

**Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

**Die Wirkung des Zytokins BAFF auf die Expression von pro- und  
anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern  
in B-Zellen des Huhnes**

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

von

**Jenny Dieckmann**

aus Gütersloh

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspers  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Sinowatz

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

**In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.**

Sir Isaac Newton

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1      | DIE ENTWICKLUNG VON BURSA FABRICII UND B-ZELLEN BEIM HUHN .....           | 3         |
| 2.1.1    | Präbursale B-Zell-Entwicklung.....  | 4         |
| 2.1.2    | B-Zell Reifung in der Bursa .....   | 6         |
| 2.1.3    | Involution der Bursa .....  | 9         |
| 2.1.4    | Postbursale B-Zell-Entwicklung.....                                       | 9         |
| 2.2      | DER B-ZELL AKTIVIERENDE FAKTOR DER TUMORNEKROSEFAKTOR FAMILIE (BAFF)..... | 13        |
| 2.2.1    | Die Tumornekrosefaktor-/Tumornekrosefaktor-Rezeptor Familie.....          | 13        |
| 2.2.2    | Die Struktur von BAFF .....   | 16        |
| 2.2.3    | Die BAFF-Rezeptoren.....  | 16        |
| 2.2.4    | Expression von BAFF .....   | 19        |
| 2.2.5    | Physiologische BAFF-Wirkung.....  | 20        |
| 2.2.6    | BAFF-abhängige Signaltransduktion.....                                    | 22        |
| 2.3      | DIE BCL-2 FAMILIE .....   | 24        |
| 2.3.1    | Die Struktur der bcl-2 Familienmitglieder.....                            | 25        |
| 2.3.2    | Anti-apoptotische bcl-2 Familienmitglieder.....                           | 26        |
| 2.3.3    | Pro-apoptotische bcl-2 Familienmitglieder .....                           | 28        |
| 2.3.4    | “BH3-only” bcl-2 Familienmitglieder.....                                  | 30        |
| <b>3</b> | <b>ZIELSETZUNG .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>33</b> |
| 4.1      | TIERE UND HALTUNG.....  | 33        |
| 4.2      | GEWINNUNG VON PRIMÄREN HÜHNERLYMPHOZYTEN UND EMBRYONALEN ORGANEN .....    | 33        |
| 4.2.1    | Material.....   | 33        |
| 4.2.2    | Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten (PBL).....                       | 34        |
| 4.2.3    | Gewinnung von Lymphozyten aus Organen.....                                | 35        |
| 4.2.4    | Gewinnung embryonaler Organe.....   | 35        |
| 4.3      | KULTIVIERUNG VON ZELLEN .....   | 36        |
| 4.3.1    | Medien und Zusätze.....   | 36        |
| 4.3.2    | Kultivierung von Zellen.....  | 37        |
| 4.4      | RNA-PRÄPARATION .....   | 39        |
| 4.4.1    | Material.....   | 39        |
| 4.4.2    | Durchführung.....   | 40        |
| 4.4.3    | Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer™.....         | 40        |
| 4.4.4    | Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration .....                     | 40        |
| 4.5      | CDNA SYNTHESE .....   | 41        |
| 4.6      | ERSTELLUNG VON PRIMERN.....   | 41        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.6.1    | Primer für die konventionelle Polymerase Kettenreaktion .....   | 41        |
| 4.6.2    | Primer für die quantitative Polymerase Kettenreaktion.....  | 41        |
| 4.7      | KONVENTIONELLE POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR) .....  | 42        |
| 4.7.1    | Material.....   | 42        |
| 4.7.2    | Durchführung.....   | 43        |
| 4.8      | AGAROSE-GELELEKTROPHORESE .....   | 43        |
| 4.8.1    | Material.....   | 44        |
| 4.8.2    | Durchführung.....   | 44        |
| 4.9      | QUANTITATIVE POLYMERASE KETTENREAKTION (QPCR).....  | 45        |
| 4.9.1    | Material.....   | 46        |
| 4.9.2    | Durchführung.....   | 47        |
| 4.9.3    | Auswertung.....   | 47        |
| 4.10     | RCAS VEKTOR-SYSTEM.....   | 48        |
| 4.10.1   | Klonierung von <i>chBAFF/huBCMA</i> in das RCAS Plasmid.....  | 49        |
| 4.10.2   | Transfektion von Hühnerembryofibroblasten.....  | 50        |
| 4.10.3   | Nachweis der <i>chBAFF</i> und <i>huBCMA</i> Sekretion in CEF-Überständen.....  | 52        |
| 4.10.4   | Injektion der transfizierten CEFs in Hühnerembryonen .....  | 52        |
| 4.10.5   | Erfolgskontrolle der Transfektion der Hühnerembryonen .....   | 52        |
| 4.11     | ELISA .....   | 52        |
| 4.11.1   | Material.....   | 52        |
| 4.11.2   | <i>chBAFF-ELISA</i> .....   | 55        |
| 4.11.3   | <i>huBCMA-ELISA</i> .....   | 56        |
| 4.12     | DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....  | 56        |
| 4.12.1   | Material.....   | 56        |
| 4.12.2   | Lebend-Zellzahlbestimmung mittels <i>beads</i> .....  | 57        |
| 4.12.3   | Auswertung.....   | 58        |
| <b>5</b> | <b>ERGEBNISSE .....</b>   | <b>59</b> |
| 5.1      | ETABLIERUNG VON PCR-PRIMERN FÜR BCL-2 FAMILIENMITGLIEDER DES HUHNS.....   | 59        |
| 5.2      | TRANSKRIPTIONSÄNDERUNGEN VON BCL-2 FAMILIENMITGLIEDERN UNTER FLAGChBAFF<br>STIMULATION .....                              | 60        |
| 5.3      | TRANSKRIPTIONSÄNDERUNGEN VON BCL-2 FAMILIENMITGLIEDERN WÄHREND DER PHYSIOLOGISCHEN<br>BURSA-ENTWICKLUNG .....             | 61        |
| 5.4      | ETABLIERUNG EINER QUANTITATIVEN NACHWEISMETHODE FÜR BCL-2 FAMILIENMITGLIEDER DES<br>HUHNS.....                            | 62        |
| 5.5      | QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES TRANSKRIPTIONSNIVEAUS AUSGESUCHTER GENE WÄHREND DER<br>PHYSIOLOGISCHEN BURSA-ENTWICKLUNG..... | 64        |
| 5.6      | TRANSKRIPTIONSNIVEAU DER BCL-2 FAMILIENMITGLIEDER IN STIMULIERTEN MILZLYMPHOZYTEN.....                                    | 68        |
| 5.6.1    | Stimulation mit <i>chBAFF</i> .....   | 69        |
| 5.6.2    | Stimulation mit <i>chCD40-Ligand</i> .....  | 70        |
| 5.6.3    | Vergleich der Wirkung von <i>chBAFF</i> und <i>chCD40-Ligand</i> .....  | 71        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 5.7      | AUSWIRKUNGEN DES ALTERS AUF DAS ÜBERLEBEN VON B-ZELLEN AUS DER MILZ IN KULTUR.....   | 73         |
| 5.7.1    | <i>Vergleich der Transkription ausgesuchter Gene in stimulierten Milzlymphozyten juveniler und adulter Tiere.....</i>                                      | 74         |
| 5.8      | WIRKUNG EINER RCAS-INDUZIERTEN ÜBEREXPRESSION UND EINER FUNKTIONELLEN INHIBITION VON BAFF AUF DIE EXPRESSION AUS-GEWÄHLTER GENE IN DER BURSA FABRICII..... | 77         |
| 5.8.1    | <i>Organspezifische Verteilung der RCAS-Konstrukte.....</i>  | 77         |
| 5.8.2    | <i>Wirkung der chBAFF-Überexpression im 18 Tage alten Embryo (ET18).....</i>   | 80         |
| 5.8.3    | <i>Auswirkung einer Hemmung von chBAFF auf Embryonen an Tag 18 (ET18).....</i>   | 83         |
| <b>6</b> | <b>DISKUSSION .....</b>  | <b>88</b>  |
| 6.1      | ETABLIERUNG EINER AUSWAHL AN PCR-PRIMERN.....  | 89         |
| 6.2      | NACHWEIS DER TRANSKRIPTION DER BCL-2 FAMILIENMITGLIEDER BEIM HUHN <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> ...   | 89         |
| 6.3      | ETABLIERUNG EINER AUSWAHL AN PRIMERN FÜR DIE QUANTITATIVE PCR.....   | 91         |
| 6.4      | TRANSKRIPTIONSNIVEAUS AUSGESUCHTER GENE WÄHREND DER PHYSIOLOGISCHEN BURSA-ENTWICKLUNG.....   | 92         |
| 6.5      | AUSWIRKUNGEN EINER STIMULATION AUF DIE ZAHL LEBENDER B-ZELLEN AUS DER MILZ <i>IN VITRO</i> ....  | 94         |
| 6.5.1    | <i>Stimulation mit chBAFF in vitro – Veränderungen auf Transkriptomenebene.....</i>  | 95         |
| 6.5.2    | <i>Stimulation mit chCD40-Ligand in vitro – Veränderungen auf Transkriptomenebene .....</i>  | 96         |
| 6.5.3    | <i>Vergleich der Wirkung von chBAFF und chCD40-Ligand in vitro – Veränderungen auf Transkriptomenebene.....</i>  | 97         |
| 6.6      | ALTERSBEDINGTE UNTERSCHIEDE IM ÜBERLEBEN VON B-ZELLEN <i>IN VITRO</i> .....  | 98         |
| 6.6.1    | <i>Stimulationsbedingte Vorgänge in adulten und juvenilen Milz-lymphozyten - Unterschiede auf Transkriptomenebene.....</i>                                 | 99         |
| 6.7      | ANWENDUNG DES RCAS VEKTORS ZUR ÜBEREXPRESSION UND FUNKTIONELLEN INHIBITION VON CHBAFF.....   | 100        |
| 6.7.1    | <i>chBAFF-Überexpression im 18 Tage alten Embryo – Wirkung auf Transkriptomenebene.....</i>  | 101        |
| 6.7.2    | <i>Funktionelle Inhibition von chBAFF im 18 Tage alten Embryo – Wirkung auf Transkriptomenebene.....</i>   | 102        |
| <b>7</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>  | <b>105</b> |
| <b>8</b> | <b>SUMMARY.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>9</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>109</b> |
|          | <b>ANHANG.....</b>   | <b>126</b> |
|          | <b>LEBENS LAUF.....</b>  | <b>129</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Abb. 2.1  | Lage und Struktur der Bursa fabricii.....   | 4  |
| Abb. 2.2  | Aufbau des B-Zell-Rezeptors .....   | 5  |
| Abb. 2.3  | Rekombination des Immunglobulin Locus beim Huhn in Dottersack, Milz und Blut .....  | 5  |
| Abb. 2.4  | 'gene conversion' im Immunglobulin Locus beim Huhn in der Bursa.....  | 7  |
| Abb. 2.5  | Immunglobulin-Klassen des Menschen und des Huhns.....   | 10 |
| Abb. 2.6  | Hühnersitus zur Verdeutlichung der Lage peripher lymphatischer Organe.....  | 11 |
| Abb. 2.7  | Die Vertreter der TNF/TNF-Rezeptor-Familie.....   | 14 |
| Abb. 2.8  | BAFF und die BAFF-Rezeptoren .....  | 17 |
| Abb. 2.9  | Stadien der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus.....  | 21 |
| Abb. 2.10 | Der BAFF-Wirkmechanismus: Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den alternativen Weg.....   | 23 |
| Abb. 2.11 | Schematische Darstellung der Rolle der Mitochondrien und ausgesuchter bcl-2 Familienmitglieder beim Auslösen der Apoptose .....                   | 24 |
| Abb. 2.12 | Struktur ausgesuchter Gene der bcl-2 Familie .....  | 25 |
| Abb. 4.1  | Gewinnung der Blutlymphozyten mittels Slow Speed Verfahren .....  | 34 |
| Abb. 4.2  | Wirkung eines interkalierenden Farbstoffs am Beispiel von SYBR Green .....  | 45 |
| Abb. 4.3  | Stilisierte qPCR-Schmelzkurve .....   | 46 |
| Abb. 4.4  | Bedeutung des CT-Wertes.....  | 48 |
| Abb. 4.5  | Aufbau des RCAS Plasmid.....  | 49 |
| Abb. 4.6  | verwendete RCAS-Konstrukte.....   | 50 |
| Abb. 4.7  | flagChBAFF-ELISA.....   | 54 |
| Abb. 4.8  | huBCMA-ELISA.....   | 55 |
| Abb. 5.1  | Analyse der mRNA Abundanz von bcl-2 Familienmitgliedern in DT40 Zellen nach Stimulation mit BAFF und Staurosporin.....                            | 60 |
| Abb. 5.2  | Analyse der mRNA Abundanz von bcl-2 Familienmitgliedern in der Organogenese von Bursa, Milz und Herz .....  | 61 |
| Abb. 5.3  | Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder während der Bursa Entwicklung .....   | 65 |
| Abb. 5.4  | Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder während der Bursa Entwicklung .....   | 66 |
| Abb. 5.5  | Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder bezogen auf die chB6 Expression während der Bursa Entwicklung.....                                | 67 |
| Abb. 5.6  | Relative Zahl lebender B-Zellen nach 24 und 48 h in Kultur .....  | 68 |
| Abb. 5.7  | $\Delta\Delta$ Ct-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten nach 8 und 24 h Inkubation mit chBAFF .....                   | 69 |
| Abb. 5.8  | $\Delta\Delta$ Ct-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten nach 8 und 24 h Inkubation mit CD40L.....                     | 71 |
| Abb. 5.9  | $\Delta\Delta$ Ct-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene im Vergleich CD40L- und BAFF-Stimulation.....                                    | 72 |
| Abb. 5.10 | Vergleich der Zahl lebender B-Zellen aus den Milzen juveniler und adulter Tiere nach 24 h und 48 h Inkubation mit verschiedenen Stimulantien..... | 73 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Abb. 5.11 | Darstellung der Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten junger und adulter Tiere nach Inkubation mit chBAFF.....   | 75 |
| Abb. 5.12 | Darstellung der Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten juveniler und adulter Tiere nach Inkubation mit CD40L .....  | 76 |
| Abb. 5.13 | Darstellung von Sequenz und Spezifität des Primerpaares für RCAS-chBAFF.....   | 78 |
| Abb. 5.14 | Organspezifische Transkription von flagChBAFF und flagChBAFF reverse in mit RCAS infizierten Tieren.....   | 78 |
| Abb. 5.15 | Organspezifische Unterschiede im Niveau an flagChBAFF-Transkript.....  | 79 |
| Abb. 5.16 | Nachweis der RCAS induzierten flagChBAFF Expression mittels .....  | 80 |
| Abb. 5.17 | Nachweis der Verwendbarkeit der Kontrollen mittels ELISA.....  | 81 |
| Abb. 5.18 | $\Delta\Delta CT$ -Werte und Expressionsniveaus der pro-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren .....  | 82 |
| Abb. 5.19 | $\Delta\Delta CT$ -Werte und Expressionsniveaus der anti-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren ..... | 82 |
| Abb. 5.20 | $\Delta\Delta CT$ -Werte und Expressions-niveaus der anti-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren..... | 83 |
| Abb. 5.21 | Nachweis der RCAS vermittelten huBCMA-Fc Expression mittels ELISA .....  | 84 |
| Abb. 5.22 | $\Delta\Delta CT$ -Werte und Expressionsniveaus der pro-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren .....  | 85 |
| Abb. 5.23 | $\Delta\Delta CT$ -Werte und Expressionsniveaus der anti-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren ..... | 85 |
| Abb. 5.24 | $\Delta\Delta CT$ -Werte der mRNA Abundanz von BAFF und chB6 in Bursen der mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren.....                                   | 86 |
| Abb. 5.25 | $\Delta\Delta\Delta Ct$ -Werte der auf die Expression an chB6 bezogenen Transkriptionsniveaus der auf die Kontrollen standardisierten pro- und anti-apoptischen Gene unter huBCMA-Einfluß.....   | 86 |



## Tabellenverzeichnis

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tab. 4.1  | <i>Im ELISA verwendete Antikörper.....</i>  | 54 |
| Tab. 5.1  | <i>Etabliertes PCR Primer Set für bcl-2 Familienmitglieder des Huhns.....</i>   | 59 |
| Tab. 5.2  | <i>Etablierte qPCR Primer für bcl-2 Familienmitglieder des Huhns.....</i>   | 63 |
| Tab. 5.3  | <i>Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder während der Bursa Entwicklung.....</i>   | 65 |
| Tab. 5.4  | <i>Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder während der Bursa Entwicklung.....</i>   | 66 |
| Tab. 5.5  | <i>Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder bezogen auf die chB6 Expression während der Bursa Entwicklung.....</i>   | 67 |
| Tab. 5.6  | <i><math>\Delta\Delta Ct</math>-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten nach 8 und 24 h Inkubation mit chBAFF.....</i>  | 69 |
| Tab. 5.7  | <i><math>\Delta\Delta Ct</math>-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten nach 8 und 24 h Inkubation mit CD40L.....</i>   | 71 |
| Tab. 5.8  | <i><math>\Delta\Delta Ct</math>-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene im Vergleich CD40L- und BAFF-Stimulation.....</i>  | 72 |
| Tab. 5.9  | <i><math>\Delta\Delta Ct</math>-Werte ausgewählter Gene in Milzlymphozyten adulter Tiere unter chBAFF Stimulation.....</i>  | 75 |
| Tab. 5.10 | <i><math>\Delta\Delta Ct</math>-Werte ausgewählter Gene in Milzlymphozyten adulter Tiere unter CD40L Stimulation.....</i>   | 76 |
| Tab. 5.11 | <i><math>\Delta\Delta CT</math>-Werte der mRNA Abundanz des mittels RCAS exprimierten chBAFF- bzw. chBAFF-reverse-Konstruktes bei je einem Küken am Tag des Schlupfes.....</i>                                    | 79 |
| Tab. 5.12 | <i><math>\Delta\Delta CT</math>-Werte und Expressionsniveaus der pro-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren.....</i>   | 82 |
| Tab. 5.13 | <i><math>\Delta\Delta CT</math>-Werte und Expressionsniveaus der anti-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren.....</i>  | 82 |
| Tab. 5.14 | <i><math>\Delta\Delta CT</math>-Werte und Expressions-niveaus der anti-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren.....</i> | 83 |
| Tab. 5.15 | <i><math>\Delta\Delta CT</math>-Werte und Expressionsniveaus der pro-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren.....</i>   | 85 |
| Tab. 5.16 | <i><math>\Delta\Delta CT</math>-Werte und Expressionsniveaus der anti-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren.....</i>  | 85 |
| Tab. 5.17 | <i><math>\Delta\Delta CT</math>-Werte der mRNA Abundanz von BAFF und chB6 in Bursen der mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren.....</i>                                   | 86 |
| Tab. 5.18 | <i><math>\Delta\Delta\Delta Ct</math>-Werte der auf die Expression an chB6 bezogenen Transkriptionsniveaus der auf die Kontrollen standardisierten pro- und anti-apoptischen Gene unter huBCMA-Einfluß.....</i>   | 86 |

## Abkürzungsverzeichnis

|             |   |
|-------------|---|
| 7-AAD       | 7-Amino-Actinomycin-D   |
| APRIL       | A proliferation inducing ligand   |
| Aqua bidest | Aqua bidestillata   |
| Aqua dest   | Aqua destillata   |
| BAFF        | B cell activating factor belonging to the TNF family                                  |
| BCMA        | B cell maturation antigen   |
| BCR         | B-Zellrezeptor (engl. <i>B cell receptor</i> )  |
| BSA         | Bovines Serumalbumin  |
| CAML        | Calcium modulator and cyclophilin ligand  |
| cDNA        | komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )                                   |
| ch          | chicken   |
| CHS         | Hühner Serum (engl. <i>chicken serum</i> )  |
| CT          | Caecaltonsillen   |
| DEPC        | Diethylpyrocarbonat   |
| DMSO        | Dimethylsulfoxid  |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure ( engl <i>Desoxyribonucleid Acid</i> )                         |
| EDTA        | Ethylendiamintetraacetic Acid   |
| ELISA       | Enzym Linked Immunosorbant Assay  |
| EST         | Expressed Sequence Tag  |
| ET          | Embryonaltag  |
| FACS        | Fluorescence activated cell sorter  |
| FasL        | Fas-Ligand  |
| Fc          | Fragment crystallizable   |
| FCS         | Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)  |
| FITC        | Fluorescein-Isothyocyanat   |
| GALT        | Darm assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>gut associated lymphoid tissue</i> ) |
| GC          | Germinales Zentrum (engl. <i>germinal center</i> )                                    |
| G-CSF       | Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor  |
| GAPDH       | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  |
| huBAFF      | humanes BAFF  |
| i.m.        | intramuskulär   |

|             |  |
|-------------|--|
| i.v.        | intravenös   |
| IFN         | Interferon   |
| Ig          | Immunglobulin  |
| IKK         | I $\kappa$ B-Kinase  |
| IL          | Interleukin  |
| kD          | Kilodalton   |
| KG          | Körpergewicht  |
| LT          | Lymphotoxin  |
| mRNA        | Messenger RNA  |
| muBAFF      | murines BAFF   |
| MW          | Mittelwert   |
| MZ          | Marginalzone   |
| NIK         | NF $\kappa$ B inducing kinase  |
| NMS         | Normal-Mausserum   |
| PBL         | Periphere Blut Leukozyten  |
| PBS         | Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )     |
| PCR         | Polymerase Ketten Reaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )         |
| PE          | Phycoerythrin  |
| PFA         | Paraformaldehyd  |
| PI          | Propidium Iodid  |
| PIPES       | 1,4 Piperazindiethansulfonsäure  |
| PMA         | Phorbol Myristat Acetat  |
| POD         | Meerrettich-Peroxidase   |
| qPCR        | quantitative Polymerase Ketten Reaktion                                      |
| RCAS        | Replication-Competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor |
| RNA         | Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleid Acid</i> )                            |
| RPMI        | Rosewell Park Memorial Institute   |
| RT          | Raumtemperatur   |
| SA-PE       | Streptavidin-PE  |
| sIgM        | surface IgM  |
| SLE         | Systemischer Lupus Erythematodes   |
| $\beta$ -ME | $\beta$ -Mercaptoethanol   |
| TACI        | transmembran activator and CAML interactor                                   |

---

|              |  |
|--------------|--|
| TEMED        | Tetramethylethyldiamin                     |
| TGF- $\beta$ | Transforming growth factor- $\beta$        |
| THD          | TNF homology domain                        |
| TMB          | 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin               |
| TNF          | Tumor Nekrose Faktor                       |
| TNFR         | Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor              |
| TNFRSF       | Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor-Superfamilie |
| TNFSF        | Tumor Nekrose Faktor-Superfamilie          |
| TRAF         | TNF-Rezeptor assoziierter Faktor           |
| Tris         | Tris(hydroxymethyl)aminomethan             |
| siRNA        | small interfering RNA                      |
| ZKÜ          | Zellkulturüberstand                        |

# 1 Einleitung

Das Wissen um die biologischen und biochemischen Grundlagen der körpereigenen Abwehr von Krankheitserregern ist essentieller Bestandteil einer jeden medizinischen Diagnostik, sei sie nun human- oder veterinärmedizinischer Natur. Der Forschung auf dem Gebiet der Immunologie kommt somit eine Relevanz zu, die sich bereits in den frühen Impfversuchen Edward Jenners und Louis Pasteurs abzeichnete [1, 2]. War man zu Zeiten der Begründer der immunologischen Wissenschaft noch auf ethisch höchst bedenkliche Versuche am Menschen angewiesen, konnte durch die Etablierung von Maus und Ratte als Modelltiere für die medizinische Wissenschaft eine Forschungsgrundlage geschaffen werden, die moralisch eher vertretbar war und nach dem Wissensstand der damaligen Zeit der Biologie des Menschen annähernd glich. Obschon die moderne medizinische Forschung deutliche Diskrepanzen in der Übertragbarkeit von zu beobachtenden Phänomenen im NagermodeLL auf die Vorgänge im menschlichen Körper nachzuweisen vermochte [3-5], bleibt dieses Modell für die Generierung neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der Humanmedizin bestehen.

Auch in der Veterinärmedizin bedient man sich fast ausschließlich der Modelltiere Maus und Ratte, obwohl grundlegende Erkenntnisse wie die Entdeckung und die Erforschung des Wesens der B-Zellen als Träger der humoralen Immunantwort aus dem Modelltier Huhn stammen. So bekam auch die Bezeichnung B-Zelle, nach ihrem Prägungsort im Huhn, der *Bursa Fabricii*, benannt (‚bursa derived‘), erst später und durch Fehlen einer ähnlichen Struktur im Menschen ihr heutiges Synonym (‚bone marrow derived‘) zugewiesen [6]. Trotz dieser wegweisenden Forschungserfolge im Modelltier Huhn ging man auch in der veterinärmedizinischen Forschung zu einer Verwendung von Nagetieren als Tiermodell über. Dies lässt sowohl durch die größere phylogenetische Nähe der Nagetiere als Mammalier zu unseren Haussäugetieren als auch durch ein Fehlen an Vogel-spezifischen Testmethoden und kreuzreagierenden Agenzien erklären.

Warum sich aber gerade das Huhn als Modelltier für die Erforschung des Immunsystems aus veterinärmedizinischer Sicht anbietet, lässt sich wie folgt begründen. Zum einen bietet das Huhn gerade in Bezug auf Fragestellungen bezüglich der Entwicklung des Immunsystems während der Embryogenese den Vorteil, dass sich diese im Ei und somit leicht zugänglich vollzieht. Auch erlaubt das Vorliegen eines isolierten B-Zell-Organs wie der Bursa fabricii einen guten Zugang zu frühen B-Zell-Entwicklungsstadien. Abschließend nimmt das Huhn durch die Lokalisation der B-Zellreifung in einem Darmanhangsorgan eine Sonderstellung

gegenüber Mensch und Maus ein, die es allerdings mit der B-Zell Lymphopoese anderer Haussäugetiere teilt. Im Englischen werden diese Tierarten unter dem Sammelbegriff GALT Spezies, welches für ‚gut associated lymphoid tissue‘ steht, geführt. Zu diesen zählen neben dem Kaninchen (B-Zellreifung in Appendix und Sacculus rotundus) [7] und den Wiederkäuern wie Rind und Schaf [8-10] auch das Schwein (Peyer’sche Platten als Ort der B-Zellentwicklung) [11]. Somit stellt das Huhn ein ideales Modelltier für die Erforschung des B-Zell-Systems unserer Haussäugetiere dar.

Wie bereits Erwähnung fand, stellt das Fehlen von Vogel-spezifischen Werkzeugen und Methoden und das vergleichsweise geringe Interesse an diesem Forschungsgebiet ein Hindernis dar, welchem es mittels Etablierung neuer und spezifischer Methoden für das Huhn zu begegnen gilt. So konnte zwar bereits die Bedeutung des Zytokins ‚*B-Zell aktivierender Faktor der Tumornekrosefaktorfamilie*‘ (BAFF) für die Entwicklung und das Überleben von B-Zellen beim Huhn beschrieben werden [12-14], die zugrundeliegenden molekularbiologischen Vorgänge blieben allerdings noch weitgehend ungeklärt. Insbesondere die anti-apoptotischen Abläufe der BAFF-Wirkung sind beim Huhn kaum erforscht.

Ziel dieser Arbeit war es somit zum einen, neue Werkzeuge für die Analyse der Auswirkungen einer BAFF-Stimulation auf B-Zellen beim Huhn zu etablieren. Zum anderen sollten mit Hilfe dieser Werkzeuge qualitative und quantitative Genexpressionsanalysen durchgeführt werden, um die anti-apoptotischen Abläufe bei der BAFF-Wirkung zu charakterisieren. Dieses sollte für B-Zellen *in vivo* wie auch *in vitro* geschehen.

## 2 Literaturübersicht

Die Besonderheiten des Immunsystems der Hühner mit ihrem isolierten B-Zell-Organ, der Bursa fabricii, regen Immunologen seit bereits mehr als sechs Dekaden zu intensiver Forschungsarbeit an [6, 15-19]. An den ersten Versuchen der Arbeitsgruppe um Bruce Glick, welcher sich der Erforschung der Bursa fabricii widmete, wurde bereits die Bedeutung dieser aviären Enddarmausstülpung für das Immunsystem des Huhns deutlich. So stellte Timothy Chang, ein Student aus Glicks Labor, durch Zufall fest, dass bursektomierte Hühner nicht mehr in der Lage waren, Antikörper zu produzieren. Glick hatte einer Gruppe von Hühnern kurz nach dem Schlupf die Bursa entfernt und Chang hatte diese Hühner im Alter von 6 Monaten zur Produktion von Antikörpern verwenden wollen. Fast alle Hühner starben und keines wies einen Antikörperspiegel gegen das injizierte Antigen auf. Glick schloss Validierungsversuche an, und der Grundstein für das bessere Verständnis der B-Zellfunktion nicht nur der Hühner war gelegt [19, 20].

### 2.1 Die Entwicklung von Bursa fabricii und B-Zellen beim Huhn

Seit der Erstbeschreibung durch Anatom und Namensgeber Girolamo Fabrici (1533–1619) in seinem Werk *De Formatione Ovi et Pulli* aus dem Jahr 1621 (posthum veröffentlicht) hat sich das Verständnis der aviären Bursa vom ‚Doppelsack im Bereich des Gesäßes‘ zum Ort der ersten Beschreibung der B-Zellen stark gewandelt.

So weiß man heute, dass sich die Bursa um den Embryonaltag 5 aus einer dorso-kaudalen Ausstülpung nahe der Kloake entwickelt [21, 22] und aus einem zentralen Lumen besteht, in welches sich die durch Proliferation des umgebenden Mesoderms entstandenen Plicae projizieren [23]. Die Wandfalten der Bursa enthalten bis zu 10000 Lymphknötchen, *Folliculi lymphatici* (s. Abb. 2.1), in welchen sich die Prägung und Proliferation der B-Lymphozyten vollzieht [24].

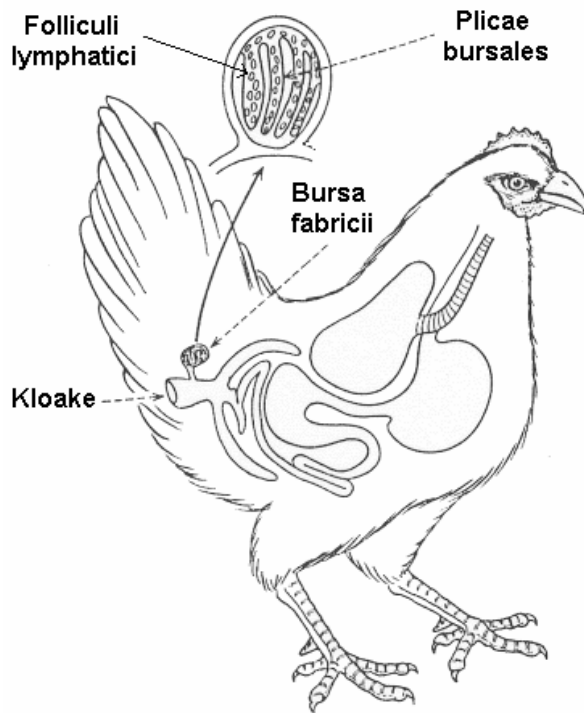


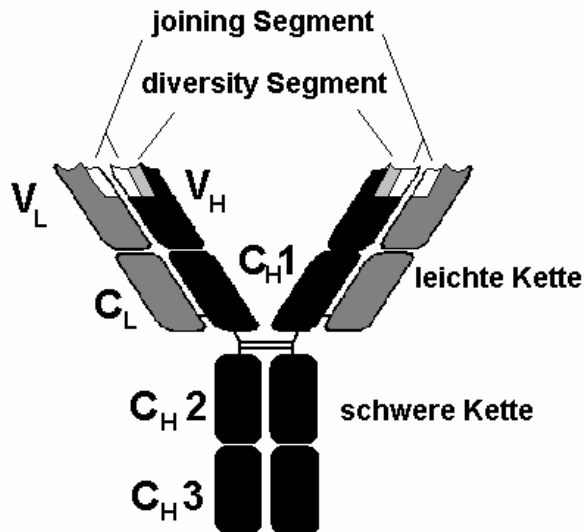
Abb. 2.1 Lage und Struktur der Bursa fabricii

Abbildung überarbeitet,  
entnommen aus:  
[http://homepage2.nifty.com/cryomedicine/wdA\\_C.htm](http://homepage2.nifty.com/cryomedicine/wdA_C.htm)

### 2.1.1 Präbursale B-Zell-Entwicklung

Während sich bei Mensch und Maus lebenslang B-Zellen aus ihren Vorläuferzellen entwickeln können, findet diese Differenzierung bei Vögeln nur während eines kurzen Zeitraums, vom Schlupf bis zur Involution der Bursa zu Beginn der Geschlechtsreife, statt [25, 26]. In diesem Zeitraum müssen B-Zellen mit einer großen Vielfalt an B-Zell-Rezeptoren generiert werden, um auf die Vielzahl der existierenden Antigene reagieren zu können. Diese B-Zell-Rezeptoren bestehen, wie beim Menschen, aus schwerer und leichter Kette, welche wiederum aus verschiedenen Segmenten aufgebaut sind. Bei der leichten Kette sind dies ein variables (V) und ein Verbindungssegment (engl. ‚*joining*‘ = J). Das Verbindungssegment verbindet den variablen mit dem konstanten Anteil (C) des B-Zell-Rezeptors. Die schwere Kette verfügt zudem noch über ein ‚*diversity*‘ (D) Segment (s. Abb. 2.2).



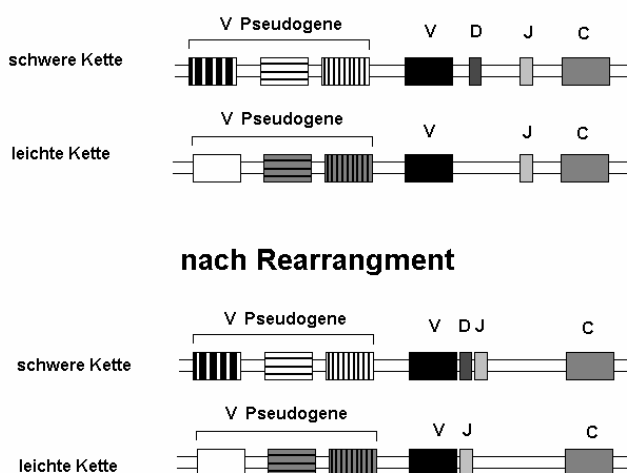
**Abb. 2.2 Aufbau des B-Zell-Rezeptors**

Jeder B-Zell-Rezeptor setzt sich aus einer schweren (schwarz) und einer leichten (grau) Kette zusammen. Diese Ketten bestehen wiederum aus konstanten (C) Regionen, die bei der leichten Kette von einer und bei der schweren Kette aus 3 Ig-Domänen (C<sub>H</sub>1-3) gebildet wird, und einem variablen (V) Anteil. Für die Antigenerkennung zuständig ist der variable Teil der schweren bzw. leichten Kette, welcher jeweils über ein Verbindungselement *joining* (J) und bei der schweren Kette auch über ein *diversity* (D) Segment verfügt.

(V = variabel, C = konstant, L = leichte Kette, H = heavy/schwere Kette)

Der erste Schritt der B-Zell-Entwicklung, die Rekombination der Immunglobulin Gene, vollzieht sich beim Huhn ab dem Embryonaltag 5-6 in Dottersack, Blut und Milz [27]. Verfügen Mensch und Maus über eine große Anzahl an verschiedenen Genen für das variable (V) und *joining* (J) Segment der leichten Kette bzw. auch das *diversity* (D) Segment der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors, so findet sich im Hühnergenom jeweils nur ein Gen für jedes Segment [28, 29], lediglich für das *diversity* Segment der schweren Ketten verfügt das Erbgut des Huhns über mehrere, jedoch höchst strukturgleiche Gene [30]. Allerdings finden sich im Erbgut des Huhnes eine Reihe sogenannter ‚Pseudogene‘ [28], auf deren Bedeutung später im Text noch eingegangen wird (s. Abb. 2.3).

### Immunglobulin Locus beim Huhn

**Abb. 2.3 Rekombination des Immunglobulin Locus beim Huhn in Dottersack, Milz und Blut**

V = variable;

D = diversity;

J = joining;

C = constant;

Segmente des B-Zell-Rezeptors

Um den Embryonaltag 15 ist diese Genrekombination komplett abgeschlossen [31, 32] und jede Hühner B-Zelle verfügt über einen nahezu identischen Immunglobulin Locus. B-Zellen, die über einen rekombinierten Immunglobulin Locus verfügen, wandern nun in die Bursa ein. Sie exprimieren zudem das Kohlenhydrat-Epitop sialyl Lewis<sup>x</sup> auf ihrer Oberfläche, welches sich ab Embryonaltag 10 in der Bursa nachweisen lässt [33]. Ein weiteres ab Embryonaltag 10 in der Bursa nachweisbares Antigen ist der B-Zellmarker Bu-1 [34], mithilfe dessen sich B-Zellvorläufer (Bu-1<sup>+</sup>) von frühen T-Lymphozyten (Bu-1<sup>-</sup>) bereits ab dem Embryonaltag 6 unterscheiden lassen.

Trotz B-Zell spezifischer Marker erinnern diese großen Zellen zu diesem Zeitpunkt lichtmikroskopisch allerdings eher an mature Makrophagen als an B-Zellen und formieren sich nun zu den bereits beschriebenen *Folliculi lymphatici* in der Bursawand.

### 2.1.2 B-Zell Reifung in der Bursa

Ab **Embryonaltag 10** erreichen die ersten B-Zellvorläufer die Bursa, ein Vorgang, der durch chemotaktische Faktoren ausgelöst wird [35] und sich durch die intravenöse Injektion von Fremd-Lymphozyten zu diesem Zeitpunkt negativ beeinflussen lässt [36]. Hierdurch wird die Bedeutung von Alloantigenen auf der B-Lymphozyten Oberfläche beim ‚Homing‘ zur Bursa hin deutlich. Diese körpereigenen Antigene werden durch überschießende Reaktionen auf die Fremdlinge ebenfalls angegriffen, und die B-Lymphozyten können nicht mehr in die Bursa einwandern. Interessanterweise lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch keine bei anderen ‚Graft vs Host‘-Reaktionen beobachtete Splenomegalie induzieren. Diese findet sich erst bei nach Embryonaltag 10 injizierten Tieren.

Nach Ankunft in der Bursa formieren sich die B-Zellvorläufer zu den sogenannten *Folliculi lymphatici*, deren Bedeutung auch durch die nun immer stärker werdende Vaskularisierung dieses Gewebes deutlich wird [37].

Einen weiteren wichtigen Zeitpunkt in der bursalen B-Zell-Reifung stellt der **Embryonaltag 14** dar. Ab diesem Augenblick lassen sich die ersten B-Zellen mit Immunglobulin auf der Oberfläche (surface Ig=sIg) nachweisen [38, 39]. Nur Zellen mit funktionellem sIg beginnen zu proliferieren [40] und der Immunglobulin-Locus wird durch ‚gene conversion‘ diversifiziert [28, 41, 42], wodurch das Antikörper-Repertoire des Huhns entsteht (s.Abb. 2.4).

**Abb. 2.4** ‚gene conversion‘ im  
Immunglobulin Locus beim Huhn in  
der Bursa

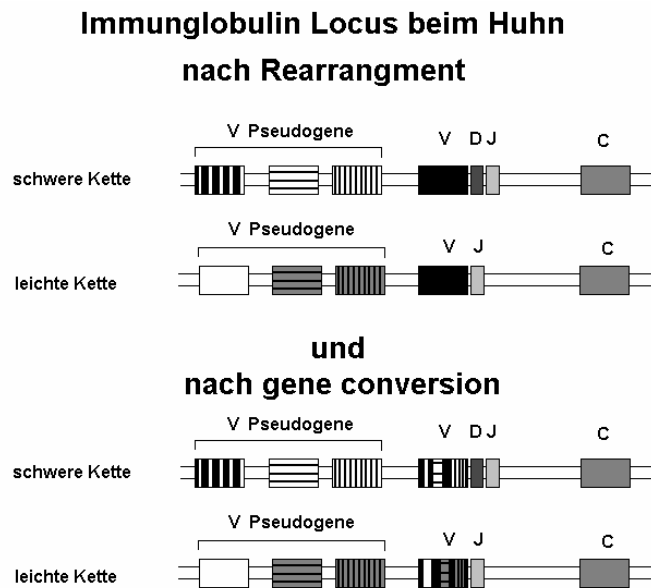
V= *variable*;

D= *diversity*;

J = *joining*;

C= *constant*;

Segmente des B-Zell-Rezeptors



Mit ‚gene conversion‘ wird der zuerst beim Vogel beschriebene Vorgang zur Erzeugung einer der Fülle an Antigenen angepassten Antikörper-Vielfalt bezeichnet. Wie bereits erwähnt, finden sich im Hühnergenom, anders als bei Maus und Mensch, nicht mehrere verschiedene Gene für die einzelnen Segmente des B-Zell-Rezeptors bzw. der Antikörper. Es findet sich jeweils nur ein Gen pro Segment, welches durch Genrekombination verbunden wird (s. 2.1.1). Somit müssten alle B-Zellen des Huhns den gleichen Rezeptor tragen. Dass dies nicht der Situation *in vivo* entspricht, konnte durch Analyse von Milz-Lymphozyten-cDNA adulter Hühner gezeigt werden [29]. Es wurde zudem dargestellt, dass die im Vergleich zum ursprünglichen V-Segment aufgetretenen Nukleotidsubstitutionen Sequenzen in den sogenannten ‚Pseudogenen‘, also 5‘ von dem V-Segment gelegene und zu ihm homologe Bereiche, entsprachen. Pseudogene zeichnen sich durch das Fehlen sowohl einer Promoter-Region als auch eines für die Oberflächenexpression notwendigen Leader-Exons aus [43]. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die ‚gene conversion‘, das Transferieren von Pseudogenen in die rearrangierten V-Gene von leichter und schwerer Kette [44], als Methode der Immunglobulin-Diversifizierung beim Vogel postuliert. Später konnte gezeigt werden, dass die Auswahl der Pseudogene nicht willkürlich, sondern aufgrund ihrer Lage, Homologie und Orientierung zum rearrangierten V-Gen erfolgt [45].

Anzumerken ist, dass nicht nur Vögel den Mechanismus der „gene conversion“ nutzen, sondern auch Schaf, Rind, Schwein und Kaninchen ihre Antikörpervielfalt teilweise oder vollständig auf diese Art erzeugen [46]. Dabei dient in all diesen Spezies das sog. „gut associated lymphoid tissue“ (GALT) als primäres B-Zell Organ. Neben der Bursa beim Huhn sind das bei Schaf, Rind [8, 10] und Schwein [47] die Peyer’schen Platten [48, 49] und beim

Kaninchen der Blinddarm [50, 51], wobei diese Spezies im Gegensatz zum Huhn mehrere funktionelle V-Gene für die schwere und leichte Kette besitzen und somit „gene conversion“ nicht als alleiniger Mechanismus zur Diversifizierung dient.

Der **Embryonaltag 18** markiert den Beginn der Emigration von B-Zellen aus der Bursa ins Blut und darauf in die peripheren lymphatischen Organe. Dabei ist die Zahl der peripheren B-Zellen zum Zeitpunkt des Schlupfes noch sehr gering. Bis zum Alter von 3 Wochen steigt die Emigrationsrate aus der Bursa jedoch auf 1% der peripheren B-Zellzahl pro Stunde an [52]. Zudem lassen sich ab diesem Zeitpunkt die ersten SE- (sheep erythrocytes) Antikörper in der Bursa nachweisen [53], welche auch ohne Stimulation durch dieses Antigen entstehen, und somit die These, dass sich spezifische Antigen-Erkennungsmuster in der Bursa in einer festgelegten Reihenfolge entwickeln, unterstreichen.

Der Embryonaltag 21 entspricht dem Zeitpunkt des Schlupfes, **Tag 1**, und kennzeichnet neben dem Ende der Embryogenese auch den Beginn der Aufnahme von Antigen durch reverse peristaltische Reflexe in die Bursa [54, 55], ein Mechanismus, der maßgeblich an der Stimulation des aviären Immunsystems durch Antigen beteiligt ist. Ligiert man vor diesem Zeitpunkt den Verbindungsgang zwischen Bursa und Enddarm (bursal duct ligation = BDL) [56], so wird nach dem Schlupf kein Fremdanigen mehr von der Bursa aufgenommen und diese Hühner verfügen über geringere Mengen an natürlichen Serum-Agglutininen [57].

Auch steigt nach dem Schlupf die Zahl apoptotischer Zellen in der Bursa dramatisch an [58]. So emigrieren lediglich etwa 5% der gebildeten B-Zellen in die Peripherie, die restlichen Zellen sterben in der Bursa [59]. Hierzu gehören alle Zellen, die während ihrer Entwicklung die Fähigkeit verloren haben, Immunglobuline auf ihrer Oberfläche zu exprimieren [60]. Wie durch retroviralen Gentransfer gezeigt werden konnte, ist die Expression eines trunkierten sIg ohne variablen Anteil ausreichend, um in der Embryonalzeit die Proliferation der Zellen zu induzieren. Zur Emigration aus der Bursa ist allerdings ein vollständiges Immunglobulinmolekül notwendig. Zellen mit trunkiertem sIg wandern nicht in die Peripherie, sie werden in der Bursa durch Apoptose eliminiert [61].

Welches Signal die Apoptose in der Bursa verursacht, weiß man bislang nicht. Da in 98% der „gene conversion“-Ereignisse der Leserahmen des Exons für den variablen Teil erhalten bleibt [62], kann ein nicht produktives „gene conversion“- Ereignis als Hauptursache allerdings ausgeschlossen werden. Interessanterweise scheint das Überleben der Zellen in der Bursa mit der Expression von chL12, einem Alloantigen von 38 – 40 kD, verknüpft zu sein, wobei sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Apoptose-resistenten Zellen unter den Zellen mit sehr hoher Expression von chL12 (chL12<sup>high</sup>) zu finden sind. Ob die Abnahme der chL12-

Expression (chL12<sup>low</sup>/chL12<sup>+</sup>) jedoch Ursache oder Folge der Apoptose darstellt, ist nicht bekannt [63].

Bursale B-Zellen sterben nach Entnahme aus dem Gewebeverband innerhalb von kurzer Zeit, so dass nach 16 Stunden der *in vitro* Kultivierung von Lymphozyten aus der Bursa die Viabilität der Zellen unter 10% liegt [64]. Durch Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen lässt sich zeigen, dass bereits nach 8 Stunden mehr als 50% der Zellen Anzeichen von Apoptose aufweisen [60]. Die Überlebensrate der Zellen kann jedoch durch Zugabe des Phorbolesters **Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)** um ein Vielfaches gesteigert werden [65].

Da bei *in vitro* Organkulturen von embryonalen Bursa-Anteilen das Überleben deutlich höher ist und sogar Proliferation und Differenzierung der B-Zellen nachgewiesen werden konnten [66, 67], scheinen Zell-Zell-Interaktionen bei der Vermittlung von Überlebenssignalen eine wichtige Rolle zu spielen.

### 2.1.3 Involution der Bursa

Bereits im Alter von 10-16 Wochen kommt es zu einer Reduktion des Gewichts der Bursa, die Mitoserate in diesem Organ nimmt deutlich ab, und es bilden sich mukoide Zysten [68]. Nach 6 Monaten lässt sich nur noch ein fibrotischer Rest ohne lymphoepitheliale Struktur nachweisen [69]. Auffällig ist, dass sich die Involution der Bursa bei männlichen Tieren schneller vollzieht [69, 70]. Eine Beobachtung, die sich auf die Expression von Sexualhormon-spezifischen Rezeptoren in der Bursa zurückführen lässt [71, 72] und somit auch in direkter Relation zur Legereife der Hühner steht. So konnte gezeigt werden, dass Hühner, die verspätet mit der Eiablage beginnen, über eine im Vergleich zu altersgleichen, bereits Eier legenden Hühnern noch juvenile Bursa verfügen [73].

### 2.1.4 Postbursale B-Zell-Entwicklung

Aus der Bursa emigrierende Lymphozyten erreichen über den Blutstrom die peripheren bzw. sekundären lymphatischen Organe, in denen sich weitere Entwicklungsschritte wie der Immunglobulin-Klassenwechsel vollziehen. Dieser Wechsel vom ursprünglich bei allen B-Zellen gleichen IgM-Isotyp liefert beim Menschen schließlich fünf und beim Huhn drei unterschiedlichen Klassen (s. Abb. 2.5).

Beim Huhn findet sich ein IgG-Molekül, das über keine flexible, sog. ‚hinge‘, Region und eine längere schwere Kette als sein humanes Äquivalent verfügt und aufgrund seiner Andersartigkeit auch als IgY bezeichnet wird [74, 75]. Auch das IgA zeichnet sich durch eine längere schwere Kette aus [76-78]. Hühner IgM wird, wie IgM beim Menschen, von naiven B-Zellen [79, 80] exprimiert. IgE und IgD wurden beim Huhn noch nicht nachgewiesen.

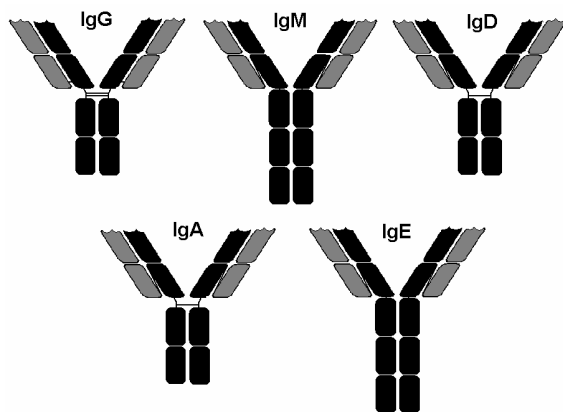


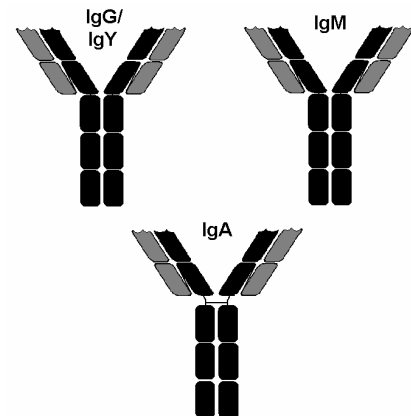
Abb. 2.5 Immunglobulin-Klassen des Menschen

schwarz = schwere Kette  
grau = leichte Kette

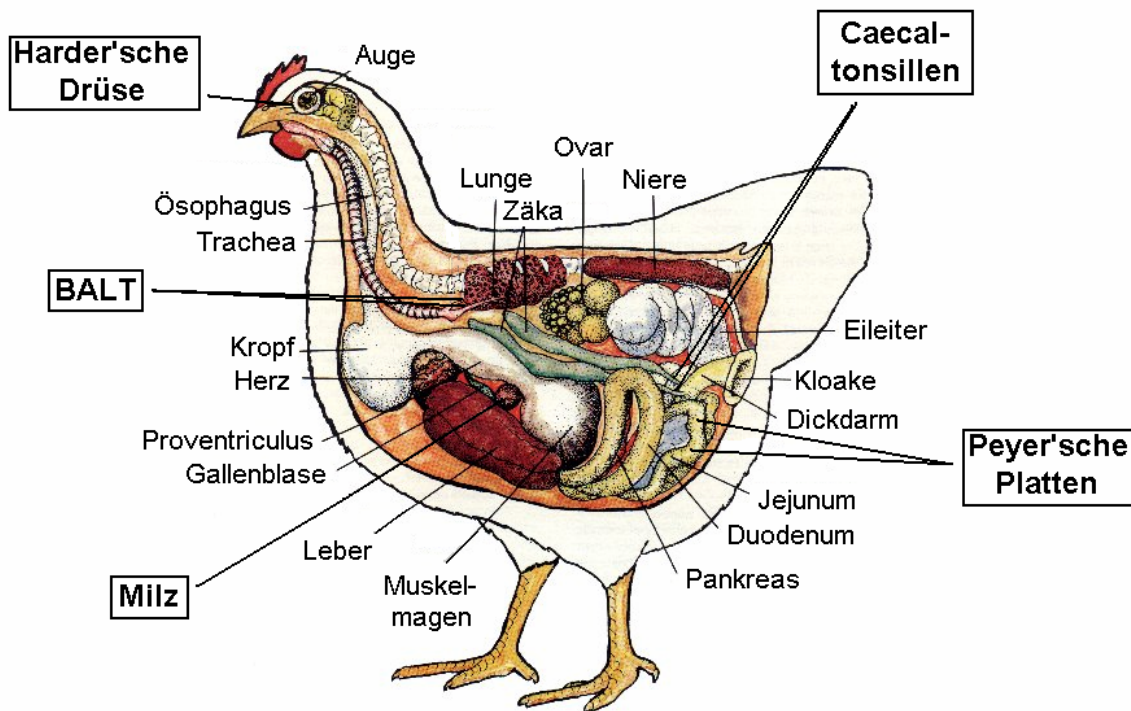
Die außer dem primären IgM (gelöst als Pentamer vorliegend) beim Menschen vorhandenen Ig-Klassen: Im Serum am häufigsten vorkommend das IgG, das meist mukosal anzutreffende IgA, das im Zusammenhang mit allergischem Geschehen zu nennende IgE und das nur membrangebundene IgD.

#### Bekannte Immunglobulin-Klassen des Huhns

Die bisher beim Huhn charakterisierten Immunglobulinklassen: das IgG, welches über eine längere schwere Kette als beim Mensch verfügt, ebenfalls länger das IgA und das IgM der naiven B-Zellen.



Dieser die unterschiedlichen Immunglobulin-Klassen hervorbringende Wechsel findet in den sogenannten germinalen Zentren statt [81]. Germinale Zentren entstehen durch die Proliferation von B-Lymphozyten nach Antigen-Kontakt und beim Mensch zumeist in Milz oder Lymphknoten [82, 83]. Hühner verfügen über keine Lymphknoten, die germinale Zentrums-Reaktion lässt sich allerdings in den peripher lymphatischen Organen Milz [84], Peyer'sche Platten [85], Caecaltonsille [86], dem Bronchus assoziierten lymphatischen Gewebe (engl.: BALM) [87] und der Harder'schen Drüse [88] nachweisen (s. Abb. 2.6).



**Abb. 2.6 Hühnersitus zur Verdeutlichung der Lage peripher lymphatischer Organe**  
Abbildung überarbeitet, entnommen aus: <http://www.msstate.edu/dept/poultry/pub1276.htm>

Die **Milz** des Huhns ist wie beim Säugetier aus roter und weißer Pulpa zusammengesetzt und bildet sich, nach erster Besiedelung durch Lymphozyten-Vorläufer um den zehnten Embryonaltag, erst nach Schlupf und erstem Antigenkontakt zum lymphoiden Organ aus. Da immunogene Substanzen die Milz über die Blutzirkulation erreichen, richten sich die hier gebildeten Antikörper meist gegen Antigene aus dem Blut [89].

**Peyer'sche Platten** finden sich ab dem 10. Tag nach dem Schlupf [85], und es konnte gezeigt werden, dass auch Zellen, die in der Milz mit Antigenen in Kontakt kommen, in den Peyer'schen Platten eine germinale Zentrums-Reaktion auslösen können [90].

Die **Caecaltonsillen (CT)** sind den zwei Zäka des Huhns im proximalen Bereich für 4-10 mm anliegende lymphatische Strukturen [91], welche über zwei Arten von germinalen Zentren verfügen [86]. Zum einen finden sich hier in der Tiefe liegende, ohne Kapsel, und zum anderen in Epithelnähe liegende und durch eine Kapsel vom umgebenden lymphoiden Gewebe abgetrennte Zentren. Die Entwicklung der Caecaltonsillen korreliert mit der ersten Aufnahme von Fremdanigenen um den Zeitpunkt des Schlupfes [92].

Im Bronchus assoziierten lymphatischen Gewebe (**BALT**) können ab einem Alter von zwei Wochen die ersten germinalen Zentren nachgewiesen werden [87]. Zudem bilden sich ab diesem Zeitpunkt auch die für die Luftwege typischen Zilien auf dem vorher squamösen BALT-Epithel aus [87].

Die **Harder'sche Drüse** schließlich ist eine zu den akzessorischen Tränendrüsen zählende, auf der Nickhaut gelegene Drüse, die in ihrem Stroma eine Ansammlung von Plasmazellen aufweist [93]. Diese gereiften B-Zellen geben Antikörper in die Tränenflüssigkeit ab [91], deren Konzentration sich durch die chirurgische Entfernung der Harder'schen Drüse stark erniedrigen lässt [94, 95].

Eine wichtige Rolle spielen neben der Lokalisation der B-Zell-Entwicklung für diese auch das Vorhandensein von löslichen Faktoren [18]. So konnte, wie bereits für die Stromazellen des Knochenmarks der Säuger [96, 97], auch für jene der Bursa die Wichtigkeit von Zytokinen als Mediatoren von Wachstums- und Differenzierungssignalen gezeigt werden. Besonders zu nennen sei hier das Tripeptid Bursin [98], welches bereits bei der Ontogenese der *Folliculi lymphatici* in der Bursa eine große Rolle spielt [99]. Ebenfalls von entscheidender Bedeutung sind die Mitglieder der Tumornekrosefaktor Familie, eine nach dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  benannte Gruppe von Zytokinen. Hierzu gehören unter anderem der beim Säuger für den Isotyp-Klassenwechsel essentielle CD40-Ligand und der ‚B-Zell aktivierender Faktor der Tumornekrosefaktorfamilie‘ (BAFF). Beide Zytokine sind auch beim Huhn beschrieben [14, 100].

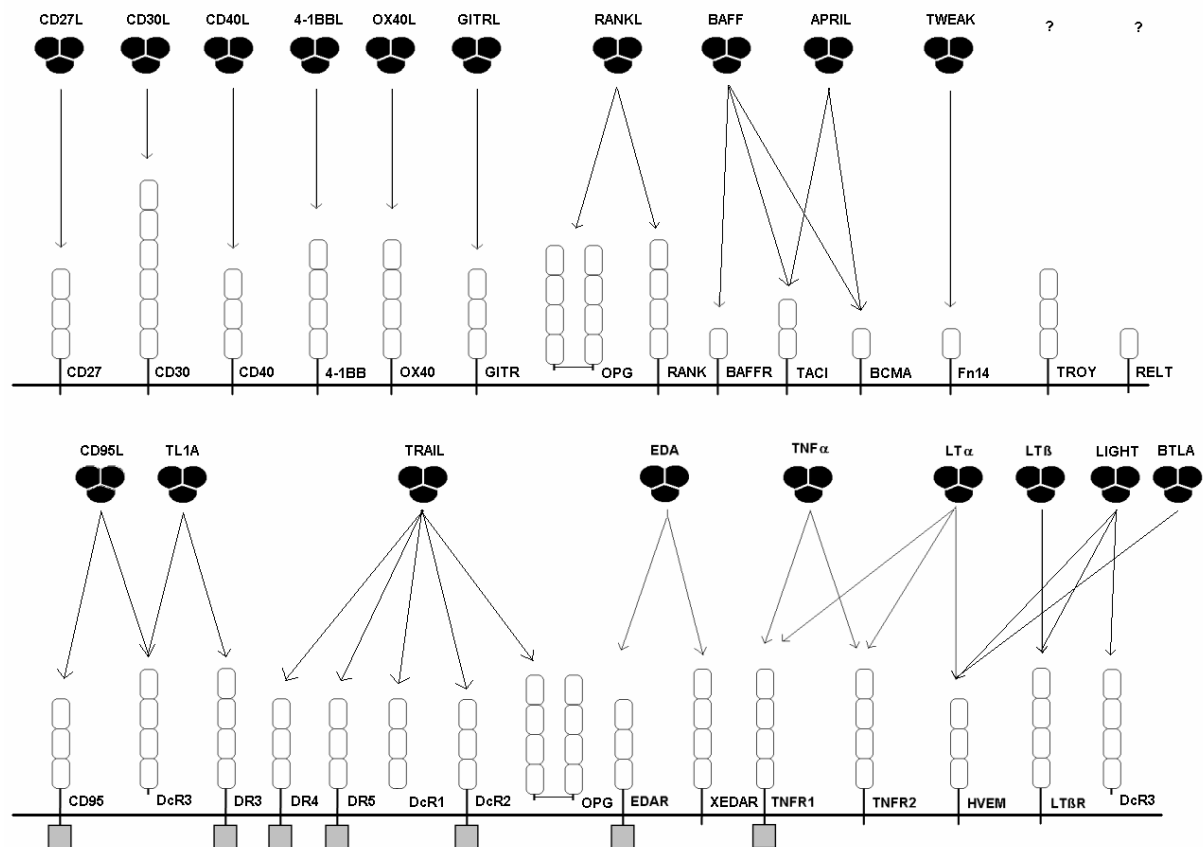


## 2.2 Der B-Zell aktivierende Faktor der Tumornekrosefaktor Familie (BAFF)

Um die in jedem Lebewesen ablaufenden mannigfaltigen Wachstums- und Differenzierungsvorgänge der Körperzellen unter Kontrolle zu halten und zu regulieren, bedient sich die Natur unter anderem der Zytokine. Diese von Zellen gebildeten Proteine beeinflussen das Verhalten anderer Zellen über spezifische Rezeptoren, welche sich auf der Oberfläche ihrer Zielzellen befinden. Es lassen sich im Wesentlichen vier Hauptgruppen von Zytokinen unterscheiden: Die **Interferone (IFN)**, deren Namen sich von ihrer beobachteten Wirkung, dem ‚Interferieren‘ bei viralen Infekten, ableitet [101], die von Leukozyten gebildeten **Interleukine (IL)**, welche in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung beziffert werden [102-104], die **Koloniestimulierenden Faktoren (CSF)**, von Erythrozyten und weißen Blutkörperchen gebildete Wachstumsfaktoren [105], und schließlich die **Tumornekrosefaktoren (TNF)**.

### 2.2.1 Die Tumornekrosefaktor-/Tumornekrosefaktor-Rezeptor Familie

Bereits kurz nach seiner Erstbeschreibung wurde evident, dass der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  [106], früher aufgrund seiner Wirkung als ‚Kachektin‘ bezeichnet [107, 108], und das bereits zuvor charakterisierte Lymphotoxin [109] prototypisch für die Mitglieder einer Familie an Proteinen sind. Mit dem Fortschreiten der Entwicklung auf dem Gebiet der Molekularbiologie konnten immer mehr Mitglieder dieser Proteinfamilie nachgewiesen und ihre essentielle biologische Bedeutung gezeigt werden [110, 111]. Auch wurde neben den dem Tumornekrosefaktor ähnlichen Proteinen eine Gruppe von Oberflächenmolekülen nachgewiesen, die dem Rezeptor des Tumornekrosefaktors ähnlich sind und somit zur ‚Tumornekrosefaktor-Rezeptor Familie‘ zusammengefasst wurden (s. Abb. 2.7). Zum jetzigen Zeitpunkt zählt man 19 Mitglieder der Tumornekrosefaktor- und 29 Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Familie [112], die eine Vielzahl an Funktionen innehaben. So sind Mitglieder der TNF-/TNF-Rezeptor Familie an der Regulation der Apoptose [113], der Initiation von Wachstums- und Differenzierungssignalen [114, 115], dem Ablauf der Immunantwort [116], der Organogenese [117] und dem Knochenstoffwechsel [118] beteiligt.



**Abb. 2.7 Die Vertreter der TNF-/TNF-Rezeptor Familie**

Die dem TNF verwandten Liganden sind schwarz, die extrazellulären Domänen ihrer Rezeptoren mit der genauen Menge an CRDs (cystein-rich domains) weiß dargestellt. Graue Vierecke entsprechen zytoplasmatisch gelegenen Death Domains.

Allen Mitgliedern der TNF-Familie gleich ist das Vorkommen als Typ 2 Transmembran-Protein, wobei die meisten auch in gelöster Form, als typische Zytokine, auftreten. Typ 2 Transmembran-Proteine zeichnen sich durch eine carboxyterminale extrazytoplasmatische und eine aminoternale intrazytoplasmatische Domäne, die durch eine Transmembran-Domäne verbunden sind, aus. C-terminal tritt bei allen Liganden eine zum TNF homologe Domäne (THD- TNF homology domain) auf, die für die charakteristische  $\beta$ -Faltblattstruktur verantwortlich ist [119]. Weiterhin gleich ist ihnen die Homotrimer-Struktur [120-122]. Für die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie ist das Vorhandensein von ein bis sechs ‚cystein rich domains‘ (CRDs) in ihrem extrazellulären Anteil typisch. CRDs sind aus bis zu 40 Aminosäuren zusammengesetzt und werden über drei Cystein-Brücken stabilisiert [123]. Die sich distal der Membran befindenden CRDs fungieren als eine Art ‚pre-ligand binding assembly domain‘ (PLAD) [111, 124], welche das sich Ausrichten der Liganden vor der Bindung an proximal der Membran gelegene CRDs ermöglicht. Desweiteren verfügen einige TNF-Rezeptoren über sogenannte ‚death domains‘ und erlauben somit eine Einteilung der

Rezeptoren in Apoptose vermittelnde ‚Death Receptors‘ und solche ohne death domain, die Überlebenssignale vermitteln [125].

Zu den Mitgliedern der TNF-Familie wird, wie bereits erwähnt, auch das Lymphotoxin gezählt. Bei seiner Entdeckung noch als einzelner Faktor beschrieben [126] und aufgrund seiner Strukturanalogie zum Tumornekrosefaktor (TNF  $\alpha$ ) auch als Tumornekrosefaktor  $\beta$  bezeichnet [127, 128], stellte sich schnell heraus, dass sich zwei unterschiedliche Lymphotoxine, nach ihrem Trennverhalten bei der Chromatographie alpha ( $\alpha$ ) und beta ( $\beta$ ) genannt, nachweisen lassen [129, 130]. Die Lymphotoxine spielen eine entscheidende Rolle bei chronischen Entzündungsreaktionen [131], der Synthese weiterer Zytokine [132] und stimulieren das Wachstum und die Proteinsynthese in Fibroblasten [133]. Zudem konnte die entscheidende Bedeutung der Lymphotoxine für die Entwicklung der GALT-Organe gezeigt werden [134]. Mit der Tatsache, dass Lymphotoxine auch für die Bildung der Lymphknoten entscheidend sind [135], lässt sich vielleicht das Fehlen von Lymphknoten beim Huhn erklären, da auch das das Lymphotoxin kodierende Gen beim Huhn noch nicht gefunden werden konnte [136]. Obwohl auch das Gen für den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  beim Huhn noch nicht nachgewiesen wurde, ließ sich TNF  $\alpha$  Aktivität zeigen [137-140], und auch ein TNF-Rezeptor-Locus wurde bereits für das Huhn beschrieben [136]. Genomisch wie auch funktionell wurde allerdings ein weiteres Mitglied der TNF Familie beim Huhn nachgewiesen: der CD40-Ligand.

CD40 weckte das Interesse der Immunologen, da eine Stimulation dieses auf B-Zellen, Makrophagen, dendritischen und Endothelzellen vorkommenden Oberflächenmarkers zu einer deutlichen Proliferation dieser Zellen führt [141]. Ferner konnte auch gezeigt werden, dass CD40 im Zusammenhang mit dem Immunglobulin-Klassenwechsel eine große Bedeutung zukommt [142]. So weisen Patienten mit dem sogenannten Hyper-IgM-Syndrom hohe Titer an IgM und extrem niedrige IgG Titer auf, was auf ein Ausbleiben des Immunglobulin-Klassenwechsels hindeutet [143]. Bei diesen Patienten konnte eine Mutation im CD40-Gen aufgezeigt und somit die Bedeutung der CD40-CD40-Ligand-Interaktion für den Immunglobulin-Klassenwechsel bewiesen werden [144, 145]. Mit dem CD40-Liganden fand man schließlich auch den sich auf aktivierten T-Zellen befindenden Bindungspartner und Aktivator von CD40. Dieser wurde, wie für den Menschen [146], auch für das Huhn erst einige Jahre nach CD40 beschrieben [147]. Ebenfalls parallel stellt sich die durch die CD40-CD40-Ligand-Interaktion induzierte Proliferation nativer B-Zellen bei Mensch und Huhn dar [100]. Dies erlaubt zudem die ersten Langzeitkulturen nativer B-Zellen beim Huhn.

## 2.2.2 Die Struktur von BAFF

Der B-Zell aktivierende Faktor der Tumornekrosefaktor-Familie (BAFF) wurde zeitgleich von unterschiedlichen Forschergruppen beschrieben und ist daher auch unter dem Namen BLyS (B Lymphocyte Stimulator) [148], TALL-1 (TNF- and ApoL related Leukocyte-expressed Ligand 1) [149], THANK (TNF Homolog that activates Apoptosis, Nuclear factor- $\kappa$ B and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase) [150], TNFSF13b (TNF-Superfamily Member 13b) und zTNF4 [151, 152] bekannt. BAFF kommt, wie die meisten TNF-Familienmitglieder, sowohl membrangebunden als auch in einer durch eine Protease vom Furin-Typ gespaltenen, löslichen Form vor [153]. Auch das BAFF sehr ähnliche APRIL (A proliferation inducing ligand) wird von einer Protease vom Furin-Typ gespalten, allerdings bereits intrazellulär [154]. APRIL bindet ebenfalls an die beiden BAFF-Rezeptoren BCMA und TACI, scheint allerdings für die Entwicklung des Immunsystems eine BAFF untergeordnete Rolle zu spielen [155].

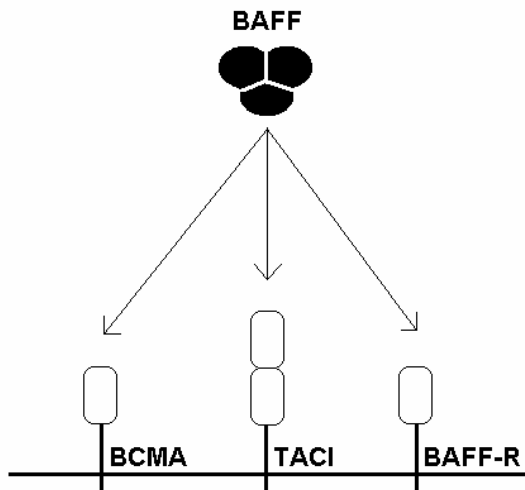
Neben der Furinschnittstelle verfügt BAFF auch über die TNF-Familien typische Homotrimere Form [156, 157], eine Größe von 55 kD (Trimer) bzw. 18 kD (Monomer) [158], und eine alternative Splice-Form,  $\Delta$ BAFF [159].  $\Delta$ BAFF fehlt eine 57 Basenpaar lange Sequenz, die eine der Rezeptorbindenden Domänen kodiert. Es multimerisiert mit BAFF und kann somit die Rezeptor-Bindung und proteolytische Spaltung von BAFF negativ beeinflussen [160]. Zudem konnte im Transgenen Maus-Modell gezeigt werden, dass  $\Delta$ BAFF die durch BAFF-Überexpression auftretenden, negativen Auswirkungen ausgleichen kann [161].

Strukturell humanem BAFF höchst homolog ist Hühner BAFF (engl.: chBAFF) [14], dessen Aminosäurenstruktur zu 76% mit dem von humanem BAFF übereinstimmt. Dies ist besonders bemerkenswert, da die strukturelle Ähnlichkeit der Mehrheit der aviären Zytokine zu ihren humanen Analogen unter 30% liegt [162]. Auch bei Schweinen [163], Gänsen [164] und Enten [165] weist BAFF eine im Vergleich zu anderen Zytokinen extrem hohe Homologie mit humanem und murinem BAFF auf.

## 2.2.3 Die BAFF-Rezeptoren

BAFF kann an drei Rezeptoren aus der TNF-Rezeptor-Familie binden: BCMA (B cell maturation antigen, TNFRSF 17) [151, 166], TACI (transmembrane activator and CAML

interacting protein, TNFRSF 13B) [156, 167], an die auch APRIL binden kann, und den nur von BAFF gebundenen BAFF-Rezeptor (BAFF-R) [168]. Eine Besonderheit von BCMA und dem BAFF-R stellt dar, dass sie jeweils nur über eine CRD (cystein rich domain) in ihrem extrazellulären Anteil verfügen (s. Abb. 2.8).



**Abb. 2.8 BAFF und die BAFF-Rezeptoren**

BAFF in seiner Homotrimeren Struktur ist schwarz, die extrazellulären Domänen seiner Rezeptoren mit der genauen Menge an CRDs (cystein-rich domains) weiß dargestellt.

(BAFF = B-Zell aktivierender Faktor der TNF-Familie, R = Rezeptor, TACI = transmembrane activator and CAML interactor/ TNFRSF 13B, BCMA = B cell maturation antigen/TNFRSF17)

Das Gen für **BCMA** wurde als erstes bei einem Patienten mit T-Zell Lymphom beschrieben und aufgrund der Auffindbarkeit in maturen B-Zell-Linien als ‚B-cell maturation antigen‘ bezeichnet [169]. Eine spätere Charakterisierung wies es als Typ I Membranprotein (die aminoterminal Domäne liegt extrazytoplasmatisch) aus, welches bidirektional transkribiert werden kann [170, 171]. Es konnte gezeigt werden, dass BCMA essentiell für das Überleben der Plasmazellen im Knochenmark ist [172]. So findet sich gegenüber ruhenden B-Zellen in den für die Langzeit-Immunität verantwortlichen, aktivierten Plasmazellen eine Hochregulation von BCMA bei gleichzeitiger Runterregulation der Rezeptoren TACI und BAFF-R. Auch konnte die Bedeutung von BCMA für die Induktion der Antigen-Produktion gezeigt werden [173]. Wie bereits erwähnt, kann neben BAFF auch APRIL an BCMA binden, dies sogar mit einer 1000mal höheren Affinität [174]. Diese geringe Affinität für BAFF wird auch für die erhöhte Apoptose der B-Zellen von mit dem HI-Virus infizierten Patienten verantwortlich gemacht [175], da in diesen Zellen BCMA hochreguliert wird und somit den höher affinen BAFF-Rezeptor (BAFF-R) konsekutiv verdrängt. Allgemein konnte allerdings gezeigt werden, dass die Bedeutung der anderen BAFF-Rezeptoren (TACI, BAFF-R) für die BAFF-Wirkung auf B-Zellen den Einfluss von BCMA überwiegt [176].

**TACI** (transmembrane activator and CAML interacting protein) wurde aufgrund seiner Affinität zum Protein CAML (calcium-modulator and cyclophilin ligand) entdeckt, welches

für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ‚Nuklear Faktor der aktivierten T-Zellen‘ (NF-AT) und somit auch für die Lymphozytenaktivierung mitverantwortlich ist [177]. Kurz nach seiner Erstbeschreibung konnte gezeigt werden, dass TACI ein Rezeptor für BAFF ist und therapeutisch bei durch BAFF-Überexpression verursachten Erkrankungen (systemischer Lupus erythematosus/SLE) als lösliches Protein zur Neutralisation von BAFF eingesetzt werden kann [151, 178]. So konnte gezeigt werden, dass die adenoviral vermittelte Expression eines TACI-Ig-Fusionsproteins bei einem SLE-Mausmodell (NZB/NZW F<sub>1</sub>) zu einem verzögerten Einsetzen von klinisch manifestem Lupus führte [179]. Auch bei chemisch induzierter Autoimmunität (subtoxische Quecksilber-Gabe) [180] und durch Ovalbumin-induziertem bronchialem Asthma [181] konnte die inhibitorische Wirkung von TACI-Ig gezeigt werden. Allerdings wirkt diese sich nicht nur auf pathologische Vorgänge, sondern auch auf die Antikörper-Produktion allgemein aus. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass TACI die durch CD40 und den BAFF-Rezeptor costimulierte Antikörperproduktion hemmt [182]. Die gegenüber den anderen BAFF-Rezeptoren (BCMA, BAFF-R) deutlich inhibitorische Wirkung von TACI konnte auch in TACI-knock-out Mäusen gezeigt werden [183]. So entwickeln diese Mäuse einen Phänotyp, der durch schwere autoimmune Reaktionen gekennzeichnet ist.

Der nur für die BAFF-Bindung spezifische **BAFF-Rezeptor** (BAFF-R, auch BR3) schließlich wurde als letzter der drei BAFF-Rezeptoren beschrieben [168, 184] und aufgrund seines Fehlens bei A/WySnJ Mäusen (Locus unterbrochen), welche phänotypisch BAFF-knock-out Mäusen gleichen, als Hauptfaktor der BAFF-vermittelten B-Zell-Reifung charakterisiert. Strukturell fällt auf, dass der BAFF-R nur über eine CRD (cystein rich domain) in seiner extrazellulären Domain verfügt [185], womit er, wie BCMA, eine Sonderstellung unter den regulär über mindestens zwei CRDs verfügenden TNF-Rezeptoren einnimmt. Eine Sonderstellung unter den BAFF-Rezeptoren nimmt der BAFF-R außerdem durch sein Vorkommen auf aktivierten/memory T-Zellen ein [186], da weder BCMA noch TACI auf der Oberfläche von diesen Zellen exprimiert werden. Somit kommt BAFF, über Bindung an den BAFF-R, auch eine Bedeutung bei der T-Zell-Aktivierung zu, welche sich zum Beispiel im verlängerten Überleben von kardialen Allograften auf Mäusen mit BAFF-R Mutation bzw. BAFF Deletion manifestiert [187]. Zu seinen B-Zell-spezifischen Funktionen zählt die Vermittlung des Ig-Klassenwechsels, welcher auch durch TACI herbeigeführt werden kann [188], eine Rolle in der Proliferation von B-Zell-Lymphomen [189] und ist, wie BCMA und TACI, an der Abwehrreaktion von T-Zell-unabhängigen (TI) Antigenen beteiligt. Diese bei

Neugeborenen reduziert ablaufende Reaktion auf gram<sup>+</sup>-Bakterien kann mit der reduzierten Expression von BAFF-Rezeptoren bei Neonaten in Verbindung gebracht werden [190].

Obwohl für Maus und Mensch bereits Besonderheiten der Wirkung eines jeden der drei BAFF-Rezeptoren gezeigt werden konnten, konnte für das Huhn bis vor kurzem nur der BAFF-R beschrieben werden [136]. Neueste Ergebnisse deuten nun allerdings darauf hin, dass auch TACI beim Huhn vorkommt (persönliche Mitteilung von Dr. John Young, Institute for Animal Health, Compton, UK). Für das Vorhandensein von BCMA und des sowohl an BCMA wie auch an TACI bindenden Proteins APRIL beim Huhn gibt es bisher hingegen keinen Hinweis.

#### **2.2.4 Expression von BAFF**

Neben der Struktur von BAFF und seinen Rezeptoren beeinflusst auch ihre gewebsspezifische Expression die durch die Rezeptor-Ligand Interaktion induzierten Funktionen.

BAFF wird bei Mensch und Maus hauptsächlich in peripheren, lymphatischen Zellen des Blutes (PBLs), der Milz und den Lymphknoten exprimiert, obwohl sich geringe Mengen auch in diversen anderen Geweben finden lassen [148-150, 158]. Zu den Zelltypen, die BAFF bilden, zählen Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen [191]. Letztere produzieren geringe Mengen an BAFF nach Aktivierung [192]. Normalerweise wird BAFF nicht von B-Zellen exprimiert, es wurde allerdings in einer B-Zelllinie aus der chronischen B-Zell Leukämie (B-CLL) detektiert [193]. Überraschenderweise lässt sich auch bei neutrophilen Granulozyten durch Stimulation mit IFN $\gamma$  und besonders durch G-CSF-Stimulation eine hohe Expression und Abgabe von BAFF feststellen [194]. Eine Besonderheit stellt hierbei dar, dass BAFF nie membrangebunden, sondern nur bereits intrazellulär gespalten vorkommt. Auch bei einigen nicht lymphoiden Zellen konnte bereits die Produktion von BAFF gezeigt werden, hierzu zählen neben Epithelien der Luftwege [195] und der Speicheldrüsen [196] auch Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten [197], Astrozyten [198], VCAM (vascular cell adhesion molecule)-1 positive Stromazellen aus dem Knochenmark [199] und Osteoklasten, welche auch das BAFF-ähnliche APRIL exprimieren [200].

Da BAFF-knock-out Mäuse bzw. Mäuse, die mit einem BAFF-Antagonisten behandelt wurden, über keine muren B-Zellen in der Peripherie verfügen, lässt sich postulieren, dass basale BAFF-Niveaus für das Überleben bzw. die Entwicklung von muren B-Zellen in der Peripherie benötigt werden [167, 176, 201]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression

von BAFF als Antwort auf andere Zytokine reguliert wird [153]. Das Niveau an BAFF auf der Oberfläche von ruhenden Monozyten ist gering, es kann aber durch Behandlung mit Interferon (IFN)  $\alpha$ , IFN $\beta$ , LPS oder Interleukin (IL) 10, welches normalerweise inhibitorisch auf Monozyten wirkt, höher exprimiert werden [148, 153, 202]. Ebenfalls positiv reguliert wird die Menge an BAFF auf Makrophagen und dendritischen Zellen durch IFN $\gamma$  und IFN $\alpha$  (nur dendritische Zellen). Auch andere Mitglieder der TNF-Familie haben Einfluss auf die Expression von BAFF, so können Lymphotoxin  $\beta$  [203] oder der CD40-Ligand [202] die Expression von BAFF mRNA in Milzzellen und dendritischen Zellen von Mäusen stimulieren. Ob sich membrangebundenes und lösliches BAFF in ihrer Wirkungsweise unterscheiden, wurde noch nicht gezeigt. Allerdings konnte ein Unterschied in der Funktion von membrangebundenem und löslichem TNF und CD40-Ligand gezeigt werden [204].

Die drei BAFF-Rezeptoren werden auf muren B-Zellen exprimiert [205], wobei sich BCMA hauptsächlich auf Plasmazellen [206] und Plasmablasten [207] finden lässt. Auf frühen B-Zellentwicklungsstadien im Knochenmark lässt sich keiner der drei BAFF-Rezeptoren nachweisen. Intrazelluläres TACI lässt sich zudem in humanen Makrophagen zeigen [208], wo es nach Aktivierung an die Zelloberfläche transportiert wird. Der dritte und nur BAFF-bindende BAFF-Rezeptor schließlich wird auch von aktivierten T-Zellen exprimiert [191]. Auf B-Zellen ist er, wie TACI und BCMA, nur zu bestimmten Entwicklungsstadien präsent. Zu diesen zählen das Reifungsstadium T2 (s.Abb. 2.9) und die muren B-Zellen in der Marginalzone der Milz und im Knochenmark [209].

Wie bereits erwähnt, wird BAFF unter physiologischen Umständen bei Mensch und Maus nicht von B-Zellen exprimiert. Wendet man sich nun allerdings dem Huhn zu, so konnte hier mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass hauptsächlich die B-Zellen BAFF produzieren [13]. Dies steht somit in deutlichem Kontrast zur BAFF-Expression bei Mensch und Maus. Ob es sich bei diesem Phänomen um eine art-spezifische Besonderheit handelt oder ob B-Zellen bei allen Mitgliedern der GALT-Spezies BAFF exprimieren, konnte noch nicht gezeigt werden.

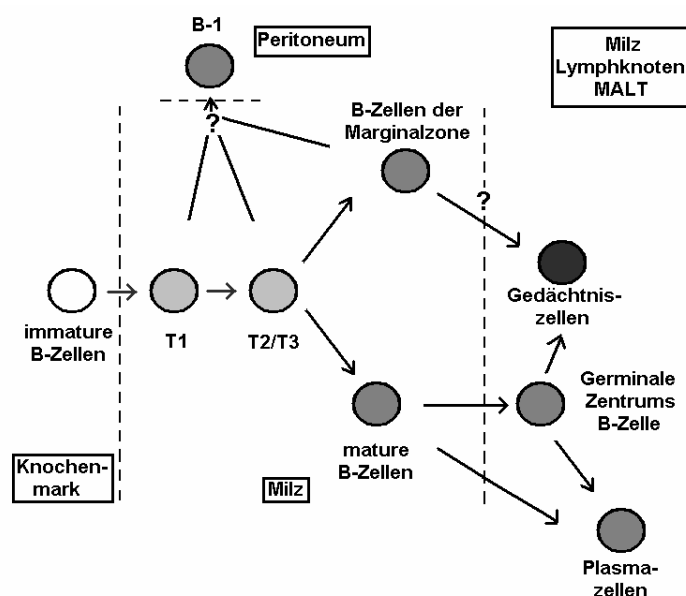
### 2.2.5 Physiologische BAFF-Wirkung

Bereits kurz nach seiner Erstbeschreibung 1999 konnte die Bedeutung von BAFF für die Entstehung und chronische Natur von Autoimmunkrankheiten gezeigt werden [178, 210, 211]. Besonders ein Ausbruch von systemischem Lupus erythematoses [212] und dem mit



der autoimmunen Zerstörung der Tränen- und Speicheldrüsen einhergehenden Sjögrens Syndrom [213] konnten mit erhöhten BAFF-Spiegeln im Serum in Zusammenhang gebracht werden. Einige Zeit später konnte auch die physiologische Bedeutung von BAFF gezeigt werden.

So konnte in *in vitro* Ansätzen dargelegt werden, dass BAFF das Überleben von reifenden ‚transitional type 2‘ (T2) (s. Abb. 2.9) B-Zellen aus der Milz verlängert und ihm somit eine Rolle als Überlebensfaktor bei der B-Zell-Reifung in der Milz zukommt [205].



**Abb. 2.9 Stadien der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus**

(nach Mackay et al. [205])

Die B-Zell-Lymphopoese findet beim Säuger ausschließlich im Knochenmark statt. Immature B-Zellen wandern aus dem Knochenmark über das Blut zur weiteren Reifung in die Milz. Hierbei bilden follikuläre (mature), Germinale Zentrums- und Plasmazellen die B2 Linie. Eine zweite im Peritoneum auftretende Linie wird mit B1 bezeichnet. Vermutlich stammen diese Zellen entweder von transitional (T1-3) oder Marginalzonen-B-Zellen der Milz ab. Zur Bildung germinaler Zentren mit Differenzierung der B-Zellen zu Gedächtnis- und Plasmazellen kann es in Milz, Lymphknoten und Mucosa assoziiertem lymphatischem Gewebe (*MALT*) kommen. Plasmazellen können sich anschließend im Körper verteilen und sind in Knochenmark, peripheren Geweben und der Milz zu finden.

Hierfür spricht zudem, dass Tiere mit BAFF-Mangel zwar über T1-B-Zellen, aber nicht über T2-B-Zellen verfügen [201]. Somit konnte gezeigt werden, dass unreife B-Zellen neben einem funktionierenden B-Zell-Rezeptor auch BAFF für ihre Reifung benötigen.

Ob B-Zellen der Marginalzone BAFF für ihre Differenzierung benötigen oder der Verlust dieser Zellpopulation bei Fehlen von BAFF mit dem Fehlen von T2-Zellen zusammenhängt, ist bislang ungeklärt. Die Beobachtungen sprechen jedoch dafür, dass T2-Zellen die Vorläufer für B-Zellen der Marginalzone sind [205]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die Zunahme von T2-Zellen unter BAFF Einwirkung nicht durch Proliferation der Zellen, sondern durch Verhinderung der Apoptose zustande kommt [214, 215].

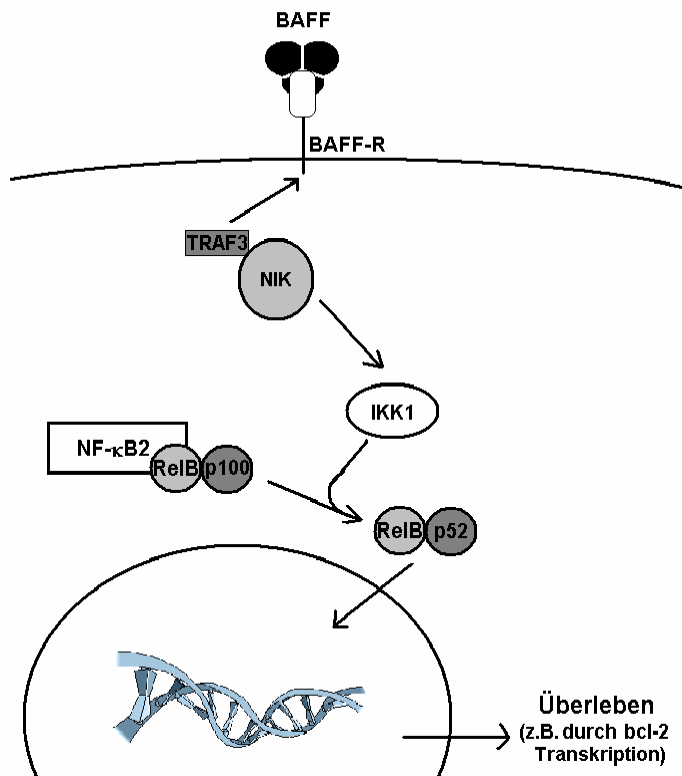
Weitere Hinweise auf die physiologische Wirkung von BAFF konnten auch mit Hilfe von BAFF-überexprimierenden Mausmodellen gewonnen werden [151, 211, 216]. Phänotypisch

zeichnen sich die BAFF-transgenen Mäuse durch erhöhte B-Zellzahlen in der Peripherie, vergrößerte peripher lymphatische Organe und Hypergammaglobulinämie aus. Letztere weist, wie bereits erwähnt, Zeichen von Autoimmunität (anti-DNA Antikörper) auf. Dass sich keine Änderungen im Knochenmark der BAFF-transgenen Mäuse nachweisen ließen, spricht wiederum dafür, dass BAFF seine Wirkung nur auf B-Zellen in der Peripherie ausübt.

Anders stellt sich die Situation beim Huhn dar, hier konnte gezeigt werden, dass chBAFF sowohl gereifte wie auch immature B-Zellen stimuliert und in hohem Maße im primären B-Zellorgan des Huhns, der Bursa fabricii, exprimiert wird [12-14]. Damit stellen sich die Vorgänge im primären B-Zellorgan des Huhns als auffällig und klar abgegrenzt zu denen im Knochenmark von Maus und Mensch dar. Besonders deutlich wird dies bei chBAFF-Neutralisationsversuchen. Mithilfe eines löslichen Konstrukts aus dem humanen BCMA Rezeptor war es möglich, chBAFF bereits ab Embryonaltag 15 *in ovo* zu neutralisieren. Aus dieser Neutralisation resultierte bereits ab Embryonaltag 18 eine deutliche Reduktion des Bursagewichtes und der B-Zellfollikelzahl in der Bursa [13].

## 2.2.6 BAFF-abhängige Signaltransduktion

Es konnte gezeigt werden, dass BAFF seine anti-apoptotische Wirkung auf B-Zellen in großem Maße über den sogenannten ‚alternativen NF- $\kappa$ B-Weg‘ ausübt [217, 218]. Aktivierend wirkt BAFF auf diesen Signalweg, indem es die Proteosom-vermittelte Degradierung der Serin/Threonin Kinase NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) verhindert. Diese Degradierung kann nur stattfinden, wenn NIK an TRAF3 (TNF receptor associated factor 3) gebunden vorliegt [219], ein Zustand, der durch die Bindung von TRAF3 an den aktivierten BAFF-Rezeptor und anschließenden Abbau von TRAF3 verhindert wird (s. Abb. 2.10). Für die inhibitorische Wirkung von TRAF3 spricht auch, dass TRAF3 knock-out Mäuse hohe Konzentrationen an NIK und NF- $\kappa$ B-Aktivierung aufweisen [220].



**Abb. 2.10 Der BAFF-Wirkmechanismus: Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den alternativen Weg**

Nach Bindung von BAFF an den BAFF-R kommt es zur Abspaltung von TRAF3 von der Kinase NIK. TRAF3 degradiert und die durch NIK aktivierte IKK1 führt zur Phosphorylierung von p100. Aus dem phosphorylierten p100 wird dann durch Ubiquitin p52 abgespalten, welches mit RelB dimerisiert. Dieses Dimer wandert in den Zellkern und führt dort u.a. zur Transkription von bcl-2.

(TRAF3 = TNF receptor associated factor 3; NIK = NF $\kappa$ B inducing kinase; IKK1 = I $\kappa$ B-Kinase 1; NF- $\kappa$ B = Nuklear Faktor-kappa B)

Nach ihrer Aktivierung bindet NIK an p100 und aktiviert dadurch IKK1, die I $\kappa$ B-Kinase 1 (auch IKKalpha), welche anschließend p100 phosphoryliert [221, 222]. Das phosphorylierte p100 wird dann von Ubiquitin zum aktiven p52 prozessiert [223]. Die Dimerisierung von aktiviertem p52 an RelB [218] führt zu einer Translokation in den Kern und anschließender Transkription von für die Apoptose bedeutenden Proteinen, den sogenannten bcl-2 Familienmitgliedern.

## 2.3 Die bcl-2 Familie

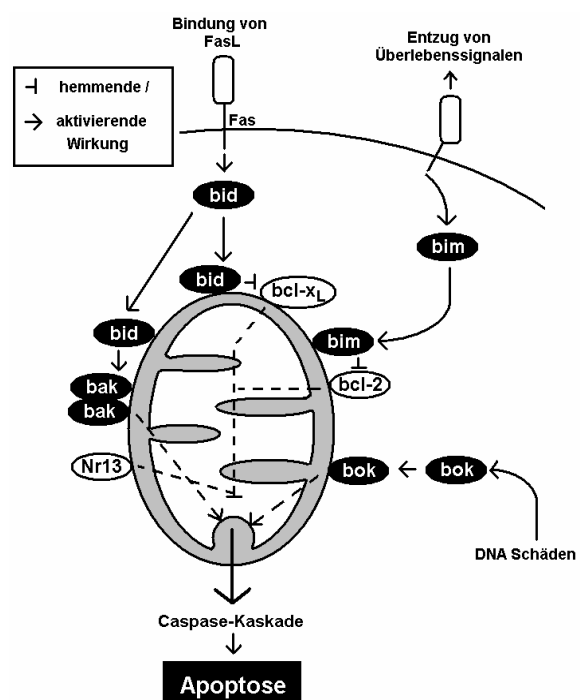
Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein für jedes mehrzellige Lebewesen essentieller Mechanismus. Nur durch ihn sind die genetische Regulation der Organentwicklung und das gezielte Abtöten von erkrankten Zellen durch das Immunsystem möglich. Gerade für das Immunsystem spielt die Apoptose eine große Rolle, da durch sie unter physiologischen Umständen das Überschießen der Immunantwort und die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindert werden.

Es gibt zwei Arten der Initiation der Apoptose, den extrinsischen und intrinsischen Weg, die beide am Ende die Effektorphase, auch Caspase-Kaskade, auslösen können. Der extrinsische Weg kann durch die Bindung des Fas-Liganden oder den Entzug von Überlebenssignalen, der intrinsische durch DNA-Schäden veranlasst werden. Beide Wege haben gemein, dass sie zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führen, welches schließlich die Caspase-Kaskade initiiert. Caspasen sind Cystein Proteasen, die im Zuge der Apoptose Proteine wie das zellstabilisierende Lamin abbauen. Betrachtet man nun die Rolle der Mitochondrien genauer, so fällt hier besonders die Bedeutung der bcl-2 Familienmitglieder auf. Mitglieder dieser Proteinfamilie beeinflussen positiv wie auch negativ die Mitochondrienmembran-Permeabilität und damit die Freisetzung von Cytochrom C (s. Abb. 2.11).

**Abb. 2.11 Schematische Darstellung der Rolle der Mitochondrien und ausgesuchter bcl-2 Familienmitglieder beim Auslösen der Apoptose**

Nach der Bindung von FasL/dem Entzug von Überlebenssignalen (extrinsisch) bzw. der Schädigung der DNA (intrinsischer Weg) kommt es zur Aktivierung der Caspase-Kaskade. Die dafür essentielle Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien wird durch die Interaktion von pro- (schwarz) und anti-apoptotischen (weiß) bcl-2 Familienmitgliedern (Ovale) miteinander und mit der Mitochondrienmembran (grau) reguliert.

(FasL = Fas-Ligand)



In dem Modelltier *Caenorhabditis elegans* konnten als Erstes Gene entdeckt werden, die für den Ablauf des programmierten Zelltodes essentiell sind. Ced-3 und ced-4 konnten als pro- [224], das Gen ced-9 als anti-apoptotisch wirkend charakterisiert werden [225]. Als erstes Homolog dieser Gene bei Mammaliern wurde 1988 bcl-2 beschrieben [226]. Es konnte gezeigt werden, dass bcl-2 transfizierte Zellen resistent gegenüber der durch Entzug von Wachstumsfaktoren, in diesem Falle IL-3, induzierten Apoptose sind. Nach 1988 konnten auch weitere dem bcl-2 in der Struktur ähnliche Proteine beschrieben werden.

### 2.3.1 Die Struktur der bcl-2 Familienmitglieder

Mitglieder der bcl-2 Familie verfügen über mindestens eine von vier dem bcl-2 homologe Regionen (bcl-2 homology domains/BH1-4). Basierend auf ihrer biologischen Funktion und homologen Sequenz lassen sie sich in drei Hauptkategorien einteilen: anti-apoptotische Proteine wie bcl-2, pro-apoptotische Proteine wie bak und bok und die sogenannten „BH3-only“ Proteine, welche dem bcl-2 nur in einer homologen Sequenz gleichen und zu denen bim und bid zählen (s. Abb. 2.12).

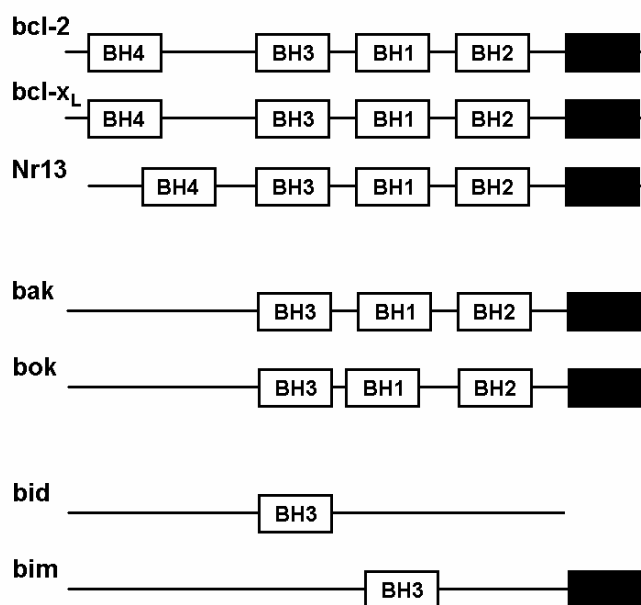


Abb. 2.12 Struktur ausgewählter Gene der bcl-2 Familie

Die Mitglieder der bcl-2 Familie lassen sich nach ihrer Wirkung in anti- (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>, Nr13) und pro-apoptotische unterteilen. Die pro-apoptotischen gliedern sich wiederum in zwei Gruppen, eine mit mehreren dem bcl-2 homologen Domänen (bak, bok) und eine mit nur der BH3-Domäne (bid, bim). Zudem verfügen alle (mit Ausnahme von bid) über eine transmembrane Domäne (schwarzer Kasten).

(BH1-4 = bcl-2 homology domain 1-4)

Trotz ihrer gegensätzlichen biologischen Wirkung und der großen Differenz in ihrer Aminosäuresequenz sind sich bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>, bak und bid strukturell sehr ähnlich [227]. Diese hohe strukturelle Homologie spielt auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion der bcl-2 Familienmitglieder, die ihre Wirkung meist als Homo- oder Heterodimere entfalten. Durch Heterodimerisierung anti- und pro-apoptotischer Proteine neutralisieren sich entgegengesetzt wirkende Proteine. Somit hängt das Zustandekommen der Apoptose vom Verhältnis der verschiedenen Proteine und ihrer Kombinationen ab [228-230]. Einen Hinweis auf diese Dimerisierung gibt die dreidimensionale Struktur von bcl-x<sub>L</sub> im Komplex mit dem Peptid aus der BH3-Domäne von bak [231]. Es konnte gezeigt werden, dass bcl-x<sub>L</sub> über eine hydrophobe Tasche auf seiner Oberfläche verfügt, welche von den Domänen BH1-3 gebildet wird und die BH3 Domäne von bak bindet. Da sich die BH3 Domäne bei einigen pro-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern im Innern des Proteins befindet, müssen diese zur Aktivierung erst dephosphoryliert bzw. proteolytisch durch Caspasen gespalten werden [232-234].

Neben ihrer Wirkung über Heterodimerisierung können die bcl-2 Familienmitglieder ihre Wirkung auch einzeln entfalten [235]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige Mitglieder der bcl-2 Familie, namentlich bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> und bid, Ionenkanäle in Lipiddoppelmembranen *in vitro* formen können [236-239].

### **2.3.2 Anti-apoptotische bcl-2 Familienmitglieder**

Aufgrund ihrer Wirkung, speziell der Verringerung der Permeabilität der Mitochondrienmembran, lässt sich eine Gruppe von anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern definieren. Da bei geringer Permeabilität Cytochrom C nicht aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma abgegeben wird, kann es nicht zur Apoptose kommen und die dies bewirkenden Proteine werden als anti-apoptotische Mitglieder der bcl-2 Familie zusammengefasst. Nachfolgend werden drei dieser Proteine genauer vorgestellt und in Bezug auf ihre Regulation in Zusammenhang mit BAFF und ihre Bedeutung beim Huhn charakterisiert.

#### **2.3.2.1 Bcl-2 (B-cell CLL/ lymphoma 2)**

Der Namensgeber der bcl-2 Familie wurde als Erstes bei der B-Zell Leukämie des Typs 2 beschrieben und daher fälschlicherweise als Onkogen klassifiziert [240]. Das bcl-2 Gen

kodiert ein unglykosyliertes Protein mit einer Größe von 26 kD [241, 242], welches in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist [243]. Die anti-apoptotische Wirkung von bcl-2 ließ sich bei bcl-2-Ig transgenen Mäusen zeigen, welche nicht nur über hyperplastische Lymphknoten verfügen, sondern deren B-Zellen *in vitro* auch eine höhere Überlebensrate aufweisen als Kontrollzellen [244]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hohe Niveaus an bcl-2 das Überleben myeloider Zellen auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren steigern [245].

Es konnte gezeigt werden, dass die antiapoptotische BAFF-Wirkung mit einer Steigerung der Menge an bcl-2 Protein einhergeht [246-248]. So weisen Kreuzungen zwischen transgenen Mäusen, die den decoy Rezeptor TACI-Ig exprimieren, was einem funktionalen BAFF-knock-out gleichkommt, und bcl-2 transgenen Mäusen eine physiologische Menge an peripheren B-Zellen auf [249]. Allerdings sind die B-Zellen dieser Mäuse unreif und nicht in der Lage, germinale Zentren zu bilden [250].

1992 wurde das bcl-2 Homolog des Huhns beschrieben [251, 252], ein ebenfalls 26 kD großes Protein, welches über zwei Regionen verfügt, die dem bcl-2 Protein von Mensch und Maus höchst homolog sind. Auffällig war, dass sich bcl-2 Transkript in großer Menge in der embryonalen Bursa, allerdings nur wenig in der adulten Bursa finden ließ. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch einen viralen Vektor überexprimiertes humanes bcl-2 die Rate an apoptotischen Zellen in der Bursa deutlich vermindert [64].

### **2.3.2.2 Bcl-x<sub>L</sub> (Apoptosis regulator bcl-x, long isoform)**

Dieses Mitglied der bcl-2 Familie stellt eine Splicevariante des bcl-x Gens dar und wurde 1993 das erste Mal beschrieben [253]. Die lange Variante des bcl-x Gens, bcl-x<sub>L</sub>, zeigt anti-apoptotische, wohingegen die kurze Variante, bcl-x<sub>S</sub>, pro-apoptotische Eigenschaften aufweist. Durch den alternativen Splicevorgang fehlen bcl-x<sub>S</sub> die bcl-2 homologen Domänen BH1 und BH2 [254]. Eine bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression verhindert die durch Immunsuppressoren verursachte Apoptose von B-Zellen [255] und es konnte gezeigt werden, dass bcl-x<sub>L</sub> eine große Bedeutung bei der Embryogenese zukommt, wohingegen bcl-2 hier eher eine untergeordnete Rolle spielt [256].

Auch ist eine gesteigerte Expression von bcl-x<sub>L</sub> in der Lage, die bei BAFF-Rezeptor knock-out Mäusen reduzierte B-Zellzahl zu erhöhen [257], und in BAFF-stimulierten Zellen ist die Menge an bcl-x<sub>L</sub> Protein erhöht [246].

Bcl-x<sub>L</sub> wurde beim Huhn im Zusammenhang mit der Spermatogenese beschrieben [258], und seine Expression konnte in mit dem Marek Virus infizierten Tumorzelllinien nachgewiesen werden [259]. Außerdem ließ sich in der bursalen B-Zelllinie DT40 zeigen, dass es im Zuge der durch Störung des mitochondrialen Proteins Thioredoxin 2 verursachten Apoptose zu einer Verminderung der Menge an bcl-x<sub>L</sub> Protein kommt [260].

### 2.3.2.3 Nr13

Das anti-apoptotische Nr13 Protein wurde in neuronalen und muskulären Geweben von Wachtelembryonen entdeckt [261]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu bcl-x<sub>L</sub> [262] bei der Entwicklung der Hühnerovarien keine entscheidende Rolle spielt [263]. Andererseits erwies sich Nr13 als das in der Entwicklung der Bursa am deutlichsten regulierte Gen. So finden sich anfänglich hohe Niveaus an Nr13 mRNA, welche allerdings nach dem Schlupf signifikant erniedrigt sind und somit mit den apoptotischen Vorgängen in der Bursa korrelieren [264]. Als direkter Interaktionspartner von Nr13 konnte *in vitro* das pro-apoptotische Protein bax beschrieben werden [265]. Für das Huhn wurde bax allerdings noch nicht charakterisiert.

Beim Mensch konnten mit dem Protein Boo/Diva, welches bei Überexpression pro-apoptotisch wirkt [266], und dem anti-apoptotischen NrH [267] zwei Nr13 höchst homologe Gene beschrieben werden. Eine Regulation von Nr13 in Zusammenhang mit einer veränderten Zytokinexposition konnte bisher nicht gezeigt werden.

### 2.3.3 Pro-apoptotische bcl-2 Familienmitglieder

Unter dieser Kategorie werden jene Mitglieder der bcl-2 Familie zusammengefasst, die durch eine Steigerung der Permeabilität der Mitochondrienmembran die Diffusion von Cytochrom C ins Zytoplasma ermöglichen und zudem über mehr als eine bcl-2 Homologie Domäne verfügen. Folgend sollen zwei Vertreter dieser Kategorie beschrieben und entsprechend den anti-apoptotischen Familienmitgliedern charakterisiert werden.



### 2.3.3.1 Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer)

Das Protein bak konnte durch die Suche nach konservierten bcl-2 Homologiemotiven in verschiedenen Geweben nachgewiesen [268, 269] und aufgrund seiner Wirkung als pro-apoptotisch charakterisiert werden [270]. Diese Wirkung entfaltet bak einerseits durch seine Bindung und konsekutive Inhibition von bcl-x<sub>L</sub> über eine konservierte Domäne (BH3), die es mit anderen pro-apoptotischen Proteinen gemein hat [271]. Andererseits konnte auch eine bcl-x<sub>L</sub>-unabhängige, destabilisierende Wirkung von bak auf die Mitochondrienmembran gezeigt werden [272].

Unter BAFF Stimulation exprimieren Milzzellen, die durch Immunisierung oder Stimulation mit CD40L aktiviert wurden, weniger bak als unstimulierte Zellen. Allerdings lässt sich dieser Effekt bei ruhenden B-Zellen nicht beobachten [246].

Durch Sequenzierung einer cDNA-Bank aus Hühner B-Lymphozyten konnte ein der bak Sequenz ähnlicher cDNA Klon gefunden werden [273]. Mit Hilfe dieser Sequenz konnte bisher gezeigt werden, dass Unterschiede in der Hühnerrasse auf die Höhe der Expression von bak keinen Einfluss haben [274].

### 2.3.3.2 Bok (BCL2-related ovarian killer)

Bok wurde zuerst in einer Rattenovar cDNA Bibliothek entdeckt [275] und aufgrund des Vorliegens von drei bcl-2 Homologiedomänen (BH1-3) der bcl-2 Familie zugeordnet. Ebenfalls um bok handelt es sich bei dem ein Jahr später beschriebenen Protein Matador (Mtd), welchem zu diesem Zeitpunkt noch eine BH4 Domäne zugeschrieben wurde [276]. Allerdings erwies sich dies als falsch, da bok pro-apoptotische Wirkung zeigt [277-279] und die BH4 Domäne nur bei anti-apoptotischen bcl-2 Proteinen zu finden ist.

Nach der Charakterisierung der Sequenz von bok beim Huhn [280] konnte gezeigt werden, dass die Menge an bok mRNA im Zuge der embryonalen Entwicklung und der vor der Geschlechtsreife einsetzenden Involution der Bursa stark ansteigt [281].

### 2.3.4 “BH3-only” bcl-2 Familienmitglieder

Neben ihrer pro-apoptotischen Wirkung charakterisiert die Mitglieder dieser bcl-2 Familien Untergruppe vor allem ihre Struktur. Phylogenetischer Vorläufer ist das Protein egl-1 aus dem Modelltier *Caenorhabditis elegans*, welches bereits das Charakteristikum, die BH3 Domäne, aufweist [282]. Wie der Name der Gruppe nahe legt, ist dies auch die einzige dem bcl-2 homologe Domäne. Nachstehend sollen zwei Mitglieder dieser Gruppe beschrieben werden.

#### 2.3.4.1 Bid (BH3 interacting domain death agonist)

Bei seiner Erstbeschreibung konnte nicht nur gezeigt werden, dass bid über eine BH3-Domäne verfügt, sondern auch, dass ihm die transmembrane Domäne fehlt, die andere bcl-2 Familienmitglieder in der Mitochondrienmembran verankert [283]. Eine weitere Besonderheit ist, dass bid erst durch die Caspase 8 gespalten werden muss, um seine pro-apoptotische Wirkung zu entfalten [233, 284]. Das gespaltene bid (tBid) diffundiert zur Mitochondrienmembran, hemmt hier die anti-apoptotische Wirkung von bcl-x<sub>L</sub> [285] und führt zur Dimerisierung und folgenden Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins bak [286].

Die Sequenz des bid Homologs beim Huhn liegt seit 2006 vor [287], allerdings wurden außer einer Untersuchung zur bid Expression in der Embryonalentwicklung des Hühnerherzens [288] noch keine weiteren Erkenntnisse über dieses Protein beim Huhn gewonnen.

#### 2.3.4.2 Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death)

Bim wurde ebenfalls anhand seiner BH3 Domäne charakterisiert [289]. Kurz nach seiner Entdeckung konnte bereits gezeigt werden, dass ihm eine zentrale Rolle in der Leukozyten Homöostase zukommt [290]. So konnte dargestellt werden, dass bim knock-out Mäuse nicht in der Lage sind, sich autoreaktiver B-Zellen, die im Zuge der physiologischen B-Zellentwicklung entstehen, durch Apoptose zu entledigen [291]. Bim kommt somit eine zentrale Rolle bei der Elimination autoreaktiver B-Zellen und der Verhinderung von Autoimmunität zu [292].

Da die Bedeutung erhöhter BAFF Spiegel für das Entstehen einer Autoimmunität bereits bekannt war [293], erwies es sich von Interesse, die BAFF-bedingte bim Regulation zu

betrachten [294]. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen BAFF-Stimulation und verringerter Menge an bim Protein nachgewiesen werden [295]. So konnte gezeigt werden, dass BAFF-stimulierte B-Lymphozyten auf apoptotische Stimuli hin geringere Mengen an bim exprimieren als ihre unstimulierten Äquivalente. Dies führt zum erhöhten Überleben der B-Zellen unter BAFF-Stimulation.

Beim Huhn wurde bim noch nicht beschrieben.

### 3 Zielsetzung

Für Mensch und Maus konnte gezeigt werden, dass die Überlebenssteigernde Wirkung des Zytokins BAFF auf B-Lymphozyten auf ein Verhindern der Apoptose dieser Zellen zurückgeführt werden kann. Eine zentrale Rolle im apoptotischen Geschehen kommt dabei den Mitgliedern der bcl-2 Familie zu. Über diese Proteinfamilie ist beim Huhn nur wenig bekannt. Die genauen Mechanismen hinter der auch bei dieser Spezies bereits beschriebenen Wirkung des Zytokins BAFF auf B-Zellen sind ebenfalls bisher unerklärt. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass auch bei dieser Spezies die BAFF Wirkung über eine Beeinflussung der bcl-2 Familie vermittelt wird. Ziel dieser Arbeit war es daher, qualitative und quantitative Nachweismethoden für die bcl-2 Familienmitglieder beim Huhn zu schaffen und mit deren Hilfe die molekularen Vorgänge des BAFF-induzierten Überlebens von B-Zellen *in vitro* wie auch *in vivo* zu analysieren. Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag dabei auf Änderungen in der Expression der Gene der bcl-2 Familie.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tiere und Haltung

#### Hühner

Die primären Lymphozyten wurden aus Blut und Organen von Hühnern der Linien M11 (B<sup>2/2</sup>-Haplotyp) und LSL (Lohmann's selected Leghorn) gewonnen.

Bezugsquelle waren das Institut für Tierzucht in Mariensee für Eier der M11 Linie und die Firma Lohmann Tierzucht GmbH für die LSL-Eier. Die Eier wurden am Institut jeweils unter Standardbedingungen ausgebrütet und die Tiere anschließend in Gruppen in Volieren gehalten. Als Futter wurde handelsübliches Alleinfutter verwendet; Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Die *in vivo* Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Tierversuchs-Nummer 209.1/211-2531-46/03 genehmigt.

### 4.2 Gewinnung von primären Hühnerlymphozyten und embryonalen Organen

#### 4.2.1 Material

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle genannten Reagenzien bei 4°C gelagert.

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

|       |   |
|-------|---|
| 8,00g | Natriumchlorid (NaCl) <sup>1*</sup>   |
| 1,45g | Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup> |
| 0,2g  | Kaliumchlorid (KCl) <sup>1</sup>  |
| 0,2g  | Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>1</sup>                                  |

ad 1000ml Aqua dest.

---

\* Hochzahlen beziehen sich auf die Bezugsquellen, die im Anhang aufgeführt sind.

Nach Anmischen wurde der Puffer jeweils mit HCl<sup>1</sup> oder NaOH<sup>1</sup> unter Verwendung eines pH-Meters, das zuvor durch Maßlösungen<sup>1</sup> geeicht wurde (pH4 und pH7), auf pH 7,2 eingestellt und anschließend autoklaviert.

### Ficoll-Paque<sup>2</sup>

### Heparinlösung (500 U/ml)

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| 1ml     | Heparin-Natrium 20.000IU <sup>3</sup> |
| ad 40ml | RPMI 1640 with Glutamax <sup>4</sup>  |

### Trypanblau-Lösung<sup>2</sup>

## 4.2.2 Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)

Abhängig von der benötigten Menge wurden eine oder mehrere 10ml Spritzen mit 0,2ml Heparinlösung beschichtet (verwendete Kanülen: 0,70x32mm). Die Blutentnahme erfolgte anschließend aus der linken Vena jugularis. Das gewonnene Vollblut wurde daraufhin in ein 15ml Röhrchen überführt und bei 60xg für 20 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Slow-Speed-Zentrifugation). Danach wurden die nun den Erythrozyten im sogenannten ‚Buffy coat‘ aufliegenden Lymphozyten vorsichtig durch Rühren mit einer Pasteurpipette im Plasma aufsuspendiert, vorsichtig in ein weiteres Röhrchen überführt und zweimal mit PBS durch Zentrifugation bei 4°C und 225xg für jeweils 10 min gewaschen (s. Abb. 4.1).

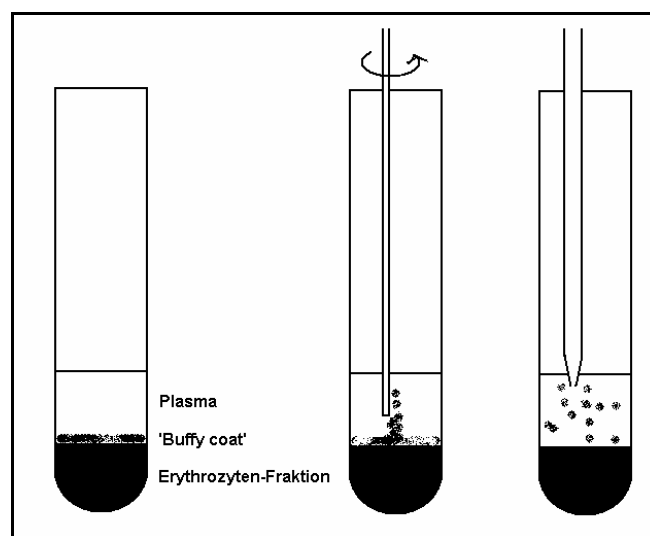


Abb. 4.1 Gewinnung der Blutlymphozyten mittels Slow Speed Verfahren

Die qualitative und quantitative Beurteilung erfolgt anschließend durch eine Lebend/Tot-Färbung mittels Trypanblaulösung (20µl Trypanblaulsg. ad 20µl Zellsuspension) unter Verwendung einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer.

### **4.2.3 Gewinnung von Lymphozyten aus Organen**

Die für die Organentnahme vorgesehenen Hühner wurden betäubt und durch Blutentzug getötet. Anschließend wurde das Abdomen mit Alkohol benetzt, die Haut abgezogen und die Leibeshöhle durch Umklappen des Sternums nach kranial eröffnet. Die Organentnahme erfolgte nun mit sterilen Instrumenten; die Organe wurden sofort danach in Falcons mit sterilem PBS überführt und auf Eis gestellt.

Die jeweiligen Organe (Bursa und Milz) wurden anschließend mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein in PBS stehendes Sieb (Maschenweite 0,75x0,75mm) gepresst und die erhaltene Organsuspension in einem 50 ml Röhrchen 10min auf Eis gestellt, um die größeren Gewebestücke über Sedimentation entfernen zu können.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Suspension bis auf 5 ml abgenommen und bei 4°C und 225xg für 10 min zentrifugiert. Im Folgenden wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml RPMI resuspendiert und auf 10 ml Ficoll-Paque geschichtet. Nach erneuter Zentrifugation bei RT und 600xg für 12 min (Dichtezentrifugation) wurde die dem Ficoll nun aufliegende Lymphozytenfraktion vorsichtig abgenommen und in PBS erneut per Zentrifugation gewaschen.

### **4.2.4 Gewinnung embryonaler Organe**

Zur Organentnahme bestimmte Embryonen wurden zu definierten Zeitpunkten (ET10, 14 und 18) durch Aufschlagen der Kalkschale aus ihren Eiern in Petrischalen überführt und durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung der Leibeshöhle mittels Scherenschnitt in der Medianen und Erweiterung des Zugangs durch einen halbmondförmigen Schnitt auf die Beckensymphyse zu konnten embryonale Bursa und Milz unter der Stereolupe stumpf von dem sie umgebenden Bindegewebe befreit und mit Hilfe einer sterilen Pinzette in ein Gefriergefäß überführt und sofort in flüssigen Stickstoff verbracht werden. Mit dem embryonalen Herzen wurde nach Eröffnung des Brustkorbs durch Verlagerung des Sternums nach kranial

und Durchtrennung der Gefäße an der Herzbasis gleichsam verfahren. Die Lagerung der embryonalen Organe erfolgte bis zur weiteren Prozessierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 4.3 Kultivierung von Zellen

### 4.3.1 Medien und Zusätze

#### Standardmedium

445 ml RPMI 1640 with Glutamax  
50 ml fetales Kälberserum<sup>3</sup> (fetal bovine serum/FBS)  
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>3</sup> (Penicillin 100IU/ml und Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in RPMI)

Lagerung: FBS und die Penicillin/Streptomycin-Lösung wurden jeweils in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### DT40 - Medium

445 ml RPMI 1640 with Glutamax  
40 ml fetales Kälberserum (fetal bovine serum/FBS)  
10 ml Hühnerserum<sup>3</sup>  
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin 100IU/ml und Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in RPMI)

Lagerung: FBS und die Penicillin/Streptomycin-Lösung wurden jeweils in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### B-Zell-Medium

460ml IMDM<sup>3</sup>  
25ml FBS  
10ml Hühnerserum  
5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin 100U/ml und Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in RPMI)  
50 $\mu\text{l}$  Selen/Insulin/Transferrin-Lösung<sup>5</sup>  
50 $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)<sup>9</sup> 20mM



**PBS-EDTA**

200mg EDTA<sup>7</sup> (Ethylendiamintetraacetic Acid Tetra Natrium Hydrat)  
ad 1000ml PBS (s. 1.2.1.)

**G418-Stammlösung 50mg/ml**

250 mg G418<sup>7</sup>  
ad 5 ml PBS

**Einfriermedium**

45ml FBS  
5ml DMSO<sup>1</sup> (Dimethylsulfoxid)

Lagerung: Das Einfriermedium wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

**Staurosporin-Stammlösung (100mmol/ml)**

100µg Staurosporin<sup>8</sup>  
ad 214 µl DMSO

**PMA (Phorbol-Myristat-Azetat)-Stammlösung 10µg/ml**

100µg PMA (Phorbol-Myristat-Azetat)<sup>5</sup>  
ad 10ml DMSO

Lagerung: Das PMA wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

## 4.3.2 Kultivierung von Zellen

### 4.3.2.1 Zelllinien

Verwendung für *in vitro* Fragestellungen fand die aus bursalen B-Lymphozyten mittels aviärem Leukose-Virus transformierte Zelllinie DT40, welche in DT40-Medium bei 40°C kultiviert wurde.

Zur Erzeugung von flagChBAFF wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 mit einem flagChBAFF-Plasmid mittels Elektroporation transient transfiziert, in Standardmedium bei 37°C kultiviert und die Zellkulturüberstände gewonnen. Aufgrund des adhärenen Wachstums dieser Zelllinie wurde zur Teilung das Medium vollständig abgenommen und der Zell-Monolayer zur Entfernung von FBS-Resten einmal kurz mit 37°C warmem PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit PBS-EDTA (37°C) bedeckt und ca. 10 min lang bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen und in der gewünschten Dichte erneut in Standardmedium aufgenommen.

#### **4.3.2.1.1 Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in einer Dichte von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 1 bis 1,8 ml in entsprechende Gefrier Röhrchen überführt und über Nacht in einer Isopropanol haltigen Einfrierbox (Abkühlung 1°C/min) bei -80°C eingefroren. Zur Lagerung bis zu einem Jahr verblieben die Zellen bei -80°C, für eine längere Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **4.3.2.1.2 Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen der Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension möglichst rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dann wurden 50 ml kaltes PBS zugegeben, die ersten 10 ml tropfenweise, um das zellschädigende DMSO langsam auszuverdünnen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (225xg, 10 min, 4°C) und nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in ca. 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben.

#### **4.3.2.2 Primäre Zellen**

Die primären Zellen wurden nach ihrer Präparation auf die gewünschte Zellzahl eingestellt, im jeweiligen Medium aufgenommen und ebenfalls bei 40°C kultiviert. Nach ihrer Entnahme zu definierten Zeitpunkten wurde unter Verwendung eines Teils der Zellen die Zahl lebender

B-Lymphozyten mittels fluoreszenzassoziierter Zellsortierung (s. 4.12) bestimmt und der andere Teil bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

#### 4.3.2.2.1 Stimulation der Zellen

Für die Kultivierung wurden die Zellen in Standardmedium verbracht und bei einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in je 1 ml pro Delle in einer 24-Loch-Platte unter Zusatz von 5% flagChBAFF enthaltendem 293-Zellkulturüberstand inkubiert.

Als Kontrollen der flagChBAFF-Wirkung fanden sowohl Zellen ohne Stimulation, mit Staurosporin (1mM/ml) zur Apoptose-Induktion bzw. PMA (20 ng/ml) zur Induktion der Proliferation inkubierte Lymphozyten, wie auch Zellen, die unter CD40L Stimulation (0,5 µg/ml) standen, Verwendung.

## 4.4 RNA-Präparation

Alle Arbeiten wurden mit RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Wiederverwendbare Geräte und Gegenstände wurden nach Benutzung für mindestens eine Stunde mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gespült oder nach Eintauchen in 96% Ethanol abgeflammt.

### 4.4.1 Material

Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Lagerung der Reagenzien bei RT.

**Trizol® Reagenz**<sup>7</sup>

Lagerung: 4°C

**Chloroform ad analysis**<sup>8</sup>

**Isopropanol**<sup>8</sup>

**70% Ethanol**

70 ml Ethanol absolut<sup>8</sup>

30 ml Wasser für die Molekularbiologie<sup>1</sup>

#### 4.4.2 Durchführung

Zur RNA-Isolierung aus primären Zellen wurden die jeweiligen Organe (bzw. je nach Größe nur Teile davon) nach Entnahme sofort oder nach Verbringung und Lagerung in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem Homogenisator unter Zugabe von 1 ml Trizol homogenisiert und in 2 ml Eppendorfcups überführt.

Bei Zelllinien wurden  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen gewonnen, zentrifugiert (10 min,  $225 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und das trockene Zellpellet in 1 ml Trizol resuspendiert.

Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt, kurz geschüttelt, 2 min bei RT inkubiert und 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $12.000 \times g$  zentrifugiert, wodurch die organische von der RNA-haltigen wässrigen Phase getrennt wurde. Die wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Probengefäß transferiert und mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt, nach kurzem Schütteln, zunächst 10 min bei RT und anschließend 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Hierdurch kommt es zur Ausfällung der RNA. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $12.000 \times g$ ) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit  $7500 \times g$  zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 100  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser aufgenommen und nach erfolgter Qualitätskontrolle bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.4.3 Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer™

Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde die gewonnene RNA auf ihre Qualität und daraus resultierende Verwendbarkeit für die konventionelle und quantitative PCR hin analysiert. Zur Anwendung kam hierbei das Bioanalyzer System von Agilent, als Ausschlusskriterium für die Verwendung der RNA in der qPCR wurde eine RIN (*RNA integrity number*) von 7 festgelegt. Die zu analysierenden RNA-Proben wurden nach Angaben des Herstellers aufgetragen und mittels ‚Agilent 2100 Expert‘ Software entsprechend ausgewertet.

#### 4.4.4 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch über die Absorption bei 260 nm. Die zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm ermöglichte die Bestimmung

des Quotienten 260/280, welcher zusätzlich zur erfolgten Qualitätskontrolle Aufschluss über die Reinheit der Probe zu geben vermochte.

## 4.5 cDNA Synthese

Die in der Gesamt-RNA enthaltene messenger-RNA (*mRNA*) wurde durch eine rekombinante aviäre reverse Transkriptase in komplementäre DNA (*cDNA*) umgeschrieben, die dann als Matrize sowohl in der konventionellen als auch in der quantitativen Polymerase Kettenreaktion diente.

Für die konventionelle Polymerase Kettenreaktion wurde das **RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit**<sup>9</sup> verwendet, wohingegen zur Gewinnung von Matrizen für die quantitative Polymerase Kettenreaktion nach erfolgtem DNase Verdau (**DNase1**<sup>10</sup>) das **SuperscriptIII**<sup>7</sup> System Einsatz fand. Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Hersteller.

## 4.6 Erstellung von Primern

### 4.6.1 Primer für die konventionelle Polymerase Kettenreaktion

Die verwendeten PCR-Primer wurden mit der **Primer Express 2.0** Software von Applied Biosystems erstellt. Dabei wurde auf einen Anteil an G/C-Nukleotiden von ca. 50%, die gleiche Annealing Temperatur zwischen Primer-Paaren und die Lage (möglichst ‚intron spanning‘) geachtet. Als ‚intron spanning‘ Primer bezeichnet man solche, die nur auf bereits gesplinter cDNA binden können, da sie zum Ende des einen und zu Beginn des anderen Exons liegen. Somit können sie keine genomische DNA amplifizieren.

### 4.6.2 Primer für die quantitative Polymerase Kettenreaktion

Auch für die qPCR-Primer fand die Primer Express Software von Applied Biosystems Verwendung. Allerdings wurde hier besonders auf die Größe des Amplikons (maximal 150

bp) und eine einheitliche Annealing Temperatur (59°C) aller Primer-Paare geachtet. Spezifität der Primerpaare wurde mittels Sequenzierung bestätigt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand einer linearen Standardkurve gewährleistet.

## 4.7 Konventionelle Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird durch eine hitzeresistente DNA Polymerase mit Hilfe von spezifischen Primern eine bestimmte cDNA Sequenz amplifiziert. Dabei wird das PCR-Reaktionsgemisch mit Hilfe eines Thermocyclers für 5 sec auf 96°C erhitzt, um die cDNA zu denaturieren und anschließend 30 sec bei der Primer-spezifischen Temperatur inkubiert, damit die Primer an der passenden Sequenz der cDNA binden können. Dann folgt eine 2-minütige Inkubation mit einer Polymerase-spezifischen Temperatur (72°C), bei der der komplementäre DNA-Strang synthetisiert wird.

Diese drei Schritte werden 35-mal wiederholt. Am Ende wird die Reaktion noch einmal 10 min bei der Polymerase-spezifischen Temperatur inkubiert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

### 4.7.1 Material

Alle Reagenzien wurden bei -20°C aufbewahrt.

**HotFirePol-DNA Polymerase<sup>11</sup>**

**10x Polymerase Puffer B<sup>11</sup>**

**Solution S<sup>11</sup>**

**dNTP 2mM<sup>9</sup>**

**MgCl<sub>2</sub> Lösung 25mM<sup>11</sup>**

**Wasser für die Molekularbiologie**

**Primer 1 pmol/µl**

## 4.7.2 Durchführung

Ansatz für eine PCR-Reaktion:

1,3 µl Wasser

1,2 µl MgCl<sub>2</sub>

1,5 µl 10 x Puffer B

1,5 µl dNTP

1,5 µl Solution S

3,0 µl Primer sense (fw), Endkonzentration: 20 mM

3,0 µl Primer antisense (rv), Endkonzentration: 20 mM

0,2 µl DNA Polymerase (Endkonzentration 1U)

Aus diesen Reagenzien wurde ein Mastermix angesetzt, welcher auf die einzelnen Ansätze verteilt wurde, und anschließend 3 µl der gewünschten cDNA oder 3 µl Wasser als Negativkontrolle dazu pipettiert.

Die verschiedenen Ansätze wurden im Thermocycler auf die oben beschriebenen Temperaturen automatisch aufgeheizt bzw. abgekühlt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

## 4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann die Größe von DNA-Stücken bestimmt werden, wie sie z.B. bei der PCR entstehen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung werden die Stücke der Länge nach im Gel aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenzgröße dient ein ebenso aufgetragener und gefärbter Marker.

## 4.8.1 Material

### EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)

186,1 g Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)-Dinatrium-Dihydrat  
(C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O)  
20 g Natriumhydroxid (NaOH)<sup>1</sup>  
ad 700 ml Aqua dest., pH 8,0 mit NaOH einstellen, bei RT lagern

### 0,5xTBE Puffer

54 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>  
27,5 g Borsäure<sup>8</sup>  
20 ml EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)

ad 1 l Aqua dest., bei RT lagern

### 1% Agarose

0,5 g Agarose<sup>12</sup>  
50 ml 0,5xTBE Puffer

vor Gebrauch ansetzen

### 6x Loading Dye Solution (Ladepuffer)<sup>9</sup>

### GeneRuler™50bp DNA Ladder plus<sup>9</sup>

### Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid<sup>5</sup>

ad 1 ml Aqua dest., bei 4°C lagern  
vor Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 in Aqua dest. verdünnt

## 4.8.2 Durchführung

Die 1 %-ige Agarose wurde in einem Mikrowellenherd so lange erhitzt, bis sie vollkommen geschmolzen und die Lösung klar war. Anschließend wurde sie auf ca. 50°C abgekühlt und in eine Elektrophoresekammer mit Probenaschenkamm gegossen. Nachdem das Gel vollständig abgekühlt war, konnte der Probenkamm entfernt und das Gel mit 0,5xTBE-Puffer überschichtet werden. Die Proben wurden nun mit dem Ladepuffer vermischt (5 µl PCR-Produkt + 1 µl 6x Loading Dye) und in die Probenaschen pipettiert. Als Referenz wurde eine Probenasche mit Marker befüllt. Danach wurde so lange eine konstante Spannung von 120 V an der Kammer angelegt, bis die Proben ausreichend weit im Gel aufgetrennt wurden. Die



beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-Cyanol-FF im Ladepuffer und im Marker wurden dabei als Orientierung verwendet. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel 30 min lang in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung geschwenkt und anschließend unter UV-Licht photographiert.

## 4.9 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion (*qPCR*, auch *Real Time RT-PCR*) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name "Real Time"). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig, die Daten sind sofort verfügbar.

Als Fluoreszenzfarbstoff fand der interkalierende DNA-Farbstoff **SYBR Green** Verwendung, dessen Fluoreszenzspektrum sich durch Einlagerung in doppelsträngige Nukleinsäuren verändert (s. Abb. 4.2). Allerdings muß bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen, um unspezifische Signale auszuschließen, eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, anhand derer die Fragmentlänge(n) und dadurch die Spezifität abgeschätzt werden kann.

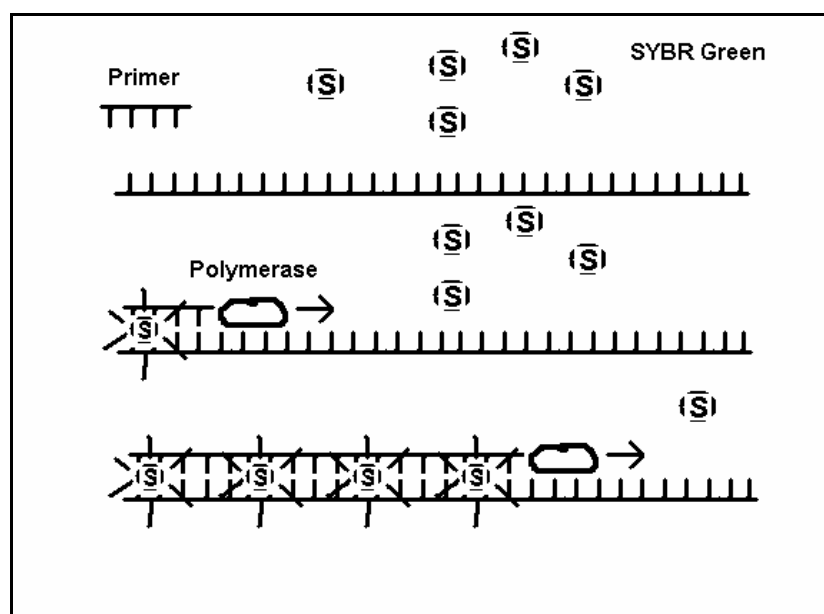


Abb. 4.2 Wirkung eines interkalierenden Farbstoffs am Beispiel von SYBR Green

Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird ( $57^{\circ}\text{C} \rightarrow 95^{\circ}\text{C}$ ). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert wird. Die Schmelztemperatur eines Fragmentes kann einfach visualisiert werden, indem die erste negative Ableitung dieser Schmelzkurve ( $-dF/dT$ ) berechnet wird. In einem Graph dargestellt, resultiert der Wendepunkt der Schmelzkurve dann in einem Peak, dessen Maximum dem der  $T_m$  entspricht. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich (s. Abb. 4.3).

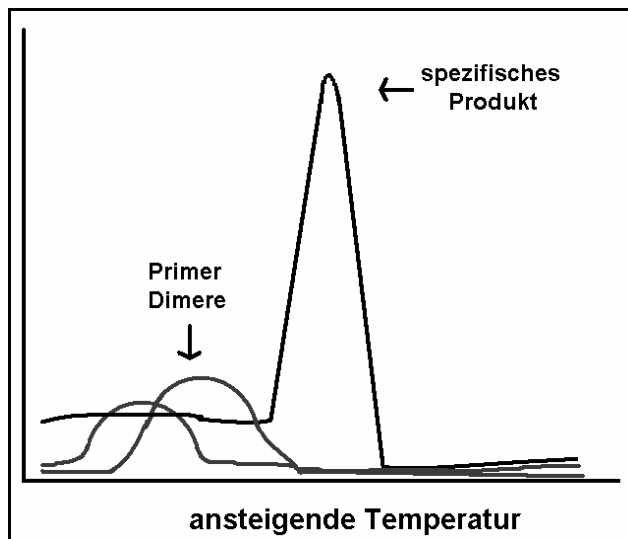


Abb. 4.3 Stilisierte qPCR-Schmelzkurve zur Darstellung der Unterscheidbarkeit von spezifischem Produkt und Primer Dimeren

#### 4.9.1 Material

**SYBR Green<sup>13</sup>**

**Wasser für die Molekularbiologie**

**qPCR Primer (5pmol/ $\mu\text{l}$ )**

## 4.9.2 Durchführung

Ansatz einer qPCR-Reaktion:

12,5 µl SYBR Green

8,5 µl Wasser

1,5 µl Primer forward (fw), Endkonzentration: 30 mM

1,5 µl Primer reverse (rv), Endkonzentration: 30 mM

Aus diesen Reagenzien wurde ein Mastermix angesetzt und anschließend 1 µl der gewünschten cDNA (Template) oder 1 µl Wasser als Negativkontrolle dazu pipettiert.

Die verschiedenen Ansätze wurden im qPCR-Cycler nach folgendem Protokoll erhitzt:

|                                   |     |      |       |
|-----------------------------------|-----|------|-------|
| <b>Initiationserhitzungsphase</b> | 1x  | 95°C | 10min |
| <b>Amplifikationsphase</b>        | 40x | 95°C | 15sec |
|                                   |     | 59°C | 1min  |
| <b>Dissoziationsphase</b>         | 1x  | 95°C | 15sec |
|                                   |     | 57°C | 30sec |
|                                   |     | 95°C | 15sec |

## 4.9.3 Auswertung

In der ersten Phase der Amplifikation einer qPCR ist die Amplifikatmenge derart begrenzt, dass ihre Fluoreszenz kaum detektierbar ist, während in der dritten Phase der Amplifikation die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) so stark ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt, häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und die Substrate langsam verbraucht werden. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen, in welcher sich die Templatmenge bei jedem Zyklus verdoppelt. Um eine Vergleichbarkeit verschiedener Proben zu schaffen, wird der CT-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, welcher im Bereich der exponentiellen Phase ermittelt wird (s. Abb. 4.4).

Zu beachten ist, dass ein hoher Ct-Wert für eine geringe Menge an Template spricht, welche erst spät ein Erreichen des Schwellenwertes ermöglicht.

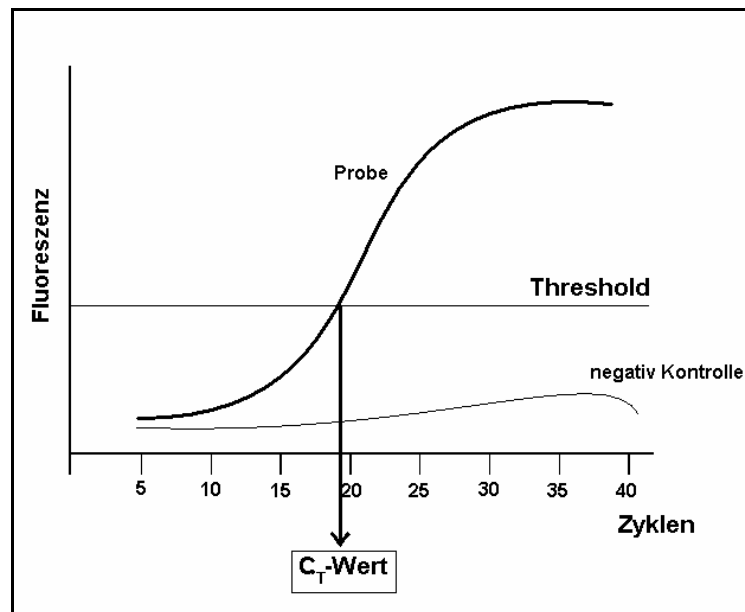


Abb. 4.4

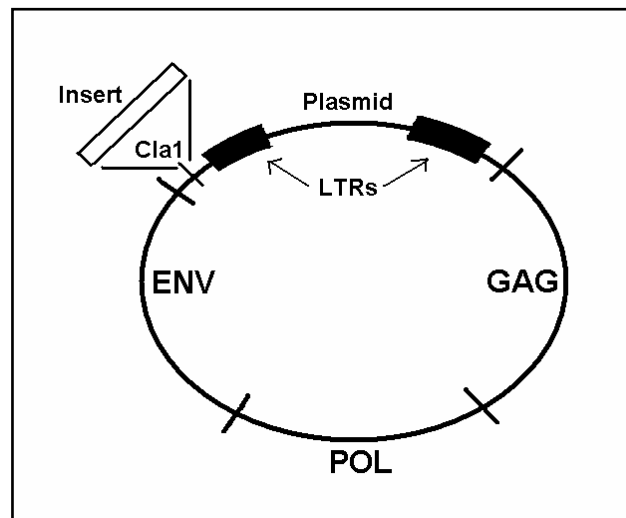
Bedeutung des CT-Wertes

## 4.10 RCAS Vektor-System

Die RCAS Vektoren sind eine Gruppe von retroviralen Vektoren, welche aus dem SR-A Stamm des Rous-Sarkom-Virus (RSV), einem Mitglied der Gruppe der aviären Sarkom-Leukose-Viren (ASLV), entwickelt wurden. Die Bezeichnung RCAS steht für "Replication-Competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor". Diese Vektoren können verwendet werden, um Hühnerembryofibroblasten (CEFs) zu transfizieren und, unter Ausnutzung der Replikationskompetenz des Vektors, nach Injektion dieser CEFs in den Dottersack von befruchteten Hühnereiern auch die Zellen des Hühnerembryos mit zu infizieren. Somit ist es mit Hilfe der RCAS Vektoren möglich, bereits zu frühen Embryonalstadien ein Protein im Hühnerembryo zu exprimieren.

### 4.10.1 Klonierung von chBAFF/huBCMA in das RCAS Plasmid

Im RCAS Plasmid liegt die virale Information in Form eines Provirus arrangiert vor. Die bakterielle Plasmid-Sequenz befindet sich zwischen zwei long terminal repeats (LTRs) und beinhaltet eine Ampicillin-Resistenz-Sequenz (s. Abb. 4.5).



**Abb. 4.5** Aufbau des RCAS Plasmid

Die für die Vermehrung eines Retrovirus notwendigen viralen Gene sind gag, pol und env. Gag trägt die Sequenz für das Protein der Viruskapsel, pol für das Enzym reverse Transkriptase und env für ein Glykoprotein, das in die das Virus umgebende Membranhülle eingebaut wird.

Sequenzen für das Zytokin- (flagChBAFF) und das Decoy-Rezeptorkonstrukt (huBCMA-Fc) wurden enzymatisch aus den ursprünglichen Plasmiden herausgeschnitten und in das Adaptorplasmid Cla12 ligiert. Dadurch erhielten die Konstrukte die für die Insertion in RCAS notwendigen Schnittstellen für das Enzym *ClaI* und konnten in die spezifische *ClaI* Restriktionsstelle von RCAS ligiert werden. Hierfür wurde von den verschiedenen zur Verfügung stehenden RCAS-Vektoren RCAS-BP(A) gewählt, da die integrierte Brian-Polymerase (BP) eine hohe Replikationsrate gewährleistet und Subtyp A die geringsten zytotoxischen Eigenschaften aufweist.

Die Überprüfung der erfolgreichen Ligation und anschließenden Transformation kompetenter Bakterienstämme erfolgte mittels PCR und Restriktionsenzymverdau. Die Konstrukte wurden sequenziert und die für anschließende Experimente benötigte Orientierung der Konstrukte sichergestellt. Verwendung fand der RCAS Vektor mit inseriertem flagChBAFF Konstrukt in *forward* wie auch in *reverse* Orientierung. Das *reverse*-orientierte Konstrukt diente zum Ausschluss einer möglichen Beeinflussung der Ergebnisse durch den Vektor selbst.

Außerdem wurde der RCAS Vektor mit inseriertem huBCMA-Fc zur Induzierung eines BAFF-Mangels verwendet (s. Abb. 4.6).

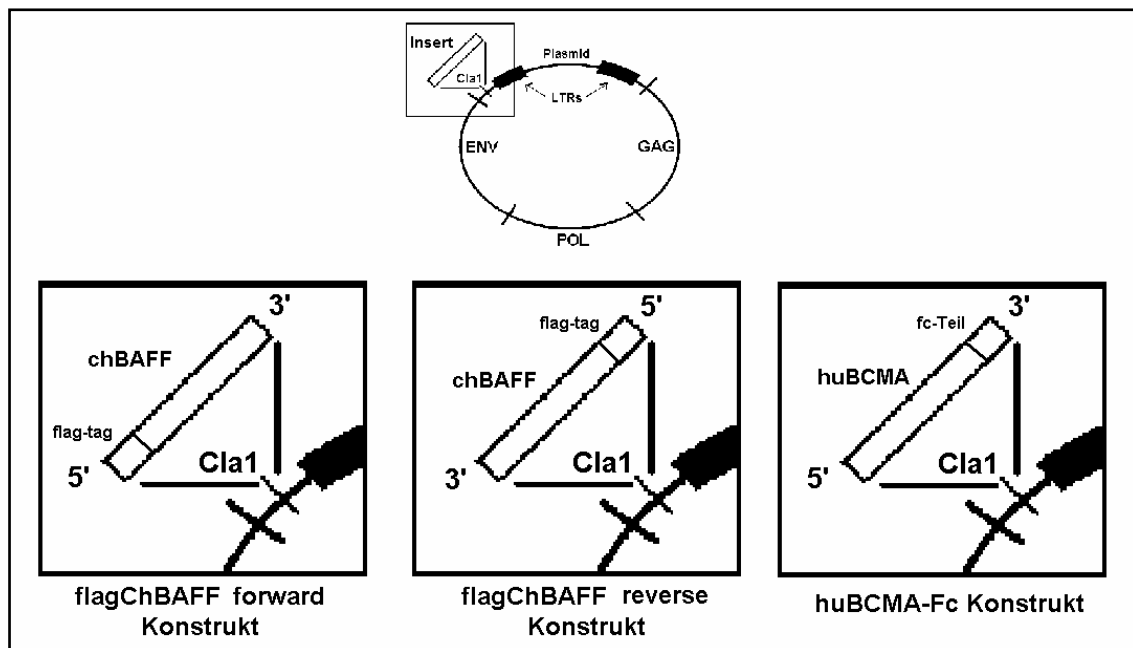


Abb. 4.6 verwendete RCAS-Konstrukte

Orientierung der zur Überexpression von flagChBAFF bzw. zur Induktion eines Mangels durch den Decoy-Rezeptor huBCMA-Fc konstruierte und verwendete RCAS-Konstrukte. Um eine Vektor-bedingte Beeinflussung auszuschließen, wurde auch ein das biologisch inaktive flagChBAFF reverse kodierender Vektor verwendet.

## 4.10.2 Transfektion von Hühnerembryofibroblasten

### 4.10.2.1 Material

#### CEF Medium

- 460ml Basal-ISCOVE Medium<sup>4</sup>
- 25ml FBS
- 10ml Hühnerserum
- 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

#### CEF Medium mit 15% Glycerol

- 8,5 ml CEF Medium
- 1,5 ml Glycerol<sup>5</sup> (steril)

#### 0,1 x TE

- 1,21 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (*Tris*)

200 µl EDTA 0,5 M (s. 4.8.1)

ad 1000 ml Aqua dest., pH-Wert mit HCL auf 7,5 einstellen; Lagerung bei RT

### **2x HBS Puffer (HEPES buffered saline)**

1,6 g NaCl

74 mg KCl

27 mg Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,2 g Glucose<sup>1</sup>

ad 80 ml Aqua dest. und 5 ml 1M HEPES<sup>1</sup> (50 mM), pH 7,05 mit NaOH einstellen, auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren und aliquotiert bei -20°C lagern

### **2 M Kalziumchlorid-Lösung**

2,94 g Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )<sup>1</sup>

ad 10 ml Aqua dest.

steril filtrieren und aliquotiert bei -20°C lagern

#### **4.10.2.2 Durchführung**

Einen Tag vor Transfektion wurden die CEFs der Linie „0“, einer von endogenen Retroviren freien Fibroblastenlinie, in einer Dichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/Petrischale ausgesät.

Nach dem Einstellen des für die Transfektion bestimmten Plasmids auf eine Konzentration von 40 µg/ml in sterilem 0,1xTE wurde die Plasmid-Lösung bei 16.000xg für 10 min zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Daraufhin wurden in einem 5ml Reaktionsgefäß 220 µl der Plasmid-Lösung mit in einem 5 ml Reaktionsgefäß vorgelegten 250µl HBS Puffer vermischt. Anschließend wurden langsam 31 µl Kalziumchlorid-Lösung hinzugegeben und durch Luftzufuhr mittels 1 ml Pipette gemischt. Es folgte eine Inkubation von 25 min bei Raumtemperatur. Nach einmaliger Resuspension wurden 500 µl der Plasmid-Lösung tropfenweise über die CEFs, die gewaschen und mit 10 ml Medium versorgt vorlagen, verteilt. Es schloss sich ein Inkubationsschritt von 4 Stunden bei 37°C an. Danach wurden die CEFs in warmem PBS gewaschen, 2 min bei 37°C mit 15% Glycerol enthaltendem CEF-Medium inkubiert und nach einem letzten Waschschrift mit PBS wieder mit Medium versetzt. 24 h nach erfolgter Transfektion konnten die Zellen 1:4 geteilt werden, nach 48-72h waren die Kulturen zu annähernd 100% infiziert. Die Expression des Transgens konnte überprüft werden.

### 4.10.3 Nachweis der chBAFF und huBCMA Sekretion in CEF-Überständen

Da für die angestrebte *in vivo* Applikation des Systems die extrazelluläre Verfügbarkeit von Zytokin und löslichem Rezeptor essentiell ist, wurde die Sekretion der Proteine in den Zellkulturüberstand mittels ELISA Verfahren (s. 4.11) überprüft.

### 4.10.4 Injektion der transfizierten CEFs in Hühnerembryonen

Um die Bedeutung von chBAFF bzw. dessen Neutralisation durch eine Expression des Decoy-Rezeptors huBCMA für die Embryonalentwicklung der Bursa untersuchen zu können, wurden befruchteten Hühnereiern an Embryonaltag 3 die transfizierten CEFs injiziert. Hierfür wurde die Kalkschale am stumpfen Eipol mittels eines Schleifwerkzeuges bis zur Eihaut hin eröffnet und 0,1 µl der transfizierten CEFs in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml vorsichtig in den Dottersack injiziert.

Die Injektionsstelle wurde anschließend unter Verwendung von erhitztem Paraffin verschlossen und die Eier bis zum Embryonaltag 18 wieder in den Brüter überführt.

### 4.10.5 Erfolgskontrolle der Transfektion der Hühnerembryonen

Zur Erfolgskontrolle der Transfektion wurde bei der Organentnahme an Embryonaltag 18 (s. 4.2.4) auch die Chorioallantoisflüssigkeit zum Test im ELISA nach 4.11 gewonnen.

## 4.11 ELISA

### 4.11.1 Material

#### Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )<sup>1</sup>  
6,00 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )<sup>1</sup>

ad 1000ml A.bidest, pH 9,6



**PBS-T 0,05%**

0,5ml Tween20®<sup>1</sup>

ad 1000ml PBS (s. 1.2.1)

**Magermilchlösung 5%**

5g Magermilchpulver<sup>1</sup>

ad 100ml PBS

**TMB-Puffer**

8,2g Natriumazetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )<sup>1</sup>

3,15g Zitronensäure-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )<sup>1</sup>

ad 1000ml A.Bidest.

**TMB-Stammlösung**

6mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB,  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$ )<sup>1</sup>

ad 1ml DMSO (Dimethylsulfoxid,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ )

**TMB-Gebrauchslösung**

10ml TMB-Puffer 37°C

332µl TMB-Stammlösung

3µl 30% Wasserstoffperoxyd ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>1</sup>

kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

**Schwefelsäure 1M**

472ml A. dest.

28ml 96% Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )<sup>1</sup>

zuerst Wasser vorlegen, dann die Säure langsam unter Rühren zugeben

**Antikörper**

| Antikörper  | Gebundenes Antigen | Tierart   | Konzentration/ Verdünnung |
|---|--------------------|-----------|---------------------------|
| M2 <sup>5</sup>   | Flag-Epitop        | Maus      | 1µg/ml                    |
| IgG-Fraktion eines polyklonalen Kaninchen Antiserums (S120) | chBAFF             | Kaninchen | 5µg/ml                    |

|  |               |       |          |
|--|---------------|-------|----------|
| Ziege-anti-Kaninchen POD <sup>14</sup> | Kaninchen IgG | Ziege | 1:20.000 |
| Ziege-anti-human POD <sup>15</sup>     | Humanes IgG   | Ziege | 1:5000   |

Tab. 4.1 Im ELISA verwendete Antikörper

**Negativkontrolle:**

PBS-T

**flagChBAFF-ELISA (s. Abb. 4.7)**

**Beschichtung:**

M2 (anti-flag) 1 µg/ml

**Primärer Antikörper:**

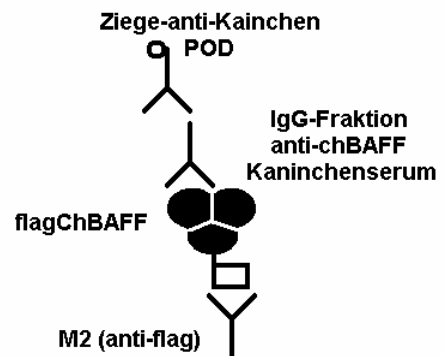
IgG-Fraktion eines polyklonalen Kaninchen Antiserums (S120) 5 µg/ml

**Sekundärer Antikörper:**

Ziege-anti-Kaninchen POD 1:20.000

**Abb. 4.7 flagChBAFF-ELISA**

Eine mit dem M2 anti-flag Antikörper beschichtete Platte wird mit flagChBAFF-haltigem Zellkulturüberstand bzw. Chorioallantoisflüssigkeit 60min inkubiert. Im nächsten Schritt wird die IgG-Fraktion aus anti-chBAFF Kaninchen serum aufgetragen und nach weiteren 60min eine erfolgte Bindung mittels eines Ziege-anti-Kaninchen-POD Konjugats nachgewiesen.



**huBCMA-ELISA (s. Abb. 4.8)**

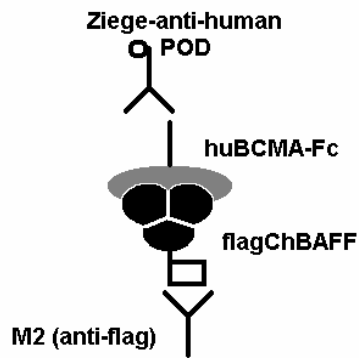
**Beschichtung:**

M2 (anti-flag) 1 µg/ml

Zellkulturüberstand stabil mit flagChBAFF transfizierter 293-Zellen (1:10)

**Sekundärer Antikörper:**

Ziege-anti-human POD 1:10.000



**Abb. 4.8 huBCMA-ELISA**

Eine mit dem M2 anti-flag Antikörper beschichtete Platte wird mit flagChBAFF-haltigem Zellkulturüberstand inkubiert. Im nächsten Schritt wird huBCMA-Fc-haltiger CEF-Zellkulturüberstand bzw. Chorioallantoisflüssigkeit aufgetragen. Eine erfolgte Bindung an chBAFF wird mittels eines Ziege-anti-human-POD Konjugat nachgewiesen.

Sofern keine anderen Angaben vorhanden, betragen die Inkubationszeiten der einzelnen Schritte jeweils 1h bei 37°C.

Zwischen jedem Schritt wurden die Platten jeweils dreimal mithilfe eines ELISA-Washers mit PBS-T gewaschen.

Die Verdünnungen der primären Antikörper erfolgten jeweils mit Beschichtungspuffer, die Verdünnungen der sekundären Antikörper sowie der Chorioallantoisflüssigkeit (1:5) jeweils mit PBS-T.

Um die Aussagekraft der ELISAs zu prüfen, wurden auf jeder Platte standardmäßig eine Positivkontrolle (chBAFF-ELISA: 293-Zellkulturüberstand (s. 4.3.2.1), huBCMA-ELISA: CEF Zellkulturüberstand (s. 4.10.2)) und eine Negativkontrolle (Blank) mitgeführt.

#### 4.11.2 chBAFF-ELISA

NUNC-Maxisorp® 96-Loch-Platten<sup>16</sup> wurden mit je 100µl/Delle der primären Antikörperverdünnung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die verbliebenen, freien Bindungsstellen durch Zugabe von 200µl/Delle 5% Magermilchlösung blockiert. Danach erfolgte der Probenauftrag als log-2 Titration mit 100µl/Delle des Zellkulturüberstandes der mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt in forward und reverse Orientierung transfizierten CEFs (unverdünnt) bzw. der Chorioallantoisflüssigkeiten (Ausgangsverdünnung 1:5) der entsprechend transfizierten Embryonen.

Abschließend erfolgte die Inkubation mit 50µl/Delle des entsprechenden sekundären Antikörpers in der in Tab.1 angegebenen Verdünnung.

Zur Entwicklung des ELISAs wurde nach Ablauf des letzten Inkubationsschrittes die kurz zuvor angesetzte TMB-Gebrauchslösung mit 100µl/Delle aufgetragen und die Platte im Dunkeln inkubiert. Nach 10min wurde die Reaktion mit je 50µl/Delle Schwefelsäure gestoppt

(Farbumschlag von Blau nach Gelb) und die Platte sofort bei 450nm photometrisch mit einem ELISA-Reader gemessen.

Als Positivkontrolle diente flagChBAFF-haltiger 293-Zellkulturüberstand (Verdünnung 1:10), die Negativkontrolle wurde durch Auftrag von 100µl PBS-T anstatt der Probe erstellt.

### 4.11.3 huBCMA-ELISA

Um den Titer an huBCMA in Zellkulturüberstand bzw. Chorioallantoisflüssigkeit zu bestimmen, erfolgte die Beschichtung über Nacht ebenfalls mit 100µl/Delle M2 anti-flag. Nach dem Blockierungsschritt erfolgte der Auftrag von flagChBAFF (1:10) enthaltendem 293 Zellkulturüberstand von je 100µl/Delle. Nach Inkubation von einer Stunde bei 37°C wurde der CEF Zellkulturüberstand der mit dem huBCMA-RCAS-Konstrukt transfizierten Zellen bzw. die Chorioallantoisflüssigkeit der entsprechend transfizierten Embryonen als log-2 Verdünnungsreihe aufgetragen. Daran anschließend wurde die Platte mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-human-POD) inkubiert und wie unter 4.11.2 beschrieben entwickelt und gemessen.

Als Positivkontrolle diente Zellkulturüberstand mit huBCMA transfizierter CEFs, als Negativkontrolle fungierte wiederum PBS-T.

## 4.12 Durchflusszytometrie

Die Messungen wurden an einem Fluorescence Activated Cell Scanner (FACScan®) durchgeführt und mit Cell Quest Pro und Flowjo 7.8 ausgewertet.

### 4.12.1 Material

#### Fluo-Puffer

5g bovines Serumalbumin<sup>1</sup>  
50mg Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)<sup>1</sup>

ad 500ml PBS  
Lagerung bei 4°C

**FACS-Puffer**

100 mg  $\text{NaN}_3^8$

ad 1000 ml PBS

**10x PBS**

40,00g Natriumchlorid (NaCl)

7,25g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

1g Kaliumchlorid (KCl)

1g Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

ad 500ml Aqua dest

**Paraformaldehyd (PFA) 4%**

20g Paraformaldehyd<sup>8</sup>

ad 450ml A. bidest und 50ml 10x PBS

Im Wasserbad bei 60°C für 1 Stunde rühren und nach Ablauf der Zeit das restliche PFA durch tropfenweise Zugabe von NaOH in Lösung bringen. Anschließend 50ml 10xPBS zugeben.

**7-Amino-Actinomycin-D<sup>17</sup> (7-AAD) 100µg/ml**

1mg 7-AAD

ad 1ml Methanol<sup>1</sup> zur Lösung und 9ml A. bidest, aliquotiert bei -20°C lagern

**CALTAG Counting Beads<sup>18</sup>****Antikörper**

Maus-anti-Bu1-RPE<sup>15</sup>

**4.12.2 Lebend-Zellzahlbestimmung mittels beads**

Zellen wurden wie unter 4.3.2.2 nachzulesen behandelt, entnommen und mittels Zentrifugation (716xg) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes schloss sich eine Resuspension des Zellpellets in 500µl Fluo-Puffer an. Somit konnten mögliche Flüssigkeitsverluste während der Zeit in Kultur ausgeglichen und ein einheitlicher

Verdünnungsgrad für die sich anschließende Auswertung zugrunde gelegt werden. 50µl dieser Zellsuspension wurden nun entnommen und mit 10µl des Bu1-RPE Antikörpers (1:30 verdünnt in Fluo-Puffer) und 10µl der CALTAG Counting Beads 20min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Fluo-Puffer und 20µl 7-AAD (7-Amino-Actinomycin-D) zur Anfärbung toter Zellen durch Bindung an die DNA wurde die Zellsuspension im Durchflußzytometer gemessen.

### 4.12.3 Auswertung

Mittels **FlowJo 7.8 (TreStar, Oregon, USA)** nach Angaben der Bead-Hersteller ausgewertete FACS-Daten ergaben Zellzahlen, welche mittels zeitgleich gemessener Zahl an Beads nach folgender Formel zur Berechnung der Zahl lebender B-Zellen pro Milliliter verwendet werden konnten:

$$\text{Bu1}^{+7}\text{-AAD}^{-}\text{-Zellen/Zahl an beads} \times 10.000 \times \text{Resuspensionsvolumen}/50\mu\text{l}$$

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Etablierung von PCR-Primern für bcl-2 Familienmitglieder des Huhns

Mit Hilfe von bekannten Gen-Sequenzen der bcl-2 Familienmitglieder des Huhns konnte eine Zusammenstellung an Primern für die konventionelle PCR erstellt werden. Diese Auswahl setzt sich aus anti-apoptotischen (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>, Nr13) und pro-apoptotischen Proteinen mit hoher (bak, bok) und geringerer Homologie zum bcl-2 (bid, bim) zusammen (s. Tab. 5.1).

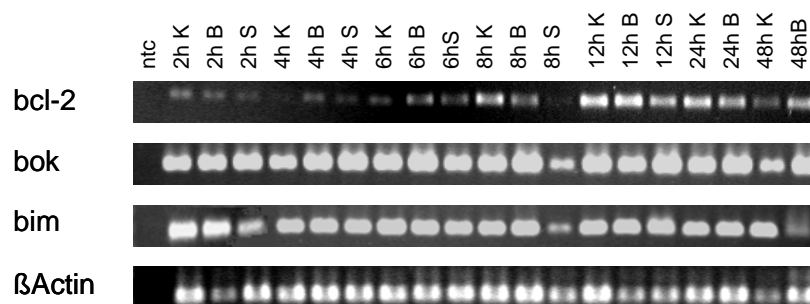
| <b>Genname</b>                                  | <b>Gensymbol</b>   | <b>Acc.-Nummer + Referenz</b> | <b>Primer-Sequenz</b>  |
|---|--------------------|-------------------------------|--|
| <b>Bcl-2 homologous antagonist/killer</b>       | bak                | NP_001026091<br>[273]         | CCGCTACCAACAGGAGAGAG (fw)<br>CAGCACCACCAGCATGTACT (rv)       |
| <b>B-cell CLL/ lymphoma 2</b>                   | bcl-2              | NM_205339<br>[251, 252]       | GGCTGCTGCTAGTGAGGTG (fw)<br>GTCCAAGATAAGCGCCAAGA (rv)        |
| <b>Apoptosis regulator bcl-x, long isoform</b>  | bcl-x <sub>L</sub> | NM_001025304<br>[258]         | AGATGGACAGCGTCCTCAAT (fw)<br>GCAGCAGCGTTGTTCCATA (rv)        |
| <b>BH3 interacting domain death agonist</b>     | bid                | NM_204552<br>[287]            | GAGTCCTCTGGCTGTGAGTTC (fw)<br>TGTGGAAGTGTTGGCTGATG (rv)      |
| <b>Bcl-2 interacting mediator of cell death</b> | bim                | BU448347<br>[296]             | CCTCCAGCGGGTACTTCTC (fw)<br>GATGAGGCGGATGATGTAATG (rv)       |
| <b>BCL2-related ovarian killer</b>              | bok                | NM_204706<br>[280]            | ATCGCCCGCCAGCTGAACATCTC (fw)<br>ACAGGGCGGTGGGGCTCATCTCT (rv) |
| <b>anti-apoptotic NR13</b>                      | Nr13               | NM_204522<br>[264]            | CCTCCAGCGGGTACTTCTC (fw)<br>GATGAGGCGGATGATGTAATG (rv)       |

Tab. 5.1 Etabliertes PCR Primer Set für bcl-2 Familienmitglieder des Huhns

## 5.2 Transkriptionsänderungen von bcl-2 Familienmitgliedern unter flagChBAFF Stimulation

Um die Anwendbarkeit der neuetablierten Primer auf die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung nach den von chBAFF induzierten Änderungen im Transkriptionsniveau der bcl-2 Familienmitglieder zu prüfen, wurde die aviäre B-Zelllinie DT40 verwendet. Diese aus bursalen B-Zellen entwickelte Zelllinie bot sich aufgrund ihres Ursprungs für erste *in vitro* Versuche an.

DT40-Zellen wurden zum einen mit dem Zytokin chBAFF und zur Validierung der Methode auch mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin zur Apoptose-Induktion inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 4, 6, 8, 12, 24 und 48 h) wurden die Zellen entnommen, die mRNA wie in 4.4 beschrieben isoliert und für die konventionelle PCR-Reaktion zu cDNA umgeschrieben (s. 4.5).



**Abb. 5.1 Analyse der mRNA Abundanz von bcl-2 Familienmitgliedern in DT40 Zellen nach Stimulation mit BAFF und Staurosporin**

DT40 Zellen wurden mit 5% BAFF-haltigem 293 Zellkulturüberstand (B), 1mmol Staurosporin (S) oder Medium (K) kultiviert. Die mRNA Expression wurde mittels konventioneller PCR für die angegebenen Gene analysiert. (Staurosporin-Werte für 24+48 h fehlen, da zu diesen Zeitpunkten keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren)

Wie aus Abb. 5.1 ersichtlich wird, konnte die PCR-Reaktion erfolgreich durchgeführt werden ( $\beta$ -Actin als Positivkontrolle). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl die mRNA anti- (bcl-2) wie auch pro-apoptotischer (bok, bim) Proteine nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist zudem die nach 8 Stunden deutlich werdende Wirkung des Staurosporins. Dieses inhibiert die Proteinkinase C, was nach 24 Stunden Inkubation zum Verlust sämtlicher vitaler Zellen führt.



### 5.3 Transkriptionsänderungen von bcl-2 Familienmitgliedern während der physiologischen Bursa-Entwicklung

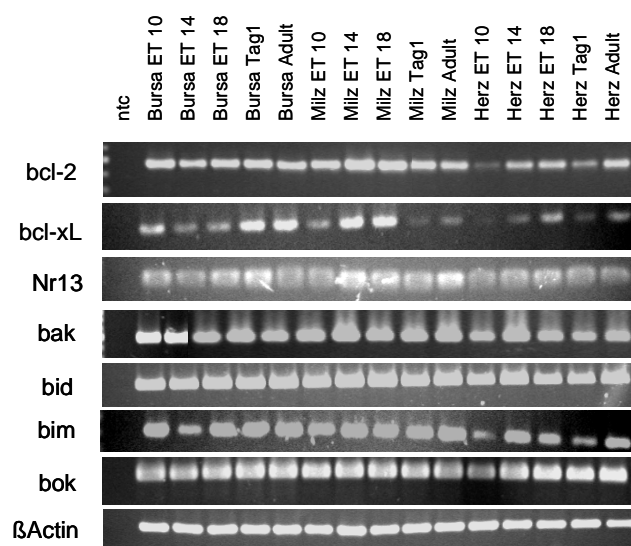
Da sich die Analyse der Stimulation von DT40 Zellen in der klassischen PCR als wenig aussagekräftig erwies, stellte sich die Frage, ob diese Methode eventuell für die Darstellung der Vorgänge *in vivo* besser geeignet wäre. Hierfür wurden embryonale Organe zu Zeitpunkten, welche für die Bursaentwicklung von Bedeutung sind, ET10, 14 und 18 (s. 2.1.2), entnommen, die RNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Zudem sollten auch die Vorgänge in der Milz, einem Organ welches die peripheren lymphatischen Organe repräsentiert, dargestellt werden. Als Vergleichswerte wurden die Änderungen in der Transkription der bcl-2 Familienmitglieder in einem für die Immunogenese nicht relevanten Organ, dem Herzen, herangezogen. Auch sollte die weitere Organ-Entwicklung nach dem Schlupf (Tag 1) betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurden Organe von Küken nach dem Schlupf bzw. drei Wochen danach von zu diesem Zeitpunkt juvenilen Hühnern gewonnen und entsprechend aufbereitet.

Wie die Kontrollreaktion für  $\beta$ -Actin zeigt, wurde in allen Proben die gleiche Menge cDNA eingesetzt (s. Abb. 5.2). Auch die pro- und anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden. Aussagen über mögliche Unterschiede im Transkriptionsniveau der entsprechenden Gene waren allerdings nicht möglich.

#### Abb. 5.2 Analyse der mRNA Abundanz von bcl-2 Familienmitgliedern in der Organogenese von Bursa, Milz und Herz

Untersuchung der Transkriptionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder wurden während ausgewählter Zeitpunkte der Embryogenese sowie der Entwicklung nach dem Schlupf wurden mittels konventioneller PCR wie unter 4.7 beschrieben durchgeführt.

(ntc= non template control/Negativkontrolle, ET= Embryonaltag)



## 5.4 Etablierung einer quantitativen Nachweismethode für bcl-2 Familienmitglieder des Huhns

Wie aus den Abschnitten 5.2 und 5.3 ersichtlich, war es notwendig eine Methode zum quantitativen Nachweis von Unterschieden in der Abundanz der mRNA der bcl-2 Familienmitglieder zu verwenden. Hierfür bot sich das Verfahren der quantitativen PCR an. Für dieses Verfahren wurden neue Primer generiert (s. Tab. 5.2), um den speziellen Ansprüchen an qPCR Primer Rechnung zu tragen.

| <b>Genname</b>                                  | <b>Gensymbol</b>   | <b>Acc.-<br/>Nummer +<br/>Referenz</b> | <b>Primer-Sequenz</b>   |
|---|--------------------|--|---|
| <b>B-cell-activating factor</b>                 | BAFF               | NP_989658<br>[158]                     | TTCAGGCACCACGGGACTTT (fw)<br>GCCCGGACCCTGTAGATCAG (rv)        |
| <b>Bcl-2 homologous antagonist/killer</b>       | bak                | NP_001026091<br>[273]                  | CTTGTTTCGACAGCGGCATTA (fw)<br>GGTTGCGCAGCATGAATTC (rv)        |
| <b>B-cell CLL/lymphoma 2</b>                    | bcl-2              | NM_205339<br>[251, 252]                | GGATCGTCGCCTTCTTCGAG (fw)<br>GCATCCCATCCTCCGTTGTC (rv)        |
| <b>apoptosis regulator bcl-x, long isoform</b>  | bcl-x <sub>L</sub> | NM_001025304<br>[258]                  | CTTTGTGCGTGGAGAGCGTG (fw)<br>GCAGCAGCGTTGTTCCCATATA (rv)      |
| <b>BH3 interacting domain death agonist</b>     | bid                | NM_204552<br>[287]                     | GCGCATGCTTCTCTTTGCTT (fw)<br>CGGTCTGAAGTTCCCATCA (rv)         |
| <b>Bcl-2 interacting mediator of cell death</b> | bim                | BU448347<br>[296]                      | CCAGCACGGTTATCCAAGAAA (fw)<br>CTTGCAAAAGAAATACAACCAGAAAT (rv) |
| <b>BCL2-related ovarian killer</b>              | bok                | NM_204706<br>[280]                     | TGCTGCGAGGATGGAAGTG (fw)<br>GACGCCTGCACGGATCAG (rv)           |

|                                |      |                    |   |
|--------------------------------|------|--------------------|---|
| <b>B6.1</b>                    | chB6 | NM_205182<br>[297] | TGTGGACTAGGCCCATTTGTG (fw)<br>TCATGCAGCAACAGATGAGTGA (rv) |
| <b>anti-apoptotic<br/>NR13</b> | Nr13 | NM_204522<br>[264] | CGGATGGGACGGCTTCT (fw)<br>TGCCGCTGCCATGATG (rv)           |

**Tab. 5.2** Etablierte qPCR Primer für bcl-2 Familienmitglieder des Huhns

Neben den Primern für die pro- und anti-apoptotischen Proteine der bcl-2 Familie wurden auch Primer für chBAFF und chB6, einen spezifischen B-Zellmarker beim Huhn, entworfen.

Besonderes Augenmerk wurde auf ein geringes Maß an möglicher Dimerisierung und auf eine hohe Spezifität der Primer gelegt. Letzteres wurde durch Sequenzierung eines jeden PCR-Produktes nachgewiesen. Für jedes neue Primerpaar wurde außerdem eine Standardkurve (7 log<sub>10</sub> Verdünnungsschritte) erstellt, welche es ermöglichte, Aussagen über die Effizienz und die Linearität der qPCR-Reaktion im relevanten Bereich zu machen. So wurde als Norm für die Linearität ein Korrelationskoeffizient über die sieben Verdünnungsstufen von mindestens 98% definiert. Zudem mussten die Primer über eine Effizienz von mindestens 80% verfügen.

Die Auswertung der mittels qPCR generierten Daten erfolgte nach folgendem Schema. Dabei zu beachten ist, dass höhere Ct-Werte geringere Mengen an Template bedeuten, da bei einer geringeren Menge an Template der Schwellenwert (threshold) später erreicht wird und somit der Ct-Wert höher ist (s. Abb. 4.4):

1. Normalisierung:

Um die Vergleichbarkeit der ermittelten Werte zu gewährleisten und mögliche Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen, wurden die Ct-Werte von jedem Gen auf den Ct-Wert der 18s rRNA normalisiert. Diese hatte sich gegenüber anderen Housekeeping-Genen (GAPDH, βActin) als am konstantesten und am wenigsten reguliert erwiesen:

$$(Ct_{\text{Gen}} - Ct_{18s \text{ rRNA}} = \Delta Ct).$$

2.a.) Standardisierung:

Änderungen im Transkriptionsniveau wurden durch Berechnung der Differenz zwischen dem ΔCt-Wert der Probe und des verwendeten Kalibrators (unbehandelte Kontrollen/ Transkriptionsniveau an ET10) darstellbar gemacht:

$$(\Delta Ct_{\text{Gen}} - \Delta Ct_{\text{Gen Kalibrator}} = \Delta \Delta Ct).$$

### 2.b) Transkriptionsniveauunterschiede pro B-Zelle:

Um Aussagen über die aufgetretenen Veränderungen in Bezug auf die Zahl der B-Zellen machen zu können, wurde der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert des B-Zellmarkers chB6 verwendet. Mit Hilfe dieses Markers war es möglich, die vorhandenen Unterschiede in der B-Zellzahl zu berücksichtigen:

$$(\Delta\text{Ct}_{\text{Gen}} - \Delta\text{Ct}_{\text{chB6}} = \Delta\Delta\text{Ct}_{\text{Gen/B-Zelle}})$$

### 3. Expressionsniveau

Zur Verdeutlichung der relativen Unterschiede in der Abundanz der mRNA der verschiedenen pro- und anti-apoptotischen Gene wurde der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert in das Expressionsniveau umgerechnet:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \text{ bzw. } 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}/\text{B-Zelle}}$$

(Für diese Berechnung wurde eine Effizienz von 100% zugrunde gelegt, was einer Verdopplung pro qPCR-Zyklus (Basis 2) entspricht)

## 5.5 Quantitative Bestimmung des Transkriptionsniveaus ausgesuchter Gene während der physiologischen Bursa-Entwicklung

Mit dem nun zur Verfügung stehenden quantitativen Nachweisverfahren wurde die physiologische Entwicklung der Bursa erneut zur Generierung eines Referenzwertes für die Bewertung möglicher durch chBAFF induzierter Änderungen herangezogen.

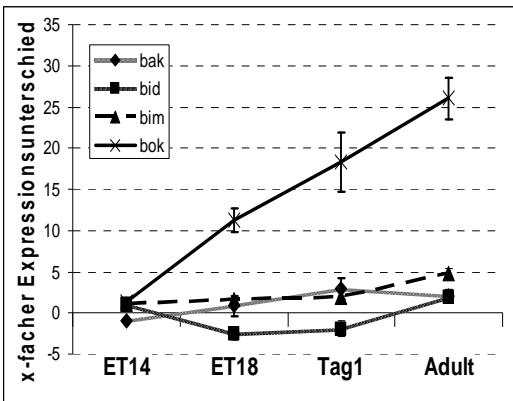
Im Zuge der Bursa-Entwicklung von der ersten Anlage über die Immigration und Proliferation der B-Zellen bis hin zur beginnenden Rückbildung der Bursa vor der Geschlechtsreife kommt es zu einem steten Anstieg der Transkription pro-apoptotischer Proteine in diesem Organ (s. Tab. 5.3 und Abb. 5.3 A). Besonders deutlich wird dies am Transkriptionsniveau von bok, welches beim adulten Tier 26 mal dem Wert an Embryonaltag 10 entspricht. Auch das Niveau an transkribiertem bim (ca. 5fach erhöht beim Adulten) spricht für den Anstieg der Transkription pro-apoptotischer bcl-2 Familienmitglieder im Zuge der Organogenese der Bursa.

Die Transkriptionsniveaus anti-apoptotischer Proteine zeigen während der Organogenese der Bursa einen leichten Anstieg im Transkriptionsniveau von bcl-x<sub>L</sub> (ca. 6fach) und Nr13 (2fach

beim adulten Tier) im Vergleich zum Niveau an Embryonaltag 10 und eine deutliche Verminderung des Transkriptionsniveaus von *bcl-2*, welches besonders an Embryonaltag 18 (um ein 8-faches vermindert bzw. nur 12,5% des Wertes an Embryonaltag 10) auffällig wird (s. Tab. 5.3 und Abb. 5.3 B).

A

|            | ET14  | ET18            | t-test | Tag1            | t-test | Adult           |
|------------|-------|-----------------|--------|-----------------|--------|-----------------|
| <b>bak</b> | -1,02 | 0,84<br>± 1,27  | 0,04   | 2,84<br>± 0,34  | 0,16   | 2,08<br>± 0,62  |
| <b>bid</b> | 1,05  | -2,56<br>± 0,69 | 0,17   | -1,67<br>± 0,93 | 0,01   | 1,85<br>± 0,01  |
| <b>bim</b> | 1,03  | 1,62<br>± 0,11  | 0,07   | 1,84<br>± 0,14  | <0,01  | 4,73<br>± 0,59  |
| <b>bok</b> | 1,30  | 11,31<br>± 1,42 | 0,01   | 18,72<br>± 3,56 | 0,09   | 26,02<br>± 2,50 |

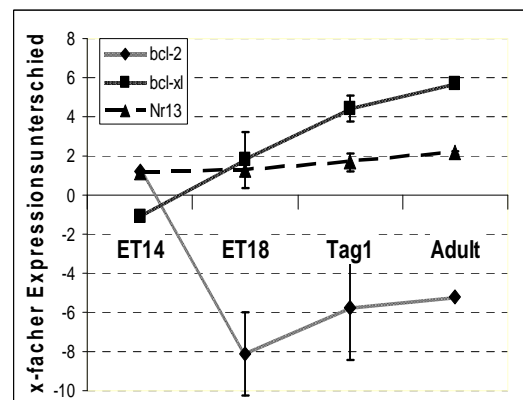


**Tab. 5.3 und Abb. 5.3 Expressionsniveaus der *bcl-2* Familienmitglieder während der Bursa Entwicklung**

Embryonale Bursen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, ihre mRNA isoliert und der cDNA-Synthese zugeführt. Dargestellt werden die Ergebnisse der durchgeführten qPCR-Reaktion, welche auf das Housekeeping-Gen 18s rRNA normalisiert und auf den  $\Delta C_t$ -Wert an ET10 standardisiert wurden. **A** pro-, **B** anti-apoptotische *bcl-2* Familienmitglieder. Der t-test wurde jeweils zwischen ET18 und Tag1 bzw. Tag1 und 3 Wochen alt (Adult) durchgeführt. ET10/ET14: Bursa-Organpools von 25/20 Tieren, ET18: 5, Tag1: 3, Adult: 2 Tiere. (ET= Embryonaltag, Ct= Cycle Threshold)

B

|               | ET14  | ET18            | t-test | Tag1            | t-test | Adult           |
|---------------|-------|-----------------|--------|-----------------|--------|-----------------|
| <b>bcl-2</b>  | 1,20  | -8,14<br>± 2,11 | 0,62   | -7,20<br>± 2,66 | 0,39   | -5,23<br>± 0,03 |
| <b>bcl-xl</b> | -1,10 | 1,81<br>± 1,42  | 0,02   | 4,75<br>± 0,67  | 0,15   | 5,70<br>± 0,00  |
| <b>Nr13</b>   | 1,18  | 1,29<br>± 0,32  | 0,44   | 1,51<br>± 0,45  | 0,16   | 2,15<br>± 0,10  |



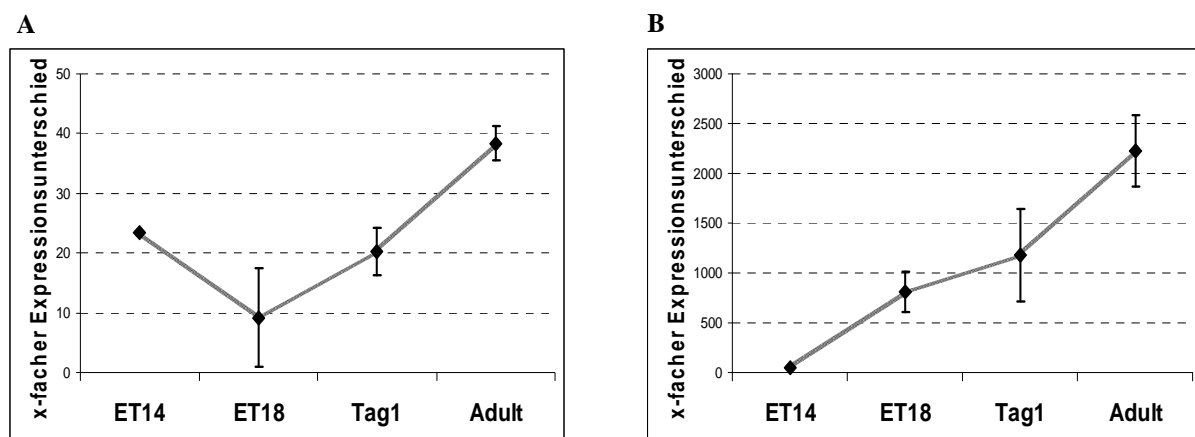
Es konnte bereits gezeigt werden, dass dem Zytokin chBAFF in der Entwicklung der Bursa eine wichtige Rolle zukommt [13]. Daher bot es sich an auch die Transkription dieser Zytokins zu wichtigen Zeitpunkten der Organogenese zu untersuchen (s. Tab. 5.4 und Abb. 5.4 A). Zur Verdeutlichung von Entwicklung und Bedeutung der Bursa als dem Organ der B-Zellreifung beim Huhn erschien zudem die Entwicklung der B-Zellzahl während dieser Zeit von Interesse und die Höhe der Transkription des Hühner B-Zellmarkers chB6 wurde als Repräsentant der B-Zellzahl herangezogen (s. Tab. 5.4 und Abb. 5.4 B). Deutlich wird ein starker Anstieg von chBAFF in der Bursa nach dem Embryonaltag 10. So ist an Embryonaltag 14 bereits 23mal mehr chBAFF Transkript in der Bursa nachzuweisen, an

ET18 die 9fache Menge und am Tag des Schlupfes 20fach mehr bzw. beim adulten Tier 38fach mehr als an ET10. Die Abundanz der mRNA von chB6 steigt fast linear von der 50fachen Menge an ET14, dem 800fachen an ET18, dem 1100fachen am Tag des Schlupfes bis hin zum 2200fachen der Menge an ET10 beim adulten Tier.

|             | ET14  | ET18               | t-test | Tag1                | t-test | Adult               |
|-------------|-------|--------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|
| <b>BAFF</b> | 23,51 | 9,21<br>± 8,17     | 0,08   | 20,71<br>± 3,97     | 0,01   | 38,37<br>± 2,88     |
| <b>chB6</b> | 51,11 | 809,70<br>± 205,29 | 0,16   | 1177,82<br>± 465,82 | 0,08   | 2222,16<br>± 357,86 |

**Tab. 5.4 und Abb. 5.4 Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder während der Bursa Entwicklung**

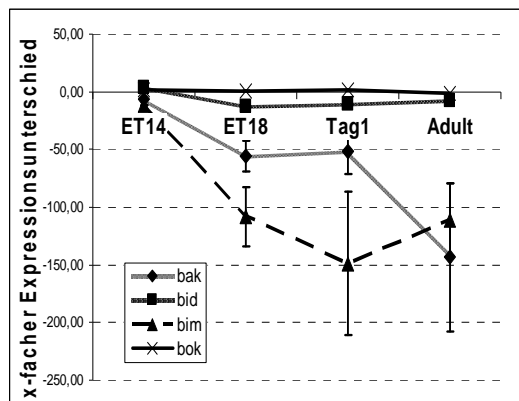
Embryonale Bursen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, ihre mRNA isoliert und der cDNA-Synthese zugeführt. Dargestellt werden die Ergebnisse der durchgeführten qPCR-Reaktion, welche auf das Houskeeping-Gen 18s rRNA normalisiert und auf den  $\Delta$ Ct-Wert an ET10 standardisiert wurden. Zur Verdeutlichung als Diagramm dargestellte Änderungen in der Konzentration von **A** chBAFF und **B** dem Hühner B-Zell Marker chB6 mRNA. Der t-test wurde jeweils zwischen ET18 und Tag1 bzw. Tag1 und 3 Wochen alt (Adult) durchgeführt. ET10/ET14: Bursa-Organpools von 25/20 Tieren, ET18: 5, Tag1: 3, Adult: 2 Tiere. (ET= Embryonaltag, Ct= Cycle Threshold)



Wie aus Tab. 5.4 Tab. 5.4 und Abb. 5.4 B hervorgeht, steigt die Konzentration an chB6 mRNA und somit an B-Zellen in der Bursa während der Entwicklung vor und nach dem Schlupf stark an. Somit könnten die in Tab. 5.3 und Abb. 5.3 dargestellten Änderungen in den mRNA-Konzentrationen der bcl-2 Familienmitglieder lediglich aufgrund des Anstiegs der B-Zellzahl zustande kommen. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, erschien auch eine Betrachtung des mRNA-Gehaltes an bcl-2 Familienmitgliedern pro B-Zelle von Interesse (s. Tab. 5.5 und Abb. 5.5). Da an ET10 noch keine B-Zellen in der Bursa zu finden sind wurde dieser Wert nicht in die Darstellung miteinbezogen.

A

|            | ET14   | ET18               | t-test | Tag1               | t-test | Adult              |
|------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|
| <b>bak</b> | -6,57  | -56,08<br>± 13,13  | 0,71   | -51,58<br>± 19,93  | 0,09   | -143,52<br>± 64,51 |
| <b>bid</b> | 3,36   | -12,70<br>± 4,55   | 0,44   | -10,45<br>± 0,56   | 0,03   | -7,45<br>± 1,24    |
| <b>bim</b> | -11,49 | -107,81<br>± 25,73 | 0,28   | -149,08<br>± 62,31 | 0,50   | -110,99<br>± 31,31 |
| <b>bok</b> | 2,01   | 0,75<br>± 1,12     | 0,41   | 1,35<br>± 0,40     | <0,01  | -1,09<br>± 0,07    |

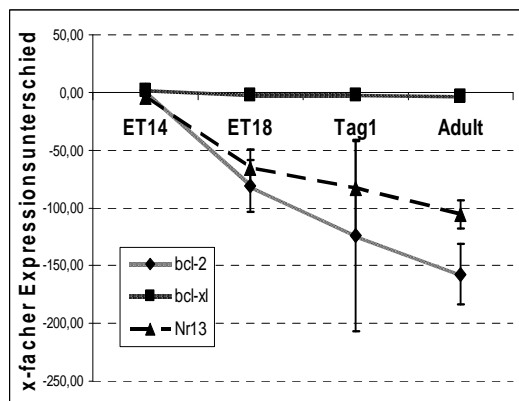


**Tab. 5.5 und Abb. 5.5 Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder bezogen auf die chB6 Expression während der Bursa Entwicklung**

Embryonale Bursen wurden zu den genannten Zeitpunkten entnommen, ihre mRNA isoliert und der cDNA-Synthese zugeführt. Dargestellt werden die Ergebnisse der durchgeführten qPCR-Reaktion, welche auf das Housekeeping-Gen 18s rRNA normalisiert und auf den  $\Delta C_t$ -Wert des Hühner B-Zell Markers chB6 standardisiert wurden. **A** pro-, **B** anti-apoptotische bcl-2 Familienmitglieder. Der t-test wurde jeweils zwischen ET18 und Tag1 bzw. Tag1 und 3 Wochen alt (Adult) durchgeführt. ET10/ET14: Bursa-Organpools von 25/20 Tieren, ET18: 5, Tag1: 3, 3 Wochen: 2 Tiere. (ET= Embryonaltag, Ct= Cycle Threshold)

B

|               | ET14  | ET18              | t-test | Tag1               | t-test | Adult              |
|---------------|-------|-------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|
| <b>bcl-2</b>  | 1,75  | -80,98<br>± 22,15 | 0,35   | -124,57<br>± 82,52 | 0,64   | -157,43<br>± 26,37 |
| <b>bcl-xl</b> | 2,19  | -2,32<br>± 0,55   | 0,47   | -1,98<br>± 0,60    | 0,10   | -3,20<br>± 0,52    |
| <b>Nr13</b>   | -4,44 | -65,49<br>± 16,34 | 0,41   | -83,13<br>± 41,67  | 0,53   | -105,52<br>± 12,04 |



Für die mRNA Abundanz pro bursaler B-Zellen lässt sich demnach feststellen:

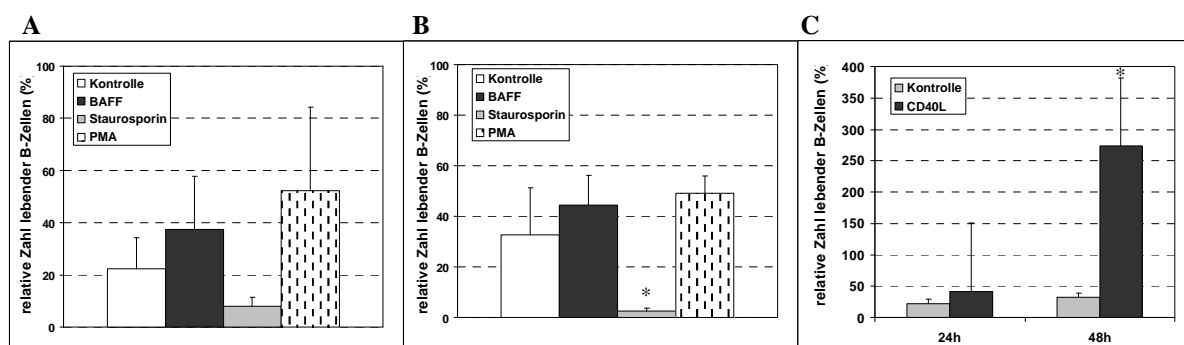
Unter den pro-apoptotisch wirkenden bcl-2 Familienmitgliedern wird die mRNA Konzentration von bak und bim im Laufe der Bursaentwicklung auf die Frequenz der B-Zellen bezogen weniger, auch bid wird im Vergleich zu dem Niveau an ET14 an ET18 nur ungefähr ein Fünftel mal so oft transkribiert. Das in Bezug auf das gesamt Organ in seiner Abundanz stark zunehmende bok erweist sich in seiner auf die B-Zellfrequenz bezogene Konzentration als höchst konstant. Auch bei den anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern relativiert sich der auf die gesamte Bursa bezogen beobachtete Effekt des Anstiegs in der Menge an bcl-x<sub>L</sub> Transkript. Dessen mRNA Konzentration bleibt auf die B-Zellfrequenz bezogen unveränderlich. Aus der im gesamt Organ beobachteten konstanten Menge an Nr13 mRNA wird nun im Hinblick auf die B-Zellfrequenz ein deutlicher

Rückgang. Wie bereits global für die Bursa festgestellt, nimmt auch die Konzentration an bcl-2 mRNA auf die B-Zellfrequenz bezogen deutlich im Laufe der Organogenese ab.

## 5.6 Transkriptionsniveau der bcl-2 Familienmitglieder in stimulierten Milzlymphozyten

Um die molekularen Vorgänge der bereits beschriebenen Wirkung von BAFF auf B-Zellen *in vitro*, namentlich eine größere Zahl an lebenden B-Zellen als in den unbehandelten Kontrollen, zu untersuchen und somit auch die Grundlage für weitere Untersuchungen zu schaffen, wurden isolierte Milzzellen von drei 6 Wochen alten Hühnern mit chBAFF stimuliert. Als Kontroll- und Vergleichsstimulantien fanden zudem bei allen das Zytokin CD40L, der Apoptose-Induktor Staurosporin und das unselektive Mitogen PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) Verwendung.

Wie aus Abb. 5.6 hervorgeht, kam es auch in diesem Versuch zu einer höheren Zahl an lebenden B-Zellen nach 24 und 48 h Kultur mit chBAFF (etwa doppelt so viel lebende Zellen nach 24 h Kultur gegenüber den Kontrollen). Ebenfalls mehr lebende Lymphozyten als in den unbehandelten Kontrollen fanden sich in den mit PMA behandelten Ansätzen (etwa die doppelte Zahl an lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 24 h). Ein deutlicher Abfall in der Zahl an lebenden B-Zellen ergab sich unter Staurosporin-Behandlung (nur 50% der lebenden Zellen der Kontrolle nach 24 h bzw. ein Zehntel nach 48 h). Deutlich wird der Effekt der Inkubation mit CD40-Ligand besonders nach 48 h, zu diesem Zeitpunkt hat sich die Zahl stimulierter Zellen im Vergleich zur eingesetzten Zahl fast verdreifacht.



**Abb. 5.6 Relative Zahl lebender B-Zellen nach 24 und 48 h in Kultur**

Die Milzen von drei 6 Wochen alten Tieren wurden entnommen und die Lymphozyten wie unter 4.2.3 beschrieben isoliert. Die Inkubation erfolgte in B-Zell Medium bzw. unter Zugabe von 5% chBAFF-haltigem Zellkulturüberstand, Staurosporin (1mMol/ml), 20 ng/ml PMA und 0,5 µg/ml CD40L. Die Kontrollansätze wurden nur in Medium kultiviert. Um vergleichbare Skalen für den 24 (A) und 48h (B) Wert verwenden zu können, wurde die Stimulation mit CD40L gesondert dargestellt (C). \* = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ( $P < 0,05$ ; student's t-test). (PMA = Phorbol-12-Myristat-13-Azetat)



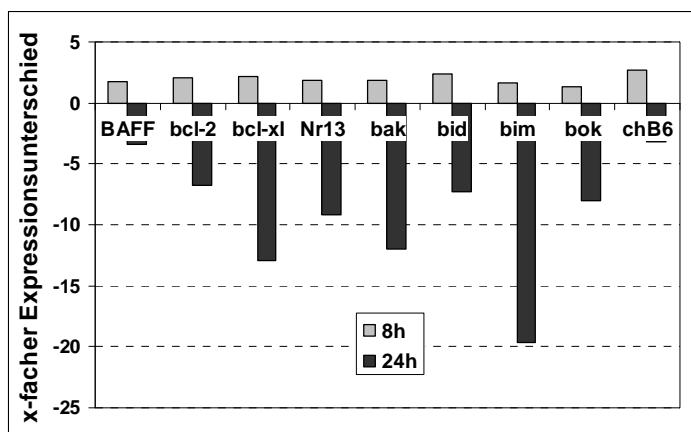
### 5.6.1 Stimulation mit chBAFF

Betrachtet man nun die zugrundeliegenden Vorgänge auf Transkriptomebene mittels quantitativer PCR, so fällt auf, dass das Niveau an pro-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern in mit chBAFF stimulierten B-Zellen nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert ist (s. Tab. 5.6 und Abb. 5.7). So ist die Menge an Transkript für bak, bid und bok nach chBAFF Stimulation signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrollen. Bak wird 12, bid 7 und bok 8mal weniger transkribiert als in den unbehandelten Kontrollzellen nach 24 h. Auch die mRNA Abundanz des pro-apoptotisch wirkenden Proteins bim ist, wenn auch nicht signifikant, so doch deutlich erniedrigt. Es wird nach 24 h chBAFF Inkubation fast 20mal seltener transkribiert als in den Kontrollen.

Bei den anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern fällt ebenfalls eine generelle Verringerung des Transkriptionsniveaus im Vergleich zur Kontrolle auf. Bcl-2 wird circa 8, Nr13 9 und bcl-x<sub>L</sub> sogar 13mal seltener transkribiert als in den Kontrollzellen.

Transkript für endogenes BAFF ist unter chBAFF Stimulation ebenfalls seltener zu finden als bei den unbehandelten Kontrollen, es wird nach 24 h 3mal seltener gebildet. Auch der Hühner B-Zellmarker chB6 wird nach 24 h 3mal weniger transkribiert als in den Kontrollen, allerdings ist sein Niveau nach 8 h signifikant erhöht. Es ist zu diesem Zeitpunkt etwa 3mal so hoch wie in den Kontrollen.

|               | 8 h             | t-test | 24 h           | t-test |
|---------------|-----------------|--------|----------------|--------|
| <b>BAFF</b>   | -0,79<br>± 0,48 | 0,10   | 1,75<br>± 2,35 | 0,33   |
| <b>bcl-2</b>  | -1,03<br>± 0,43 | 0,05   | 2,76<br>± 0,39 | 0,01   |
| <b>bcl-xl</b> | -1,12<br>± 1,18 | 0,24   | 3,69<br>± 0,45 | <0,01  |
| <b>Nr13</b>   | -0,87<br>± 1,02 | 0,28   | 3,19<br>± 0,92 | 0,03   |
| <b>bak</b>    | -0,87<br>± 0,66 | 0,15   | 3,59<br>± 0,58 | 0,01   |
| <b>bid</b>    | -1,23<br>± 1,23 | 0,23   | 2,86<br>± 0,89 | 0,03   |
| <b>bim</b>    | -0,74<br>± 0,86 | 0,28   | 4,30<br>± 3,06 | 0,14   |
| <b>bok</b>    | -0,44<br>± 0,85 | 0,46   | 3,00<br>± 0,89 | 0,03   |
| <b>chB6</b>   | -1,45<br>± 0,37 | 0,02   | 1,69<br>± 1,32 | 0,16   |



**Tab. 5.6 und Abb. 5.7  $\Delta\Delta$ Ct-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten nach 8 und 24 h Inkubation mit chBAFF**

Milzlymphozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. In der Tabelle dargestellt sind die auf den Ct-Wert der 18s rRNA normalisierten und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisierten  $\Delta\Delta$ Ct-Werte der durchgeführten qPCR-Reaktion. Zur Verdeutlichung wurden diese als Expressionsniveaus in der Abbildung rechts dargestellt. Der t-test wurde auf  $\Delta$ Ct-Ebene zwischen Kontrollen und stimulierten Zellen durchgeführt (n=3).

## 5.6.2 Stimulation mit chCD40-Ligand

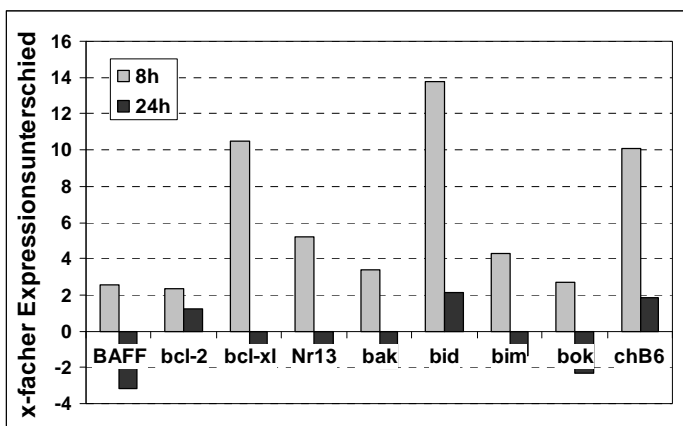
CD40-Ligand ist wie BAFF ein Zytokin aus der Tumornekrosefaktor Familie und zeichnet sich ebenfalls dadurch aus, dass eine Stimulation mit CD40L zu höheren Zahlen an lebenden B-Zellen in Kultur führt. Anders als BAFF bewirkt die Zugabe von CD40-Ligand allerdings eine Proliferation der B-Zellen. Da auch chCD40L zur Verfügung stand, sollte untersucht werden, in wie weit sich die Stimulation mit CD40L auf die Transkriptionsniveaus von pro- und anti-apoptotischen Proteinen der bcl-2 Familie, auf das Niveau an chBAFF sowie auf die Transkription des B-Zellmarkers chB6 auswirken würde.

Auf die Transkription der pro-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder wirkt sich die Stimulation mit CD40L unterschiedlich aus (s. Tab. 5.7 und Abb. 5.8). So kommt es zu einer im Vergleich zur Kontrolle 3mal höheren Transkription von bak bereits nach 8 h. Eine Wirkung, die sich nach 24 h (2fach niedrigere mRNA Abundanz) umkehrt. Auch das Transkriptionsniveau von bid ist gegenüber der Kontrolle nach 8 h (13mal) erhöht, und fällt auch nach 24 h (2mal mehr) nicht unter das Niveau der Kontrolle ab. Diese Tendenz zeigen allerdings die Transkriptmengen von bim und bok, die nach 8 h erst steigen (4 bzw. 2fach zur Kontrolle) und dann nach 24 h unter dem Wert der Kontrollen sinken (1,5 bzw. 2mal weniger).

Bei den anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern fällt besonders die im Vergleich zu dem Wert in den Kontrollen 10mal höhere Menge an bcl-x<sub>L</sub> Transkript nach 8 h auf. Allerdings ist bereits nach 24 h das Niveau zwischen Kontrollen und stimulierten Zellen wieder gleich. Bcl-2 mRNA hingegen liegt auch noch nach 24 h marginal erhöht gegenüber den Kontrollen vor. Allerdings erreicht sie nicht den Mengenunterschied von Nr13, welches nach 8 h 5mal öfter in stimulierten Zellen transkribiert wird als in den Kontrollen.

BAFF wird erst vermehrt (2fach) und nach 24 h seltener (um Faktor 3 weniger) transkribiert als in den unbehandelten Zellen. Die mRNA des B-Zell Markers chB6 liegt unter CD40L Stimulation immer in einer größeren Menge vor, als in den Kontrollen. So wird er nach 8 h 10mal und nach 24 h noch doppelt so oft transkribiert.

|               | 8 h             | t-test | 24 h            | t-test |
|---------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>BAFF</b>   | -1,35<br>± 2,66 | 0,47   | 1,65<br>± 0,89  | 0,08   |
| <b>bcl-2</b>  | -1,21<br>± 3,74 | 0,63   | -0,28<br>± 2,08 | 0,84   |
| <b>bcl-xl</b> | -3,39<br>± 3,20 | 0,21   | 0,37<br>± 1,34  | 0,68   |
| <b>Nr13</b>   | -2,38<br>± 3,10 | 0,31   | 0,60<br>± 2,15  | 0,68   |
| <b>bak</b>    | -1,77<br>± 2,95 | 0,41   | 1,05<br>± 1,12  | 0,25   |
| <b>bid</b>    | -3,78<br>± 2,58 | 0,13   | -1,10<br>± 2,74 | 0,56   |
| <b>bim</b>    | -2,11<br>± 2,70 | 0,31   | 0,42<br>± 2,81  | 0,82   |
| <b>bok</b>    | -1,41<br>± 3,07 | 0,51   | 1,22<br>± 2,54  | 0,49   |
| <b>chB6</b>   | -3,33<br>± 2,26 | 0,13   | -0,89<br>± 1,27 | 0,35   |



**Tab. 5.7 und Abb. 5.8  $\Delta\Delta$ Ct-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten nach 8 und 24 h Inkubation mit CD40L**

Milzlymphozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. In der Tabelle dargestellt sind die auf den Ct-Wert der 18s rRNA normalisierten und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisierten  $\Delta\Delta$ Ct-Werte der durchgeführten qPCR-Reaktion. Zur Verdeutlichung wurden diese als Expressionsniveaus in der Abbildung rechts dargestellt. Der t-test wurde auf  $\Delta$ Ct-Ebene zwischen Kontrollen und stimulierten Zellen durchgeführt (n=3).

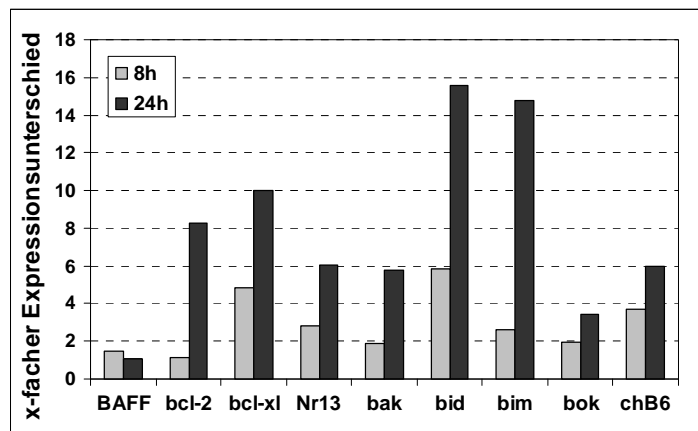
### 5.6.3 Vergleich der Wirkung von chBAFF und chCD40-Ligand

Aufgrund der beobachteten deutlichen Unterschiede in der Stimulation mit chBAFF bzw. chCD40L erschien auch ein direkter Vergleich dieser beiden TNF Familienmitglieder von Interesse (s. Tab. 5.8 und Abb. 5.9). Das anti-apoptotisch wirkende chBAFF und der proliferativ wirkende CD40L unterscheiden sich im Expressionsniveau der bcl-2 Familienmitglieder deutlich. Bereits nach 8 h wird sichtbar, dass unter CD40L Stimulation allgemein eine größere Menge an Transkripten der ausgewählten Gene vorliegt. Besonders deutlich wird dies nach 24 h, zu diesem Zeitpunkt transkribieren Lymphozyten unter CD40L-Einfluß 10mal mehr von dem anti-apoptotisch wirkenden bcl-x<sub>L</sub>, 8mal mehr bcl-2 und 6mal mehr Nr13 als mit BAFF stimulierte Zellen.

An pro-apoptotisch wirkenden bcl-2 Familienmitgliedern werden besonders bid und bim (beide 15mal) nach 24 h häufiger transkribiert als unter chBAFF-Stimulation. Hierbei ist zu beachten, dass bim bereits im Vergleich CD40L zur Kontrolle seltener transkribiert wurde. Somit wird die durch BAFF-Stimulation verursachte starke Reduktion im Niveau an bim mRNA (15mal weniger als unter CD40L-Stimulation) deutlich. Abschließend fällt im

Vergleich chBAFF und chCD40L auf, dass unter CD40L Stimulation deutlich mehr chB6 (nach 8 h 3, nach 24 h 6mal mehr) gebildet wird als in BAFF stimulierten Zellen.

|               | 8 h             | t-test | 24 h            | t-test |
|---------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>BAFF</b>   | -0,55<br>± 0,73 | 0,73   | -0,10<br>± 0,96 | 0,96   |
| <b>bcl-2</b>  | -0,18<br>± 0,94 | 0,94   | -3,04<br>± 0,17 | 0,17   |
| <b>bcl-xl</b> | -2,27<br>± 0,20 | 0,20   | -3,32<br>± 0,06 | 0,06   |
| <b>Nr13</b>   | -1,51<br>± 0,57 | 0,57   | -2,60<br>± 0,11 | 0,11   |
| <b>bak</b>    | -0,89<br>± 0,60 | 0,60   | -2,54<br>± 0,03 | 0,03   |
| <b>bid</b>    | -2,55<br>± 0,34 | 0,34   | -3,96<br>± 0,08 | 0,08   |
| <b>bim</b>    | -1,37<br>± 0,35 | 0,35   | -3,88<br>± 0,13 | 0,13   |
| <b>bok</b>    | -0,97<br>± 0,69 | 0,69   | -1,78<br>± 0,20 | 0,20   |
| <b>chB6</b>   | -1,88<br>± 0,28 | 0,28   | -2,58<br>± 0,11 | 0,11   |

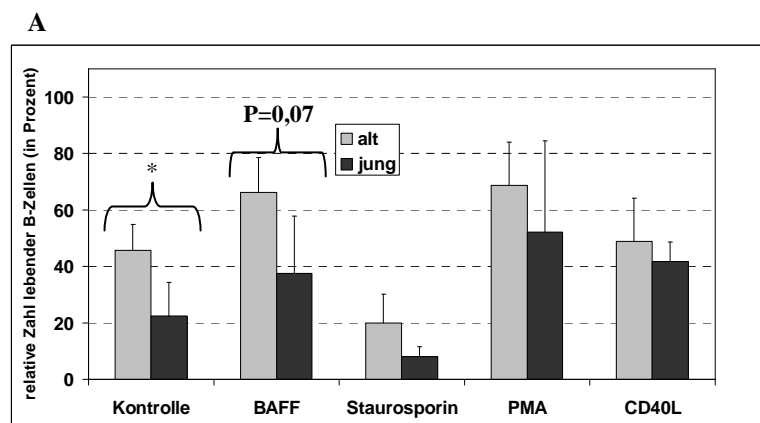


**Tab. 5.8 und Abb. 5.9  $\Delta\Delta$ Ct-Werte und Expressionsniveaus ausgewählter Gene im Vergleich CD40L- und BAFF-Stimulation**

Milzlymphozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. In der Tabelle dargestellt sind die auf den Ct-Wert der 18s rRNA normalisierten und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der BAFF-stimulierten Zellen standardisierten  $\Delta\Delta$ Ct-Werte der durchgeführten qPCR-Reaktion. Zur Verdeutlichung wurden diese als Expressionsniveaus in der Abbildung rechts dargestellt. Dem Wert 1 entspricht hierbei die mRNA Abundanz in mit BAFF stimulierten Zellen. Der t-test wurde auf  $\Delta$ Ct-Ebene zwischen Kontrollen und stimulierten Zellen durchgeführt (n=3).

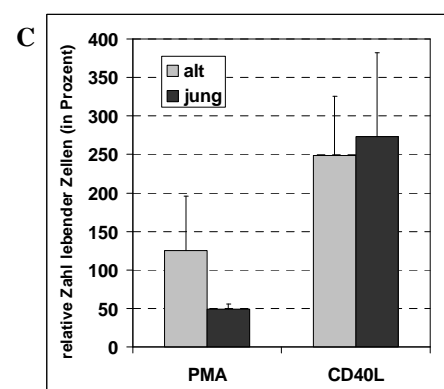
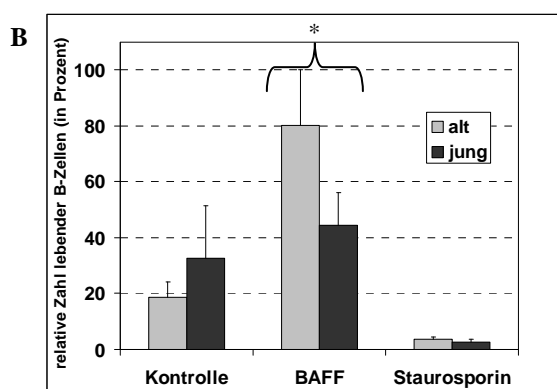
## 5.7 Auswirkungen des Alters auf das Überleben von B-Zellen aus der Milz in Kultur

Während bei Hühnern im Alter von sechs Wochen die Bursa noch funktionsfähig ist und hier kontinuierlich B-Zellen reifen, ist sie bei Tieren im Alter von 6 Monaten bereits involuiert. Es können sich keine weiteren B-Zellen entwickeln und Hühner müssen während ihres adulten Lebens auf den B-Zellpool zurückgereifen, den sie vor der Geschlechtsreife in der Bursa generiert haben. Bereits in früheren Versuchen war aufgefallen, dass sich B-Zellen aus der Milz juveniler Tiere mit aktiver Bursa in ihrer Überlebensrate in Kultur deutlich von denen adulter Tiere unterscheiden. Auch bei der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass jene von adulten Tieren (6 Monate) deutlich länger als die von jüngeren Tieren (6 Wochen) überlebten (s. Abb. 5.10).



**Abb. 5.10 Vergleich der Zahl lebender B-Zellen aus den Milzen juveniler und adulter Tiere nach 24 h und 48 h Inkubation mit verschiedenen Stimulantien**

Milz-Lymphozyten von drei 6 Wochen (**jung**) und vier 6 Monate alten Tieren (**alt**) wurden mit 5% chBAFF-haltigem 293 Zellkulturüberstand, 20 ng/ml PMA, 0,5 µg/ml CD40L oder 1mMol/ml Staurosporin inkubiert und die noch lebenden B-Zellen nach 24 h und 48 h mittels Durchflusszytometrie (s. 4.12) bestimmt. **A** lebende B-Zellen in Prozent des Ausgangswertes nach 24 h, **B** und **C** nach 48 h (zwei Diagramme aufgrund unterschiedlicher Skalen). \* diese Werte sind signifikant unterschiedlich zwischen den B-Zellen aus den Milzen juveniler und adulter Tiere (\* $P < 0,05$ ; student's t-test ).



Unabhängig von der Stimulation ergab sich ein signifikanter Unterschied im Überleben der B-Zellen von juvenilen und adulten Tieren. So lebten nach 24 h noch 45% der B-Zellen adulter Tiere im Vergleich zu 25% der Zellen juveniler Tiere in den unbehandelten Kontrollen. Auch unter chBAFF Stimulation lebten nach 24 h mehr B-Zellen adulter (67%) als juveniler (42%) Tiere. Ein Unterschied, der nach 48 h signifikant wurde (80% bei den adulten, 43% bei den juvenilen).

Unter Staurosporin-Einwirkung waren nach 24 h bereits 91% der Zellen juveniler, aber nur 80% der Zellen adulter Tiere in Apoptose gegangen nach 48 h bei juvenilen wie adulten mehr als 95%. Auch mit PMA stimulierte B-Zellen verhielten sich ähnlich, sowohl nach 24 wie auch nach 48 h waren noch mehr B-Zellen aus den Milzen adulter Tiere vital.

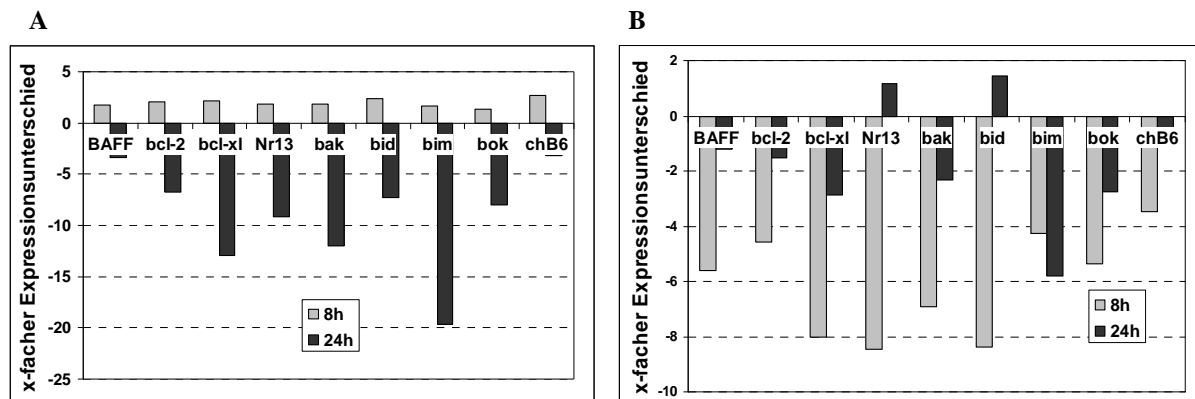
Lediglich durch die Stimulation mit CD40L wurde dieser Unterschied aufgewogen und Zellen von adulten und juvenilen Tieren waren nach 24 h im Vergleich zum Entnahmezeitpunkt noch zu etwa 45% vital. Ebenfalls augenscheinlich wurde die Besonderheit der CD40L Stimulation auch nach 48 h. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich in etwa gleich viele vitale Zellen in Ansätzen aus Milzen adulter wie juveniler Tiere.

Im Anschluß sollten nun zum einen die Ursachen für den altersbedingten Unterschied und zum anderen die Besonderheit der Stimulation mit CD40L in diesem Zusammenhang mittels qPCR analysiert werden.

### **5.7.1 Vergleich der Transkription ausgesuchter Gene in stimulierten Milzlymphozyten juveniler und adulter Tiere**

Bei der Betrachtung der Unterschiede zwischen stimulierten Milzlymphozyten juveniler und adulter Tiere auf Transkriptomebene fällt auf, dass sich die Niveaus der Transkripte der bcl-2 Familienmitglieder bzw. von BAFF und dem Hühner B-Zellmarker chB6 stark unterscheiden (s. Abb. 5.11 und Tab. 5.9). So findet sich bei den adulten Tieren nach 8 h von jedem der analysierten Gene eine geringere Menge an Transkript in den mit chBAFF stimulierten Zellen als in den unbehandelten Kontrollen. Bei den juvenilen Tieren hingegen finden sich nach 8 h noch kaum deutliche Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen. Auch nach 24 h finden sich deutliche Unterschiede zwischen adulten und juvenilen Tieren. So zeigt sich zwar auch bei ihnen eine ähnliche Tendenz wie bei den B-Zellen der juvenilen Tiere, namentlich eine geringere Transkription als in den Kontrollen, allerdings fällt diese

nicht so deutlich aus (bim bei juvenilen Tieren um den Faktor 20, bei adulten nur um den Faktor 6 reduziert).



**Abb. 5.11** Darstellung der Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten junger und adulter Tiere nach Inkubation mit chBAFF

Drei 6 Wochen (A) und vier 6 Monate (B) alten Tieren wurde jeweils die Milz entnommen, Lymphozyten gewonnen und mit B-Zell-Medium bzw. 5% chBAFF-haltigem Zellkulturüberstand inkubiert. Nach 8 und 24h wurden die Zellen entnommen, ihre mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Dargestellte Werte entsprechen den auf das Housekeeping-Gen 18s mRNA normalisierten und auf den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Kontrollen standardisierten Expressionsniveaus der durchgeführten qPCR.

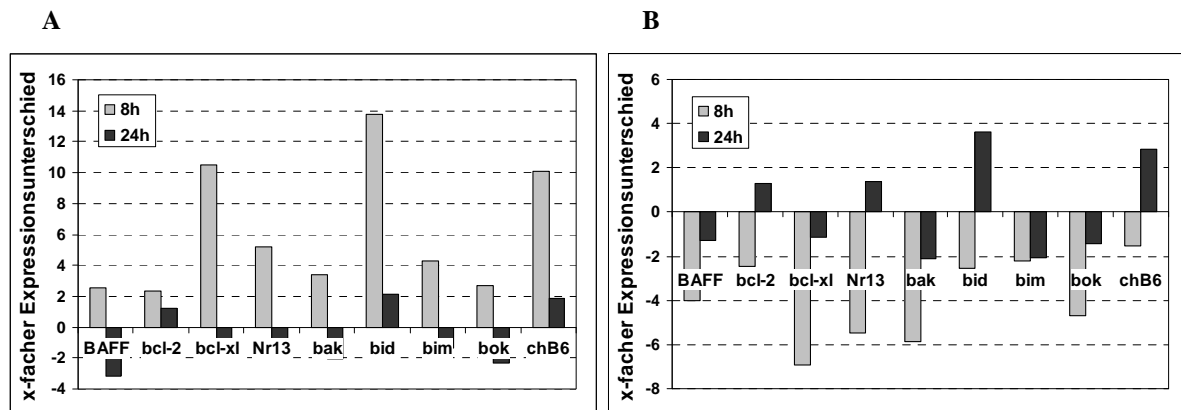
|               | 8 h            | t-test | 24 h            | t-test |
|---------------|----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>BAFF</b>   | 2,49<br>± 3,04 | 0,20   | 0,25<br>± 1,32  | 0,73   |
| <b>bcl-2</b>  | 2,20<br>± 3,08 | 0,25   | 0,62<br>± 1,31  | 0,41   |
| <b>bcl-xl</b> | 3,01<br>± 3,36 | 0,17   | 1,51<br>± 1,88  | 0,21   |
| <b>Nr13</b>   | 3,08<br>± 3,96 | 0,22   | -0,20<br>± 1,43 | 0,80   |
| <b>bak</b>    | 2,79<br>± 3,48 | 0,21   | 1,20<br>± 1,64  | 0,24   |
| <b>bid</b>    | 3,07<br>± 3,39 | 0,17   | -0,52<br>± 1,91 | 0,63   |
| <b>bim</b>    | 2,09<br>± 3,39 | 0,27   | 2,53<br>± 0,68  | <0,01  |
| <b>bok</b>    | 2,42<br>± 3,48 | 0,26   | 1,47<br>± 1,76  | 0,19   |
| <b>chB6</b>   | 1,79<br>± 2,79 | 0,29   | 0,11<br>± 0,99  | 0,83   |

**Tab. 5.9**  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ausgewählter Gene in Milzlymphozyten adulter Tiere unter chBAFF Stimulation  
Milzlymphozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. In der Tabelle dargestellt sind die auf den Ct-Wert der 18s rRNA normalisierten und auf den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der BAFF-stimulierten Zellen standardisierten  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der durchgeführten qPCR-Reaktion.

Der t-test wurde auf  $\Delta\text{Ct}$ -Ebene zwischen Kontrollen und stimulierten Zellen durchgeführt.

Nach Analyse der Unterschiede im Expressionsniveau der bcl-2 Familienmitglieder, von BAFF und dem B-Zellmarker chB6 bei mit chCD40L stimulierten Milzlymphozyten adulter und juveniler Tiere, so fällt auch hier auf, dass die Menge an Transkript in den stimulierten

Milzlymphozyten adulter Tiere nach 8 h deutlich unter dem Niveau in den Kontrollen liegt (s. Abb. 5.12 und Tab. 5.10). Auffällig nach 24 h ist die sich auch schon bei BAFF stimulierten Milzlymphozyten adulter Hühner abzeichnende Tendenz einer Erhöhung an bid Transkript gegenüber den Kontrollen. Dies lässt sich zwar auch in Milzlymphozyten juveniler Tiere beobachten, allerdings nicht in diesem Ausmaß (adulte: 3,5fach, juvenile: 2fach erhöht gegenüber den Kontrollen).



**Abb. 5.12** Darstellung der Expressionsniveaus ausgewählter Gene in Milzlymphozyten juveniler und adulter Tiere nach Inkubation mit CD40L

Drei 6 Wochen (A) und vier 6 Monate (B) alten Tieren wurde jeweils die Milz entnommen, Lymphozyten gewonnen und mit B-Zell-Medium bzw. CD40L inkubiert. Nach 8 und 24h wurden die Zellen entnommen, ihre mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Dargestellte Werte entsprechen den auf das Housekeeping-Gen 18s mRNA normalisierten und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisierten Expressionsniveaus der durchgeführten qPCR.

|               | 8 h            | t-test | 24 h            | t-test |
|---------------|----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>BAFF</b>   | 2,00<br>± 2,31 | 0,18   | 0,36<br>± 1,60  | 0,68   |
| <b>bcl-2</b>  | 1,29<br>± 2,35 | 0,35   | -0,35<br>± 1,90 | 0,74   |
| <b>bcl-xl</b> | 2,79<br>± 2,12 | 0,08   | 0,22<br>± 1,74  | 0,81   |
| <b>Nr13</b>   | 2,45<br>± 2,72 | 0,17   | -0,48<br>± 1,61 | 0,59   |
| <b>bak</b>    | 2,56<br>± 3,19 | 0,21   | 1,09<br>± 3,40  | 0,57   |
| <b>bid</b>    | 1,36<br>± 2,04 | 0,28   | -1,85<br>± 2,02 | 0,16   |
| <b>bim</b>    | 1,14<br>± 2,45 | 0,42   | 1,05<br>± 1,27  | 0,20   |
| <b>bok</b>    | 2,24<br>± 2,27 | 0,14   | 0,52<br>± 2,22  | 0,67   |
| <b>chB6</b>   | 0,60<br>± 1,87 | 0,57   | -1,51<br>± 1,52 | 0,14   |

**Tab. 5.10**  $\Delta$ Ct-Werte ausgewählter Gene in Milzlymphozyten adulter Tiere unter CD40L Stimulation

Milzlymphozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. In der Tabelle dargestellt sind die auf den Ct-Wert der 18s rRNA normalisierten und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der CD40L-stimulierten Zellen standardisierten  $\Delta$ Ct-Werte der durchgeführten qPCR-Reaktion.

Der t-test wurde auf  $\Delta$ Ct-Ebene zwischen Kontrollen und stimulierten Zellen durchgeführt.



## **5.8 Wirkung einer RCAS-induzierten Überexpression und einer funktionellen Inhibition von BAFF auf die Expression ausgewählter Gene in der Bursa fabricii**

Die bisher durchgeführten Versuche lieferten bereits Aufschluß über die Abundanz der mRNA ausgesuchter bcl-2 Familienmitglieder, von dem B-Zellmarker chB6 und von chBAFF während der physiologischen Bursaentwicklung und unter Zytokin-Stimulation (chBAFF, chCD40-Ligand) *in vitro*. Eine Betrachtung der Vorgänge auf Transkriptomebene *in vivo* stand allerdings noch aus. Für diese Fragestellung bot sich das RCAS Vektor-System (s. 4.10) an, welches ein Einbringen des chBAFF Konstruktes in den Embryo bereits an Embryonaltag 3 ermöglicht. Neben einem eine BAFF-Überexpression verursachenden Konstrukt wurde zudem ein Vektor verwandt, der die biologisch inaktive Sequenz von chBAFF in der umgekehrten Orientierung (chBAFF reverse) enthielt und somit als Kontrolle für die durch den Vektor verursachten Änderungen verwendet werden konnte. Folglich wurde zur Validierung der Ergebnisse nicht nur eine gänzlich unbehandelte Kontrolle, sondern auch eine mit dem Kontroll-Virus infizierte Gruppe hinzugezogen.

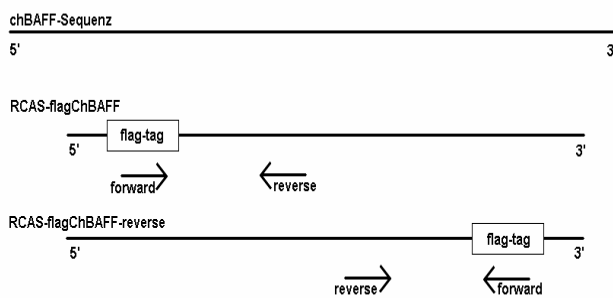
Als drittes Vektorkonstrukt fand die Sequenz für ein Fusionsprotein aus dem Fc-Teil des B-Zellrezeptors und dem humanem BCMA-Rezeptor Verwendung. BCMA ist einer der drei bei Mensch und Maus beschriebenen BAFF-Rezeptoren, dessen Vorkommen beim Huhn allerdings noch nicht beschrieben wurde. Gleichwohl erlaubt die hohe Homologie zwischen humanem und Hühner BAFF die Verwendung des humanen Rezeptors beim Huhn. Mit Hilfe dieses Fusionsproteins sollte ein funktioneller ‚knock down‘ von chBAFF erreicht und somit die Auswirkung eines Fehlens der BAFF-Wirkung auf Transkriptomebene betrachtet werden.

### **5.8.1 Organspezifische Verteilung der RCAS-Konstrukte**

Zur weiteren Validierung der Anwendbarkeit des RCAS-Vektor-Systems beim Huhn und als Grundlage für weitere Arbeiten sollte zuerst die Verteilung der RCAS-Konstrukte in den einzelnen Organen untersucht werden. Von besonderem Interesse war hierbei auch eine Unterscheidbarkeit von natürlich vorkommendem und durch RCAS überexprimiertem chBAFF.

Zu diesem Zweck wurde ein spezielles Primerpaar entworfen, welches lediglich überexprimiertes flagChBAFF und nicht das physiologisch vorhandene Zytokin erkennt (s. Abb. 5.13).

| Interne Primernummer | Sequenz und Orientierung    |
|----------------------|-----------------------------|
| 1235                 | CAAAGACGATGACGATAAAGGA (fw) |
| 1236                 | TCAGAAGCCAAGGGACAATG (rv)   |



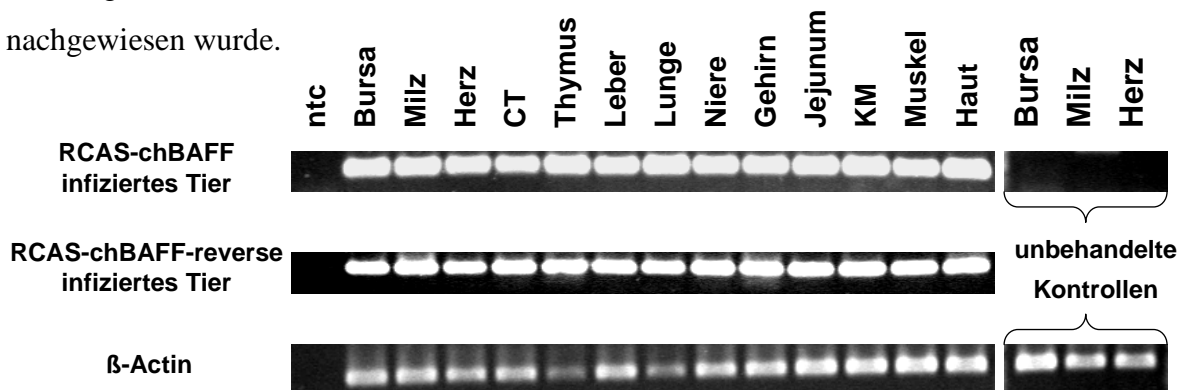
**Abb. 5.13 Darstellung von Sequenz und Spezifität des Primerpaares für RCAS-chBAFF**

Aufgrund der Lage des forward Primers auf dem artifiziellen flag-tag ist eine Amplifizierung von endogenem chBAFF durch dieses Primerpaar nicht möglich. Es erlaubt somit die Unterscheidung zwischen endogenem und über RCAS exprimiertem, 'flag-markiertem' chBAFF.

Neben dem das biologisch aktive chBAFF kodierenden 'RCAS-flagChBAFF' erkennt das entworfene Primerpaar auch das zur Kontrolle verwendete 'RCAS-flagChBAFF-reverse' und ermöglicht so auch die Betrachtung der Verteilung des Transkripts für dieses Konstrukt.

(fw= forward, rv= reverse)

Mit Hilfe dieses Primerpaares war es nun möglich, die organspezifische Verteilung des RCAS-flagChBAFF-Konstruktes nachzuweisen. Die Verteilung wurde zunächst qualitativ mittels konventioneller PCR betrachtet (s. Abb. 5.14). In jedem von den infizierten Tieren gewonnenen Organ konnte das RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. das RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt nachgewiesen werden. Auch konnte die Spezifität des Primerpaares für das RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. für das RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt gezeigt werden, da in den Organen (Bursa, Milz und Herz) aus unbehandelten Kontrolltieren kein Transkript nachgewiesen wurde.



**Abb. 5.14 Organspezifische Transkription von flagChBAFF und flagChBAFF reverse in mit RCAS infizierten Tieren**

Organe eines mit dem RCAS-chBAFF- bzw. eines mit dem RCAS-chBAFF-reverse-infizierten Tieres wurden am Tag des Schlupfes gewonnen, die RNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Es schloß sich eine PCR-Reaktion mit den für überexprimiertes BAFF spezifischen Primern an. Als Kontrollen fand cDNA aus Organen von unbehandelten Tieren Anwendung. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA Menge wurde beta-Actin verwandt. (ntc= non template control/Negativkontrolle)

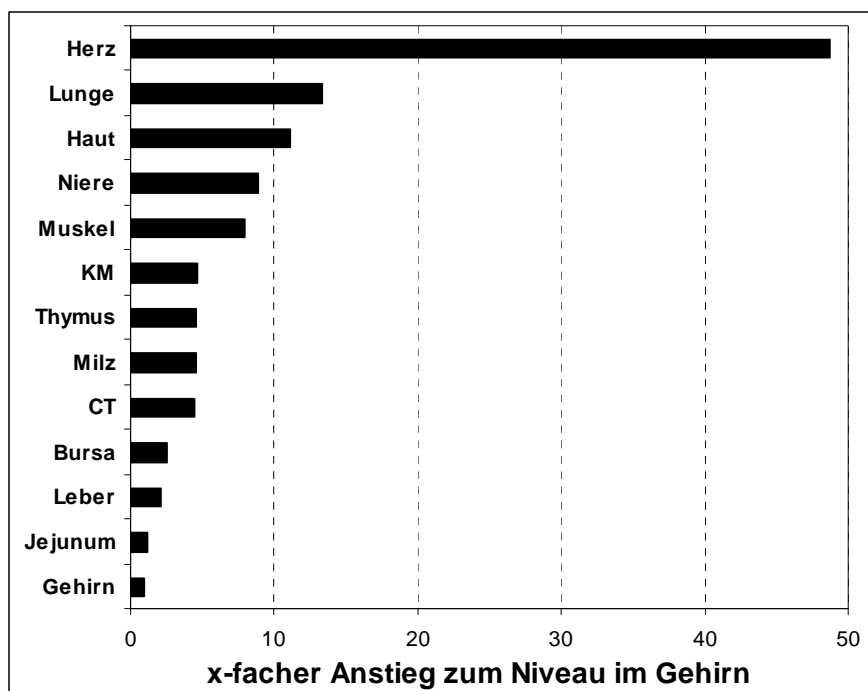
Um mögliche Unterschiede in den Transkriptionsniveaus zwischen den verschiedenen Organen der mit RCAS infizierten Tiere darstellbar zu machen, wurde neben der konventionellen auch eine quantitative PCR Reaktion durchgeführt (s. Tab. 5.11 und Abb. 5.15).

**Tab. 5.11  $\Delta\Delta$ CT-Werte der mRNA Abundanz des mittels RCAS exprimierten chBAFF- bzw. chBAFF-reverse-Konstruktes bei je einem Küken am Tag des Schlupfes**

Die Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen (18s rRNA) normalisiert und auf den  $\Delta$ Ct-Wert des Organs mit der geringsten RCAS-chBAFF-mRNA Menge (Gehirn) standardisiert, um Transkriptionsunterschiede zu veranschaulichen.

(reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infiziertes Tier, KM= Knochenmark, CT=Caecaltonsille)

|         | BAFF  | reverse |
|---------|-------|---------|
| Herz    | -5,70 | -5,52   |
| Lunge   | -4,50 | -2,97   |
| Haut    | -4,36 | -2,59   |
| Niere   | -3,24 | -3,07   |
| Thymus  | -3,09 | -1,31   |
| Milz    | -2,47 | -1,89   |
| Muskel  | -2,41 | -3,55   |
| Bursa   | -2,13 | -0,54   |
| KM      | -2,08 | -2,34   |
| CT      | -1,34 | -2,96   |
| Leber   | -1,10 | -1,05   |
| Jejunum | 0,22  | -0,58   |



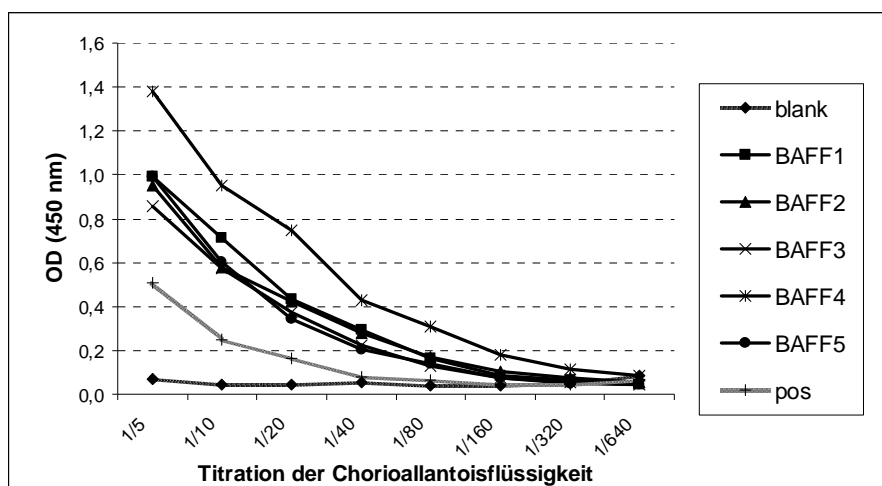
**Abb. 5.15 Organspezifische Unterschiede im Niveau an flagChBAFF-Transkript**

Mittelwerte der  $\Delta\Delta$ CT-Werte des mit flagChBAFF bzw. des mit flagChBAFF reverse infizierten Tieres wurden hier zur Verdeutlichung als Expressionswerte dargestellt. Aufgrund der Standardisierung entspricht das Niveau im Gehirn dem Wert 1. (KM= Knochenmark, CT=Caecaltonsille)

Im Vergleich mit dem internen Standard (Transkriptmenge im Gehirn) findet sich im Herz somit etwa 48mal mehr mRNA des durch RCAS-Infektion überexprimierten chBAFFs. Auch in der Lunge (13mal) und in der Haut (11mal höher) liegt die Transkript-Menge deutlich über der im Gehirn. In den immunologisch besonders relevanten Organen Thymus, Milz und Caecaltonsille ist 4mal mehr mRNA des durch RCAS-Infektion induzierten chBAFFs nachweisbar, in der Bursa 2,5mal mehr.

### 5.8.2 Wirkung der chBAFF-Überexpression im 18 Tage alten Embryo (ET18)

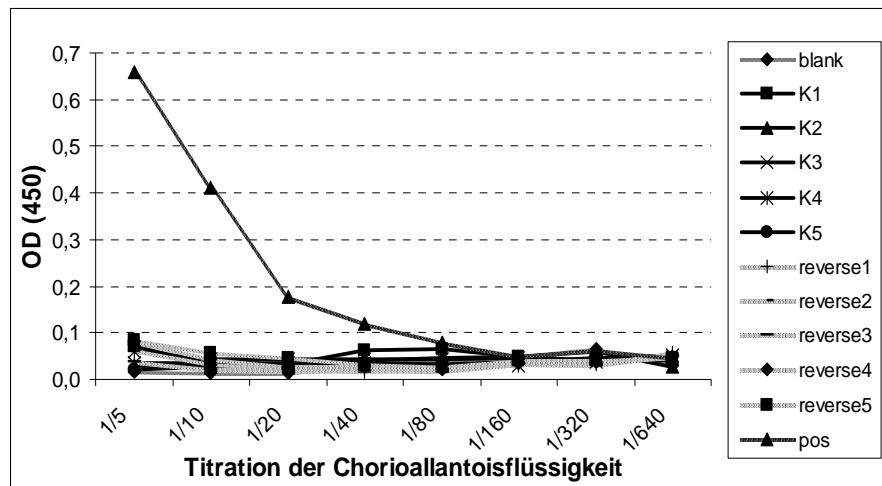
Die zuvor beschriebenen Versuche haben gezeigt, dass eine Infektion von 3 Tage alten Embryonen zu einer deutlichen Überexpression von flagChBAFF in allen untersuchten Organen und somit auch in der Bursa führt. Der Nachweis von Transkripten erlaubt allerdings keinen Rückschluß auf die Synthese des biologisch aktiven Proteins. Um diese zu prüfen, wurde in weiteren Versuchen daher der Nachweis der erfolgreichen Proteinsynthese vorausgeschickt. Dieser wurde mittels ELISA-Verfahren erbracht. So wiesen die Chorioallantoisflüssigkeiten aller fünf mit dem flagChBAFF-Konstrukt infizierten Tiere einen flagChBAFF –Titer auf (s. Abb. 5.16).



**Abb. 5.16 Nachweis der RCAS induzierten flagChBAFF Expression mittels ELISA**

Fünf Embryonen wurden an ET3 mit dem RCAS-flagChBAFF-Konstrukt infiziert. Die Chorioallantoisflüssigkeit wurde an ET18 gewonnen und mittels ELISA-Verfahren wie in 4.11.2 beschrieben analysiert. Als Ausgangsverdünnung diente eine 1:5 Verdünnung in PBS. (blank= negativ Kontrolle, pos= positiv Kontrolle/chBAFF-haltiger Zellkultur-Überstand in einer 1:10 Verdünnung mit PBS)

Auch die Chorioallantoisflüssigkeit der fünf Kontrolltiere bzw. der fünf mit dem flagChBAFF-reverse-Konstrukt infizierten Tiere wurden mittels ELISA-Verfahren getestet. In diesen Chorioallantoisflüssigkeiten ließ sich kein chBAFF nachweisen (s. Abb. 5.17). Somit konnten sowohl die Organe der fünf flagChBAFF-infizierten ET18 Embryonen wie auch jene der fünf mit dem reverse-Konstrukt infizierten bzw. der unbehandelten Embryonen verwendet werden.



**Abb. 5.17 Nachweis der Verwendbarkeit der Kontrollen mittels ELISA**

Fünf Embryonen wurden an ET3 mit dem RCAS-flagChBAFF-reverse-Konstrukt infiziert. An ET18 wurde die Chorioallantoisflüssigkeit dieser wie auch jene von fünf unbehandelten Kontrolltieren gewonnen und mittels ELISA-Verfahren wie in 4.11.2 beschrieben analysiert. Als Ausgangsverdünnung diente eine 1:5 Verdünnung in PBS. (blank= negativ Kontrolle, K= Kontrolle, reverse= mit dem RCAS-flagChBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere, pos= positiv Kontrolle/ chBAFF-haltiger Zellkultur-Überstand in einer 1:10 Verdünnung mit PBS)

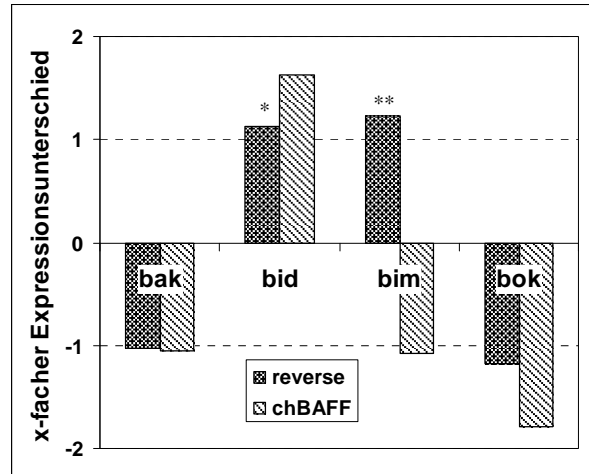
Nachdem der Erfolgsnachweis der RCAS-Infektion erbracht werden konnte, sollte die Wirkung der chBAFF-Überexpression auf Transkriptionsebene analysiert werden. Somit schloss sich die Auswertung der Transkriptionsniveaus von pro- und anti-apoptischen bcl-2 Familienmitgliedern sowie der von chBAFF und dem B-Zellmarker chB6 mittels qPCR an.

Für die Transkriptionsniveaus der pro-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder (s. Tab. 5.12 und Abb. 5.18) konnte unter chBAFF-Überexpression ein Anstieg von bid (1,6fach erhöht gegenüber den Kontrollen) gezeigt werden. Zudem ließ sich ein signifikanter Transkriptionsunterschied im Niveau von bim zwischen den Kontrollen und den flagChBAFF-reverse infizierten Bursen darstellen (1,22mal mehr als in den Kontrollen).

|            | reverse         | t-test | chBAFF          | t-test |
|------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>bak</b> | 0,03<br>± 0,34  | 0,85   | 0,08<br>± 0,50  | 0,76   |
| <b>bid</b> | -0,17<br>± 0,30 | 0,47   | -0,70<br>± 0,48 | 0,04   |
| <b>bim</b> | -0,29<br>± 0,11 | <0,01  | 0,12<br>± 0,41  | 0,60   |
| <b>bok</b> | 0,23<br>± 0,33  | 0,21   | 0,83<br>± 0,84  | 0,06   |

Tab. 5.12 und Abb. 5.18  $\Delta\Delta$ CT-Werte und Expressionsniveaus der pro-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren

Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen (18s rRNA) normalisiert und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisiert, um Transkriptionsunterschiede zur Kontrolle zu veranschaulichen.  $\Delta\Delta$ CT-Werte wurden zudem zur Verdeutlichung als Expressionsniveaus dargestellt. Der t-test drückt Signifikanzen im Vergleich zur Abundanz der mRNA in den Kontrollbursen aus. Die gezeigten Werte stellen Mittelwerte von fünf Tieren je Gruppe dar. (reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere)

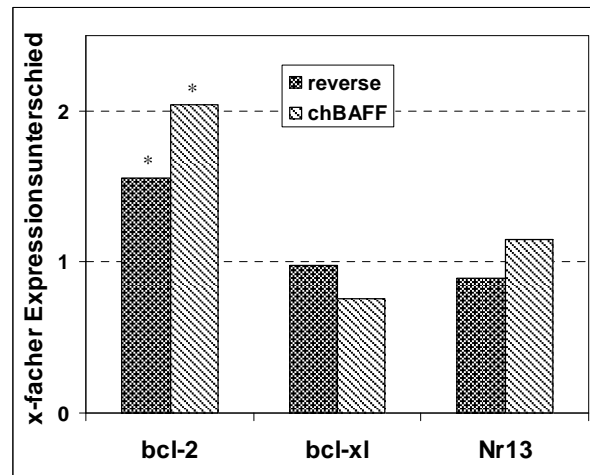


Auch bei der Betrachtung der mRNA Abundanz anti-apoptotischer bcl-2 Familienmitglieder fällt auf, dass signifikante Unterschiede zwischen der mit dem RCAS-reverse-Konstrukt infizierten Gruppe und der Kontrollgruppe auftreten (s. Tab. 5.13 und Abb. 5.19). So konnte ein signifikanter Anstieg des Transkriptionsniveaus von bcl-2 zum einen in der mit RCAS-flagChBAFF (2fach) und zum anderen in der mit dem reverse-Konstrukt infizierten Gruppe (1,5fach erhöht zur Kontrolle) gezeigt werden.

|               | reverse         | t-test | chBAFF          | t-test |
|---------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>bcl-2</b>  | -0,64<br>± 0,38 | 0,04   | -1,03<br>± 0,54 | 0,02   |
| <b>bcl-xl</b> | 0,03<br>± 0,21  | 0,84   | 0,39<br>± 0,43  | 0,13   |
| <b>Nr13</b>   | 0,16<br>± 0,27  | 0,44   | -0,20<br>± 0,60 | 0,44   |

Tab. 5.13 und Abb. 5.19  $\Delta\Delta$ CT-Werte und Expressionsniveaus der anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren

Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen (18s rRNA) normalisiert und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisiert, um Transkriptionsunterschiede zur Kontrolle zu veranschaulichen.  $\Delta\Delta$ CT-Werte wurden zudem zur Verdeutlichung als Expressionsniveaus dargestellt. Der t-test drückt Signifikanzen im Vergleich zur Abundanz der mRNA in den Kontrollbursen aus. Die gezeigten Werte stellen Mittelwerte von fünf Tieren je Gruppe dar. (reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere)

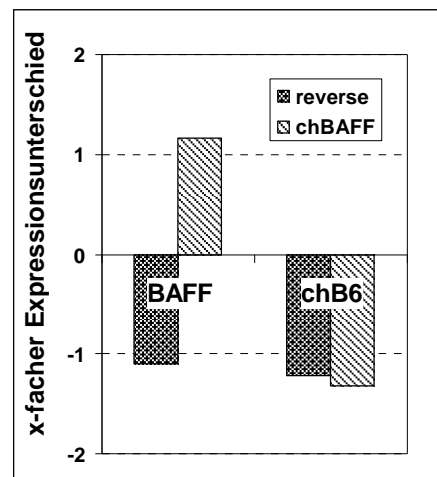


Zudem war wiederum das Transkriptionsniveau von endogenem chBAFF und dem B-Zellmarker chB6 von Interesse (s. Tab. 5.14 und Abb. 5.20). Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und Kontrolltieren.

|             | reverse        | t-test | chBAFF          | t-test |
|-------------|----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>BAFF</b> | 0,14<br>± 0,51 | 0,72   | -0,23<br>± 0,46 | 0,56   |
| <b>chB6</b> | 0,27<br>± 0,31 | 0,28   | 0,40<br>± 0,97  | 0,42   |

**Tab. 5.14 und Abb. 5.20  $\Delta\Delta$ CT-Werte und Expressionsniveaus der anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-chBAFF-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren**

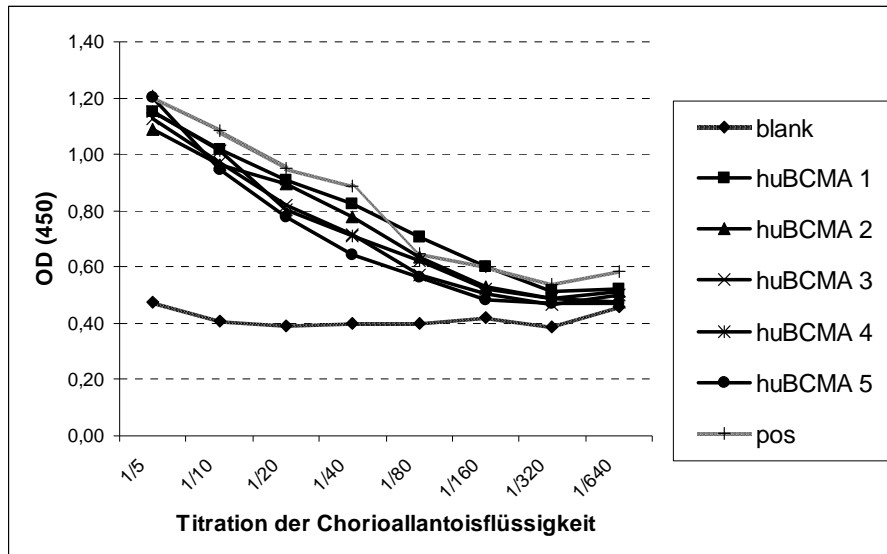
Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen (18s rRNA) normalisiert und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisiert, um Transkriptionsunterschiede zur Kontrolle zu veranschaulichen.  $\Delta\Delta$ CT-Werte wurden zudem zur Verdeutlichung als Expressionsniveaus dargestellt. Der t-test drückt Signifikanzen im Vergleich zur Abundanz der mRNA in den Kontrollbursen aus. Die gezeigten Werte stellen Mittelwerte von fünf Tieren je Gruppe dar. (reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere)



### 5.8.3 Auswirkung einer Hemmung von chBAFF auf Embryonen an Tag 18 (ET18)

Wie unter 5.8 ausgeführt, sollte der RCAS-Vektor für zwei unterschiedliche Fragestellungen verwendet werden. Zum einen wurden die Auswirkungen einer chBAFF-Überexpression auf Transkriptomebene analysiert, die Ergebnisse finden sich unter 5.8.2. Zum anderen sollte auch die durch einen chBAFF-Mangel induzierten Änderungen betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurden fünf Hühnerembryonen an Embryonaltag 3 mit einem Vektor für das Fusionsprotein aus dem Fc-Teil des humanen IgGs und dem BAFF-Rezeptor BCMA infiziert. Da BCMA beim Huhn noch nicht beschrieben werden konnte, wurde das humane Protein verwendet. Dieses ist aufgrund der hohen Homologie zwischen humanem und Hühner BAFF möglich. Mittels der Expression dieses löslichen BAFF-Rezeptors war es nun möglich, endogenes chBAFF zu binden und somit eine Hemmung der BAFF-vermittelten Wirkung zu erreichen.

Um die biologische Aktivität und erfolgreiche Synthese des BCMA-Fc-Fusionsproteins nachweisen zu können, wurde auch für diese Gruppe der fünf RCAS-infizierten Tiere ein spezieller ELISA durchgeführt (s. Abb. 5.21). Neben dem Nachweis der biologischen Aktivität lieferte dieses ELISA-Verfahren zudem auch den Beweis der Bindung des huBCMA-Fusionsproteins an chBAFF, da das Fusionsprotein über seine Bindung an flagChBAFF auf der ELISA-Platte detektiert wurde (s. 4.11.3).



**Abb. 5.21 Nachweis der RCAS vermittelten huBCMA-Fc Expression mittels ELISA**

Fünf Embryonen wurden an ET3 mit dem RCAS-huBCMA-Fc-Konstrukt infiziert. Die Chorioallantoisflüssigkeit wurde an ET18 gewonnen und mittels ELISA-Verfahren wie in 4.11.3 beschrieben analysiert. Als Ausgangsverdünnung diente eine 1:5 Verdünnung in PBS. (blank= negativ Kontrolle, pos= positiv Kontrolle/huBCMA-haltiger CEF Zellkultur-Überstand)

Auch für die Bewertung der Transkriptionsniveauänderungen durch die Expression von huBCMA wurden sowohl fünf unbehandelte Kontrolltiere als auch fünf mit dem RCAS-reverse-chBAFF-Konstrukt infizierte Tiere herangezogen (s. Abb. 5.17). Somit war es möglich, neben Unterschieden zu den unbehandelten Tieren auch die eventuell durch den Vektor verursachten Änderungen zu analysieren.

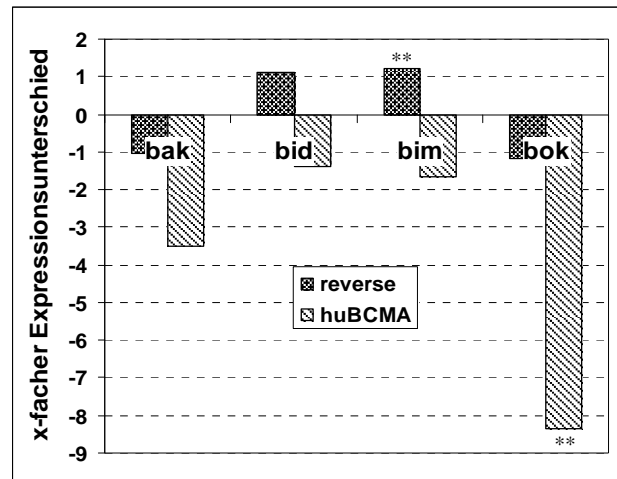
Die pro-apoptotisch wirkenden Proteine der bcl-2 Familie zeigen unter huBCMA-Fc Einwirkung eine deutliche Reduktion ihrer mRNA Niveaus (s. Tab. 5.15 und Abb. 5.22). Besonders auffällig war die signifikante Erniedrigung der mRNA Menge des pro-apoptotischen Proteins bok (8mal weniger als in den Kontrollbursen).



|            | reverse         | t-test | huBCMA         | t-test |
|------------|-----------------|--------|----------------|--------|
| <b>bak</b> | 0,03<br>± 0,34  | 0,85   | 1,80<br>± 1,82 | 0,06   |
| <b>bid</b> | -0,17<br>± 0,30 | 0,47   | 0,48<br>± 0,59 | 0,17   |
| <b>bim</b> | -0,29<br>± 0,11 | <0,01  | 0,73<br>± 0,69 | 0,08   |
| <b>bok</b> | 0,23<br>± 0,33  | 0,21   | 3,06<br>± 1,71 | <0,01  |

**Tab. 5.15 und Abb. 5.22  $\Delta\Delta$ CT-Werte und Expressionsniveaus der pro-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren**

Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen (18s rRNA) normalisiert und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisiert, um Transkriptionsunterschiede zur Kontrolle zu veranschaulichen.  $\Delta\Delta$ CT-Werte wurden zudem zur Verdeutlichung als Expressionsniveaus dargestellt. Der t-test drückt Signifikanzen im Vergleich zur Abundanz der mRNA in den Kontrollbursen aus. Gezeigte Werte stellen Mittelwerte von fünf Tieren je Gruppe dar. (reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere)

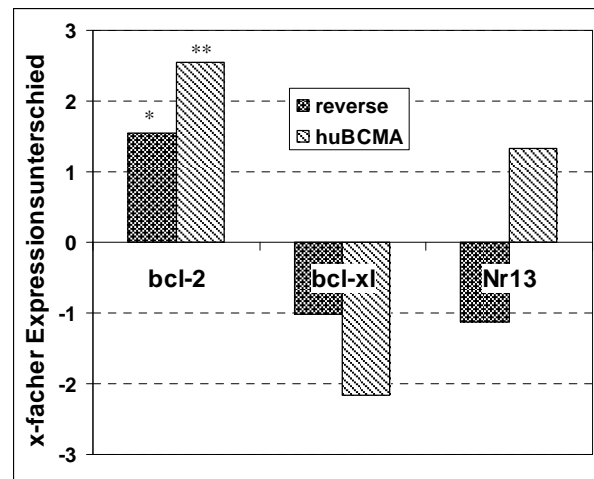


Auffällig ist, dass sich die generelle Reduktion der Transkriptionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder bei den anti-apoptotischen Mitgliedern nur bei bcl-x<sub>L</sub> (2mal weniger als in den unbehandelten Kontrollen) finden lässt. Niveaus an Nr13 (1,3fach) und bcl-2 (2,5fach mehr) sind gegenüber Kontrollen und mit dem RCAS-reverse-Konstrukt infizierten Tieren zum Teil höchst signifikant erhöht (s. Tab. 5.16 und Abb. 5.23).

|               | reverse         | t-test | huBCMA          | t-test |
|---------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>bcl-2</b>  | -0,64<br>± 0,38 | 0,04   | -1,35<br>± 0,11 | <0,01  |
| <b>bcl-xl</b> | 0,03<br>± 0,21  | 0,84   | 1,11<br>± 0,74  | 0,02   |
| <b>Nr13</b>   | 0,16<br>± 0,27  | 0,44   | -0,42<br>± 0,41 | 0,12   |

**Tab. 5.16 und Abb. 5.23  $\Delta\Delta$ CT-Werte und Expressionsniveaus der anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder in Bursen von mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren**

Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen (18s rRNA) normalisiert und auf den  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollen standardisiert, um Transkriptionsunterschiede zur Kontrolle zu veranschaulichen.  $\Delta\Delta$ CT-Werte wurden zudem zur Verdeutlichung als Expressionsniveaus dargestellt. Der t-test drückt Signifikanzen im Vergleich zur Abundanz der mRNA in den Kontrollbursen aus. Gezeigte Werte stellen Mittelwerte von fünf Tieren je Gruppe dar. (reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere)



Betrachtet man nun erneut das Niveau an transkribierter BAFF mRNA, so fällt auf, dass es scheinbar zu keiner Erhöhung unter BAFF-Mangel (Niveau nur um 0,14  $\Delta\Delta$ Ct-Werte unterschiedlich zu den Kontrollen) kommt (s. Tab. 5.17 und Abb. 5.24). Allerdings fällt die

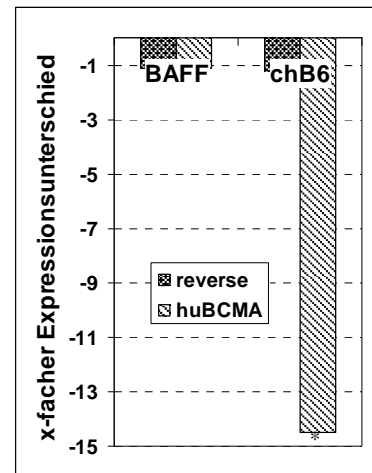
signifikante Differenz an chB6 mRNA in Bursen von mit RCAS-huBCMA-infizierten Tieren auf. In diesen Bursen ist die Menge an chB6 Transkript um das 14fache gegenüber den Kontrollen erniedrigt.

|             | reverse        | t-test | huBCMA         | t-test |
|-------------|----------------|--------|----------------|--------|
| <b>BAFF</b> | 0,14<br>± 0,51 | 0,72   | 0,14<br>± 1,04 | 0,82   |
| <b>chB6</b> | 0,27<br>± 0,31 | 0,28   | 3,85<br>± 3,59 | 0,04   |

**Tab. 5.17 und Abb. 5.24  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte der mRNA Abundanz von BAFF und chB6 in Bursen der mit dem RCAS-huBCMA-Konstrukt bzw. dem reverse-Konstrukt transfizierten Tieren**

Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen (18s rRNA) normalisiert und auf den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Kontrollen standardisiert, um Transkriptionsunterschiede zur Kontrolle zu veranschaulichen. Der t-test drückt Signifikanzen im Vergleich zur Abundanz der mRNA in den Kontrollbursen aus. Gezeigte Werte stellen Mittelwerte von fünf Tieren je Gruppe dar.

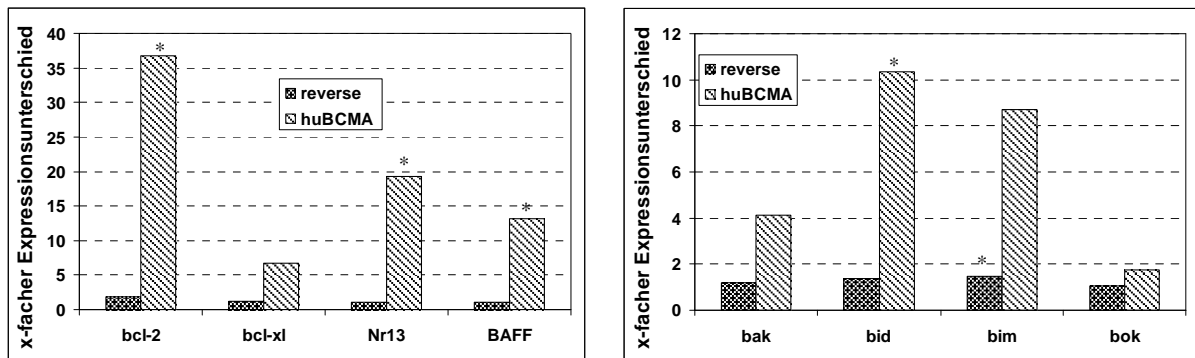
(reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere)



Aufgrund der signifikanten Reduktion an dem Hühner B-Zellmarker chB6 unter huBCMA Einwirkung (über 14fach reduziert gegenüber den Kontrollen) erschien es unabdingbar, die bereits global für die Bursa erhobenen mRNA Abundanzen der bcl-2 Familienmitglieder und von chBAFF zur besseren Vergleichbarkeit auch auf die chB6 Expression zu beziehen. Zu diesem Zweck wurde der  $\Delta\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert herangezogen.

Nach Normalisierung auf den Ct-Wert der 18s rRNA wurden die resultierenden  $\Delta\text{Ct}$ -Wert auf die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der Kontrollen standardisiert und schließlich auf die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte des B-Zell Markers chB6 bezogen. Mit diesem Wert ließ sich ein Transkriptionsniveau errechnen, dass Aufschluß über die Vorgänge bezogen auf die B-Zellzahl gibt (s. Tab. 5.18 und Abb. 5.26).

Unter Verwendung des chB6-Wertes ergibt sich eine Erhöhung des BAFF Transkripts bei unter huBCMA-Einfluß stehenden Zellen gegenüber den Kontrollen um den Faktor 13. Auch die Niveaus an bcl-xL (6fach) und Nr13 (19fach) sind stark erhöht. Am prominentesten unter den anti-apoptotisch wirkenden bcl-2 Familienmitgliedern erscheint allerdings bcl-2, welches um den Faktor 36 gegenüber unbehandelten Kontrollen erhöht ist. Auch bei den pro-apoptotisch wirkenden bcl-2 Familienmitgliedern fällt eine deutlich Erhöhung der Transkriptionsniveaus gegenüber den Kontrollen und den mit flagChBAFF-reverse-Konstrukt infizierten Bursen auf. Allerdings fällt diese Erhöhung (am deutlichsten bid mit einer 10fachen Erhöhung) nicht so deutlich aus, wie bei den anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern.



**Tab. 5.18 und Abb. 5.25  $\Delta\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der auf die Expression an chB6 bezogenen Transkriptionsniveaus der auf die Kontrollen standardisierten pro- und anti-apoptischen Gene unter huBCMA-Einfluß**

Die Bursen von fünf mit RCAS-huBCMA-Fc infizierten Tieren wurden an ET18 entnommen und für die Verwendung in der qPCR zu cDNA verarbeitet. Zur Verdeutlichung dargestellt sind Expressionsniveaus errechnet aus dem  $\Delta\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert (s. Text). Der t-test drückt Signifikanzen im Vergleich zur Abundanz der mRNA in den Kontrollbursen aus. Gezeigte Werte stellen Mittelwerte von fünf Tieren je Gruppe dar. (reverse= mit dem RCAS-chBAFF-reverse-Konstrukt infizierte Tiere)

|               | reverse         | t-test | huBCMA          | t-test |
|---------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| <b>bcl-2</b>  | -0,91<br>± 0,56 | 0,06   | -5,20<br>± 3,18 | 0,03   |
| <b>bcl-xl</b> | -0,25<br>± 0,28 | 0,53   | -2,74<br>± 2,60 | 0,12   |
| <b>Nr13</b>   | -0,11<br>± 0,18 | 0,57   | -4,27<br>± 3,13 | 0,03   |
| <b>BAFF</b>   | -0,13<br>± 0,66 | 0,94   | -3,71<br>± 2,42 | 0,04   |
| <b>bak</b>    | -0,24<br>± 0,40 | 0,39   | -2,05<br>± 3,52 | 0,28   |
| <b>bid</b>    | -0,44<br>± 0,28 | 0,14   | -3,37<br>± 2,73 | 0,04   |
| <b>bim</b>    | -0,57<br>± 0,19 | 0,05   | -3,12<br>± 2,68 | 0,09   |
| <b>bok</b>    | -0,04<br>± 0,23 | 0,83   | -0,79<br>± 1,92 | 0,44   |

## 6 Diskussion

Die Kenntnisse über die Funktionsweise des Immunsystems beim Modelltier Huhn erweisen sich trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte auf diesem Gebiet immer noch als höchst unzulänglich. Lange ist bereits bekannt, dass sich beim Huhn die B-Zellen, jene für die humorale Abwehr verantwortlichen Lymphozyten, in einem speziellen Organ, der Bursa fabricii, entwickeln. Eine Besonderheit stellt dar, dass dieses Organ nicht während des gesamten Lebenszyklus des Huhns aktiv ist, sondern bereits im Alter von 3-4 Monaten erste Anzeichen der Rückbildung zeigt und schließlich mit 6 Monaten komplett involuiert [69, 298]. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu den Vorgängen bei Maus und Mensch. Hier findet die Reifung der B-Zellen lebenslang in dem bei diesen Spezies für die B-Zellgenese verantwortlichen Knochenmark statt [299, 300]. Im Gegensatz zu Maus und Mensch muss das Huhn somit lebenslang auf den in den ersten 6 Monaten generierten B-Zellpool zurückgreifen. Infolgedessen kommt der Regulation der B-Zell Homöostase beim Huhn eine andere Bedeutung zu, als dies im murinen oder humanen Organismus vonnöten wäre.

Als wichtiger Regulator der Homöostase des B-Zellpools konnte bei Mensch und Maus bereits das Zytokin BAFF (B-Zell aktivierender Faktor der Tumornekrosefaktor-Familie) charakterisiert werden [148, 149, 158]. Dieses Mitglied der TNF-Familie, welche sich aus Liganden, die über spezielle TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ihre mannigfaltige Wirkung erzielen, zusammensetzt, zeichnet sich durch seinen starken anti-apoptischen Effekt auf B-Zellen aus. *In vitro* überleben B-Zellen unter BAFF Stimulation länger und *in vivo* führen erhöhte BAFF-Spiegel sogar zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen [211, 212, 301]. Krankheiten wie der systemische Lupus erythematoses oder das Sjögrens Syndrom werden normalerweise durch die Apoptose der sie auslösenden autoreaktiven B-Zellen verhindert. Bei Maus und Mensch konnte man diesen anti-apoptischen Effekt von BAFF bereits mit einer Änderung im Verhältnis der pro- und anti-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder in Verbindung bringen [295, 302, 303]. Die bcl-2 Familie besteht aus Proteinen, die das mitochondriale Membranpotential regulieren und somit die zur Apoptose führende Caspase-Kaskade auslösen oder verhindern können.

Die anti-apoptische BAFF-Wirkung konnte auch beim Huhn nach der Charakterisierung von Hühner BAFF (chBAFF) bereits beschrieben werden [13, 14, 304], die dieser Wirkung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden aber noch nicht analysiert. Zwar wurden bereits einige Vertreter der bcl-2 Familie für das Huhn charakterisiert [251, 287], ein

regulatorischer Zusammenhang mit einer Zytokin-Wirkung konnte aber noch nicht gezeigt werden.

## 6.1 Etablierung einer Auswahl an PCR-Primern

Um die anti-apoptotische BAFF-Wirkung auch beim Huhn besser charakterisieren zu können, mussten für diese Arbeit entsprechende Nachweisverfahren erst etabliert werden. Wie bereits erwähnt, stellt die Regulation der bcl-2 Familienmitglieder einen wichtigen Schritt im BAFF-vermittelten Überleben von murinen und humanen B-Zellen dar. Somit lag es nahe, die Änderungen der Transkription dieser Gene unter BAFF-Stimulation beim Huhn zu betrachten. Hierzu wurde als Erstes die klassische PCR durchgeführt, um Aufschluss über die Verteilung und eventuelle Regulation der bcl-2 Familienmitglieder zu liefern. Es wurden Primer für anti-apoptotische Moleküle (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>, Nr13), pro-apoptotische Moleküle (bak, bok) und Vertreter der ‚BH3-only‘ Subgruppe, welche ebenfalls anti-apoptotisch wirken, generiert. Für jedes dieser Primerpaare wurden mittels Temperaturgradienten die geeignetsten PCR-Protokolle generiert und die Spezifität durch PCR-Produkt Sequenzierung sichergestellt. Somit steht nun eine Auswahl an spezifischen PCR-Primern für die bcl-2 Familienmitglieder des Huhns zur Verfügung.

## 6.2 Nachweis der Transkription der bcl-2 Familienmitglieder beim Huhn *in vitro* und *in vivo*

Um etwaige chBAFF-induzierte Änderungen in der Transkription der bcl-2 Familienmitglieder beim Huhn *in vivo* zeigen zu können, sollten diese zuerst in einem gut charakterisierten *in vitro* System betrachtet werden. Hierfür bot sich die bursale B-Zelllinie DT40 an. Diese durch das aviäre Leukose Virus transformierte Zelllinie wurde schon häufig für Fragestellungen die Immunologie des Huhns betreffend verwendet [305-307].

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl pro- wie auch anti-apoptotische Proteine in DT40 Zellen transkribiert werden. Diese Transkription findet sowohl in unbehandelten wie auch in mit chBAFF inkubierten Zellen statt. Somit entspricht das Vorhandensein von Transkript für die bcl-2 Familienmitglieder beim Huhn den publizierten Ergebnissen bei Mensch und Maus. Auch vor humanem bzw. murinem Hintergrund konnten Transkripte für bcl-2

Familienmitglieder *in vitro* sowohl in unbehandelten wie auch in BAFF stimulierten Zellen gezeigt werden [257, 295, 308].

Das zur Apoptoseinduktion verwendete Staurosporin führte nach 8 h zu einer Reduktion des Transkripts der *bcl-2* Familienmitglieder. Staurosporin wirkt über die Hemmung der Proteinkinase C, welche über einen Zytokin-vermittelten Signalweg zum Überleben der Zellen durch Hemmung des pro-apoptotischen Proteins *bax* beiträgt [309]. Eine Herunterregulation von *bcl-2* Protein unter Staurosporin-Einwirkung konnte bereits für humane Leberzelllinien beschrieben werden [310]. Allerdings gab es bisher keine entsprechenden Daten für die DT40-Zelllinie bzw. das Transkriptionsniveau der *bcl-2* Familienmitglieder unter Staurosporin-Inkubation. Der hier beobachtete Effekt einer eventuellen Reduktion an Transkript der pro-apoptotischen *bcl-2* Familienmitglieder *bok* und *bim* nach 8 h wurde so noch nicht beschrieben. Bisher konnte nach Staurosporin-Stimulation einer Zelllinie lediglich eine Steigerung in der Menge an *bax* Protein, ein für das Huhn noch nicht charakterisiertes, pro-apoptotisches Mitglied der *bcl-2* Familie, gezeigt werden [311].

Für eine Betrachtung der Vorgänge *in vivo* musste zuerst untersucht werden, wie sich das Verhältnis pro- und anti-apoptotischer *bcl-2* Familienmitglieder beim Huhn unter physiologischen Bedingungen darstellt. Zu diesem Zweck und zur Eruiierung eines geeigneten Zeitpunktes für spätere Versuche wurde die Transkription dieser Proteine zu definierten Zeitpunkten der Organogenese von Bursa, Milz und Herz betrachtet. Als für die Entwicklung der immunologischen Organe relevante Zeitpunkte wurden der Embryonaltag 10, zu dem erste B-Zellvorläufer die Bursa erreichen [35-37], der Embryonaltag 14, welcher durch ein hohes Maß an proliferativer Tätigkeit der B-Zellen und den Vorgang der ‚gene conversion‘ in der Bursa charakterisiert wird [38-42], der Embryonaltag 18, an dem erste B-Zellen die Bursa verlassen und in periphere lymphatische Organe wie die Milz immigrieren [53], sowie der Tag des Schlupfes, Tag 1, erachtet. Zudem sollten mögliche Änderungen bei 3 Wochen alten, juvenilen Tieren betrachtet werden. Neben den immunologisch-bedeutenden Organen Bursa und Milz wurde zum Vergleich auch das immunologisch weniger relevante Herz betrachtet. Hierdurch sollten global entwicklungsbedingte Änderungen in der Transkription der *bcl-2* Familienmitglieder von rein die zentralen bzw. peripheren immunologischen Organe (Bursa, Milz) betreffenden unterscheidbar gemacht werden.

Während der Organogenese von Bursa und Milz konnten sowohl die anti- (*bcl-2*, *bcl-x<sub>L</sub>*, Nr13) wie auch die pro-apoptotischen (*bak*, *bid*, *bim*, *bok*) *bcl-2* Familienmitglieder zu jedem der als relevant erachteten Zeitpunkte nachgewiesen werden. Dieser Befund stimmt mit bereits publizierten Ergebnissen überein. So wurden *bcl-2* [251], *bcl-x<sub>L</sub>* [63] sowie Nr13

Transkript [264] bereits in der Bursa beschrieben. Von den pro-apoptischen Mitgliedern der bcl-2 Familie wurde bisher nur bok Transkript in der Bursa charakterisiert [281]. Somit gelang es in dieser Arbeit zum ersten Mal, bak und bim Transkript in der Bursa nachzuweisen. Bid Transkript wurde bereits in Herz und Leber von Hühnerembryonen [287], allerdings ebenfalls noch nicht in der Bursa dargestellt.

### **6.3 Etablierung einer Auswahl an Primern für die quantitative PCR**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl Vertreter der pro- (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>, Nr13) und der anti-apoptischen (bak, bok) wie auch Mitglieder der ‚BH3-only‘ Subgruppe (bid, bim) der bcl-2 Familie während einer Stimulation mit chBAFF wie auch während der physiologischen Bursaentwicklung vorhanden sind, stellte sich die Frage nach den Änderungen im Transkriptionsniveau dieser Gene. Dem bcl-2 ähnliche Proteine werden kontinuierlich transkribiert und es ist eher ihr Verhältnis zueinander bzw. Abweichungen vom physiologischen Niveau als das komplette Fehlen einer Transkription, das schlussendlich zur Apoptose bzw. deren Ausbleiben führt. Somit erschien es höchst sinnvoll, dem initialen qualitativen Nachweis dieser Gene auch einen quantitativen anzuschließen.

Um quantitative Aussagen über bcl-2 Familienmitglieder machen zu können, wurde das Verfahren der quantitativen PCR gewählt. Auch für dieses Nachweisverfahren wurden für ausgewählte Vertreter der bcl-2 Familie Primer erstellt, wobei besonderer Wert auf eine einheitliche Annealing Temperatur (59°C) und eine hohe Spezifität der Primer gelegt wurde. Gleiche Ansprüche wurden auch an die Primer für endogenes chBAFF und chB6 gestellt. ChB6 ist ein Hühner spezifischer B-Zellmarker [297, 312], der Aufschluss über den Anteil an B-Zellen in den untersuchten Proben liefern sollte. Nach der Erstellung von Standardkurven zur Verifizierung von Effizienz und Linearität der qPCR-Reaktion im relevanten Bereich schloss sich die Sequenzierung jedes PCR-Produktes an.

Dem Wesen der quantitativen PCR entsprechend muss ein Housekeeping-Gen verwendet werden, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Proben gewährleisten zu können. In der Literatur finden sich verschiedenste Gene, die sich aufgrund ihrer stabilen Transkription zur Normalisierung eignen [313-315]. Aufgrund der intendierten Anwendung für Zytokin stimulierte Zellen bzw. Organe wurde aus drei getesteten Genen ( $\beta$ Actin,

GAPDH, 18s rRNA) das Gen für die 18s rRNA als am besten geeignet befunden. Die Eignung für viral-infizierte Gewebe entspricht bereits publizierten Ergebnissen [316].

## **6.4 Transkriptionsniveaus ausgesuchter Gene während der physiologischen Bursaentwicklung**

Das Organ, welches beim Huhn für die Reifung der B-Zellen verantwortlich ist, die Bursa fabricii, unterliegt während der Embryonalentwicklung großen strukturellen Veränderungen. Von der ersten Anlage der Bursa, welche sich um den Embryonaltag 5 aus einer dorso-kaudalen Ausstülpung der Kloake entwickelt [22], bis hin zur Involution mit dem Erreichen der Geschlechtsreife [298] lassen sich nicht nur morphologische Unterschiede erkennen. So ändert sich auch die Zusammensetzung des bursalen Gewebes stark. Das zu Beginn vorherrschende Bild einer epithelialen Struktur wird um den Embryonaltag 10 durch die Immigration erster B-Zellvorläufer aus Dottersack und Leber [35] ergänzt. Diese Zellen beginnen nach erfolgreicher ‚gene conversion‘ [8, 48, 50, 317] ab dem Embryonaltag 14 mit ihrer Proliferation [318, 319]. Zeitgleich kommt es in hohem Maße zur Apoptose jener B-Zellen, deren B-Zellrezeptor nicht funktionell ist [58, 66]. Apoptose spielt auch für die Bursa als Gesamtorgan im Zuge ihrer Entwicklung eine immer größere Rolle und führt schließlich zu ihrer Involution.

In wie weit sich diese Vorgänge auf Transkriptomebene verfolgen und erklären lassen, wurde nun unter Verwendung der neu etablierten qPCR-Primer adressiert. Wie bereits unter 6.2 ausgeführt, lassen sich sowohl die Transkripte pro- wie auch die anti-apoptotisch wirkender bcl-2 Familienmitglieder während der Bursaentwicklung nachweisen. Unterschiede im Niveau der Transkription lassen sich mit der konventionellen PCR allerdings nicht zeigen.

Anders stellt sich dies bei der qPCR dar. So konnte ein deutlicher Anstieg des Transkriptionsniveaus des pro-apoptotischen Proteins bok während der Embryogenese der Bursa und der Entwicklung nach dem Schlupf gezeigt werden (26fache Erhöhung zwischen ET10 und 3 Wochen altem Tier) (s. Tab. 5.3). Eine Beobachtung, die bereits publiziert wurde [281]. Noch nicht in der Literatur dokumentiert ist allerdings der Anstieg der Transkription des pro-apoptotischen Proteins bim, welches in 3 Wochen alten Tieren 5mal öfter transkribiert wird als zum Embryonaltag 10.

Bei der Analyse der Transkriptionsniveaus anti-apoptotischer Proteine fiel auch in der hier durchgeführten Analyse der Abfall an bcl-2 auf. Dieser konnte bereits mehrfach im



Zusammenhang mit der Entwicklung der Bursa beschrieben werden [63, 251, 320]. Interessanterweise konnte ein Anstieg der Transkription des anti-apoptotischen Proteins *bcl-x<sub>L</sub>* beobachtet werden (s. Tab. 5.3). Auch von anderen Gruppen wurde dies bereits gezeigt [264]. Dieser Befund scheint dem in der Bursa beobachteten Anstieg der Apoptose zu widersprechen. Allerdings betrachtet man bei dieser Art der Analyse höchst unterschiedliche Zellpopulationen. So setzt sich die Bursa zu Beginn dieser Befundung (ET10) zum größten Teil aus Epithelzellen, zum Ende allerdings hauptsächlich aus B-Zellen (ET18, Tag 1 und Adult) zusammen. Dies wird auch evident, wenn man den Verlauf der Transkription des B-Zellmarkers *chB6* betrachtet (s. Tab. 5.4). Im Vergleich zum ET10, an dem nur vereinzelt B-Zellvorläufer in der Bursa zu finden sind, kommt es zu einer deutlichen Proliferation im Laufe der Entwicklung des Embryos. Diese bereits mittels Immunofluoreszenz und Durchflusszytometrie belegte Entwicklung [39, 43, 321] ließ sich nun auch auf Transkriptomebene zeigen.

Bereits in früheren Arbeiten wurde die These aufgestellt, dass BAFF beim Huhn von B-Zellen gebildet wird [13, 304]. Dies scheint der Verlauf der Menge an *chBAFF*-Transkript zu bestätigen, da er zur Entwicklung der mRNA Abundanz des B-Zellmarker *chB6* fast parallel verläuft (s. Tab. 5.4). Einzig an Embryonaltag 14 erscheint dieses Verhältnis verändert. Es könnte darauf hindeuten, dass verschiedene B-Zellentwicklungsstufen unterschiedliche Mengen an *chBAFF* transkribieren. So könnten jene B-Zellvorläufer, die um den Embryonaltag 10 die Bursa erreichen, höhere Mengen an *chBAFF* transkribieren als jene, die bereits eine andere Entwicklungsstufe erreicht haben. Es ist im murinen System bekannt, dass sich das auf der B-Zelloberfläche exprimierte BAFF-Rezeptoren Muster im Laufe der Entwicklung verändert [176, 183, 186, 322]. Dies konnte für das Huhn noch nicht gezeigt werden. Es lässt sich vermuten, dass hier eventuell die Varianz in der *chBAFF* Transkription zu Unterschieden zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien führt.

Aufgrund der großen Unterschiede in den dieser Analyse zugrunde liegenden B-Zellzahlen war es von Interesse, eine Darstellungsform zu finden, die dieser Situation gerecht wurde. Wie bereits ausgeführt, ergibt sich eine positive Korrelation zwischen B-Zellzahl und der mRNA Abundanz des B-Zellmarkers *chB6*. Somit erschien es sinnvoll, die Expressionsniveaus der *bcl-2* Familienmitglieder auf das mRNA Niveau an *chB6* zu beziehen. Die sich nun ergebenden, auf *chB6* bezogenen Niveaus stellen Werte dar, die den unterschiedlichen zugrunde liegenden B-Zellzahlen Rechnung tragen.

Auf die Menge an *chB6* Transkript bezogen, fällt auf, dass sich das Niveau an *bcl-2*-Transkript konstant verhält. Stieg es auf die Gesamtbursa bezogen an (s. Tab. 5.3), so lässt sich dieser

Befund nun relativieren (s. Tab. 5.5). Dafür wird nun der Abfall von bak und bim auf die B-Zellzahl bezogen deutlich. Dies scheint dem in der Bursa beobachteten, im Zuge der Embryonalentwicklung zunehmendem Maß an Apoptose nicht zu entsprechen. Allerdings ist bei den Mitgliedern der bcl-2 Familie besonders die Interaktion zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern von Bedeutung. Bezieht man die mRNA-Abundanz auf den B-Zellmarker chB6 so findet sich bei den anti-apoptotischen Mitgliedern dieser Familie, namentlich bcl-2 und Nr13, ein starker Abfall. Dies allein kann schon der Grund für die Apoptose in der Bursa sein. Desweiteren gibt es bereits Hinweise auf ein anderes Mitglied der pro-apoptotischen, bcl-2 ähnlichen Subgruppe, bax (*bcl-2 associated X protein*), welches eine Rolle im apoptotischen Geschehen in der Bursa zu spielen scheint [264]. Dies konnte jedoch bisher nur über kreuzreagierende, humane Reagentien nachgewiesen werden, da die Sequenz für Hühner bax noch nicht bekannt ist und dieses Protein beim Huhn noch nicht charakterisiert werden konnte.

Abschließend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte quantitative Betrachtung während der physiologischen Bursaentwicklung auf Transkriptomebene eine Ergänzung zu bereits erhobenen Befunden darstellt. Bezogen auf die bcl-2 Familienmitglieder lässt sich sagen, dass es anscheinend im großen Maße die Runterregulation anti-apoptotischer bcl-2 Familienmitglieder (bcl-2, Nr13) ist, welche mit der Zunahme des apoptotischen Geschehens in der Bursa einhergeht. Von besonderer Wichtigkeit bei einer Analyse der mRNA Abundanzen während der Bursaentwicklung erwies sich zudem eine Darstellungsform, welche einen Bezug zur zugrunde liegenden B-Zellzahl zulässt. Ausblickend würde sich zur Validierung und Ergänzung der erhobenen Befunde eine Betrachtung der Regulation der Proteinabundanzen der bcl-2 Familie anbieten. Einer Analyse auf Proteomebene müsste allerdings aufgrund des Mangels an Hühner-spezifischer Methodik wieder die Etablierung selbiger vorangestellt werden.

## **6.5 Auswirkungen einer Stimulation auf die Zahl lebender B-Zellen aus der Milz *in vitro***

Bei der Inkubation von Hühner B-Zellen mit chBAFF fällt auf, dass sich unter dieser Stimulation bereits nach 24 Stunden Kultur mehr lebende B-Zellen finden lassen als in unbehandelten Kontrollen. Dies konnte auch im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden (s. Abb. 5.6). Zwar war der beobachtete Unterschied nach 24 h bzw. 48 h noch nicht signifikant, aber

auch in bereits publizierten Versuchen ließ sich ein signifikanter Unterschied erst nach 72h zeigen [13, 14]. Da Änderungen, die zu einer signifikanten Erhöhung im Überleben der Zellen nach 48 h führen, auf Transkriptomebene bereits vor diesem Zeitpunkt ablaufen, lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf den Veränderungen nach 8 h bzw. 24 h Kultur.

Neben der chBAFF-Wirkung wurde auch die Wirkung des Apoptose-Induktors Staurosporin betrachtet. Wie erwartet und bereits in der Literatur beschrieben [323-325], führt eine Inkubation mit diesem Proteinkinase-Inhibitor zu einem deutlichen Abfall in der Zahl der lebenden B-Zellen (nur noch 10% der eingesetzten B-Zellen sind nach 48 h vital).

Eine PMA- (Phorbol-Myristat-Acetat) Behandlung führt im Gegensatz dazu zu einer Steigerung der Zahl lebender B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dies erfolgt, wie bei chBAFF Inkubation, durch eine Verhinderung der Apoptose. Auch dieser Effekt ist bereits aus der Literatur bekannt [326, 327].

Die Stimulation mit dem chCD40L wiederum führte zu einer deutlichen Proliferation der B-Zellen. Dieser nach 48 h signifikant werdende Effekt des CD40-Liganden konnte auch in bereits publizierten Versuchen bei Säuger [100, 328-330] und Huhn [100] gezeigt werden.

### **6.5.1 Stimulation mit chBAFF *in vitro* – Veränderungen auf Transkriptomebene**

Wie aus dem vorangehenden Unterpunkt deutlich geworden, zeigten sich die chBAFF-stimulierten B-Zellen aus der Milz vitaler als jene aus unbehandelten Kontrollen. Es stellte sich die Frage, welche Änderungen der Transkription der bcl-2 Familienmitglieder zu diesem Bild führten. Auffällig war hierbei, dass für alle untersuchten Gene nach 8 h eine gesteigerte und nach 24 h eine geringere Transkription als in den unbehandelten Kontrollen zu beobachten war (s. Tab. 5.6).

So wurden die anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitglieder bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> und Nr13 nach 24 h Kultur mit chBAFF seltener transkribiert als ohne Stimulation. Konnte nach 8 h Kultur mit chBAFF noch eine Verdopplung von bcl-2 und bcl-x<sub>L</sub> Transkript nachgewiesen werden, so war nach 24 h eine signifikante Reduktion von bcl-2 (8fach), Nr13 (9fach) und bcl-x<sub>L</sub> (13fach) gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen. In der Literatur finden sich nur Hinweise auf eine Steigerung der Menge an Proteinen der anti-apoptotischen Mitglieder der bcl-2 Familie beim Säuger [247, 249, 257], wobei dieser Anstieg auch noch nach 48 h nachweisbar ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Änderungen auf Transkriptomebene, die sich bereits

nach 8 h darstellen (Steigerung der Transkription anti-apoptotischer Proteine), jene, welche wir noch nach 48 h auf Proteom- und Zellebene feststellen können, nach sich ziehen.

Bei den pro-apoptotisch wirkenden bcl-2 Familienmitgliedern zeigte sich ein ähnliches Bild. Einem initialen Anstieg in der Transkription nach 8 h folgt ein deutlicher Abfall nach 24 h. Der initiale Anstieg wurde so noch nicht beschrieben, es finden sich aber bereits Beschreibungen der BAFF-induzierten Verringerung von bak [246] und bim Protein [295] im murinen System. Zwar war die beobachtete Reduktion von bim in diesem Versuch nicht signifikant, ihre Höhe (19fach weniger als in den Kontrollen) jedoch deutlich. Somit könnte die fehlende Signifikanz in der Tierzahl (n=3) begründet liegen. Die signifikante Reduktion von bok (8fach) und bid (7fach) wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit BAFF beschrieben.

Auch diese Befunde sollten nach Etablierung entsprechender Analyseverfahren für das Huhn auf Proteomebene verifiziert werden. Weitere Einsicht in die BAFF-induzierte bim Reduktion könnte die Verwendung von bim spezifischer *small interfering RNA* (siRNA) liefern. So konnte bereits in humanen Zelllinien eine Verminderung der Apoptoseanfälligkeit durch bim siRNA erreicht werden [331, 332]. SiRNA wurde bereits auf Hühnerzellen angewandt [333, 334] und könnte verwendet werden, um Hühnerzellen unter BAFF-Inkubation mit bim siRNA behandeln zu vergleichen. Ein deutlich ähnliches Verhalten der Zellen in beiden Ansätzen würde die Vermutung untermauern, dass der antiapoptotische BAFF-Effekt über eine bim Reduktion zustande kommt.

### **6.5.2 Stimulation mit chCD40-Ligand *in vitro* – Veränderungen auf Transkriptomebene**

Auch das zweite in diesem Versuch verwendete Zytokin, der CD40-Ligand des Huhns, führt zu einer Erhöhung der Zahl lebender B-Zellen in Kultur gegenüber den Kontrollen. Wie aus bereits publizierten Versuchen bekannt, wird dies allerdings im Gegensatz zu der durch BAFF induzierten Veränderung auch beim Huhn durch eine Proliferation der B-Zellen erreicht [100].

Allerdings konnten bei der für diesen Versuch zugrunde liegenden Tierzahl (n=3) keine signifikanten Veränderungen in den Expressionsniveaus der bcl-2 Familienmitglieder beobachtet werden (s. Tab. 5.7). Allerdings ist zu beachten, dass es sich bei der diesen Versuchen zugrunde liegenden Hühnerlinie um eine Auszuchtlinie handelt, in der es zu

deutlichen individuellen Unterschieden kommt. Zudem lag das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf der Erstellung einer globalen Referenz, welche ein spezifischeres, späteres Vorgehen ermöglichen sollte. Trotzdem entspricht das Transkriptionsmuster dem bereits für humane B-Zellen unter CD40L Stimulation publizierten [335]. So werden auch beim Huhn unter CD40L Stimulation vermehrt anti-apoptotische Proteine (*bcl-x<sub>L</sub>*, Nr13) transkribiert. Interessanterweise lässt sich auch das kontrovers anmutende, hohe Transkriptionsniveau des pro-apoptotischen *bid* (14fach erhöht) bei Huhn und Mensch unter CD40-Ligand Stimulation zeigen. Als Erklärungsversuch für die hohe Transkription von *bid* könnte herangezogen werden, dass das Protein *bid* erst durch Prozessierung (Spaltung) zum aktivierten *tBid* (*,truncated bid'*) umgewandelt werden muß. Erst gespalten entfaltet es seine pro-apoptotische Wirkung [336]. Somit ist der Aussagewert einer hohen Transkription von *bid* gegenüber dem wirklich vorliegenden apoptotischen Geschehen gering.

Betrachtet man die Transkription des B-Zellmarkers *chB6*, so scheint sich hier wiederum die B-Zellzahl widerzuspiegeln. So ist dieser nach 8 h 10fach und nach 24 h 2fach und mit einem Signifikanzniveau von 8% erhöht. Dies scheint den nach 48 h signifikant werdenden Anstieg in der Zahl lebender B-Zellen zu antizipieren.

Weitere Versuche zur Validierung der erhobenen Befunde des Transkriptionsverhaltens der *bcl-2* Familienmitglieder unter *chCD40*-Ligand Einfluss sollten nach Etablierung entsprechender Verfahren auf Proteomebene angeschlossen werden.

### **6.5.3 Vergleich der Wirkung von *chBAFF* und *chCD40*-Ligand *in vitro* – Veränderungen auf Transkriptomebene**

Nun bot sich die Möglichkeit, die Veränderungen auf Transkriptomebene durch die Stimulation mit einem proliferativ wirkenden Zytokin (*CD40L*) zum einen und die mit einem anti-apoptotisch wirkenden Zytokin (*BAFF*) zum anderen zu vergleichen (s. Tab. 5.8).

Bei diesem Vergleich wurde deutlich, dass eine Stimulation mit *chCD40L* im Vergleich zur Stimulation mit *chBAFF* eine Steigerung im Niveau der Transkription anti-apoptotischer Proteine (hier besonders *bcl-x<sub>L</sub>* mit einer Erhöhung um den Faktor 10 und einem Signifikanzniveau von 6%) induziert. Dieser Effekt des *CD40*-Liganden wurde bereits in der Literatur beschrieben [335, 337, 338].

Desweiteren zeigt dieser Vergleich, dass eine Stimulation mit *chBAFF* im Gegensatz zur Stimulation mit *chCD40L* das Niveau der Transkripte der pro-apoptotischen Proteine deutlich

senkt. So erscheinen besonders die Proteine bak, bid und bim in mit chCD40L stimulierten Zellen gegenüber den chBAFF stimulierten erhöht. Dieser Effekt kommt aber nur durch den gewählten Vergleichswert (chBAFF) zustande. Vergleicht man die chCD40L stimulierten mit unbehandelten Zellen (s. Tab. 5.7), so reduziert die chCD40L Stimulation sogar das Transkriptionsniveau der pro-apoptischen Proteine. Allerdings fällt diese Reduktion nicht so deutlich wie in chBAFF-stimulierten Zellen aus (s. Tab. 5.6). Es lässt sich vermuten, ob dies vielleicht mit der CD40-Ligand induzierten Aktivierung des alternativen wie auch des klassischen NF- $\kappa$ B-Weg zusammenhängt [339]. So könnte vermutet werden, dass die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Wegs eher über eine Erhöhung der anti-apoptischen Mitglieder wirkt, wohingegen der alternative NF- $\kappa$ B-Weg eher über eine Erniedrigung der pro-apoptischen bcl-2 Familienmitglieder seine Wirkung entfaltet.

Die mRNA Abundanz des B-Zellmarkers chB6, welche unter chCD40L Stimulation höher ist als bei chBAFF Stimulation, scheint den proliferativen Charakter der CD40L-Stimulation zu unterstreichen.

## **6.6 Altersbedingte Unterschiede im Überleben von B-Zellen in vitro**

Die bisher besprochenen Befunde wurden mittels B-Zellen aus den Milzen juveniler Tiere (6 Wochen alt) gewonnen. Diese Tiere verfügen noch über eine funktionsfähige Bursa, und es können ständig neue B-Zellen in diesem Organ reifen. Mit dem Erreichen der Geschlechtsreife und der zeitgleichen Involution der Bursa können im Huhn keine weiteren B-Zellen mehr geprägt werden. Das Tier muss mit den bis zu diesem Zeitpunkt gereiften Zellen eine humorale Immunantwort ausführen können, die ein Überleben trotz Pathogenkontakt ermöglicht. Ob sich dies auch auf das Verhalten der B-Zellen auswirkt, wurde *in vitro* analysiert.

Zu diesem Zweck wurde die Überlebensrate von B-Zellen aus den Milzen juveniler (6 Wochen) und adulter (6 Monate) Tiere in Kultur verglichen (s. Abb. 5.10). Nach 24 h wurde bereits ein gesteigertes Überleben der B-Zellen adulter Tiere deutlich. Auch unter Stimulation blieb dieser Unterschied zwischen adulten und juvenilen Tieren bestehen. Lediglich die Stimulation mit CD40-Ligand führte zu einem geringeren Unterschied, der nach 48 h komplett aufgehoben war. Dieser Unterschied im Überleben konnte bereits bei den B-Zellen junger und alter Mäuse gezeigt werden [340]. Es finden sich aber auch Daten, die für eine

Erhöhung der Apoptose in den B-Zellen adulter Mäuse sprechen [341]. Ob es sich bei dem im Zuge dieser Arbeit beobachteten Effekt um eine Besonderheit des Huhns handelt oder ob adulte B-Zellen des Huhns wie jene der Maus geringere apoptotische Vorgänge als ihre jungen Äquivalente zeigen, lässt sich somit noch nicht sagen. Allerdings stellen die hier erhobenen Ergebnisse die ersten dieser Art für das Huhn dar.

### **6.6.1 Stimulationsbedingte Vorgänge in adulten und juvenilen Milzlymphozyten - Unterschiede auf Transkriptomebene**

Betrachtet man nun die diesen Unterschieden in der Zahl lebender B-Zellen vorangehenden Änderungen in der Transkription der *bcl-2* Familienmitglieder in Milzlymphozyten von adulten und juvenilen Tieren, so bietet sich ein hochgradig unterschiedliches Bild. Demnach scheint es in den Milzzellen adulter Tiere im Gegensatz zum Anstieg bei juvenilen Tieren zu einem Abfall in der Expression der *bcl-2* Familienmitglieder unter chBAFF Stimulation zu kommen (s. Abb. 5.11). Signifikant wird dies nach 24 h für das Transkriptionsniveau des pro-apoptischen Proteins *bim*. Dieser Zusammenhang zwischen BAFF Stimulation und negativer *bim* Regulation wurde bereits in der Maus beschrieben [295]. Allerdings finden sich keine Angaben über das Alter der für diesen Versuch verwendeten Mäuse. Dass eine Altersangabe allerdings essentiell wäre, unterstreichen die in diesem Versuch gewonnenen Daten. Es konnten hier sowohl Hinweise auf die Bedeutung des Alters für das Verhalten der Milzlymphozyten gewonnen werden wie auch darauf, dass BAFF auch beim Huhn über eine negative Regulation des pro-apoptischen Proteins *bim* seine anti-apoptische Wirkung entfaltet. Eine Validierung dieser Befunde auf Proteomebene wie auch die bereits diskutierte Verwendung von *bim* siRNA könnten weiteren Aufschluss über die BAFF-bedingte *bim* Reduktion geben.

Da der Effekt des gesteigerten Überlebens adulter Zellen gegenüber juvenilen bei allen Stimulationen (chBAFF, PMA, Staurosporine) außer bei einer Stimulation mit dem chCD40-Liganden gegeben war, sollten nun auch jene Veränderungen, die dieses Zytokin in den Milzlymphozyten induziert, betrachtet werden. Durch eine Stimulation mit dem chCD40L konnte das Überleben der juvenilen Milzlymphozyten insoweit verändert werden, dass es dem der adulten Zellen fast entsprach (s. Abb. 5.10). Auf Transkriptomebene korreliert diese Beobachtung mit einer im Vergleich zu den Kontrollen vorliegenden geringeren Transkription des anti-apoptischen Proteins *bcl-x<sub>L</sub>* in adulten Milzlymphozyten (7fach seltener

transkribiert, Signifikanzniveau 8%). Diese aus Abb. 5.12 hervorgehende Regulation steht dem in juvenilen Milzlymphozyten beobachteten und in der Literatur beschriebenen CD40L-Effekt, namentlich der positiven Regulation von *bcl-x<sub>L</sub>* [337, 338, 342-344], entgegen. In der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass B-Zellen alter Mäuse signifikant geringere Mengen an *bcl-x<sub>L</sub>* in Reaktion auf CD40L Stimulation exprimieren als jene junger Mäuse [345]. Dies konnte nun auch beim Huhn das erste Mal dargestellt werden.

Eine veränderte Reaktion auf chCD40L Stimulation zwischen juvenilen und adulten Hühnern konnte im Zuge dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben werden. Dieser Unterschied konnte, wie bereits in der Maus beschrieben, auch beim Huhn auf eine Abweichung in der Transkription des anti-apoptischen *bcl-2* Familienmitgliedes *bcl-x<sub>L</sub>* zurückgeführt werden. Um diese These zu untermauern, könnte eine *bcl-x<sub>L</sub>* Überexpression in adulten B-Lymphozyten induziert werden und ihr Verhalten mit dem juveniler Zellen verglichen werden.

## **6.7 Anwendung des RCAS Vektors zur Überexpression und funktionellen Inhibition von chBAFF**

Mit RCAS (*Replication Competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor*) steht ein System zur Verfügung, das sich den reversen Transkriptionsmechanismus des aviären Rous Sarkom Virus zunutze macht. Dieser durch Deletion des *src* Onkogens und Insertion einer *Clal* Schnittstelle modifizierte Vektor hat sich bereits als nützliches Werkzeug für die Analyse der Embryonalentwicklung des Huhns erwiesen [346-348]. Auch für die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung nach den mit der beobachteten chBAFF Wirkung einhergehenden molekularen Vorgängen erwies er sich als Mittel der Wahl. So ist die Untersuchung der Auswirkung einer Überexpression von Zytokinen im Huhn ohne retrovirales Vektorsystem fast unmöglich. Der Produktion transgener Hühner stehen durch die Besonderheit der aviären Reproduktion Unwägbarkeiten entgegen, und das Zuführen der benötigten Zytokinmengen zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung bedeutet einen extremen Zeit- und Materialaufwand. Zudem erwies sich das RCAS-Vektorsystem bereits in früheren Versuchen als zuverlässig.

Einer konkreten Anwendung dieses Vektorsystem musste allerdings erst eine genauere Charakterisierung vorangestellt werden. So liegen keine Daten über die organ- und gewebespezifische Transkription des RCAS-Vektors vor. Mittels eines speziell auf die



Verwendung von RCAS als Vektor für chBAFF abgestimmten Primerpaares war es erstmals möglich, die Transkription von endogenem chBAFF von jener durch RCAS induzierten zu unterscheiden und Daten über die Transkription in verschiedenen Geweben zu gewinnen. Auch die gegensätzlich orientierte, Sequenz-homologe Kontrolle (RCAS-flagChBAFF-reverse) ließ sich mithilfe des Primerpaares nachweisen.

Der qualitative Nachweis bewies sowohl für flagChBAFF wie auch für flagChBAFF-reverse eine Transkription in jedem der untersuchten Gewebe (s. Abb. 5.14). Mittels quantitativer PCR war es nachfolgend auch möglich, das Niveau der Transkription in den verschiedenen Organen und Geweben zu vergleichen (s. Abb. 5.15). So zeigte sich die größte mRNA Abundanz für vektoruell induziertes flagChBAFF bzw. flagChBAFF-reverse unter allen untersuchten Geweben im Herz. Von den Organen, welche zu den primär bzw. sekundär lymphatischen zählen, findet sich das höchste Maß an Transkription der Konstrukte in Thymus und Caecaltonsille. Dass es aber auch in der Bursa zu einer deutlichen Transkription kommt, zeigte bereits der qualitative Nachweis.

In der Literatur finden sich Versuche, in denen das RCAS-Vektorsystem für organspezifische Fragestellungen verwendet wurde. So konnte es bereits in Herz [349], Haut [350], Muskel [351] und Leber [352] erfolgreich zur Überexpression diverser Proteine eingesetzt werden. Ein Vergleich der organspezifischen Transkription findet sich in der Literatur allerdings nicht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RCAS in allen untersuchten Organen und Geweben exprimiert wird. Da zu diesen auch immunologisch besonders relevante Organe wie Bursa und Milz zählen, lässt sich das RCAS-Vektorsystem für immunologische Fragestellungen verwenden.

Nach erfolgter Charakterisierung der spezifischen Transkription des RCAS-Vektors konnte er nunmehr für eine Überexpression bzw. funktionelle Inhibition von chBAFF eingesetzt werden.

### **6.7.1 chBAFF-Überexpression im 18 Tage alten Embryo – Wirkung auf Transkriptomebene**

Nach Infektion mit einem RCAS-flagChBAFF-Konstrukt an Embryonaltag 3 wurden jeweils fünf Embryonen an Embryonaltag 18 die Bursen entnommen und mittels qPCR quantitativ ausgewertet. Desgleichen wurde mit 5 weiteren Embryonen verfahren, die zur Kontrolle der vektorinduzierten Veränderungen mit dem biologisch inaktiven RCAS-flagChBAFF-reverse

Konstrukt infiziert wurden. Als weitere Kontrolle fanden die Bursen von 5 unbehandelten Embryonen Verwendung.

Die Verwendung zweier Kontrollen stellte sich als essentiell heraus, da der Vektor allein signifikante Veränderungen im Niveau der Transkription der bcl-2 Familienmitglieder zu induzieren vermochte. So kam es auch unter den mit dem inaktiven RCAS-flagChBAFF-reverse infizierten Tieren zu einem Anstieg im Niveau von bid, bim und bcl-2. Letzteres konnte bereits im Zusammenhang mit RCAS beobachtet werden [288]. Allerdings sind diese Unterschiede zwischen Kontrollen und Vektor sowohl in der Literatur wie auch in der vorliegenden Arbeit extrem gering und im Vergleich zu den durch das huBCMA-Vektorkonstrukt induzierten zu vernachlässigen.

In den Bursen der mit dem aktiven RCAS-chBAFF infizierten Tiere fanden sich neben dem signifikanten Anstieg im Transkriptionsniveau von bcl-2, welcher auf die Vektorwirkung zurückzuführen ist, keine weiteren deutlichen Änderungen. Wie aus bereits publizierten Versuchen ersichtlich, wird chBAFF während der physiologischen Bursaentwicklung bereits in hohem Maße exprimiert [13, 14, 304]. Auch im Zuge dieser Arbeit konnte das hohe Maß der chBAFF Transkription in der Bursa gezeigt werden (s. Tab. 5.4). Somit scheint während der physiologischen Bursaentwicklung bereits eine gewisse Sättigung an chBAFF vorzuherrschen, welche eine weitere Überexpression unbedeutend erscheinen lässt.

### **6.7.2 Funktionelle Inhibition von chBAFF im 18 Tage alten Embryo – Wirkung auf Transkriptomebene**

ChBAFF, das wie gezeigt werden konnte in hohem Maße während der Entwicklung der Bursa exprimiert wird, kann von dem humanen Rezeptor BCMA gebunden werden. BCMA stellt einen der drei BAFF-Rezeptoren dar, welche zur Familie der TNF-Rezeptoren zählen, konnte aber noch nicht für das Huhn beschrieben werden. Allerdings erlaubt die hohe Homologie zwischen humanem und chBAFF (76%) [14] die Verwendung von humanem BCMA zur funktionellen Inhibition von chBAFF. Mittels des RCAS-Vektorsystems war es möglich, 5 Hühnerembryonen am Embryonaltag 3 mit einem huBMCA-Fc Konstrukt zu infizieren und somit schon zu einem frühen Stadium in der Embryonalentwicklung chBAFF durch Bindung an huBCMA biologisch zu inaktivieren. Bereits in früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit huBCMA zu einer deutlichen Reduktion in der Zahl der peripheren B-Zellen und der B-Zellfollikel in der Bursa führt [13]. Auswirkungen auf das

Transkriptionsniveau der bcl-2 Familienmitglieder wurden bisher weder bei Hühnern noch vor murinem oder humanem Hintergrund analysiert.

Zu den durch die funktionelle Inhibition von chBAFF verursachten Veränderungen auf Transkriptomebene zählt ein hoch signifikanter Abfall in der mRNA Abundanz des pro-apoptotischen Proteins bok (s. Tab. 5.15). Ein Zusammenhang zwischen dem Protein bok und BAFF wurde bisher noch nicht dargestellt. Allerdings wurde bereits ein Anstieg von bok im Zuge der physiologischen Bursaentwicklung beschrieben [281]. Weiterhin verursachte die chBAFF Inhibition einen Abfall im Transkriptionsniveau des anti-apoptotischen Proteins bcl-x<sub>L</sub>. Dies scheint die geringe Zahl an B-Zellen unter dem Einwirken von huBCMA zu erklären. Konträr hierzu mutet die in den huBCMA behandelten Bursen beobachtete Steigerung in der Transkription von bcl-2 an. Überaus deutlich und dem histologischen Bild entsprechend stellt sich die Reduktion der Transkription des B-Zellmarkers chB6 dar. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen wird er knapp 15mal seltener transkribiert als in den unbehandelten Kontrollen.

Es stellte sich nunmehr ein Problem, welches bereits bei der physiologischen Bursaentwicklung evident wurde: die Vergleichbarkeit der Transkriptionsanalysen bei stark unterschiedlichen zugrunde liegenden Zellpopulationen. In diesem Falle die Vergleichbarkeit der Kontrollbursen mit einer hohen Zahl an B-Zellen und den Bursen der mit huBCMA-behandelten Tiere, welche eine stark reduzierte Zahl an B-Zellen aufweisen. Um diesem Problem zu begegnen, wurde wiederum die mRNA Abundanz des B-Zellmarkers chB6 zur Standardisierung der qPCR Ergebnisse herangezogen.

Das sich nun präsentierende, auf die Zahl der B-Zellen bezogene Transkriptionsmuster der bcl-2 Familienmitglieder ist hauptsächlich durch den starken Anstieg in den mRNA Abundanzen von bcl-2 (35mal) und Nr13 (19mal so oft transkribiert wie in den Kontrollen) gekennzeichnet (s. Tab. 5.18). Anscheinend handelt es sich bei den unter huBCMA Wirkung vorhandenen B-Zellen um eine Subgruppe, die mittels hoher Transkription der anti-apoptotischen Proteine bcl-2 und Nr13 das Fehlen der chBAFF Stimulation kompensiert. Auch kommt es in diesen Zellen zu einer erhöhten Produktion von chBAFF (13fach erhöht). Dies könnte ebenfalls auf einen kompensatorischen Effekt zurückzuführen sein. Mit bid wird auch ein pro-apoptotisch wirkendes Protein in diesen B-Zellen stärker transkribiert als in den Kontrollen. Allerdings liegt diese Transkription mit einer knapp 11fachen Erhöhung deutlich unter den bei den anti-apoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern beobachteten Effekten.

Eine Validierung der aufgestellten These des Überlebens einer B-Zellsubpopulation unter huBCMA-Einfluß aufgrund einer gesteigerten Transkription anti-apoptotischer bcl-2

Familienmitglieder ließe sich ebenfalls unter Verwendung des RCAS-Systems erreichen. So wäre es von Interesse, ob eine RCAS-induzierte Überexpression von *bcl-2* oder Nr13 einer BCMA-bedingten B-Zellreduktion entgegenwirken könnte.

Abschließend lässt sich sagen, dass es im Zuge dieser Arbeit möglich war, neue Hühnerspezifische Methodik zur Apoptose- und B-Zellanalyse zu etablieren. Dem vorausgehend konnte die Notwendigkeit der Verwendung jener Verfahren dargestellt werden. Mithilfe dieser Techniken war es nun möglich, Ansatzpunkte für sich anschließende Arbeiten zu schaffen. So konnten erstmals Änderungen in den Transkriptionsniveaus der *bcl-2* Familienmitglieder während der Organogenese der Bursa auf die zugrunde liegende B-Zellzahl bezogen werden. Es konnten im Zuge dessen Kandidatengene charakterisiert werden, deren weitere Betrachtung auf Proteomebene notwendig ist.

Zudem konnte, wie bereits in der Maus beschrieben, auch für das Huhn ein deutlicher Zusammenhang zwischen BAFF-Stimulation und Bim Reduktion *in vitro* gezeigt werden. Hierbei zeigten sich altersbedingte Unterschiede im Verhalten der B-Lymphozyten, die so beim Huhn noch nicht beschrieben wurden. Auch unter chCD40-Ligand Stimulation ließ sich dies beobachten und mit dem Transkriptionsniveau von *bcl-x<sub>L</sub>* in Zusammenhang bringen. Auch *in vivo* konnte die Bedeutung des Zytokins chBAFF für das Überleben der B-Lymphozyten durch einen funktionellen *knock-down* gezeigt werden. Eine Validierung der erhobenen Befunde muss nach Etablierung entsprechender Nachweismethoden für das Huhn auf Proteomebene folgen.

## 7 Zusammenfassung

Das Zytokin BAFF (*B-Zell aktivierender Faktor der Tumornekrosefaktorfamilie*) wurde als wichtiger Regulator der B-Zell-Homöostase beim Huhn beschrieben. Neben der Regulation der peripheren B-Zellen in den sekundär-lymphatischen Organen scheint es beim Huhn auch die Entwicklung unreifer B-Zellen in der Bursa fabricii wesentlich zu beeinflussen. Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, dass BAFF das Überleben dieser Lymphozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflusst. Die molekularen Mechanismen dieses Effekts sind aber bisher beim Huhn ungeklärt. Für B-Zellen von Mensch und Maus konnte dagegen bereits gezeigt werden, dass bestimmte Mitglieder der bcl-2 Familie den anti-apoptotischen Effekt von BAFF vermitteln. In dieser Arbeit sollten daher bcl-2 Familienmitglieder des Huhns identifiziert und deren Regulation durch BAFF auf der Ebene der Transkription untersucht werden.

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Expression der nachfolgend genannten Gene in Bursa, Milz und Herz untersucht. Sowohl die anti-apoptotischen Mitglieder der bcl-2 Familie wie bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> und Nr13, als auch die pro-apoptotischen wie bak, bid, bim und bok ließen sich zu allen untersuchten Zeitpunkten in den genannten Organen nachweisen.

Für die weiterführenden Arbeiten wurden daher quantitative RT-PCR Assays zum Nachweis unterschiedlicher Transkriptabundanz sowohl für die anti-apoptotischen Mitglieder der bcl-2 Familie wie bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> und Nr13, und die pro-apoptotischen wie bak, bid, bim und bok, als auch für den B-Zellmarker chB6 und chBAFF etabliert. Während der Entwicklung der Bursa fabricii kommt es zu einem deutlichen Anstieg in der Transkription des pro-apoptotischen bok, einem leichten Anstieg in der Menge an Transkript des anti-apoptotischen bcl-x<sub>L</sub> und einem Abfall an bcl-2 mRNA. Da es im Verlauf der Bursareifung zu einer starken Vermehrung der B-Zellen kommt, wurde eine Methode etabliert, die es ermöglicht, die beobachteten Expressionsunterschiede auf die B-Zellzahl zu beziehen. Hierzu diente als Parameter das Expressionsniveau des B-zellspezifischen Gens chB6. Dabei zeigte sich, dass sowohl pro-apoptotische Proteine wie bak und bim, als auch anti-apoptotische wie bcl-2 und Nr13 eine deutliche Reduktion ihrer mRNA Abundanz im Bezug auf die B-Zellzahl aufweisen. Die Konzentration an bok mRNA scheint hingegen in den B-Zellen konstant zu bleiben.

Erste Analysen der BAFF-Wirkung wurden *in vitro* an isolierten Milzlymphozyten durchgeführt. Der anti-apoptotische Effekt einer BAFF-Stimulation konnte auch in diesen

Versuchen bestätigt werden. Auf Transkriptomenebene korrelierter dieser mit einer Reduktion in der Transkription des pro-apoptotisch wirkenden Gens *bim*.

Vergleichend wurde in diesen Untersuchungen auch die Wirkung des CD40-Liganden, eines weiteren B-zellspezifischen Zytokins, verwandt. Eine Stimulation der Milzzellen führte zu einer bereits beschriebenen Proliferation der B-Zellen. Besonders auffällig war hierbei ein Unterschied im Verhalten der B-Lymphozyten adulter und juveniler Tiere. So reagierten die Zellen letzterer mit einer höheren Steigerung der Transkription des anti-apoptotischen Gens *bcl-x<sub>L</sub>* als die adulter Tiere.

Abschließend sollte die Wirkung des Zytokins BAFF in der Bursaentwicklung auch in einem *in vivo* Versuch analysiert werden. Mithilfe eines retroviralen Vektorsystems, des RCAS-Vektors, wurde sowohl eine BAFF-Überexpression als auch eine funktionelle Inhibition durch Überexpression eines spezifischen löslichen Rezeptors (BCMA) erreicht. Die Überexpression von BAFF führte nur zu geringen Änderungen in den B-Zellzahlen in den Bursaen. Wahrscheinlich führen die schon unter physiologischen Bedingungen hohen BAFF-Spiegel zu einer maximalen Wirkung, die durch die Überexpression nicht signifikant gesteigert werden kann. Dagegen bewirkte die Neutralisation des Zytokins eine Reduktion der B-Zellzahlen, die sich auch in deutlichen Veränderungen der Transkriptabundanzen der *bcl-2* Familienmitglieder widerspiegelte. Auch in diesen Versuchen erwies sich ein Bezug der Messergebnisse auf die B-Zellzahlen als notwendig. Somit war es möglich, Kandidatengene für ein BAFF-unabhängiges Überleben von B-Lymphozyten zu charakterisieren. Es konnte in den unter BCMA-Einwirkung stehenden B-Zellen eine im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöhte Menge an Transkript der anti-apoptotischen Proteine *bcl-2* und Nr13 gezeigt werden. Für Nr13 wurde somit zum ersten Mal eine zytokinabhängige Regulation aufgezeigt.

## 8 Summary

### **Effect of B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) on the expression of pro- and anti-apoptotic bcl-2 family members in chicken B cells**

The recently discovered chicken cytokine BAFF (B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family) was characterised as an important regulator of chicken B-cell homeostasis. Besides regulating B-cells in secondary lymphatic organs BAFF seems to have a significant impact on chicken B-cell development in the Bursa of Fabricius, too. Past studies already showed that chicken BAFF plays a vital role in the survival of B-cells both *in vitro* and *in vivo*. Yet molecular correlation for this effect has still to be established in the chicken. In mouse and man, the antiapoptotic effect of BAFF was linked to a regulation of certain bcl-2 family members. Thus this study focused on the identification of bcl-2 family members in the chicken and their regulation by BAFF at transcriptional level.

By means of RT-PCR the expression of both anti-apoptotic (e.g. bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> and Nr13) as well as pro-apoptotic (e.g. bak, bid, bim and bok) transcripts was shown in bursa, spleen and heart muscle at various developmental stages.

To enable further studies quantitative RT-PCR assays were established for both anti-apoptotic (e.g. bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> and Nr13) and pro-apoptotic (e.g. bak, bid, bim and bok) bcl-2 family members as well as for the B-cell specific marker chB6 and chBAFF. During bursal development, transcripts for pro-apoptotic bok and anti-apoptotic bcl-x<sub>L</sub> are increased while the level of bcl-2 mRNA is decreased. Considering the vast raise in B-cell number within the developing bursa, a means of correlating this with characterised changes in transcription levels had to be established. This was done based on expression levels of the B-cell marker chB6. Thus it could be shown that transcription of both anti-apoptotic genes like bcl-2 and Nr13 and pro-apoptotic genes such as bak and bim were decreased based on the amount of B-cell. In contrast, levels of bok transcript remained unchanged in B-cells during bursal development.

Isolated lymphocytes taken from the spleen were used for initial studies on the impact of BAFF *in vitro*. In agreement with published data, the anti-apoptotic effect of BAFF could be demonstrated in this study, too. At transcriptional level, this was linked to a decrease in the transcription of pro-apoptotic bim. In contrast, incubation of spleen cells with chicken CD40-ligand resulted in the vast proliferation of B-cells from both juvenile and mature birds.

However, age-related differences in the survival of lymphocytes were observed in this study, which correlated with a lower increase of anti-apoptotic *bcl-x<sub>L</sub>* in mature cells than in juvenile in response to CD40-ligand stimulation.

To further analyse the effect of BAFF on bursal B-cell development *in vivo* a previously published retroviral vector system (RCAS) was utilized. Both the effect of overexpression of BAFF as well as its neutralization using a soluble decoy receptor (BCMA) were characterised at transcriptional level. Overexpressing BAFF led to insignificant changes during the development of the bursa. Since BAFF is expressed at high levels during all stages of bursal development, gene overexpression may not exert additional effects. Neutralization of BAFF on the other hand caused distinct changes among *bcl-2* family members at the transcriptional level. It again proved necessary to correlate these changes with B-cell numbers represented by the level of *chB6* transcription. By this method genes highly expressed within the remaining B-cell population were characterised. Anti-apoptotic *bcl-2* along with *Nr13* was shown to be significantly increased in comparison to control cells.



## 9 Literaturverzeichnis

1. Jenner, E., *The Three Original Publications On Vaccination Against Smallpox, by Edward Jenner*. The Harvard classics, ed. C.W. Eliot. Vol. 38. 1909–14, New York: Collier & Son.
2. Pasteur L, C.C., Roux E. , *Sur une maladie nouvelle provoquee par la salive d'un enfant mort de la rage*. C R Acad Sci 1881(92): p. 159-65.
3. Joachims, M.L., et al., *Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential--differences between men and mice*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1543-52.
4. Pontynen, N., et al., *Aire deficient mice do not develop the same profile of tissue-specific autoantibodies as APECED patients*. J Autoimmun, 2006. **27**(2): p. 96-104.
5. Vitek, M.P., et al., *Characterization of NO and cytokine production in immune-activated microglia and peritoneal macrophages derived from a mouse model expressing the human NOS2 gene on a mouse NOS2 knockout background*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(5-6): p. 893-901.
6. Glick B., T.S.C., R.G. Jaap, *The bursa of Fabricius and antibody production on the domestic fowl*. Poultry Science, 1956. **35**: p. 224 ff.
7. Vajdy, M., P. Sethupathi, and K.L. Knight, *Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2725-9.
8. Meyer, A., et al., *Immunoglobulin gene diversification in cattle*. Int Rev Immunol, 1997. **15**(3-4): p. 165-83.
9. Yasuda, M., et al., *The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development*. Vet Res, 2006. **37**(3): p. 401-15.
10. Parng, C.L., et al., *Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5478-86.
11. Takamatsu, H., et al., *Establishment of long-term CD154-dependent porcine B-cell cultures*. Immunology, 1999. **97**(2): p. 211-8.
12. Koskela, K., et al., *Chicken B-cell-activating factor: regulator of B-cell survival in the bursa of fabricius*. Scand J Immunol, 2004. **59**(5): p. 449-57.
13. Kothlow, S., et al., *Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken*. Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-15.
14. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 139-48.
15. Cooper, M.D., et al., *Development and function of the immunoglobulin producing system. I. Effect of bursectomy at different stages of development on germinal centers, plasma cells, immunoglobulins and antibody production*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1969. **35**(3): p. 242-52.
16. Moore, M.A. and J.J. Owen, *Experimental studies on the development of the bursa of Fabricius*. Dev Biol, 1966. **14**(1): p. 40-51.
17. Cooper, M.D., et al., *The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken*. J Exp Med, 1966. **123**(1): p. 75-102.
18. StPierre, R.L. and G.A. Ackerman, *Bursa of Fabricius in chickens: Possible humoral factor*. Science, 1965(147): p. 1307ff.
19. Glick, B. and C.R. Sadler, *The Elimination of the Bursa of Fabricius and Reduction of Antibody Production in Birds from Eggs Dipped in Hormone Solutions*. Poult Sci, 1961: p. 185-189.

20. Glick, B., *The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 979-83.
21. Hamilton, H.L., *Lillie's Development of the Chick. An Introduction to Embryology*. 1953, New York: Holt, Rinehart and Winston.
22. Olah, I., B. Glick, and I. Toro, *Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos*. Poult Sci, 1986. **65**(3): p. 574-88.
23. Romanoff, A., *The avian embryo*. 1960, New York: Macmillan: p. 497–508.
24. R. Nickel, A.S., E. Seiferle, *Anatomie der Vögel*. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Vol. 5. 2004, Berlin und Hamburg Verlag Paul Parey.
25. Ratcliffe, M.J., *The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius*. Immunology Today, 1985. **6**(7): p. 223-27.
26. Ratcliffe, M.J., et al., *Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event*. Eur J Immunol, 1986. **16**(2): p. 129-33.
27. Reynaud, C.A., et al., *Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo*. Embo J, 1992. **11**(12): p. 4349-58.
28. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
29. Reynaud, C.A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-91.
30. Reynaud, C.A., et al., *Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region*. Cell, 1989. **59**(1): p. 171-83.
31. McCormack, W.T., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 838-47.
32. Pickel, J.M., et al., *Differential regulation of V(D)J recombination during development of avian B and T cells*. Int Immunol, 1993. **5**(8): p. 919-27.
33. Masteller, E.L., et al., *Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis*. Development, 1995. **121**(6): p. 1657-67.
34. Houssaint, E., E. Diez, and J.R. Pink, *Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen*. Immunology, 1987. **62**(3): p. 463-70.
35. Holmes, K.L. and J.L. Haar, *Migration of chicken yolk sac cells to bursa of fabricius supernatants*. Dev Comp Immunol, 1982. **6**(4): p. 727-36.
36. Lydyard, P.M. and J. Ivanyi, *Immunodeficiency in the chicken. III. Hypoplasia of bursal follicles following intravenous injection of embryos with lipopolysaccharide or allogeneic lymphocytes*. Immunology, 1975. **28**(6): p. 1023-31.
37. Schoenwolf, G.C., L.A. Bell, and R.L. Watterson, *Vasculogenesis of the bursa cloacalis (bursa of Fabricius) of the chick embryo*. J Morphol, 1981. **167**(1): p. 35-42.
38. Tao-Wiedmann, T.W., F. Loor, and L.B. Hagg, *Development of surface immunoglobulins in the chicken*. Immunology, 1975. **28**(5): p. 821-30.
39. Lebacqz, A.M. and M.A. Ritter, *B-cell precursors in early chicken embryos*. Immunology, 1979. **37**(1): p. 123-34.
40. Szenberg, A., *Ontogeny of myelopoietic precursor cells in the chicken embryo*. Adv Exp Med Biol, 1977. **88**: p. 3-11.
41. Weill, J.C. and C.A. Reynaud, *The chicken B cell compartment*. Science, 1987. **238**(4830): p. 1094-8.
42. Thompson, C.B. and P.E. Neiman, *Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment*. Cell, 1987. **48**(3): p. 369-78.

43. Masteller, E.L. and C.B. Thompson, *B cell development in the chicken*. *Poult Sci*, 1994. **73**(7): p. 998-1011.
44. Ratcliffe, M.J. and K.A. Jacobsen, *Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development*. *Semin Immunol*, 1994. **6**(3): p. 175-84.
45. McCormack, W.T. and C.B. Thompson, *Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity*. *Genes Dev*, 1990. **4**(4): p. 548-58.
46. Flajnik, M.F., *Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(9): p. 688-98.
47. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in swine*. *Dev Comp Immunol*, 2006. **30**(1-2): p. 199-221.
48. Reynaud, C.A., et al., *Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches*. *Cell*, 1991. **64**(5): p. 995-1005.
49. Reynaud, C.A., et al., *Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process*. *Cell*, 1995. **80**(1): p. 115-25.
50. Weinstein, P.D., A.O. Anderson, and R.G. Mage, *Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms*. *Immunity*, 1994. **1**(8): p. 647-59.
51. Weinstein, P.D., R.G. Mage, and A.O. Anderson, *The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit*. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **355**: p. 249-53.
52. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(1): p. 96-102.
53. Grossi, C.E., P.M. Lydyard, and M.D. Cooper, *B-cell ontogeny in the chicken*. *Ann Immunol (Paris)*, 1976. **127**(6): p. 931-41.
54. Sorvari, T., et al., *Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius*. *Nature*, 1975. **253**(5488): p. 217-9.
55. Sorvari, R. and T.E. Sorvari, *Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ. Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological importance*. *Immunology*, 1977. **32**(4): p. 499-505.
56. Ekino, S., et al., *Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli*. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1980. **58**(3): p. 289-96.
57. Ekino, S., et al., *The bursa of Fabricius: a trapping site for environmental antigens*. *Immunology*, 1985. **55**(3): p. 405-10.
58. Motyka, B. and J.D. Reynolds, *Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection*. *Eur J Immunol*, 1991. **21**(8): p. 1951-8.
59. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. *Eur J Immunol*, 1989. **19**(5): p. 955-8.
60. Paramithiotis, E., K.A. Jacobsen, and M.J. Ratcliffe, *Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius*. *J Exp Med*, 1995. **181**(1): p. 105-13.
61. Sayegh, C.E. and M.J. Ratcliffe, *Perinatal deletion of B cells expressing surface Ig molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the bursa of Fabricius is not due to intrafollicular competition*. *J Immunol*, 2000. **164**(10): p. 5041-8.
62. Sayegh, C.E., G. Drury, and M.J. Ratcliffe, *Efficient antibody diversification by gene conversion in vivo in the absence of selection for V(D)J-encoded determinants*. *Embo J*, 1999. **18**(22): p. 6319-28.
63. Lampisuo, M., et al., *Expression of chL12 surface antigen is associated with cell survival in the avian bursa of Fabricius*. *Scand J Immunol*, 1998. **47**(3): p. 223-8.

64. Jacobsen, K.A., et al., *Apoptotic cell death in the chicken bursa of Fabricius*. Adv Exp Med Biol, 1996. **406**: p. 155-65.
65. Asakawa, J., V.K. Tsiagbe, and G.J. Thorbecke, *Protection against apoptosis in chicken bursa cells by phorbol ester in vitro*. Cell Immunol, 1993. **147**(1): p. 180-7.
66. Neiman, P.E., S.J. Thomas, and G. Loring, *Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5857-61.
67. Nowak, J.S., O. Vainio, and O. Lassila, *In vitro organ culture of embryonic bursa of Fabricius*. Dev Comp Immunol, 1990. **14**(2): p. 239-46.
68. Franchini, A. and E. Ottaviani, *Immunoreactive POMC-derived peptides and cytokines in the chicken thymus and bursa of Fabricius microenvironments: age-related changes*. J Neuroendocrinol, 1999. **11**(9): p. 685-92.
69. Bickford, A.A., et al., *Histologic characterization of the involuting bursa of Fabricius in single-comb white Leghorn chickens*. Avian Dis, 1985. **29**(3): p. 778-97.
70. Milicevic, Z., et al., *Involution of bursa of fabricius in male and female chickens: a light microscopic histoquantitative study*. Poult Sci, 1986. **65**(12): p. 2318-23.
71. Ylikomi, T.J., et al., *Characterization of the estrogen-sensitive cells expressing progesterone receptor in the bursa of Fabricius*. Mol Cell Endocrinol, 1987. **52**(1-2): p. 35-42.
72. Ylikomi, T.J., et al., *Sexual maturation-associated and estrogen-induced progesterone receptor expression in the bursa of Fabricius*. J Immunol, 1987. **138**(10): p. 3174-8.
73. Butcher, G.D., R.H. Harms, and R.W. Winterfield, *Relationship between delayed onset of egg production and involution of the bursa of Fabricius in White Leghorn chickens*. Avian Dis, 1989. **33**(2): p. 361-4.
74. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunol Today, 1995. **16**(8): p. 392-8.
75. Leslie, G.A. and L.W. Clem, *Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken*. J Exp Med, 1969. **130**(6): p. 1337-52.
76. Mansikka, A., *Chicken IgA H chains. Implications concerning the evolution of H chain genes*. J Immunol, 1992. **149**(3): p. 855-61.
77. Muir, W.I., W.L. Bryden, and A.J. Husband, *Investigation of the site of precursors for IgA-producing cells in the chicken intestine*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(3): p. 294-6.
78. Muir, W.I., W.L. Bryden, and A.J. Husband, *Immunity, vaccination and the avian intestinal tract*. Dev Comp Immunol, 2000. **24**(2-3): p. 325-42.
79. Higgins, D.A., *Fractionation of fowl immunoglobulins*. Res Vet Sci, 1976. **21**(1): p. 94-9.
80. Schraner, I. and U. Losch, *Immunological identification of avian monomeric and polymeric immunoglobulin M and immunoglobulin A after fractionation on sodium dodecylsulfate pore gradient polyacrylamide gels*. Poult Sci, 1986. **65**(2): p. 360-8.
81. Liu, Y.J., et al., *Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 241-50.
82. Hanna, M.G., Jr., *An Autoradiographic Study of the Germinal Center in Spleen White Pulp During Early Intervals of the Immune Response*. Lab Invest, 1964. **13**: p. 95-104.
83. Amano, S. and K. Maruyama, *[Electron Microscopic Studies on Germinal Center Cells of the Lymph Node.]* Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi, 1964. **27**: p. 53-64.
84. Vainio, O., M.K. Viljanen, and A. Toivanen, *Early ontogeny of germinal center formation in the chicken*. Dev Comp Immunol, 1978. **2**(3): p. 493-504.
85. Befus, A.D., et al., *Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches*. J Immunol, 1980. **125**(6): p. 2626-32.

86. Olah, I. and B. Glick, *Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies*. Poult Sci, 1979. **58**(1): p. 195-210.
87. Fagerland, J.A. and L.H. Arp, *Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens*. Avian Dis, 1993. **37**(1): p. 10-8.
88. del Cacho, E., et al., *Follicular dendritic cell activation in the harderian gland of the chicken*. Vet Immunol Immunopathol, 1993. **35**(3-4): p. 339-51.
89. White, R.G., et al., *Localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the morphogenesis of the germinal centre*. Immunology, 1975. **28**(1): p. 1-21.
90. Gallego, M., E. del Cacho, and J.A. Bascuas, *Antigen-binding cells in the cecal tonsil and Peyer's patches of the chicken after bovine serum albumin administration*. Poult Sci, 1995. **74**(3): p. 472-9.
91. Glick, B., et al., *A scanning electron microscope study of the caecal tonsil: the identification of a bacterial attachment to the villi of the caecal tonsil and the possible presence of lymphatics in the caecal tonsil*. Poult Sci, 1978. **57**(5): p. 1408-16.
92. Gomez Del Moral, M., et al., *Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (Gallus gallus) caecal tonsil*. Anat Rec, 1998. **250**(2): p. 182-9.
93. Kittner, Z., I. Olah, and I. Toro, *Histology and ultrastructure of the the harderian glands - accessory lacrimal gland - of the chicken*. Acta Biol Acad Sci Hung, 1978. **29**(1): p. 29-41.
94. Baba, T., et al., *Role of the harderian gland in immunoglobulin A production in chicken lacrimal fluid*. Res Vet Sci, 1990. **49**(1): p. 20-4.
95. Baba, T., et al., *Harderian gland dependency of immunoglobulin A production in the lacrimal fluid of chicken*. Immunology, 1988. **65**(1): p. 67-71.
96. Chabannon, C. and B. Torok-Storb, *Stem cell-stromal cell interactions*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **177**: p. 123-36.
97. Quesenberry, P.J., *Stroma-dependent hematolymphopoietic stem cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **177**: p. 151-66.
98. Obranovich, T.D. and R.L. Boyd, *A bursal stromal derived cytokine induces proliferation of MHC class II bearing cells*. Dev Comp Immunol, 1996. **20**(1): p. 61-75.
99. Otsubo, Y., et al., *Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius*. Dev Comp Immunol, 2001. **25**(5-6): p. 485-93.
100. Morgenroth, I., et al., *CD40L is a main stimulator of B cell proliferation and antibody production in the chicken*. Dev Comp Immunol, 2007(submitted).
101. Wagner, B., *Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 155-64.
102. Lachman, L.B., S.O. Page, and R.S. Metzgar, *Purification of human interleukin 1*. J Supramol Struct, 1980. **13**(4): p. 457-66.
103. Mochizuki, D.Y., J. Watson, and S. Gillis, *Biochemical separation of interleukin 2*. J Immunol Methods, 1980. **39**(3): p. 185-201.
104. Ihle, J.N., et al., *Interleukin 3: possible roles in the regulation of lymphocyte differentiation and growth*. Immunol Rev, 1982. **63**: p. 5-32.
105. Stanley, E.R., W.A. Robinson, and G.L. Ada, *Properties of the colony stimulating factor in leukaemic and normal mouse serum*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1968. **46**(6): p. 715-26.
106. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.

107. Beutler, B. and F. Bazzoni, *TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread?* Blood Cells Mol Dis, 1998. **24**(2): p. 216-30.
108. Beutler, B., et al., *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin.* Nature, 1985. **316**(6028): p. 552-4.
109. Granger, G.A., et al., *Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells.* Nature, 1969. **221**(5186): p. 1155-7.
110. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.* Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
111. Siegel, R.M., et al., *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations.* Science, 2000. **288**(5475): p. 2354-7.
112. Hehlgans, T. and D.N. Mannel, *The TNF-TNF receptor system.* Biol Chem, 2002. **383**(10): p. 1581-5.
113. Moulin, M. and A.P. Arrigo, *Long lasting heat shock stimulation of TRAIL-induced apoptosis in transformed T lymphocytes.* Exp Cell Res, 2006. **312**(10): p. 1765-84.
114. Hino, K., et al., *TNF induces the growth of thymocytes in rainbow trout.* Dev Comp Immunol, 2006. **30**(7): p. 639-47.
115. Zijlmans, H.J., et al., *Role of tumor-derived proinflammatory cytokines GM-CSF, TNF-alpha, and IL-12 in the migration and differentiation of antigen-presenting cells in cervical carcinoma.* Cancer, 2007. **109**(3): p. 556-65.
116. Ferguson, T.A. and T.S. Griffith, *The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response.* Chem Immunol Allergy, 2007. **92**: p. 140-54.
117. Matsumoto, M., *Role of TNF ligand and receptor family in the lymphoid organogenesis defined by gene targeting.* J Med Invest, 1999. **46**(3-4): p. 141-50.
118. Kastelan, D., et al., *Possible association of psoriasis and reduced bone mineral density due to increased TNF-alpha and IL-6 concentrations.* Med Hypotheses, 2006. **67**(6): p. 1403-5.
119. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily.* Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
120. Wingfield, P., R.H. Pain, and S. Craig, *Tumour necrosis factor is a compact trimer.* FEBS Lett, 1987. **211**(2): p. 179-84.
121. Eck, M.J. and S.R. Sprang, *The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding.* J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17595-605.
122. Karpusas, M., et al., *2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand.* Structure, 1995. **3**(10): p. 1031-9.
123. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family.* Trends Biochem Sci, 1998. **23**(2): p. 74-9.
124. Chan, F.K., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling.* Science, 2000. **288**(5475): p. 2351-4.
125. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
126. Kolb, W.P. and G.A. Granger, *Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(4): p. 1250-5.
127. Semon, D., et al., *Nucleotide sequence of the murine TNF locus, including the TNF-alpha (tumor necrosis factor) and TNF-beta (lymphotoxin) genes.* Nucleic Acids Res, 1987. **15**(21): p. 9083-4.
128. Thomson, B.M., G.R. Mundy, and T.J. Chambers, *Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption.* J Immunol, 1987. **138**(3): p. 775-9.

129. Walker, S.M., S.C. Lee, and Z.J. Lucas, *Cytotoxic activity of lymphocytes. VI. Heterogeneity of cytotoxins in supernatants of mitogen-activated lymphocytes.* J Immunol, 1976. **116**(3): p. 807-15.
130. Lee, S.C. and Z.J. Lucas, *Regulatory factors produced by lymphocytes. I. The occurrence of multiple alpha-lymphotoxins associated with ribonuclease activity.* J Immunol, 1976. **117**(1): p. 283-91.
131. Ruddle, N.H., *Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development.* Immunol Res, 1999. **19**(2-3): p. 119-25.
132. Kaushansky, K., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor-beta (lymphotoxin) stimulate the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and IL-1 in vivo.* J Immunol, 1988. **141**(10): p. 3410-5.
133. Kahaleh, M.B., et al., *Effect of lymphotoxin and tumor necrosis factor on endothelial and connective tissue cell growth and function.* Clin Immunol Immunopathol, 1988. **49**(2): p. 261-72.
134. Spahn, T.W., et al., *Role of lymphotoxins in the development of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes: relevance to intestinal inflammation and treatment.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 187-93.
135. Rennert, P.D., et al., *Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor.* Immunity, 1998. **9**(1): p. 71-9.
136. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines.* J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 467-84.
137. Arnold, J.W. and P.S. Holt, *Cytotoxicity in chicken alimentary secretions as measured by a derivative of the tumor necrosis factor assay.* Poult Sci, 1996. **75**(3): p. 329-34.
138. Qureshi, M.A., et al., *Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line.* Vet Immunol Immunopathol, 1990. **26**(3): p. 237-50.
139. Byrnes, S., R. Eaton, and M. Kogut, *In vitro interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either Eimeria maxima or Eimeria tenella.* Int J Parasitol, 1993. **23**(5): p. 639-45.
140. Rautenschlein, S., A. Subramanian, and J.M. Sharma, *Bioactivities of a tumour necrosis-like factor released by chicken macrophages.* Dev Comp Immunol, 1999. **23**(7-8): p. 629-40.
141. Paulie, S., et al., *The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction.* J Immunol, 1989. **142**(2): p. 590-5.
142. Shapira, S.K., et al., *Molecular analysis of the induction of immunoglobulin E synthesis in human B cells by interleukin 4 and engagement of CD40 antigen.* J Exp Med, 1992. **175**(1): p. 289-92.
143. Brahmi, Z., et al., *Immunologic studies of three family members with the immunodeficiency with hyper-IgM syndrome.* J Clin Immunol, 1983. **3**(2): p. 127-34.
144. Aruffo, A., et al., *The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome.* Cell, 1993. **72**(2): p. 291-300.
145. DiSanto, J.P., et al., *CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM.* Nature, 1993. **361**(6412): p. 541-3.
146. Armitage, R.J., et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40.* Nature, 1992. **357**(6373): p. 80-2.
147. Tregaskes, C.A., et al., *Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate.* Dev Comp Immunol, 2005. **29**(4): p. 361-74.
148. Moore, P.A., et al., *BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator.* Science, 1999. **285**(5425): p. 260-3.

149. Shu, H.B., W.H. Hu, and H. Johnson, *TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(5): p. 680-3.
150. Mukhopadhyay, A., et al., *Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 15978-81.
151. Gross, J.A., et al., *TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 995-9.
152. Kawasaki, A., et al., *Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Genes Immun, 2002. **3**(7): p. 424-9.
153. Nardelli, B., et al., *Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells*. Blood, 2001. **97**(1): p. 198-204.
154. Lopez-Fraga, M., et al., *Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase*. EMBO Rep, 2001. **2**(10): p. 945-51.
155. Varfolomeev, E., et al., *APRIL-deficient mice have normal immune system development*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(3): p. 997-1006.
156. Wu, Y., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLYS*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35478-85.
157. Zhukovsky, E.A., et al., *TNF ligands: is TALL-1 a trimer or a virus-like cluster?* Nature, 2004. **427**(6973): p. 413-4; discussion 414.
158. Schneider, P., et al., *BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1747-56.
159. Gavin, A.L., et al., *DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38220-8.
160. Gavin, A., et al., *Peripheral B lymphocyte tolerance*. Keio J Med, 2004. **53**(3): p. 151-8.
161. Gavin, A.L., et al., *deltaBAFF, a splice isoform of BAFF, opposes full-length BAFF activity in vivo in transgenic mouse models*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 319-28.
162. Staeheli, P., et al., *Cytokines of birds: conserved functions--a largely different look*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(12): p. 993-1010.
163. Guan, Z.B., et al., *cDNA cloning, expression and bioactivity of porcine BAFF*. Dev Comp Immunol, 2007.
164. Dan, W.B., et al., *Molecular cloning, in vitro expression and bioactivity of goose B-cell activating factor*. Vet Immunol Immunopathol, 2007. **118**(1-2): p. 113-20.
165. Guan, Z.B., et al., *Cloning, expression and bioactivity of duck BAFF*. Mol Immunol, 2007. **44**(6): p. 1471-6.
166. Marsters, S.A., et al., *Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI*. Curr Biol, 2000. **10**(13): p. 785-8.
167. Thompson, J.S., et al., *BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population*. J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 129-35.
168. Thompson, J.S., et al., *BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2108-11.
169. Laabi, Y., et al., *A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma*. Embo J, 1992. **11**(11): p. 3897-904.



170. Laabi, Y., et al., *The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(7): p. 1147-54.
171. Gras, M.P., et al., *BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes*. Int Immunol, 1995. **7**(7): p. 1093-106.
172. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 91-8.
173. Yang, M., et al., *B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2814-24.
174. Patel, D.R., et al., *Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16727-35.
175. Moir, S., et al., *Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily*. J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 587-99.
176. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
177. von Bulow, G.U. and R.J. Bram, *NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily*. Science, 1997. **278**(5335): p. 138-41.
178. Dorner, T. and C. Putterman, *B cells, BAFF/ $\zeta$ TNF4, TACI, and systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res, 2001. **3**(4): p. 197-9.
179. Ramanujam, M., et al., *Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3524-34.
180. Zheng, Y., et al., *A role for B cell-activating factor of the TNF family in chemically induced autoimmunity*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 6163-8.
181. Moon, E.Y. and S.K. Ryu, *TACI:Fc scavenging B cell activating factor (BAFF) alleviates ovalbumin-induced bronchial asthma in mice*. Exp Mol Med, 2007. **39**(3): p. 343-52.
182. Sakurai, D., et al., *TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 110-8.
183. Seshasayee, D., et al., *Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 279-88.
184. Yan, M., et al., *Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1547-52.
185. Kim, H.M., et al., *Crystal structure of the BAFF-BAFF-R complex and its implications for receptor activation*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(5): p. 342-8.
186. Ng, L.G., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 807-17.
187. Ye, Q., et al., *BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses*. Eur J Immunol, 2004. **34**(10): p. 2750-9.
188. Castigli, E., et al., *TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 35-9.
189. Nakamura, N., et al., *Expression of BAFF-R (BR 3) in normal and neoplastic lymphoid tissues characterized with a newly developed monoclonal antibody*. Virchows Arch, 2005. **447**(1): p. 53-60.

190. Kaur, K., et al., *Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates*. *Blood*, 2007.
191. Mackay, F. and H. Leung, *The role of the BAFF/APRIL system on T cell function*. *Semin Immunol*, 2006. **18**(5): p. 284-9.
192. Huard, B., et al., *BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation*. *Int Immunol*, 2004. **16**(3): p. 467-75.
193. Novak, A.J., et al., *Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival*. *Blood*, 2002. **100**(8): p. 2973-9.
194. Scapini, P., et al., *G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional B<sub>LyS</sub>*. *J Exp Med*, 2003. **197**(3): p. 297-302.
195. Kato, A., et al., *Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7164-72.
196. Ittah, M., et al., *B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(2): p. R51.
197. Ohata, J., et al., *Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 864-70.
198. Krumbholz, M., et al., *BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma*. *J Exp Med*, 2005. **201**(2): p. 195-200.
199. Schaumann, D.H., et al., *VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF*. *Mol Immunol*, 2007. **44**(7): p. 1606-12.
200. Abe, M., et al., *BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma*. *Leukemia*, 2006. **20**(7): p. 1313-5.
201. Gross, J.A., et al., *TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking B<sub>LyS</sub>*. *Immunity*, 2001. **15**(2): p. 289-302.
202. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through B<sub>LyS</sub> and APRIL*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(9): p. 822-9.
203. Dejardin, E., et al., *The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways*. *Immunity*, 2002. **17**(4): p. 525-35.
204. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. *Cell*, 1995. **83**(5): p. 793-802.
205. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 231-64.
206. Klein, B., et al., *Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells*. *Int J Hematol*, 2003. **78**(2): p. 106-13.
207. Avery, D.T., et al., *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(2): p. 286-97.
208. Chang, S.K., et al., *A role for B<sub>LyS</sub> in the activation of innate immune cells*. *Blood*, 2006. **108**(8): p. 2687-94.
209. Gorelik, L., et al., *Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function*. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p. 762-6.
210. Zhang, M., et al., *Expression and function of TNF family member B cell-activating factor in the development of autoimmune arthritis*. *Int Immunol*, 2005. **17**(8): p. 1081-92.

211. Khare, S.D., et al., *Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3370-5.
212. Stohl, W., *SLE--systemic lupus erythematosus: a BLYSful, yet BAFFling, disorder*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(3): p. 136-8.
213. Mariette, X., et al., *The level of BLYS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(2): p. 168-71.
214. Hsu, B.L., et al., *Cutting edge: BLYS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 5993-6.
215. Rolink, A.G., et al., *BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 2004-10.
216. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
217. Kayagaki, N., et al., *BAFF/BLYS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 515-24.
218. Claudio, E., et al., *BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 958-65.
219. Liao, G., et al., *Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26243-50.
220. He, J.Q., et al., *Rescue of TRAF3-null mice by p100 NF-kappa B deficiency*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2413-8.
221. DiDonato, J.A., et al., *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
222. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
223. Magnani, M., et al., *The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB)*. Curr Drug Targets, 2000. **1**(4): p. 387-99.
224. Yuan, J.Y. and H.R. Horvitz, *The Caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death*. Dev Biol, 1990. **138**(1): p. 33-41.
225. Hengartner, M.O., R.E. Ellis, and H.R. Horvitz, *Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death*. Nature, 1992. **356**(6369): p. 494-9.
226. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
227. Liu, D. and Z. Huang, *Synthetic peptides and non-peptidic molecules as probes of structure and function of Bcl-2 family proteins and modulators of apoptosis*. Apoptosis, 2001. **6**(6): p. 453-62.
228. Reed, J.C., et al., *BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy*. J Cell Biochem, 1996. **60**(1): p. 23-32.
229. Yang, E., et al., *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death*. Cell, 1995. **80**(2): p. 285-91.
230. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.
231. Sattler, M., et al., *Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 983-6.

232. Slee, E.A., S.A. Keogh, and S.J. Martin, *Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release*. *Cell Death Differ*, 2000. **7**(6): p. 556-65.
233. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 491-501.
234. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. *Cell*, 1996. **87**(4): p. 619-28.
235. Knudson, C.M. and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death*. *Nat Genet*, 1997. **16**(4): p. 358-63.
236. Schlesinger, P.H., et al., *Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11357-62.
237. Minn, A.J., et al., *Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes*. *Nature*, 1997. **385**(6614): p. 353-7.
238. Schendel, S.L., et al., *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(10): p. 5113-8.
239. Schendel, S.L., et al., *Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(31): p. 21932-6.
240. Pegoraro, L., et al., *A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(22): p. 7166-70.
241. Tsujimoto, Y. and C.M. Croce, *Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(14): p. 5214-8.
242. Tsujimoto, Y., N. Ikegaki, and C.M. Croce, *Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma*. *Oncogene*, 1987. **2**(1): p. 3-7.
243. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death*. *Nature*, 1990. **348**(6299): p. 334-6.
244. McDonnell, T.J., et al., *bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation*. *Cell*, 1989. **57**(1): p. 79-88.
245. Tsujimoto, Y., *Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell*. *Oncogene*, 1989. **4**(11): p. 1331-6.
246. Do, R.K., et al., *Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response*. *J Exp Med*, 2000. **192**(7): p. 953-64.
247. Chiu, A., et al., *Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL*. *Blood*, 2007. **109**(2): p. 729-39.
248. Kessel, A., et al., *Increased susceptibility of cord blood B lymphocytes to undergo spontaneous apoptosis*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **145**(3): p. 563-70.
249. Tardivel, A., et al., *The anti-apoptotic factor Bcl-2 can functionally substitute for the B cell survival but not for the marginal zone B cell differentiation activity of BAFF*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(2): p. 509-18.
250. Rahman, Z.S. and T. Manser, *B cells expressing Bcl-2 and a signaling-impaired BAFF-specific receptor fail to mature and are deficient in the formation of lymphoid follicles and germinal centers*. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 6179-88.
251. Eguchi, Y., D.L. Ewert, and Y. Tsujimoto, *Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(16): p. 4187-92.

252. Cazals-Hatem, D.L., et al., *Molecular cloning and DNA sequence analysis of cDNA encoding chicken homologue of the Bcl-2 oncoprotein*. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1132**(1): p. 109-13.
253. Boise, L.H., et al., *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. *Cell*, 1993. **74**(4): p. 597-608.
254. Akgul, C., D.A. Moulding, and S.W. Edwards, *Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(17): p. 2189-99.
255. Gottschalk, A.R., et al., *Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(15): p. 7350-4.
256. Gonzalez-Garcia, M., et al., *bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria*. *Development*, 1994. **120**(10): p. 3033-42.
257. Amanna, I.J., J.P. Dingwall, and C.E. Hayes, *Enforced bcl-xL gene expression restored splenic B lymphocyte development in BAFF-R mutant mice*. *J Immunol*, 2003. **170**(9): p. 4593-600.
258. Vilagrasa, X., C. Mezquita, and J. Mezquita, *Differential expression of bcl-2 and bcl-x during chicken spermatogenesis*. *Mol Reprod Dev*, 1997. **47**(1): p. 26-9.
259. Ohashi, K., et al., *Expression of bcl-2 and bcl-x genes in lymphocytes and tumor cell lines derived from MDV-infected chickens*. *Acta Virol*, 1999. **43**(2-3): p. 128-32.
260. Wang, D., et al., *Control of mitochondrial outer membrane permeabilization and Bcl-xL levels by thioredoxin 2 in DT40 cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(11): p. 7384-91.
261. Gillet, G., et al., *A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus*. *Embo J*, 1995. **14**(7): p. 1372-81.
262. Johnson, A.L., et al., *Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-xlong gene expression*. *Endocrinology*, 1996. **137**(5): p. 2059-66.
263. Johnson, A.L., et al., *Expression of bcl-2 and nr-13 in hen ovarian follicles during development*. *Biol Reprod*, 1997. **57**(5): p. 1096-103.
264. Lee, R.M., et al., *Role of Nr13 in regulation of programmed cell death in the bursa of Fabricius*. *Genes Dev*, 1999. **13**(6): p. 718-28.
265. Girard-Egrot, A., et al., *Specific interaction of the antiapoptotic protein Nr-13 with phospholipid monolayers is prevented by the BH3 domain of Bax*. *J Mol Biol*, 2004. **335**(1): p. 321-31.
266. Lee, R., et al., *Characterization of NR13-related human cell death regulator, Boo/Diva, in normal and cancer tissues*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1520**(3): p. 187-94.
267. Aouacheria, A., et al., *Nrh, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis*. *Oncogene*, 2001. **20**(41): p. 5846-55.
268. Chittenden, T., et al., *Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak*. *Nature*, 1995. **374**(6524): p. 733-6.
269. Kiefer, M.C., et al., *Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak*. *Nature*, 1995. **374**(6524): p. 736-9.
270. Moss, S.F., et al., *Increased intestinal Bak expression results in apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **223**(1): p. 199-203.
271. Chittenden, T., et al., *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions*. *Embo J*, 1995. **14**(22): p. 5589-96.
272. Brooks, C., et al., *Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(28): p. 11649-54.

273. Caldwell, R.B., et al., *Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis*. Genome Biol, 2005. **6**(1): p. R6.
274. Cheeseman, J.H., et al., *Breed effect on early cytokine mRNA expression in spleen and cecum of chickens with and without Salmonella enteritidis infection*. Dev Comp Immunol, 2007. **31**(1): p. 52-60.
275. Hsu, S.Y., et al., *Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12401-6.
276. Inohara, N., et al., *Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 8705-10.
277. Rodriguez, J.M., et al., *Bok, Bcl-2-related Ovarian Killer, Is Cell Cycle-regulated and Sensitizes to Stress-induced Apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22729-35.
278. Yakovlev, A.G., et al., *BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28367-74.
279. Bartholomeusz, G., et al., *Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis*. Mol Carcinog, 2006. **45**(2): p. 73-83.
280. Zhang, H., W. Holzgreve, and C. De Geyter, *Evolutionarily conserved Bok proteins in the Bcl-2 family*. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 311-3.
281. Brown, C.Y., et al., *Role of Mtd/Bok in normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(6): p. 619-34.
282. Conradt, B. and H.R. Horvitz, *The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9*. Cell, 1998. **93**(4): p. 519-29.
283. Wang, K., et al., *BID: a novel BH3 domain-only death agonist*. Genes Dev, 1996. **10**(22): p. 2859-69.
284. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
285. Gross, A., et al., *Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1156-63.
286. Wei, M.C., et al., *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 2060-71.
287. Diaz-Gil, G., et al., *Characterization of a human Bid homologue protein from Gallus gallus*. Gene, 2006. **372**: p. 26-32.
288. Keyes, W.M. and E.J. Sanders, *Regulation of apoptosis in the endocardial cushions of the developing chick heart*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(6): p. C1348-60.
289. O'Connor, L., et al., *Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis*. Embo J, 1998. **17**(2): p. 384-95.
290. Bouillet, P., et al., *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1735-8.
291. Enders, A., et al., *Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1119-26.
292. Hughes, P., P. Bouillet, and A. Strasser, *Role of Bim and other Bcl-2 family members in autoimmune and degenerative diseases*. Curr Dir Autoimmun, 2006. **9**: p. 74-94.
293. Knight, A.K., et al., *High serum levels of BAFF, APRIL, and TACI in common variable immunodeficiency*. Clin Immunol, 2007. **124**(2): p. 182-9.

294. Lesley, R., et al., *Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF*. *Immunity*, 2004. **20**(4): p. 441-53.
295. Craxton, A., et al., *BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway*. *J Exp Med*, 2005. **202**(10): p. 1363-74.
296. Boardman, P.E., et al., *A comprehensive collection of chicken cDNAs*. *Curr Biol*, 2002. **12**(22): p. 1965-9.
297. Tregaskes, C.A., et al., *Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure*. *Immunogenetics*, 1996. **44**(3): p. 212-7.
298. Hoffmann-Fezer, G. and R. Lade, *[Post-hatching development and involution of the Bursa Fabricii in the chicken (Gallus domesticus)]*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1972. **124**(3): p. 406-18.
299. Le Bouteiller, P.P. and G.L. Asherson, *Regulation of B cell development in mouse bone marrow*. *Adv Exp Med Biol*, 1982. **149**: p. 31-8.
300. Asma, G.E., R. Langlois van den Bergh, and J.M. Vossen, *Development of pre-B and B lymphocytes in the human fetus*. *Clin Exp Immunol*, 1984. **56**(2): p. 407-14.
301. Kalled, S.L., C. Ambrose, and Y.M. Hsu, *BAFF: B cell survival factor and emerging therapeutic target for autoimmune disorders*. *Expert Opin Ther Targets*, 2003. **7**(1): p. 115-23.
302. Batten, M., et al., *BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes*. *J Exp Med*, 2000. **192**(10): p. 1453-66.
303. Defrance, T., M. Casamayor-Palleja, and P.H. Krammer, *The life and death of a B cell*. *Adv Cancer Res*, 2002. **86**: p. 195-225.
304. Kothlow, S., *Characterization of chBAFF as an important regulator of B-cell function in the chicken*, in *Dissertation. Institute of Animal Physiology*. 2004, LMU: Munich.
305. Buerstedde, J.M., et al., *Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line*. *Embo J*, 1990. **9**(3): p. 921-7.
306. Koskela, K., et al., *Insight into lymphoid development by gene expression profiling of avian B cells*. *Immunogenetics*, 2003. **55**(6): p. 412-22.
307. Arakawa, H. and J.M. Buerstedde, *Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line*. *Dev Dyn*, 2004. **229**(3): p. 458-64.
308. Moreaux, J., et al., *BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone*. *Blood*, 2004. **103**(8): p. 3148-57.
309. Tamaoki, T., et al., *Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependent protein kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **135**(2): p. 397-402.
310. Giuliano, M., et al., *Staurosporine-induced apoptosis in Chang liver cells is associated with down-regulation of Bcl-2 and Bcl-XL*. *Int J Mol Med*, 2004. **13**(4): p. 565-71.
311. Marcelli, M., et al., *Heterogeneous apoptotic responses of prostate cancer cell lines identify an association between sensitivity to staurosporine-induced apoptosis, expression of Bcl-2 family members, and caspase activation*. *Prostate*, 2000. **42**(4): p. 260-73.
312. Rothwell, C.J., L. Vervelde, and T.F. Davison, *Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996. **55**(1-3): p. 225-34.
313. Nailis, H., et al., *Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in Candida albicans biofilms by real-time PCR*. *BMC Mol Biol*, 2006. **7**: p. 25.
314. Richtsteiger, R., et al., *Quantitative multiplex real-time PCR for the sensitive detection of interferon beta gene induction and viral suppression of interferon beta expression*. *Cytokine*, 2003. **24**(5): p. 190-200.

315. Desroche, N., C. Beltramo, and J. Guzzo, *Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium Oenococcus oeni*. J Microbiol Methods, 2005. **60**(3): p. 325-33.
316. Nystrom, K., et al., *Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells*. J Virol Methods, 2004. **118**(2): p. 83-94.
317. McCormack, W.T., L.W. Tjoelker, and C.B. Thompson, *Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 219-41.
318. Sayegh, C.E., et al., *The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 187-200.
319. Ratcliffe, M.J., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 101-18.
320. Sayegh, C.E., M.A. Rao, and M.J. Ratcliffe, *Avian B cell development: lessons from transgenic models*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **72**(1-2): p. 31-7.
321. Lydyard, P.M., C.E. Grossi, and M.D. Cooper, *Ontogeny of B cells in the chicken. I. Sequential development of clonal diversity in the bursa*. J Exp Med, 1976. **144**(1): p. 79-97.
322. Schneider, P., et al., *Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1691-7.
323. Perandones, C.E., et al., *Regulation of apoptosis in vitro in mature murine spleen T cells*. J Immunol, 1993. **151**(7): p. 3521-9.
324. Knox, K.A., et al., *Second-messenger pathways involved in the regulation of survival in germinal-centre B cells and in Burkitt lymphoma lines*. Int J Cancer, 1992. **52**(6): p. 959-66.
325. Illera, V.A., et al., *Apoptosis in splenic B lymphocytes. Regulation by protein kinase C and IL-4*. J Immunol, 1993. **151**(6): p. 2965-73.
326. Ashman, R.F., D. Peckham, and L.L. Stunz, *Fc receptor off-signal in the B cell involves apoptosis*. J Immunol, 1996. **157**(1): p. 5-11.
327. Herrin, B.R. and L.B. Justement, *Expression of the adaptor protein hematopoietic Src homology 2 is up-regulated in response to stimuli that promote survival and differentiation of B cells*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4163-72.
328. Armitage, R.J., et al., *Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines*. J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3671-80.
329. Defrance, T., et al., *Proliferation and differentiation of human CD5+ and CD5- B cell subsets activated through their antigen receptors or CD40 antigens*. Eur J Immunol, 1992. **22**(11): p. 2831-9.
330. Spriggs, M.K., et al., *Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1543-50.
331. Zantl, N., et al., *Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance*. Oncogene, 2007.
332. Sabbagh, L., et al., *A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18703-8.
333. Gao, Y., et al., *Rapid identification of small interfering RNA that can effectively inhibit the replication of multiple influenza B virus strains*. Antivir Ther, 2006. **11**(4): p. 431-8.



334. Myers, S.A., S.C. Wang, and G.E. Muscat, *The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors modulate genes and pathways involved in skeletal muscle cell metabolism*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24149-60.
335. Kater, A.P., et al., *CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack*. Br J Haematol, 2004. **127**(4): p. 404-15.
336. Cartier, A., et al., *The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B*. Cell Death Differ, 2003. **10**(12): p. 1320-8.
337. Choi, M.S., et al., *The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1352-7.
338. Zhang, X., et al., *Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis*. Cell Immunol, 1996. **173**(1): p. 149-54.
339. Zarnegar, B., et al., *Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NF-kappaB activation pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8108-13.
340. Montes, C.L., et al., *B cells from aged mice exhibit reduced apoptosis upon B-cell antigen receptor stimulation and differential ability to up-regulate survival signals*. Clin Exp Immunol, 2006. **143**(1): p. 30-40.
341. Van der Put, E., et al., *Aged mice exhibit distinct B cell precursor phenotypes differing in activation, proliferation and apoptosis*. Exp Gerontol, 2003. **38**(10): p. 1137-47.
342. Ghia, P., et al., *Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival*. Blood, 1998. **91**(1): p. 244-51.
343. Koizumi, T., et al., *Regulation of bcl-xL expression and Fas susceptibility in mouse B cells by CD40 ligation, surface IgM crosslinking and IL-4*. Mol Immunol, 1996. **33**(16): p. 1247-53.
344. Fang, W., et al., *CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating bcl-xL expression and blocking oxidant accumulation*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. C950-6.
345. Sherwood, E.M., W. Xu, and R.L. Riley, *B cell precursors in senescent mice exhibit decreased recruitment into proliferative compartments and altered expression of Bcl-2 family members*. Mech Ageing Dev, 2003. **124**(2): p. 147-53.
346. Bromberg-White, J.L., et al., *Delivery of short hairpin RNA sequences by using a replication-competent avian retroviral vector*. J Virol, 2004. **78**(9): p. 4914-6.
347. Harpavat, S. and C.L. Cepko, *RCAS-RNAi: a loss-of-function method for the developing chick retina*. BMC Dev Biol, 2006. **6**: p. 2.
348. Hughes, S.H., *The RCAS vector system*. Folia Biol (Praha), 2004. **50**(3-4): p. 107-19.
349. Yu, X., et al., *Differential expression and functional analysis of Pitx2 isoforms in regulation of heart looping in the chick*. Development, 2001. **128**(6): p. 1005-13.
350. Widelitz, R.B., et al., *beta-catenin in epithelial morphogenesis: conversion of part of avian foot scales into feather buds with a mutated beta-catenin*. Dev Biol, 2000. **219**(1): p. 98-114.
351. Mitchell, P.J., S.E. Johnson, and K. Hannon, *Insulin-like growth factor I stimulates myoblast expansion and myofiber development in the limb*. Dev Dyn, 2002. **223**(1): p. 12-23.
352. Suksaweang, S., et al., *Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation*. Dev Biol, 2004. **266**(1): p. 109-22.

## Anhang

### A) Verwendete Chemikalien und Reagenzien

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

- 1 AppliChem, Darmstadt
- 2 Amersham Pharmacia, Freiburg
- 3 Ratiopharm, Ulm
- 4 Biochrom, Berlin
- 5 Sigma, Deisenhofen
- 6 Fluka, Buchs, Schweiz
- 7 Invitrogen, Karlsruhe
- 8 Merck, Darmstadt
- 9 Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- 10 Roche Diagnostics, Mannheim
- 11 Solis BioDyne, Tartur, Estland
- 12 Cambrex, Nottingham, Großbritannien
- 13 Qiagen, Hilden
- 14 Jackson, Newmarket-Suffolk, Großbritannien
- 15 SBA, Birmingham, Alabama, USA
- 16 NUNC, Roskilde, Dänemark
- 17 Fluka, Buchs, Schweiz
- 18 Caltag Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

**B) Geräte in alphabetischer Reihenfolge**

| <b>Gerät</b>           | <b>Bezeichnung</b>   | <b>Herstellerfirma</b>   |
|------------------------|--|--|
| Bioanalyzer            | Agilent 2100 Bioanalyzer<br>Software: Bioanalyzer 2100<br>Expert | Agilent Technologies Sales<br>& Services GmbH & Co.<br>KG, Waldbronn |
| Brutschrank            | CO <sub>2</sub> -Auto-Zero                                       | Heraeus Instruments,<br>München                                      |
| Durchflusszytometer    | FACScan<br>Software: CellQuest,<br>FlowJo 7.8                    | Becton Dickinson,<br>Heidelberg                                      |
| ELISA-Washer           | Tecan M8/4R Columbus plus  | SLT Labinstruments,<br>Crailsheim                                    |
| Gel Dokumentation      | Gel Doc 2000<br>Software: Quantity One 4.1.1                     | BioRad, München  |
| Hybridisierungsschrank | BFD  | WTB Binder, Tuttlingen   |
| Mikroskop              | Leica DMR  | Leica, Bensheim  |
| Mikrozentrifuge        | Centrifuge 5415R   | Eppendorf, Köln  |
| Photometer             | Biophotometer  | Eppendorf, Köln  |
| Photometer Küvette     | Spectrophotometer Quartz-<br>Küvette                             | Sigma, Deisenhofen   |
| Platten-Photometer     | Sunrise-Remote   | Tecan, Crailsheim  |
| qPCR Cycler            | qPCR 7300 RealTime PCR<br>System                                 | Applied Biosystems, Foster<br>City, Kalifornien, USA                 |
| Schleifwerkzeug        | Dremel MultiPro  | Dremel Deutschland,<br>Leinfelden-Echterdingen                       |
| Schüttler              | Kombischüttler KL-2  | Johanna-Otto GmbH,<br>Hechingen                                      |
| Stereomikroskop        | Olympus SZ61   | Olympus Deutschland<br>GmbH, Hamburg                                 |
| Sterile Werkbank       | Microflow  | Nunc, Wiesbaden  |
| Thermocycler           | Biometra, TRIO Heated Lid  | Biotron, Göttingen   |
| Zählkammer             | Modifizierte Zählkammer<br>nach Neubauer                         | Brand, Wertheim  |
| Zentrifuge             | Sigma 4K15C  | Sigma, Deisenhofen   |

---

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Kaspers für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Sonja Kothlow bedanken.

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

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Gewährung des Stipendiums im Rahmen des ‚Graduiertenkollegs 1029- Funktionale Genomforschung in der Tiermedizin‘. Danke für die hervorragende Ausbildung und die freundschaftliche Atmosphäre unter den Stipendiaten.

Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl, Dr. Birgit Viertböck und allen anderen Labormitgliedern danke ich für das freundliche Arbeitsklima und für ihre stete Hilfsbereitschaft. Dank an Ramona Schmitt für arbeitsgruppenübergreifende Unterstützung und Tiramisu in der Not.

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

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

Auch meinen Mitdoktoranden Yvonne Gräf, Matthias Hanczaruk, Ferdinand Schmitt und Katharina Weibhauser möchte ich an dieser Stelle danken. Besonderer Dank an Iris Morgenroth für gemeinsame OPs, Tagungen und Musik im Büro, und an Christian Seliger für beads, genaue Aufzeichnungen und den obligatorischen Gang in die Innere.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung über all die vielen Jahre und meinem Bruder für seine juristische Genauigkeit beim Korrekturlesen.

Abschließend danke ich Tim Florian Rieger für sein liebevolles Verständnis, viele Gemeinsamkeiten und bereichernde Unterschiede.