B-Zellen betrachtet werden, soll auf deren Entwicklung und Rolle im Immunsystem im Folgenden näher eingegangen werden.

3.1.3 Die Entwicklung und Funktion der B-Zellen

In Analogie zu T-Zellen entwickeln sich B-Zellen aus hämatopoietischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Der B-Zellrezeptor (*B cell receptor*, BCR) wird aus je zwei identischen Polypeptidketten zusammengesetzt, deren Sequenz durch Genumlagerungsvorgänge erzeugt wurde (Tonegawa, S. 1983). Im Knochenmark durchlaufen sie Selektionsprozesse, die sowohl die Funktionalität als auch die Selbst-Toleranz gewährleisten. B-Zellen verlassen dann das Knochenmark und wandern in periphere lymphatische Organe. Begegnen sie Ag, das durch ihren BCR erkannt wird, können sie aktiviert werden und anschließend Ak, die sezernierte Form des BCR mit identischer Spezifität, in großen Mengen produzieren. Auch sind B-Zellen in der Lage, sich zu langlebigen Gedächtniszellen zu entwickeln, die im Falle eines erneuten Auftretens des gleichen Ag sofort massiv spezifische Ak sezernieren können.

3.1.3.1 Der B-Zellrezeptor

Die Vielfalt der potenziellen Ag und die daraus resultierende mögliche Anzahl an verschiedenen Epitopen erfordern ein entsprechendes Spektrum an Bindungsspezifitäten seitens der B-Zellrezeptoren beziehungsweise der Ak. Daneben muß der BCR in der Lage sein, bei Antigenerkennung und Bindung der Zelle entsprechende Signale zu liefern. In seiner sezernierten Form, als Ak, müssen dieselben Moleküle andere Effektorfunktionen übernehmen. Die Erfüllung dieses Aufgabenkomplexes wird durch die besondere Art der Kodierung auf DNA-Ebene und die Struktur des exprimierten Proteins ermöglicht.

Der BCR gehört zur Proteinfamilie der Immunglobuline. In seiner Membran-gebundenen Form besteht er aus je zwei identischen sogenannten schweren und leichten Ketten. Die schwere Kette (IgH) besteht in der Regel aus vier Immunglobulindomänen, die leichte (IgL) aus zwei. IgH wird in zwei *splice*-Varianten synthetisiert: die Expression der längeren Variante führt zu membranständigen BCR, die der kürzeren hingegen zu sezernierten Ak. IgL ist über Disulfidbrücken an IgH gebunden. Auch die IgH-Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Durch diese Bindungen entsteht ein Molekül, das über zwei identische Antigenbindungsstellen verfügt (siehe Abb. 3.1).

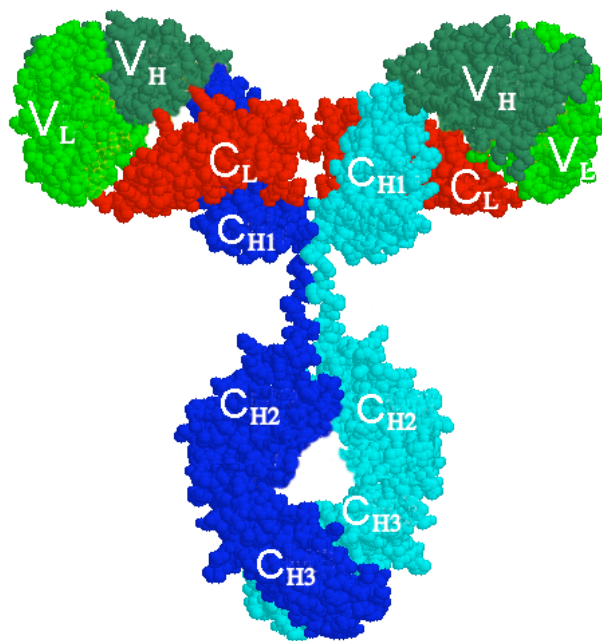


Abb. 3.1: 3D Darstellung der Struktur eines Antikörpers (IgG). Hell- und dunkelgrün: die variablen (V), rot, blau und türkis: die konstanten (C) Regionen, der jeweiligen leichten (L) und schweren (H) Ketten. (Quelle: <http://imgt.cines.fr>, verändert).

In seiner Struktur kann der BCR in zwei funktionelle Bereiche unterteilt werden: den C-terminalen konstanten und den N-terminalen variablen Anteil. Für die Vielfalt der Antigenbindungsspezifitäten sind die variablen Bereiche von IgH (V_H) und IgL (V_L) verantwortlich. Dagegen ist die Effektorfunktion der sezernierten Ak durch den konstanten C-terminalen Bereich der IgH-Kette definiert, der in fünf unterschiedlichen Hauptvarianten, Isotypen, vorkommt: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. So werden beispielsweise Fc-Teile von IgG1 und IgG3 durch Fc-Rezeptoren unterschiedlicher Affinität und Isotyp-Spezifität erkannt, die auf Makrophagen und Neutrophilen exprimiert sind. So können diese phagozytierenden Zellen das an die Ak gebundene Ag internalisieren (Daeron, M. 1997). Die Fc-Teile von IgM und IgG können durch Proteine des Komplementsystems gebunden

werden. Durch die Bindung wird die Komplement-Kaskade aktiviert, welche durch Lyse und Aktivierung weiterer Effektorzellen potenzielle Pathogene zu beseitigen hilft (Cooper, N. R. 1985). Eine dritte Funktion des Fc-Teils ist bei Ak des IgA-Isotyps prominent. Hier dient der Fc-Teil dem Rezeptor-vermittelten Transport der IgA-Dimere durch Zellen hindurch in ansonsten unerreichbare Bereiche, wie mucosale Fluide oder Tränenflüssigkeit (Mostov, K. E. *et al.* 1984).

Eine funktionelle Besonderheit des BCR beziehungsweise Ak liegt in seiner Fähigkeit, ein nahezu unbegrenztes Spektrum an Spezifitäten bilden und damit potenzielle Ag verschiedenster Herkunft erkennen zu können. Die Ausbildung dieser Vielfalt liegt in vier verschiedenen Prozessen begründet. Die für die V-Regionen kodierenden DNA-Bereiche bestehen bei IgH aus V-, D- und J-Segmenten, bei IgL aus V- und J-Segmenten. Jede dieser Sequenzen kommt in vielen Kopien vor. Diese unterscheiden sich voneinander und kodieren damit für unterschiedliche Aminosäuresequenzen. Im Prozeß der sogenannten somatischen Rekombination werden im Fall der schweren Kette die drei verschiedenen, beziehungsweise im Fall der leichten Kette die zwei verschiedenen Segmente aus dem jeweiligen Pool zufällig ausgewählt und miteinander verbunden. Damit entstehen die für den variablen Bereich der IgH beziehungsweise IgL Kette kodierenden Sequenzen, während die dazwischen liegenden DNA-Bereiche verloren gehen. Dieser erste Mechanismus erzeugt die sogenannte Rekombinationsvielfalt.

Da es während der einzelnen Schritte des Rekombinationsprozesses zu Doppelstrangbrüchen der DNA kommt, kann ein zweiter Mechanismus zur Rezeptorvariabilität beitragen. Dabei werden an den Bruchstellen Nukleotide abgespalten, was zur Bildung von Palindromen führen kann. Diese können dann eventuell an einer anderen als der ursprüngliche Stelle geöffnet werden, was zum Transfer von Basen von einem zum anderen DNA-Strang führt. Dies hat wiederum eine Veränderung der resultierenden kodierenden Sequenz zur Folge. An die hierdurch entstandenen Einzelstrangüberhänge können weitere Basen matrixlos angehängt werden. Letztlich werden beide DNA-Enden miteinander verbunden und die Einzelstrangbereiche aufgefüllt. Bedingt durch die Zufälligkeit dieser Prozesse führt nur etwa 1/3 aller Rekombinationen zu einem im Leseraster liegenden Ergebnis. Daneben können auch zufällig Stop-Codons generiert werden, was ebenfalls zu einem unproduktiven Ergebnis und damit zum induzierten Zelltod führt.

Der dritte Rezeptorspezifitätenvielfalt-erzeugende Mechanismus beruht auf dem Vorhandensein zweier IgL Loci im Genom: λ und κ . Jede schwere Kette ist prinzipiell frei

mit entweder einer IgL_λ oder IgL_κ Kette kombinierbar. In der Kombination können die drei Prozesse insgesamt 10^{11} verschiedene BCR-Spezifitäten erzeugen, Tab. 3.1.

	B-Zellrezeptor			T-Zellrezeptor ($\alpha:\beta$)	
	IgH	IgL $_\kappa$	IgL $_\lambda$	α	β
V-Segmente	250 - 1000	250	200	100	25
D-Segmente	13	0	0	0	2
J-Segmente	6	5	4	50	12
D in allen Rastern lesbar	selten	nein	nein	nein	oft
N und P-Nukleotide	V-D, D-J	V-J	V-J	V-J	V-D, D-J
mögliche Kombinationen	$\sim 10^{11}$			$\sim 10^{15}$	

Tab. 3.1: Die Entstehung der Sequenzdiversitäten des B-Zellrezeptors und des ($\alpha:\beta$) T-Zellrezeptors bei der Maus.

Während die bisher beschriebenen Prozesse im Laufe der B-Zellentwicklung im Knochenmark stattfinden, erfolgt ein letzter außerhalb des Knochenmarks, in peripheren lymphatischen Organen im Verlauf einer Immunantwort und wird dort beschrieben.

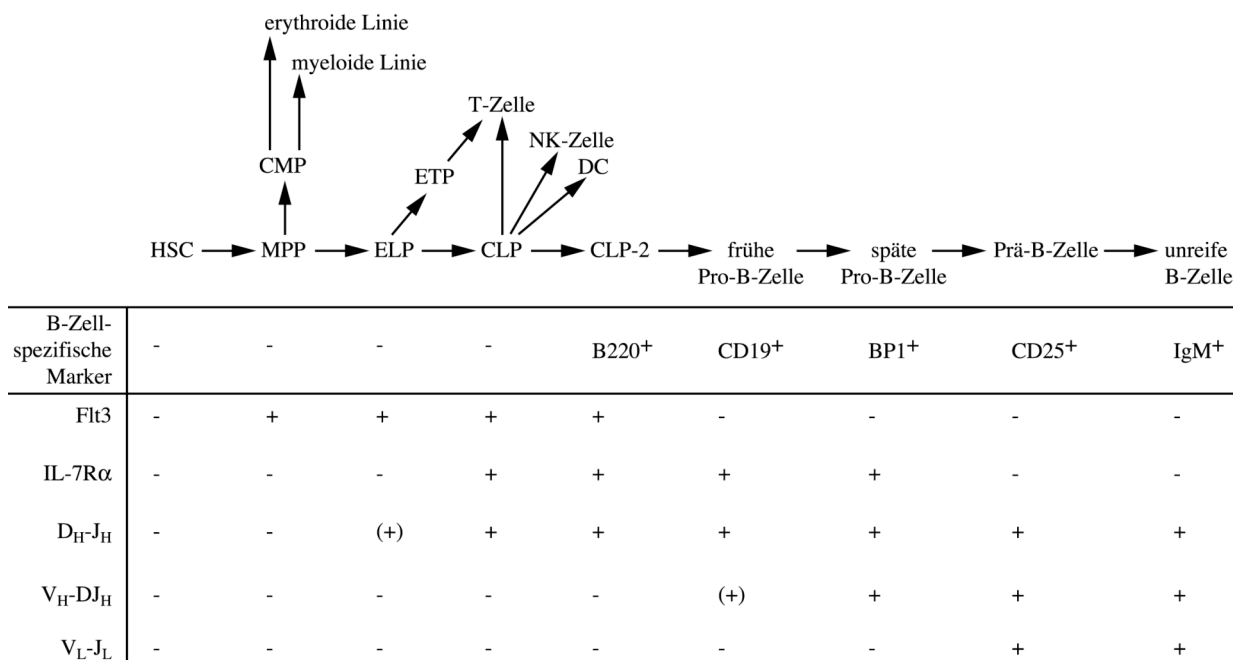
Eine B-Zelle muß in der Lage sein die Antigenerkennung und Bindung durch den BCR über eine Signalleitung wahrzunehmen. Der zytoplasmatische Anteil der schweren Kette des BCR besteht aus nur wenigen Aminosäuren und ist nicht in der Lage intrazelluläre Signalleitung zu vermitteln. Für die Signalleitung sind die mit dem BCR assoziierten, sogenannten invarianten Ketten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ verantwortlich (Reichlin, A. *et al.* 2001; Kraus, M. *et al.* 2004). Diese gehören strukturell ebenfalls zur Proteinfamilie der Immunglobuline. Ihre zytoplasmatischen Anteile beinhalten jedoch Sequenzen, die sogenannten Immunrezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungs-Motive (*immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*, ITAM), die phosphoryliert werden können und durch Rekrutierung anderer intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle, wie zum Beispiel Kinasen, die Signalleitung ermöglichen (Cambier, J. C. und Campbell, K. S. 1990; Turner, M. 2002; Wang, L. D. und Clark, M. R. 2003). Ein weiteres Oberflächenmolekül, das an der BCR-Signalleitung mitwirkt, ist B220/CD45. Diese Phosphatase kann Signaltransduktionsmoleküle durch Dephosphorylierung aktivieren. Neben dem eigentlichen BCR spielt ein weiterer Rezeptorkomplex auf der Oberfläche der B-Zellen eine wichtige Rolle. Der B-Zell-Korezeptor wird auf der Oberfläche reifer B-Zellen

exprimiert. Dieser Komplex besteht aus CD19, CD21 und CD81. Bei CD21 handelt es sich um einen Rezeptor für ein Protein des Komplementsystems, das in physiologisch wirksamen Konzentrationen nur in Ag-gebundener Form im Blut vorkommt. Über dieses sogenannte C3d-Fragment kann der B-Zell-Korezeptorkomplex Ag binden. Geschieht dies gleichzeitig mit Ag-Bindung an den BCR kann das intrazelluläre Signal 1000 – 10000-fach verstärkt werden (Yankee, T. M. und Clark, E. A. 2000; Tsubata, T. und Wienands, J. 2001).

3.1.3.2 Die Entwicklung der B-Zellen

B-Zellen kommen in kieferlosen Wirbeltieren nicht vor. Erst ab der Entwicklungsstufe der Kiefermäuler können B-Zellen entstehen. In der Ontogenese entwickeln sich die frühesten B-Zellen in der Leber des Fötus. Im adulten Organismus ist das Knochenmark der Bildungsort von B-Zellen (Ghia, P. *et al.* 1998). Die Entwicklung geht von sich selbst erneuernden pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen (*haematopoietic stem cell*, HSC) aus, umfasst mehrere Stufen, die jeweils durch spezifische Muster in Expression von Oberflächenmarkern voneinander phänotypisch abgegrenzt werden können (Orkin, S. H. und Zon, L. I. 2002).

Auch wenn unter artifiziellen *in vitro* Bedingungen B-Zellentwicklung ohne Stroma möglich ist (Brasel, K. *et al.* 1996; Ray, R. J. *et al.* 1998), so verläuft sie *in vivo* Stroma-abhängig (Dorshkind, K. 1990; Orkin, S. H. 1995). Neben notwendigen spezifischen Adhäsionskontakten zwischen B-Zellen und den Stromazellen, produziert das Stroma für die Entwicklung und Reifung notwendige Faktoren. Dazu zählen unter anderem Wachstumsfaktoren, Interleukine (IL), vor allem IL-7 und IL-11, Chemokine wie SDF-1 α (Marshall, A. J. *et al.* 1998) sowie Stammzellen-Faktor (*stem cell factor*, SCF) und Flt3L (Ray, R. J. *et al.* 1996; McKenna, H. J. *et al.* 2000).



Tab. 3.2: Charakteristische Merkmale der B-Zellentwicklung im Knochenmark. HSC: hämatopoietische Stammzelle (*haematopoietic stem cell*), MPP: multipotente Vorläuferzelle (*multipotent progenitor*), CMP: gemeinsamer myeloider Vorläufer (*common myeloid progenitor*), ELP: frühester lymphoider Vorläufer (*earliest lymphoid progenitor*), ETP: frühester T-Zell-Vorläufer (*earliest T cell progenitor*), CLP: gemeinsamer Lymphozyten-Vorläufer (*common lymphoid progenitor*). (Quelle: (Buslinger, M. 2004), verändert).

Aus frühen B-Zell-Vorstufen können neben B-Zellen auch andere Zelltypen entstehen (Wu, L. *et al.* 1991; Montecino-Rodriguez, E. *et al.* 1996; Mori, S. *et al.* 1997). Diese Pluripotenz geht mit fortschreitender Entwicklung immer mehr verloren (Akashi, K. *et al.* 2000) und ab dem späten CLP-Stadium können sich aus den Vorläufern nur noch B-Zellen entwickeln. Ebenso nimmt die Fähigkeit zu Selbsterneuerung stetig ab (Hardy, R. R. 2003). Die B-Zellentwicklung im Knochenmark geht einher mit Genumlagerungsprozessen, die zur Expression des BCR führen (Bassing, C. H. *et al.* 2002). Der Prozeß der somatischen Rekombination beginnt mit der D_H zu J_H Umlagerung bereits im ELP Stadium. So werden zum Beispiel auch T-Zellen mit derartigen Genumlagerungen gefunden (Nutt, S. L. *et al.* 1999; Rolink, A. G. *et al.* 1999; Romanow, W. J. *et al.* 2000). Charakteristisch ist dieser Prozeß jedoch für die frühen pro B-Zellen. Gefolgt wird diese Umlagerung durch Verknüpfung von V_H mit DJ_H im späten pro B-Zellstadium. Erst im Falle einer produktiven Umlagerung, die zu Expression einer schweren Kette führt, kann der sogenannte Prä-BCR bestehend aus zwei identischen schweren Ketten, im Komplex mit zwei sogenannten Ersatz-L-Ketten (*surrogate light chain, SLC*) sowie I γ α und I γ β exprimiert werden (Sanchez, M. *et al.* 1993). Mit der Oberflächenexpression des Prä-BCR erhält die sich entwickelnde B-Zelle Signale (Meffre, E. *et al.* 2000; Niino, H. und Clark, E. A. 2002) die

Umlagerungen im V-Segment der schweren Kette zu beenden und zu proliferieren (Nussenzweig, M. C. *et al.* 1987; Decker, D. J. *et al.* 1991; Cancro, M. P. und Kearney, J. F. 2004). Nach der Expression des Prä-BCR und Proliferation fährt die Prä-B-Zelle mit Umlagerungen im V-Segment der leichten Kette fort. Sind diese ebenfalls erfolgreich, kann nun der vollständige BCR exprimiert werden. Gleichzeitig verläßt die unreife B-Zelle das Knochenmark.

Der Isotyp des exprimierten BCR ist dabei zum Großteil IgM, jedoch exprimieren unreife B-Zellen ebenfalls IgD. Dieser Zustand wird durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts erreicht, welches sowohl die Sequenz für die konstante Region des IgM als auch des IgD-Isotyps enthält (Liu, C. P. *et al.* 1980).

Ein wichtiges Kriterium für die Funktionalität des BCR ist neben seiner Expression auch die Spezifität (Cancro, M. P. und Kearney, J. F. 2004). Etwa 40-60% aller unreifen B-Zellen tragen einen potenziell autoreaktiven BCR und können noch im Knochenmark eliminiert werden (Spanopoulou, E. *et al.* 1994; Andersson, J. *et al.* 1995; Xu, H. *et al.* 1998). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit zur erneuten Aktivierung des Rekombinationskomplexes und der Ausbildung einer neuen Spezifität (Braun, U. *et al.* 2000). Etwa 25% aller peripheren B-Zellen vollführen sekundäre Rearrangements der leichten Kette (Casellas, R. *et al.* 2001; Edry, E. und Melamed, D. 2004). Dennoch werden auch in der Milz autoreaktive B-Zellen gefunden. Diese unreifen B-Zellen sind jedoch empfindlich für BCR-induzierte Apoptose und können somit im Fall einer starken Antigenbindung beseitigt werden (Rolink, A. *et al.* 1987).

Auf diesem Wege entstehen in einer sechs bis acht Wochen alten Maus etwa 2×10^7 unreife B-Zellen pro Tag (Osmond, D. G. 1993). Die Lebensspanne dieser unreifen B-Zellen in der Milz beträgt etwa 2-4 Tage (Forster, I. und Rajewsky, K. 1990; Chung, J. B. *et al.* 2003). Nur etwa 5-10% der unreifen B-Zellen wird den langlebigen Pool reifer B-Zellen erreichen (Allman, D. M. *et al.* 1993; Rolink, A. G. *et al.* 1998). Der Weg der Reifung wird von einer erhöhten Expression von antiapoptotischen Molekülen, wie Bcl-2, Bcl-xl begleitet (Woodland, R. T. *et al.* 1996; Grossmann, M. *et al.* 2000; Brunner, C. *et al.* 2003). Daneben ist die Expression von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B wichtig (Shachar, I. und Flavell, R. A. 1996; Matza, D. *et al.* 2003). Auch exogene Faktoren sind für die späte B-Zellreifung von Bedeutung. Ein wichtiges Beispiel ist BAFF (*B cell activator belonging to the TNF family*), ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktoren-Familie, das für das Überleben von B-Zellen mitverantwortlich ist. Während transgene Überexpression von BAFF zu B-Zell-Hyperplasie führt, bewirkt eine BAFF- oder BAFF-Rezeptor-Deletion B-Zell-

Hypoplasie (Mackay, F. *et al.* 1999; Khare, S. D. *et al.* 2000; Schiemann, B. *et al.* 2001). In lymphatische Organe gelangen B-Zellen über den Blutstrom. Als Signale auf diesem Weg dienen in erster Linie Adhäsionsmoleküle, die den im Blutstrom fließenden Zellen ermöglichen, das Endothel der Gefäßwand zu erkennen und daran anzudocken. Die hierbei beteiligten Moleküle gehören verschiedenen Proteinfamilien an. Zu den drei wichtigsten zählen die Selektine, die über ihre Lectin-artigen Domänen spezifisch bestimmte Kohlenhydrat-Motive binden können. Die Integrine, die zur Familie der Immunglobuline gehören, sind dimere Proteine, mit deren Hilfe Leukozyten an auf Endothel exprimierte Adhäsionsmoleküle binden können. Die wichtigsten Vertreter hierbei sind die intrazellulären Adhäsionsmoleküle (*intracellular adhesion molecule*, ICAM, Butcher, E. C. 1991; Butcher, E. C. *et al.* 1999). Eine weitere Art von Signalen, die wichtig für eine gerichtete Migration sind, bilden die sogenannten Chemoattraktanten. Die bekanntesten Vertreter gehören zur Familie der Interleukine. Für die Migration der B-Zellen in die Follikel sind außerdem auch Chemokine wichtig (Cyster, J. G. *et al.* 2000).

Der periphere Pool reifer B-Zellen besteht in der Maus aus etwa $2-3 \times 10^8$ Zellen (Rolink, A. G. *et al.* 2004) und bleibt außerhalb von Phasen einer adaptiven Immunantwort dank verschiedener Mechanismen der Homöostase lebenslang stabil (Rathmell, J. C. 2004). Dieser Pool umfaßt reife folliculäre B-Zellen, B-Zellen der marginalen Zone und B-1 B-Zellen. Diese Populationen unterscheiden sich sowohl in ihrer Entwicklung als auch in ihrer Funktion sowie in ihrem Vorkommen in der Peripherie (Pillai, S. *et al.* 2004). Folliculäre B-Zellen ($\text{IgM}^{\text{hi}}/\text{IgD}^{\text{lo}}$) sind mit einer Lebensspanne von 2-3 Monaten relativ kurzlebig, während sowohl B-1 als auch B-Zellen der marginalen Zone eine Lebensspanne von mindestens einem Jahr aufweisen (Hao, Z. und Rajewsky, K. 2001). Im Gegensatz zu folliculären B-Zellen sind B-1 B-Zellen und die B-Zellen der marginalen Zone selbst-erneuernd (Korner, H. *et al.* 2001). Die B-1 B-Zellpopulation stellt weiterhin einen besonderen B-Zelltyp dar, da diese Zellen, obwohl sie unter bestimmten Umständen auch aus adulten Vorläufern entstehen können (Wortis, H. H. und Berland, R. 2001), ihren Ursprung mehrheitlich nicht im Knochenmark, sondern in der fötalen Leber haben (Hayakawa, K. und Hardy, R. R. 2000; Kruetzmann, S. *et al.* 2003). Die Population kann in zwei Gruppen weiter unterteilt werden B-1a und B-1b. Die Funktion der B-1b B-Zellen liegt hauptsächlich in der Immunantwort gegen Ag an den Schleimhäuten des Verdauungstraktes. B-1a B-Zellen produzieren in gesunden Mäusen, auch ohne Immunisierung, Ak des IgM-Isotyps, die in der Lage sind verschiedene Ag mit niedriger Affinität zu binden (Forster, I. *et al.* 1991). Diese sogenannten natürlichen Ak tragen

entscheidend dazu bei, in der frühen Phase der Immunantwort ein unkontrolliertes Ausbreiten von Pathogenen im Körper zu verhindern (Ochsenbein, A. F. *et al.* 1999; Ochsenbein, A. F. und Zinkernagel, R. M. 2000; Carsetti, R. *et al.* 2004). Desweiteren können B-1a B-Zellen auch Ak gegen Thymus-unabhängige (*thymus independent*, TI) Ag bilden (Mond, J. J. *et al.* 1995; Wardemann, H. *et al.* 2002). Sie sind die einzige Population, die Ak gegen Polysaccharidkapsel-bildende Bakterien produzieren können (Kruetzmann, S. *et al.* 2003).

Die folliculären B-Zellen und die B-Zellen der marginalen Zone haben hingegen beide ihren Ursprung im Knochenmark. Die Entscheidung zur Ausdifferenzierung zu einem der Phänotypen hängt offenbar mit der Stärke des, durch physiologische Liganden in der Peripherie vermittelten, BCR-Signals zusammen. Während relativ starke Signale die Entwicklung von folliculären B-Zellen begünstigen, sind nur schwache BCR-Signale in der Lage, die B-Zellentwicklung in Richtung der B-Zellen der marginalen Zone zu leiten (Samardzic, T. *et al.* 2002). Auch funktionell erfüllen die beiden Populationen verschiedene Aufgaben. Folliculäre B-Zellen tragen hauptsächlich zu in Keimzentren von Milz und Lymphknoten stattfindenden Thymus-abhängigen (*thymus dependent*, TD) Immunantworten bei. B-Zellen der marginalen Zone hingegen sind für TI Immunantworten gegen Ag, die durch die Makrophagen der marginalen Zone aus dem langsam fließenden Blut des marginalen Sinus aufgenommen wurden, verantwortlich (Gatto, D. *et al.* 2004). Aufgrund einer starken Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7.1 und B7.2 können sie jedoch auch zu TD Immunantworten gegen diese Ag beitragen (Oliver, A. M. *et al.* 1999; Pillai, S. *et al.* 2004).

3.1.3.3 Die humorale Immunantwort

Adaptive Immunantworten finden zum einen direkt am Ort einer Infektion statt. So können dort zum Beispiel infizierte Körperzellen von CD8⁺ T-Zellen lysiert werden. Ein anderer Bereich der adaptiven Immunantwort kann jedoch auch vom Infektionsort weit entfernt stattfinden. Ag, die durch die Haut eindringen, werden über lymphatische Gefäße in drainierende Lymphknoten transportiert. Ag aus dem Gastro-Intestinaltrakt werden durch spezialisierte Epithelzellen in Tonsillen oder Peyerschen Plaques befördert. In der Milz werden Ag aus dem Blut gefiltert und konzentriert. Kommen dort reife B-Zellen mit dem passenden Ag über ihren BCR in Kontakt, so können sie dieses internalisieren. Die B-Zelle

selbst wird dabei aktiviert. Je nach Art des Ag benötigt sie Hilfe von CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für das gleiche Ag (TD-Ag) beziehungsweise kann auch ohne T-Zellhilfe (TI-Ag) voll aktiviert werden und ihre Effektorfunktionen ausführen (Liu, Y. J. *et al.* 1991; Kelsoe, G. und Zheng, B. 1993). Aktivierte B-Zellen teilen sich rasch und formen in den Follikeln sogenannte Keimzentren. Ein jeder solcher Proliferationsorte entstammt einer einzelnen B-Zelle. Während der Proliferation entstehen Ak-sezernierende Plasmazellen (Calame, K. 2001; Calame, K. L. 2001). Hierbei kommt es zu einem weiteren Prozeß, der die Vielfalt der Antikörperspezifitäten erhöht, der somatischen Hypermutation. Dabei entstehen in den für die Ag-bindenden Regionen des Ak kodierenden DNA-Bereichen gehäuft Mutationen, die zu einer höheren Affinität der Ak gegenüber dem Ag führen können. Dieser im Verlauf einer Immunantwort stattfindende Prozeß der Affinitätsreifung führt letztlich zu Produktion von Ak mit einer sehr hohen Spezifität und Affinität für ein Ag, welches dadurch dann effektiv beseitigt werden kann. Da die Mutationen zufällig und nicht gerichtet sind, entstehen auch Zellen mit niedriger affinen Ak-Spezifitäten. Diese werden jedoch im Laufe der Reaktion kompetitiv verdrängt (Kosco-Vilbois, M. H. 2003). Ein weiterer Prozeß, der in den Keimzentren stattfindet, ist der Klassenwechsel des Ig-Isotyps (Chaudhuri, J. und Alt, F. W. 2004; Li, Z. *et al.* 2004). Vor allem je nach Art des Pathogens und des herrschenden Zytokinmilieus werden unterschiedliche Isotypen bevorzugt (Bengtén, E. *et al.* 2000). Diese können dann entsprechend verschiedene Funktionen erfüllen, wie Neutralisierung von zum Beispiel bakteriellen Toxinen, Opsonisierung von Pathogenen, die damit einfacher von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden können, oder der Aktivierung des Komplementsystems.

Neben der notwendigen Proliferation, die einige Zeit in Anspruch nimmt, bedingt das Erreichen der hohen Spezifität und Affinität der im Laufe einer adaptiven Immunantwort produzierten Ak die mehrtägige Verzögerung dieser Art der Immunantwort. Ein weiterer Grund ist die Seltenheit von B-Zelle mit einer für ein bestimmtes Ag passenden BCR-Spezifität. In den meisten Fällen ist nur 1 von etwa 10⁶ B-Zellen in der Lage, ein gegebenes Ag zu binden (Carsetti, R. *et al.* 2004). Der Abschluß einer erfolgreichen adaptiven Immunantwort wird von zwei wichtigen Prozessen begleitet. Während die Mehrheit der nicht mehr benötigten Effektorzellen durch Apoptose eliminiert wird, überleben einige Zellen und formen den Gedächtniszellpool. Diese Zellen besitzen eine besonders lange Lebensspanne und können im Menschen auch noch nach mehreren Jahrzehnten nachgewiesen werden (McHeyzer-Williams, M. G. *et al.* 2000). Damit ist der Organismus im Fall einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen besser gegen dieses geschützt.

Eine Immunantwort, bei der Gedächtniszellen beteiligt sind, unterscheidet sich vielfach von der Primärantwort. Sie wird wesentlich schneller ausgelöst, verläuft heftiger, zeichnet sich aber auch durch qualitative Besonderheiten aus. So werden, im Unterschied zur Primärantwort, die zumindest anfangs von IgM Sekretion dominiert wird, typischerweise hauptsächlich Ak vom IgG-Isotyp sezerniert. Desweiteren verfügen diese Ak über eine hohe Ag-Spezifität, die im Prozeß der somatischen Hypermutation der V-Gene erworben wurde (Neuberger, M. S. *et al.* 2000; Sale, J. E. *et al.* 2001).

3.1.3.4 B-Zelldefekte

Die Komplexität der während der Entwicklung ablaufenden Prozesse und die Vielfalt der Funktionen von B-Zellen macht dieses Kompartiment besonders für Defekte anfällig. Zwar werden die Zellen permanent sowohl extern von anderen Zellen als auch endogen kontrolliert, doch auch diese Mechanismen sind nicht immer in der Lage, eine einwandfreie Funktion jeder B-Zelle zu gewährleisten. Neben auf den Einzelfall bezogenen zufälligen Defekten, existieren jedoch auch natürlich vorkommende genetische Faktoren, die direkt zu Defekten führen oder Fehlfunktionen begünstigen.

Ebenso wie alle anderen Körperzellen können B-Zellen aller Entwicklungsstadien entarten und zu B-Zellymphomen führen. Die meisten im Menschen vorkommenden B-Zellymphome haben ihren Ursprung in B-Zellen, die aus der Reaktion im Keimzentrum hervorgingen. Die besondere Anfälligkeit für maligne Veränderungen liegt einerseits an den Genumlagerungen, die während des Klassenwechsels Megabasenbereiche umfassen und damit ein hohes Risikopotential für Translokationen von Onkogenen in V-Regionen in sich bergen. Andererseits kann es im Zusammenhang mit dem ebenfalls einzig in B-Zellen vorkommenden Prozeß der somatischen Hypermutation in Genen, die nicht für die V-Bereiche der Ak kodieren auch zu Sequenzveränderungen kommen, die neoblastisches Wachstum begünstigen (Korsmeyer, S. J. 1992; Bergsagel, P. L. und Kuehl, W. M. 2001; Dunn-Walters, D. *et al.* 2001).

Wenn, wie im Fall von schwerer kombinierter Immundefizienz (*severe combined immunodeficiency*, SCID), die Funktionsfähigkeit des Systems der somatischen Rekombination gestört ist, kommt es zu Fehlentwicklungen beziehungsweise zum Fehlen des Lymphozytenkompartiments. Beim Menschen kann diese Defizienz je nach der genauen Art des zugrunde liegenden genetischen Defekts schon innerhalb des ersten

Lebensjahres lethal sein (1995; 1997). Eine besondere Form stellt die X-chromosomal-gekoppelte SCID (SCID-X1) dar. Durch einen Defekt in der kodierenden Sequenz für das Gen der gemeinsamen γ -Kette der IL-2-, IL-4-, IL-7-, IL-9- und IL-15-Rezeptoren kommt es zu erheblichen Entwicklungsstörungen unter anderem der B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen (Fischer, A. 1992). Da der Defekt auf Zellen hämatopoietischen Ursprungs beschränkt ist, kann dieser durch Knochenmarkstransplantation behoben werden.

Bei der X-chromosomal-gekoppelten Agammaglobulinämie (*X-linked agammaglobulinemia*, XLA) wird die B-Zellentwicklung im Stadium der Prä-B-Zellen unterbrochen. Die Erkrankung wird durch eine Mutation im Gen des Signaltransduktionsmoleküls Btk (Bruton's tyrosine kinase) verursacht (Bruton, O. C. 1952; Desiderio, S. 1997).

Eine weitere Defizienz, die X-chromosomal vererbt wird, ist das X-gekoppelte Hyper-IgM-Syndrom. Hier kann aufgrund von Mutationen kein Signal über CD40 empfangen werden, das für den Ig-Klassenwechsel notwendig ist. Es werden dadurch kaum Ak anderer Isotypen produziert (Di Santo, J. P. *et al.* 1994).

Das Fehlen von Ak kann aber auch nur einzelne Isotypen betreffen. Wie zum Beispiel IgA (Burrows, P. D. und Cooper, M. D. 1997). Hier sind Mutationen in DNA-Bereichen, die für den konstanten Teil von IgA kodieren, für den Phänotyp verantwortlich.

Eine Auswahl der genetisch bedingten B-Zelldefizienzen ist in Tab. 3.3 dargestellt.

Krankheit	verantwortliches Gen
schwere kombinierte Immundefizienz	Adenosin-Deaminase gemeinsame γ -Kette JAK-3 RAG 1/2 DNA-PKcs
X-chromosomal-gekoppelte Agammaglobulinämie	Btk
Leukozyten Adhäsionsdefizienz	β 2-Integrin
IgA-Defizienz	(komplex)
X-chromosomal-gekoppeltes Hyper-IgM-Syndrom	CD40-Ligand
Wiskott-Aldrich-Syndrom	WASP

Tab. 3.3: Ausgewählte genetische Defekte, die die B-Zellfunktion beeinträchtigen.

Wie die Mehrzahl der Leukozyten sind auch B-Zellen in der Lage selektiv in bestimmte Organe zu migrieren (*homing*). Dabei werden gewebspezifische Adhäsionsmoleküle auf

Endothelzellen erkannt (Gowans, J. L. und Knight, E. J. 1964; Butcher, E. C. *et al.* 1980; Butcher, E. C. und Picker, L. J. 1996; Warnock, R. A. *et al.* 1998). Das Fehlen einzelner Komponenten hat in der Regel schwere Organmißbildungen und Immundefizienzen zur Folge (Lau, Y. L. *et al.* 1991; Tohma, S. *et al.* 1991; Springer, T. A. 1995; Wagner, N. *et al.* 1996; Xu, B. *et al.* 2003). Wie ebenfalls bereits erwähnt, sind Chemokingradienten wichtige Wegweiser für die Lokalisation von B-Zellen im Organismus und in einzelnen Kompartimenten lymphatischer Organe. So bedingt zum Beispiel eine Unterbrechung der Wechselwirkungen zwischen dem Chemokin BLC (CXCL13) und dem Rezeptor CXCR5 Störungen in der Entwicklung von B-Zellfollikeln in der Milz und Peyerschen Plaques (Forster, R. *et al.* 1994; Forster, R. *et al.* 1996).

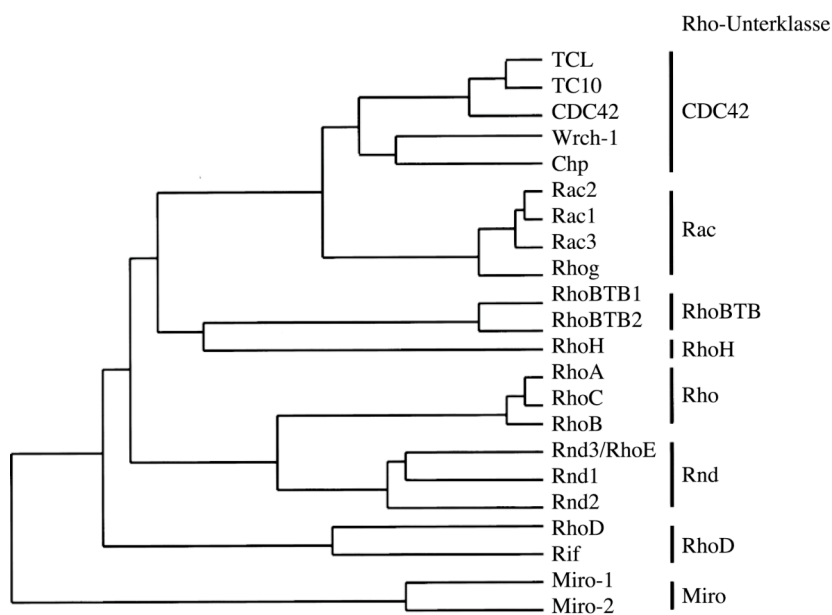
Eine weitere Art einer genetisch bedingten Erkrankung, bei der auch die B-Zellen betroffen und für den Phänotyp mitverantwortlich sind, stellt das X-chromosomal rezessiv vererbbares Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) dar (Wiskott, A. 1937; Aldrich, R. A. *et al.* 1954). Bei den Patienten manifestiert sich die Erkrankung vor allem durch eine Thrombozytopenie, sowie Ekzeme und verschieden starke Immundefizienzen, aber auch Autoimmunerkrankungen, wie juvenile rheumatische Arthritis, Vaskulitis, Glomerulonephritis und Coombs-positive hämolytische Anämie. Das Gen, dessen Mutationen für den Phänotyp verantwortlich sind, konnte bei Menschen auf Xp11.23 lokalisiert werden. Es besteht aus 12 Exons, die für ein Protein mit 502 Aminosäuren kodieren (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein, WASP, Kwan, S. P. *et al.* 1991; Derry, J. M. *et al.* 1994). Obwohl dieses Syndrom zunächst als eine T-Zelldefizienz beschrieben wurde, zeigen auch B-Zellen von WAS-Patienten unter anderem verminderte Motilität und eine reduzierte Migrationsfähigkeit (Freitas, A. A. und Rocha, B. 2000; Westerberg, L. *et al.* 2004). Einen ähnlichen Phänotyp zeigen WASP-defiziente Mäuse (Zhang, J. *et al.* 1999; Westerberg, L. *et al.* 2001). Als direkte Funktion dieses Proteins konnte seine Rolle in der Reorganisation des Zytoskeletts bestimmt werden (Higgs, H. N. und Pollard, T. D. 2001). Wichtige Reaktionspartner des WASP wurden innerhalb der Familie der Rho-GTPasen gefunden (Symons, M. *et al.* 1996), auf die nun näher eingegangen werden soll.

3.2 Die Familie der Rho-Proteine

Vor allem die Entdeckung von onkogenen Mutationen in Genen der Ras-Familie (*rat sarcoma virus*), die wiederholt in humanen Karzinomen vorkommen (Harvey, J. J. 1964;

Ridley, A. 2000; Montaner, S. *et al.* 2004; Ridley, A. J. 2004), sowie die Identifizierung der entsprechenden viralen Proto-Onkogene, v-Ras (Shih, T. Y. *et al.* 1979; Barbacid, M. 1987; Shields, J. M. *et al.* 2000), lösten die Suche nach Ras verwandten Genen beziehungsweise Proteinen aus. Rho (*ras homolog*) wurde hierbei als eines der ersten Genprodukte identifiziert (Madaule, P. und Axel, R. 1985). Inzwischen wurden über 100 Ras-ähnliche Proteine in Säugetierzellen gefunden, die in fünf Gruppen eingeteilt werden: Ras, Rab, Arf, Ran und Rho (Ridley, A. J. 2001).

Die besonders gut untersuchte Familie der 20-30 kDa großen, monomeren, Guanosin-Triphosphat- (GTP) bindenden und spaltenden Proteine der Rho-Familie (Rho-GTPasen) umfaßt mindestens 22 Vertreter (Wherlock, M. und Mellor, H. 2002; Fransson, A. *et al.* 2003, Tab. 3.4), die als molekulare Schalter eine breite Palette von Signaltransduktionswegen in allen eukaryotischen Zellen kontrollieren und damit wichtige zelluläre Prozesse, wie Regulation des Aktin-Zytoskeletts, der Aktivität von Transkriptionsfaktoren und den Zellzyklus beeinflussen (Bishop, A. L. und Hall, A. 2000; Etienne-Manneville, S. und Hall, A. 2002).



Tab. 3.4: Dendrogramm der Rho-GTPasen (Quelle: (Bishop, A. L. und Hall, A. 2000), verändert).

3.2.1 Funktionsweise und Regulation der Rho-GTPasen

Alle Rho-GTPasen wechseln zwischen der inaktiven, an Guanosin 5'-Diphosphat (GDP) gebundenen, Form und der aktiven Form, in der sie an GTP gebunden sind (Boguski, M. S. und McCormick, F. 1993; Takai, Y. *et al.* 2001). Zur Zeit sind drei Arten von Faktoren bekannt, die diesen Prozeß, der auch einen strukturellen Konformationswechsel des Proteins beinhaltet, regulieren (Vetter, I. R. und Wittinghofer, A. 2001). Während die zur Zeit über 60 bekannten Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) als Co-Faktoren den Austausch von GDP zu GTP forcieren und dadurch die Rho-GTPasen aktivieren (Van Aelst, L. und D'Souza-Schorey, C. 1997; Kjoller, L. und Hall, A. 1999), beschleunigen GTPase-aktivierende Proteine (GAP), von denen über 70 identifiziert werden konnten, drastisch die ansonsten langsame, intrinsische Hydrolyse von GTP zu GDP, was zu Inaktivierung der Rho-GTPase führt (Lamarche, N. und Hall, A. 1994; Moon, S. Y. und Zheng, Y. 2003). Eine andere Art der Regulation führen die Guaninnucleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI) aus. Sie binden an den inaktiven Rho-GTPase/GDP Komplex und translozieren diesen von der Zellmembran weg ins Zytoplasma (Johnson, D. I. 1999; Olofsson, B. 1999). Die Wechselwirkungen von Rho-GTPasen mit GEF, GAP und GDI sind schematisch in Abb. 3.2 dargestellt.

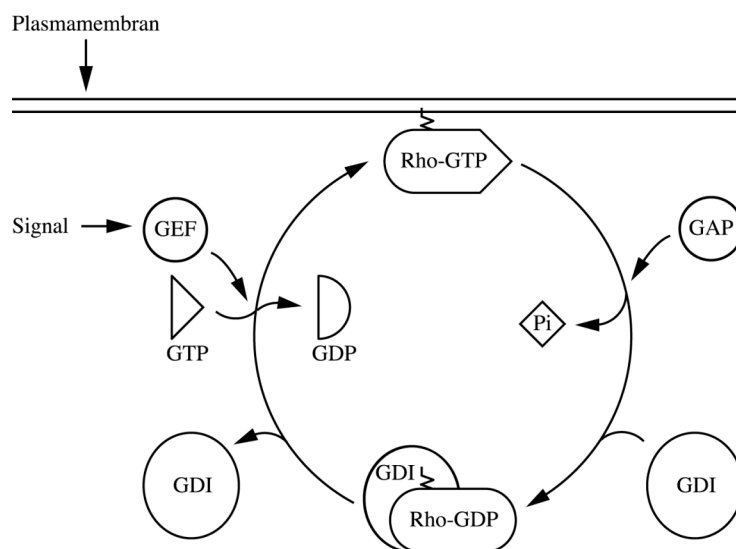


Abb. 3.2: Mechanismus und Kontrolle der Aktivität von Rho-GTPasen (Quelle: (Paduch, M. *at al.* 2001), verändert).

Alle Rho-GEF besitzen eine katalytische Dbl-homologe Domäne (*Dbl-homology domain*, DH, Hart, M. J. *et al.* 1994; Cherfils, J. und Chardin, P. 1999), sowie eine benachbarte

Pleckstrin-homologe Domäne (*pleckstrin homology domain*, PH). Diese vermittelt einerseits durch Bindung von Lipiden die Lokalisation an der Plasmamembran (Zheng, Y. *et al.* 1996; Rameh, L. E. *et al.* 1997), sie verstärkt jedoch auch direkt die Aktivität der DH-Domäne. So weist der Wildtyp des Trio-GEF eine etwa 100-fach höhere GEF-Aktivität auf als eine künstlich erzeugte Mutante ohne die PH-Domäne (Liu, X. *et al.* 1998). Weitere spezifische Domänen sorgen für Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation sowie dem genauen Aktivierungsmechanismus (Cerione, R. A. und Zheng, Y. 1996).

Das Hauptmerkmal des Funktionsmechanismus der GAP ist eine 20°-Drehung zwischen der GTPase gegenüber dem GAP im Wechsel vom Grundzustand in den sogenannten Übergangszustand. Dabei dringt eine Domäne (Arginin-Finger) des GAP in das aktive Zentrum der GTPase ein und stabilisiert den Übergangszustand, in dem GTP effektiv gespalten werden kann (Rittinger, K. *et al.* 1997 (a); Rittinger, K. *et al.* 1997 (b); Nassar, N. *et al.* 1998).

Rho-GTPasen sind in der Lage, mit Hilfe ihres posttranslational modifizierten C-Terminus mit der Plasmamembran zu interagieren. Diese Interaktion wird durch GDI inhibiert. Diese sind in der Lage GTPasen, die GDP gebunden haben, im Zytoplasma zurückzuhalten sowie den spontanen Austausch von GDP gegen GTP zu inhibieren (Keep, N. H. *et al.* 1997).

Zur Familie der Rho-GTPasen gehören neben den drei bekannten Rho Isoformen RhoA, RhoB und RhoC unter anderem noch Cdc42 (*cell division cycle 42*) und Rac (*ras-related C3 botulinum toxin substrate*), das in Säugern in drei Isoformen vorkommt: Rac1, Rac2 und Rac3. Diese werden von verschiedenen Genen kodiert, ihre Aminosäuresequenzen sind jedoch zu 89-93% identisch (Haataja, L. *et al.* 1997; Wherlock, M. und Mellor, H. 2002). Ungeachtet der Sequenz- und Strukturhomologie sind das Vorkommen und die Funktionen der einzelnen Rac-Isoformen teilweise unterschiedlich. Während Rac1 in allen untersuchten Geweben vorkommt, ist Rac2 hauptsächlich in Zellen des hämatopoietischen Systems, Rac3 hingegen nur im Gehirn exprimiert (Bolis, A. *et al.* 2003; Haeusler, L. C. *et al.* 2003). *In vitro* Analysen zeigten vor allem Unterschiede in den Nukleotidbindungseigenschaften sowie der Aktivierung durch die Rac spezifischen GEF: TIAM1, Trion und GEF H1 auf (Gao, Y. *et al.* 2001; Karnoub, A. E. *et al.* 2001). Die genauen Unterschiede in den zugrunde liegenden biochemischen Charakteristika konnten jedoch bisher nur sehr unzureichend untersucht werden (Michiels, F. und Collard, J. G. 1999; Dinauer, M. C. 2003; Haeusler, L. C. *et al.* 2003; Prieto-Sanchez, R. M. und Bustelo, X. R. 2003).

Eine besondere Schwierigkeit in der Untersuchung der *in vivo* Rac1 Funktion in Säugern ergibt sich aus der Tatsache, daß Rac1 defiziente Mäuse am achten Tag ihrer

Embryonalentwicklung sterben (Sugihara, K. *et al.* 1998). So ist auch der Vergleich von Funktionen der beiden Rac-Isoformen Rac1 und Rac2 in Zellen des hämatopoietischen Systems schwierig. Eine Möglichkeit stellt die konditionelle Eliminierung des Rac1-Gens, die je nach gewähltem Promotor gezielt in bestimmten Zelltypen erfolgen kann (Gu, Y. *et al.* 2003). Eine weitere Möglichkeit stellt die transgene Expression von entweder konstitutiv aktiven oder dominant-negativen mutanten Formen der entsprechenden GTPase, die ebenfalls zelltypspezifisch oder ubiquitär erfolgen kann. In früheren *in vitro* Untersuchungen wurden diese Mutanten zum Teil auch in Form von Protein in die zu untersuchenden Zellen mikroinjiziert (Olson, M. F. *et al.* 1995).

Die GTPasen der Rho-Familie agieren innerhalb der Zelle nicht unabhängig voneinander. In verschiedenen Systemen konnten vielfältige Wechselwirkungen der Rho-GTPasen untereinander, sowie mit anderen Ras-GTPasen gezeigt werden. Diese können entweder direkt oder über Mediatoren erfolgen. Neben diesen ist auch die genaue Hierarchie der GTPasen untereinander nicht näher bekannt (Ridley, A. J. *et al.* 1992). Ein besonders wichtiger Aspekt dieser Abhängigkeiten ist die Inaktivierung von Rho durch Rac über die Rac-vermittelte Produktion von Sauerstoff-Radikalen (Ridley, A. J. und Hall, A. 1992; Nimnual, A. S. *et al.* 2003; Burridge, K. und Wennerberg, K. 2004). Die Ausbalancierung der Rac- und Rho-Aktivitäten ist für Zellmorphologie, Zellbewegung und Wachstum besonders wichtig (Sander, E. E. *et al.* 1999; Caron, E. 2003).

3.2.2 Effektorproteine

Als Effektoren der Rho-GTPasen werden Proteine definiert, die mit hoher Affinität ausschließlich an den aktiven Rho-GTPase/GTP-Komplex binden. Vergleiche von Kristallstrukturen aktiver und inaktiver Rho-GTPasen offenbarten Konformationsunterschiede vor allem in zwei Regionen, den sogenannten Schalterregionen I und II. Bis auf wenige Ausnahmen interagieren alle bekannten Effektoren über diese Motive (Wei, Y. *et al.* 1997; Ihara, K. *et al.* 1998).

Um an Rho-GTPasen binden zu können, verfügen die Effektoren ihrerseits über entsprechende Bindungssequenzen. Die am weitesten verbreitete stellt die CRIB-Domäne (*Cdc42/Rac-interactive binding*) dar. Diese ist stark konserviert und kommt in verschiedensten Proteinfamilien: Serin/Threonin-Kinasen (MEKK, (Fanger, G. R. *et al.* 1997), JNK, (Coso, O. A. *et al.* 1995; Crespo, P. *et al.* 1996)), Tyrosin-Kinasen (Ack1,

(Yang, W. und Cerione, R. A. 1997)), Lipid-Kinasen (PI3K, (Tolias, K. F. *et al.* 1995; Bokoch, G. M. *et al.* 1996)), Lipasen (PLC- β 2, (Illenberger, D. *et al.* 1998)), sowie Struktur und Adapterproteinen (WASP, (Machesky, L. M. und Insall, R. H. 1998)) vor. Daneben sind weitere Motive wie REM und RKH bekannt. Diese kommen jedoch viel seltener, hauptsächlich in Adapterproteinen vor (Hotta, K. *et al.* 1996).

3.2.3 Die biologische Aktivität der Rho-GTPasen

Die breite Palette an Interaktionspartnern bedingt die Vielfalt zellulärer Prozesse, an denen Rho-GTPasen beteiligt sind. In folgenden Abschnitten soll das umfangreiche Funktionsspektrum von Rho, Rac und Cdc42, als der am besten untersuchten Mitglieder der Rho-Familie, näher erläutert werden.

3.2.3.1 Zellmorphologie und Adhäsion

Studien zur Erforschung der Bedeutung von Rho-GTPasen sind selbst in einfachen eukaryotischen Einzellern möglich. Untersuchungen zur Ausbildung von Polarität bei der Zellteilung von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zeigten, daß Cdc42 für die gezielte, örtliche Fokussierung der Knospung notwendig ist (Pruyne, D. und Bretscher, A. 2000), während Rho in einem weiteren Schritt Signaltransduktionswege aktiviert, die für das Wachstum der Knospe notwendig sind (Schmidt, A. und Hall, M. N. 1998). Diese Beobachtungen erlauben Rückschlüsse auf die Rolle von Rho-GTPasen bei der Morphogenese höherer Organismen. Dabei könnten Rho-GTPasen einerseits Determinanten für korrekte Zellpolarisation in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen sein, jedoch auch anderweitig kooperativ am Prozeß der Morphogenese beteiligt sein.

Dies wurde zum Beispiel durch entsprechende Untersuchungen der Rolle von Cdc42 bei der Ausbildung einer Anterior-Posterior-Asymmetrie bei der Zygotenteilung von *Caenorhabditis elegans* (Lin, D. *et al.* 2000; Qiu, R. G. *et al.* 2000), sowie der Oozytenreifung und Neuroblastenteilung in *Drosophila melanogaster* (Gotta, M. *et al.* 2001; Kay, A. J. und Hunter, C. P. 2001; Ohno, S. 2001) festgestellt. Auch Rac scheint für Morphogenese bei *D. melanogaster* von großer Bedeutung zu sein (Eaton, S. *et al.* 1995; Murphy, A. M. und Montell, D. J. 1996).

Eine für die Funktion von Epithelien notwendige Voraussetzung stellt die Ausbildung und Aufrechterhaltung von basalen und lateralen Verbindungen zwischen Nachbarzellen dar. Untersuchungen an Epidermiszellen von *C. elegans* sowie an Maus-Keratinocyten zeigten, daß Cdc42 und Rac für die Ausbildung von lateralen Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten durch Penetration von Nachbarzellen mit Zellfortsätzen (Filopodien und Lamellopodien) notwendig sind (Raich, W. B. *et al.* 1999; Betson, M. *et al.* 2002; Malliri, A. *et al.* 2004). Rho hingegen ist an der Ausbildung von Aktin-Filamenten beteiligt, die die Zellverbindungen stabilisieren (Braga, V. M. *et al.* 1997; Noren, N. K. *et al.* 2001; Fukata, M. *et al.* 2002). Desweiteren leistet Rac durch seinen Einfluß auf die Formation der Laminin-vermittelten basolateralen Kontakte einen entscheidenden Beitrag für die Ausbildung der apicalen Polarität von Endothelien (O'Brien, L. E. *et al.* 2001).

Die Ausbildung von Asymmetrien stellt im Fall der meisten tierischen Zellen einen wichtigen Schritt in der Morphogenese dar. Der dabei mögliche Grad an Ausprägung und Komplexität wird am Beispiel von Neuronen deutlich. Auch in diesem Fall werden die beteiligten Prozesse durch Rho-GTPasen reguliert. Während Cdc42 und Rac1 das Wachstum von Neuriten positiv regulieren, wird dieses durch Rho inhibiert (Luo, L. 2000). Das Wachstum wird hier durch den kontrollierten Auf- und Abbau des Zytoskeletts reguliert. Dabei fördern Cdc42 und Rac den Aufbau von Aktin-Filamenten in den Membranausstülpungen, Rho hingegen fördert die Membranretraktion durch Aufbau kontraktiler Aktin- und Myosinfilamente (Lee, T. *et al.* 2000; Ozdinler, P. H. und Erzurumlu, R. S. 2001). Ähnliches konnte bei Makrophagen beobachtet werden. Während die Aktivierung von Rac2 die Ausbildung von Lamellopodien forciert, bewirkt die Aktivierung von Rho eine Abrundung der Zelle (Hall, A. 1994; Allen, W. E. *et al.* 1997).

Die durch Aktin- und Myosinfilamente vermittelte Kontraktion wird in vielen Zelltypen auch für die Durchführung schneller, reversibler Formveränderungen genutzt. Auch die, auf diese Art durch Zellen der glatten Gefäßwandmuskulatur vermittelte Regulation der Blutzirkulation wird ausgelöst durch äußere Stimuli, durch Rho und die Rho-abhängige p160Rho-Kinase über Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins und die darauffolgende Kontraktion der Aktin-Myosin-Filamente vollführt (Uehata, M. *et al.* 1997; Fukata, Y. *et al.* 2001; Sakurada, S. *et al.* 2001). So korreliert starke Rho-Aktivität in Zellen der glatten Gefäßwandmuskulatur bei Menschen in vielen Fällen mit Bluthochdruck und vaskulären Erkrankungen (Puceat, M. *et al.* 2003; Seasholtz, T. M. und Brown, J. H. 2004).

3.2.3.2 Zellbewegung

Die Fähigkeit zur Migration setzt eine asymmetrische Organisation zellulärer Aktivitäten voraus. Dabei wird an der Frontseite der Zelle eine vorwärts treibende Kraft generiert, die üblicherweise mit Ausbildung von Fortsätzen (Lammellopodien) und Adhäsionskontakten zur extrazellulären Umgebung einhergeht. Gleichzeitig ist die Kontraktion am gegenüberliegenden Ende der Zelle notwendig. Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts, die beide Prozesse ermöglicht, fungiert somit als die treibende Kraft der Zellbewegung (Tapon, N. und Hall, A. 1997; Ridley, A. J. 2001; Fukata, M. *et al.* 2003). Durch Aktivierung des Arp2/3 Komplexes ist Rac in der Lage Aktin-Polymerisation zu induzieren (Condeelis, J. 2001). Die Untersuchungen in diversen Zelltypen zeigen, daß Rac in allen Fällen essentiell für die Zellmigration ist (Chung, C. Y. *et al.* 2000; Small, J. V. *et al.* 2002; Swetman, C. A. *et al.* 2002). Es existieren jedoch auch Ausnahmen. So zeigen Rac1 defiziente Makrophagen *in vitro* zwar Defekte in Ausbildung der für diese Zellen typischen Morphologie, jedoch ist die migratorische Fähigkeit selbst nicht negativ beeinflusst (Chimini, G. und Chavrier, P. 2000; Wells, C. M. *et al.* 2004). Ähnliches wurde auch bei DC beobachtet (Shurin, G. V. *et al.* 2005).

Die gerichtete Migration von Zellgruppen ist, neben ihrer Notwendigkeit für den Erhalt der Gewebeintegrität, wie im Fall der Wanderung von Stammzellen in den Kolon, eine typische Eigenschaft der Ontogenese von Metazoen. Eines der bestuntersuchten Beispiele ist die Schließung des Dorsalspaltes während der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster*. Rac und Cdc42 tragen zur Ausbildung von Zellfortsätzen in Form von Filopodien und Lammellopodien durch Zellen beiderseits des Spaltes bei, die eine Schließung einleiten (Jacinto, A. *et al.* 2001). Rac- und Cdc42-Aktivitäten sind darüber hinaus ebenso notwendig, um über die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase Signalleitungskaskade den Transkriptionsfaktor Dpp zu aktivieren, der für die Koordinierung und Synchronisierung der Migration zwischen einzelnen Zellen notwendig ist (Knust, E. 1997).

3.2.3.3 Endozytose und Sekretion

Weitere Prozesse, für die der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten essentiell ist, finden sich im Bereich des Membrantransportes und der Veränderungen der Membranstruktur, wie zum Beispiel beim intrazellulärem Vesikeltransport, sowie der Bildung von

Membraneinstülpungen bei der Phagozytose (Nobes, C. D. und Hall, A. 1995 (a); Nobes, C. D. und Hall, A. 1995 (b)).

In Makrophagen existieren parallel zwei verschiedene Phagozytosemechanismen. Diese werden durch unterschiedliche Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen gesteuert. So ist bei der Komplementrezeptor-vermittelten Phagozytose Rho beteiligt, während Rac und Cdc42 nicht essentiell zu sein scheinen. Bei der Immunglobulinrezeptor-vermittelten Phagozytose hingegen sind Rac und Cdc42 wichtig (Lamaze, C. *et al.* 1996; O'Sullivan, A. J. *et al.* 1996; Cox, D. *et al.* 1997; Caron, E. und Hall, A. 1998). Rac1 und Rac2 regulieren hier auch die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Enzymkomplexes, was zur Bildung von Sauerstoffradikalen führt (Dorseuil, O. *et al.* 1996; Bokoch, G. M. 2000; Park, J. B. 2003; Yamauchi, A. *et al.* 2004).

Ein mit der Phagozytose eng verwandter Endozytoseprozeß ist die Pinozytose. Sie wird durch Rac- und Cdc42-Aktivitäten reguliert und ist primär für die Nährstoffaufnahme verantwortlich. Pinozytose spielt daneben jedoch auch eine wichtige Rolle für die Antigenpräsentation durch pAPC. In DC ist das auf diese Weise aufgenommene Material die Hauptquelle für auf MHC II Molekülen präsentierten Peptide (Cox, D. *et al.* 1997; Garrett, W. S. *et al.* 2000; Nobes, C. und Marsh, M. 2000; West, M. A. *et al.* 2000).

Sekretorische Aktivitäten von Zellen erfordern ebenfalls Umlagerungen im Netzwerk der Aktinfilamente. Die Kreuzvernetzung von IgE auf der Oberfläche zirkulierender Mastzellen führt zur Freisetzung von Histamin und Serotonin aus intrazellulären Granulae. Entsprechende Versuche haben gezeigt, daß Rho, Rac und Cdc42 hierbei beteiligt sind. Obwohl ihre genaue Funktion in diesem System nicht bekannt ist, scheint diese vom Aktin-Zytoskelett unabhängig zu sein (Pinxteren, J. A. *et al.* 2000).

Die zentrale Rolle, die Rho-GTPasen bei Endozytose-Vorgängen spielen, bietet auch eine Erklärung für die Tatsache, daß diese oftmals Zielsubstrate bakterieller Toxine sind. Clostridien-Toxin ist in der Lage, an Rho-GTPasen kovalent zu binden und diese zu inaktivieren. Das YopE-Toxin aus *Yersinia* hingegen agiert als ein GAP. In beiden Fällen wird die Endozytose dieser Pathogene damit inhibiert. Umgekehrt agiert das SopE aus *Salmonella typhimurium* als ein GEF. Es aktiviert Rac und Cdc42, um die Aufnahme des intrazellulären Pathogens zu beschleunigen (Aktories, K. *et al.* 2000; Galan, J. E. 2001).

3.2.3.4 Proliferation und Proteinexpression

Der Zellzyklus findet seinen Abschluß im Prozeß der Zytokinese. Mechanisch erfolgt die Bildung der Tochterzellen durch die Einschnürung des sogenannten kontraktilen Rings. Dieser besteht aus Aktin und Myosinfilamenten. Sowohl die Inhibierung, als auch die Expression konstitutiv aktivierten Rho oder Cdc42 verhindern die Bildung des kontraktilen Rings. Somit ist offenbar der Wechsel der GTPasen vom inaktiven in den aktiven Zustand für den Prozeß entscheidend (Glotzer, M. 2001).

Neben Zytoskelett-vermittelten Effekten beeinflussen Rho-GTPasen den Zellzyklus über Signalleitung und Aktivierung anderer Proteine. Die Inhibierung von Rho, Rac oder Cdc42 in Fibroblasten und Epithelzellen verhindert einen Serum-induzierten Eintritt in den Zellzyklus *in vitro* (Olson, M. F. *et al.* 1995). Detailliertere Studien führten zu der Erkenntnis, daß Rho die Expression des D1-Zyklins fördert, während es die Expression von Zyklin-Inhibitoren unterdrückt (Olson, M. F. *et al.* 1998; Philips, A. *et al.* 2000; Welsh, C. F. *et al.* 2001). Ebenso ist Rac für die Expression von D1 verantwortlich, wobei es, im Gegensatz zu Rho, nicht die Transkription, sondern die Translation der mRNA beeinflusst (Joyce, D. *et al.* 2001; Mettouchi, A. *et al.* 2001; Vigorito, E. *et al.* 2003). In weiteren biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnte an zahlreichen Beispielen ein Zusammenhang zwischen Rho-, Rac- oder Cdc42-Aktivierung und DNA-Transkription, beziehungsweise Proteinexpression gezeigt werden (Hill, C. S. *et al.* 1995; Teramoto, H. *et al.* 2003).

3.2.3.5 Besondere Aspekte der Funktion der Rac-GTPasen in Zellen des Immunsystems

Die GTPasen der Rho-Familie spielen auch für die Funktion von Lymphozyten eine wichtige Rolle. *In vitro* Untersuchungen konnten die Bedeutung von Rac1 und Cdc42 für die Regulation des Zytoskeletts in B-Zellen belegen (Westerberg, L. *et al.* 2001). Ähnliche Befunde wurden bei anderen durch Zytoskelett und insbesondere Aktin-vermittelten Prozessen gemacht. Rac defiziente DC zeigen neben einer stark inhibierten Migrationsfähigkeit und Phagozytose auch Fehlfunktionen bei der Ausbildung von Membranfortsätzen, die für Interaktionen mit naiven T-Zellen und deren Aktivierung notwendig sind (Benvenuti, F. *et al.* 2004). In T-Zellen kontrolliert Rac1 neben der

Regulation des Aktin-Zytoskeletts (Arrieumerlou, C. *et al.* 2000) die Aktivierung von Kinasen-Signaltransduktion (Hashimoto, A. *et al.* 1998; Jacinto, E. *et al.* 1998; Genot, E. M. *et al.* 2000) sowie NFAT-abhängige Transkription (Genot, E. *et al.* 1996; Holsinger, L. J. *et al.* 1998) und Zytotoxizität (Billadeau, D. D. *et al.* 1998). Weitere Studien in Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form von Rac1 in Zellen der T-Zelllinie exprimierten, führten zu der Erkenntnis, daß Rac1 für die Entwicklung der T-Zellen wichtig ist. So ist Rac1-Aktivität bei der Prä-TCR und TCR abhängigen Thymozyten Selektion im Thymus notwendig (Gomez, M. *et al.* 2000; Gomez, M. *et al.* 2001). In vergleichbaren Studien konnten ähnliche Funktionen auch für Rac2 bestimmt werden (Lores, P. *et al.* 1997). Während einer Immunantwort sind Rac2 defiziente T-Zellen nicht in der Lage, den Th1-Phänotyp zu entwickeln (Li, B. *et al.* 2000). Rac2 beeinflusst die Funktion von B-Zellen auf eine ebenso vielfältige Weise. So ist in Rac2 defizienten Mäusen neben einer gestörten Chemotaxis der B-Zellen, auch die Populationsgröße der B-1a und B-Zellen der marginalen Zone deutlich reduziert. Zusätzlich ist die Ca^{2+} Freisetzung in Folge von BCR und CD19 Ligation vermindert (Croker, B. A. *et al.* 2002). Umgekehrt konnte in B-Zellen eine Aktivierung von Rac1, Rac2 und Cdc42 in Folge der BCR-Kreuzvernetzung mit F(ab')₂ sowie der Stimulierung mit Wachstumsfaktoren CSF-1, SLF und GM-CSF *in vitro* beobachtet werden (Grill, B. und Schrader, J. W. 2002).

In einer neueren, umfassenden Studie konnten die Rollen von Rac1 und Rac2 in B-Zellen *in vivo* direkt verglichen werden (Walmsley, M. J. *et al.* 2003). Die untersuchten Gruppen umfassten eine CD19-spezifisch, konditionell Rac1 defiziente Maus (Rac1^B), eine ubiquitär Rac2 defiziente Maus (Rac2^{-/-}), sowie die aus einer Kreuzung beider Stämme hervorgegangene Maus, deren B-Zellen Rac1 und Rac2 defizient waren. Die Größen der B-Zellpopulationen im Knochenmark unterschieden sich in den defizienten Mäusen nicht von denen in Wildtyp-Tieren. In der Milz waren die Rac2 defizienten B-Zellen der marginalen Zone reduziert. Daneben waren alle untersuchten B-Zellpopulationen in der Milz in den Rac1/2 defizienten Mäuse reduziert. Die über CD40 und BCR *in vitro* induzierte Proliferation von Milz-B-Zellen war im Fall von Rac2 und Rac1/2 defizienten B-Zellen inhibiert. Die Zellen waren jedoch in der Lage, auf Stimulation mit Ionomycin und Phorbol ester mit Zellteilung zu reagieren, was darauf hindeutet, daß die Rolle der Rac-GTPasen hier nicht in der Proliferationsfähigkeit per se, sondern in der Signalleitung liegt (Arbibe, L. *et al.* 2000; Nosaka, Y. *et al.* 2001). Rho-GTPasen sind neben ihrer Rolle im Zellzyklus auch für das Überleben der Zelle wichtig (Etienne-Manneville, S. und Hall, A. 2002). In einer *in vitro* Kultur brachte der Vergleich von Apoptose in Abwesenheit

exogener Stimuli keine Unterschiede zwischen Rac defizienten und Wildtyp-B-Zellen hervor. Wurden die Zellen dagegen mit anti-IgM stimuliert, starben Rac1 und Rac1/2 defiziente B-Zellen schneller. Für die Entwicklung und das Überleben von B-Zellen ist auch die Bindung von BAFF an den BAFF-Rezeptor von Bedeutung (Mackay, F. *et al.* 2003). Die Zugabe von BAFF zum Kulturmedium erhöhte die Überlebensdauer von unreifen Wildtyp-B-Zellen aus dem Knochenmark. Hier zeigt sich eine Redundanz in der Rac Funktion. Während die Rac1- und die Rac2-Defizienz alleine keinen negativen Effekt hatte, überlebten Rac1/2 defiziente B-Zellen signifikant schlechter. Die Fähigkeit zur Expression des BAFF-Rezeptors sowie seiner mRNA nach BCR-Stimulation *in vitro* war hingegen sowohl in Rac2, als auch in Rac1/2 defizienten B-Zellen inhibiert. Diese Ergebnisse zeigen die wichtige Rolle von Rac-GTPasen in einigen Aspekten der B-Zellentwicklung und Funktion. Dabei agieren Rac1 und Rac2 meist kooperativ, in einigen Fällen ist ihre Wirkung sogar weitgehend redundant.

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Die grundsätzlichen Aspekte der Funktionsweise der Rac2- und Rac3-GTPasen konnten in vielen *in vitro* und *in vivo* Systemen erforscht werden. Die besondere Situation bei Rac1 ergab sich aus der Tatsache, daß die Herstellung von Rac1-defizienten Mäusen aufgrund deren embryonalen Lethalität nicht möglich war. Somit ist die Funktion von Rac1 bei Säugern hauptsächlich nur *in vitro* erforscht worden.

Bei Untersuchungen der Bedeutung von bestimmten Proteinen für ausgewählte Zellpopulationen besteht der grundsätzliche Nachteil von *in vitro* Ansätzen in der Abkoppelung der Zellen von ihrer natürlichen Umgebung. Ergebnisse funktioneller Tests *in vitro* korrelieren folglich nicht immer mit der Situation *in vivo*. Die Rolle der Proteine für die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen läßt sich ohnehin nur in einem Modellorganismus bestimmen.

Mit Hilfe einer biochemischen Rac1-Defizienz in CD19 positiven Zellen sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Rac1 für B-Zellen untersucht werden. Die dabei verwendeten Ansätze zielten auf die Erforschung der Rolle von Rac1 sowohl für die B-Zellentwicklung als auch deren Funktion.

Nach der biochemischen und durflußzytometrischen Bestimmung der Spezifität der Expression des Transgens, sollten zunächst mögliche Einflüsse auf die Größen einzelner B-

Zellpopulationen in lymphatischen Organen, im Knochenmark, Milz, Lymphknoten sowie dem peripheren Blut untersucht werden. Dazu wurden neben FACS-Analysen, die Aufschluß über die Populationsgrößen brachten, verschiedenartige Überlebens- und Proliferationstests durchgeführt. Zusätzlich sollten mögliche Auswirkungen auf die Morphologie lymphatischer Organe am Beispiel der Milz und Lymphknoten histologisch charakterisiert werden.

Die darauffolgenden Tests sollten über die Rolle von Rac1 für verschiedene Bereiche der B-Zellfunktion Aufschluß geben.

Das Hauptaufgabenfeld der B-Zellen liegt in der humoralen Immunantwort. So sollte neben Antikörpertitern in nicht-immunisierten Mäusen die Produktion von Ak im Verlauf von, sowohl Thymus-abhängigen als auch Thymus-unabhängigen, Immunantworten bestimmt werden.

Der Feststellung der Funktionsfähigkeit von Signaltransduktionswegen, und der notwendigen Aktin-Umlagerungen, sollte die umfassende Erforschung der Induzierbarkeit einer Lymphozytopenie durch verschiedene Agenzien, sowie der Migrationsfähigkeit sowohl in einem Chemokingradienten, als auch nach adoptiven Zelltransfer dienen. Zur Verfeinerung und Abgrenzung der Effekte sollte dann in eigenständigen Versuchen zusätzlich die durch exogene Stimuli induzierte Bildung von Aktin-Filamenten und die für Genregulation notwendige Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern untersucht werden.

Die vielfältigen Abhängigkeiten der B-Zellen von Rac1 sollten *in vivo* und *in vitro* analysiert werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

4.1.2 Geräte

Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), pH-Meter (Inolab, Weilheim), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, CH), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg), Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Munzingen), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen).

Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmal Injektionskanülen 0,45 × 12 mm	Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan
Einmal Injektionskanülen 0,70 × 30 mm	Braun, Melsungen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Plastik-Petrischalen	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen 5 ml (FACS)	BD Falcon, Lincon Park, NJ, USA
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen

Sterilfilter 0,22 μm Millex[®]-GP

Millipore, Bedford, MA, USA

4.1.4 Proteine und Oligonukleotide

Hühner-Ovalbumin (*albumin, chicken egg, Grade V*) wurde von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) hergestellt:

#28: 5'-TACTCCAAGGGGCTCACATCTT-3'

#19: 5'-CCATGGTGATACAAGGGAC-3'.

4.1.5 Antikörper

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper für Durchflußzytometrie und ELISA

Spezifität (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
BrdU	FITC	B44	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD3	FITC	BM10-37	BD Pharmingen
CD4	PE	L3T4	BD Pharmingen
	PerCP		
	APC		
CD5/Ly-1	BIO	53-7.3	BD Pharmingen
CD8	PE	Ly-2	Caltag, San Francisco, CA, USA
	APC		BD Pharmingen
CD11b	FITC	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	PE	HL3	BD Pharmingen
CD16/CD32	-	2.4G2	BD Pharmingen
CD19	FITC	1D3	BD Pharmingen
	PE		
	PerCP		
	APC		
CD21/CD35	FITC	7G6	BD Pharmingen

CD23	BIO	B3B4	BD Pharmingen
CD25	FITC	7D4	BD Pharmingen
CD40	-	FGK-45.5	freundlicherweise von T.Rolink zur Verfügung gestellt
CD43/Leukosialin	BIO	S7	BD Pharmingen
CD45R/B220	BIO	RA3-6B2	BD Pharmingen
	FITC		
	PE		
	PerCP		
	APC		
CD45.1/LCA	FITC	A20	BD Pharmingen
CD90.2/Thy-1.2	BIO	53-2.1	BD Pharmingen
CD138/Syndecan-1	PE	281-2	BD Pharmingen
I-A ^b	PE	AF6-120.1	BD Pharmingen
IgM	HRP	polyklonal	Serotec, Oxford, England
	-	F(ab') ₂	Jackson Immuno-Research Inc., West Grove, PA, USA
IgG	HRP	polyklonal	Serotec
IgG1	HRP	polyklonal	Southern Biotech Associates, Inc., Birmingham, AL, USA
	APC	X56	BD Pharmingen
IgG2a	HRP	polyklonal	Southern Biotech
IgG2b	HRP	polyklonal	Southern Biotech
IgG3	HRP	polyklonal	Southern Biotech
MOMA-1	BIO		BMA Biomedicals AG, Augst, CH
Myc	-	9E10	Covance, Richmond, CA, USA

APC-konjugiertes Streptavidin wurde von der Firma Caltag (San Francisco, CA, USA) bezogen.

PerCP-konjugiertes Streptavidin wurde von der Firma BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) bezogen.

Alexa-568-konjugiertes Phalloidin wurde von der Firma Molecular Probes (Leiden, NL) bezogen.

FITC-konjugiertes Annexin V wurde von der Firma Bender Med Systems (Wien, A) bezogen.

4.1.6 Versuchstiere

Die hier verwendeten CD19/Rac1-N17 transgenen Mäuse wurden vor Beginn dieser Arbeit kreiert. Dazu wurde die aus einer Cosmid-DNA stammende, 4200 Basenpaare (bp) lange, 5'-Region des humanen CD19 Gens (Kleindienst, P. *et al.* 2000) isoliert (zur Verfügung gestellt von M.Bussinger, Wien, A). Parallel dazu wurde die Sequenz für Rac1-N17, sowie den Myc-Marker (humanes c-myc, Aminosäuren: 409-419) durch Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *HindIII* aus dem Plasmid pGEM1-Myc-Rac1-N17#6 (Guillemot, J. C. *et al.* 1997) isoliert. Die *splice-donor* und *acceptor* sowie die poly-A-Sequenz des Kaninchen- β -Globingens wurden durch Restriktionsenzymverdau mit *XhoI* und *BamHI* aus dem Plasmid pDOI5 (Kouskoff, V. *et al.* 1993) isoliert. Beide Fragmente wurden anschließend ligiert und die Orientierung durch Restriktionsenzymverdau und DNA-Sequenzanalyse überprüft. Das linearisierte transgene Konstrukt (Abb. 4.1) wurde in fertilisierte C57BL/6 Maus-Oozyten injiziert (Hogan B, C. F., Lacy E, 1986). Zwei transgene Nachkommen wurden mittels Southern-Analyse und PCR identifiziert.

Bei der Analyse auf RNA Ebene (Southern-Analyse) wurde festgestellt, daß die beiden transgenen Tiere deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke aufweisen. Um die somit erhaltene Möglichkeit einer dosisabhängige Untersuchung der Effekte des Transgens zu nutzen, wurden beide Tiere in die Zucht genommen. Im folgenden wurden die, das Transgen tragenden, Nachkommen der beiden Zuchtlinien entsprechend der Expressionsstärke, sinngemäß als tg^{lo} für die niedrigexprimierenden transgenen Mäuse und tg^{hi} für die hochexprimierenden Mäuse bezeichnet.

Die Tiere wurden in den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt. Für die in dieser Arbeit präsentierten Experimente fanden Tiere der Generationen F5 bis F14 im Alter von 8-16 Wochen Verwendung. Als Kontrollgruppen (Wildtyp, wt) dienten jeweils PCR-negative Nachkommen gleicher Generation und gleichen Alters, beider transgener Zuchtlinien. Es wurden insgesamt über 2400 Tiere benötigt.

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gehalten.

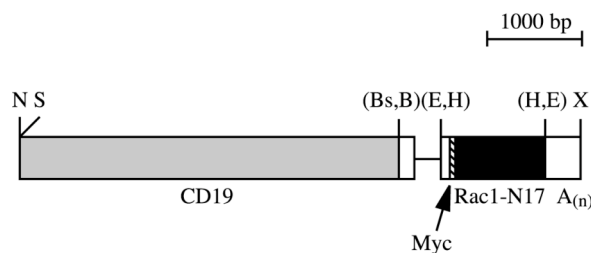


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des transgenen Konstrukts. Grau: CD19 5'-Region (human), weiß: Splice-Donor-, Splice-Acceptor- und Poly-A-Sequenz (Kaninchen), schraffiert: Myc-Marker, schwarz: Rac1-N17; B, *Bam*HI; Bs, *Bsr*GI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Not*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I und X, *Xho*I. Die Schnittstellen in Klammern wurden beim *blunt end*-Verdau entfernt.

4.1.7 Pufferlösungen und Medien

ACK-Puffer

8,29 g Ammoniumchlorid
 1 g Kaliumhydrogencarbonat
 37,2 mg Na₂EDTA
 H₂O ad 1 l
 pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch
 0,2 µm Filter sterilfiltrieren

PBS

150 mM NaCl
 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat
 pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen

FACS-Puffer²

0,01% Natriumazid (v/v)
 2% FBS (v/v)
 PBS

MACS-Puffer

0,1% BSA (w/v)
 PBS

² Natriumazid (NaN₃) wirkt toxisch, daher wurde bei funktionellen Tests, in denen die Vitalität der Zellen essentiell ist, FACS-Puffer ohne NaN₃ verwendet.

50× TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure (Eisessig) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
BSU-Auftragspuffer	21 g Harnstoff 25 g Saccharose 0,1 M EDTA 1 Spatelspitze Bromphenolblau H ₂ O _{dest} ad 50 ml
Anästhetikum	0,25 ml 2% Rompun® (BayerVital, Leverkusen) 0,5 ml 100 mg/ml Ketavet® (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) PBS ad 5 ml
B-Zellinkubationsmedium	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10% FBS (inaktiviert, v/v) 500 mM β-Mercaptoethanol 1% Penizillin/Streptavidin (v/v)
Migrationsmedium	Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Aidenbach) 0,5% BSA (v/v) 10 mM HEPES
Medium für Gewebeverdau	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 5% FBS (inaktiviert, v/v) 0,5 mg/ml Collagenase A 40 μg/ml DNase I

ELISA-Puffer**10× Waschpuffer**

1010 g NaCl
10 g KCl
10 g Kaliumhydrogenphosphat
57,5 g Dinatriumhydrogenphosphat
H₂O_{dest} ad 5 l

1× Waschpuffer

1 l 10× Waschpuffer
5 ml Tween 20
H₂O_{dest} ad 10 l

Blockierungslösung

0,05% Natriumazid (w/v)
0,5% Milchpulver (w/v, Applichem,
Darmstadt)
PBS

Antikörperfärbelösung

0,05% Tween20 (v/v)
0,5% Milchpulver (w/v)

Kaliumzitratspuffer

42 g Zitronensäure-Monohydrat
950 ml H₂O_{dest}
pH 3,95 mit KOH einstellen
275 µl 30%ige H₂O₂
H₂O_{dest} ad 1 l
bei 4°C im Dunkeln lagern

TMB-Lösung

240 mg TMB
(3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin)
5 ml Aceton
45 ml Methanol
bei RT im Dunkeln lagern

Substratlösung

5% TMB-Lösung (v/v)

Kaliumzitrattpuffer

SDS-PAGE und Western-Blot Puffer**Lysispuffer**

8 g NaCl

6 g TRIS/HCl (pH 7,8)

0,6 g EDTA

0,174 g Phenylmethylsulfonylfluorid

10 ml Igepal CA-630

H₂O_{dest} ad 1 l**1×Ladepuffer (Lämml)**

0,6 g TRIS/HCl (pH 6,8)

10 ml Glycerol

5 ml β-Mercaptoethanol

2 g SDS

H₂O_{dest} ad 100 ml**5×Ladepuffer (Lämml)**

3 g TRIS/HCl (pH 6,8)

50 ml Glycerol

25 ml β-Mercaptoethanol

10 g SDS

H₂O_{dest} ad 100 ml**Trenngelpuffer**

100 g SDS

181,7 g TRIS (pH 6,8)

H₂O_{dest} ad 1 l**Sammelgelpuffer**

100 g SDS

121,1 g TRIS/HCl (pH 8,8)

Laufpuffer	19 g Glycin 3 g TRIS/HCl(pH 8,8) 1 g SDS H ₂ O _{dest} ad 1 l
Transferpuffer	14,4 g Glycin 3 g TRIS/HCl (pH 8,8) 200 ml Methanol H ₂ O _{dest} ad 1 l
Blockierungslösung	0,05% Natriumazid(w/v) 0,5% Milchpulver (w/v, Applichem, Darmstadt) PBS
Antikörperfärbelösung	0,05% Natriumazid (w/v) PBS

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien

Die Gewebeprobe, hier Schwanzspitzen, werden mit einem sterilen Skalpell in 1-2 mm große Stücke geschnitten. Das blutige Anfangsstück wird dabei verworfen, um Kontaminationen mit Blut anderer Mäuse zu vermeiden. Die Gewebeprobe wird zusammen mit 100 μ l sterilem H₂O_{dest} in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wird für 10 min bei 95°C inkubiert, um endogene Peptidasen zu inaktivieren und anschließend kurz zentrifugiert. Dann werden 2 μ l Proteinase K (2 mg/ml) zugegeben und mit dem Ansatz vermischt. Während einer etwa zwölfstündigen Inkubation bei 54°C wird das Schwanzstück verdaut. Bevor die freigesetzte genomische DNA verwendet werden kann,

muß die Proteinase K durch eine zehnmünütige Inkubation bei 95°C inaktiviert werden. Anschließend kann ein Aliquot der DNA direkt in einem PCR-Ansatz verwendet werden.

4.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR, Saiki, R. K. *et al.* 1985; Mullis, K. *et al.* 1986) dient zur *in vitro* Amplifikation eines DNA-Segments, das zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt. Als Primer werden zwei Oligonukleotide verwendet, die spezifisch an die 5'-und 3'-flankierenden Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz hybridisieren. Die DNA-Stränge werden erst durch Hitze denaturiert, dann auf eine Temperatur abgekühlt, die erstens den Primern erlaubt, an ihre Zielsequenzen zu hybridisieren und zweitens der DNA-Polymerase ermöglicht, den komplementären Strang zu synthetisieren. Die Reaktion findet unter einem hohen molaren Überschuß an Oligonukleotid-Primern und den vier dNTP statt. Alle Schritte werden mehrmals wiederholt, was zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA führt, da die Produkte einer Amplifikationsrunde wieder für die nächste zur Verfügung stehen. Die DNA-Polymerisation erfolgt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien, A. *et al.* 1976).

PCR-Reaktionsbedingungen

2,5 µl Primer #19 (10 pmol/µl)
2,5 µl Primer #28 (10 pmol/µl)
2 µl MgCl₂ (12,5 mM)*
2,5 µl 10× NH₄-Puffer*
2 µl dNTP-Mix (5 mM)#
0,25 µl Panscript DNA-Polymerase (5 U/µl)*
1 µl DNA (aus 4.2.1.1)
H₂O_{dest} ad 25 µl

* Pan Biotech GmbH, Aidenbach

Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA

Die Amplifikation des DNA-Fragments erfolgte im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit Hilfe des folgenden Programms:

96°C 5 min.

30 Zyklen: 96°C 30 s., 53°C 30 s., 72°C 45 s.

1 Zyklus 72°C 10 min.

kühlen

Sequenzen der Primer:

#28: 5'-TACTCCAAGGGGCTCACATCTT-3' (hCD19 Position 38-59 in der 5'-untranslatierten Sequenz über dem ATG-Kodon = Sense-Primer)

#19: 5'-CCATGGTGATACAAGGGAC-3' (β -Globin Position 691-673 der kodierenden Sequenz = Antisense-Primer)

Mit diesen Primern wird ein DNA-Stück von 420 bp amplifiziert (siehe Abb. 4.2).

4.2.1.3 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, J. F., E.F. und Maniatis, T. 1989) diente der Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. Es wurden Horizontalgele verwendet, die 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer enthielten. Der flüssigen Agaroselösung wurden zur späteren Analyse der DNA-Banden mit UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen) 7 μ l pro 150 ml Gelvolumen einer 0,1%igen (w/v) Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit BSU-Auftragspuffer im Verhältnis 1:5 (v/v) vermischt. Als Längenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V in einer Elektrophoresekammer (Werkstatt, Institut für Immunologie, München) mit 1 \times TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen) fotografiert. Abb. 4.2 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer PCR, wie sie routinemäßig zur Genotypisierung der Mäuse des Stammes CD19/Rac1-N17 eingesetzt wurde.

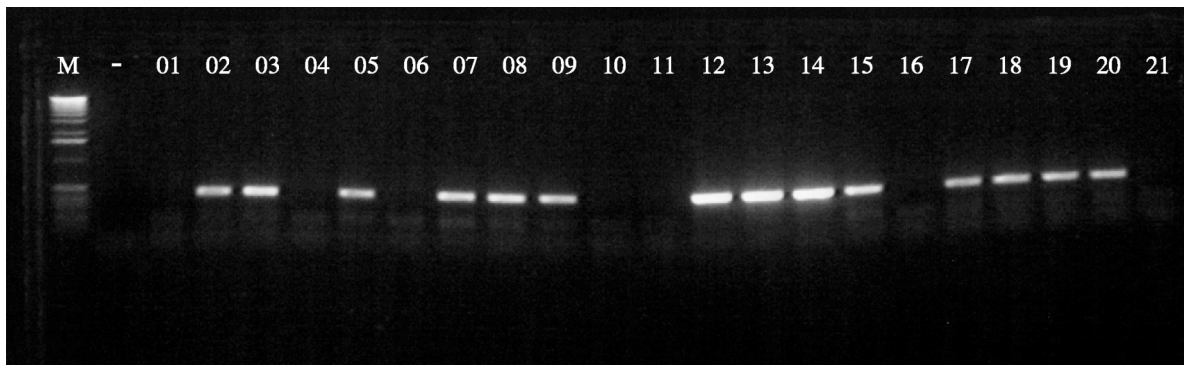


Abb. 4.2: Repräsentatives Beispiel einer DNA-Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten zur Maus-Genotypisierung. Amplifiziert wurde ein DNA Stück von 420 bp. Die Mäuse, deren DNA in den Reihen 02, 03, 05, 07, 08, 09, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19 und 20 aufgetragen wurde, sind positiv für das Transgen Rac1-N17, die Mäuse deren DNA in den Reihen 01, 04, 06, 10, 11, 16 und 21 zu sehen ist, sind negativ für das Transgen. - = Negativkontrolle; M= Marker; hierfür wurde die 1 kb Leiter verwendet.

4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

4.2.2.1 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut

Für die Blutabnahme wurde die Maus unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führte zur Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und somit zur Förderung der Durchblutung. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden der Maus einige Tropfen (ca. 150 bis 200 μ l) Blut entnommen, davon wurden 100 μ l sofort mit ca. 50 μ l Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml, Ratiopharm, Ulm) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern.

Um die Erythrozyten aus einer Blutsuspension zu entfernen, wurde diese in 2 ml ACK-Puffer suspendiert und bei Raumtemperatur 5 min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Da Erythrozyten eine Natrium-Kalium-Pumpe fehlt, können diese die einströmenden Ionen nicht mehr aus der Zelle befördern. Um den osmotischen Druck auszugleichen, strömt Wasser in die Zellen und bringt diese dadurch zum Platzen. Nach Ablauf der Inkubation erscheint die zunächst sehr trübe Suspension klar, da die zahlreichen Erythrozyten lysiert sind und sich nun nur noch wenige Zellen in Lösung befinden. Die Zellsuspension wurde dann mit 10 ml FACS Puffer verdünnt, bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend deren Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

4.2.2.2 Serumgewinnung aus peripherem Blut

Zur Serumgewinnung wurde das Blut nicht mit Heparin vermischt, sondern 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 3000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand (Serum) wurde in ein neues Gefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.2.3 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, äußerlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert.

Die Lage von Thymus, Milz und Lymphknoten kann Abb. 4.3 entnommen werden. Die Lymphknoten wurden mit feinen Pinzetten entnommen und bis zur weiteren Verwendung in FACS-Puffer auf Eis gelagert.

Die Milz befindet sich in der linken mittleren Bauchhälfte und ist ein längliches, dunkelrotes Organ. Sie kann mit einer feinen Schere herausgelöst und in FACS-Puffer auf Eis gelagert werden.

Um den Thymus zu entnehmen, wurde der Brustkorb geöffnet. Dabei galt es darauf zu achten, daß die mit direkt darunter liegenden blutführenden Gefäße und das Herz nicht verletzt werden. Der Thymus besteht aus zwei teilweise übereinander liegenden, weißlichen Lappen. Nach Entnahme wird der Thymus im FACS-Puffer auf Eis aufbewahrt.

Bei allen Organentnahmen sollte darauf geachtet werden, das Fett zu entfernen, da dies bei der späteren Verarbeitung zu viele Zellen bindet und bei Analysen störend wirken kann.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe in einer Petrischale (Ø 5cm) in etwas FACS-Puffer zwischen zwei Gazestückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Porengröße 100 µm) mit dem Stempel einer Injektionsspritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im gewünschten Puffer oder Medium suspendiert. Die aus der Milz gewonnene Zellsuspension wurde anschließend einer Erythrozytenlyse unterzogen.

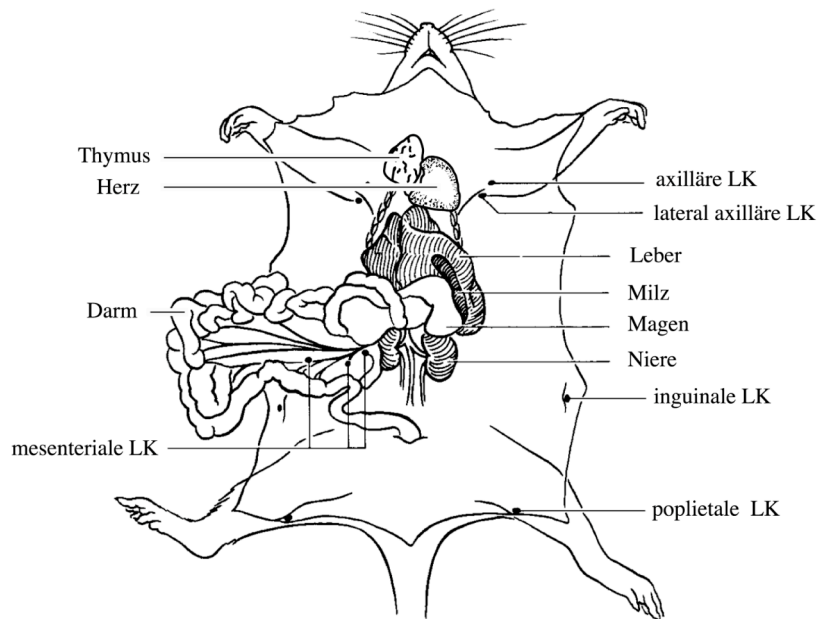


Abb. 4.3: Lage der wichtigsten Organe der Maus (Quelle: (Reeves, J. P. R., P. A. 2001), verändert).

4.2.2.4 Herstellung einer Einzelzellsuspension mit Stromazellen

Bei der unter 4.2.2.2 beschriebenen Vorgehensweise werden Stromazellen der Organe nicht mit in die Suspension überführt. Ist es notwendig bei den Untersuchungen Stromazellen mit einzubeziehen, kann das Organ diesem Zweck entsprechend jedoch auch anders verarbeitet werden.

Das herauspräparierte Organ wurde in 5 ml Medium (Medium für Gewebeerddau) mit Hilfe zweier Skalpellklingen (Aesculap, Tuttlingen) in kleine Stücke zerschnitten und für 20 min bei 37°C in einem Schüttler (Infors, Bottmingen, CH) inkubiert, dabei wurden Zell-Zell-Verbindungen enzymatisch gelöst. Um die Aktivität der im Medium enthaltenen Enzyme zu inhibieren, wurde zu den Proben je 25 μ l 0,5 M EDTA zugegeben und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in FACS-Puffer suspendiert, beziehungsweise im Fall der Milz zunächst einer Erythrozytenlyse unterzogen. Wie in Abb. 4.4 am Beispiel des Thymus gezeigt, enthielt die so gewonnene Suspension neben Thymozyten (LCA⁺) auch Stromazellen (LCA⁻)

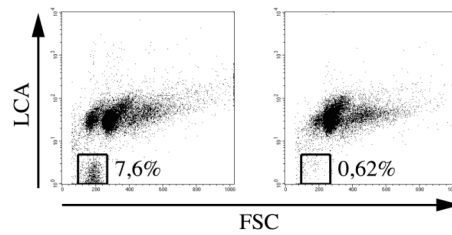


Abb. 4.4: Vergleich des Stromazellenanteils in unterschiedlich präparierten Zellsuspensionen. Thymus einer Wildtyp-Maus wurde entweder enzymatisch verdaut (linkes *dot plot*, Methode 4.2.2.3) oder zerrieben (rechtes *dot plot*, Methode: 4.2.2.2). Die Präparationen enthielten jeweils unterschiedlich viele Stromazellen (LCA).

4.2.2.5 Erythrozytenlyse in der Milzzellsuspension

Um die Erythrozyten aus einer Milzzellsuspension zu entfernen, wurde diese in 1 ml ACK Puffer suspendiert und 4 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 4 ml FACS Puffer verdünnt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

4.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Zellzählgerätes Coulter Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) bestimmt. Die Arbeitsmethode dieses Gerätes basiert auf der meßbaren Veränderung des elektrischen Widerstandes, die von einer Zelle ausgelöst wird, die in einem Elektrolyt suspendiert ist und eine Kapillaröffnung zwischen zwei Elektroden passiert. Die Höhe des ausgelösten elektrischen Impuls ist dabei proportional zu dem Volumen der Zellen, wohingegen die Anzahl der Impulse die Zahl der aufgenommenen Zellen wiedergibt. Durch Zugabe von Zap-O-Globin (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) werden nur lebende Zellen gezählt.

4.2.2.7 Oberflächenfärbung von Zellen mit fluorchrommarkierten Antikörpern

Um unerwünschte, nicht-antigenspezifische Bindungen von Antikörpern an Fc γ -Rezeptoren zu unterbinden, wurden zu 100 μ l Zellsuspension 5 μ l CD16/CD32 Antikörper (0,5 mg/ml)

zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend wurden 100 μl in eiskaltem FACS Puffer entsprechend vorverdünnter Antikörper zugegeben, gut gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Falls notwendig, wurde nun eine Färbung mit einem sekundären Antikörper oder Reagens wie z.B. Streptavidin durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift verblieben ca. 200 μl in dem Reaktionsgefäß.

4.2.2.8 Intrazelluläre Färbung von Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern

Um intrazellulär exprimierte Proteine nachweisen zu können, wurden aufgereinigte beziehungsweise oberflächenmarkierte Zellen fixiert und permeabilisiert, um den fluorochrommarkierten Antikörpern Zugang zum stabilisierten Zellinneren zu verschaffen. Dazu wurde die Zellsuspension bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 200 μl *Cytofix/Cytoperm*-Puffer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit *Perm/Wash*-Puffer (BD Pharmingen) gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit einem in *Perm/Wash*-Puffer entsprechend vorverdünnten Antikörper für 20 min auf Eis. Nach Entfernung ungebundener Antikörper in einem weiteren Waschschrift wurde, falls notwendig, eine Färbung mit einem sekundären Antikörper oder Reagens durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 250 μl FACS-Puffer aufgenommen.

4.2.2.9 Durchflußzytometrie (FACS Analyse)

Mit einem FACS-Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) können die relative Größe, Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim einzelnen Passieren einer Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle. Granulozyten und Makrophagen enthalten mehr Granula als Lymphozyten und weisen daher ein höheres SSC-Signal auf. Tote Zellen haben normalerweise mehr Granula als lebende Lymphozyten, sind aber deutlich kleiner. Die Fluorochrome, mit denen die

Zellen gegebenenfalls markiert wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektronische Signale konvertiert und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen kann die interessierende Zellpopulation durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dargestellt wird oder das Punktwolkendiagramm (*dot plot*), bei dem zwei Streugrößen beziehungsweise Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCaliburTM-Durchflußzytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit zwei Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (488 und 633 nm). Die Datenaufnahme und -analyse erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA).

4.2.2.10 Generierung von Knochenmarkschimären

Mindestens zehn Wochen alte Mäuse wurden an Tag -2 und 0 mit je 550 rad einer Cäsium-137-Quelle (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Kanata, Ontario, CDN) bestrahlt. Sechs Stunden nach der letzten Bestrahlung wurden pro Maus 4×10^6 Knochenmarkszellen i.v. injiziert. Um eine mögliche bakterielle Infektion während der ersten drei Wochen der Rekonstitution des hematopoetischen Systems zu vermeiden, wurde dem Trinkwasser Neomycin zugegeben (1,17g/l Trinkwasser).

4.2.2.11 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die magnetische Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) beruht auf der Separation von Zellen mit Antikörpern, die mit paramagnetischen Partikeln (MACS *Microbeads*) gekoppelt sind. Die Separation erfolgt mit Hilfe einer Säule, die in ein starkes Magnetfeld plaziert wird. Die magnetisch markierten Zellen werden dadurch in der Säule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen durchfließen. Sobald die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen wird, können die magnetisch markierten Zellen eluiert werden. In dieser Arbeit fand die

positive Selektion, für eine geringfügig höhere Reinheit, bei biochemischen Analysen und die negative Selektion, zwecks Vermeidung einer möglichen Stimulierung der B-Zellen, über B220-Anwendung. B-Zellen wurden bei der positiven Selektion mit biotinkoppletten B220-Antikörpern markiert, bei der negativen Selektion wurden nicht-B-Zellen aus der Milz mit biotinkoppletten CD43-Antikörpern markiert. Zur Isolation dienten dann streptavidinkoppelte *Microbeads*. Es wurden nur entgaste Puffer verwendet. Die Suspensionen wurden mit 10 μl Microbeads und 90 μl MACS-Puffer pro 10×10^6 Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit dem 20-fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen. Um Zellaggregate zu entfernen, wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Porengröße 51 μm , Reichelt Chemie Technik, Heidelberg) filtriert, bevor sie auf die gemäß den Angaben des Herstellers äquilibrierte Säule gegeben wurden. Maximal 2×10^8 Zellen pro 500 μl wurden auf die Säule aufgetragen, welche in einem Magneten befestigt war. Für die positive Selektion von bis zu 10×10^6 beziehungsweise 100×10^6 Zellen wurde eine MS^+ beziehungsweise LS^+ -Säule verwendet. Die Zellen wurden mit 3 \times 500 μl beziehungsweise 3 \times 3 ml MACS-Puffer für MS^+ beziehungsweise LS^+ -Säulen gewaschen. Die durchgeflossenen Zellen wurden als negative Fraktion gesammelt. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen als positive Fraktion mit 2 \times 500 μl beziehungsweise 2 \times 3 ml MACS-Puffer eluiert.

4.2.2.12 Nachweis von Apoptose und Nekrose

Der Zelltod kann auf zwei Arten erfolgen, durch Apoptose oder Nekrose. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zellinhalte frei werden und im Gewebe eine inflammatorische Antwort induzieren, wird dies durch den Vorgang der Apoptose vermieden. Eines der ersten Anzeichen von Apoptose ist die, im Zuge der Veränderung der Plasmamembran erfolgende, Translokation von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Seite. Phosphatidylserin wird so für eine extrazelluläre Detektion mit Annexin V zugänglich (siehe Abb. 4.5). Annexin V ist ein Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin und bindet an Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin. Propidiumjodid (PJ) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert. Er kann die Plasmamembran von lebendigen Zellen oder solchen, die sich in Anfangsstadien der Apoptose befinden nicht durchdringen. Zellen, die sich jedoch in späteren Phasen der Apoptose befinden beziehungsweise tot sind, haben die Integrität ihrer

Plasmamembran verloren und sind durchlässig für PJ. Mit Hilfe einer Färbung mit Annexin V und PJ können also lebendige Zellen (Annexin V⁻, PJ⁻) von apoptotischen Zellen (AnnexinV⁺, PJ⁻) und toten (nekrotischen) oder Zellen im Endstadium der Apoptose unterschieden werden (Annexin V⁺, PJ⁺).

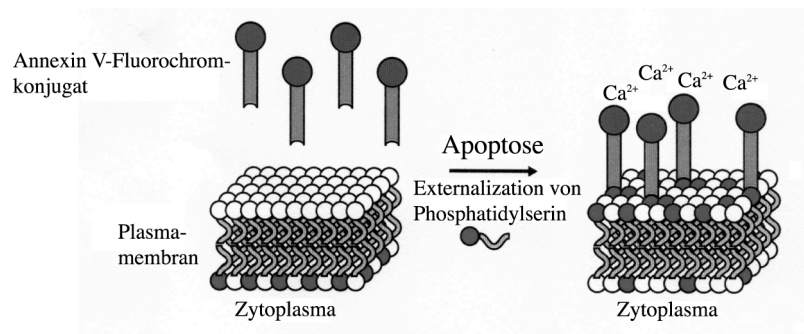


Abb. 4.5: Graphische Darstellung der Bindung von Annexin V an in der Plasmamembran exponiertes Phosphatidylserin. (Quelle: Produktbeschreibung, BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), verändert).

Annexin V wird im Ca²⁺ FACS-Puffer (FACS-Puffer + 2 mM CaCl₂) vorverdünnt. Die Färbung erfolgt analog zu der weiter oben beschriebenen Färbung mit fluorochrommarkierten Antikörpern. Im Gegensatz dazu ist für PJ keine gesonderte Färbung notwendig, es wird kurz vor Analyse zur Probe hinzugegeben (Endkonzentration 0,8 µg/ml).

4.2.2.13 Adoptiver Transfer von CFSE markierten B-Zellen

Der adoptive Transfer von mit einem Fluorochrom markierten Zellen in syngene Mäuse erlaubt die Untersuchung des Migrationsverhaltens dieser Zellen *in vivo* (Pape, K. A. *et al.* 1997).

Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus Milzen von CD19/Rac1-N17 transgenen und Wildtyp-Mäusen hergestellt. Die Erythrozyten in der Suspension wurden lysiert und B-Zellen mittels MACS-Separation angereichert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1-50×10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Färbung mit Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE, 1 µM) wurde für 10 min bei 37°C im Wasserbad durchgeführt und durch Zugabe eines Volumens FBS gestoppt. Vor der Injektion wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Jeder Maus

wurden je nach Versuch zwischen $5\text{-}20 \times 10^6$ B-Zellen in $500 \mu\text{l}$ PBS in die laterale Schwanzvene injiziert.

Die Analyse des Migrationsverhaltens erfolgte nach 4 Stunden entweder histologisch oder durchflußzytometrisch.

4.2.2.14 Histologie

Direkt nach Entnahme wurden die Organe in *Tissue Tek* (Sakura, Zoeterwoude, NL) eingebettet und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. An einem Kryotom (Leica Microsystems, Wetzlar) wurden $5 \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden bei -20°C für 20 min in Azeton fixiert, anschließend über Nacht im Dunkeln getrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Vor der Färbung müssen die Objektträger auf Raumtemperatur aufgewärmt und die Schnitte für 15 min in PBS, 0,25% BSA, 0,01% NaN_3 rehydriert werden. Unspezifische Färbungen können durch vorherige Inkubation mit PBS 0,25% BSA, 0,01% NaN_3 und 10% normalem Mausserum für 15 min minimiert werden. Hierbei werden die Fc-Rezeptoren auf Zellen im Schnitt, die später mit den Färbeantikörpern reagieren könnten, durch Immunglobuline aus dem Mausserum abgesättigt. Gefärbt wurde bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln. Zwischen den Färbeschritten und nach dem letzten Färbeschritt wurden die Schnitte mit PBS, 0,25 % BSA, 0,01% NaN_3 gewaschen, anschließend in *Fluoromount G* (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) eingebettet.

Die Präparate wurden in einem Fluoreszenzmikroskop (DMXA-RF8, Leica Microsystems) betrachtet, mittels einer Kamera (Sensys CCD, Photometrics, Tucson, AZ, USA) digital fotografiert und mit dem Programm Q-Fish (Leica Microsystems) analysiert. Zwecks Anpassung, insbesondere der Helligkeit und des Kontrasts an das Druckmedium, wurden die Aufnahmen mit Photoshop, Version 5.5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) bearbeitet.

4.2.2.15 *In vitro* Proliferationsnachweis mittels [^3H] Thymidin-Einbau in die DNA

Der Prozeß der Teilung mononukleärer somatischer Zellen ist strikt an die Replikation der Zellkern-DNA gebunden. Zur DNA-Synthese werden Nukleotide benötigt, die in diesem

Versuchsaufbau von den Zellen aus dem Medium aufgenommen werden. Setzt man nun dem Medium radioaktiv markiertes Thymidin zu, so wird auch dieses zur DNA-Synthese mitverwendet und entsprechend proportional zu dieser eingebaut. Zellen deren DNA für eine Messung ausreichend radioaktiv markiert sind, können dann geerntet werden. Deren isolierte und vom freien [³H]-Thymidin gereinigte DNA kann nun analysiert werden.

Aufgereinigte B-Lymphozyten (CD43⁺) aus der Milz wurden in Inkubationsmedium in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml aufgenommen. 100 μ l der Zellsuspension wurden je Kavität einer Flachboden-96-Lochplatte (BD Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) aufgetragen. Danach wurden weitere 200 μ l Inkubationsmedium mit dem entsprechenden Stimulanzien beziehungsweise ohne (Kontrolle) zugegeben. Die Endkonzentrationen betragen: anti-CD40 10 μ g/ml, IL-4 10 ng/ml, F(ab')₂ 10 μ g/ml, LPS 2 μ g/ml. Nach 36 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, wurden 5 μ l [³H]-Thymidin pro Kavität zugegeben (entspricht 1 μ Ci) und die Ansätze für weitere 8 Stunden inkubiert. Die Proben wurden nun entweder direkt weiterverwendet, oder bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Für die Analyse wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät (Scatron Instruments, Oslo, N) geerntet. Die Weiterverarbeitung und Messung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Hierbei wurde die in jeder Probe freigewordene DNA auf ein Feld einer Filtermembran gebracht, gewaschen und fixiert. Die Membran wurde dann mit einem Szintillationscocktail (Wallac, Perkin Elmer, Turku, FIN) versetzt und die Lichtquantität in einem Szintillationszähler (Wallac) gemessen. Die Teilungsrate der Zellen verhält sich hierbei proportional zur gemessenen Radioaktivität.

4.2.2.16 *In vivo* Proliferationsnachweis mittels BrdU-Einbau in die DNA

Bromodesoxyuridin (BrdU, Sigma) ist ein Analogon des DNA-Bausteines Thymidin und kann von Zellen, die die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen, in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Eingebaute BrdU-Moleküle können nach Aufschluß der Zelle und des Zellkerns sowie einem partiellen DNA-Verdau mit Hilfe eines spezifischen anti-BrdU-Antikörpers nachgewiesen werden. Der Prozentsatz der Zellen, die für BrdU färben, wird anschließend durchflußzytometrisch bestimmt. Den Versuchstieren wurde 1 mg BrdU i.p. injiziert, anschließend bekamen die Tiere bis zum Zeitpunkt der Analyse Trinkwasser, das mit 1 mg/ml BrdU versetzt war. Die aus Knochenmark, Milz und inguinalen Lymphknoten gewonnenen Zellen wurden mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt.

Nach dem Waschschrift im FACS-Puffer erfolgte die Weiterbehandlung mit BrdU *Flow Kit* (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Alle folgenden Schritte wurden, mit Ausnahme des DNA-Verdaus, bei 4°C beziehungsweise auf Eis durchgeführt. Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden jeweils 100 μl der Zellsuspension mit 200 μl *Cytofix/Cytoperm*-Puffer für 20 min inkubiert. Vor jedem der nachfolgenden Schritte wurden die Proben mit jeweils 1 ml *Perm/Wash*-Puffer gewaschen. Die Fixierung und Permeabilisierung des Zellkerns erfolgte in einer weiteren Inkubation mit 100 μl *Cytoperm-Plus*-Puffer für 30 min. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μl *Cytofix/Cytoperm*-Puffer für 5 min re-fixiert. Um die DNA für die Antikörperbindung aufzuschließen, wurde diese in einer Inkubation mit 100 μl DNase, 300 $\mu\text{g/ml}$ für 1 Stunde bei 37°C partiell verdaut. Für die intranukleäre Färbung wurden die Zellen mit dem in 100 μl *Perm/Wash*-Puffer vorverdünnten BrdU Antikörper für 30 min inkubiert. Vor der Analyse am FACS-Gerät wurden die Zellen in 250 μl FACS-Puffer aufgenommen.

4.2.2.17 *In vitro* Migration entlang eines Chemokingradienten

Für die *in vitro* Migrationsversuche wurden erythrozytendepletierte Milzzellen im Migrationsmedium für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Diese Vorbereitung sowie die Vermeidung von Isolationsschritten diente dem Ausgleich, beziehungsweise der Vorbeugung möglicher Veränderungen der Zellen die, die Migrationsfähigkeit beeinflussen könnten.

In 24-Lochplatten (Nunc, Wiesbaden) wurden 600 μl Migrationsmedium ohne beziehungsweise mit Chemokin aufgetragen. Die zuvor austitrierten, optimalen Konzentrationen der Chemokine betragen: SDF-1 α 200 ng/ml, 6CKine 1 $\mu\text{g/ml}$, MIP-3 β 1 $\mu\text{g/ml}$, BLC 7 $\mu\text{g/ml}$. Als Migrationsbarriere wurden entsprechend der Herstellerempfehlung *Transwell*-Einsätze mit einem Porendurchmesser von 5 μm verwendet (Corning Costar, Cambridge, MA, USA). Die Porengröße war damit so bemessen, daß die Lymphozyten einerseits nicht widerstandslos durchfallen konnten, andererseits eine aktive Überwindung der Barriere problemlos möglich war.

Für die Bestimmung des prozentuellen Anteils der B-Zellen in der ursprünglichen Suspension wurde ein Aliquot mit B220 angefärbt und am FACS-Gerät analysiert.

Die *Transwell*-Einsätze wurden vorsichtig in die Kavitäten der Platten überführt, und pro Einsatz wurden 100 μl der auf $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellten Suspension zugegeben. Die

anschließende Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. In dieser Zeit migrierten Zellen entsprechend dem Chemokingradienten von der oberen Kammer (*Transwell*-Einsatz) in die untere Kammer (Kavität der Platte). Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die *Transwell*-Einsätze vorsichtig entfernt. Die migrierten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellzählgeräts quantifiziert und der prozentuelle Anteil der B-Zellen erneut am FACS-Gerät bestimmt. Der prozentuelle Anteil der migrierten B-Zellen wurde entsprechend der untenstehenden Formel bestimmt:

$$\% \text{ migrierter B-Zellen} = [n_{(u)} * \%B_{(u)}] / [7,5 \times 10^5 * \%B_{(o)}] * 100$$

$7,5 \times 10^5$: Zellzahl in der oberen Kammer, vor Migration

$n_{(u)}$: Zellzahl in der unteren Kammer, nach Migration

$\%B_{(o)}$: Prozentsatz der B-Zellen in der oberen Kammer, vor Migration

$\%B_{(u)}$: Prozentsatz der B-Zellen in der unteren Kammer, nach Migration

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4.6 schematisch dargestellt.

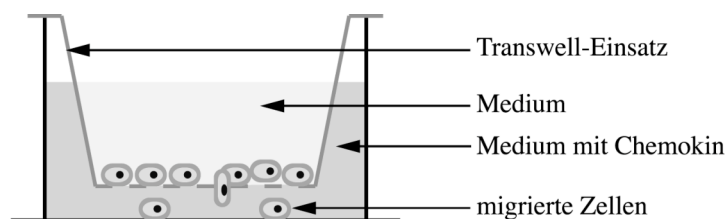


Abb. 4.6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur *in vitro* Migration entlang eines Chemokingradienten. Zellen aus der oberen Kammer (Medium ohne Chemokin) migrieren aktiv über die Membran des *Transwell*-Einsatzes mit Poren von 5 μm Durchmesser in die untere Kammer (Medium mit Chemokin).

4.2.2.18 Nachweis induzierter Aktin-Polymerisation

Der Nachweis der induzierten Neubildung von Aktin-Filamenten (F-Aktin) erfolgte mittels Anfärbung mit fluorchrommarkierten Phalloidin. Phalloidin bindet selektiv an F-Aktin, nicht jedoch an Aktin-Monomere (G-Aktin, Wieland, T. 1987).

Für den Versuch wurden aufgereinigte B-Zellen (CD43⁻) aus der Milz verwendet. Pro Ansatz wurden 1×10^6 dieser Zellen in 100 μl B-Zellinkubationsmedium für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Danach wurden jeweils 100 μl , das entsprechende

Stimulanz enthaltenden, B-Zellinkubationsmedium zugegeben. Die zuvor austitrierten, optimalen Inkubationszeiten und Konzentrationen betragen jeweils für: SDF-1 α 400 ng/ml, 1 min; F(ab')₂ 10 μ g/ml, 5 min; LPS 10 μ g/ml, 15 min; anti-CD40 10 μ g/ml, 30 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zu den Ansätzen je 1 ml eiskaltes *Cytofix/Cytoperm*-Puffer zugegeben (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) und sofort gevortext. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte für 20 min auf Eis. Die weitere Vorgehensweise entsprach sinngemäß dem unter 4.2.2.8 (Intrazelluläre Färbung von Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern) beschriebenen Protokoll. Anstatt des Antikörpers wurde Phalloidin verwendet. Am FACS-Gerät wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Proben gemessen.

Die Quantifizierung der induzierten Aktin-Polymerisation erfolgte anhand der folgenden Formel:

$$\% \text{ Induktion} = \text{MFI}_{(s)} / \text{MFI}_{(-)} * 100$$

MFI_(s): mittlere Fluoreszenzintensität der Phalloidin-Färbung der stimulierten Zellen

MFI₍₋₎: mittlere Fluoreszenzintensität der Phalloidin-Färbung der nicht-stimulierten Zellen

4.2.2.19 Nukleare Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Für die Untersuchung der induzierten Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern wurden aufgereinigte B-Zellen (CD43⁻) aus der Milz verwendet. Pro Ansatz wurden 1 \times 10⁶ dieser Zellen in 100 μ l B-Zellinkubationsmedium für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Danach wurden jeweils 100 μ l, das entsprechende Stimulanz enthaltenden, B-Zellinkubationsmedium zugegeben. Die zuvor austitrierten, optimalen Inkubationszeiten und Konzentrationen betragen jeweils für: F(ab')₂ 10 μ g/ml, 30 min; LPS 10 μ g/ml, 30 min.

Für den Nachweis von NF- κ B in den Nuclei wurden zunächst mit Hilfe des *Nuclear Extract Kit* (Active Motif, Rixensart, B) entsprechend den Herstellerangaben Zellkernlysate hergestellt.

Dazu wurden nach Ablauf der Inkubationszeit zu jedem Ansatz PBS mit *phosphatase inhibitors* zugegeben und sofort zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in *Hypotonic*-Puffer aufgenommen, um die Zellen zu lysieren. Nach einer weiteren

Zentrifugation wurde der, die zytoplasmatische Fraktion enthaltende, Überstand verworfen und das, die Zellkerne enthaltende, Pellet in *complete lysis*-Puffer inkubiert, was zur Kernlyse führte. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und der verbleibende Überstand (Zellkernlysat) bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Der NF- κ B-Nachweis erfolgte nun in einem speziellen ELISA mit Hilfe des *TransAM NF- κ B Kit* (Active Motif, Rixensart, B) entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wurde zunächst eine spezielle, mit NF- κ B-spezifischen Oligonukleotiden beschichtete 96-Lochplatte mit den Zellkernlysaten inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Ansätze mit einem NF- κ B-spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper: Nach dem letzten Waschschrift wurde Substratlösung zugegeben. Die Färbereaktion wurde je nach Geschwindigkeit des Farbumschlags abgestoppt. Der Ablauf ist in Abb. 4.7 schematisch dargestellt. Die optische Dichte (OD_{450}) war dabei direkt proportional zum NF- κ B-Gehalt in den Zellkernen.

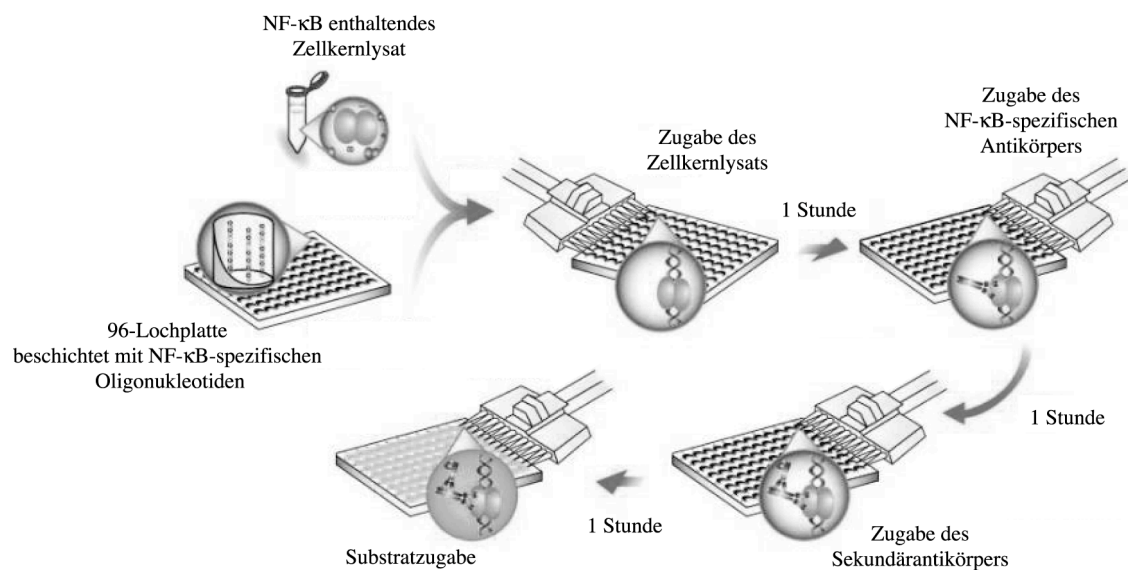


Abb. 4.7: Bestimmung des NF- κ B-Gehalts mit Hilfe des *TransAM NF- κ B Kit* (Quelle: activemotif.com, Produktbeschreibung, verändert).

4.2.2.20 Immunisierung mit Hühner-Ovalbumin (OVA) im kompletten Freund'schen Adjuvans

Komplettes Freund'sches Adjuvans (*complete Freund's adjuvant*, CFA; Sigma, St. Louis, MO, USA) ist ein öliges Adjuvans, das im Tierexperiment als Zusatz zum Antigen dessen Immunisierungseffekt steigert. Es enthält abgetötete Mykobakterien oder deren Zellwandbestandteile (meist *Mycobacterium butyricum*).

Das Antigen (OVA) wurde in PBS gelöst (2 mg/ml) und mit einem Volumen CFA gründlich vermischt, so daß sich eine konsistente Emulsion bildete. Pro Immunisierung wurden jeweils 100 µl der Emulsion an drei Stellen am Rücken der Maus subkutan injiziert. Dies entspricht einer Menge von 300 µg Antigen pro Maus und Immunisierung. Die Mäuse wurden vor der Injektion mit einem Inhalationsanästhetikum (Isofluran-Baxter, Baxter, Lessines, Belgien) betäubt.

4.2.2.21 Intraperitoneale Immunisierung mit TNP-Ficoll und TNP-KLH

Das Antigen (TNP-Ficoll beziehungsweise TNP-KLH, Biosearch Technologies, Novato, CA, USA) wurde in PBS gelöst (0,5 mg/ml). Pro Immunisierung wurden jeweils 200 µl der Lösung in das Peritoneum injiziert. Dies entspricht einer Menge von 100 µg Antigen pro Maus und Immunisierung. Für die Injektion war keine Betäubung notwendig.

4.2.2.22 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)

Mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion können mit einem ELISA (*Enzyme linked immuno sorbent assay*) die gegen ein bestimmtes Antigen gebildeten Antikörper detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA zur Detektion von Serumantikörpern in nicht-immunisierten Mäusen, sowie gegen Ficoll und KLH durchgeführt. Der Nachweis von intranukleärem NF-κB mit Hilfe des ELISA wurde im Abschnitt 4.2.2.19 beschrieben.

Das für die Immunisierungen verwendete Ficoll sowie KLH wurde jeweils in Form von TNP-Konjugaten verwendet. Im Verlauf der Immunantwort werden Antikörper sowohl gegen das eigentliche Antigen, als auch gegen des TNP-Hapten produziert. TNP kann anschließend im ELISA problemlos nachgewiesen werden.

Für den Nachweis der TNP-Antikörper wurden Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) mit TNP-OVA (Biosearch Technologies, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet. Es wurden jeweils 50 μl pro Kavität der Antigen/PBSN-Lösung in die Platten pipettiert, die anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Vor Gebrauch wurden die Platten fünfmal mit PBS gewaschen und dann mit 50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$ Blockierungspuffer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe der zu testenden Seren (50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$), die entsprechend in Blockierungspuffer bei einer Anfangsverdünnung von 1:50 in einer 1:3 Verdünnungsreihe verdünnt waren. Nach zwei Stunden wurde wieder fünfmal gewaschen. Die enzymgekoppelten anti-Maus Antikörper wurden in Antikörperlösung verdünnt, in die Kavitäten verteilt (50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$) und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten wieder fünf Waschschrritte und anschließend die Zugabe von 100 μl Substratlösung pro Napf. Die Färbereaktion wurde je nach Geschwindigkeit des Farbumschlags nach fünf bis 20 Minuten durch Zugabe von 50 μl $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Kavität}$ abgestoppt. Die Färbung der einzelnen Ansätze wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (Vmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) als optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Waschschrritte erfolgten mit einem automatischen Waschgerät (96 PW, SLT Labinstruments, Gröding, Österreich).

Für den Nachweis der Antikörper in Serum nicht-immunisierter Mäuse wurden Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) mit den zu testenden Seren (50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$), die entsprechend in Waschpuffer bei einer Anfangsverdünnung von 1:50 in einer 1:3 Verdünnungsreihe verdünnt waren, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Vor weiterem Gebrauch wurden die Platten fünfmal mit PBS gewaschen und dann mit 50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$ Blockierungspuffer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschschrritten mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe der entsprechend vorverdünnten isotypspezifischen, enzymgekoppelten anti-Maus Antikörper in die Kavitäten (50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$). Die anschließende Inkubation betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Es folgten wieder fünf Waschschrritte und anschließend die Zugabe von 100 μl Substratlösung pro Napf. Die Färbereaktion wurde wie weiter oben beschrieben durchgeführt.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden Meßwerte (OD_{405}) für Serumverdünnungen verwendet, die im linearen Bereich der Titrationskurve lagen.

4.2.3 Biochemische Methoden

4.2.3.1 Herstellung von Zellysaten

Die zu lysierenden Zellen wurden bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 500 μ l eiskalten Lysispuffer pro 1×10^7 Zellen suspendiert und sofort gevortext. Die Inkubation erfolgte auf Eis für 15 min unter gelegentlichem Vortexen. Die Suspension wurde anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 UpM und 4°C für 10 min in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

4.2.3.2 SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Diese Art der Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen anhand ihres Migrationsverhaltens in der Gelmatrix. Dabei wandern kleine Proteine schneller als große. Die Migrationsgeschwindigkeit verhält sich proportional zum Logarithmus des molekularen Radius eines Proteins. Der molekulare Radius korreliert seinerseits mit der Länge der Polypeptidkette gemessen in Aminosäuren.

Es wurde eine SDS-PAGE Apparatur von BIO-RAD Hercules, CA, USA verwendet. Diese wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Für ein 12%iges Trenngel wurden 5 ml Trenngelpuffer, 8 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Rotiphorese Gel-30, Roth) und 6,6 ml H₂O_{dest} gemischt und unter Vakuum entgast. Nach Zugabe von 200 μ l 10% Ammoniumsulfat (w/v) und 8 μ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) wurden zwei Gele gegossen und in der Kammer mit H₂O_{dest} überschichtet. Nach Abschluß der Polymerisation wird das Wasser durch Dekantieren entfernt. Für das 5%ige Sammelgel wurden 1,35 ml Sammelgelpuffer, 1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung und 6,8 ml H₂O_{dest} gemischt und unter Vakuum entgast. Nach Zugabe von 100 μ l 10% Ammoniumsulfat (w/v) und 10 μ l TEMED wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingesteckt. 20 μ l Lysat wurden mit 5 μ l 5xLadepuffer (Lämmli) vermischt, bei 95°C für 3 min denaturiert und in einen vom Probenkamm ausgeformten Auftragsschlitz gegeben. Als Größenmarker diente *FullRangeRainbow* Protein-Molekulargewichtsmarker von Amersham, Little Chalfont, UK. Eventuell übriggebliebene, leere Auftragsschlitze im Gel wurden mit 1xLadepuffer

aufgefüllt, um die Gleichmäßigkeit der Probenmigration zu gewährleisten. Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt Spannung und bei Raumtemperatur im Laufpuffer durchgeführt. Die Dauer richtete sich nach der Laufstrecke der Größenmarker, entsprechend der zu erwartenden Größe der zu detektierenden Proteins und betrug in etwa 1,5 - 2 Stunden.

4.2.3.3 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran, Western-Blot

Um ein Protein mit Hilfe einer spezifischen Antikörperbindung detektieren zu können, muß es zunächst aus dem Gel auf eine Membran transferiert werden.

Dazu wurde die Transferapparatur (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengebaut. Im einzelnen wurde ein Sandwich aus im Transferpuffer getränkten Schwamm, zwei Lagen saugfähigem Papier (Schleicher&Schuell, Dassel), Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Gel, erneut zwei Lagen saugfähigem Papier und Schwamm so in die Transferapparatur eingespannt, daß sich die mit der Nitrozellulosemembran belegte Seite des Gels auf der Pluspolseite befand. Der Transfer wurde bei 70 Volt Spannung, für 1,5 h auf Eis im Transferpuffer durchgeführt. Die Banden der Markerproteine auf der Membran wurden anschließend mit einem Kugelschreiber markiert.

4.2.3.4 Proteindetektion auf der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembran wurde aus der Apparatur entnommen und für 5 min in Blockierungslösung gespült. Danach erfolgte die Sättigung der Proteinbindungsfähigkeit der Membran in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C unter milder Agitation auf einem Schüttler (Heidolph, Schwabach). Die Membran wurde dann dreimal für je 5 min in 10 ml Antikörperfärbelösung gespült. Die Inkubation mit dem, das gewünschte Protein detektierenden und in der Antikörperfärbelösung entsprechend vorverdünnten, Antikörper erfolgte für 1,5 h bei 4°C unter milder Agitation. Die Membran wurde dann erneut dreimal für je 5 min in 10 ml Antikörperfärbelösung gespült und mit dem, an Merretichperoxidase gekoppelten, entsprechenden sekundärem Antikörper für 1,5 h bei 4°C unter milder Agitation inkubiert. Anschließend wurde die Membran weitere dreimal für je 5 min in 10

ml Antikörperfärbelösung gespült, mit einem Lumineszenz-erzeugenden Substrat der Peroxidase (Amersham Pharmacia) bedeckt und für 60 sek ruhend inkubiert. Nach Abtropfen und vorsichtigem Abschütteln der überschüssigen Substratflüssigkeit, wurde die Membran in Lebensmittel-Frischhaltefolie (Roth, Karlsruhe) eingepackt und bei entsprechender Sicherheitsbeleuchtung (rot) zusammen mit einem Film (Tycon Medical Systems, Burgdorf, CH) in eine Kassette eingelegt. Die Expositionszeit wurde jeweils empirisch ermittelt und betrug zwischen 5 sek bis 30 min. Der exponierte Film wurde in einem Automaten (Protec, Oberstenfeld) entwickelt.

4.3 Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte (Student'scher *t*-Test) wurden mit dem Programm Microsoft® Excel 2001 berechnet. Dabei bedeuten: * (signifikant): $p \leq 0,05$, ** (hoch signifikant): $p \leq 0,01$, *** (extrem signifikant): $p \leq 0,001$.



5 ERGEBNISSE

5.1 Expression des Transgens Myc/Rac1-N17

Die im folgenden dargestellten Expressionstests dienten dem Funktionalitätsnachweis des Transgens innerhalb des hier verwendeten Maussystems. Dabei sollte die Expression der dominant-negativen Form der Rac1 GTPase, Rac1-N17, in B-Zellen von PCR positiven Vertretern der beiden transgenen Zuchtlinien überprüft werden.

Bisher gibt es jedoch nur sehr eingeschränkte Möglichkeiten, um zwischen der Wildtyp-Rac1 und der Rac1-N17-Mutante auf Proteinebene zu differenzieren. Insbesondere existiert kein Antikörper, der ausschließlich an die Rac1-N17 Isoform bindet. Um eine Unterscheidung zwischen dem endogenen und dem transgenen Rac1 Protein zu ermöglichen, wurde innerhalb des verwendeten Konstrukts, an die Rac1-N17 cDNA, die Sequenz für den Myc-Marker (humanes c-myc, Aminosäuren: 409-419) angefügt. Diese Modifikation ermöglichte den eindeutigen Nachweis des exprimierten Myc/Rac1-N17 Transgens mit Hilfe des anti-Myc-Antikörpers (Klon 9E10).

5.1.1 Western-Analyse

Die Western-Analyse stellt eine Möglichkeit dar Proteine aus Lösungen, beziehungsweise Zellysaten ihrer Größe nach aufzutrennen und nachzuweisen. Für den Nachweis mit dieser empfindlichen Methode wurden Zellysate von mittels MACS-Separation aufgereinigten B-Zellen (B220⁺) und nicht-B-Zellen (B220⁻) aus Milzen von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere) und transgenen Mäusen verwendet. Bei der MACS-Separation lag die Reinheit der positiven Fraktion bei etwa 90%, die der negativen Fraktion $\geq 95\%$. Das transgene Protein (22,5 kDa) konnte mit Hilfe der Myc-Antikörper-Bindung in B-Zellen von PCR-positiven Tieren nachgewiesen werden. Analog zu der unterschiedlichen Anzahl von Kopien des transgenen Konstrukts in den beiden transgenen Zuchtlinien (tg^{lo}: 2, tg^{hi}: 10-12), konnten in den entsprechenden B-Zellysaten deutlich unterschiedliche Mengen des Myc/Rac1-N17 Proteins detektiert werden. So sind in tg^{hi} B-Zellen etwa 5× mehr des transgenen Proteins vorhanden, als in tg^{lo} B-Zellen. Im Fall der hochexprimierenden

Zuchtlinie, wurde überraschenderweise auch in der Kontrolle (B220⁻) eine deutliche Expression des Transgens nachgewiesen (Abb. 5.1).

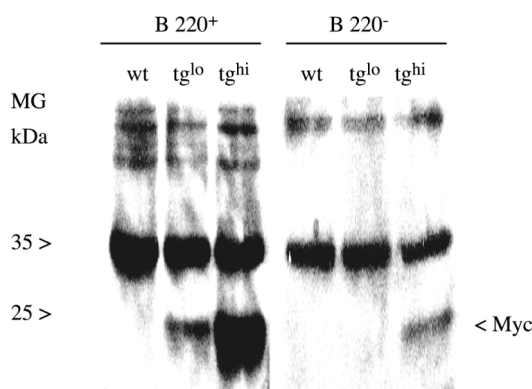


Abb. 5.1: Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens in Milzleukozyten. Nachweis mittels Western-Analyse. Pro Spur wurden je 20 μ l Lysat aufgetragen, dies entspricht 4×10^5 Zellen. Die Detektion erfolgte in B-Lymphozyten (B220⁺), Spur 1-3 und nicht-B-Zellen (B220⁻), Spur 4-6, aus der Milz von jeweils Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere, wt) und transgenen Mäusen (tg^{lo}, tg^{hi}), mit Hilfe des Myc-Antikörpers (Maus IgG1), als Sekundärantikörper diente ein HRP-gekoppelter anti-Maus IgG1-Antikörper.

5.1.2 Durchflußzytometrische Analysen

Der Einsatz der Durchflußzytometrie ermöglicht im Gegensatz zum zuvor dargestellten biochemischen Verfahren (Western-Analyse) eine Expressionsbestimmung auf Einzelzellniveau. Die Vorteile dieser Methode kamen in Untersuchungen zur Geltung, in denen die Information über das Expressionsmuster des transgenen Proteins in Vertretern der beiden transgenen Zuchtlinien vervollständigt und verfeinert werden sollte. Für diese Untersuchungen wurden Einzelzellsuspensionen aus lymphatischen Organen, wie Knochenmark, Milz, inguinalen und axialen Lymphknoten, sowie dem Thymus gewonnen. Nach erfolgter Markierung mittels populationspezifischer Zelloberflächenmarker wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Zum Expressionsnachweis des Transgens wurde hier, wie zuvor auch, der Myc-Antikörper verwendet. Bei allen durchflußzytometrischen Analysen fand ein APC-gekoppelter Sekundärantikörper (anti-Maus IgG1) Anwendung. Mit diesem Verfahren wurde, analog zum vorhergehenden Experiment, die Expression des Transgens sowie deren Stärke zunächst in B-Lymphozyten (B220⁺) und nicht-B-Lymphozyten (B220⁻) aus der Milz untersucht (Abb. 5.2). Die dabei gewonnenen Daten stimmen mit denen der biochemischen Western-Analyse überein. In den B-Lymphozyten der beiden transgenen Zuchtlinien konnten erneut deutlich unterschiedliche Mengen an

Myc/Rac1-N17 detektiert werden. Im Fall der hochexprimierenden Zuchtlinie tg^{hi} wurde auch hier in nicht-B-Zellen ($B220^-$) eine deutliche Expression des Transgens nachgewiesen, während in nicht-B-Zellen der niedrigexprimierenden Zuchtlinie tg^{lo} kein transgenes Protein nachweisbar war.

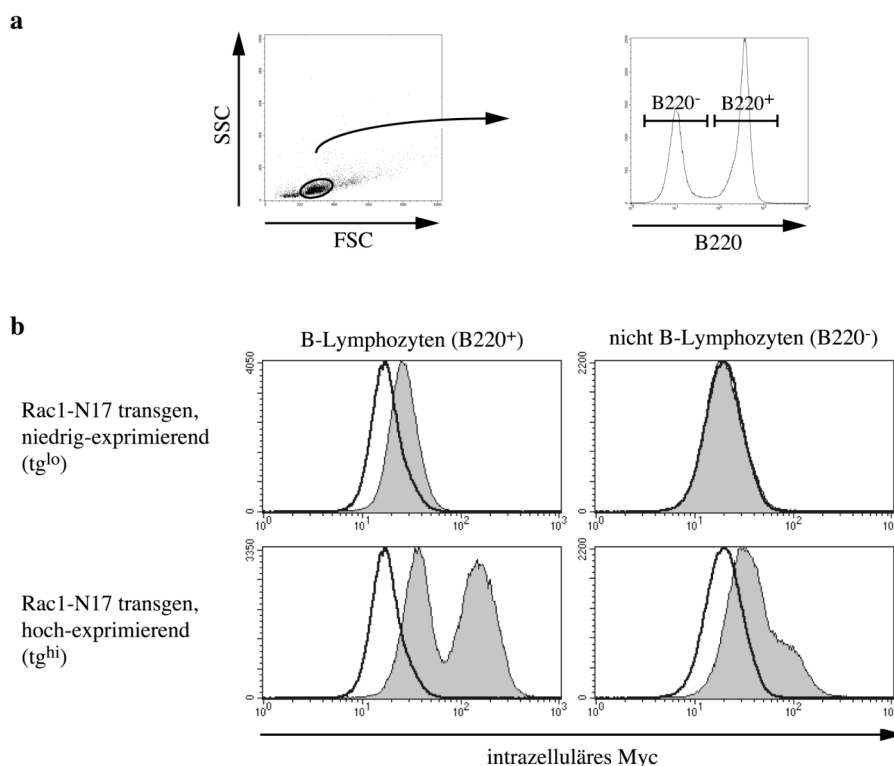


Abb. 5.2: Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens in Milzleukozyten. Durchflußzytometrische Analyse. Einzelzellsuspensionen aus Milzen von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere) und das Myc/Rac1-N17 Transgen hochexprimierenden Mäusen (tg^{hi}) wurden, nach entsprechender Oberflächenfärbung, fixiert, permeabilisiert und in einer intrazellulären Färbung mit Hilfe des Myc-Antikörpers auf die Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens hin untersucht. *Dot plot* (a, links) und Histogramm (a, rechts) zeigen die Auswahl der analysierten Populationen: B-Zellen ($B220^+$, b, links) und nicht-B-Zellen ($B220^-$, b, rechts). Die schwarze, dicke Linie (offene Histogramme: □) entspricht jeweils der Hintergrundfärbung in der zugehörigen Wildtyp-Kontrolle (C57BL/6, PCR-negative Tiere). Die grau ausgefüllten Histogramme: ■ zeigen die Färbintensität in den jeweiligen transgenen Zellen.

Auffallend ist hierbei der Kurvenverlauf im Fall der B-Lymphozyten ($B220^+$) der hochexprimierenden Tiere (tg^{hi} , Abb. 5.2b unteres, linkes Histogramm). In einer weiteren Analyse wurden Milzzellen mit Antikörpern gegen IgM und IgD angefärbt. Diese Färbung erlaubt die Unterscheidung zweier Subpopulationen der B-Zellen in der Milz: IgM^+/IgD^- und IgM^+/IgD^+ (Abb. 5.3a). Die Expressionsanalyse des transgenen Proteins machte in diesem Fall deutlich, daß die Spitzen der Expressionskurve weitgehend jeweils einer bestimmten Population zugeordnet werden können (Abb. 5.3b). So exprimiert die Mehrzahl

der $\text{IgM}^+/\text{IgD}^+$ B-Zellen aus der Milz das Myc/Rac1-N17 Transgen etwa $5\times$ stärker, als die meisten $\text{IgM}^+/\text{IgD}^-$ Zellen gleichen Ursprungs.

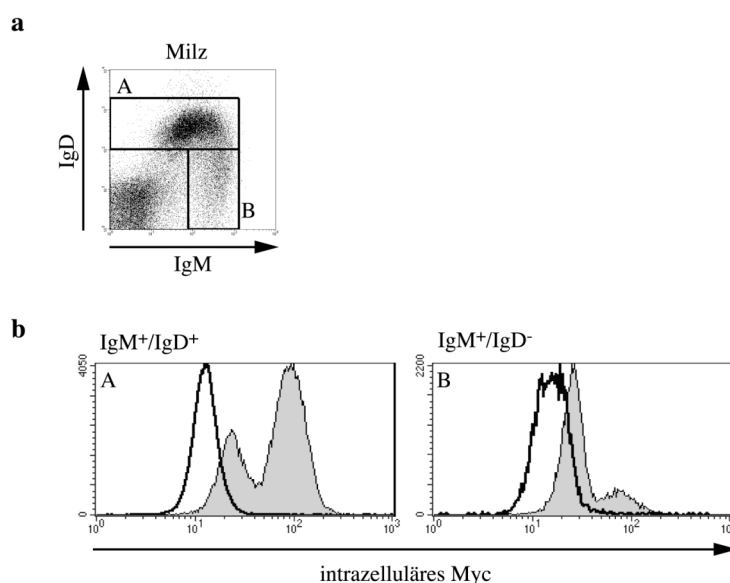


Abb. 5.3: Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens in Milz-B-Zellen. Durchflußzytometrische Analyse. Einzelzellsuspensionen aus Milzen von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere) und das Myc/Rac1-N17 Transgen hochexprimierenden Mäusen (tg^{hi}) wurden, nach entsprechender Oberflächenfärbung, fixiert, permeabilisiert und in einer intrazellulären Färbung mit Hilfe des Myc-Antikörpers auf die Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens hin untersucht. *Dot plot* (a) zeigt die Auswahl der analysierten B-Zellen: $\text{IgM}^+/\text{IgD}^+$ (b, links) und $\text{IgM}^+/\text{IgD}^-$ (b, rechts). Die schwarze, dicke Linie (offene Histogramme: □) entspricht jeweils der Hintergrundfärbung in der zugehörigen Wildtyp-Kontrolle (C57BL/6, PCR-negative Tiere). Die grau ausgefüllten Histogramme: ■ zeigen die Färbeintensität in den jeweiligen transgenen Zellen (tg^{hi}).

In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, daß das transgene Protein im Fall der tg^{lo} Linie in allen untersuchten Subpopulationen der B-Lymphozyten, im Knochenmark (Abb. 5.4a): pro und Prä-B-Zellen ($\text{B220}^{\text{int}}/\text{IgM}^-/\text{IgD}^-$), unreife B-Zellen ($\text{B220}^{\text{int}}/\text{IgM}^{\text{hi}}/\text{IgD}^-$), transitionale B-Zellen ($\text{B220}^+/\text{IgM}^{\text{hi}}/\text{IgD}^+$), reife und rezirkulierende B-Zellen ($\text{B220}^{\text{hi}}/\text{IgM}^{\text{lo}}/\text{IgD}^+$), im Peritoneum (Abb. 5.4b): B-1a-Zellen ($\text{B220}^+/\text{IgM}^+/\text{CD5}^-$), B-1b-Zellen ($\text{B220}^+/\text{IgM}^+/\text{CD5}^+$) und Lymphknoten (Abb. 5.4c), exprimiert wird. Die Expressionsstärke ist in allen Fällen etwa gleich und vergleichbar mit der, der B-Zellpopulation (B220^+) in der Milz.

Im Fall der hochexprimierenden transgenen Tiere (tg^{hi}) wurde das transgene Protein neben B-Lymphozyten auch in allen anderen untersuchten Zellen hämatopoietischen Ursprungs gefunden. Thymozyten (Abb. 5.5a): doppelt-negative ($\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$), doppelt-positive ($\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$), einzel-positive (CD4^+ und CD8^+), periphere T-Lymphozyten: CD4^+ und CD8^+ (Abb. 5.5b), dendritische Zellen (CD11c^+) und Makrophagen ($\text{CD11b}^+/\text{CD11c}^-$, Abb. 5.5c). Auffallend ist vor allem das hohe Niveau der Expression in den Thymozyten.

Dagegen exprimieren periphere T-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen vergleichsweise nur geringe Mengen des Transgens.

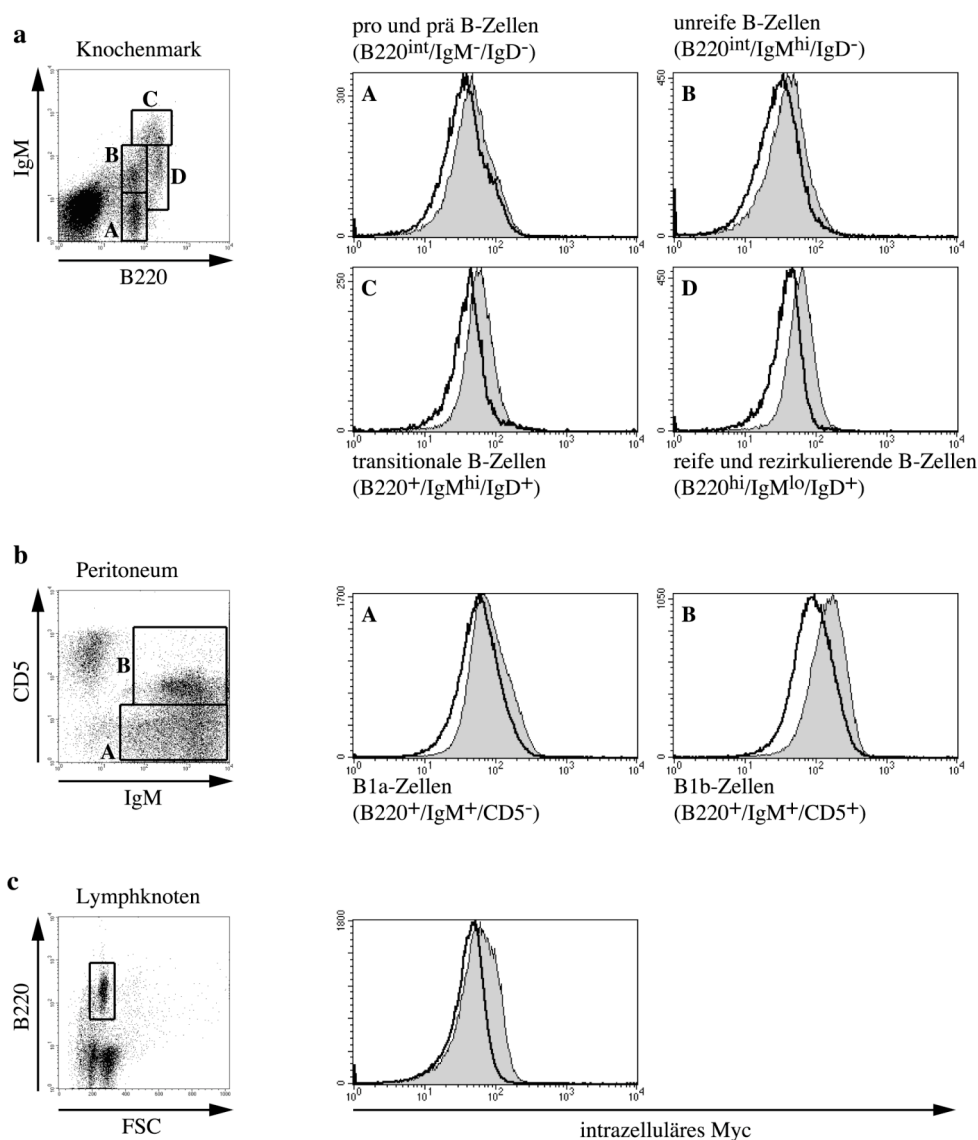


Abb. 5.4: Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens in B-Zellen (tg^{lo}). Durchflußzytometrische Analyse. Einzelzellsuspensionen aus den entsprechenden Organen wurden fixiert und permeabilisiert. *Dot plots* zeigen jeweils die Auswahl der in den Histogrammen dargestellten B-Zell-Populationen. Es wurden B-Zellen aus dem Knochenmark (a), dem Peritoneum (b), sowie inguinalen und axialen Lymphknoten (c) von transgenen Mäusen (tg^{lo}) in einer intrazellulären Färbung mit Hilfe des Myc-Antikörpers auf die Expression des Rac1-Myc/N17 Transgens hin untersucht. Die schwarze, dicke Linie (offene Histogramme: □) entspricht jeweils der Hintergrundfärbung in der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle (C57BL/6, PCR-negative Tiere). Die grau ausgefüllten Histogramme: ■ zeigen die Färbeintensität in den jeweiligen transgenen Zellen.

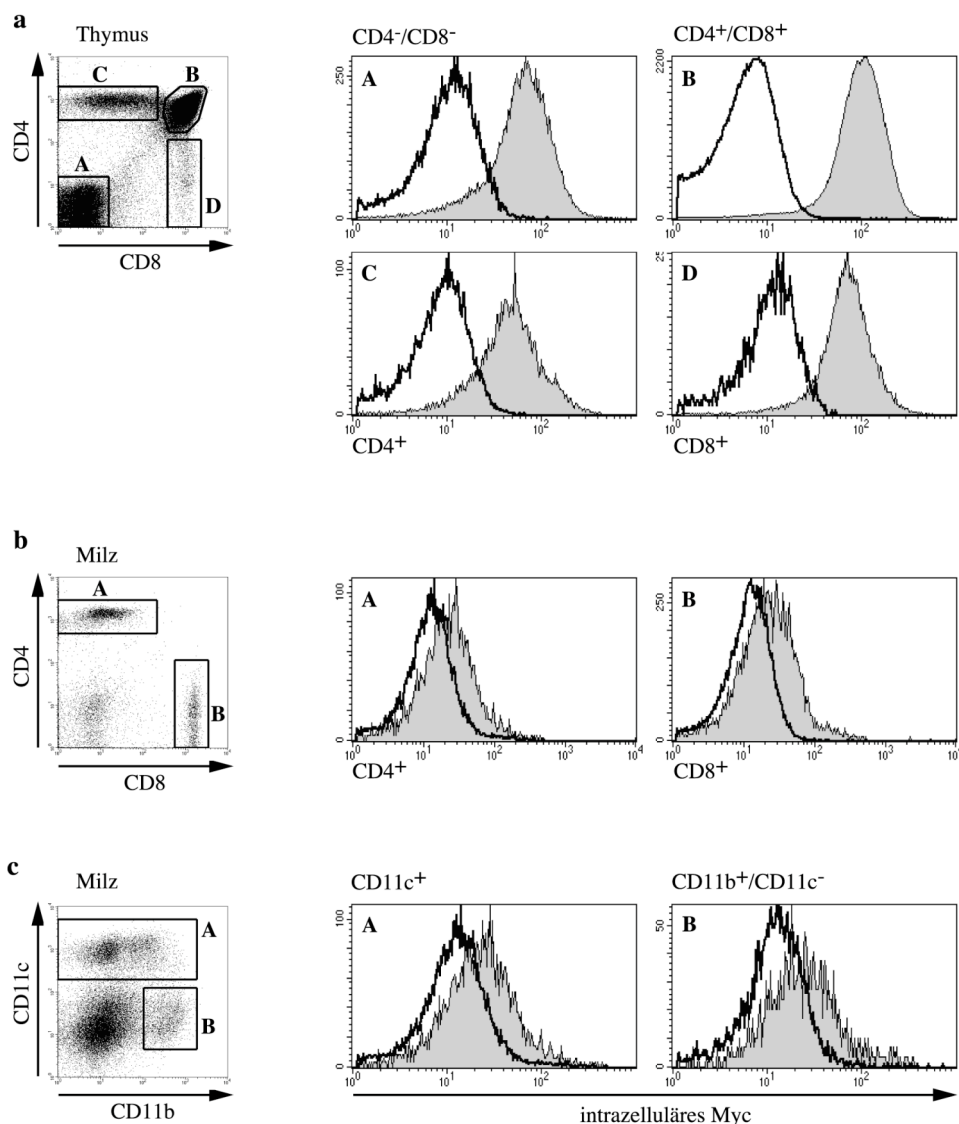


Abb. 5.5: Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens Zellen hämatopoietischen Ursprungs. Durchflußzytometrische Analyse. Einzelzellensuspensionen aus Milzen (a, b) und Thymi (c) von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere) und das Myc/Rac1-N17 Transgen hochexprimierenden Mäusen (tg^{hi}) wurden, nach entsprechender Oberflächenfärbung, fixiert, permeabilisiert und in einer intrazellulären Färbung mit Hilfe des Myc-Antikörpers auf die Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens hin untersucht. *Dot plot* (links) zeigen die Auswahl der analysierten Zellen. Die schwarze, dicke Linie (offene Histogramme: □) entspricht jeweils der Hintergrundfärbung in der zugehörigen Wildtyp-Kontrolle (C57BL/6, PCR-negative Tiere). Die grau ausgefüllten Histogramme: ■ zeigen die Färbintensität in den jeweiligen transgenen Zellen (tg^{hi}).

Aufgrund der fehlenden Spezifität der Expression des Transgens im Fall der hochexprimierenden Tiere (tg^{hi}), die sich, wie bisher gezeigt, auf alle untersuchten Zellen hämatopoietischen Ursprungs erstreckt, sollte in diesen Tieren, in Zellen nicht-hämatopoietischen Ursprungs die Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens untersucht werden. Für diesen Zweck wurden Thymusepithelzellen ausgewählt. Dabei erwies sich die Tatsache als hilfreich, daß alle Zellen hämatopoietischen Ursprungs (außer Erythrozyten) im Thymus das *leukocyte-common-antigen* (LCA, CD45.1) exklusiv exprimieren,

wohingegen Epithelzellen LCA-negativ sind (Thomas, M. L. 1989; Lagasse, E. *et al.* 2000). Nach entsprechendem Gewebeverdau enthielt die Einzelzellsuspension neben Thymozyten (LCA^+), auch Epithelzellen nicht-hämatopoietischen Ursprungs (LCA^- , Abb. 5.6a). Die Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens konnte für nicht-Thymozyten aus der hochexprimierenden (tg^{hi}) Maus nachgewiesen werden. Dagegen exprimieren dieselben Zellen in der niedrigexprimierenden (tg^{lo}) Maus das Transgen nicht (Abb. 5.6b, links). In Thymi von Tieren beider transgenen Zuchtlinien exprimieren B-Zellen, wie erwartet, das Myc/Rac1-N17 Transgen (Abb. 5.6b, rechts).

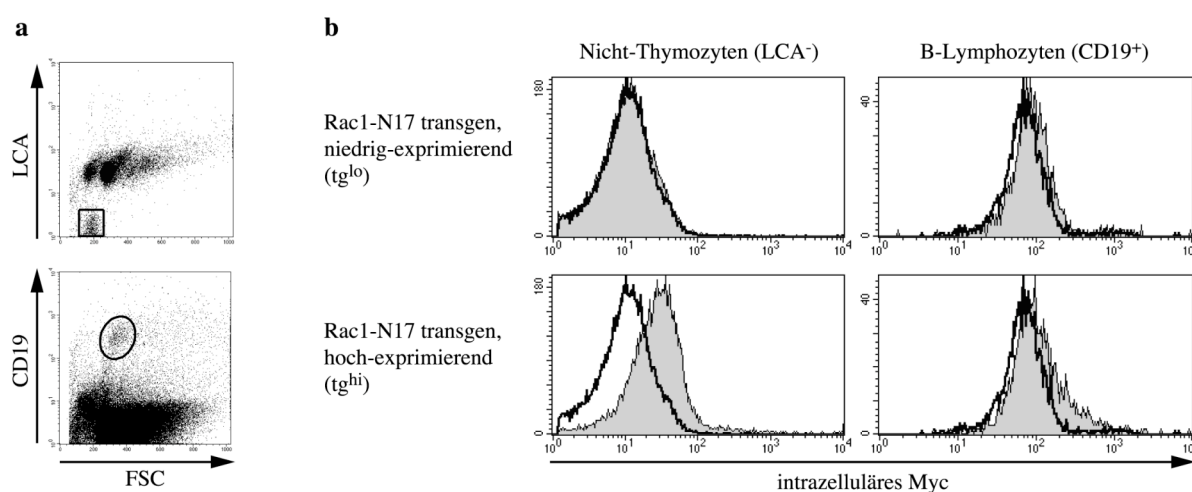


Abb. 5.6: Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens in Zellen des Thymus. Durchflußzytometrische Analyse. Thymuszellen wurden fixiert und permeabilisiert. In vorausgewählten nicht-Thymozyten (LCA^-) und B-Lymphozyten ($CD19^+$, a) von transgenen Mäusen (tg^{lo} , tg^{hi}) wurde mittels einer intrazellulären Färbung mit dem Myc-Antikörper die Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens untersucht (b). Die schwarze, dicke Linie (offene Histogramme: □) entspricht jeweils der Hintergrundfärbung in der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle. Die grau ausgefüllten Histogramme: ■ zeigen die Färbintensität in den jeweiligen transgenen Zellen.

Neben Gedächtniszellen können B-Zellen als terminale Ausdifferenzierungsform auch Antikörper-sezernierende Plasmazellen bilden (Ahmed, R. und Gray, D. 1996). Auf der Oberfläche der B-Zellen in diesem Entwicklungsstadium kann CD19 jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß der transgenen Rac1-N17 Expression in B-Zellen auch auf die humorale Immunantwort untersucht, hierfür mußte zunächst bestimmt werden, ob das transgene Rac1-N17 in den Plasmazellen vorhanden ist.

Plasmazellen sind neben der Abwesenheit des CD19-Moleküls auf ihrer Oberfläche, durch die massive Immunglobulin-Synthese charakterisiert, welche anhand einer intrazellulären Färbung bestimmt werden kann. Daneben exprimieren Plasmazellen CD138 (Syndecan-1).

Bei diesem Adhäsionsmolekül handelt es sich um einen weiteren Marker, der in der Peripherie nur auf Plasmazellen, nicht jedoch auf anderen B-Zellen exprimiert wird (Sanderson, R. D. *et al.* 1989; Lalor, P. A. *et al.* 1992; Driver, D. J. *et al.* 2001). Mit Hilfe dieser Markerkombination können Plasmazellen in der Milz eindeutig von anderen B-Zellpopulationen abgegrenzt werden.

Für die Expressionsanalyse des transgenen Myc/Rac1-N17 Proteins wurden CD19/Rac1-N17 transgene und Wildtyp-Mäuse mit einem Antigen (Hühner-Ovalbumin, OVA) in CFA immunisiert. Am Tag 7 nach Immunisierung fanden sich in der Milz zahlreiche IgM-sezernierende Plasmazellen (Abb. 5.7a, unten). Die Einzelzellsuspensionen aus den Milzen wurden zunächst auf der Zelloberfläche mit CD19 und CD138 angefärbt, danach fixiert und intrazellulär für IgM und Myc markiert. In Plasmazellen (CD19⁺/CD138⁺/intrazellulär IgM⁺, Abb. 5.7a) aus Milzen immunisierter Mäuse der CD19/Rac1-N17 transgenen Zuchtlinien konnte Myc/Rac1-N17 detektiert werden, obwohl CD19 auf der Zelloberfläche nicht mehr nachweisbar war (Abb. 5.7b).

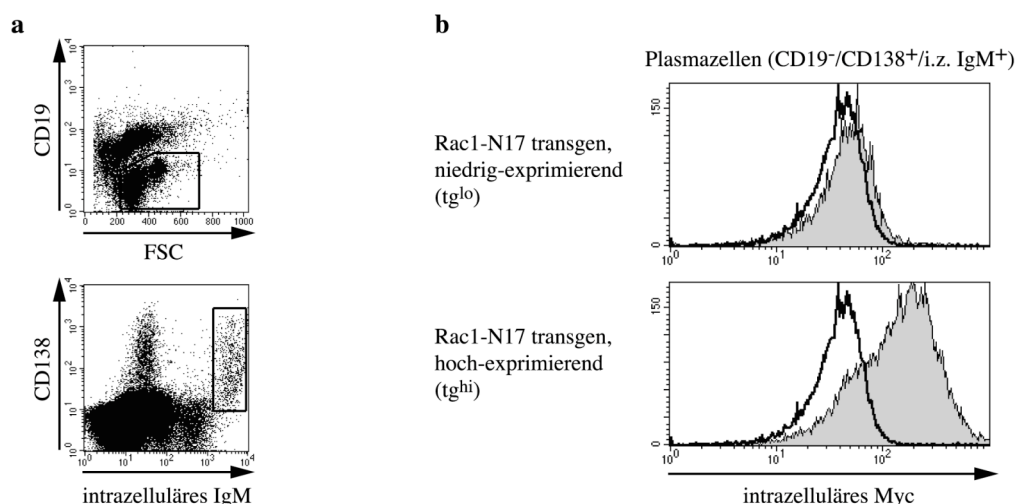


Abb. 5.7: Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens in Plasmazellen der Milz, Durchflußzytometrische Analyse. Milzzellen aus OVA/CFA-immunisierten Mäusen wurden fixiert und permeabilisiert. In vorausgewählten Plasmazellen (CD19⁺/CD138⁺/intrazellulär IgM⁺, **a**) von transgenen Mäusen (tg^{lo}, tg^{hi}) wurde mittels einer intrazellulären Färbung mit Hilfe des Myc-Antikörpers die Expression des Myc/Rac1-N17 Transgens untersucht (**b**). Die schwarze, dicke Linie (offene Histogramme: □) entspricht jeweils der Hintergrundfärbung in der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle (C57BL/6, PCR-negative Tiere). Die grau ausgefüllten Histogramme: ■ zeigen die Färbeintensität in den jeweiligen transgenen Zellen.

5.2 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Entwicklung der B-Lymphozyten

Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen haben gezeigt, daß Rho-GTPasen, darunter auch Rac1, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung verschiedener Säuger-Zelltypen spielen, wie Neuronen (Redmond, L. und Ghosh, A. 2001), Skelettmuskellzellen (Myogenese, Charrasse, S. *et al.* 2003), Cardiomyozyten (Puceat, M. *et al.* 2003), Epithelzellen (Rogers, K. K. *et al.* 2003) aber auch hämatopoietische Zellen (Gomez, M. *et al.* 2000; Gu, Y. *et al.* 2003).

Aufgrund der bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit erwähnten methodischen Einschränkungen, existieren jedoch nur sehr wenige Daten zur speziellen Rolle von Rac1 in der Entwicklung der B-Lymphozyten (Gu, Y. *et al.* 2003). In dem nun folgenden Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der B-Lymphozyten-Entwicklung der CD19/Rac1-N17 transgenen Mäuse auf mögliche Abweichungen vom Wildtyp *in vitro* und *in vivo* eingehend untersucht.

5.2.1 Größen der B Lymphozyten-Populationen in lymphatischen Organen und peripherem Blut

Zu den wichtigsten Organen der Maus, in denen zahlenmäßig bedeutende B-Lymphozyten-Populationen vorhanden sind, gehören: das Knochenmark, die Milz und Lymphknoten. Auch im peripheren Blut können B-Lymphozyten nachgewiesen werden, die diesen Kreislauf als Transportweg unter anderem vom Knochenmark, dem Ort ihrer Entstehung, zur Milz nutzen.

In den folgenden Experimenten wurden zunächst relative (prozentuale) und absolute (Zahlen) Populationsgrößen der B-Lymphozyten bestimmt.

Die auffälligsten Unterschiede sind bereits in den *dot plots* sichtbar. So sind im Knochenmark $\text{IgD}^+/\text{B220}^+$ B-Lymphozyten sowohl prozentual, als auch in ihrer Gesamtzahl in den Rac1-N17 transgenen Mäusen deutlich reduziert. Demgegenüber sind $\text{IgD}^+/\text{B220}^+$ Zellen kaum betroffen (Abb. 5.8a). In der Milz ist vor allem die $\text{IgM}^+/\text{IgD}^+$ Population reduziert, wohingegen die Zahl der $\text{IgM}^+/\text{IgD}^-$ Zellen auf Wildtyp-Niveau liegt (Abb. 5.8b). Diese Sachverhalte weisen jedoch nur im Fall der hochexprimierenden Mäuse (tg^{hi}) eine statistische Signifikanz. In den untersuchten Lymphknoten hingegen, von denen hier beispielhaft die inguinalen präsentiert werden, ist, was die totalen Zellzahlen angeht,

die Abnahme der B220⁺ Zellen bereits in den tg^{lo} Mäusen signifikant. Hier hängt der Grad der Reduktion direkt mit der jeweiligen Expressionsstärke des Transgens in den beiden transgenen Zuchtlinien zusammen. Auffällig ist jedoch auch die prozentuale Zunahme der B-Lymphozyten im Fall der tg^{hi} Mäuse, die im Kontrast zu der nicht signifikanten, dennoch tendenziell vorhandenen Abnahme in den tg^{lo} Mäusen steht. Dieser Effekt hängt mit der nicht B-Zell-spezifischen, ubiquitären Expression des Rac1-N17 Transgens in den tg^{hi} Mäusen zusammen. So wurden in der Populationsgrößenanalyse dieser Tiere neben reduzierten B-Zellzahlen auch sehr deutliche Reduktionen bei den Thymozyten, T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Im Fall der Lymphknoten waren die T-Lymphozyten sogar bedeutend stärker betroffen als die B-Lymphozyten. Diese Situation führt zu der tendenziellen, prozentualen Zunahme der B-Lymphozyten in den Lymphknoten der tg^{hi} Maus (Abb. 5.8c, linkes Histogramm).

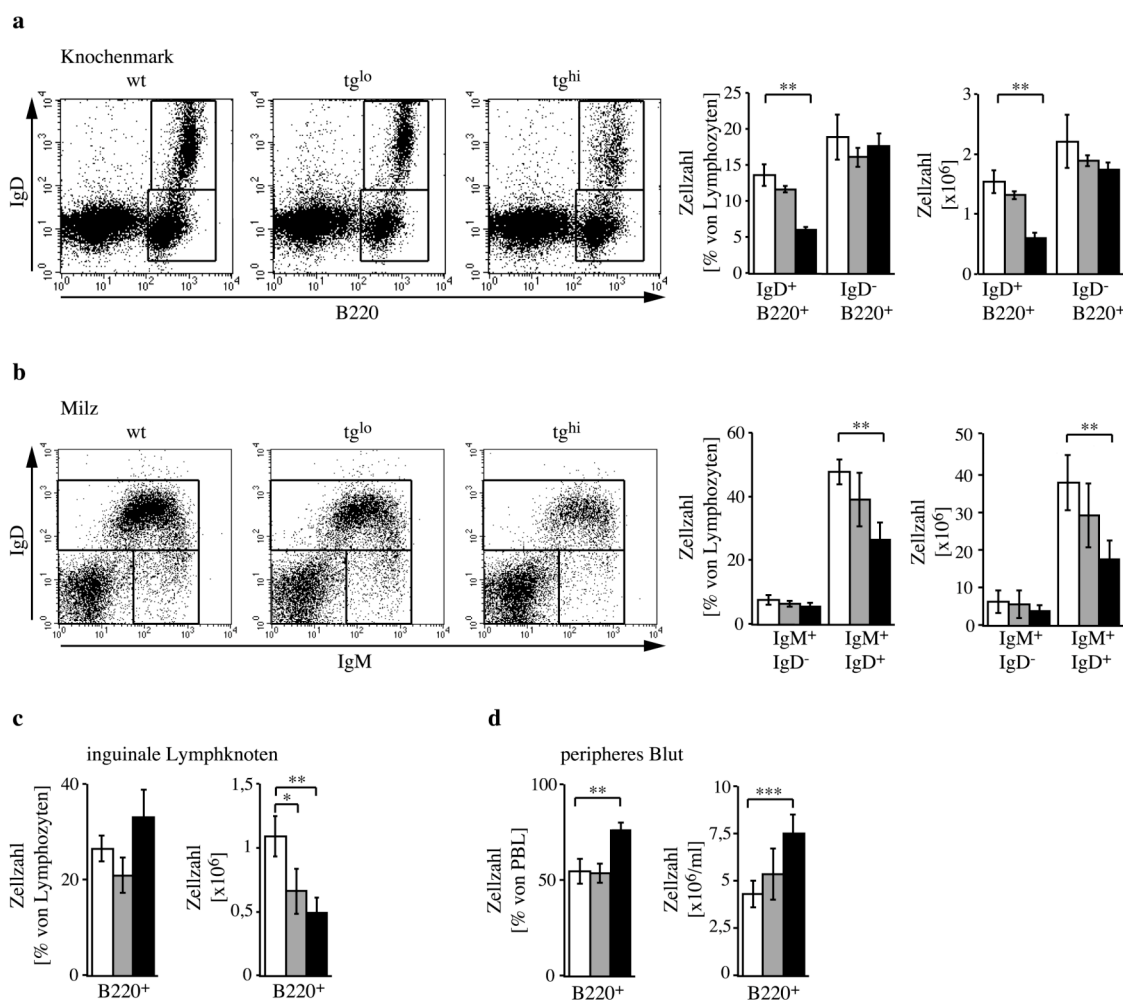


Abb. 5.8: Vergleich von Populationsgrößen ausgewählter B-Lymphozyten in lymphatischen Organen und peripheren Blut von Wildtyp und Rac1-N17 transgenen Mäusen. Dot plots zeigen aufgrund von Größe und Granularität vorausgewählte Lymphozyten aus dem Knochenmark (a) und Milz (b) von Wildtyp

(wt) und Rac1-N17 transgenen Mäusen (tg^{lo} , tg^{hi}), angefärbt mit in der Abbildung genannten fluoreszenzmarkierten Antikörpern. In den Balkendiagrammen sind jeweils Durchschnittswerte (\pm SD) relativer und absoluter B-Zellzahlen im Knochenmark (**a**), Milz (**b**), inguinalen Lymphknoten (**c**) und peripherem Blut (**d**), von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere, \square) und Rac1-N17 transgenen Mäusen (niedrig-exprimierend: \blacksquare , hoch-exprimierend: \blacksquare) dargestellt (n=5 Mäuse/Gruppe; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$, Student'scher *t*-Test).

Im Gegensatz zu den in den soliden lymphatischen Organen beobachteten mehr oder minder ausgeprägten Reduktionen in den Populationsgrößen der B-Lymphozyten, präsentiert sich die Situation im peripheren Blut. In den Rac1-N17 transgenen Mäusen wurden deutlich mehr B-Lymphozyten im Blutkreislauf gefunden (Abb. 5.8d). Auch hier ist der Unterschied nur im Fall der hochexprimierenden Mäuse (tg^{hi}) statistisch signifikant. Mögliche Ursachen für dieses beobachtete Phänomen wurden im dritten Teil dieser Arbeit näher untersucht (5.3.3 - 5.3.5).

Einzelne GTPasen der Rho-Familie können einen auffallend spezifischen Einfluß auf eine bestimmte Subpopulation von B-Lymphozyten ausüben. So hat Cdc42 eine selektive und gleichzeitig drastische Wirkung auf die phänotypisch und funktionell abgegrenzte Subpopulation der B-Zellen der marginalen Zone ($B220^+/CD21^+/CD23^-$) in der Milz. Diese Zellen sind in der, der CD19/Rac1-N17 analogen, CD19/Cdc42-N17 transgenen Maus zu 95% reduziert, während andere B-Lymphozyten in Bezug auf ihre Populationsgrößen nahezu unverändert bleiben (Brocker, T. unveröffentlichte Daten). Ähnliches gilt für Rac2, welches für B-1a und B-Zellen der marginalen Zone von entscheidender Bedeutung ist (Crocker, B. A. *et al.* 2002). Vor diesem Hintergrund wurden weitere, detaillierte Populationsgrößen-Analysen durchgeführt. Dabei wurde deutlich, daß in den CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen B-Lymphozyten der marginalen Zone zwar reduziert sind, der Grad dieser Reduktion selbst unterscheidet sich jedoch nicht wesentlich von dem, der in anderen Populationen in Knochenmark, Milz und Lymphknoten beobachtet wurde (Abb. 5.9a). Ebenso sind im Peritoneum sowohl $IgM^+/CD5^-$ B-Zellen, als auch die B-1b-Zellen ($IgM^+/CD5^+$) im vergleichbaren Ausmaß reduziert (Abb. 5.9b).

Aufgrund der erhaltenen Daten kann somit zusammenfassend festgestellt werden, daß Rac1 einen starken Einfluß auf die Größe aller Subpopulationen der B-Lymphozyten ausübt. Dabei geht die Expression des dominant-negativen Rac1-N17, mit Ausnahme des peripheren Bluts, mit einer generellen Reduktion der Zellzahlen einher. Desweiteren, vorbehaltlich eventueller Einflüsse anderer, das Rac1-N17 exprimierender Zelltypen auf die B-Lymphozyten in der tg^{hi} Maus (sogenannte *bystander-effects*), korrelieren diese Effekte im Grad ihrer Ausprägung direkt mit der Menge des exprimierten Transgens.

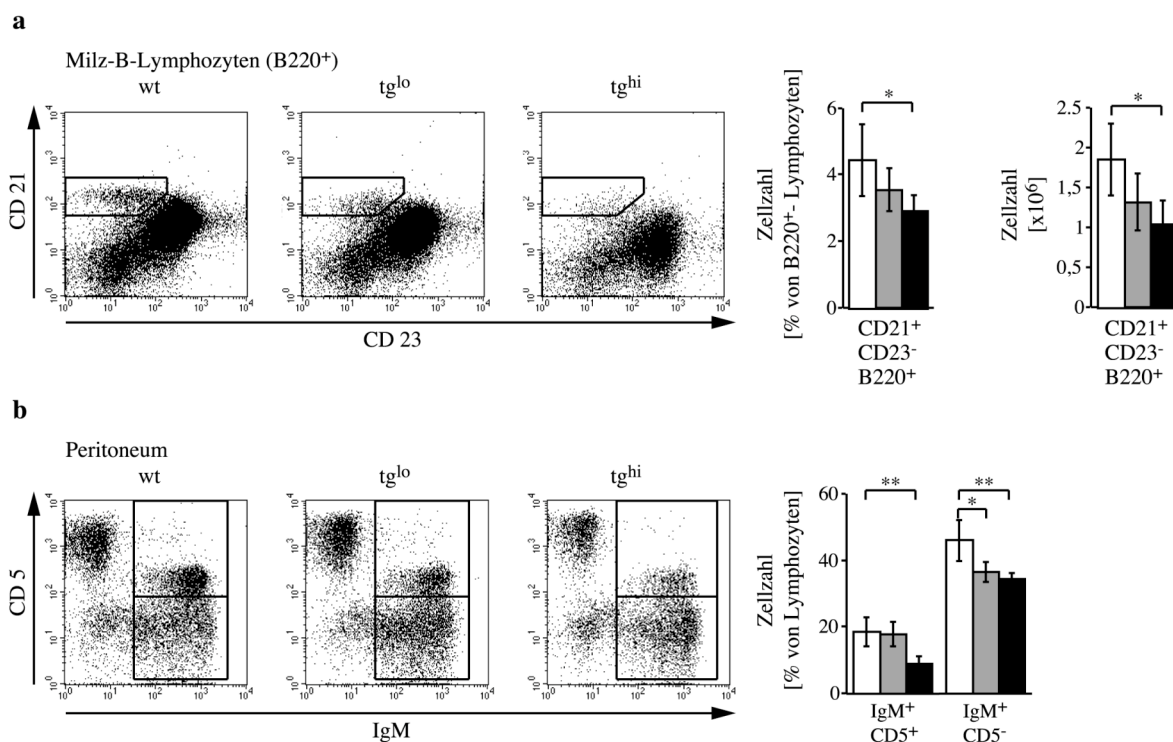


Abb. 5.9: Vergleich von Populationsgrößen ausgewählter B-Lymphozyten in Milz und Peritoneum von Wildtyp und Rac1-N17 transgenen Mäusen. Dot plots zeigen aufgrund von Größe und Granularität vorausgewählte B220⁺ Lymphozyten aus der Milz (a), beziehungsweise die Gesamtlymphozyten des Peritoneums (b) von Wildtyp (wt) und Rac1-N17 transgenen Mäusen (tg^{lo}, tg^{hi}), angefärbt mit in der Abbildung genannten fluoreszenzmarkierten Antikörpern. In den Balkendiagrammen sind jeweils Durchschnittswerte (± SD) relativer beziehungsweise absoluter Zahlen von B-Zellen der marginalen Zone der Milz (CD21⁺/CD23⁻/B220⁺, a), sowie von B-1b-Zellen (IgM⁺/CD5⁺) und B-1a (IgM⁺/CD5⁻) Zellen des Peritoneums (b), von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere, □) und Rac1-N17 transgenen Mäusen (niedrig-exprimierend: ■, hoch-exprimierend: ■) dargestellt (n=4-5 Mäuse/Gruppe; *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; Student'scher t-Test).

5.2.2 Einfluß der Rac1-N17 exprimierenden, nicht-hämatopoietischen Zellen auf die B-Zellentwicklung

Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen beeinflussen das Schicksal der B-Lymphozyten in entscheidender Weise. Dabei sind neben anderen Zellen des hämatopoietischen Systems auch Kontakte zur epithelialen Matrix von grundsätzlicher Bedeutung.

Eine Besonderheit der das Transgen hochexprimierenden Mäuse (tg^{hi}) besteht, wie bereits unter 5.1.2 erwähnt, in der ubiquitären, nicht auf das hämatopoietische System beschränkten, Rac1-N17 transgenen Expression. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß die gesamte Entwicklung und Funktionalität der B-Lymphozyten in den tg^{hi} Mäusen

von der Rac1 defizienten nicht-hämatopoietischen zellulären Umgebung zusätzlich negativ beeinflußt wird.

Um diesen möglichen Einfluß auf die B-Zellentwicklung gegen den Beitrag hämatopoietischer Zellen abzugrenzen, wurden Knochenmarkschimären generiert.

Als Rezipienten dienten dabei Wildtyp (C57BL/6, Thy-1.1) Mäuse. Diese wurden lethal bestrahlt. Diese Behandlung diente der Eliminierung sich teilender Zellen, wozu auch die hämatopoietischen Vorläufer im Knochenmark zählen. Die so präparierten Tiere wurden anschließend mit Zellen syngenen Knochenmarks (B57BL/6, Thy-1.2) von entweder Wildtyp oder tg^{hi} Donoren rekonstituiert. Die Thy-1-Isotypen dienten bei den anschließenden Analysen als Herkunftsmarker für vom Donor beziehungsweise Empfänger abstammende Zellen.

Der Fortschritt der Rekonstitution des Lymphozytenpools wurde anhand einer regelmäßigen Blutanalyse der chimären Mäuse im Bezug auf absolute B- und T-Zellzahlen im peripheren Blut bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Am Tag 100 nach Knochenmarkstransfer wurden die Populationsgrößen der B-Lymphozyten in lymphatischen Organen der Chimären analysiert (Abb. 5.10). Es wurden deutliche Unterschiede sowohl in den relativen (prozentual), als auch absoluten (Zahlen) Größen der B-Zellpopulationen in Milz und Lymphknoten zum Nachteil der mit CD19/Rac1-N17 Knochenmark rekonstituierten Chimären gefunden, ähnlich der Unterschiede zwischen unbehandelten Wildtyp und CD19/Rac1-N17 tg^{hi} Kontrollmäusen. So sind bei den mit CD19/Rac1-N17 Knochenmark rekonstituierten Chimären in der Milz hauptsächlich IgM^+/IgD^+ B-Zellzahlen reduziert, während im Fall von IgM^+/IgD^- B-Zellen die Unterschiede wesentlich geringer ausfallen. In den Lymphknoten sind ähnlich wie bei den nicht-Chimären CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen in den entsprechenden Chimären die B-Zellzahlen verhältnismäßig vergleichbar reduziert.

Obwohl die Rekonstitution aller Chimären, zum Beispiel im Fall der IgM^+/IgD^- B-Zellen der Milz nicht vollständig war, hat diese Tatsache keinen Einfluß auf die verhältnismäßigen Unterschiede in den einzelnen B-Zell-Populationsgrößen zwischen den Wildtyp und tg^{hi} Mäusen innerhalb der Chimären im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Expression des Transgens in Zellen nicht-hämatopoietischen Ursprungs keinen erkennbaren Einfluß auf die B-Zellentwicklung und deren Populationsgrößen in den tg^{hi} Mäusen hat.

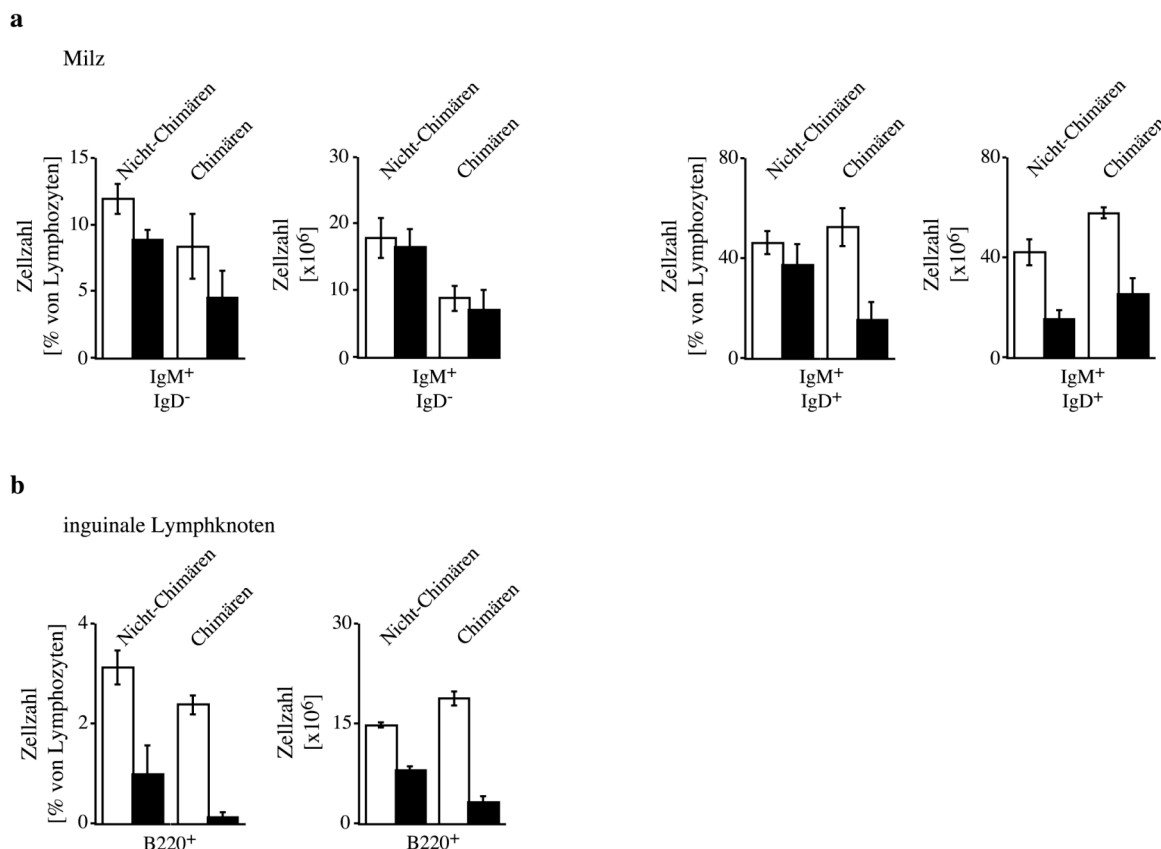


Abb. 5.10: Vergleich der Populationsgrößen von B-Lymphozyten in lymphatischen Organen zwischen jeweils nicht-chimären Wildtyp und Rac1-N17 transgenen Mäusen gegen Chimären aus Wildtyp und Rac1-N17 transgenen Knochenmarkszellen in Wildtyp-Rezipienten. In den Balkendiagrammen sind jeweils Durchschnittswerte (\pm SD) relativer und absoluter B-Zellzahlen in der Milz (a), und inguinalen Lymphknoten (b), von Wildtyp (\square) und hochexprimierenden Rac1-N17 transgenen Mäusen (\blacksquare), beziehungsweise der jeweils entsprechend rekostituierten Knochenmarkschimären dargestellt (n=4-5 Mäuse/Gruppe, Die Daten stammen aus einem von zwei ähnlichen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen).

5.2.3 Zelltod

Mögliche Ursachen für die in den CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen veränderten Populationsgrößen der B-Lymphozyten können unter anderen im Bereich der Zellentwicklung beziehungsweise der Überlebensfähigkeit angesiedelt sein. In dem folgenden Versuch sollten aus lymphatischen Organen gewonnene Lymphozyten auf ihre Vitalität hin untersucht werden. Dabei kann anhand des Annexin V/PJ Färbemusters zwischen lebendigen (Annexin V⁻/PJ⁻), toten (Annexin V⁺/PJ⁺) und sich im Prozeß der Apoptose befindenden Zellen (Annexin V⁺/PJ⁻) unterschieden werden (Abb. 5.11a). Im Verlauf entsprechender Vorversuche zeigte sich dabei, daß bereits nach erfolgter

Herstellung der Einzelzellsuspensionen apoptotische und nekrotische Lymphozyten in ausreichend hoher Konzentration vorlagen, so daß hier keine weitere Behandlung zwecks Induktion der entsprechenden Prozesse notwendig war.

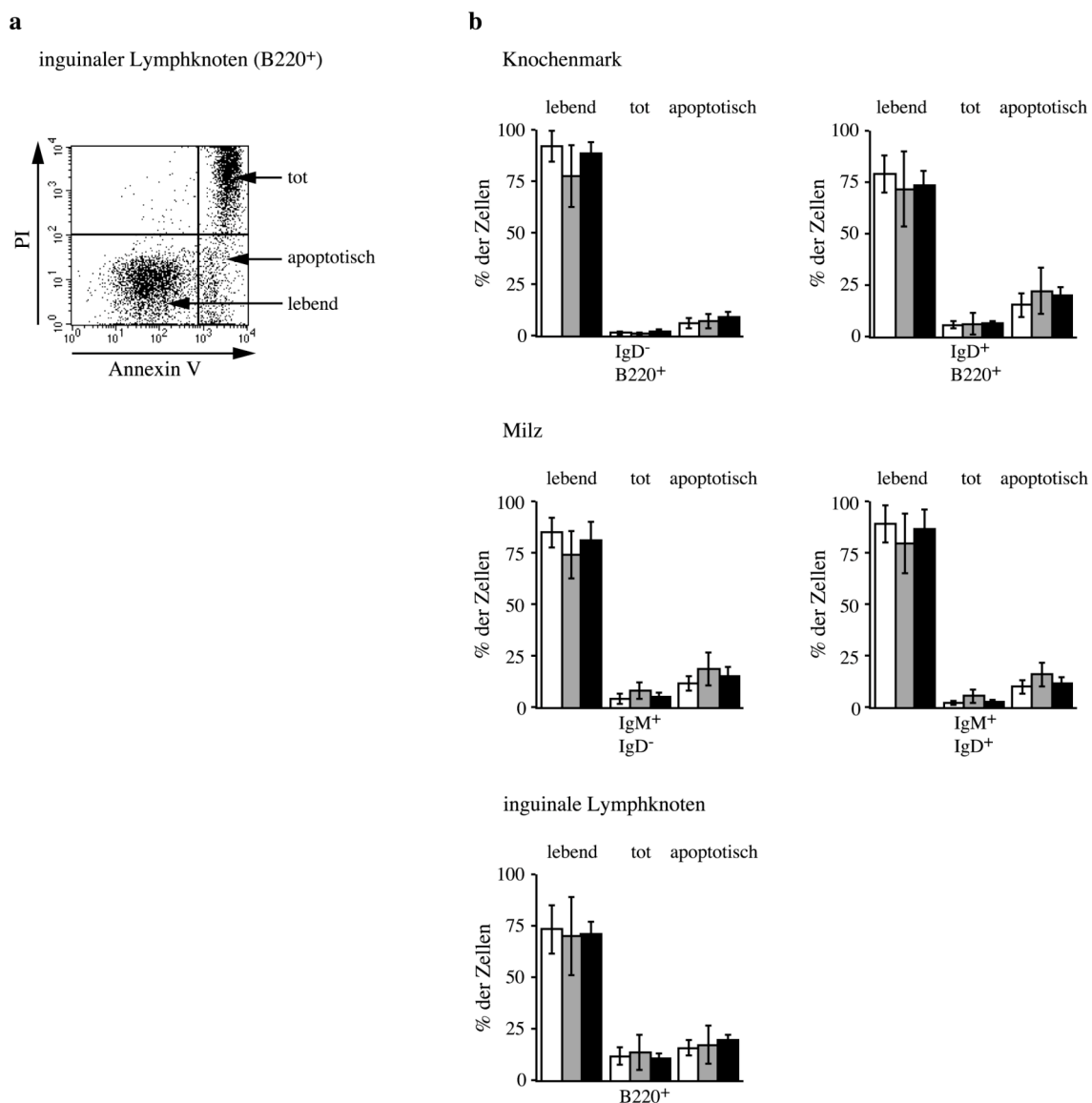


Abb. 5.11: Vergleich der Vitalität von B-Lymphozyten in lymphatischen Organen zwischen Wildtyp und Rac1-N17 transgenen Mäusen. Dot plot (a) zeigt am Beispiel der B220⁺ Zellen im inguinalen Lymphknoten einer Wildtyp-Maus die Auswahl der lebenden (Annexin V⁻/PJ⁻; unterer, linker Quadrant), apoptotischen (Annexin V⁺/PJ⁺; unterer, rechter Quadrant) und toten (Annexin V⁺/PJ⁺; oberer, rechter Quadrant) Zellen. In den Balkendiagrammen (b) sind jeweils Durchschnittswerte (\pm SD) der Prozentsätze lebender, apoptotischer und toter B-Zellen in Knochenmark, Milz und inguinalen Lymphknoten von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere, □) und Rac1-N17 transgenen Mäusen (niedrig-exprimierend: □, hoch-exprimierend: ■) dargestellt (n=3-5 Mäuse/Gruppe).

Die Lymphozyten wurden somit wie in 4.2.2.3 beschrieben isoliert, angefärbt und anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Das Ergebnis der Analysen in Knochenmark, Milz und Lymphknoten ist in Abb. 5.11b dargestellt. Es wurde deutlich, daß

in den untersuchten Organen unterschiedlich viele B-Zellen lebendig, apoptotisch beziehungsweise tot sind. So sind beispielsweise in der Lymphknotensuspension, im Vergleich zu anderen Organen, die wenigsten B-Zellen lebendig. Ungeachtet dieser Unterschiede konnte in keinem der Fälle eine Auswirkung des Rac1-N17 Transgens auf die Vitalität der B-Zellen in den transgenen Mäusen festgestellt werden.

5.2.4 *In vitro* Proliferation von B-Lymphozyten

Um weitere mögliche Ursachen für die beobachtete Reduktion der B-Zell-Populationsgrößen zu untersuchen, wurden aufgereinigte (negative Selektion, Leukosialin) B-Lymphozyten aus der Milz einem *in vitro* Proliferationstest unterzogen. Zum einen ist die sogenannte homöostatische Proliferation in Abwesenheit einer Immunantwort für die Aufrechterhaltung des B-Zell-Pools in der Peripherie wichtig (Lam, K. P. *et al.* 1997; Agenes, F. *et al.* 2000), doch vor allem stellt die antigenspezifische B-Zellproliferation eine essentielle Voraussetzung einer effektiven humoralen Immunantwort dar. Die Auslöser für eine induzierte Zellteilung *in vitro* können jedoch verschiedenster Natur sein und über verschiedene Zelloberflächenrezeptoren und anschließende intrazelluläre Signalwege wirken. CD40 gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-R) und spielt eine entscheidende Rolle bei der T-Zell abhängigen B-Zell-Aktivierung (van Kooten, C. und Banchereau, J. 2000; Bishop, G. A. und Hostager, B. S. 2001). IL-4 wird von T-Lymphozyten sezerniert und beeinflusst ebenfalls die Differenzierung und Teilung von B-Lymphozyten (Banchereau, J. und Rousset, F. 1991; Fecteau, J. F. und Neron, S. 2003). Die Stimulierung mit F(ab')₂ wirkt über Kreuzvernetzung der membranständigen B-Zellrezeptoren. Das E. Coli Lipopolysaccharid (LPS) gehört zu den Thymus-unabhängigen Antigenen. B-Lymphozyten binden LPS mit Hilfe des *Toll-like-receptor-4* (TLR-4, Fenton, M. J. und Golenbock, D. T. 1998).

Die B-Lymphozyten wurden jeweils im Dreifachansatz mit verschiedenen Agenzien stimuliert, dann mit [³H]-Thymidin gefüttert und anschließend die Einbaurrate der Radioaktivität gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.12 dargestellt.

Beim Vergleich mit dem Wildtyp zeigen die das Rac1-N17 Transgen hochexprimierenden B-Lymphozyten (tg^{hi}) bei allen verwendeten Stimuli eine verminderte Proliferation. B-Lymphozyten von niedrigexprimierenden (tg^{lo}) Mäusen hingegen unterscheiden sich signifikant vom Wildtyp nur bei einer Stimulation mit anti-CD40 und F(ab')₂ und zwar

jeweils nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL-4 im Medium. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Expression von Rac1-N17 in B-Lymphozyten eine dosisabhängige Proliferationsdefizienz zur Folge hat. Hierbei wird die Stimulation durch anti-CD40 + IL-4 und F(ab')₂ + IL-4 bereits durch kleine Mengen von Rac1-N17 negativ beeinflusst.

Neben der Verminderung der antigeninduzierten Proliferation zeigten Rac1-N17 transgene B-Lymphozyten (tg^{hi}) eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Proliferation auch in Abwesenheit spezifischer Stimuli *in vitro*. Diese Eigenschaft kann mitverantwortlich sein für die Reduktion der B-Zell-Populationsgrößen *in vivo* in den Rac1-N17 transgenen Mäusen.

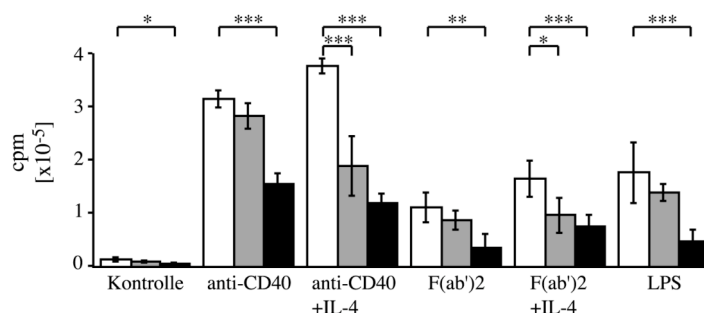


Abb. 5.12: Analyse der *in vitro* Proliferationsfähigkeit von B-Lymphozyten aus der Milz von Wildtyp und Rac1-N17 transgenen Mäusen. B-Zellen aus der Milz wurden mit folgenden Agenzien stimuliert: anti-CD40 10 µg/ml, IL-4 10 ng/ml, F(ab')₂ 10 µg/ml, LPS 2 µg/ml. Nach 36h Kultur wurden 5 µl [³H]-Thymidin pro Kavität zugegeben (entspricht 1 µCi), die Ansätze für weitere 8 Stunden inkubiert und anschließend die Einbaurrate der Radioaktivität bestimmt. In den Balkendiagrammen sind für die angegebenen Stimuli jeweils Durchschnittswerte (± SD) der gemessenen Radioaktivität in cpm dargestellt. Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere): □, Rac1-N17 transgen, tg^{lo} ▒, tg^{hi} ■ (n=3 Mäuse/Gruppe, Triplikate; *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001, Student'scher *t*-Test).

5.2.5 *In vivo* Proliferation von B-Lymphozyten

Ergänzend zu den *in vitro* Daten, die eine verminderte Proliferation von Rac1-N17 transgenen B-Lymphozyten aus der Milz in Abwesenheit spezifischer Stimuli zeigten, wurde hier die homöostatische *in vivo* Proliferation untersucht.

Hierzu eignet sich besonders die Analyse mittels BrdU-Einbau in die DNA. Wird den Versuchstieren BrdU zugeführt, so kann dieses in neusynthetisierte DNA eingebaut und der Einbau durchflußzytometrisch nachgewiesen werden (Abb. 5.13a). Der jeweilige Zeitpunkt der Analyse wurde anhand von Vorversuchen bestimmt. Einerseits galt es zu beachten, daß BrdU langfristig toxisch wirkt, andererseits sollte sich der BrdU-Einbau zum Zeitpunkt der Analyse gerade in der Log-Phase befinden. In diesen Versuch wurde den Tieren zu Beginn

1 mg BrdU i.p. injiziert, anschließend bekamen sie BrdU im Trinkwasser in einer Konzentration von 1 mg/ml für die in der Abb. 5.13b jeweils genannte Zeit.

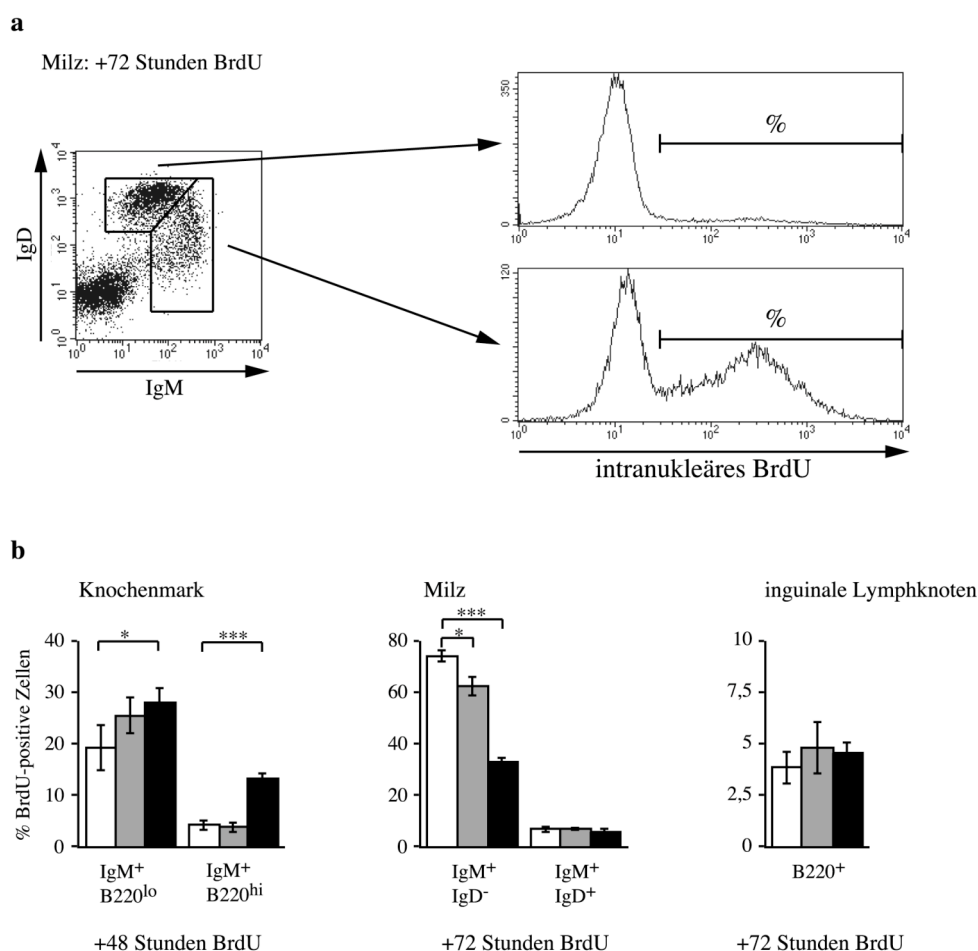


Abb. 5.13: BrdU-Einbau in B-Lymphozyten *in vivo*. (a) *Dot plot* (links) zeigt am Beispiel von Lymphozyten aus der Milz einer Wildtyp-Maus, die Auswahl der Populationen für die Analyse des BrdU-Einbaus. Die entsprechenden Ergebnisse der intranukleären Färbung für BrdU zeigen die Histogramme (rechts). In den Balkendiagrammen (b) sind jeweils Durchschnittswerte (\pm SD) der Prozentsätze BrdU positiver B-Zellen im Knochenmark, der Milz und inguinalen Lymphknoten von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere, □) und Rac1-N17 transgenen Mäusen (niedrig-exprimierend: □, hoch-exprimierend: ■) dargestellt. Der Analysezeitpunkt ist jeweils für das untersuchte Organ in der Abbildung genannt (n=3-5 Mäuse/Gruppe; *, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$, Student'scher *t*-Test).

Im Vergleich zum Wildtyp zeigten B-Lymphozyten im Knochenmark der tg^{hi} Mäuse einen beschleunigten BrdU-Einbau in die DNA, was auf eine höhere Teilungsrate dieser Zellen hinweist. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in den tg^{lo} Tieren beobachtet werden. In den Lymphknoten, in denen die B-Zellzahlen transgener Tiere signifikant reduziert sind, konnte kein beschleunigter BrdU-Einbau festgestellt werden. Ebenso verhielt es sich im Fall der reifen (IgM⁺/IgD⁺) B-Zellpopulation in der Milz. Interessanterweise wiesen unreife (IgM⁺/IgD⁻) B-Lymphozyten in der Milz der transgenen Tiere eine reduzierte BrdU-

Einbaurrate auf (Abb. 5.13b). Da die Proliferation innerhalb dieser Population jedoch grundsätzlich deutlich geringer ist als es die BrdU-Einbaurrate hier suggerieren könnte (Agenes, F. 2003), hängt der hier beobachtete Effekt eventuell nicht primär mit einer Proliferationsdefizienz zusammen, vielmehr könnte der hier detektierte hohe Prozentsatz BrdU⁺ Zellen mit den innerhalb der Versuchsdauer im Knochenmark neusynthetisierten und über den Blutstrom hinzugekommenen B-Lymphozyten innerhalb dieser Population zusammenhängen. Somit könnten die hier festgestellten Unterschiede zwischen Wildtyp und Rac1-N17 transgenen IgM⁺/IgD⁻ B-Lymphozyten in der Milz ihre Ursachen auch in eventuellen Störungen des Migrationsverhaltens haben.

5.2.6 Histologische Untersuchungen der Struktur lymphatischer Organe

Defekte in der Entwicklung von Lymphozyten, die mit entsprechend veränderten Zellzahlen in der Peripherie einhergehen, können einen starken Einfluß auf die von lymphatischen Organen haben, in denen sie normalerweise vorkommen. Da die Reduktion der B-Zellzahlen in den transgenen Mäusen zum Teil sehr beträchtlich ist, wurden hier eventuelle Veränderungen der Feinstruktur peripherer lymphatischer Organe histologisch untersucht.

Dazu wurden Mikrotomschnitte von Milzen und inguinalen Lymphknoten von Wildtyp und transgenen Mäusen angefertigt. Diese wurden dann mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt (B220 für B-Lymphozyten, I-A^b für MHC II exprimierende Zellen und Thy1.2 für T-Lymphozyten) und schließlich unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Es wurde dabei sowohl die Gesamtstruktur der Organe im Querschnitt, als auch die Feinstruktur des Follikels betrachtet. Abb. 5.14 zeigt beispielhaft Follikel in der Milz. Die typische Struktur besteht dabei aus einer zentralen T-Zell-Zone und der diese umgebenden B-Zell-Zone. Anhand der Analysen ließen sich keine Unterschiede in der Struktur der Milzen, Lymphknoten (Daten nicht gezeigt) und Follikel feststellen.

Milz

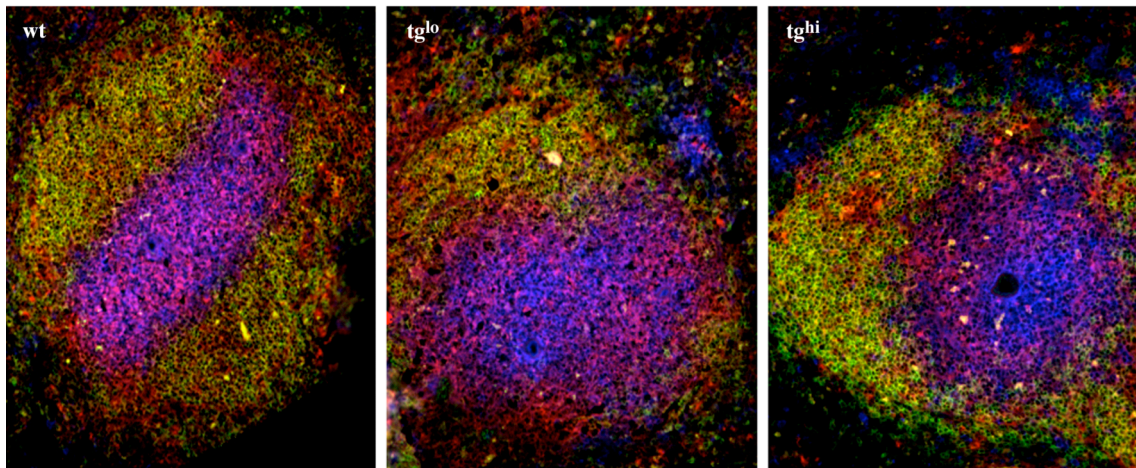


Abb. 5.14: Histologische Untersuchung der Follikelstruktur in der Milz. Mikrotom-Schnitte aus Milzen von Wildtyp (wt) und CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen (tg^{lo} und tg^{hi}) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt: Thy1.2-Cy-5 (blau), B220-FITC (grün), und I-A^b-PE (rot). Die Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen (Vergrößerung: 200-fach) zeigen jeweils die typische Struktur eines Follikels eingebettet in die rote Pulpa (nicht angefärbt, schwarz).

5.3 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Funktion der B-Lymphozyten

Auf die Bedeutung von GTPasen der Rho-Familie sowie insbesondere von Rac1 für die Funktionalität verschiedener Säuger-Zelltypen, beziehungsweise davon abgeleiteter Zelllinien, wurde bereits in der Einleitung (3.2.3) hingewiesen.

Das hier verwendete CD19/Rac1-N17 transgene Maussystem erlaubt eine direkte *in vivo* Evaluation des Einflusses von Rac1 auf die B-Zellfunktion.

5.3.1 Antikörper im Normalserum

Antikörper dienen der Abwehr von Pathogenen und der Neutralisierung von Toxinen. Sie werden im Verlauf einer Immunantwort von ausdifferenzierten Plasmazellen sezerniert. Im Serum sind vor allem die IgG- und IgM- Isotypen vertreten. Diese werden je nach Art des Antigens in unterschiedlichen Verhältnissen produziert. Im Serum einer nicht-immunisierten Maus (Normalserum) finden sich, neben den sogenannten natürlichen Antikörpern, auch die im Verlauf diverser Immunantworten entstandenen Antikörper.

In der hier dargestellten Analyse wurde die Fähigkeit von B-Lymphozyten Rac1-N17 transgener Mäuse zum Aufbau und Aufrechterhaltung physiologischer

Immunglobulinkonzentrationen im Serum, in Abwesenheit einer induzierten Immunantwort untersucht.

Dazu wurden Sera aus 6-7 Wochen alten, nicht-immunisierten Mäusen gesammelt und in enzymgekoppelten Absorptionstests (ELISA) auf den Titer verschiedener Immunglobulin-Subtypen hin untersucht (Abb. 5.15).

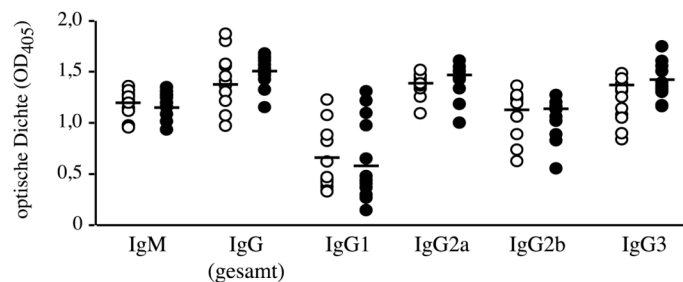


Abb. 5.15: Vergleich der Antikörper-Isotypen im Normalserum. Sera von 6-7 Wochen alten Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere, O) und hochexprimierenden Rac1-N17 transgenen Mäusen (tg^{hi}, ●) wurden gesammelt und in ELISA der Titer einzelner Antikörper-Isotypen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Meßwerte für einzelne Tiere und der Mittelwert. (n=10-11 Mäuse/Gruppe).

Der direkte Vergleich der Meßwerte für die untersuchten Isotypen zwischen Rac1-N17 transgenen (tg^{hi}) und Wildtyp-Mäusen läßt keine Unterschiede erkennen. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß selbst eine sehr starke und ubiquitäre Rac1-N17 Expression keinen nachweisbaren Einfluß auf die Antikörper-Titer im Normalserum adulter Mäuse hat.

Aufgrund der Verwendung verschiedener, Isotyp-spezifischer Nachweis-Antikörper mit jeweils unterschiedlicher Affinität erlauben die in den einzelnen ELISA gemessenen Werte jedoch keine Aussage über die relativen Verhältnisse der einzelnen Antikörper-Isotypen zueinander. So sind im Normalserum von nichttransgenen Wildtyp-Mäusen (gehalten unter normalen, nicht-pathogenfreien Bedingungen) etwa 10% IgM und fast 90% IgG vorhanden, während die in der Abbildung für IgM und IgG dargestellten Werte nahezu gleich sind.

5.3.2 Humorale Immunantwort

Eine streng regulierte, schnelle und massive Antikörper-Antwort durch B-Lymphozyten ist entscheidend für die Abwehr beziehungsweise Kontrolle einer Infektion. Ihre Bedeutung wird am deutlichsten sichtbar in Fällen in denen eine Antikörper-Antwort durch genetische Defekte nicht oder nur partiell möglich ist.

Um die Rolle von Rac1 für humorale Immunantworten zu untersuchen, wurden CD19/Rac1-N17 transgene und Wildtyp-Mäuse mit verschiedenen Antigenen immunisiert und anschließend die Antikörpertiter im Serum gemessen.

5.3.2.1 Thymus-unabhängige Immunantwort vom Typ 2

Die Antikörper-vermittelte Immunantwort läßt sich hinsichtlich der notwendig beteiligten Zellarten grundsätzlich in zwei verschiedene Typen einteilen, die Thymus-unabhängige (TI) und die Thymus-abhängige (TD) Immunantwort. Bei der TI-Antwort unterscheidet man wiederum zwei Unterarten. Für den Typ 1 (TI-1) ist charakteristisch, daß das Antigen ausreichende Signale liefert, um sowohl reife als auch unreife B-Lymphozyten zu aktivieren. Diese Antwort ist speziell gegen bakterielle Polysaccharide, wie LPS gerichtet (Andersson, J. *et al.* 1977). Eine TI-2 Antwort kann auch in thymektomierten Versuchstieren ausgelöst werden, sie setzt dennoch die Anwesenheit zumindest einiger T-Lymphozyten voraus (Lane, P. J. *et al.* 1986; Mond, J. J. *et al.* 1995).

Um die Fähigkeit von CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen zu einer Antikörperantwort gegen TI-2 Antigene zu untersuchen, wurden die Tiere mit TNP-Ficoll i.p. immunisiert.

24 Stunden vor und an Tag 7, 14, 21 und 28 nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die Titer einzelner Immunglobulin-Isotypen im Serum in einem ELISA bestimmt (Abb. 5.16).

Beim Vergleich der Antikörper-Titer zwischen CD19/Rac1-N17 transgenen (tg^{lo}) und Wildtyp-Mäusen während der Immunantwort gegen das TI-2 Antigen, konnten bei keinem der Isotypen signifikante Unterschiede festgestellt werden.

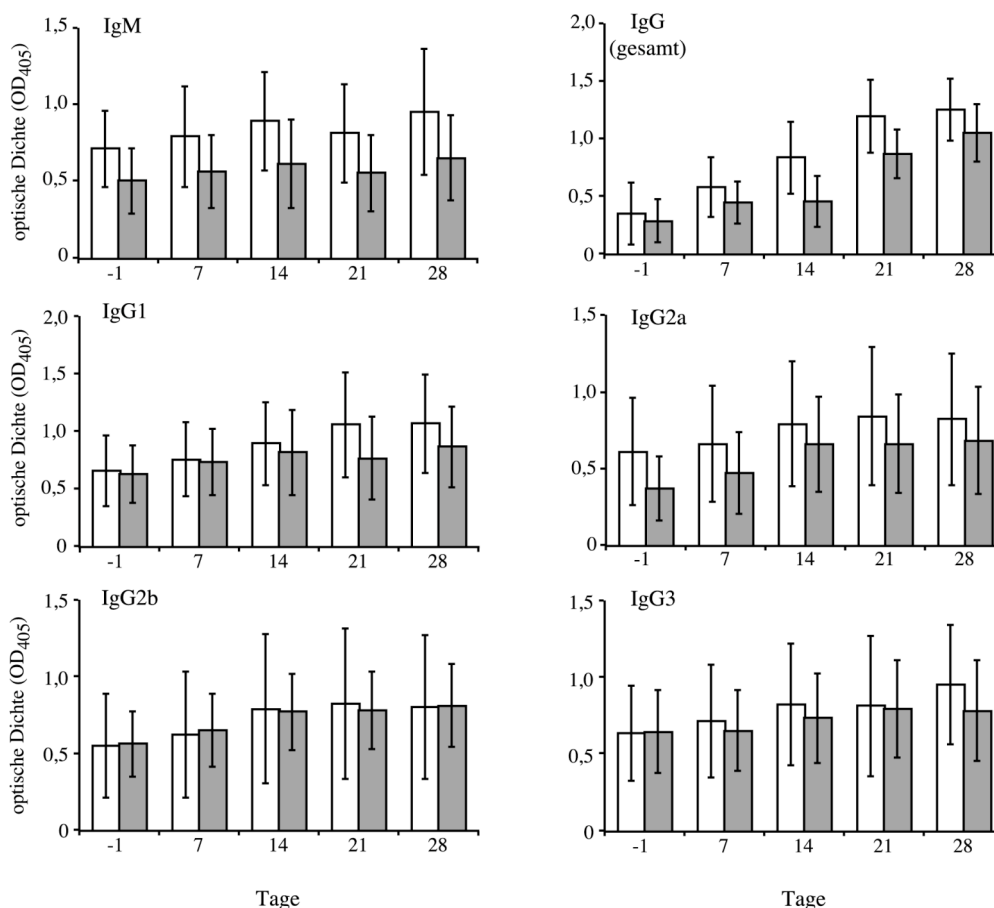


Abb. 5.16: Thymus-unabhängige Immunantwort vom Typ 2. 6-7 Wochen Mäuse wurden mit TNP-Ficoll immunisiert. Der Verlauf der humoralen TI-2 Immunantwort wurde anhand der Serum-Titer einzelner Antikörper-Isotypen an Tag -1 (vor Immunsierung), Tag 7, 14, 21 und 28 in einem ELISA bestimmt. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (\pm SD) von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere) und niedrigexprimierenden, Rac1-N17 transgenen (tg^{lo} , \odot) Mäusen (n=4-6 Mäuse/Gruppe).

5.3.2.2 Thymus-abhängige Immunantwort

Antikörperantworten gegen Proteinantigene erfordern die Mithilfe antigenspezifischer Th-Zellen. Im Gegensatz zu TI-Antworten liefert hier das, an den membranständigen spezifischen Rezeptor bindende, Antigen ein notwendiges, jedoch kein ausreichendes Signal, um die B-Zelle vollständig zu aktivieren. Weitere notwendige Signale werden über sogenannte kostimulatorische Moleküle geliefert. Daneben sezernieren Th-Zellen Zytokine, die auch die Aktivierung von B-Zellen positiv beeinflussen können. Die für die T-Zellhilfe erforderliche Antigenerkennung setzt eine Antigenpräsentation seitens der B-Zellen voraus. Um die Fähigkeit von CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen zu einer Antikörperantwort gegen TD-Antigene zu untersuchen, wurden die Tiere mit TNP-KLH i.p. immunisiert.

24 Stunden vor und an Tag 7, 14, 21 und 28 nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die Titer einzelner Immunglobulin-Isotypen im Serum in einem ELISA bestimmt (Abb. 5.17).

Beim Vergleich der Antikörper-Titer zwischen CD19/Rac1-N17 transgenen (tg^{lo}) und Wildtyp-Mäusen im Verlauf der Immunantwort gegen das TD-Antigen, konnten bei keinem der Isotypen signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Damit wurde deutlich, daß neben der Antikörper-Synthese und Sekretion auch die, für die TD-Immunantwort notwendigen Wechselwirkungen zwischen B- und T-Zellen durch die transgene Rac1-N17 Expression in den B-Zellen nicht signifikant negativ beeinflußt werden.

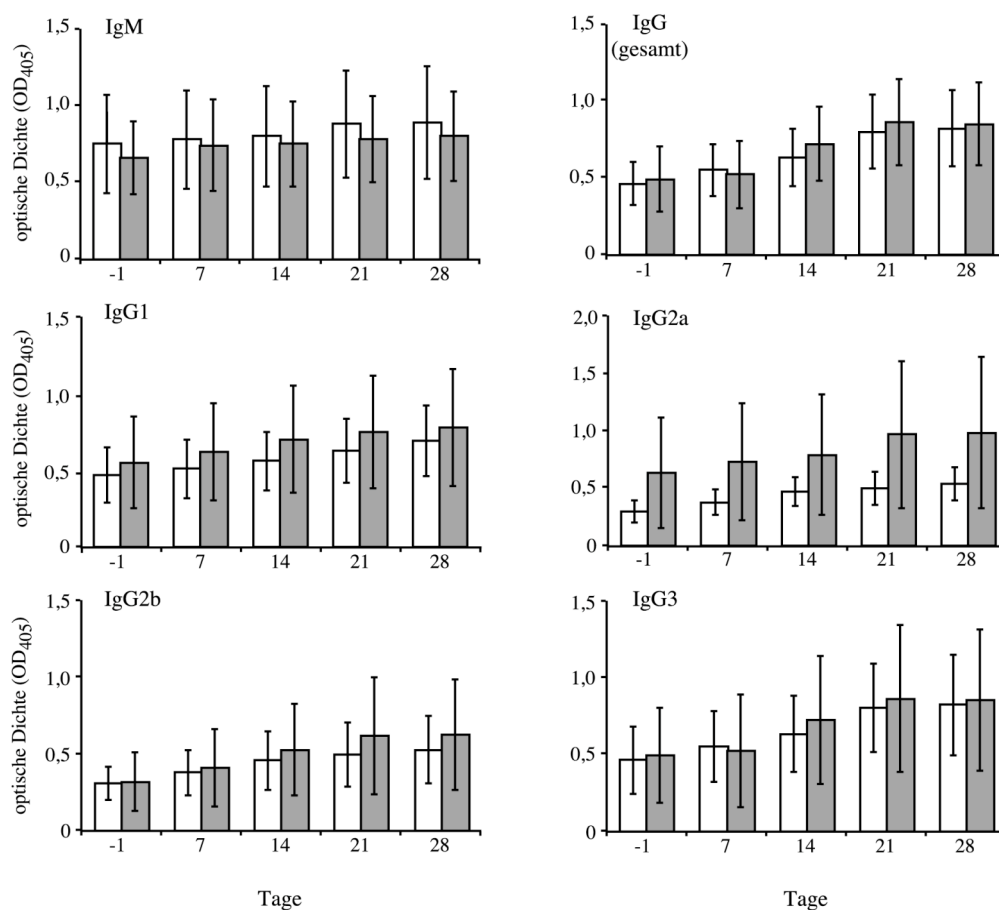


Abb. 5.17: Thymus-abhängige Immunantwort. 6-7 Wochen alte Mäuse wurden mit TNP-KLH immunisiert. Der Verlauf der humoralen TD-Immunantwort wurde anhand der Serum-Titer einzelner Antikörper-Isotypen an Tag -1 (vor Immunisierung), Tag 7, 14, 21 und 28 in einem ELISA bestimmt. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (\pm SD) von Wildtyp (C57BL/6, PCR-negative Tiere) und niedrigexprimierenden, Rac1-N17 transgenen (tg^{lo} , \bullet) Mäusen (n=5-7 Mäuse/Gruppe).

5.3.3 *In vivo* Migrationsverhalten

Die Analyse der Zellzahlen zeigte, verglichen mit Wildtyp-Kontrollen, eine generelle Verminderung der B-Zellpopulationen in den peripheren lymphatischen Organen in CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen. Anders stellt sich die Situation im peripheren Blut dar, die B-Zellzahlen CD19/Rac1-N17 transgener Mäuse sind hier tendenziell erhöht (Abschnitt 5.2.1).

Um einen möglichen Einfluß transgener Rac1-N17 Expression auf das Migrationsverhalten von B-Lymphozyten *in vivo* zu bestimmen, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Es wurden zunächst B-Lymphozyten aus Milzen von CD19/Rac1-N17 transgenen und Wildtyp-Mäusen isoliert. Diese wurden anschließend mit einem grün-fluoreszierenden Lebendfarbstoff (CFSE) markiert. Die Behandlung ermöglichte später eine eindeutige Identifizierung der Zellen. 5×10^6 dieser so vorbehandelten Zellen wurden dann mittels i.v. Injektion jeweils in Wildtyp-Empfänger transferiert.

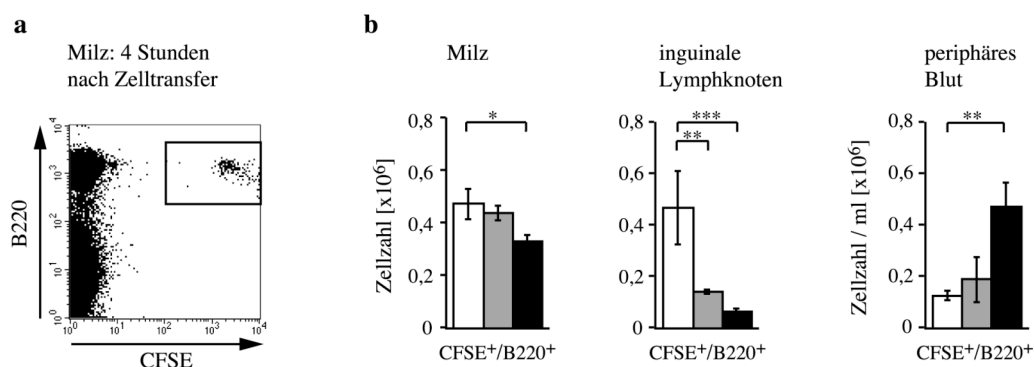


Abb. 5.18: Migration transferierter B-Zellen *in vivo*. (a) *Dot plot* (links) zeigt am Beispiel der Milz die Auswahl der Population für die Analyse des Migrationsverhaltens *in vivo*. In den Balkendiagrammen (b) sind jeweils Durchschnittswerte (\pm SD) der absoluten Zahlen der transferierten B-Zellen (Wildtyp: □; Rac1-N17 transgen: niedrig-exprimierend: ▣, hoch-exprimierend: ■) in den bezeichneten Organen der Empfänger, 4h nach Transfer dargestellt (n=3 Mäuse/Gruppe; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$, Student'scher *t*-Test).

Die transferierten Zellen konnten vom peripheren Blut aus in verschiedene Organe migrieren. Nach 4 Stunden wurde im Blut sowie peripheren lymphatischen Organen der Empfänger die Anzahl der transferierten B-Lymphozyten bestimmt. *Dot plot* in Abb. 5.18a zeigt die Auswahl der analysierten Population ($B220^+/CFSE^+$). Die jeweiligen Anzahlen der, in Milz, inguinalen Lymphknoten und peripherem Blut der Empfänger gefundenen, transferierten Zellen sind in Balkendiagrammen in Abb. 5.18b dargestellt. Während die Migration in die Milz, im Vergleich zu Wildtyp, nur im Fall der hochexprimierenden Rac1-N17 transgenen B-Zellen signifikant vermindert war, waren die Unterschiede bei der

Migration in die Lymphknoten bedeutend stärker. Sowohl hochexprimierende, als auch niedrigexprimierende Rac1-N17 transgene B-Zellen konnten im Vergleich zu Wildtyp signifikant weniger in inguinale Lymphknoten migrieren. Entgegengesetzt verhielt sich die Situation im peripheren Blut. Hier wurden Vergleich zu Wildtyp statistisch signifikant mehr transferierte, sowohl hochexprimierende, als auch niedrigexprimierende Rac1-N17 transgene B-Zellen, gefunden. Die festgestellte Migrationsdefizienz zeigte jeweils eine direkte Abhängigkeit von der Expressionsstärke des transgenen Rac1-N17.

Die anhand der durchflußzytometrischen Analyse festgestellte Migrationsdefizienz der Rac1-N17 transgenen B-Lymphozyten wurde nun histologisch eingehender untersucht.

Wie zuvor, wurden Rac1-N17 transgene und Wildtyp-B-Lymphozyten aus Milzen isoliert und 20×10^6 der mit CFSE markierten Zellen in Wildtyp-Rezipienten transferiert. Nach 4 Stunden wurden periphere lymphatische Organe isoliert und daraus hergestellte Mikrotom-Schnitte mit B220 (rot) und Thy1 (blau) angefärbt, um die B-Zellzone und die T-Zellzone der Follikel unterscheiden zu können. In Abb. 5.19a sind einzelne Follikel der Milz der entsprechenden Empfänger dargestellt, jeweils eingebettet in die rote Pulpa (nicht markiert, schwarz).

Transferierte Rac1-N17 transgene und Wildtyp-B-Lymphozyten (grün markiert) konnten sowohl in den Follikeln, als auch in der umgebenden roten Pulpa gefunden werden. Die Verteilung der Rac1-N17 transgenen B-Lymphozyten auf die Kompartimente weicht jedoch vom Wildtyp deutlich ab. So fanden sich, verglichen mit Wildtyp, die meisten Rac1-N17 transgenen B-Lymphozyten in den Bereichen der roten Pulpa, außerhalb der Follikel, während nur wenige die T- und B-Zellzone erreichen konnten.

Das Vorkommen der transferierten Zellen in den unterschiedlichen Bereichen der Empfänger-Milzen ist in Abb. 5.19b quantitativ dargestellt.

Bei der Analyse zeigte sich, daß die weitaus meisten von den in der Präparation gefundenen Rac1-N17 transgenen B-Lymphozyten in der roten Pulpa (nicht angefärbt, schwarz), jedoch nur wenige in den Follikeln zu finden waren (B-Zellzone: rot, T-Zellzone: blau). Transferierte Wildtyp-B-Lymphozyten hingegen fanden sich mehrheitlich in Follikeln und nur wenige verblieben in der roten Pulpa. Entsprechend ähnliche Verhältnisse wurden auch in inguinalen Lymphknoten festgestellt, jedoch war die Anzahl der dort gefundenen transferierten B-Lymphozyten insgesamt deutlich geringer (Daten nicht gezeigt).

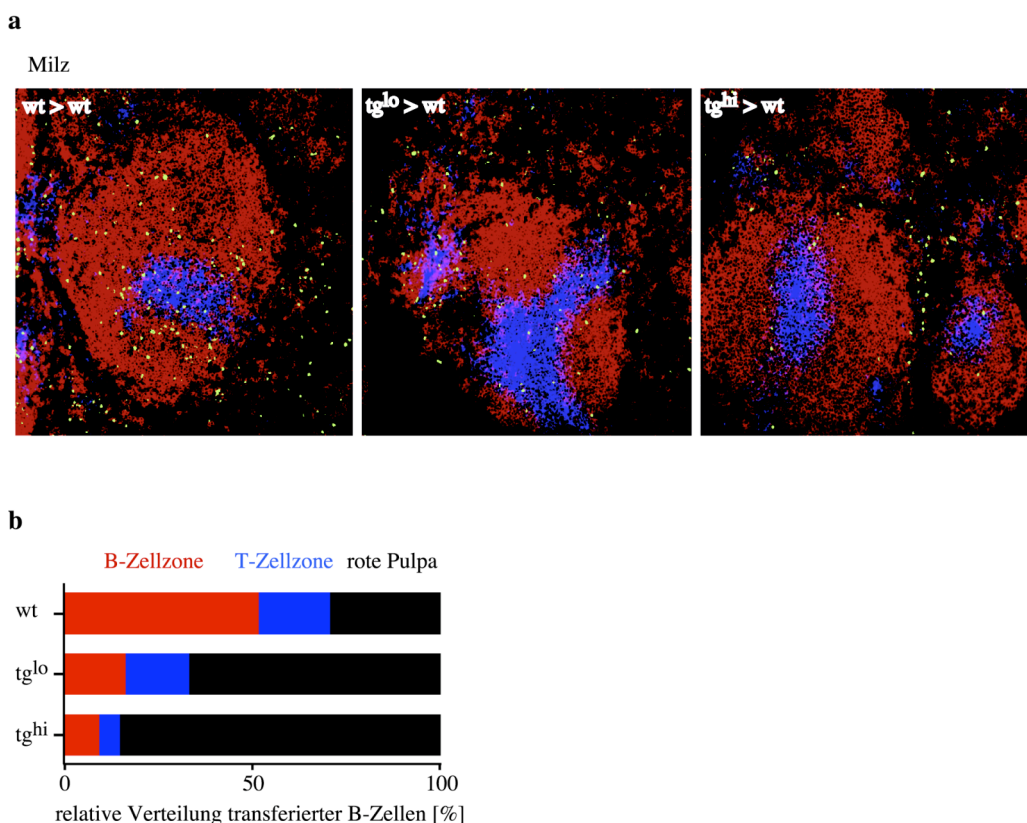


Abb. 5.19: Migration transferierter B-Zellen *in vivo*, histologische Analyse. (a) Mikrotom-Schnitte aus Milzen von Wildtyp-Empfängern, in die 20×10^6 Wildtyp (wt > wt, linke Abbildung) oder Rac1-N17 transgene B-Lymphozyten (tg^{lo} > wt, mittlere Abbildung, tg^{hi} > wt, rechte Abbildung) transferiert wurden. Die Schnitte wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt: B220-PE und Thy1.2-Cy-5. Transferierte B-Zellen wurden zuvor mit CFSE markiert und erscheinen in der Abbildung grün. Vergrößerung: 200-fach. (b) Quantitative Analyse der relativen Verteilung der transferierten B-Lymphozyten auf die Kompartimente in der Milz. Für die Analyse wurden pro Gruppe 7-12 Querschnittspräparate der Milz aus je zwei Empfängern CFSE⁺-Zellen manuell ausgezählt. Prozentsatz CFSE⁺-Zellen in der B-Zellzone: ■, in der T-Zellzone: ■, in der roten Pulpa: ■.

Die Migrationsdefizienz zeigte sich insgesamt am deutlichsten bei den das Rac1-N17 Transgen hochexprimierenden B-Lymphozyten (tg^{hi}), während die niedrigexprimierenden B-Lymphozyten (tg^{lo}) weniger stark betroffen waren. Deutlich wurde hier erneut die direkte Abhängigkeit des Grades der festgestellten Defizienz von der Expressionsstärke des Rac1-N17 Transgens in den transferierten B-Lymphozyten. Damit unterstützen auch die in der quantitativen Analyse gewonnen Daten (Abb. 5.19b) den optischen Eindruck aus der Abb. 5.19a.

5.3.4 Induktion einer Lymphozytopenie im peripheren Blut

Im vorhergehenden Versuch konnte gezeigt werden, daß die Migrationsfähigkeit transferierter Rac1-N17 transgener B-Zellen unter homöostatischen Bedingungen *in vivo* beeinträchtigt ist. Um die Erfüllung ihrer Funktionen während einer adaptiven Immunantwort zu gewährleisten müssen B-Zellen in der Lage sein, im Fall einer Infektion, unmittelbar auf entsprechende Signale reagieren zu können. Dazu gehört auch induzierte, gerichtete Migration.

Eines der ersten Ereignisse im Fall einer Entzündungsreaktion ist die Bindung Pathogen-assoziiierter molekularer Muster (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) an TLR. Die PAMP können dabei verschiedenster Natur sein und sind meist bakteriellen oder auch viralen Ursprungs. Durch die Bindung werden unter anderem Chemokine ausgeschüttet und Adhäsionsmoleküle aktiviert, die es den Zellen erlauben an ihren jeweiligen Einsatzort zu migrieren (Laudanna, C. *et al.* 2002; Iwasaki, A. und Medzhitov, R. 2004; Takeuchi, O. *et al.* 2004). Dabei kommt es im Fall einer massiven Infektion vorübergehend zu einem starken Abfall der Lymphozytenfrequenzen im peripheren Blut (Lymphozytopenie). Nach der Identifizierung der Liganden einzelner TLR, kann diese Reaktion auch durch Injektion künstlicher Liganden hervorgerufen werden (Buckler, C. E. *et al.* 1971). Einige Viren benutzen als Erbsubstanz doppelsträngige Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA). Diese wird durch TLR3 spezifisch erkannt. Ein künstlicher TLR3 Ligand ist in Form von Poly I:C bekannt (Akira, S. und Hemmi, H. 2003; Takeda, K. *et al.* 2003).

In dem folgenden Versuch sollte die Migrationsfähigkeit von Rac1-N17 transgenen B-Zellen unter Bedingungen einer akuten viralen Infektion untersucht werden. Dafür wurde den Versuchstieren 200 μ g Poly I:C i.p. injiziert. Die Bestimmung der Größen der B-Zellpopulationen gab Aufschluß über die Kinetik der induzierten Lymphozytopenie im peripheren Blut. Dabei wurde festgestellt, daß 12 Stunden nach Poly I:C-Injektion nur ein Bruchteil der ursprünglichen B-Zellen im peripheren Blut nachweisbar war (Abb. 5.20a).

Die genaue Analyse der Kinetik einzelner Wildtyp und Rac1-N17 transgener Mäuse ist in Abb. 5.20b dargestellt. Hier wurden sowohl die relativen (prozentualen), als auch absoluten (Zahlen) Größen der B-Zellpopulationen im peripheren Blut vor Poly I:C-Injektion gleich 100% gesetzt. Die Wildtyp-B-Zellen erreichten nach circa 12 Stunden ihre niedrigste Frequenz beziehungsweise Zahl im peripheren Blut um danach wieder anzusteigen. Das Verschwinden der B-Zellen aus dem peripheren Blut ist im Fall der Rac1-N17 transgenen Mäuse weit weniger stark ausgeprägt. Die Inhibition der Migration ist direkt zur Stärke der

Expression des transgenen Rac1-N17 proportional. So waren was die relative (prozentuale) Größe der B-Zellpopulation betrifft beim nichttransgenen Wildtyp nach 12 Stunden nur noch $4,76 \pm 3,62\%$ der ursprünglichen B-Zellen im peripheren Blut. In das Rac1-N17 Transgen niedrigexprimierenden (tg^{lo}) Mäusen waren es $12,40 \pm 4,11\%$, in hochexprimierenden (tg^{hi}) $48,33 \pm 25,72\%$. Ähnliche Unterschiede wurden auch bei den absoluten (Zahlen) Größen der B-Zellpopulationen beobachtet (Abb. 5.20c).

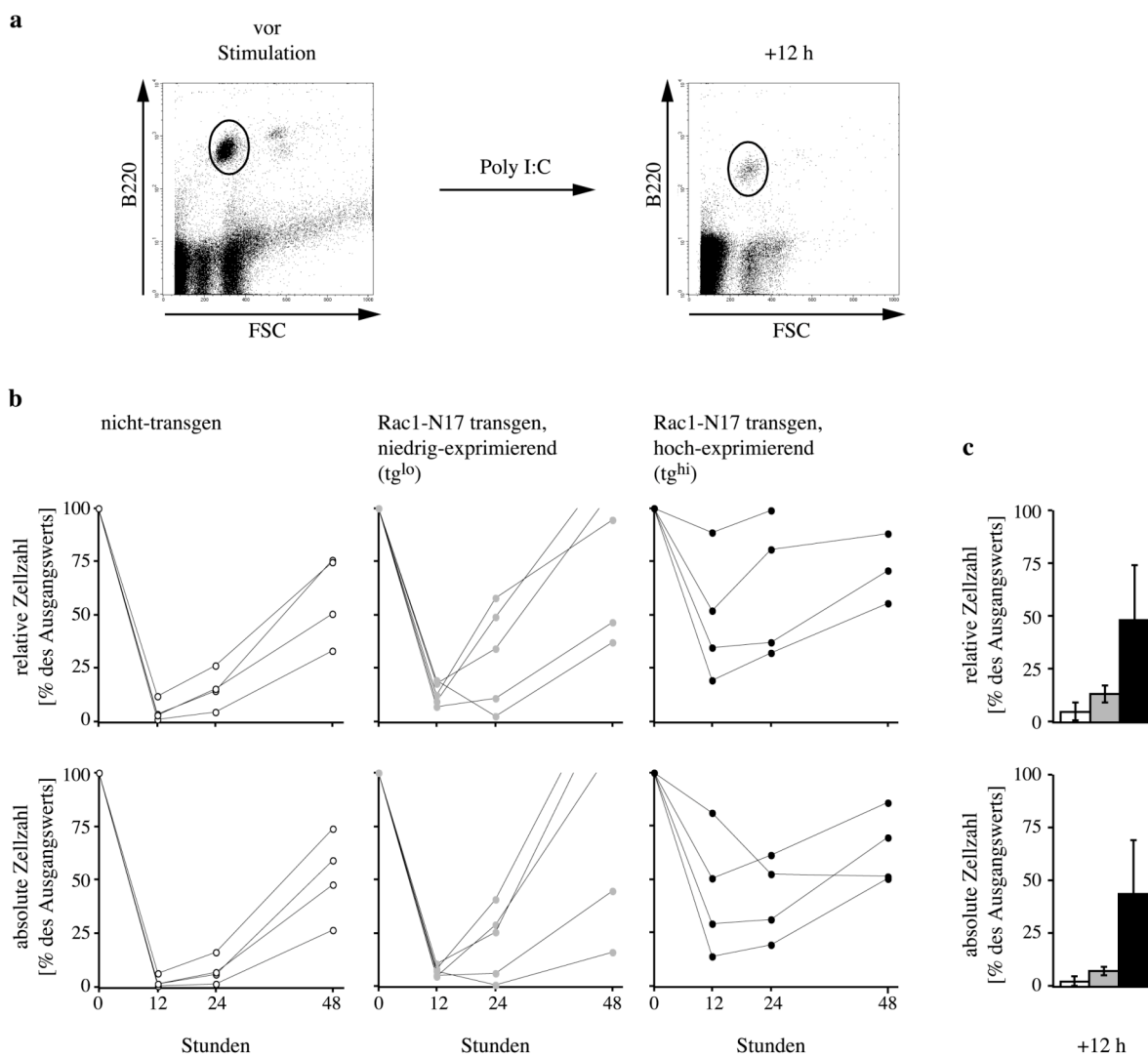


Abb. 5.20: Induktion einer Lymphozytopenie *in vitro*. Mäuse wurden mit $200 \mu\text{g}$ Poly I:C i.p. injiziert. Direkt vor und 12, 24 und 48 Stunden nach Injektion wurde den Tieren peripheres Blut entnommen und darin sowohl die absolute Anzahl, als auch der Prozentsatz B220⁺ Zellen bestimmt. Auswirkung der Injektion und Auswahl der B220⁺ Zellen (a). Vergleich der Kinetik der induzierten Lymphozytopenie im peripheren Blut, in einzelnen Mäusen der drei untersuchten Gruppen: Wildtyp (○) und Rac1-N17 transgene (niedrig-exprimierend: ●, hoch-exprimierend: ●, b). Vergleich der Größen der B-Zellpopulationen am Höhepunkt der Lymphozytopenie, 12 Stunden nach Poly I:C-Injektion (c). Die Ausgangsmeßwerte, vor Poly I:C-Injektion wurden jeweils gleich 100% gesetzt (n=4-5 Mäuse/Gruppe).

Die soeben gezeigte verminderte Migrationsfähigkeit der Rac1-N17 transgenen B-Zellen kann durch defekte in der Funktionsfähigkeit der B-Zellen selbst ihre Ursache haben. Daneben besteht bei den tg^{hi} Mäusen die Möglichkeit, daß eventuell das Rac1-N17 Transgen unspezifisch exprimierende nicht-B-Zellen ihren Beitrag zu dem beobachteten Phänotyp leisten. Dabei könnte vor allem eine verminderte Botenstoff-Sekretion durch Epithelzellen von Bedeutung sein (Taniguchi, T. und Takaoka, A. 2002).

Um derartige Einflüsse auszuschließen, wurde die Induktion der Lymphozytopenie in einem Zelltransfersystem durchgeführt. Dazu wurden Erythrozyten-depletierte Einzelzellsuspensionen aus Milzen von nichttransgenen (Wildtyp) sowie hochexprimierenden, Rac1-N17 transgenen Mäusen (tg^{hi}) in nichttransgene Empfänger 36 Stunden vor Poly I:C- beziehungsweise LPS-Injektion transferiert. Als Unterscheidungsmerkmal zwischen den transferierten Zellen und den Zellen der Empfänger diente der Ly5-Isotyp (Abb. 5.21a). Die transferierten Zellen exprimieren Ly5.2, während der Empfänger Ly5.1 exprimiert. Um gleichzeitig die Liganden-Spezifität der beobachteten Effekte zu untersuchen, wurde neben Poly I:C bei einer anderen Gruppe LPS verwendet. Während wie bereits erwähnt Poly I:C durch TLR3 gebunden wird, bindet TLR4 spezifisch an das verwendete *E. coli* LPS (Akashi, S. *et al.* 2003; Miyake, K. 2004).

Den Versuchstieren wurde 200 µg Poly I:C oder 10 µg LPS i.p. injiziert. Die Bestimmung der Größen der transferierten (Ly5.2⁺) B-Zellpopulationen gab Aufschluß über die Kinetik der induzierten Lymphozytopenie im peripheren Blut. Zwölf Stunden nach Stimulation geht wie erwartet in allen Fällen die Zahl der B-Zellen der Empfänger im peripheren Blut zurück (Empf. wt). Ähnlich verhalten sich die transferierten Wildtyp-B-Zellen (transf. wt), wohingegen die Zahl der tg^{hi} B-Zellen (transf. tg^{hi}) nicht abnimmt. Die Veränderung der Populationsgrößen ist für die Stimulation mit Poly I:C in Abb. 5.21a dargestellt. Ein ähnliches Bild ergab die Stimulation mit LPS (Daten nicht gezeigt). Die genaue Analyse der Kinetik in einzelnen Mäusen ist in Abb. 5.21b dargestellt. Hier wurden sowohl die relativen (prozentualen), als auch absoluten (Zahlen) Größen der transferierten (Ly5.2⁺) B-Zellpopulationen im peripheren Blut vor Poly I:C Injektion gleich 100% gesetzt. Die transferierten Wildtyp-B-Zellen erreichten hier etwa zwischen 12 und 24 Stunden nach Injektion ihre niedrigste Frequenz beziehungsweise Zahl im peripheren Blut um danach wieder anzusteigen. Während die transferierten hochexprimierenden Rac1-N17 transgenen B-Zellen kaum einen Abfall, beziehungsweise sogar einen deutlichen Anstieg ihrer Anzahl erfuhren. Die Gesamtsituation 12 Stunden nach Poly I:C- beziehungsweise LPS-Injektion ist in Abb. 5.21c dargestellt.

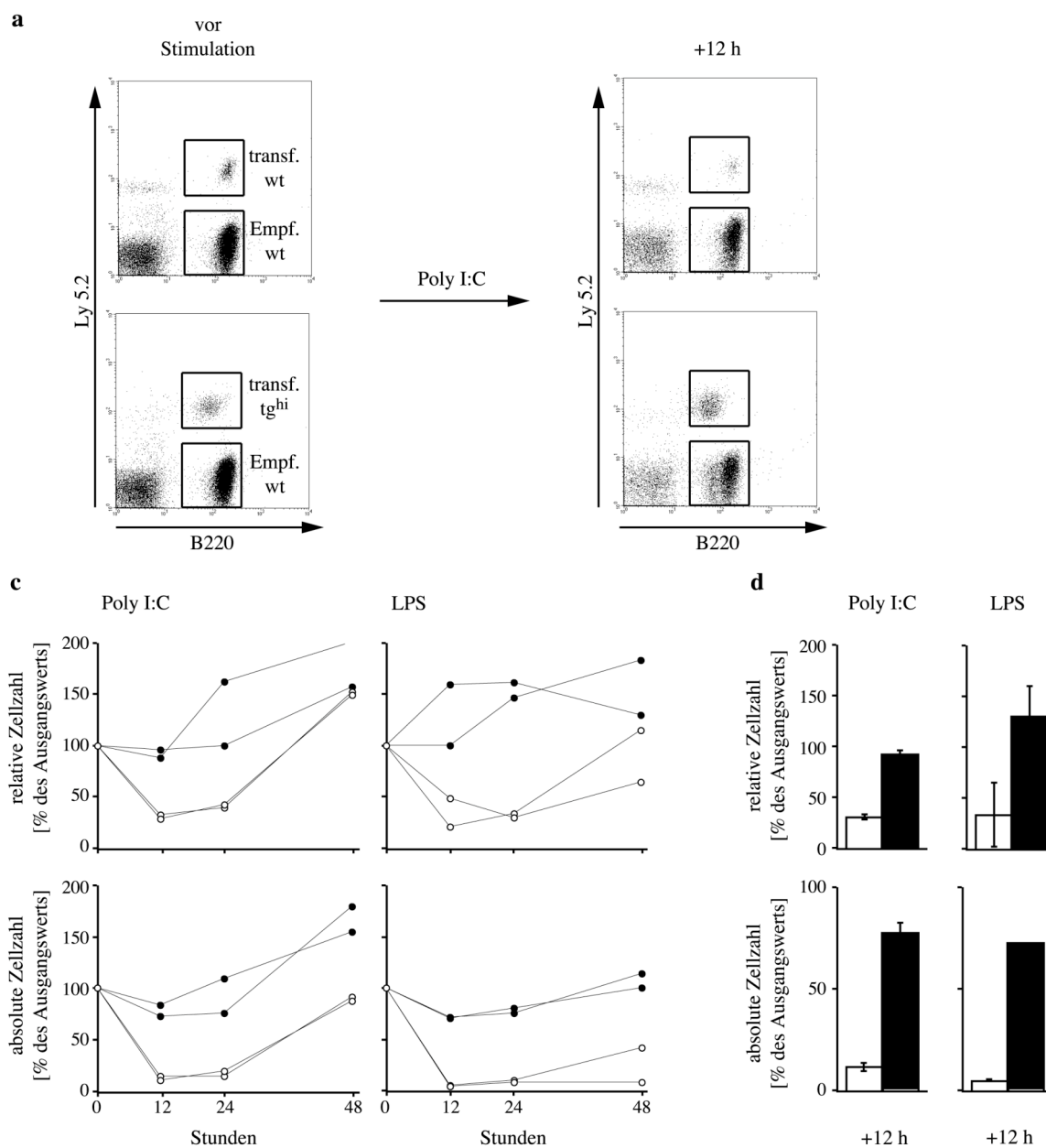


Abb. 5.21: Induktion einer Lymphozytopenie *in vitro*. In nichttransgene Wildtyp-Mäuse wurden 45×10^6 Milzleukozyten von entweder Wildtyp (○) oder hochexprimierenden Rac1-N17 transgenen (●) Mäusen transfertiert. Die Empfänger wurden 36 Stunden später entweder mit $200 \mu\text{g}$ Poly I:C oder $10 \mu\text{g}$ LPS (jeweils in $200 \mu\text{l}$ PBS) i.p. injiziert. Direkt vor und 12, 24 und 48 Stunden nach Injektion wurde den Tieren peripheres Blut entnommen und darin sowohl die absolute Anzahl, als auch der Prozentsatz Ly5.2⁺/B220⁺ Zellen bestimmt. Auswahl der analysierten B-Zellpopulationen (transferierte Zellen: Ly5.2⁺, Zellen des Empfängers: Ly5.2⁻) und beispielhafte Darstellung des abweichenden Verhaltens der transferierten, Rac1-N17 transgenen B-Zellen (transf. tg^{hi}) im Vergleich zum nichttransgenen Wildtyp (transf. wt und Empf. wt, **a**) Vergleich der Kinetik der Lymphozytopenie im peripheren Blut, in einzelnen Mäusen der untersuchten Gruppen: (**b**). Vergleich der Größen der transferierten B-Zellpopulationen am Höhepunkt der Lymphozytopenie, 12 Stunden nach Poly I:C-Injektion (**c**). Die Ausgangsmeßwerte, vor Poly I:C-beziehungsweise LPS-Injektion wurden jeweils gleich 100% gesetzt (n=2 Mäuse/Gruppe).

5.3.5 Migrationsverhalten von B-Lymphozyten entlang eines Chemokingradienten *in vitro*

Die Lokalisation der B-Lymphozyten im Gewebe setzt eine Vielzahl aktiver Prozesse voraus. So ist unter anderen einerseits das Vorhandensein entsprechender Chemokingradienten für eine gerichtete Migration unabdingbar. Andererseits müssen die B-Lymphozyten in der Lage sein, diese Chemokingradienten über spezifische Rezeptoren wahrzunehmen und auf diese Signale zu reagieren. Zirkulierende Lymphozyten exprimieren verschiedene Chemokinrezeptoren, wie CCR7 (Rezeptor für MIP-3 β und 6Ckine), CXCR4 (Rezeptor für SDF-1 α). B-Lymphozyten exprimieren zusätzlich CXCR5, den Rezeptor für BLC. Sowohl MIP-3 β , als auch 6Ckine sind auf Zellen des hohen Endothels in Venolen stark exprimiert (Gunn, M. D. *et al.* 1998; Baekkevold, E. S. *et al.* 2001). Beide spielen eine entscheidende Rolle für die Induktion der Adhäsion der an den Venolen-Wänden rollenden Lymphozyten (Campbell, J. J. *et al.* 1998; Tangemann, K. *et al.* 1998) und für Migration der Lymphozyten in Lymphknoten (Ma, Q. *et al.* 1998). BLC hingegen wird hauptsächlich in Follikeln lymphatischer Organe gebildet. Es liefert entscheidende Signale für eine gerichtete Migration von naiven B-Zellen dorthin (Forster, R. *et al.* 1996; Ansel, K. M. *et al.* 2000).

Die Fähigkeit Rac1-N17 transgener B-Zellen, entlang eines Chemokingradienten zu migrieren, wurde im folgenden Versuch *in vitro* bestimmt. Dazu wurden B-Zellen aus Milzen von CD19/Rac1-N17 transgenen und Wildtyp-Mäusen isoliert, und in einem *Transwell*-Migrationsassay (4.2.2.17, (Boyden, S. 1962)) wurde der Prozentsatz der entlang des Chemokingradienten migrierten B-Zellen bestimmt.

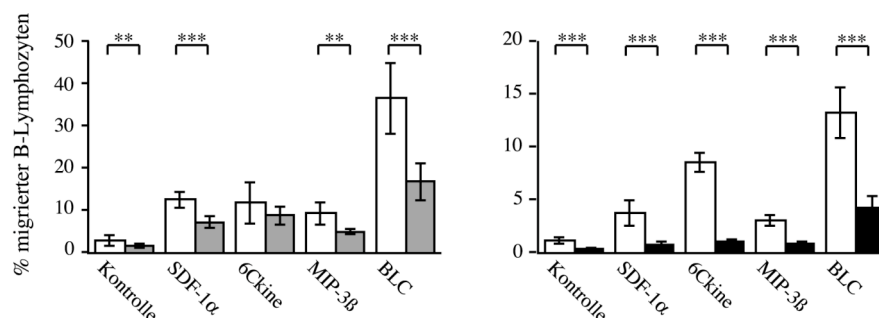


Abb. 5.22: Migration von B-Zellen entlang eines Chemokingradienten *in vitro*. In den Balkendiagrammen ist der Prozentsatz im jeweiligen Gradienten migrierter Wildtyp (\square) und Rac1-N17 transgener (niedrig-exprimierend: \square , hoch-exprimierend: \blacksquare) B-Zellen dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Versuchen (n=5 Mäuse/Gruppe; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$, Student'scher *t*-Test).

Bei der Analyse zeigte sich, daß Rac1-N17 transgene B-Zellen bei allen eingesetzten Chemokinen eine verminderte Migrationsfähigkeit aufwiesen. Desweiteren war die ungerichtete Migration, in Abwesenheit eines Chemokingradienten (Kontrolle), ebenfalls reduziert.

Auch in diesem Experiment war die beobachtete Defizienz direkt von der Expressionsstärke des transgenen Rac1-N17 abhängig.

5.3.6 Aktinpolymerisation

Die zuvor festgestellte *in vitro* Migrationsdefizienz bezog sich nicht nur auf die Migration im Chemokingradienten. Vielmehr war auch die ungerichtete *random*-Migration der Rac1-N17 transgenen B-Zellen *in vitro* inhibiert. Da hier Signaltransduktion nicht involviert war, mußte die Ursache anderweitig lokalisiert sein. Das Aktin-Zytoskelett ist für die Bewegung (Motilität) von eukaryotischen Zellen mitverantwortlich. Dabei werden polymere Aktin-Filamente (F-Aktin) ständig neu auf- und abgebaut. Viele exogene Stimuli haben eine Zunahme der Aktin-Polymerisation zufolge. Im Fall von Defekten in der Funktion verschiedener GTPasen der Rho-Familie konnte ein negativer Effekt auf die Aktin-Polymerisation in verschiedenen Zelltypen beobachtet werden (Hall, A. 1994; Machesky, L. M. und Hall, A. 1996; Allen, W. E. *et al.* 1997).

Für die Messung der induzierten Aktin-Polymerisation wurden B-Zellen jeweils im Zweifachansatz mit verschiedenen Agenzien stimuliert, danach wurde in den fixierten Zellen die Menge des F-Aktins mittels intrazellulärer Färbung mit Phalloidin bestimmt (Abb. 5.23).

Die, für eine maximale Induktion der Aktin-Polymerisation, optimalen Konzentrationen der Stimuli sowie die jeweiligen Inkubationszeiten wurden in entsprechenden Vorversuchen ermittelt.

Unabhängig von dem verwendeten Stimulus, konnte jeweils eine Induktion der Aktin-Polymerisation beobachtet werden. Dabei hatte das Chemokin SDF-1 α und das gegen IgM gerichtete F(ab')₂-Fragment den stärksten Effekt, während LPS und anti-CD40 nur eine geringe Zunahme des F-Aktins im Vergleich zu unstimulierten Zellen zufolge hatten. Die Verminderung der Fähigkeit zu Aktin-Polymerisation in Rac1-N17 transgenen B-Zellen war am deutlichsten feststellbar im Fall von SDF-1 α - und F(ab')₂-Stimulation, während die

Stimulation mit LPS beziehungsweise anti-CD40 keine Unterschiede zwischen Rac1-N17 transgenen und Wildtyp-B-Zellen hervorbrachte.

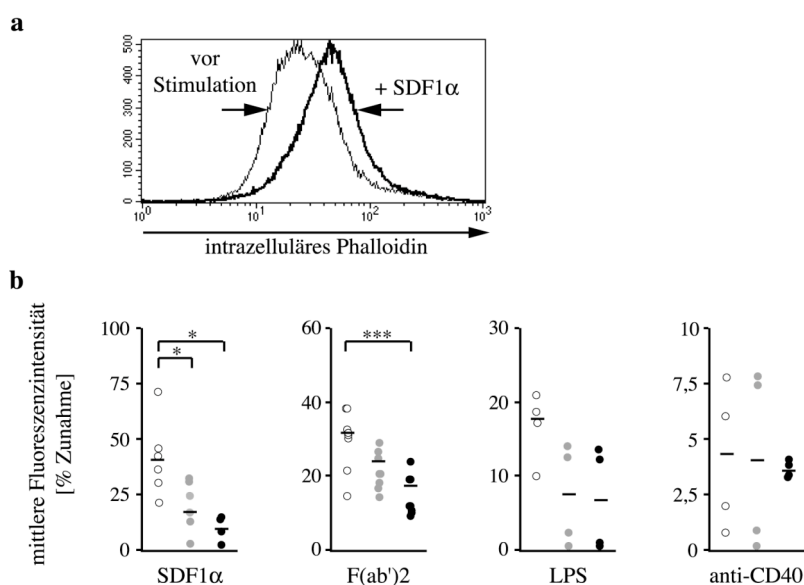


Abb. 5.23: Induktion der Aktin-Polymerisation *in vitro*. Isolierte B-Zellen wurden mit: SDF-1 α 400 ng/ml für 1 min, F(ab')2 10 μ g/ml für 5 min, LPS 10 μ g/ml für 15 min, oder anti-CD40 10 μ g/ml für 30 min stimuliert und die Bildung von F-Aktin mit Hilfe intrazellulärer Phalloidin-Bindung nachgewiesen. Die Stimulation führt zur Zunahme der Phalloidin-Färbeintensität (a). In Graphen dargestellt ist die Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität der Phalloidin-Färbung in stimulierten Zellen, gegenüber nicht-stimulierten Kontrollen, jeweils für einzelne Wildtyp (○) und Rac1-N17 transgene (niedrig-exprimierend: ●, hoch-exprimierend: ●) Mäuse, mit dem dazugehörigen Mittelwert (b), (n=4-8 Mäuse/Gruppe; *, p \leq 0,05; ***, p \leq 0,001, Student'scher t-Test).

5.3.7 Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und dessen Translokation in den Zellkern spielt eine zentrale Rolle für die Regulation der Transkription und somit für die Steuerung wichtiger zellulärer Prozesse. Dazu zählen unter anderem Proliferation, Differenzierung, Apoptose sowie verschiedene Aspekte der Entzündung und Immunantwort. In Säugetierzellen setzt sich das NF- κ B aus zwei Untereinheiten zusammen, die einer strengen Kontrolle durch eine Familie von Inhibitoren (I κ B) unterliegen. I κ B verhindern dabei die Translokation des NF- κ B in den Zellkern und dadurch dessen Bindung an die DNA. NF- κ B kann *in vivo* auf verschiedene Weise aktiviert werden. Unter anderem durch Chemokine, wie SDF-1 α , LPS (Mordmüller, B. *et al.* 2003) oder über die membranständigen B-Zellrezeptoren (Rooney, J. W. *et al.* 1991). Die

verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden konvergieren hier in der Aktivierung des NF- κ B (Hatada, E. N. *et al.* 2000; Ghosh, S. und Karin, M. 2002; Li, Q. und Verma, I. M. 2002).

In Rac1-N17 transgenen HeLa-Zellen wurde eine verminderte NF- κ B-Aktivität beobachtet (Sulciner, D. J. *et al.* 1996; Joyce, D. *et al.* 2001). Daher wurden in diesem Versuch Rac1-N17 transgene und Wildtyp-B-Zellen in Bezug auf ihre Fähigkeit, als Antwort auf exogene Stimuli NF- κ B in den Kern zu translozieren, verglichen. Dazu wurden B-Zellen jeweils im Zweifachansatz mit verschiedenen Agenzien stimuliert, danach wurden die Zellen lysiert und Zellkernextrakte hergestellt. Die Menge des NF- κ B in den Lysaten wurde in einem ELISA bestimmt (Abb. 5.24).

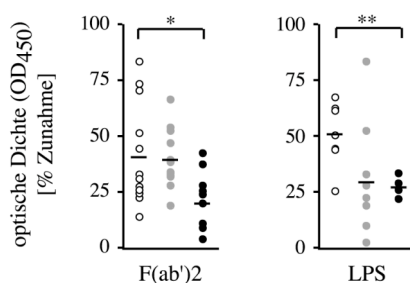


Abb. 5.24: Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern *in vitro*. Isolierte B-Zellen wurden mit: F(ab')₂ 10 μ g/ml für 30 min, oder LPS 10 μ g/ml für 30 min stimuliert und die Translokation von NF- κ B in den Zellkern in einem ELISA gemessen. Dargestellt ist die Zunahme der optischen Dichte aus Proben von stimulierten Zellen, verglichen mit nicht-stimulierten Kontrollen, jeweils für einzelne Wildtyp (○) und Rac1-N17 transgene (niedrig-exprimierend: ●, hoch-exprimierend: ●) Mäuse, mit dem dazugehörigen Mittelwert (n=4-12 Mäuse/Gruppe; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, Student'scher *t*-Test).

Es zeigte sich, daß verglichen mit Zellkernlysaten unstimulierter Zellen, sowohl die F(ab')₂ als auch die LPS-Stimulation eine Zunahme des NF- κ B-Gehaltes der Zellkernlysate zufolge hatte. Verglichen mit Wildtyp, waren Rac1-N17 transgene B-Zellen (tg^{hi}) in diesem Versuch weitaus weniger in der Lage NF- κ B zu aktivieren und in den Zellkern zu translozieren. Die Dosisabhängigkeit der Defizienz vom Expressionsniveau des Rac1-N17 Transgens wurde in der Beobachtung deutlich, daß die niedrigexprimierenden Rac1-N17 transgenen B-Zellen (tg^{lo}) keinen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp aufwiesen.

6 DISKUSSION

Die Erforschung der kleinen GTPasen begann mit der Entdeckung ihrer Funktion in der Krebsentstehung (Harvey, J. J. 1964; Shih, T. Y. *et al.* 1980). Andererseits stieß man bei der Suche nach Interaktionspartnern des für das Wiskott-Aldrich Syndrom verantwortlichen Proteins (WASP) ebenfalls auf verschiedene Mitglieder der Familie der kleinen GTPasen (Aspenstrom, P. *et al.* 1996). In einer Vielzahl darauffolgender Untersuchungen konnte deren Beteiligung an einem breiten Spektrum zellulärer Funktionen festgestellt werden. Dazu zählen unter anderem die Regulation der Aktin-Dynamik, Proliferation, Adhäsion und Migration (Aspenstrom, P. 1999; Etienne-Manneville, S. und Hall, A. 2002). Dabei konnten sowohl exogene Aktivierungs- und Steuerungsmechanismen, als auch intrazelluläre Interaktionspartner (Aspenstrom, P. 1999; Puls, A. *et al.* 1999; Burridge, K. und Wennerberg, K. 2004) sowie funktionelle Effekte (Fukata, M. *et al.* 1999; Ridley, A. J. 2001; Takai, Y. *et al.* 2001) der Aktivität der GTPasen detailliert charakterisiert werden.

Während frühe Untersuchungen hauptsächlich in Zelllinien durchgeführt wurden (Ridley, A. J. und Hall, A. 1992; Olson, M. F. *et al.* 1995; Allen, W. E. *et al.* 1997), basieren neuere Studien auch auf der Verwendung von Versuchstiermodellen (Glogauer, M. *et al.* 2003; Benvenuti, F. *et al.* 2004). Diesen liegt die Überlegung zu Grunde, daß im Gegensatz zu *in vitro* Tests, *in vivo* Modelle den Vorteil eines natürlichen Systems beziehungsweise einer natürlichen Versuchsumgebung bieten, womit eventuelle Zellkulturartefakte vermieden werden können.

Die besondere Schwierigkeit der Erforschung von Rac1 *in vivo* liegt in der embryonalen Lethalität Rac1 defizienter Mäuse (Sugihara, K. *et al.* 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Barriere durch die Verwendung des dominant-negativen Rac1-N17, das die Funktion des endogenen Rac1 unterdrückt, umgangen. Damit war es möglich, die Rolle von Rac1 in der Entwicklung und Funktion der B-Zellen *in vivo* zu untersuchen.

6.1 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Entwicklung der B-Lymphozyten

In der Studie von Walmsley *et al.* (Walmsley, M. J. *et al.* 2003) wurde die Rolle von Rac1 und Rac2 für die B-Zellentwicklung und Signalleitung untersucht. Dort wurden Rac2 defiziente Mäuse (Rac2^{-/-}), sowie Mäuse mit einer induzierten Rac1-Defizienz in CD19⁺ B-Zellen (Rac1^B) verwendet. Während in den Rac2^{-/-} Mäusen der Proteinverlust 100% betrug,

lag die Reduktion der Rac1 Proteinmenge in B-Zellen (CD19⁺) in den Rac1^B Mäusen in der Regel bei 80-90% (Walmsley, M. J. *et al.* 2003, Daten nicht gezeigt).

Wie bereits früher gezeigt (Croker, B. A. *et al.* 2002), ist Rac2 für die Entwicklung von B-Zellen der marginalen Zone (MZB) und B-1 B-Zellen wichtig. MZB und B-1 B-Zellen sind in der Rac2^{-/-} Maus deutlich reduziert. Bei der B-zellspezifisch Rac1 defizienten Maus (Rac1^B) sind von den untersuchten B-Zellpopulationen nur die B-1 B-Zellen um 20% gegenüber Rac1-kompetentem Wildtyp reduziert. Alle anderen B-Zellzahlen unterscheiden sich nicht signifikant vom Wildtyp-Niveau.

In den CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen sind neben den B-1 B-Zellen auch weitere B-Zellpopulationen reduziert: die reifen B-Zellen in der Milz (IgM⁺/IgD⁺), den Lymphknoten (B220⁺) und im Knochenmark (rezirkulierend, IgD⁺/B220⁺), während unreife B-Zellen in der Milz (IgM⁺/IgD⁻) und im Knochenmark (IgD⁻/B220⁺) weder in den das Rac1-N17 Transgen niedrigexprimierenden (tg^{lo}) noch den hochexprimierenden (tg^{hi}) Tieren in ihrer Populationsgröße abweichen (Abb. 5.8). Damit korrelieren die in unserer Studie vorgelegten Daten diesbezüglich weniger mit dem Rac1^B-Phänotyp, sie entsprechen eher der Daten von Rac1^B×Rac2^{-/-} Mäusen (Walmsley, M. J. *et al.* 2003), in denen alle reifen B-Zellpopulationen in ihrer Zahl reduziert waren, während unreife B-Zellen nicht tangiert wurden.

Hierbei wird ein grundsätzlicher Nachteil von *in vivo* und *in vitro* Studien unter Verwendung von dominant-negativen Mutanten der Rho-GTPasen deutlich. Es besteht in der noch wenig erforschten Fähigkeit der N17-Mutanten, verschiedene GEF zu binden (Hart, M. J. *et al.* 1994; Feig, L. A. 1999; Debreceni, B. *et al.* 2004). Mehrere mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität an Rac1 bindende GEF sind ebenso für andere Rho und Ras-GTPasen spezifisch, wie zum Beispiel Alsln, mSos1, Ras GRF1 und 2 (Innocenti, M. *et al.* 1999; Wasiak, S. *et al.* 2001; Kim, C. *et al.* 2003; Topp, J. D. *et al.* 2004). Der durch Bindung von Rac1-N17 hervorgerufene Mangel an entsprechenden GEF kann somit eventuell auch die Aktivitäten anderer Rho und Ras-GTPasen negativ beeinflussen (Grill, B. und Schrader, J. W. 2002). Diese Zusammenhänge könnten damit eine mögliche Erklärung der Diskrepanz zwischen unseren Daten und denen von Walmsley *et al.* darstellen.

Gegen diese Annahme spricht jedoch vor allem die Beobachtung, daß die transgene Expression der N17-Mutanten von Rac1 und Cdc42 in B-Zellen in einem völlig unterschiedlichen Phänotyp resultieren (Brocker, T. unveröffentlichte Daten). Andererseits gilt es bei den Rac2^{-/-} beziehungsweise Rac1^B×Rac2^{-/-} Mäusen zu beachten, daß durch das

Fehlen des Rac2 in allen Zellen des Organismus deutliche Einflüsse seitens anderer Rac2^{-/-}-Zellen auf den Phänotyp der B-Zellen auch bezüglich ihrer Entwicklung möglich sind.

Die Daten von Walmsley *et al.* (Walmsley, M. J. *et al.* 2003) lassen zusätzlich auch auf eine starke funktionelle Redundanz zwischen Rac1 und Rac2 schließen, da nur das gleichzeitige Fehlen beider GTPasen die Reduktion reifer B-Zellen bewirkt, während die isolierten Rac1- und Rac2-Defizienzen nur die MZB beziehungsweise die B-1 B-Zellpopulation stören.

Ungeachtet der Differenzen lassen die Beobachtungen in beiden Systemen den Schluß zu, daß Rac1 für die reifen B-Zellen in allen untersuchten Organen von großer Bedeutung ist, während es für die unreifen B-Zellen eher eine untergeordnete Rolle spielt. Unterschiede in der B-Zellzahl im Vergleich zum nichttransgenen Wildtyp waren in vielen Fällen, besonders bei den tg^{hi} Mäusen deutlich. Für eine normale Entwicklung der B-Zellen, ist neben intrinsischer Funktion der B-Zellen selbst, auch das Vorhandensein und die korrekte Funktion anderer Zelltypen mit entscheidend. Da in den tg^{hi} Mäusen neben B-Zellen auch alle anderen untersuchten Zellen sowohl hämatopoietischen als auch nicht-hämatopoietischen Ursprungs das Rac1-N17 Transgen exprimieren (5.1), bestand die Möglichkeit zusätzlicher negativer Einflüsse durch Rac1-N17 exprimierende nicht-B-Zellen. Diese Art von Beeinflussung konnte jedoch aufgrund der Ergebnisse von Untersuchungen entsprechender Knochenmarkschimären (5.2.2) ausgeschlossen werden.

Der Grund für die verminderte Größe der reifen B-Zellpopulationen könnte entweder in einer verlangsamten Entwicklung oder im schnelleren Absterben der B-Zellen vermutet werden.

Die Untersuchung des Zelltodes (Apoptose und Nekrose) in frisch isolierten B-Zellen aus Knochenmark, Milz und Lymphknoten brachte jedoch keine Unterschiede zwischen CD19/Rac1-N17 und nichttransgenen Wildtyp-Mäusen zu Tage (Abb.5.9). Diese Beobachtung korreliert im Fall der unreifen B-Zellen mit ihrer normalen Populationsgröße, erklärt jedoch nicht die Reduktion der Zellzahl reifer B-Zellen in den CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen.

Die Untersuchung der Proliferationsdynamik *in vivo* wurde mittels der Messung des BrdU-Einbaus in die DNA durchgeführt (Abb. 5.13). Besonders unreife B-Zellen im Knochenmark (IgM⁺/B220^{lo}) und der Milz (IgM⁺/IgD⁻) wiesen eine hohe BrdU-Einbaurrate auf. Dies deutet auf eine rege Proliferationsaktivität hin. Der BrdU-Einbau in der unreifen B-Zellpopulation im Knochenmark war in den CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen im Vergleich zum nichttransgenen Wildtyp deutlich, bei tg^{hi} signifikant beschleunigt, bei der

unreifen B-Zellpopulation in der Milz jedoch entsprechend verlangsamt. Der hohe Prozentsatz BrdU⁺, IgM⁺/IgD⁻ B-Zellen in der Milz der nichttransgenen Wildtyp-Mäuse suggeriert, daß innerhalb der Versuchsdauer von 72 Stunden etwa 70% dieser Zellen die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen haben. Dieser Wert ist jedoch im Vergleich zu Literaturdaten ungewöhnlich hoch (Agenes, F. *et al.* 2000; Agnes, F. 2003). Auffällig ist weiterhin der signifikant niedrigere Prozentsatz BrdU⁺ Zellen innerhalb dieser Population bei den CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen. Damit ist es der einzige B-Zelltyp in dem Rac1-N17 Expression zu einem verlangsamt BrdU-Einbau führt. Bei diesen Ergebnissen gilt es jedoch zu beachten, daß die IgM⁺/IgD⁻ B-Zellpopulation der Milz zum großen Teil aus kürzlich aus dem Knochenmark über den Blutkreislauf hinzugekommenen Zellen, besteht. Zieht man Daten aus den *in vitro* und *in vivo* Migrationsversuchen, die später diskutiert werden hinzu (Abb. 5.22 und 5.18), so scheint die Annahme vertretbar, daß es sich hier hauptsächlich um eine Migrationsdefizienz handeln könnte. Diese Überlegung wird zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, daß im Knochenmark der CD19/Rac1-N17 transgenen Mäuse (tg^{hi}) mehr rezirkulierende BrdU⁺ Zellen vorgefunden werden, als in nichttransgenen Wildtyp-Mäusen (Abb. 5.8a). Auch hier könnten diese Effekte eventuell mit einem Migrationsdefekt zusammenhängen. Ebenfalls gilt es in diesem Zusammenhang, die kurze Versuchsdauer von 48-72 Stunden zu beachten. Bei bestimmten B-Zellen, die eine relativ geringe Teilungsrage aufweisen und zusätzlich nur langsam durch neu hinzugekommene Zellen ersetzt werden, wie das der Fall bei reifen B-Zellen in der Milz und den Lymphknoten ist, läßt sich hier kein Unterschied zwischen CD19/Rac1-N17 transgenen und nichttransgenen Wildtyp-Mäusen feststellen.

Die Gesamtheit der Daten läßt keine eindeutige Schlußfolgerung zur Rolle von Rac1 für die B-Zellproliferation zu, da die Effekte nicht in allen Fällen gegen Migrationseinflüsse abgegrenzt werden können. Auch wäre es denkbar, daß Proliferationsdefekte, die zu unterschiedlichen Zellzahlen führen, erst über einen längeren Zeitraum deutlich werden und sich somit innerhalb der Versuchsdauer der BrdU-Markierung von 48-72 Stunden nicht feststellen lassen, jedoch in 6-8 Wochen alten Versuchstieren, die auf die Größe ihrer B-Zellpopulationen untersucht wurden, manifest werden. Diese Überlegung konnte jedoch nicht experimentell überprüft werden, da einerseits BrdU langfristig toxisch wirkt, andererseits hätten auch innerhalb der sich langsam teilenden B-Zellpopulationen die meisten Zellen einen Zellzyklus bereits durchlaufen. Damit befänden sich die Populationen nicht mehr in der *log*-Phase des BrdU-Einbaus, was die Auswertung der Daten unmöglich machen würde.

Neben der homöostatischen Proliferation *in vivo* wurde im Rahmen dieser Studie auch der Einfluß von Rac1 auf die induzierte Proliferationsfähigkeit von B-Zellen *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse brachten sowohl bei allen verwendeten Stimuli, als auch ohne Stimulus einen deutlichen, teilweise auch bei den tg^{lo} B-Zellen signifikanten Nachteil der Rac1-N17 transgenen B-Zellen gegenüber nichttransgenen Wildtyp zum Vorschein (Abb. 5.10). Die in diesem Versuch verwendeten Stimuli wirken über Rezeptoren, die Signaltransduktion auslösen, an denen auch Rac1 beteiligt ist. F(ab')₂ bindet membranständiges IgM, was zur BCR-Signalleitung führt. Die Beteiligung von Rac1 an der Signalleitung des BCR konnte bei Untersuchungen der Vav-GEF festgestellt werden (Turner, M. und Billadeau, D. D. 2002). Ähnlich verhält es sich bei CD40, das mit dem anti-CD40-Antikörper aktiviert wurde. CD40 gehört zu der TNF-R-Familie, an deren Signalleitung die Beteiligung von Rac1 in T Zellen nachgewiesen werden konnte (Gulbins, E. *et al.* 1996; Brenner, B. *et al.* 1997; Cantrell, D. A. 2003). LPS wirkt über TLR4 und übermittelt Signale über die PI3-Kinase, was wiederum zu Rac1 abhängiger MAPK-Aktivierung führt (Woo, C. H. und Kim, J. H. 2002; Equils, O. *et al.* 2004). Auch die Signalleitung über IL-Rezeptoren involviert Rac1 (Wery-Zennaro, S. *et al.* 2000; Debidida, M. *et al.* 2005).

Auffällig ist weiterhin auch die bereits bei den B-Zellen aus der Milz von tg^{lo} Tieren beobachtete signifikante Verminderung der Proliferationsfähigkeit bei der Stimulation mit anti-CD40 + IL-4 und F(ab')₂ + IL-4. Da diese Differenzen bei der Verwendung von anti-CD40 und F(ab')₂ ohne IL-4 nicht beobachtet werden konnten, kann eine besondere Rolle von Rac1 für die IL-4 induzierte Antwort vermutet werden. Es könnten jedoch auch synergetisch wirkende negative Effekte der Beteiligung von Rac1 an jeweils beiden Signaltransduktionswegen in diesen zwei Ansätzen für die beobachteten Phänomene mitverantwortlich sein.

Da dieser Versuch mit der, sowohl reife (IgM⁺/IgD⁺), als auch unreife (IgM⁺/IgD⁻) Zellentwicklungstadien enthaltenden, Gesamtpopulation der B-Zellen der Milz durchgeführt wurde, korreliert die hier beobachtete verminderte Proliferation für den Ansatz ohne zusätzlichen Stimulus zumindest teilweise mit der *in vivo* beobachteten Situation des BrdU-Versuchs, in dem die Proliferation von unreifen B-Zellen (IgM⁺/IgD⁻) eventuell vermindert war (Abb. 5.13).

Insgesamt unterstützen die dargestellten Ergebnisse die in anderen Systemen und Zelltypen gewonnenen Erkenntnisse, wonach Rac1, mit Ausnahme der Makrophagen (Wells, C. M. *et*

al. 2004), wichtig für die Zellteilung ist (Joyce, D. *et al.* 2001; Mettouchi, A. *et al.* 2001; Vigorito, E. *et al.* 2003).

Die verminderte Größe der Zellpopulation, beziehungsweise das Fehlen eines Zelltyps oder auch eine Migrationsdefizienz können zu Fehlbildungen in Organstrukturen führen (Shinkai, Y. *et al.* 1992; Forster, R. *et al.* 1994; Forster, R. *et al.* 1996). Die Verminderung der MZB in $Rac2^{-/-}$ beziehungsweise CD19/Cdc42-N17 Mäusen betrifft nur einen kleinen Bereich der Organe und verändert die Struktur der Follikel nur in den entsprechenden Bereichen (Walmsley, M. J. *et al.* 2003, Brocker, T. unveröffentlichte Daten). In Übereinstimmung mit Daten von $Rac1^B$ Mäusen (Walmsley, M. J. *et al.* 2003, Daten nicht gezeigt) konnte jedoch weder in tg^{lo} noch in tg^{hi} CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen eine Veränderung der Organstruktur der Milz (Abb. 5.12) oder der untersuchten Lymphknoten (Daten nicht gezeigt) festgestellt werden, obwohl bei den tg^{hi} Mäusen aufgrund der unspezifischen Expression des Transgens neben einer deutlichen Reduktion der Gesamtpopulation der B-Zellen (Abb. 5.6 b und c) unter anderem auch die T-Zellen in ihrer Anzahl mindestens ebenso stark reduziert sind (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Daten läßt sich kein Einfluß der Rac1 Funktion in B-Zellen auf die Struktur lymphatischer Organe beziehungsweise Follikel in Milz und Lymphknoten erkennen.

6.2 Einfluß der Rac1-GTPase auf die Funktion der B-Lymphozyten

Neben der Feststellung der Bedeutung der Rac1 Funktion bei der Entwicklung und Homöostase der B-Zellen konnte als weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Rac1 auf eine breite Palette funktioneller Eigenschaften von B-Zellen bestimmt werden.

6.2.1 Antikörperproduktion

Die bedeutendste Effektorfunktion der B-Zellen liegt im Bereich der humoralen Immunantwort. Die Sekretion von Antikörpern ist dabei unter anderem direkt abhängig von einer Vielzahl von Signalleitungs-, Gentranskriptions- und intrazellulären Transportvorgängen. Die Beteiligung von Rac1 an derartigen Vorgängen wurde in verschiedenen untersuchten Systemen nachgewiesen (Takai, Y. *et al.* 2001; Etienne-

Manneville, S. und Hall, A. 2002; Burridge, K. und Wennerberg, K. 2004). In CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen scheint eine eventuelle Funktionsbeeinträchtigung dieser Prozesse in B-Zellen keinen negativen Einfluß auf die Antikörper-Titer im Serum nicht-immunisierter Mäuse (Normalserum) zu haben. Es ließen sich keine Unterschiede bezüglich der Titer einzelner Antikörper-Isotypen im Normalserum zwischen CD19/Rac1-N17 transgenen (tg^{hi}) und nichttransgenen Wildtyp-Mäusen feststellen. Bei der Untersuchung (5.3.1) wurden 6-7 Wochen alte Versuchstiere verwendet. So war offenbar die auch zahlenmäßig teilweise beeinträchtigte B-Zellpopulation in den CD19/Rac1-N17 transgenen Tieren in der Lage, einen normalen Antikörpertiter über diesen Zeitraum aufzubauen. Die Antikörperproduktion erfolgt normalerweise mit einem sehr starken Überschuß, so daß auch in Mäusen mit nur wenigen B-Zellen normale Antikörpertiter aufgebaut werden können (Schultz, M. *et al.* 2001; Shulga-Morskaya, S. *et al.* 2004). Eventuelle Defekte in Rac1-N17 transgenen B-Zellen hinsichtlich der Signalleitung, Genregulation und Transkription, intrazellulären Transports und weiterer Prozesse, welche für die Antikörpersekretion notwendig sind, haben somit zumindest langfristig keinen meßbaren Effekt in Bezug auf die Antikörpertiter im Normalserum.

Vergleichbare Schlußfolgerungen erlaubt ebenfalls die Analyse der Verläufe von humoralen Thymus-unabhängigen (5.3.2.1) und Thymus-abhängigen (5.3.2.2) Immunantworten. Obwohl Rac1 eine wichtige Rolle für die BCR vermittelte Signaltransduktion spielt (Turner, M. 2002) konnte auch hier bei keiner der beiden Immunisierungen, für keinen der Antikörper-Isotypen zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen CD19/Rac1-N17 transgenen (tg^{lo}) und nichttransgenen Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Abb. 5.16 und 5.17).

Während Rac1 damit keinen messbaren Einfluß auf die Antikörperproduktion hat, konnte für Rac2 eine Beteiligung an diesem Prozeß festgestellt werden. So sind in $Rac2^{-/-}$ Mäusen IgG Titer im Serum teilweise reduziert (Croker, B. A. *et al.* 2002).

Anhand des Vergleichs der Ergebnisse wird deutlich, daß Rac1 und Rac2 unterschiedliche, nicht überlappende Funktionen bei der durch B-Zellen vermittelten humoralen Immunantwort ausüben. Das Fehlen von der bei $Rac2^{-/-}$ beschriebenen Defekte bei der CD19/Rac1-N17 transgenen Maus stützt zusätzlich auch die Überlegung, daß die biochemische Unterdrückung der Rac1 Funktion durch die transgene Rac1-N17 Expression die normale Rac2 Funktion nicht stört.

6.2.2 Zellbewegung

Der bekannteste und besonders gut untersuchte Wirkungsbereich der Rho-GTPasen und damit auch von Rac1 ist die Zellbewegung (Sander, E. E. *et al.* 1999; Ridley, A. J. 2001; Etienne-Manneville, S. und Hall, A. 2002). Für ihre Funktion als professionelle antigenpräsentierende Zellen, sowie für die Antikörperproduktion ist eine korrekte Lokalisation der B-Zellen in lymphatischen Organen unerlässlich (Steeber, D. A. *et al.* 1996). Als eine mögliche Ursache für die verminderten B-Zellzahlen in lymphatischen Organen, beziehungsweise erhöhten B-Zellzahlen im peripheren Blut CD19/Rac1-N17 transgener Mäuse, konnte die dort beobachtete *in vivo* Migrationsdefizienz der B-Zellen bestimmt werden (5.3.3). So konnten Rac1-N17 exprimierende B-Zellen nach einem adoptiven Zelltransfer im Vergleich zu nichttransgenen Wildtyp-B-Zellen schlechter aus peripherem Blut in die Milz und in einem noch stärkeren Maß in die Lymphknoten migrieren. Die histologische Untersuchung der Milz brachte weiterhin die Erkenntnis, daß von den wenigen Rac1-N17 transgenen B-Zellen erneut, im Gegensatz zum nichttransgenen Wildtyp, nur eine Minderheit innerhalb der Versuchsdauer in die B-Zellzone der Follikel migriert ist, während die Mehrheit in der T-Zellzone beziehungsweise vor allem in der roten Pulpa verblieb. Diese Beobachtungen machen deutlich, daß Rac1-N17 die homöostatische *in vivo* Migration (*homing*) von B-Zellen stark negativ beeinflusst. Ähnliche Beobachtungen konnten zuvor auch für Rac1-N17 exprimierende Fibroblasten (Khosravi-Far, R. *et al.* 1995; Michiels, F. *et al.* 1995; Anand-Apte, B. *et al.* 1997) und Kolon-Karzinom-Zellen (Keely, P. J. *et al.* 1997; Shaw, L. M. *et al.* 1997; Yoshioka, K. *et al.* 1998; Itoh, K. *et al.* 1999) gemacht werden. Demgegenüber stehen diametral gegensätzliche Ergebnisse von Studien, wonach Rac1-N17 keine Inhibierung des *in vivo* Migrationsverhaltens in Fibroblasten und Kolon-Karzinom-Zellen verursacht (Ahram, M. *et al.* 2000; O'Connor, K. L. *et al.* 2000). Ähnlich verhält es sich mit Ergebnissen von Untersuchungen der Migrationsfähigkeit von Rac1 defizienten Makrophagen, beziehungsweise davon abgeleiteter Zelllinien. Während in mehreren Studien Rac1^{-/-} Makrophagen in ihrer *in vivo* Migrationsfähigkeit inhibiert waren (Allen, W. E. *et al.* 1997; Cox, D. *et al.* 1997), konnte in einer einzelnen Studie keine solche Defizienz von Rac1^{-/-} Makrophagen festgestellt werden (Wells, C. M. *et al.* 2004). Derartige Ergebnisse bilden jedoch insgesamt eher seltene Ausnahmen und liegen möglicherweise in besonderen experimentellen Ansätzen begründet. In einer neueren Untersuchung konnte auch in DC, im Gegensatz zu anderen Rho-GTPasen, kein negativer Einfluß von Rac1-N17 auf die

Migrationsfähigkeit *in vitro* festgestellt werden (Shurin, G. V. *et al.* 2005). Diese widersprüchlichen Berichte zur Rolle von Rac1 sowie anderer Rho-GTPasen für die *in vivo* und *in vitro* Migrationsfähigkeit könnten eventuell auch auf deren verschiedene Rollen in einzelnen Zelltypen zurückzuführen sein.

Ungeachtet der ungeklärten Differenzen in anderen Zelltypen, konnte in der vorliegenden Arbeit die Evidenz der Bedeutung von Rac1 für die Migrationsfähigkeit von B-Zellen durch weitere *in vivo* und *in vitro* Tests zusätzlich ausgebaut werden.

Die in CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen und in Rezipienten, nach einem adoptiven Transfer Rac1-N17 transgener B-Zellen, wiederholt beobachtete erhöhte Zahl von B-Zellen im peripheren Blut gab Anlaß, die Rolle von Rac1 für das Verhalten von B-Zellen im Fall einer künstlich erzeugten Sepsis zu untersuchen. Im Gegensatz zu dem vergleichsweise langsam ablaufenden Prozeß des *homing*, sind hier aufgrund der plötzlichen, massiven Ausschüttung von Botenstoffen, die Migrationsaktivitäten der B-Zellen besonders schnell und umfangreich.

Der i.p. Injektion von TLR3 und TLR4 Liganden (Poly I:C und LPS) folgte wie erwartet, eine rasche und massive Lymphozytopenie im peripheren Blut (Taniguchi, T. und Takaoka, A. 2002; Stovall, S. H. *et al.* 2004). Der Höhepunkt dieser Reaktion lag bei 12 Stunden nach Induktion. Hier waren nahezu alle nichttransgen Wildtyp-B-Zellen aus dem Blutkreislauf verschwunden. Die Situation normalisierte sich weitgehend wieder nach weiteren 36 Stunden. Demgegenüber stand die Situation in CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen. Während bei den tg^{lo} Mäusen die Inhibierung kaum deutlich wurde, war sie bei tg^{hi} Mäusen sehr stark ausgeprägt. Auch in einem weiteren Zelltransferexperiment, in dem ein eventueller negativer Einfluß Rac1-N17 exprimierender nicht-B-Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurde eine vergleichbare Inhibierung der Extravasation Rac1-N17 transgener (tg^{hi}) B-Zellen aus dem Blut beobachtet (5.3.4).

Mit diesen Versuchen konnte erneut die Bedeutung von Rac1 für Migrationsprozesse in B-Zellen bestimmt werden. Daneben wurde auch deutlich, daß in der das Rac1-N17 Transgen hochexprimierenden Maus (tg^{hi}) die unspezifische Expression des Transgens in Zellen nicht-hämatopoietischen Ursprungs keinen erkennbaren zusätzlichen Einfluß auf die Inhibierung der Extravasation von B-Zellen ausübt.

Obwohl in diesen Versuchen die verminderte Reaktionsfähigkeit von Rac1-N17 transgenen B-Zellen auf die, eine Infektion signalisierende Situation beobachtet wurde, scheinen derartige Einflüsse in keinem Zusammenhang mit der Effektivität einer humoralen

Immunantwort zu stehen, die in CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen normal verläuft (5.3.2).

Die Fähigkeit Rac1-N17 transgener B-Zellen, entlang von Botenstoff-Gradienten zu migrieren, wurde in einem *in vitro* Ansatz untersucht. Die Tatsache der Chemokin-abhängigen Aktivierung kleiner GTPasen in B-Zellen (McLeod, S. J. *et al.* 2004) unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (5.3.5), wonach im Vergleich zum nichttransgenen Wildtyp, Rac1-N17 exprimierende B-Zellen nur in einem geringeren Maß auf CC (6CKine, MIP-3 β) und CXC (SDF-1 α , BLC) Chemokine reagieren konnten. Diese Ergebnisse stimmen mit Berichten überein, in welchen die Rolle von Rac1 für die durch Chemokine ausgelöste, gerichtete Migration untersucht wurde. Demnach wiesen sowohl Rac1^{-/-} HSC als auch Rac1^{-/-} Neutrophile entsprechende chemotaktische Defekte auf (Glogauer, M. *et al.* 2003; Gu, Y. *et al.* 2003). Ähnliches konnte auch für Rac2^{-/-} Neutrophile beobachtet werden (Roberts, A. W. *et al.* 1999).

Die Prozesse der homöostatischen *in vivo* Migration (*homing*), der durch Chemokingradienten induzierten *in vitro* Migration sowie der durch verschiedene TLR Liganden induzierte *in vivo* Lymphozytopenie im peripheren Blut setzen die einwandfreie Funktion verschiedener Prozesse innerhalb der B-Zelle voraus. Dazu zählen die Signaltransduktion von Oberflächenrezeptoren zu Effektormolekülen, die unter anderem die Genregulation aber auch die Reorganisation des Zytoskeletts beeinflussen.

In CD19/Rac1-N17 transgenen Mäusen ist die Reaktion auf Signale von BCR, CD40 (5.2.4 und 5.3.7), Interleukin- und Chemokinrezeptoren (5.3.5 und 5.3.6) TLR (5.3.4 und 5.4.7) inhibiert. Bei von diesen Rezeptoren ausgehenden Signaltransduktionskaskaden konnte in allen Fällen die Beteiligung von Rac1 in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden (Ridley, A. J. 1994; Narumiya, S. 1996). Somit können auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Defekte der Migrationsfähigkeit von Rac1-N17 transgenen B-Zellen zumindest teilweise in einer fehlerhaften Signaltransduktion begründet sein.

6.2.3 Aktin-Polymerisation und Genregulation

Ähnlich der Beteiligung von Rac1 bei der, über verschiedene Oberflächenrezeptoren und intrazelluläre Signalleitungswege vermittelten, Migration von B-Zellen, konnte die Rolle von Rac1 bei der induzierten Aktin-Polymerisation *in vitro* festgestellt werden (5.3.6). So war die, durch das Chemokin SDF-1 α und die Kreuzvernetzung der Oberflächen IgM

durch F(ab')₂ induzierte, F-Aktin-Formation in Rac1-N17 transgenen B-Zellen inhibiert. Ähnliche Defekte in der durch Chemokine initiierten Ausbildung von Aktin-Filamenten konnten unter anderem in Rac1^{-/-} Neutrophilen (Guillemot, J. C. *et al.* 1997; Glogauer, M. *et al.* 2003), in Rac2^{-/-} Neutrophilen (Roberts, A. W. *et al.* 1999), Rac2^{-/-} Prä-T-Zellen (Corre, I. *et al.* 2001) und Rac2^{-/-} T-Zellen (Yu, H. *et al.* 2001; Croker, B. A. *et al.* 2002) beobachtet werden.

Die Stimulierung mit LPS und anti-CD40 enthüllte keine Unterschiede in der Bildung von F-Aktin zwischen Rac1-N17 transgenen und nichttransgenen Wildtyp-B-Zellen. Somit läßt sich zusammenfassend feststellen, daß Rac1 bei einigen, jedoch nicht allen Stimuli für die Bildung von F-Aktin mitverantwortlich ist.

Diese Ergebnisse könnten ebenfalls ein Hinweis sein, auf eine möglicherweise unterschiedliche Rolle von Rac1 bei der durch LPS beziehungsweise anti-CD40 induzierten Bildung von F-Aktin einerseits und der durch LPS induzierten Lymphozytopenie im peripheren Blut, sowie LPS und anti-CD40 induzierten Proliferation von B-Zellen *in vitro* andererseits.

6.2.4 Transkriptionskontrolle

Mit der Untersuchung der Kapazität von B-Zellen, den Transkriptionsfaktor NF-κB nach einer Stimulierung *in vitro* in den Zellkern zu translozieren, wurde beispielhaft der Einfluß von Rac1 auf die Regulation der Genaktivität bestimmt (5.3.7).

Die subzelluläre Lokalisation eines Proteins kann für seine Funktion von entscheidender Bedeutung sein. Ein Beispiel hierfür sind DNA bindende Transkriptionsregulatoren.

Rac1 spielt eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Lokalisation verschiedener Moleküle. Contractin, ein Aktin-bindendes Substrat der Src-Kinase, wird durch von Wachstumsfaktorrezeptoren induzierte Rac1-Aktivität vom Zytoplasma an besondere Zellmembranbereiche (*membrane ruffles*) transloziert. Dieser Vorgang wird durch Rac1-N17 inhibiert (Weed, S. A. *et al.* 1998).

Die durch Rac1 und andere Rho-GTPasen über Phosphorylierung von IκB vermittelte, Redox-abhängige NF-κB-Aktivierung wurde in mehreren Systemen demonstriert (Sulciner, D. J. *et al.* 1996; Perona, R. *et al.* 1997; Montaner, S. *et al.* 1998; Joyce, D. *et al.* 1999; Reyes-Reyes, M. *et al.* 2001; Huang, W. *et al.* 2005). Auch wird die TLR2 und IL-Rezeptor

vermittelte NF- κ B-Aktivierung durch Rac1-N17 Expression inhibiert (Arbibe, L. *et al.* 2000; Joyce, D. *et al.* 2001).

Diese Daten decken sich mit den in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnissen, wonach die transgene Rac1-N17 Expression die BCR und TLR4 vermittelte NF- κ B Translokation in den Zellkern in B-Zellen inhibiert. Damit wird deutlich, daß Rac1 neben vielen anderen Zelltypen auch in B-Zellen für die Genregulation mitverantwortlich ist.



7 AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem *in vivo* Modell die Rolle von Rac1 für die Entwicklung und Funktion von B-Zellen detailliert untersucht werden.

Vorläufige Daten über andere Rho-GTPasen deuten darauf hin, daß neben vielen Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede im Bezug auf den Phänotyp einer Defizienz beobachtet werden können. So führt im Gegensatz zu Rac1-N17, zum Beispiel die Expression des nahe verwandten, dominant-negativen Cdc42-N17 in B-Zellen zu einem selektiven, fast vollständigen Verlust der B-Zellen der marginalen Zone in der Milz, während andere B-Zellpopulationen nicht betroffen sind (Brocker, T. unveröffentlichte Daten). Gleichzeitig sind auch Unterschiede bezüglich der Rolle ein und derselben GTPase in verschiedenen Zelltypen feststellbar. So inhibiert Rac1-N17 bei B-Zellen die Migration, während es auf DC in dieser Hinsicht keinen Einfluß hat (Shurin, G. V. *et al.* 2005).

Die weitere Erforschung der Funktion einzelner Rho-GTPasen in verschiedenen Zelltypen des hämatopoietischen Systems könnte neue Erkenntnisse über die Bedeutung GTPase abhängiger Prozesse für die Funktionsfähigkeit und Wirkungsweise bestimmter Zellen sowie der Gesamtheit des Immunsystems liefern. Ebenso würde das Verständnis von Mechanismen, die für den Phänotyp von bestimmten Immundefizienzen verantwortlich sind, erweitert und verfeinert werden. Das für das Wiskott-Aldrich-Syndrom verantwortliche Protein ist beispielsweise als Interaktionspartner verschiedener GTPasen bekannt (Aspenstrom, P. *et al.* 1996; Westerberg, L. *et al.* 2001).

Einen anderen Aspekt solcher Untersuchungen stellen die Systemvoraussetzungen dar. *In vitro* und *in vivo* Tests waren bisher oft mit dem Einsatz dominant-negativer oder dominant-aktiver Mutanten der entsprechenden GTPasen verknüpft. Hier könnten durch den auftretenden Mangel von mehrfach spezifischen GEF eventuell auch andere GTPasen unspezifisch inhibiert werden und damit die Ergebnisse möglicherweise verfälschen (Hart, M. J. *et al.* 1994; Feig, L. A. 1999; Debreceni, B. *et al.* 2004).

Eine andere Lösung für *in vivo* Untersuchungen der Rho-GTPasen bietet der Einsatz von Versuchstieren, die für einzelne GTPasen defizient sind. Diese Möglichkeit wird eingeschränkt aufgrund der Tatsache, daß das Fehlen von bestimmten GTPasen, wie beispielsweise Rac1, bereits in der Embryonalentwicklung zum Tod führt. Desweiteren, bedingt durch das Fehlen des Moleküls in allen Zellen des Organismus, lassen sich die Beiträge einzelner Zelltypen für den resultierenden Phänotyp nicht immer eindeutig definieren beziehungsweise voneinander abgrenzen.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung eines sogenannten konditionellen *knockout*. Hierbei wird die Defizienz durch eine Deletion in der für das Protein kodierenden DNA-Sequenz, in einzelnen Tieren induziert. Dieser Eingriff kann auch Zellart-spezifisch erfolgen, was den Vorteil der Aufrechterhaltung der vollen Funktionsfähigkeit aller übrigen Zellen des Organismus bietet.

Die besondere Stellung der Rho-GTPasen hinsichtlich ihrer speziellen Fähigkeit der Bündelung extrazellulärer Signale, der Mannigfaltigkeit möglicher Effektoren sowie der vielschichtigen Wechselwirkungen untereinander, jeweils in zusätzlicher Abhängigkeit vom Zelltyp, verleihen entsprechenden Untersuchungen eine besondere Bedeutung.

Diese tragen auch zum Verständnis der Bedeutung verschiedener, von einzelnen Rho GTPasen abhängiger Prozesse für die Funktionsfähigkeit und Wirkungsweise einzelner Zelltypen und der Gesamtheit des Immunsystems bei.



8 LITERATURVERZEICHNIS

(1995). "Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO Scientific Group." Clin Exp Immunol **99 Suppl 1**: 1-24.

(1997). "Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group." Clin Exp Immunol **109 Suppl 1**: 1-28.

Agenes, F. (2003). "B lymphocyte life span, rate of division and differentiation are regulated by total cell number." Eur J Immunol **33**(4): 1063-9.

Agenes, F., Rosado, M. M. und Freitas, A. A. (2000). "Peripheral B cell survival." Cell Mol Life Sci **57**(8-9): 1220-8.

Ahmed, R. und Gray, D. (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." Science **272**(5258): 54-60.

Ahram, M., Sameni, M., Qiu, R. G., Linebaugh, B., Kirn, D. und Sloane, B. F. (2000). "Rac1-induced endocytosis is associated with intracellular proteolysis during migration through a three-dimensional matrix." Exp Cell Res **260**(2): 292-303.

Akashi, K., Reya, T., Dalma-Weiszhausz, D. und Weissman, I. L. (2000). "Lymphoid precursors." Curr Opin Immunol **12**(2): 144-50.

Akashi, S., Saitoh, S., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y. *et al.* (2003). "Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14." J Exp Med **198**(7): 1035-42.

Akira, S. und Hemmi, H. (2003). "Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family." Immunol Lett **85**(2): 85-95.

Aktorics, K., Schmidt, G. und Just, I. (2000). "Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins." Biol Chem **381**(5-6): 421-6.

Aldrich, R. A., Steinberg, A. G. und Campbell, D. C. (1954). "Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea." Pediatrics **13**(2): 133-9.

Allen, W. E., Jones, G. E., Pollard, J. W. und Ridley, A. J. (1997). "Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages." J Cell Sci **110 (Pt 6)**: 707-20.

Allman, D. M., Ferguson, S. E., Lentz, V. M. und Cancro, M. P. (1993). "Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells." J Immunol **151**(9): 4431-44.

Anand-Apte, B., Zetter, B. R., Viswanathan, A., Qiu, R. G., Chen, J., Ruggieri, R. *et al.* (1997). "Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways." J Biol Chem **272**(49): 30688-92.

Andersson, J., Coutinho, A., Lernhardt, W. und Melchers, F. (1977). "Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion in vitro of every growth-inducible B lymphocyte." Cell **10**(1): 27-34.

Andersson, J., Melchers, F. und Rolink, A. (1995). "Stimulation by T cell independent antigens can relieve the arrest of differentiation of immature auto-reactive B cells in the bone marrow." Scand J Immunol **42**(1): 21-33.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D. *et al.* (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." Nature **406**(6793): 309-14.

Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N. *et al.* (2000). "Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway." Nat Immunol **1**(6): 533-40.

Arrieumerlou, C., Randriamampita, C., Bismuth, G. und Trautmann, A. (2000). "Rac is involved in early TCR signaling." J Immunol **165**(6): 3182-9.

Ashton-Rickardt, P. G., Bandeira, A., Delaney, J. R., Van Kaer, L., Pircher, H. P., Zinkernagel, R. M. *et al.* (1994). "Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus." Cell **76**(4): 651-63.

Ashton-Rickardt, P. G. und Tonegawa, S. (1994). "A differential-avidity model for T-cell selection." Immunol Today **15**(8): 362-6.

Aspenstrom, P. (1999). "Effectors for the Rho GTPases." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 95-102.

Aspenstrom, P. (1999). "The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton." Exp Cell Res **246**(1): 20-5.

Aspenstrom, P., Lindberg, U. und Hall, A. (1996). "Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome." Curr Biol **6**(1): 70-5.

Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Palframan, R. T., Carlsen, H. S., Reinholt, F. P., von Andrian, U. H. *et al.* (2001). "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment." J Exp Med **193**(9): 1105-12.

Banchereau, J. und Rousset, F. (1991). "Growing human B lymphocytes in the CD40 system." Nature **353**(6345): 678-9.

- Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Barbacid, M. (1987). "ras genes." Annu Rev Biochem **56**: 779-827.
- Bassing, C. H., Swat, W. und Alt, F. W. (2002). "The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination." Cell **109 Suppl**: S45-55.
- Bengten, E., Wilson, M., Miller, N., Clem, L. W., Pilstrom, L. und Warr, G. W. (2000). "Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics." Curr Top Microbiol Immunol **248**: 189-219.
- Benvenuti, F., Hugues, S., Walmsley, M., Ruf, S., Fetler, L., Popoff, M. *et al.* (2004). "Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming." Science **305**(5687): 1150-3.
- Bergsagel, P. L. und Kuehl, W. M. (2001). "Chromosome translocations in multiple myeloma." Oncogene **20**(40): 5611-22.
- Betson, M., Lozano, E., Zhang, J. und Braga, V. M. (2002). "Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **277**(40): 36962-9.
- Billadeau, D. D., Brumbaugh, K. M., Dick, C. J., Schoon, R. A., Bustelo, X. R. und Leibson, P. J. (1998). "The Vav-Rac1 pathway in cytotoxic lymphocytes regulates the generation of cell-mediated killing." J Exp Med **188**(3): 549-59.
- Bishop, A. L. und Hall, A. (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-55.
- Bishop, G. A. und Hostager, B. S. (2001). "Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation." Immunol Res **24**(2): 97-109.
- Boguski, M. S. und McCormick, F. (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." Nature **366**(6456): 643-54.
- Bokoch, G. M. (2000). "Regulation of cell function by Rho family GTPases." Immunol Res **21**(2-3): 139-48.
- Bokoch, G. M., Vlahos, C. J., Wang, Y., Knaus, U. G. und Traynor-Kaplan, A. E. (1996). "Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase." Biochem J **315 (Pt 3)**: 775-9.
- Bolis, A., Corbetta, S., Cioce, A. und de Curtis, I. (2003). "Differential distribution of Rac1 and Rac3 GTPases in the developing mouse brain: implications for a role of Rac3 in Purkinje cell differentiation." Eur J Neurosci **18**(9): 2417-24.

- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-66.
- Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A. und Hotchin, N. A. (1997). "The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts." J Cell Biol **137**(6): 1421-31.
- Brasel, K., McKenna, H. J., Morrissey, P. J., Charrier, K., Morris, A. E., Lee, C. C. *et al.* (1996). "Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice." Blood **88**(6): 2004-12.
- Braun, U., Rajewsky, K. und Pelanda, R. (2000). "Different sensitivity to receptor editing of B cells from mice hemizygous or homozygous for targeted Ig transgenes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7429-34.
- Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F. und Gulbins, E. (1997). "Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153." J Biol Chem **272**(35): 22173-81.
- Brunner, C., Marinkovic, D., Klein, J., Samardzic, T., Nitschke, L. und Wirth, T. (2003). "B cell-specific transgenic expression of Bcl2 rescues early B lymphopoiesis but not B cell responses in BOB.1/OBF.1-deficient mice." J Exp Med **197**(9): 1205-11.
- Bruton, O. C. (1952). "Agammaglobulinemia." Pediatrics **9**(6): 722-8.
- Buckler, C. E., DuBuy, H. G., Johnson, M. L. und Baron, S. (1971). "Kinetics of serum interferon response in mice after single and multiple injections of polyI-poly C." Proc Soc Exp Biol Med **136**(2): 394-8.
- Burridge, K. und Wennerberg, K. (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-79.
- Burrows, P. D. und Cooper, M. D. (1997). "IgA deficiency." Adv Immunol **65**: 245-76.
- Busslinger, M. (2004). "Transcriptional control of early B cell development." Annu Rev Immunol **22**: 55-79.
- Butcher, E. C. (1991). "Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity." Cell **67**(6): 1033-6.
- Butcher, E. C. und Picker, L. J. (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." Science **272**(5258): 60-6.
- Butcher, E. C., Scollay, R. G. und Weissman, I. L. (1980). "Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules." Eur J Immunol **10**(7): 556-61.
- Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. und Briskin, M. (1999). "Lymphocyte trafficking and regional immunity." Adv Immunol **72**: 209-53.

- Calame, K. (2001). "Immunology. End game for B cells." Nature **412**(6844): 289-90.
- Calame, K. L. (2001). "Plasma cells: finding new light at the end of B cell development." Nat Immunol **2**(12): 1103-8.
- Cambier, J. C. und Campbell, K. S. (1990). "Signal transduction by B lymphocyte receptors: structure-function relationships of membrane immunoglobulins and associated molecules." Semin Immunol **2**(2): 139-49.
- Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A. und Butcher, E. C. (1998). "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions." Science **279**(5349): 381-4.
- Cancro, M. P. und Kearney, J. F. (2004). "B cell positive selection: road map to the primary repertoire?" J Immunol **173**(1): 15-9.
- Cantrell, D. A. (2003). "GTPases and T cell activation." Immunol Rev **192**: 122-30.
- Caron, E. (2003). "Rac signalling: a radical view." Nat Cell Biol **5**(3): 185-7.
- Caron, E. und Hall, A. (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-21.
- Carsetti, R., Rosado, M. M. und Wardmann, H. (2004). "Peripheral development of B cells in mouse and man." Immunol Rev **197**: 179-91.
- Casellas, R., Shih, T. A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K. *et al.* (2001). "Contribution of receptor editing to the antibody repertoire." Science **291**(5508): 1541-4.
- Cerione, R. A. und Zheng, Y. (1996). "The Dbl family of oncogenes." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 216-22.
- Charrasse, S., Causeret, M., Comunale, F., Bonet-Kerrache, A. und Gauthier-Rouviere, C. (2003). "Rho GTPases and cadherin-based cell adhesion in skeletal muscle development." J Muscle Res Cell Motil **24**(4-6): 309-13.
- Chaudhuri, J. und Alt, F. W. (2004). "Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair." Nat Rev Immunol **4**(7): 541-52.
- Cherfils, J. und Chardin, P. (1999). "GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci **24**(8): 306-11.
- Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M. (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." J Bacteriol **127**(3): 1550-7.

- Chimini, G. und Chavrier, P. (2000). "Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment." Nat Cell Biol **2**(10): E191-6.
- Chung, C. Y., Lee, S., Briscoe, C., Ellsworth, C. und Firtel, R. A. (2000). "Role of Rac in controlling the actin cytoskeleton and chemotaxis in motile cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5225-30.
- Chung, J. B., Silverman, M. und Monroe, J. G. (2003). "Transitional B cells: step by step towards immune competence." Trends Immunol **24**(6): 343-9.
- Condeelis, J. (2001). "How is actin polymerization nucleated in vivo?" Trends Cell Biol **11**(7): 288-93.
- Cook, J. R., Wormstall, E. M., Hornell, T., Russell, J., Connolly, J. M. und Hansen, T. H. (1997). "Quantitation of the cell surface level of Ld resulting in positive versus negative selection of the 2C transgenic T cell receptor in vivo." Immunity **7**(2): 233-41.
- Cooper, N. R. (1985). "The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component." Adv Immunol **37**: 151-216.
- Corre, I., Gomez, M., Vielkind, S. und Cantrell, D. A. (2001). "Analysis of thymocyte development reveals that the GTPase RhoA is a positive regulator of T cell receptor responses in vivo." J Exp Med **194**(7): 903-14.
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N. *et al.* (1995). "The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway." Cell **81**(7): 1137-46.
- Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P. G., Bokoch, G. M. und Greenberg, S. (1997). "Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes." J Exp Med **186**(9): 1487-94.
- Crespo, P., Bustelo, X. R., Aaronson, D. S., Coso, O. A., Lopez-Barahona, M., Barbacid, M. *et al.* (1996). "Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav." Oncogene **13**(3): 455-60.
- Crocker, B. A., Handman, E., Hayball, J. D., Baldwin, T. M., Voigt, V., Cluse, L. A. *et al.* (2002). "Rac2-deficient mice display perturbed T-cell distribution and chemotaxis, but only minor abnormalities in T(H)1 responses." Immunol Cell Biol **80**(3): 231-40.
- Crocker, B. A., Tarlinton, D. M., Cluse, L. A., Tuxen, A. J., Light, A., Yang, F. C. *et al.* (2002). "The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes." J Immunol **168**(7): 3376-86.
- Cyster, J. G., Ansel, K. M., Reif, K., Ekland, E. H., Hyman, P. L., Tang, H. L. *et al.* (2000). "Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles." Immunol Rev **176**: 181-93.
- Daeron, M. (1997). "Fc receptor biology." Annu Rev Immunol **15**: 203-34.

- Debidda, M., Wang, L., Zang, H., Poli, V. und Zheng, Y. (2005). "A role of STAT3 in Rho GTPase regulated cell migration and proliferation." J Biol Chem.
- Debreceni, B., Gao, Y., Guo, F., Zhu, K., Jia, B. und Zheng, Y. (2004). "Mechanisms of guanine nucleotide exchange and Rac-mediated signaling revealed by a dominant negative trio mutant." J Biol Chem **279**(5): 3777-86.
- Debrick, J. E., Campbell, P. A. und Staerz, U. D. (1991). "Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses." J Immunol **147**(9): 2846-51.
- Decker, D. J., Boyle, N. E., Koziol, J. A. und Klinman, N. R. (1991). "The expression of the Ig H chain repertoire in developing bone marrow B lineage cells." J Immunol **146**(1): 350-61.
- Derry, J. M., Ochs, H. D. und Francke, U. (1994). "Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome." Cell **78**(4): 635-44.
- Desiderio, S. (1997). "Role of Btk in B cell development and signaling." Curr Opin Immunol **9**(4): 534-40.
- Di Santo, J. P., de Saint Basile, G., Durandy, A. und Fischer, A. (1994). "Hyper-IgM syndrome." Res Immunol **145**(3): 205-9; discussion 244-9.
- Dinauer, M. C. (2003). "Regulation of neutrophil function by Rac GTPases." Curr Opin Hematol **10**(1): 8-15.
- Dorseuil, O., Reibel, L., Bokoch, G. M., Camonis, J. und Gacon, G. (1996). "The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1." J Biol Chem **271**(1): 83-8.
- Dorshkind, K. (1990). "Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products." Annu Rev Immunol **8**: 111-37.
- Driver, D. J., McHeyzer-Williams, L. J., Cool, M., Stetson, D. B. und McHeyzer-Williams, M. G. (2001). "Development and maintenance of a B220- memory B cell compartment." J Immunol **167**(3): 1393-405.
- Dunn-Walters, D., Thiede, C., Alpen, B. und Spencer, J. (2001). "Somatic hypermutation and B-cell lymphoma." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1405): 73-82.
- Eaton, S., Auvinen, P., Luo, L., Jan, Y. N. und Simons, K. (1995). "CDC42 and Rac1 control different actin-dependent processes in the Drosophila wing disc epithelium." J Cell Biol **131**(1): 151-64.
- Edry, E. und Melamed, D. (2004). "Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis." J Immunol **173**(7): 4265-71.

- Equils, O., Madak, Z., Liu, C., Michelsen, K. S., Bulut, Y. und Lu, D. (2004). "Rac1 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein mediate Toll-like receptor 4 induction of HIV-long terminal repeat." J Immunol **172**(12): 7642-6.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A. (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-35.
- Fanger, G. R., Johnson, N. L. und Johnson, G. L. (1997). "MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42." Embo J **16**(16): 4961-72.
- Fecteau, J. F. und Neron, S. (2003). "CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells." J Immunol **171**(9): 4621-9.
- Feig, L. A. (1999). "Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases." Nat Cell Biol **1**(2): E25-7.
- Fenton, M. J. und Golenbock, D. T. (1998). "LPS-binding proteins and receptors." J Leukoc Biol **64**(1): 25-32.
- Fischer, A. (1992). "Severe combined immunodeficiencies." Immunodefic Rev **3**(2): 83-100.
- Forster, I., Gu, H., Muller, W., Schmitt, M., Tarlinton, D. und Rajewsky, K. (1991). "CD5 B cells in the mouse." Curr Top Microbiol Immunol **173**: 247-51.
- Forster, I. und Rajewsky, K. (1990). "The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4781-4.
- Forster, R., Emrich, T., Kremmer, E. und Lipp, M. (1994). "Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells." Blood **84**(3): 830-40.
- Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G. und Lipp, M. (1996). "A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen." Cell **87**(6): 1037-47.
- Fransson, A., Ruusala, A. und Aspenstrom, P. (2003). "Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis." J Biol Chem **278**(8): 6495-502.
- Freitas, A. A. und Rocha, B. (2000). "Population biology of lymphocytes: the flight for survival." Annu Rev Immunol **18**: 83-111.
- Fukata, M., Nakagawa, M. und Kaibuchi, K. (2003). "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 590-7.
- Fukata, M., Nakagawa, M., Kuroda, S. und Kaibuchi, K. (1999). "Cell adhesion and Rho small GTPases." J Cell Sci **112** (Pt 24): 4491-500.

- Fukata, M., Nakagawa, M., Kuroda, S. und Kaibuchi, K. (2002). "Effects of Rho family GTPases on cell-cell adhesion." Methods Mol Biol **189**: 121-8.
- Fukata, Y., Amano, M. und Kaibuchi, K. (2001). "Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells." Trends Pharmacol Sci **22**(1): 32-9.
- Fukui, Y., Ishimoto, T., Utsuyama, M., Gyotoku, T., Koga, T., Nakao, K. *et al.* (1997). "Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus." Immunity **6**(4): 401-10.
- Galan, J. E. (2001). "Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 53-86.
- Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., Leto, T. L. und Zheng, Y. (2001). "Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors." J Biol Chem **276**(50): 47530-41.
- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S. *et al.* (2000). "Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42." Cell **102**(3): 325-34.
- Gatto, D., Ruedl, C., Odermatt, B. und Bachmann, M. F. (2004). "Rapid response of marginal zone B cells to viral particles." J Immunol **173**(7): 4308-16.
- Genot, E., Cleverley, S., Henning, S. und Cantrell, D. (1996). "Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells." Embo J **15**(15): 3923-33.
- Genot, E. M., Arrieumerlou, C., Ku, G., Burgering, B. M., Weiss, A. und Kramer, I. M. (2000). "The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase." Mol Cell Biol **20**(15): 5469-78.
- Ghia, P., ten Boekel, E., Rolink, A. G. und Melchers, F. (1998). "B-cell development: a comparison between mouse and man." Immunol Today **19**(10): 480-5.
- Ghosh, S. und Karin, M. (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109** **Suppl**: S81-96.
- Glogauer, M., Marchal, C. C., Zhu, F., Worku, A., Clausen, B. E., Foerster, I. *et al.* (2003). "Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions." J Immunol **170**(11): 5652-7.
- Glotzer, M. (2001). "Animal cell cytokinesis." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 351-86.
- Gomez, M., Kioussis, D. und Cantrell, D. A. (2001). "The GTPase Rac-1 controls cell fate in the thymus by diverting thymocytes from positive to negative selection." Immunity **15**(5): 703-13.

- Gomez, M., Tybulewicz, V. und Cantrell, D. A. (2000). "Control of pre-T cell proliferation and differentiation by the GTPase Rac-1." Nat Immunol **1**(4): 348-52.
- Gotta, M., Abraham, M. C. und Ahringer, J. (2001). "CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*." Curr Biol **11**(7): 482-8.
- Gowans, J. L. und Knight, E. J. (1964). "The Route of Re-Circulation of Lymphocytes in the Rat." Proc R Soc Lond B Biol Sci **159**: 257-82.
- Grill, B. und Schrader, J. W. (2002). "Activation of Rac-1, Rac-2, and Cdc42 by hemopoietic growth factors or cross-linking of the B-lymphocyte receptor for antigen." Blood **100**(9): 3183-92.
- Grossmann, M., O'Reilly, L. A., Gugasyan, R., Strasser, A., Adams, J. M. und Gerondakis, S. (2000). "The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression." Embo J **19**(23): 6351-60.
- Gu, Y., Filippi, M. D., Cancelas, J. A., Siefving, J. E., Williams, E. P., Jasti, A. C. *et al.* (2003). "Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases." Science **302**(5644): 445-9.
- Gu, Y., Wang, Z. und Yang, Z. (2004). "ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling." Curr Opin Plant Biol **7**(5): 527-36.
- Guillemot, J. C., Montcourrier, P., Vivier, E., Davoust, J. und Chavrier, P. (1997). "Selective control of membrane ruffling and actin plaque assembly by the Rho GTPases Rac1 and CDC42 in FcepsilonRI-activated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells." J Cell Sci **110** (Pt 18): 2215-25.
- Gulbins, E., Brenner, B., Schlottmann, K., Koppenhoefer, U., Linderkamp, O., Coggeshall, K. M. *et al.* (1996). "Activation of the Ras signaling pathway by the CD40 receptor." J Immunol **157**(7): 2844-50.
- Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D. und Williams, L. T. (1998). "A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 258-63.
- Haataja, L., Groffen, J. und Heisterkamp, N. (1997). "Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family." J Biol Chem **272**(33): 20384-8.
- Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Stege, P., Dvorsky, R. und Ahmadian, M. R. (2003). "Comparative functional analysis of the Rac GTPases." FEBS Lett **555**(3): 556-60.
- Hall, A. (1994). "Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton." Annu Rev Cell Biol **10**: 31-54.

- Hao, Z. und Rajewsky, K. (2001). "Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow." J Exp Med **194**(8): 1151-64.
- Hardy, R. R. (2003). "B-cell commitment: deciding on the players." Curr Opin Immunol **15**(2): 158-65.
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A. *et al.* (1994). "Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product." J Biol Chem **269**(1): 62-5.
- Hartgers, F. C., Figdor, C. G. und Adema, G. J. (2000). "Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology." Immunol Today **21**(11): 542-5.
- Harvey, J. J. (1964). "An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice." Nature **204**: 1104-5.
- Hashimoto, A., Okada, H., Jiang, A., Kurosaki, M., Greenberg, S., Clark, E. A. *et al.* (1998). "Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor." J Exp Med **188**(7): 1287-95.
- Hatada, E. N., Krappmann, D. und Scheidereit, C. (2000). "NF-kappaB and the innate immune response." Curr Opin Immunol **12**(1): 52-8.
- Hayakawa, K. und Hardy, R. R. (2000). "Development and function of B-1 cells." Curr Opin Immunol **12**(3): 346-53.
- Hernandez, J., Aung, S., Marquardt, K. und Sherman, L. A. (2002). "Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens." J Exp Med **196**(3): 323-33.
- Higgs, H. N. und Pollard, T. D. (2001). "Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins." Annu Rev Biochem **70**: 649-76.
- Hill, C. S., Wynne, J. und Treisman, R. (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." Cell **81**(7): 1159-70.
- Hogan B, C. F., Lacy E, (1986). "Manipulation of the Mouse Embryo: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Press: 332-.
- Holsinger, L. J., Graef, I. A., Swat, W., Chi, T., Bautista, D. M., Davidson, L. *et al.* (1998). "Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction." Curr Biol **8**(10): 563-72.

- Hotta, K., Tanaka, K., Mino, A., Kohno, H. und Takai, Y. (1996). "Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 69-74.
- Huang, W., Ochs, H. D., Dupont, B. und Vyas, Y. M. (2005). "The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Regulates Nuclear Translocation of NFAT2 and NF- κ B (RelA) Independently of Its Role in Filamentous Actin Polymerization and Actin Cytoskeletal Rearrangement." J Immunol **174**(5): 2602-11.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S. *et al.* (1998). "Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue." J Biol Chem **273**(16): 9656-66.
- Illenberger, D., Schwald, F., Pimmer, D., Binder, W., Maier, G., Dietrich, A. *et al.* (1998). "Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1." Embo J **17**(21): 6241-9.
- Innocenti, M., Zippel, R., Brambilla, R. und Sturani, E. (1999). "CDC25(Mm)/Ras-GRF1 regulates both Ras and Rac signaling pathways." FEBS Lett **460**(2): 357-62.
- Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T. und Narumiya, S. (1999). "An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells." Nat Med **5**(2): 221-5.
- Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Jacinto, A., Martinez-Arias, A. und Martin, P. (2001). "Mechanisms of epithelial fusion and repair." Nat Cell Biol **3**(5): E117-23.
- Jacinto, E., Werlen, G. und Karin, M. (1998). "Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes." Immunity **8**(1): 31-41.
- Johnson, D. I. (1999). "Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity." Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 54-105.
- Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B. und Pestell, R. G. (2001). "NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 73-90.
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J. *et al.* (1999). "Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway." J Biol Chem **274**(36): 25245-9.
- Karnoub, A. E., Worthylake, D. K., Rossman, K. L., Pruitt, W. M., Campbell, S. L., Sondek, J. *et al.* (2001). "Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors." Nat Struct Biol **8**(12): 1037-41.

- Kay, A. J. und Hunter, C. P. (2001). "CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*." Curr Biol **11**(7): 474-81.
- Ke, Y. und Kapp, J. A. (1996). "Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake." J Exp Med **184**(3): 1179-84.
- Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J. und Parise, L. V. (1997). "Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K." Nature **390**(6660): 632-6.
- Keep, N. H., Barnes, M., Barsukov, I., Badii, R., Lian, L. Y., Segal, A. W. *et al.* (1997). "A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm." Structure **5**(5): 623-33.
- Kelsoe, G. und Zheng, B. (1993). "Sites of B-cell activation in vivo." Curr Opin Immunol **5**(3): 418-22.
- Khare, S. D., Sarosi, I., Xia, X. Z., McCabe, S., Miner, K., Solovyev, I. *et al.* (2000). "Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3370-5.
- Khosravi-Far, R., Solski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S. und Der, C. J. (1995). "Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation." Mol Cell Biol **15**(11): 6443-53.
- Kim, C., Marchal, C. C., Penninger, J. und Dinauer, M. C. (2003). "The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions." J Immunol **171**(8): 4425-30.
- Kjoller, L. und Hall, A. (1999). "Signaling to Rho GTPases." Exp Cell Res **253**(1): 166-79.
- Kleindienst, P., Chretien, I., Winkler, T. und Brocker, T. (2000). "Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo." Blood **95**(8): 2610-6.
- Knust, E. (1997). "Drosophila morphogenesis: movements behind the edge." Curr Biol **7**(9): R558-61.
- Korner, H., Winkler, T. H., Sedgwick, J. D., Rollinghoff, M., Basten, A. und Cook, M. C. (2001). "Recirculating and marginal zone B cell populations can be established and maintained independently of primary and secondary follicles." Immunol Cell Biol **79**(1): 54-61.
- Korsmeyer, S. J. (1992). "Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes." Annu Rev Immunol **10**: 785-807.
- Kosco-Vilbois, M. H. (2003). "Are follicular dendritic cells really good for nothing?" Nat Rev Immunol **3**(9): 764-9.

- Kouskoff, V., Fehling, H. J., Lemeur, M., Benoist, C. und Mathis, D. (1993). "A vector driving the expression of foreign cDNAs in the MHC class II-positive cells of transgenic mice." J Immunol Methods **166**(2): 287-91.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B. und Rock, K. L. (1993). "Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 4942-6.
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N. und Rajewsky, K. (2004). "Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer." Cell **117**(6): 787-800.
- Kruetzmann, S., Rosado, M. M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H. H. *et al.* (2003). "Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen." J Exp Med **197**(7): 939-45.
- Kwan, S. P., Lehner, T., Hagemann, T., Lu, B., Blaese, M., Ochs, H. *et al.* (1991). "Localization of the gene for the Wiskott-Aldrich syndrome between two flanking markers, TIMP and DXS255, on Xp11.22-Xp11.3." Genomics **10**(1): 29-33.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L. *et al.* (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." Nat Med **6**(11): 1229-34.
- Lalor, P. A., Nossal, G. J., Sanderson, R. D. und McHeyzer-Williams, M. G. (1992). "Functional and molecular characterization of single, (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)-specific, IgG1+ B cells from antibody-secreting and memory B cell pathways in the C57BL/6 immune response to NP." Eur J Immunol **22**(11): 3001-11.
- Lam, K. P., Kuhn, R. und Rajewsky, K. (1997). "In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death." Cell **90**(6): 1073-83.
- Lamarche, N. und Hall, A. (1994). "GAPs for rho-related GTPases." Trends Genet **10**(12): 436-40.
- Lamaze, C., Chuang, T. H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M. und Schmid, S. L. (1996). "Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac." Nature **382**(6587): 177-9.
- Lane, P. J., Gray, D., Oldfield, S. und MacLennan, I. C. (1986). "Differences in the recruitment of virgin B cells into antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens." Eur J Immunol **16**(12): 1569-75.
- Lau, Y. L., Low, L. C., Jones, B. M. und Lawton, J. W. (1991). "Defective neutrophil and lymphocyte function in leucocyte adhesion deficiency." Clin Exp Immunol **85**(2): 202-8.

- Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G. und Butcher, E. (2002). "Rapid leukocyte integrin activation by chemokines." Immunol Rev **186**: 37-46.
- Lee, T., Winter, C., Marticke, S. S., Lee, A. und Luo, L. (2000). "Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis." Neuron **25**(2): 307-16.
- Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A. W. *et al.* (2000). "Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation." Science **288**(5474): 2219-22.
- Li, Q. und Verma, I. M. (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-34.
- Li, Z., Woo, C. J., Iglesias-Ussel, M. D., Ronai, D. und Scharff, M. D. (2004). "The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination." Genes Dev **18**(1): 1-11.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. und Pawson, T. (2000). "A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity." Nat Cell Biol **2**(8): 540-7.
- Liu, C. P., Tucker, P. W., Mushinski, J. F. und Blattner, F. R. (1980). "Mapping of heavy chain genes for mouse immunoglobulins M and D." Science **209**(4463): 1348-53.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P. *et al.* (1998). "NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio." Cell **95**(2): 269-77.
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y. und MacLennan, I. C. (1991). "Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens." Eur J Immunol **21**(12): 2951-62.
- Lores, P., Morin, L., Luna, R. und Gacon, G. (1997). "Enhanced apoptosis in the thymus of transgenic mice expressing constitutively activated forms of human Rac2GTPase." Oncogene **15**(5): 601-5.
- Luo, L. (2000). "Rho GTPases in neuronal morphogenesis." Nat Rev Neurosci **1**(3): 173-80.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T. *et al.* (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9448-53.
- Machesky, L. M. und Hall, A. (1996). "Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton." Trends Cell Biol **6**(8): 304-10.

- Machesky, L. M. und Insall, R. H. (1998). "Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex." Curr Biol **8**(25): 1347-56.
- Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P. und Browning, J. (2003). "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival." Annu Rev Immunol **21**: 231-64.
- Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P. *et al.* (1999). "Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations." J Exp Med **190**(11): 1697-710.
- Madaule, P. und Axel, R. (1985). "A novel ras-related gene family." Cell **41**(1): 31-40.
- Malliri, A., van Es, S., Huvener, S. und Collard, J. G. (2004). "The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions." J Biol Chem **279**(29): 30092-8.
- Marshall, A. J., Fleming, H. E., Wu, G. E. und Paige, C. J. (1998). "Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression." J Immunol **161**(11): 6038-45.
- Matza, D., Kerem, A. und Shachar, I. (2003). "Invariant chain, a chain of command." Trends Immunol **24**(5): 264-8.
- McHeyzer-Williams, M. G., McHeyzer-Williams, L. J., Fanelli Panus, J., Bikah, G., Pogue-Caley, R. R., Driver, D. J. *et al.* (2000). "Antigen-specific immunity. Th cell-dependent B cell responses." Immunol Res **22**(2-3): 223-36.
- McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E. *et al.* (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." Blood **95**(11): 3489-97.
- McLeod, S. J., Shum, A. J., Lee, R. L., Takei, F. und Gold, M. R. (2004). "The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes." J Biol Chem **279**(13): 12009-19.
- Meffre, E., Casellas, R. und Nussenzweig, M. C. (2000). "Antibody regulation of B cell development." Nat Immunol **1**(5): 379-85.
- Mellman, I. und Steinman, R. M. (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J. K. *et al.* (2001). "Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle." Mol Cell **8**(1): 115-27.

- Michiels, F. und Collard, J. G. (1999). "Rho-like GTPases: their role in cell adhesion and invasion." Biochem Soc Symp **65**: 125-46.
- Michiels, F., Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A. und Collard, J. G. (1995). "A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion." Nature **375**(6529): 338-40.
- Miyake, K. (2004). "Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2." Trends Microbiol **12**(4): 186-92.
- Mond, J. J., Lees, A. und Snapper, C. M. (1995). "T cell-independent antigens type 2." Annu Rev Immunol **13**: 655-92.
- Mond, J. J., Vos, Q., Lees, A. und Snapper, C. M. (1995). "T cell independent antigens." Curr Opin Immunol **7**(3): 349-54.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. und Lacal, J. C. (1998). "Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases." J Biol Chem **273**(21): 12779-85.
- Montaner, S., Sodhi, A., Servitja, J. M., Ramsdell, A. K., Barac, A., Sawai, E. T. *et al.* (2004). "The small GTPase Rac1 links the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vGPCR to cytokine secretion and paracrine neoplasia." Blood **104**(9): 2903-11.
- Montecino-Rodriguez, E., Johnson, A. und Dorshkind, K. (1996). "Thymic stromal cells can support B cell differentiation from intrathymic precursors." J Immunol **156**(3): 963-7.
- Moon, S. Y. und Zheng, Y. (2003). "Rho GTPase-activating proteins in cell regulation." Trends Cell Biol **13**(1): 13-22.
- Mordmuller, B., Krappmann, D., Esen, M., Wegener, E. und Scheidereit, C. (2003). "Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism." EMBO Rep **4**(1): 82-7.
- Mori, S., Inaba, M., Sugihara, A., Taketani, S., Doi, H., Fukuba, Y. *et al.* (1997). "Presence of B cell progenitors in the thymus." J Immunol **158**(9): 4193-9.
- Mostov, K. E., Friedlander, M. und Blobel, G. (1984). "The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains." Nature **308**(5954): 37-43.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Murphy, A. M. und Montell, D. J. (1996). "Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in Drosophila oogenesis." J Cell Biol **133**(3): 617-30.

- Narumiya, S. (1996). "The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction." J Biochem (Tokyo) **120**(2): 215-28.
- Nassar, N., Hoffman, G. R., Manor, D., Clardy, J. C. und Cerione, R. A. (1998). "Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP." Nat Struct Biol **5**(12): 1047-52.
- Neuberger, M. S., Ehrenstein, M. R., Rada, C., Sale, J., Batista, F. D., Williams, G. *et al.* (2000). "Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1395): 357-60.
- Niirio, H. und Clark, E. A. (2002). "Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals." Nat Rev Immunol **2**(12): 945-56.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K. und Messaoudi, I. (2004). "The many important facets of T-cell repertoire diversity." Nat Rev Immunol **4**(2): 123-32.
- Nimmual, A. S., Taylor, L. J. und Bar-Sagi, D. (2003). "Redox-dependent downregulation of Rho by Rac." Nat Cell Biol **5**(3): 236-41.
- Nobes, C. und Marsh, M. (2000). "Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake?" Curr Biol **10**(20): R739-41.
- Nobes, C. D. und Hall, A. (1995, a). "Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility." Biochem Soc Trans **23**(3): 456-9.
- Nobes, C. D. und Hall, A. (1995, b). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**(1): 53-62.
- Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M. und Burridge, K. (2001). "Cadherin engagement regulates Rho family GTPases." J Biol Chem **276**(36): 33305-8.
- Nosaka, Y., Arai, A., Kanda, E., Akasaki, T., Sumimoto, H., Miyasaka, N. *et al.* (2001). "Rac is activated by tumor necrosis factor alpha and is involved in activation of Erk." Biochem Biophys Res Commun **285**(3): 675-9.
- Nussenzweig, M. C., Shaw, A. C., Sinn, E., Danner, D. B., Holmes, K. L., Morse, H. C., 3rd *et al.* (1987). "Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu." Science **236**(4803): 816-9.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. und Busslinger, M. (1999). "Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5." Nature **401**(6753): 556-62.
- O'Brien, L. E., Jou, T. S., Pollack, A. L., Zhang, Q., Hansen, S. H., Yurchenco, P. *et al.* (2001). "Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly." Nat Cell Biol **3**(9): 831-8.

- O'Connor, K. L., Nguyen, B. K. und Mercurio, A. M. (2000). "RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin and cAMP metabolism." J Cell Biol **148**(2): 253-8.
- O'Sullivan, A. J., Brown, A. M., Freeman, H. N. und Gomperts, B. D. (1996). "Purification and identification of FOAD-II, a cytosolic protein that regulates secretion in streptolysin-O permeabilized mast cells, as a rac/rhoGDI complex." Mol Biol Cell **7**(3): 397-408.
- Ochsenbein, A. F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H. *et al.* (1999). "Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies." Science **286**(5447): 2156-9.
- Ochsenbein, A. F. und Zinkernagel, R. M. (2000). "Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity." Immunol Today **21**(12): 624-30.
- Ohno, S. (2001). "Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 641-8.
- Oliver, A. M., Martin, F. und Kearney, J. F. (1999). "IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells." J Immunol **162**(12): 7198-207.
- Olofsson, B. (1999). "Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling." Cell Signal **11**(8): 545-54.
- Olson, M. F., Ashworth, A. und Hall, A. (1995). "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." Science **269**(5228): 1270-2.
- Olson, M. F., Paterson, H. F. und Marshall, C. J. (1998). "Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21^{Waf1/Cip1}." Nature **394**(6690): 295-9.
- Orkin, S. H. (1995). "Hematopoiesis: how does it happen?" Curr Opin Cell Biol **7**(6): 870-7.
- Orkin, S. H. und Zon, L. I. (2002). "Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity." Nat Immunol **3**(4): 323-8.
- Osmond, D. G. (1993). "The turnover of B-cell populations." Immunol Today **14**(1): 34-7.
- Ozdinler, P. H. und Erzurumlu, R. S. (2001). "Regulation of neurotrophin-induced axonal responses via Rho GTPases." J Comp Neurol **438**(4): 377-87.
- Pape, K. A., Kearney, E. R., Khoruts, A., Mondino, A., Merica, R., Chen, Z. M. *et al.* (1997). "Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo." Immunol Rev **156**: 67-78.

- Park, J. B. (2003). "Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages." Exp Mol Med **35**(5): 325-35.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. und Lacal, J. C. (1997). "Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins." Genes Dev **11**(4): 463-75.
- Philips, A., Roux, P., Coulon, V., Bellanger, J. M., Vie, A., Vignais, M. L. *et al.* (2000). "Differential effect of Rac and Cdc42 on p38 kinase activity and cell cycle progression of nonadherent primary mouse fibroblasts." J Biol Chem **275**(8): 5911-7.
- Pillai, S., Cariappa, A. und Moran, S. T. (2004). "Marginal Zone B Cells." Annu Rev Immunol.
- Pillai, S., Cariappa, A. und Moran, S. T. (2004). "Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development." Immunol Rev **197**: 206-18.
- Pinxteren, J. A., O'Sullivan, A. J., Larbi, K. Y., Tatham, P. E. und Gomperts, B. D. (2000). "Thirty years of stimulus-secretion coupling: from Ca(2+) toGTP in the regulation of exocytosis." Biochimie **82**(4): 385-93.
- Pleiman, C. M., D'Ambrosio, D. und Cambier, J. C. (1994). "The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction." Immunol Today **15**(9): 393-9.
- Prieto-Sanchez, R. M. und Bustelo, X. R. (2003). "Structural basis for the signaling specificity of RhoG and Rac1 GTPases." J Biol Chem **278**(39): 37916-25.
- Pruyne, D. und Bretscher, A. (2000). "Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states." J Cell Sci **113** (Pt 3): 365-75.
- Puceat, M., Travo, P., Quinn, M. T. und Fort, P. (2003). "A dual role of the GTPase Rac in cardiac differentiation of stem cells." Mol Biol Cell **14**(7): 2781-92.
- Puls, A., Eliopoulos, A. G., Nobes, C. D., Bridges, T., Young, L. S. und Hall, A. (1999). "Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1." J Cell Sci **112** (Pt 17): 2983-92.
- Qiu, R. G., Abo, A. und Steven Martin, G. (2000). "A human homolog of the C. elegans polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation." Curr Biol **10**(12): 697-707.
- Raich, W. B., Agbunag, C. und Hardin, J. (1999). "Rapid epithelial-sheet sealing in the Caenorhabditis elegans embryo requires cadherin-dependent filopodial priming." Curr Biol **9**(20): 1139-46.

- Rameh, L. E., Arvidsson, A., Carraway, K. L., 3rd, Couvillon, A. D., Rathbun, G., Crompton, A. *et al.* (1997). "A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains." J Biol Chem **272**(35): 22059-66.
- Rathmell, J. C. (2004). "B-cell homeostasis: digital survival or analog growth?" Immunol Rev **197**: 116-28.
- Ray, R. J., Paige, C. J., Furlonger, C., Lyman, S. D. und Rottapel, R. (1996). "Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7." Eur J Immunol **26**(7): 1504-10.
- Ray, R. J., Stoddart, A., Pennycook, J. L., Huner, H. O., Furlonger, C., Wu, G. E. *et al.* (1998). "Stromal cell-independent maturation of IL-7-responsive pro-B cells." J Immunol **160**(12): 5886-97.
- Redmond, L. und Ghosh, A. (2001). "The role of Notch and Rho GTPase signaling in the control of dendritic development." Curr Opin Neurobiol **11**(1): 111-7.
- Reeves, J. P. R., P. A. (2001). Care and Handling of Laboratory Animals. Current Protocols in Immunology. Coligan, J. E. K., A. M.; Margulies, D. H.; Shevach, E. M., Strober, W. Edison, John Wiley & Sons, Inc. **1**.
- Reichlin, A., Hu, Y., Meffre, E., Nagaoka, H., Gong, S., Kraus, M. *et al.* (2001). "B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta." J Exp Med **193**(1): 13-23.
- Reyes-Reyes, M., Mora, N., Zentella, A. und Rosales, C. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF-kappaB and MAPK activation through separate signaling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1579-89.
- Ridley, A. (2000). "Molecular switches in metastasis." Nature **406**(6795): 466-7.
- Ridley, A. J. (1994). "Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho." J Cell Sci Suppl **18**: 127-31.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho family proteins: coordinating cell responses." Trends Cell Biol **11**(12): 471-7.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho GTPases and cell migration." J Cell Sci **114**(Pt 15): 2713-22.
- Ridley, A. J. (2004). "Rho proteins and cancer." Breast Cancer Res Treat **84**(1): 13-9.
- Ridley, A. J. und Hall, A. (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-99.

- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. und Hall, A. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-10.
- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E. *et al.* (1997, a). "Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP." Nature **388**(6643): 693-7.
- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Smerdon, S. J. und Gamblin, S. J. (1997, b). "Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue." Nature **389**(6652): 758-62.
- Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B. *et al.* (1999). "Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense." Immunity **10**(2): 183-96.
- Rogers, K. K., Jou, T. S., Guo, W. und Lipschutz, J. H. (2003). "The Rho family of small GTPases is involved in epithelial cystogenesis and tubulogenesis." Kidney Int **63**(5): 1632-44.
- Rolink, A., Radaszkiewicz, T. und Melchers, F. (1987). "The autoantigen-binding B cell repertoires of normal and of chronically graft-versus-host-diseased mice." J Exp Med **6**(165): 1675-87.
- Rolink, A. G., Andersson, J. und Melchers, F. (1998). "Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity." Eur J Immunol **28**(11): 3738-48.
- Rolink, A. G., Andersson, J. und Melchers, F. (2004). "Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development." Immunol Rev **197**: 41-50.
- Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F. und Busslinger, M. (1999). "Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors." Nature **401**(6753): 603-6.
- Romanow, W. J., Langerak, A. W., Goebel, P., Wolvers-Tettero, I. L., van Dongen, J. J., Feeney, A. J. *et al.* (2000). "E2A and EBF act in synergy with the V(D)J recombinase to generate a diverse immunoglobulin repertoire in nonlymphoid cells." Mol Cell **5**(2): 343-53.
- Rooney, J. W., Dubois, P. M. und Sibley, C. H. (1991). "Cross-linking of surface IgM activates NF-kappa B in B lymphocyte." Eur J Immunol **21**(12): 2993-8.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. *et al.* (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.

Sakurada, S., Okamoto, H., Takuwa, N., Sugimoto, N. und Takuwa, Y. (2001). "Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol **281**(2): C571-8.

Sale, J. E., Bemark, M., Williams, G. T., Jolly, C. J., Ehrenstein, M. R., Rada, C. *et al.* (2001). "In vivo and in vitro studies of immunoglobulin gene somatic hypermutation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1405): 21-8.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. und Mackay, C. R. (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses." Immunol Today **19**(12): 568-74.

Samardzic, T., Marinkovic, D., Danzer, C. P., Gerlach, J., Nitschke, L. und Wirth, T. (2002). "Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice." Eur J Immunol **32**(2): 561-7.

Sambrook, J. F., E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A. L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R. *et al.* (1993). "Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta." J Exp Med **178**(3): 1049-55.

Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A. und Collard, J. G. (1999). "Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior." J Cell Biol **147**(5): 1009-22.

Sanderson, R. D., Lalor, P. und Bernfield, M. (1989). "B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation." Cell Regul **1**(1): 27-35.

Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M. *et al.* (2001). "An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway." Science **293**(5537): 2111-4.

Schmidt, A. und Hall, M. N. (1998). "Signaling to the actin cytoskeleton." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 305-38.

Schmidt, C. S. und Mescher, M. F. (1999). "Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo." J Immunol **163**(5): 2561-7.

Schultz, M., Clarke, S. H., Arnold, L. W., Sartor, R. B. und Tonkonogy, S. L. (2001). "Disrupted B-lymphocyte development and survival in interleukin-2-deficient mice." Immunology **104**(2): 127-34.

Seasholtz, T. M. und Brown, J. H. (2004). "RHO SIGNALING in Vascular Diseases." Mol Interv **4**(6): 348-57.

- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F. und Ohashi, P. S. (1999). "Selection of the T cell repertoire." Annu Rev Immunol **17**: 829-74.
- Sebzda, E., Wallace, V. A., Mayer, J., Yeung, R. S., Mak, T. W. und Ohashi, P. S. (1994). "Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide." Science **263**(5153): 1615-8.
- Shachar, I. und Flavell, R. A. (1996). "Requirement for invariant chain in B cell maturation and function." Science **274**(5284): 106-8.
- Shaw, L. M., Rabinovitz, I., Wang, H. H., Toker, A. und Mercurio, A. M. (1997). "Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion." Cell **91**(7): 949-60.
- Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A. und Der, C. J. (2000). "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'." Trends Cell Biol **10**(4): 147-54.
- Shih, T. Y., Papageorge, A. G., Stokes, P. E., Weeks, M. O. und Scolnick, E. M. (1980). "Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus." Nature **287**(5784): 686-91.
- Shih, T. Y., Weeks, M. O., Young, H. A. und Scholnick, E. M. (1979). "Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus." Virology **96**(1): 64-79.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M. *et al.* (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell **68**(5): 855-67.
- Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M. E., Ng, L. G., MacKay, F., Rao, S. P. *et al.* (2004). "B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation." J Immunol **173**(4): 2331-41.
- Shurin, G. V., Tourkova, I. L., Chatta, G. S., Schmidt, G., Wei, S., Djeu, J. Y. *et al.* (2005). "Small rho GTPases regulate antigen presentation in dendritic cells." J Immunol **174**(6): 3394-400.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E. und Rottner, K. (2002). "The lamellipodium: where motility begins." Trends Cell Biol **12**(3): 112-20.
- Spanopoulou, E., Roman, C. A., Corcoran, L. M., Schlissel, M. S., Silver, D. P., Nemazee, D. *et al.* (1994). "Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice." Genes Dev **8**(9): 1030-42.
- Sprent, J., Lo, D., Gao, E. K. und Ron, Y. (1988). "T cell selection in the thymus." Immunol Rev **101**: 173-90.

Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol **57**: 827-72.

Steeber, D. A., Green, N. E., Sato, S. und Tedder, T. F. (1996). "Humoral immune responses in L-selectin-deficient mice." J Immunol **157**(11): 4899-907.

Steinman, R. M. und Cohn, Z. A. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.

Stovall, S. H., Yi, A. K., Meals, E. A., Talati, A. J., Godambe, S. A. und English, B. K. (2004). "Role of vav1- and src-related tyrosine kinases in macrophage activation by CpG DNA." J Biol Chem **279**(14): 13809-16.

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H. *et al.* (1998). "Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation." Oncogene **17**(26): 3427-33.

Sulciner, D. J., Irani, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Goldschmidt-Clermont, P. und Finkel, T. (1996). "rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation." Mol Cell Biol **16**(12): 7115-21.

Swetman, C. A., Leverrier, Y., Garg, R., Gan, C. H., Ridley, A. J., Katz, D. R. *et al.* (2002). "Extension, retraction and contraction in the formation of a dendritic cell dendrite: distinct roles for Rho GTPases." Eur J Immunol **32**(7): 2074-83.

Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F. *et al.* (1996). "Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization." Cell **84**(5): 723-34.

Takai, Y., Sasaki, T. und Matozaki, T. (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.

Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

Takeuchi, O., Hemmi, H. und Akira, S. (2004). "Interferon response induced by Toll-like receptor signaling." J Endotoxin Res **10**(4): 252-6.

Tangemann, K., Gunn, M. D., Giblin, P. und Rosen, S. D. (1998). "A high endothelial cell-derived chemokine induces rapid, efficient, and subset-selective arrest of rolling T lymphocytes on a reconstituted endothelial substrate." J Immunol **161**(11): 6330-7.

Taniguchi, T. und Takaoka, A. (2002). "The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors." Curr Opin Immunol **14**(1): 111-6.

- Tapon, N. und Hall, A. (1997). "Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **9**(1): 86-92.
- Teramoto, H., Malek, R. L., Behbahani, B., Castellone, M. D., Lee, N. H. und Gutkind, J. S. (2003). "Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes." Oncogene **22**(17): 2689-97.
- Thery, C. und Amigorena, S. (2001). "The cell biology of antigen presentation in dendritic cells." Curr Opin Immunol **13**(1): 45-51.
- Thomas, M. L. (1989). "The leukocyte common antigen family." Annu Rev Immunol **7**: 339-69.
- Tohma, S., Hirohata, S. und Lipsky, P. E. (1991). "The role of CD11a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation." J Immunol **146**(2): 492-9.
- Tolias, K. F., Cantley, L. C. und Carpenter, C. L. (1995). "Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases." J Biol Chem **270**(30): 17656-9.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-81.
- Topp, J. D., Gray, N. W., Gerard, R. D. und Horazdovsky, B. F. (2004). "Alsin is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor." J Biol Chem **279**(23): 24612-23.
- Tsubata, T. und Wienands, J. (2001). "B cell signaling. Introduction." Int Rev Immunol **20**(6): 675-8.
- Turner, M. (2002). "B-cell development and antigen receptor signalling." Biochem Soc Trans **30**(4): 812-5.
- Turner, M. und Billadeau, D. D. (2002). "VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors." Nat Rev Immunol **2**(7): 476-86.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T. *et al.* (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." Nature **389**(6654): 990-4.
- Van Aelst, L. und D'Souza-Schorey, C. (1997). "Rho GTPases and signaling networks." Genes Dev **11**(18): 2295-322.
- van Kooten, C. und Banchereau, J. (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.
- Vetter, I. R. und Wittinghofer, A. (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." Science **294**(5545): 1299-304.

- Vigorito, E., Billadeu, D. D., Savoy, D., McAdam, S., Doody, G., Fort, P. *et al.* (2003). "RhoG regulates gene expression and the actin cytoskeleton in lymphocytes." *Oncogene* **22**(3): 330-42.
- von Boehmer, H. und Fehling, H. J. (1997). "Structure and function of the pre-T cell receptor." *Annu Rev Immunol* **15**: 433-52.
- Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G. *et al.* (1996). "Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue." *Nature* **382**(6589): 366-70.
- Walmsley, M. J., Ooi, S. K., Reynolds, L. F., Smith, S. H., Ruf, S., Mathiot, A. *et al.* (2003). "Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling." *Science* **302**(5644): 459-62.
- Wang, L. D. und Clark, M. R. (2003). "B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development." *Immunology* **110**(4): 411-20.
- Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N. und Carsetti, R. (2002). "B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen." *J Exp Med* **195**(6): 771-80.
- Warnock, R. A., Askari, S., Butcher, E. C. und von Andrian, U. H. (1998). "Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes." *J Exp Med* **187**(2): 205-16.
- Wasiak, S., Quinn, C. C., Ritter, B., de Heuvel, E., Baranes, D., Plomann, M. *et al.* (2001). "The Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor mammalian Son-of-sevenless interacts with PACSIN 1/syndapin I, a regulator of endocytosis and the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* **276**(28): 26622-8.
- Weed, S. A., Du, Y. und Parsons, J. T. (1998). "Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1." *J Cell Sci* **111** (Pt 16): 2433-43.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R. K. *et al.* (1997). "Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications." *Nat Struct Biol* **4**(9): 699-703.
- Wells, C. M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. und Ridley, A. J. (2004). "Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration." *J Cell Sci* **117**(Pt 7): 1259-68.
- Welsh, C. F., Roovers, K., Villanueva, J., Liu, Y., Schwartz, M. A. und Assoian, R. K. (2001). "Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho." *Nat Cell Biol* **3**(11): 950-7.
- Wennerberg, K. und Der, C. J. (2004). "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)." *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1301-12.

- Wery-Zennaro, S., Zugaza, J. L., Letourneur, M., Bertoglio, J. und Pierre, J. (2000). "IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38 MAPK-dependent pathways in keratinocytes." Oncogene **19**(12): 1596-604.
- West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J. und Watts, C. (2000). "Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation." Curr Biol **10**(14): 839-48.
- Westerberg, L., Greicius, G., Snapper, S. B., Aspenstrom, P. und Severinson, E. (2001). "Cdc42, Rac1, and the Wiskott-Aldrich syndrome protein are involved in the cytoskeletal regulation of B lymphocytes." Blood **98**(4): 1086-94.
- Westerberg, L., Larsson, M., Hardy, S. J., Fernandez, C., Thrasher, A. J. und Severinson, E. (2004). "Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B cell adhesion, migration, homing and to a delayed humoral immune response." Blood.
- Wherlock, M. und Mellor, H. (2002). "The Rho GTPase family: a Rac to Rho story." J Cell Sci **115**(Pt 2): 239-40.
- Wieland, T. (1987). "[50 years of phalloidine: its discovery, characterization and current and future applications in cell research]." Naturwissenschaften **74**(8): 367-73.
- Williams, O., Tanaka, Y., Tarazona, R. und Kioussis, D. (1997). "The agonist-antagonist balance in positive selection." Immunol Today **18**(3): 121-6.
- Wiskott, A. (1937). "Familiärer, angeborener Morbus Welhofii." Monatsschr Kinderheilkd **68**: 212-6.
- Woo, C. H. und Kim, J. H. (2002). "Rac GTPase activity is essential for lipopolysaccharide signaling to extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase activation in rat-2 fibroblasts." Mol Cells **13**(3): 470-5.
- Woodland, R. T., Schmidt, M. R., Korsmeyer, S. J. und Gravel, K. A. (1996). "Regulation of B cell survival in xid mice by the proto-oncogene bcl-2." J Immunol **156**(6): 2143-54.
- Wortis, H. H. und Berland, R. (2001). "Cutting edge commentary: origins of B-1 cells." J Immunol **166**(4): 2163-6.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R. und Shortman, K. (1991). "Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus." J Exp Med **174**(6): 1617-27.
- Xu, B., Wagner, N., Pham, L. N., Magno, V., Shan, Z., Butcher, E. C. *et al.* (2003). "Lymphocyte homing to bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is mediated by L-selectin/PNAd, alpha4beta1 integrin/VCAM-1, and LFA-1 adhesion pathways." J Exp Med **197**(10): 1255-67.

- Xu, H., Li, H., Suri-Payer, E., Hardy, R. R. und Weigert, M. (1998). "Regulation of anti-DNA B cells in recombination-activating gene-deficient mice." J Exp Med **188**(7): 1247-54.
- Yamauchi, A., Kim, C., Li, S., Marchal, C. C., Towe, J., Atkinson, S. J. *et al.* (2004). "Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles." J Immunol **173**(10): 5971-9.
- Yang, W. und Cerione, R. A. (1997). "Cloning and characterization of a novel Cdc42-associated tyrosine kinase, ACK-2, from bovine brain." J Biol Chem **272**(40): 24819-24.
- Yankee, T. M. und Clark, E. A. (2000). "Signaling through the B cell antigen receptor in developing B cells." Rev Immunogenet **2**(2): 185-203.
- Yoshioka, K., Matsumura, F., Akedo, H. und Itoh, K. (1998). "Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells." J Biol Chem **273**(9): 5146-54.
- Yu, H., Leitenberg, D., Li, B. und Flavell, R. A. (2001). "Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation." J Exp Med **194**(7): 915-26.
- Zhang, J., Shehabeldin, A., da Cruz, L. A., Butler, J., Somani, A. K., McGavin, M. *et al.* (1999). "Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes." J Exp Med **190**(9): 1329-42.
- Zheng, Y., Zangrilli, D., Cerione, R. A. und Eva, A. (1996). "The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic dbl through specific intracellular targeting." J Biol Chem **271**(32): 19017-20.
- Zinkernagel, R. M. und Doherty, P. C. (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Adam, Jan Nopora
Geburtsdatum:	21.06.1972
Geburtsort:	Beuthen O/S
Nationalität:	deutsch
Adresse:	Justinus-Kerner-Str. 22, 80686 München

Schulbildung

September 1978 – Mai 1982	Grundschule Beuthen-Karf
September 1982 – Dezember 1987	Sportgymnasium Beuthen
4. Dezember 1987	Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland
September 1988 – Juli 1990	Realschule Ettenheim
Juli 1990	Realschulabschluß
September 1990 – Mai 1993	Wirtschaftsgymnasium Lörrach
Mai 1993	Abitur

Studium

Oktober 1995 – Mai 2000	Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau Diplomstudiengang Biologie
Oktober 1999 – Mai 2000	Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Klinik für Tumorbilologie der Universität Freiburg im Breisgau Abt. Prof. T. Brocker, Diplomarbeit
seit August 2000	Ludwig-Maximilians-Universität München Institut für Immunologie Abt. Prof. T. Brocker, Dissertation

Veröffentlichungen

Nopora, A. und Brocker, T. (2002). "Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo." J Immunol **169**(6): 3006-14.

Nopora, A. und Brocker, T. (2005). "The role of Rac1 in B cell development and function."; *Manuskript in Vorbereitung*



10 DANKSAGUNG

Frau Prof. E. Weiß danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit offiziell zu betreuen und mir damit die Prüfung an der biologischen Fakultät der Universität München zu ermöglichen.

Herrn Prof. T. Brocker möchte ich für sein Vertrauen danken, mich in seine Arbeitsgruppe aufzunehmen und mir ein interessantes Thema zur Dissertation zu überlassen. Besonders dankbar bin ich für seine stets sehr gute wissenschaftliche Betreuung. Die gleichzeitig gewährte Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen Kongressen erlaubte mir, sehr wertvolle Erfahrungen und Erkenntnisse nicht nur wissenschaftlicher Art zu sammeln.

Allen früheren und aktuellen Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit, die immerwährende Bereitschaft zur Diskussion in allen wissenschaftlichen Bereichen und vor allem für das sehr freundschaftliche Arbeitsklima, das gleichfalls für den Erfolg dieser Arbeit wichtig war. M. Cannarile und ganz besonders S. Schroeder danke ich für das akribische Korrekturlesen und die korrekte Verteilung der Kommas in dieser Arbeit.

Frau A. Bol und Herrn W. Mertel danke ich für die ausnahmslos ausgezeichnete Pflege der Versuchstiere. Ihre Flexibilität und ihr Interesse ermöglichten es mir, Experimente auch kurzfristig zu planen und reibungslos durchzuführen.

U. Wolf, G. Mair, C. Rothenaigner sowie A. Kozar danke ich für die zuverlässige Hilfe in allen administrativen und organisatorischen Angelegenheiten.

Ein Dank auch an meinen Freundeskreis, der mich die Zeit in München in besonders schöner Erinnerung behalten läßt.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern für Ihre außerordentliche Unterstützung, Anteilnahme und Geduld. Sie schafften die Grundlagen für meine Ausbildung. Dank der Liebe und Kraft, die ich von Ihnen erhielt, war es mir möglich auch schwierige Phasen durchzustehen und diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

