

Aus dem Institut für Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Untersuchung genetisch modifizierter
Mäuse bezüglich IgE vermittelter
allergischer Reaktionen, T- Zellentwicklung
und der Abwehr endogener Retroviren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Wolger Lübben

aus Leer

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 28.09.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Stefan Bauer

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Steinhoff

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1. Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2. Das adaptive Immunsystem	2
1.2. Die T-Lymphozyten	3
1.2.1. Der TCR-Signalweg	5
1.2.2. Die Bedeutung der Phospholipase-Cy1 (PLCy1)	7
1.2.3. Notch1	7
1.3. Die B-Lymphozyten	8
1.3.1. Der BCR-Signalweg	10
1.3.2. Die Bedeutung der Phospholipase-Cy2 (PLCy2)	12
1.4. Allergie und Anaphylaxie	12
1.4.2.1. Mastzellen	14
1.4.2.2. Basophile	15
1.5. Toll-like Rezeptoren (TLR)	16
1.5.1. Endogene Retroviren (ERV)	17
1.6. Das Nukleoporin Nup214	18
1.7. Die Bedeutung des Mausmodells in der immunologischen Forschung	19
1.8. Zielsetzung	20
2. Material	23
2.1. Geräte	23
2.2. Chemikalien	24
2.3. Puffer	25
2.4. Enzyme und Reagenzien	27
2.5. Kits	28
2.6. Zellkultur: Medien und Zusätze	29
2.7. Bakterienkultur-Medien	29
2.8. Antikörper	29
2.9. Vektoren	31
2.10. Primer	31
2.11. Zelllinien	32
2.12. Bakterienstämme	32
2.13. Mausstämme	32
2.14. Verbrauchsmaterialien	33
3. Methoden	34
3.1. Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.1.2. DNA-Präparation aus PCR-Ansätzen	35

3.1.3. Präparation von Plasmid-DNA.....	36
3.1.3.1. Präparation von Plasmid-DNA im mini-Maßstab	36
3.1.3.2. Präparation von Plasmid-DNA im maxi-Maßstab	36
3.1.4. Hydrolytische Spaltung von DNA.....	37
3.1.5. Agarosegelelektrophorese.....	37
3.1.6. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	38
3.1.7. Generierung von <i>blunt ends</i>	38
3.1.8. Dephosphorylierung hydrolytisch gespaltener Vektor-Fragmente	39
3.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten	39
3.1.10. Entsalzung der Ligationsansätze	40
3.1.11. Transformation	40
3.1.11.1. Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	40
3.1.11.2. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	40
3.1.12. Herstellung elektrokompeter Bakterien	41
3.1.13. Überprüfung von loxP-Stellen auf Funktionalität.....	41
3.1.14. DNA-Sequenzanalyse.....	41
3.1.15. Stammhaltung von Bakterien	42
3.1.16. Isolierung von DNA aus der Schwanzspitze von Mäusen	42
3.1.17. Präparation genomischer DNA aus Säugetierzellen.....	42
3.1.18. Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen.....	43
3.1.19. RNase-Verdau von DNA.....	43
3.1.20. Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen	43
3.1.21. DNase-Verdau von RNA	44
3.1.22. Kontrolle der RNA-Integrität	44
3.1.23. Synthese von cDNA durch reverse Transkription	44
3.1.24. Real-Time-PCR.....	44
3.1.25. Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	45
3.2. Zellkultur.....	46
3.2.1. Kultur von Säugerzellen.....	46
3.2.2. Präparation von Mausorganen	46
3.2.2.1. Präparation des Knochenmarks.....	46
3.2.2.2. Präparation von Milz und Thymus.....	46
3.2.3. Erythrozytenlyse	47
3.2.4. MACS-Aufreinigung von B-Zellen.....	47
3.2.5. Stimulation von Milzzellen mit LPS und IL-4	47
3.2.6. Stimulation von Milzzellen mit LPS, IL-4, CpG1668 und R848	48
3.2.7. MuLV-Isolation aus Zellüberständen	48
3.2.8. Stammhaltung von Säugerzellen.....	48
3.3. Kultur embryonaler Stammzellen.....	49
3.3.1. Gewinnung Embryonaler Fibroblasten	49
3.3.2. Kultur Embryonaler Fibroblasten	49

3.3.3. Kultur embryonaler Stammzellen.....	50
3.3.4. Transfektion embryonaler Stammzellen	50
3.3.5. Selektion transfizierter embryonaler Stammzellen	50
3.3.6. Isolation einzelner ES-Zellklone	51
3.3.7. Nachweis der homologen Rekombination transfizierter ES-Zellen	51
3.3.8. Ausschneiden der Neo-TK-Kassette aus transfizierten ES-Zellen	52
3.3.9. Blastozysten-Injektion	53
3.4. Anaphylaxieexperiment.....	53
3.4.1. Immunisierung von Mäusen mit TNP-OVA.....	53
3.4.2. Systemische Anaphylaxie	53
3.5. Analytische Methoden.....	53
3.5.1. Lyse von Zellen zur Proteingewinnung.....	53
3.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	54
3.5.3. Probenvorbereitung für die SDS-PAGE.....	54
3.5.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
3.5.5. Western-Blot	55
3.5.5.1. Western-Blot nach dem Tank-Verfahren.....	55
3.5.5.2. Western-Blot nach dem Semi-dry-Verfahren	56
3.5.6. Immundetektion	56
3.5.7. Strippen von Western-Blot-Membranen	57
3.5.8. Southernblot.....	57
3.5.9. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	58
3.5.10. Hybridisierung membrangebundener DNA-Fragmente mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	59
3.5.11. Strippen von Southernblotmembranen	59
3.5.12. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	59
3.5.13. Durchflusszytometrie (FACS)	61
4. Ergebnisse	62
4.1. Untersuchung der systemischen Anaphylaxie in murinen IgE-knock-in-Mäusen.....	62
4.1.1. In IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen ist der lösliche Teil der schweren Kette von murinem IgE in den IgG1-Genlocus eingeführt worden.....	62
4.1.2. Überexpression von IgE im Serum von IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen.....	63
4.1.4. Erhöhte IgE-Expression bei <i>in vitro</i> Stimulation von Milzzellen aus IgE- <i>knock-in</i> - Mäusen mit LPS und IL-4	65
4.1.4. Die <i>in vitro</i> Stimulation von Milzzellen aus IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen mit CpG 1668 bzw. R848 und IL-4 führt zur IgE-Überexpression.....	68
4.1.5. IgE- <i>knock-in</i> -Mäuse zeigen eine normale B-Zellentwicklung.....	69
4.1.6. B-Zellen von IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen zeigen eine erhöhte Expression von membrangebundenem IgE	70
4.1.7. B-Zellen von IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen weisen eine starke Expression von chimärem mIgE-IgG1 auf.....	73

4.1.8. Ein erhöhter IgE-Spiegel führt zu einer verstärkten Bindung von IgE an FcεRI auf Basophilen	75
4.1.9. Überexpression von spezifischem IgE im Serum immunisierter IgE- <i>knock-in</i> -Mäuse	78
4.1.10. Stark erhöhte Expression von spezifischem IgE im Serum von CD23 ^{-/-} IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen	80
4.1.11. Verstärkte aktive systemische Anaphylaxie in IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen	82
4.1.12. Ein erhöhter spezifischer IgE-Spiegel aktiviert Basophile in der aktiven systemischen Anaphylaxie	85
4.1.13. Die Aktivierung von Mastzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion einer IgE-vermittelten aktiven systemischen Anaphylaxie in IgE- <i>knock-in</i> Mäusen.....	87
4.2. Generierung transgener Knock-in-Mäuse mit Überexpression von humanem IgE	88
4.2.1. Strategie zur Generierung humanisierter IgE- <i>knock-in</i> -Mäuse	88
4.2.2. Generierung transgener ki-huIgE-ES-Zellen	89
4.2.3. Blastozysteninjektion und Entstehung chimärer Mäuse.....	94
4.3. Generierung von Mäusen mit induzierbarem Knock-out von PLCγ1.....	94
4.2.1. Strategie zur Generierung von Mäusen mit induzierbarem <i>Knock-out</i> von PLCγ1 (PLCγ1-iko-Mäuse).....	94
4.2.3. Klonierung des Targetvektors iko-PLCγ1	97
4.2.4. Funktionalität der loxP-Stellen im Targetvektor.....	99
4.2.4. Optimierung der Nested-PCR zum Nachweis der homologen Rekombination des <i>targeting</i> -Vektors ikoPLCγ1	100
4.2.5. Generierung von PLCγ1-iko-ES-Zellen	101
4.2.6. Generierung von geflochten PLCγ1-iko-ES-Zellen	105
4.2.7. Blastozysteninjektion und Entstehung chimärer Mäuse.....	106
4.4. Die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 bei der Abwehr endogener Retroviren (ERV) und ERV induzierter Tumorerkrankungen	107
4.4.1. TLR7 defiziente Mäuse zeigen <i>in vivo</i> eine spontane, unkontrollierte Virämie.....	107
4.4.2. TLR379 ^{-/-} -Mäuse entwickeln eine prä-T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL)	109
4.4.3. Tumorzelllinien aus TLR379 ^{-/-} -Mäusen exprimieren große Mengen MuLV	112
4.4.4. Die Neuintegration von aktivierten MuLVs in T-zellspezifische Onkogene führt zur Entstehung von T-ALL in TLR379 ^{-/-} -Mäusen	113
4.4.5. TLR379 ^{-/-} -Mäuse zeigen eine erhöhte Produktion autoreaktiver anti-DNA-Antikörper	117
5. Diskussion.....	120
5.1. Aktive systemische Anaphylaxie wird in IgE- <i>knock-in</i> -Mäusen durch IgE und nicht durch IgG1 vermittelt	120
5.2. Generierung einer transgenen huIgE- <i>knock-in</i> -Maus.....	129
5.3. Generierung von PLCγ1-iko-Mäusen	129
5.4. Die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 bei der Abwehr endogener Retroviren	131

5.5. Die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen.	135
6. Zusammenfassung	137
6.1 Summary	138
I. Abkürzungsverzeichnis	I
II. Literaturverzeichnis	IV
IV. Verzeichnis der akademischen Lehrer	XI
V. Publikationen	XII
VI. Danksagung	XIII

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

In unserer Umwelt leben eine Vielzahl von pathogenen Organismen, die unsere Gesundheit gefährden. Die Tatsache, dass wir trotzdem nur selten krank werden, haben wir einem effektiven Immunsystem zu verdanken. Es ist in der Lage, wirksam zwischen fremden Pathogenen, also Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, aber auch Toxinen und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden und die körperfremden Organismen und Substanzen zu bekämpfen.

Das Immunsystem wird in zwei eng miteinander verbundene Bereiche unterteilt, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Alle Zellen des Immunsystems haben ihren Ursprung im Knochenmark. Hier entwickeln sie sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Aus diesen bilden sich zwei Arten von Zellen: die lymphatische und myeloide Vorläuferzelle. Aus der lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und alle B- und T-Zellen, aus der myeloiden Vorläuferzelle alle Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen.

1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Die erste Barriere für eindringende Pathogene stellt das angeborene Immunsystem dar. Es reagiert unmittelbar auf eine Bedrohung, erkennt konservierte mikrobielle Strukturen und führt in der Regel nicht zu einem dauerhaften Schutz (immunologisches Gedächtnis). Zu den löslichen Bestandteilen gehört das Komplementsystem, aber auch akute Phase-Proteine und antimikrobielle Peptide. Seine zellulären Bestandteile sind die Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und NK-Zellen.

Die Mehrzahl dieser Zellen besitzt sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs). Diese erkennen für bestimmte Mikroorganismen typische Strukturen, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie z.B. LPS (Lipopolysaccharide), das in der Zellmembran gram-negativer Bakterien vorkommt. Die PRRs sind in der Keimbahn kodiert und können auf der Plasmamembran, im Zytoplasma (z.B. RIG-I-like Rezeptoren), in extrazellulären Flüssigkeiten (z.B. das mannanbindende Lectin im Blutplasma) oder in der Membran intrazellulärer Kompartimente lokalisiert sein (Medzhitov and Janeway).

Die ersten Zellen, die ein eingedrungenes Pathogen erkennen, sind gewöhnlich die Makrophagen. Sie binden das Pathogen mit Hilfe eines Oberflächenrezeptors, der die Phagozytose initiiert. Das hierbei entstehende Phagosom wird anschließend mit einem Lysosom zu einem Phagolysosom fusioniert. In diesem wird der Krankheitserreger schließlich zerstört. Dies induziert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6 oder TNF- α , die eine Entzündungsreaktion hervorrufen (Fearon and Locksley). Hierbei werden zuerst Neutrophile an den Infektionsherd gelockt. Wie die Makrophagen sind auch sie zur Phagozytose fähig. Ihnen folgen Monozyten, die im Gewebe, je nach Zytokinumfeld, zu

Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren. In späteren Entzündungsstadien gelangen Eosinophile, Basophile, Mastzellen und Lymphozyten an den Infektionsherd.

Die Eosinophilen kommen in den Schleimhäuten der Atemwege, des Magen-Darm-Trakts und in der Haut vor. Nur ein geringer Teil auch im Blut. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Abwehr von Parasiten. Hierzu setzen sie den Inhalt ihrer Granula frei, bestehend aus basischen Proteinen, Peroxidasen, lysosomalen Enzymen und Sauerstoffradikalen. Neben den Neutrophilen und Eosinophilen sind die Basophilen die dritte Gruppe der Granulozyten. Ihr Anteil an allen Leukozyten beträgt weniger als 1%. Sie zirkulieren im Blut und dienen in erster Linie der Bekämpfung von Parasiten. Aktiviert werden sie durch Zytokine oder Antigene. Dies führt zu ihrer Degranulierung und zur Freisetzung von Histamin, Proteasen und anderen Mediatoren (z.B. Prostaglandin-D2). Sie spielen neben den Mastzellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Anaphylaxie und Allergien. Basophile und Mastzellen haben vergleichbare Aufgaben, letztere kommen allerdings nicht im Blut, sondern in der Schleimhaut und im Bindegewebe vor, wo sie auch heranreifen.

Neben den Neutrophilen und Makrophagen zählen auch die dendritischen Zellen zu den Phagozyten. Hierbei unterscheidet man die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) von den konventionellen dendritischen Zellen (cDCs). Letztere gehören, wie Makrophagen und B-Zellen, zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC). Die nach der Phagozytose prozessierten Peptide werden an den *major histocompatibility complex II* (MHC II) gebunden und naiven T-Zellen präsentiert. Auf diese Weise und durch die Freisetzung von Zytokinen aktivieren sie schließlich die T-Lymphozyten. Sie stellen somit ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Die wichtigste Aufgabe der pDCs ist dagegen die Virusabwehr, da sie in der Lage sind, schon kurz nach der Viruserkennung große Mengen Typ I Interferon zu produzieren (Gilliet, Cao et al.).

Die NK-Zellen sind die einzigen Lymphozyten, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Sie zerstören entartete und infizierte Zellen. So greifen sie etwa Zellen an, die kein MHC I auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit von T-Zellen nicht erkannt werden können. NK-Zellen können aber auch durch Antigene und Zytokine aktiviert werden.

Das angeborene Immunsystem reicht zur Erkennung und Abwehr des größten Teils aller Pathogene aus. Krankheitserreger, die diese Barriere durchdringen, werden vom adaptiven Immunsystem beseitigt.

1.1.2. Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem besteht aus den B- und T-Lymphozyten sowie den Antikörpern, die von den B-Zellen als löslichen Bestandteil produziert werden. Es ist in der Lage eine praktisch unbegrenzte Anzahl verschiedener Antigene zu erkennen. Seine große Bedeutung liegt dabei in seiner Antigen-spezifität und der Bildung von Gedächtniszellen. Letztere ermöglichen eine effizientere Immunantwort gegen ein spezifisches Pathogen oder Toxin, wenn der Körper ihnen ein zweites Mal ausgesetzt ist.

1.2. Die T-Lymphozyten

Die von den B-Zellen produzierten Antikörper sind nur in der Lage extrazelluläre Pathogene zu bekämpfen. Um auch intrazelluläre Krankheitserreger (vor allem Viren) vernichtet zu können, existiert eine weitere Gruppe von Lymphozyten, die T-Zellen. Ihre wichtigste Aufgabe ist es, infizierte Zellen zu identifizieren und zu zerstören. Auch können sie Peptidfragmente von Antigenen erkennen die APCs durch Phagozytose und Makropinozytose aufgenommen haben. Dies geschieht mit Hilfe von membranständigen Glykoproteinen, den MHC-Molekülen. Sie sind in der Lage Peptidfragmente von Proteinen zu binden, die in der Zelle synthetisiert (MHC I) oder von außen aufgenommen wurden (MHC II).

Um infizierte Zellen identifizieren und zerstören zu können exprimieren nahezu alle Zellen des Körpers MHC I Moleküle auf ihrer Oberfläche. Sie bilden einen Komplex mit endogenen Peptiden. Dabei werden die Proteine durch das Proteasom in kleine Peptide zerlegt und ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Hier werden die Peptide nun an die Bindungsstelle der MHC I Moleküle gebunden und zum Golgiapparat transportiert. Über Vesikel gelangen die Komplexe dann zur Zelloberfläche. Auf diese Weise können z.B. virale Peptide von infizierten Zellen durch MHC I Moleküle präsentiert werden, wo sie von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden. Diese lysieren daraufhin die infizierte Zelle. Unter bestimmten Umständen können auch exogene Antigene (die außerhalb der APC synthetisiert wurden), die über Endozytose in die Zelle gelangt sind, von MHC I Molekülen präsentiert werden. Diese Kreuz-Präsentation ist für die antivirale Immunität von Bedeutung, da viele Viren die endogene Antigenprozessierung unterdrücken können (Melief 2003), (Sigal, Crotty et al. 1999).

MHC II Proteine werden konstitutiv in B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert und den $CD4^+$ T-Zellen präsentiert. Sie können aber auch durch eine Stimulation mit $INF-\gamma$ in andere Zellen, wie z.B. Endothel- oder Epithelzellen exprimiert werden. Die MHC II Moleküle werden über den exogenen Pfad mit Peptiden beladen. Hierbei werden die Proteine von extrazellulären Pathogenen über Phagozytose aufgenommen und in lineare Proteine prozessiert. Diese werden dann in einem endosomalen Kompartiment gesammelt. Die MHC II Moleküle werden im ER synthetisiert und von dort zu diesem endosomalen Kompartiment transportiert. Hier binden nun die Peptide an die MHC II Moleküle und werden anschließend zur Plasmamembran transportiert (Turley, Inaba et al. 2000). Dort aktivieren sie nun die $CD4^+$ T-Zellen, die ihrerseits andere Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und B-Zellen stimulieren.

Die meisten T-Zellen exprimieren einen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf ihrer Oberfläche, der aus einer α - und einer β -Polypeptidkette besteht. Dieser TCR ist in der Lage ein Antigenpeptid zu erkennen, das einen Komplex mit einem MHC I oder MHC II bildet. Die $\alpha\beta$ -T-Zellen differenzieren in verschiedene Untergruppen, von denen einige $CD8$ positiv sind ($CD8^+$ T-Zellen) und mit intrazellulären Mikroben infizierte Zellen abtöten können. Andere exprimieren $CD4$ auf der Zelloberfläche ($CD4^+$ T-Zellen) und regulieren die humorale und zelluläre Immunantwort. Eine kleine Gruppe von $\alpha\beta$ -T-Zellen schließlich exprimiert das NK-Zellenantigen NK1.1 und ist negativ für $CD4$ und $CD8$. Diese NK-T-Zellen erkennen Glykolipidantigene, die

von CD1d-Molekülen präsentiert werden und eine immunregulatorische Funktion haben (Godfrey, MacDonald et al. 2004).

Etwa 60 bis 70% aller T-Zellen im Blut und den sekundären lymphatischen Organen sind $CD4^+$, 30 bis 40% $CD8^+$. Ein Teil der $CD4^+$ T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Herunterregulierung der Immunantwort. Diese regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) unterteilen sich in zwei Gruppen: Die natürlichen T_{reg} entwickeln ihre regulatorischen Funktionen im Thymus. Die induzierten T_{reg} differenzieren sich in der Peripherie aus naiven $CD4^+$ T-Zellen.

Ruhende naive $CD4^+$ T-Zellen, auch als Helfer-T-Zellen (T_H) bezeichnet, setzen nur sehr geringe Mengen Zytokine frei. Kurz nach ihrer Stimulation durch das Antigen beginnen die T_H -Zellen mit der Produktion von IL-2 und werden nun als T_H0 -Zellen bezeichnet. Abhängig von den Zytokinen in ihrer Umgebung differenzieren diese nun zu T_H1 , T_H2 oder T_H17 (Sallusto and Lanzavecchia 2009). IL-12, welches von Makrophagen oder NK-Zellen produziert wird, induziert die Differenzierung in Richtung T_H1 . Die Produktion von IL-4 durch $NK1.1^+$ T-Zellen, Basophilen oder Mastzellen führt zur Differenzierung in Richtung T_H2 und TGF- β und IL-6 in Richtung T_H17 . Die T_H1 -Zellen unterstützen die zellvermittelnde Immunantwort und produzieren IL-2 und INF- γ . Dagegen unterstützen die T_H2 -Zellen die humorale Immunantwort und spielen bei Allergien eine wichtige Rolle. Sie produzieren IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 sowie GM-CSF. T_H17 -Zellen sind bei der Immunantwort auf extrazelluläre Bakterien von Bedeutung und produzieren IL-6 und IL-17 (Bonilla and Oettgen).

Jede T-Zelle besitzt einen Rezeptor mit einer ganz bestimmten Spezifität. Die Assemblierung des TCR erfolgt durch somatische Rekombination von V-, D- und J-Gensegmenten. Dabei entsteht eine $V_\alpha J_\alpha$ - und eine $V_\beta D_\beta J_\beta$ -Kette. Die Diversität wird noch dadurch erhöht, dass die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase Nukleotide zwischen den Verknüpfungen der Gensegmente einbaut (Nguyen, Zemlin et al. 2007). Dies führt allerdings auch zu einer großen Menge an nicht funktionsfähigen TCRs.

Die Selektion von autoreaktiven und funktionsunfähigen TCRs erfolgt im Thymus. Zuerst wandern die im Knochenmark entstandenen Pro-T-Zellen in den Thymus, wo sie differenzieren, proliferieren und die Gene der TCR- β -Kette rekombinieren. Es folgt die Rekombination der Gensegmente der α -Kette, was zur Bildung eines $\alpha\beta$ -TCRs führt. Dieser durchläuft anschließend einer Positivselektion, bei der getestet wird, ob der Rezeptor eine ausreichende Affinität zu einem Selbst-MHC-Molekül besitzt. Ist dies nicht der Fall, so führt dies zur Apoptose des Lymphozyten. Als letztes durchlaufen die überlebenden Zellen eine Negativselektion, bei der getestet wird ob sie körpereigene Peptide erkennen. Ist das der Fall, erfolgt die Apoptose dieser Zellen. Weniger als 5% aller sich entwickelnden T-Zellen überleben die Positiv- und Negativselektion (Nitta, Murata et al. 2008).

Etwa 90 bis 95% der zirkulierenden T-Zellen verwenden den $\alpha\beta$ -TCR. Die restlichen besitzen einen TCR aus einer γ - und einer δ -Kette. Auch bei ihnen werden V-, D- (nur bei der δ -Kette) und J-Gensegmente rekombiniert. Ein Teil der $\gamma\delta$ -T-Zellen werden im Thymus, die meisten aber außerhalb erzeugt, was zur Besiedelung des Magen-Darm-Traktes durch diese Zellen führt (Ishikawa, Naito et al. 2007). Menschliche $\gamma\delta$ -T-Zellen können auch durch Zellen aktiviert

werden, die kein MHC I- oder MHC II-Peptidkomplex an ihrer Oberfläche exprimieren, etwa durch die Stress induzierten Moleküle MICA und MICB.

Zur Aktivierung der T-Zelle reicht die Bindung eines MHC-Peptidkomplexes an den TCR nicht aus. Darüber hinaus bedarf es eines zweiten Signals durch kostimulatorische Moleküle, die sich auf den antigenpräsentierenden Zellen befinden. Die beiden wichtigsten sind CD80 und CD86, die Liganden von CD28, einem T-Zell-Rezeptor und Initiator des TCR-Signalwegs.

1.2.1. Der TCR-Signalweg

Der TCR ist ein Komplex aus integralen Membranproteinen, der für die Aktivierung der T-Zellen von großer Bedeutung ist. Die Bindung eines spezifischen Antigens, das von einer APC an den TCR präsentiert wird, setzt eine Reihe von positiven und negativen Signalkaskaden in Gang. Dies führt schließlich zur Proliferation, Differenzierung, Zytokinproduktion oder Apoptose.

Der TCR-Komplex setzt sich aus sechs unterschiedlichen Ketten zusammen. Er besitzt neben den zwei TCR-Ketten (meist α und β) noch das CD3-Molekül, bestehend aus CD3- γ , δ , ϵ , ζ . Die CD3-Untereinheiten enthalten charakteristische Aminosäuresequenzen für die Tyrosinphosphorylierung, sogenannte ITAMs. Nach der Bindung eines spezifischen Antigens an den TCR und der Bindung von CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) an CD28 kommt es zur Autophosphorylierung der Proteintyrosinkinase Lck. Diese bindet nun an CD28 und CD4 bzw. CD8 und phosphoryliert die ITAMs von CD3. Der phosphorylierte TCR-CD3-Komplex kann jetzt seinerseits die Tyrosinkinasen Fyn und ZAP70 phosphorylieren. ZAP70 bleibt an der CD3- ζ -Kette gebunden und induziert die Aktivierung des membranständigen Adapterproteins LAT. Dieses rekrutiert nun die Adapter GADS, SLP76 und Fyb sowie die Kinase ITK. Eines der wichtigsten Proteine die LAT rekrutiert ist die Phospholipase-C γ 1 (PLC γ 1). Dieses Enzym katalysiert die Spaltung des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in die sekundären Botenstoffe Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3). DAG aktiviert eine Reihe von Proteinen, wie die Proteinkinase-C θ (PKC θ) und Ras. Dagegen bindet IP3 an den IP3-Rezeptor auf der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums, was zur Ca²⁺-Freisetzung führt. Dadurch öffnen sich die CRAC-Kanäle der Plasmamembran, wodurch extrazelluläre Calciumionen in die Zelle eindringen können. Der erhöhte Ca²⁺-Spiegel aktiviert nun das Protein Calmodulin, das anschließend die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Dieses dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, der daraufhin in den Zellkern gelangen kann (Lin and Weiss 2001).

LAT bindet eine Reihe von Adapterproteinen der GRB2-Familie, wie GRB2, GRAP und GADS. Dies führt zur Aktivierung von Ras durch GRB2 und SOS. Das aktivierte Ras ist nun in der Lage einige Serin/Threonin-Kinasen zu aktivieren: Raf1, MEK und ERK1/2. Andererseits kann ERK auch durch VHR herunterreguliert werden, nachdem dieses durch ZAP70 phosphoryliert wurde. Andere MAP-Kinasen wie JNK und p38 werden ebenfalls über ZAP70 und SLP76 aktiviert. Zuerst wird dabei der GTP-Austauschfaktor Vav aktiviert. Dieser phosphoryliert das GTP-bindende Protein Rac, das wiederum MKK1 aktiviert. Diese aktiviert MKK4/MKK7, was schließlich zur Aktivierung von JNK führt. p38 wird durch MKK1 über MKK3/MKK6 aktiviert. Die

MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 phosphorylieren nun direkt Transkriptionsfaktoren, die an der Bildung des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1 beteiligt sind (Gong, Cheng et al. 2001).

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor, der über den TCR-Signalweg aktiviert wird, ist NFκB. Daran beteiligt ist einerseits ZAP70, das die Kinase CARD11 aktiviert, die mit BCL10 und MALT1 einen Komplex bildet, andererseits die Proteinkinase-Cθ, die MAP3K aktiviert. Sowohl CARD11 als auch MAP3K sind an der Aktivierung des heterotrimeren IκB-Kinasekomplexes (IKK) beteiligt. Letzterer reguliert die NFκB-Aktivität durch die Phosphorylierung von IκB, was zu dessen Ubiquitinierung und anschließendem Abbau führt. Das frei gewordene NFκB kann nun in den Zellkern diffundieren (Hara, Wada et al. 2003).

Um eine Hyperaktivierung der Immunantwort zu verhindern ist auch eine Negativregulation des TCR-Signalwegs von Bedeutung. So kann etwa das Transmembranprotein CTLA4 als Inhibitor des Signalwegs fungieren. Er hat die gleichen Liganden wie CD28, nämlich CD80 und CD86, bindet diese aber mit einer höheren Affinität. Um eine schnelle T-Zellaktivierung zu ermöglichen, wird CTLA4 rasch endozytiert. Soll die Aktivierung dagegen herunter reguliert werden, so setzt ZAP70 einen Prozess in Gang, der zur Translokation von CTLA4 in die Plasmamembran führt. Dort interagiert es mit SHP2 und verhindert die Phosphorylierung des TCR. Außerdem inhibiert es CD28, indem es mit ihm um die gleichen Liganden konkurriert (Anderton 2006).

Die Darstellung des TCR-Signalwegs zeigt, dass das Enzym PLCγ1 hierin eine Schlüsselstellung einnimmt. Es wird daher im folgenden Kapitel noch genauer beschrieben.

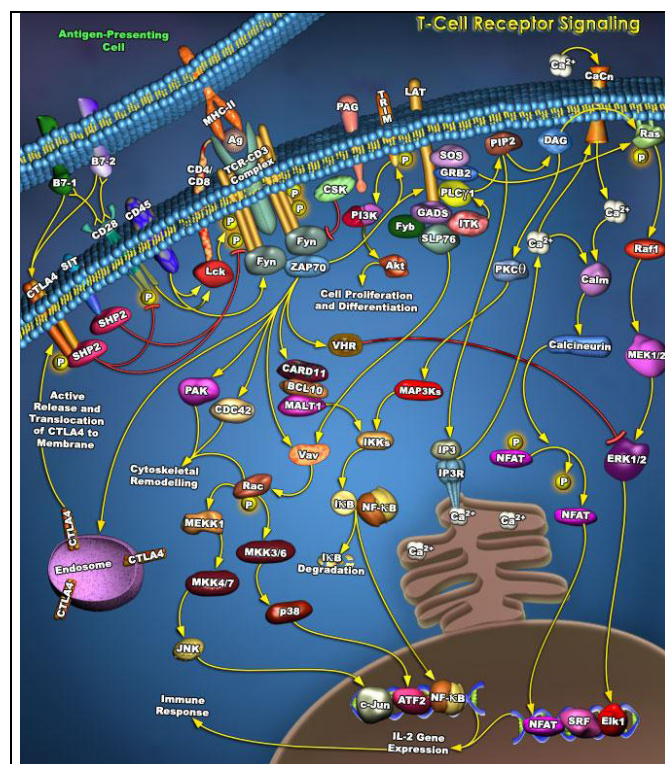


Abb. 1.1 Der TCR-Signalweg © 2009 QIAGEN, all rights reserved (Qiagen)

1.2.2. Die Bedeutung der Phospholipase-C γ 1 (PLC γ 1)

Es sind gegenwärtig 13 verschiedene PLC-Isozyme in Säugetieren bekannt. Sie werden in sechs Gruppen unterteilt: PLC- β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ , und - η . Alle hydrolysieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die beiden sekundären Botenstoffe Diazylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). DAG und IP₃ initialisieren dann weitere Signalwege durch Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) und der Freisetzung von intrazellulärem Calcium (siehe Abschnitt 1.3.1) (Suh, Park et al. 2008).

Von den PLC γ -Isozymen existieren 2 verschiedene Typen: PLC γ 1 und PLC γ 2, welches in Abschnitt 1.4.2 näher beschrieben wird. PLC γ 1 wird in fast allen Geweben und Zellen exprimiert, besonders stark in embryonalen kortikalen Strukturen, Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten. Dort reguliert es eine Vielzahl von zellulären Funktionen (Mizuguchi, Yamada et al. 1991). Seine große Bedeutung zeigt sich auch daran, dass *Knock-out*-Mäuse für PLC γ 1 nicht lebensfähig sind und die Embryonen am Tag 9 sterben (Ji, Winnier et al. 1997).

PLC γ 1 kann einerseits durch Wachstumsfaktoren wie PDGF aktiviert werden, die bestimmte Tyrosinreste des Enzyms phosphorylieren (Sekiya, Poulin et al. 2004). Andererseits kann sie aber auch durch Rezeptoren aktiviert werden, die selbst keine Tyrosinkinaseaktivität besitzen. Dazu zählen GPCRs wie die Bradykininrezeptoren, Zytokinrezeptoren und der oben erwähnte TCR (Espagnolle, Depoil et al. 2007).

Das Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen (Ye and Snyder 2004). Auch bei der Regulation der Zellmigration ist es von Bedeutung, etwa bei der Ausrichtung der Zellbewegung in Richtung EGF (Kolsch, Charest et al. 2008). Außerdem ist es ein wichtiger Faktor bei der Krebsmetastasierung (Kassis, Moellinger et al. 1999). Innerhalb des Immunsystems reguliert es die Aktivität von T-Zellen und Mastzellen (Irvin, Williams et al. 2000; Tkaczyk, Beaven et al. 2003). Im Gehirn hat PLC γ 1 ebenfalls wichtige Funktionen zu erfüllen. So reguliert sie die Differenzierung von Neuronen und das Auswachsen von Nervenzellfortsätzen (Bae, Lee et al. 1998; Lin, Xu et al. 1998).

Die Generierung einer *Knock-out*-Maus für dieses Schlüsselenzym könnte somit zu einem besseren Verständnis der Funktion von PLC γ 1 auf die Entwicklung von T-Zellen führen. Hierbei ist ihre Wirkungsweise in regulatorischen T-Zellen und die Bildung von Autoimmunität von besonderem Interesse. Da die Bedeutung von PLC γ 1 aber weit über die Immunologie hinaus geht, ist ein solches Mausmodell auch für andere Fachgebiete, insbesondere die Onkologie und Neurologie interessant.

1.2.3. Notch1

Der Notch1-Rezeptor fungiert als ligandeninduzierter Transkriptionsfaktor, der extrazelluläre Signale von der Zelloberfläche direkt in Änderungen der Genexpression umwandelt. Insgesamt gibt es vier Notch-Rezeptoren (Notch1 bis 4). Alle sind transmembrane Glykoproteine, bestehend aus einer N-terminalen extrazellulären und einer C-terminalen intrazellulären Untereinheit. Sie werden durch Zell-Zell-Kontakt aktiviert, wobei die Oberflächenrezeptoren Delta-like und Jagged der Nachbarzelle als Liganden für Notch fungieren. Diese Interaktion

führt zur Abspaltung der intrazellulären Domäne, die daraufhin in den Nukleus diffundiert, wo sie zusammen mit RBPJ/CSL einen Transkriptionskomplex bildet. Nach der Rekrutierung des Koaktivators MAML1 kann Notch1 nun die Expression verschiedener Gene aktivieren (Aster, Pear et al. 2008).

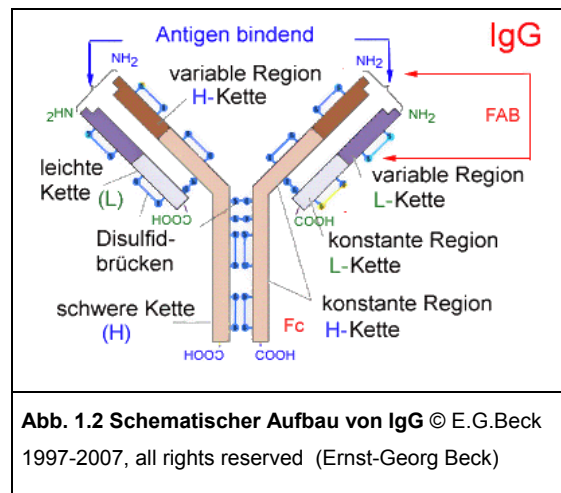
Die Notch1-Aktivierung spielt in vielen Phasen der T-Zellentwicklung eine große Rolle. So ist es z.B. an der Regulation des *TCRB*-Gens beteiligt. Dadurch reguliert Notch1, ob sich $\alpha\beta$ -T-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen entwickeln und hat außerdem Einfluss auf die Entwicklung von CD4 und CD8 positiven Zellen. Mäuse mit einer Deletion des *Notch1*-Gens entwickeln keine T-Zellen und weisen eine ektopische B-Zellentwicklung im Thymus auf, was die große Bedeutung von Notch1 unterstreicht (Tanigaki and Honjo 2007).

Notch1 ist auch ein wichtiges Onkogen: Über 60% aller Menschen mit einer T-ALL-Erkrankung (T-Zell akute lymphatische Leukämie) weisen *Notch1*-Mutationen auf, die die Notch1-Signalisierung erhöhen. Die Mutationen finden sich in Domänen, die eine spontane Aktivierung verhindern sollen oder die Dauer des Signals im Zellkern zeitlich begrenzen (Weng, Ferrando et al. 2004).

Notch1 reguliert eine Reihe von Genen die an einer T-Zelltransformation beteiligt sind. Es fördert die Ribosomenbiosynthese, die Proteintranslation sowie den Metabolismus von Nucleotiden und Aminosäuren. Des Weiteren verstärkt es direkt die Expression des Onkogens cMYC, das an vielen Prozessen der Zellproliferation beteiligt ist. Tatsächlich werden viele anabolische Gene, die von Notch1 kontrolliert werden, ebenso von c-MYC kontrolliert, so dass eine *feed-forward*-Schleife entsteht (Palomero, Lim et al. 2006). Darüber hinaus interagiert Notch1 mit Signalwegen, die für Wachstum, Proliferation und das Überleben von T-ALL-Zellen von Bedeutung sind. So verstärkt es die NF κ B-Aktivität, indem es die Expression von NF κ B erhöht (Thompson, Buonamici et al. 2007), den Aufenthalt von NF κ B im Zellkern verlängert (Shin, Minter et al. 2006) und die I κ B-Kinase aktiviert (Song, Peng et al. 2008).

1.3. Die B-Lymphozyten

Etwa 15% der Lymphozyten des peripheren Blutes bestehen aus B-Zellen. Ihre charakteristische Aufgabe ist die Produktion von Immunglobulinen. Diese setzen sich aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten zusammen. Bei den Letzteren unterscheidet man eine κ - und eine λ -Kette. Die variable Region der Immunglobuline bildet die Antigenbindungsstelle, welche aus einem V_H - und einem V_κ - oder V_λ -Segment besteht. Somit besitzt jedes Immunglobulinmolekül zwei identische Antigenbindungsstellen. Die C-terminale Region der leichten und schweren Kette ist für jede Antikörperklasse konstant. Hierbei formt die konstante Region der schweren Kette die Fc-Domäne, die für die Effektorfunktionen der Antikörper verantwortlich sind (Bonilla and Oettgen).



Sowohl der Genlocus der schweren, als auch der der leichten Kette bestehen aus mehreren V-, D- (nur für die schwere Kette) und J-Segmenten sowie einem Exon für die konstante Region (C-Exon). Die konstante Region der κ - und λ -Kette werden von je einem C-Exon kodiert. Im Gegensatz dazu besteht der Genlocus der schweren Kette aus neun verschiedenen Genen, die für die Produktion der verschiedenen Antikörperklassen und Unterklassen verantwortlich sind. Folgende Antikörper-Isotypen sind bekannt: IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 bzw. IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 bei der Maus), IgA (IgA1 und IgA2) sowie IgE.

B-Zellen werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Hier wird der B-Zellrezeptor (BCR) in einem ähnlichen Prozess generiert, wie er oben für den TCR beschrieben wurde. Zuerst wird eines der D_H -Segmente mit einem J_H -Segment verbunden. Anschließend wird ein V_H -Segment mit dem rekombinierten D_HJ_H -Segment fusioniert. Gleichzeitig baut die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase Nukleotide zwischen den drei Segmenten ein. Stromabwärts des $V_HD_HJ_H$ -Segments liegen die C_μ - und C_δ -Exons, die die konstanten Regionen der schweren Kette kodieren, um zusammen mit der leichten Kette IgM bzw. IgD zu erzeugen. Dies geschieht durch alternatives RNA-Spleißen des $V_HD_HJ_H$ -Exons zum C_μ - oder C_δ -Exon.

Nachdem die schwere Kette erzeugt wurde, beginnt die Rekombination der leichten Kette. Zuerst werden V_κ - und J_κ -Segmente rekombiniert. Entsteht hierbei eine funktionsfähige leichte Kette, so wird diese mit der schweren Kette verbunden, um ein funktionsfähiges Immunoglobulin zu bilden. Ist dies nicht der Fall, so findet eine Rekombination auf dem anderen Chromosom statt. Ist auch diese nicht erfolgreich, so kommt es zur Rekombination der λ -Kette. Naive B-Zellen exprimieren IgM und IgD auf ihrer Oberfläche. Durch alternatives Spleißen ist die Zelle in der Lage sowohl ein lösliches als auch membranständiges Immunoglobulin zu produzieren. Während der Reifung der B-Zellen kommt es dann unter dem Einfluss von Zytokinen, die von T_H -Zellen frei gesetzt werden, zum Isotypenwechsel. Hierbei wird das $V_HD_HJ_H$ -Exon zu alternativen C-Exons rekombiniert. Dadurch werden Antikörper unterschiedlichen Isotyps, aber gleicher Spezifität produziert. IL-4 löst den Isotypenwechsel zu IgG1 und IgE aus, TGF- β den zu IgG2b und IgA und IFN- γ den Wechsel zu IgG2a und IgG3 (Huston 1997).

Während des Isotypenwechsels kommt es zum Einbau von somatischen Mutationen in die Antigenbindungsstellen der leichten und schweren Kette. Führen diese Mutationen zu einer Verringerung der Affinität zum Antigen, so verliert die Zelle wichtige rezeptorvermittelte Wachstumssignale und stirbt. Führen die Mutationen aber zu einer erhöhten Affinität, so erhält die Zelle, die diesen Antikörper produziert, verstärkte Proliferationssignale und entwickelt sich zum dominanten Pool unter den Zellen, die auf das Antigen ansprechen. Die somatische Hypermutation und klonale Expansion der mutierten Zellen findet in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe statt (Schmidlin, Diehl et al. 2009).

B-Zellen können an den BCR gebundene Antigene über Phagozytose aufnehmen, prozessieren und mit Hilfe von MHC II auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die Aufnahme von Antigenen führt zu einer verstärkten Produktion von MHC II und induziert die Expression von CD80 und CD86. Diese kostimulatorischen Signale und die Präsentation der Antigenpeptide durch die B-Zelle aktiviert nun die T-Zellen. Diese wiederum interagieren mit der B-Zelle über die Wechselwirkung von dem CD40-Ligand der T-Zelle mit CD40 der B-Zelle, wodurch der Isotypenwechsel induziert wird.

Auch für die Entstehung von B-Gedächtniszellen ist der Isotypenwechsel und die somatische Hypermutation wichtig. Immunantworten durch Gedächtniszellen zeichnen sich durch eine schnelle Induktion von hochaffinen Antikörpern aus, als Reaktion auf einen zweiten Kontakt mit dem gleichen Antigen. Es werden IgG, IgA oder IgE produziert, deren Affinität durch somatische Hypermutation erhöht wird (Tangye and Tarlinton 2009).

Durch Kreuzvernetzungen mehrerer BCR durch große Antigene mit Wiederholungsmuster können B-Zellen auch ohne die Hilfe von T-Zellen aktiviert werden. Auch einige TLR-Liganden sind zu einer T-Zell unabhängigen Aktivierung von B-Zellen in der Lage. Murine B-Zellen exprimieren tatsächlich eine ganze Reihe von Toll-like Rezeptoren: TLR1, 2, 3, 4, 6, 7 und 9 (Gururajan, Jacob et al. 2007).

1.3.1. Der BCR-Signalweg

Der BCR oder auch mIg (membrangebundenes Immunglobulin) ist mit zwei Ig α - und zwei Ig β -Ketten verbunden. Während die mIg-Untereinheit das Antigen bindet, sind die Ig α /Ig β -Untereinheiten für die Signaltransduktion zuständig. Die Aktivierung des BCR führt zur Aktivierung einer Reihe von Tyrosinkinase wie Syk oder Lyn. Diese phosphorylieren nun die ITAMs der Ig α - und Ig β -Ketten, was zur Rekrutierung von Syk und Lyn an den BCR führt. Als nächstes bindet der Adapter BLNK an den Komplex und wird phosphoryliert. Über seine SH2-Domänen kann BLNK nun PLC γ 2 und BTK binden (Fu, Turck et al. 1998; Kurosaki and Tsukada 2000).

Das von BTK oder Syk phosphorylierte und aktivierte PLC γ 2 hydrolysiert das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in die sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG). Das lösliche IP $_3$ bindet an die IP $_3$ -Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und induziert deren Öffnung. Dies ermöglicht es den Ca $^{2+}$ -Ionen vom ER ins Zytosol zu fließen. Dadurch reduziert sich die Ca $^{2+}$ -Konzentration im ER, was

von STIM registriert wird, einem Transmembranprotein im ER. Die dadurch ausgelösten Konformationsänderungen von STIM führen zu direkten Wechselwirkungen zwischen STIM und dem Plasmamembrankanale CRAC, der sich daraufhin öffnet. Nun kommt es zum Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} ins Zytoplasma (Roos, DiGregorio et al. 2005; Zhang, Yu et al. 2005). Der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel aktiviert Calmodulin, das daraufhin Calcineurin aktiviert. Dies dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, der nun in den Zellkern eindringen kann. DAG aktiviert die Kinase PKC β , die daraufhin CARMA1 phosphoryliert. Darauf folgt die Rekrutierung von BCL10 und MALT1. Der entstandene Komplex phosphoryliert jetzt die IKKs, was zur Phosphorylierung und Degradierung von I κ B und Translokation von NF κ B in den Nukleus führt. Der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel und PKC β induzieren auch die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38, was wiederum zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt.

Die Kinase PI3K phosphoryliert PIP₂ zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Dieses reichert sich in der Plasmamembran an und bindet mit hoher Affinität an die PH-Domäne von BTK. Dadurch wird BTK rasch an die Membranregionen rekrutiert wo PIP₃ vorkommt. Da sowohl BTK als auch PLC γ 2 an BLNK gebunden sind, wird so PLC γ 2 in die Regionen mit PIP₃ gebracht. Diese Regionen sind ebenfalls reich an PIP₂, dem Substrat von PLC γ 2. BTK interagiert auch mit der Kinase PIP5K, die dadurch in den Komplex mit PLC γ 2 rekrutiert wird. PIP5K bildet hier weiteres PIP₃ (Saito, Tolia et al. 2003).

Ein weiterer Signalweg beginnt damit, dass Syk den Adapter Shc phosphoryliert. Als Folge davon entsteht ein Komplex aus Shc, Grb2 und dem GTP-Austauschfaktor SOS. Letzterer aktiviert Ras, das wiederum die Serin/Threoninkinase Raf1 aktiviert. Dies führt letztlich zur Aktivierung von ERK.

Korezeptoren können das BCR-Signal verstärken. So werden Pathogene, die mit dem Komplementsystem bedeckt sind, an einen trimolekularen Komplex aus CD19, CD21 und CD81 gebunden. Hierbei fungiert CD21 als Rezeptor für den Komplementteil C3d. Dies führt zu einer verstärkten Rekrutierung und Aktivierung des GTP-Austauschfaktors Vav und der Kinase PI3K. Vav fördert hierbei die Aktivierung von PI3K durch die in der Nähe befindliche GTPase Rac1. Auf diese Weise kommt es zu einer deutlichen Aktivierungsverstärkung von PLC γ 2. Außerdem kontrolliert Rac1 die Kinasekaskade, die p38 und JNK aktiviert (Tuveson, Carter et al. 1993).

Es gibt auch eine negative Regulation des BCR-Signalwegs. So bindet der *low-affinity*-Rezeptor für IgG (Fc γ RIIB1) die intrazellulären Proteine SHIP und SHP1. Die Rekrutierung von SHP1 führt dabei zu einer Dephosphorylierung von CD19 an Aminosäureresten, die für die Bindung und Aktivierung von PI3K verantwortlich sind. SHIP stimuliert die Hydrolyse von PIP₃ zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (Hippen, Buhl et al. 1997).

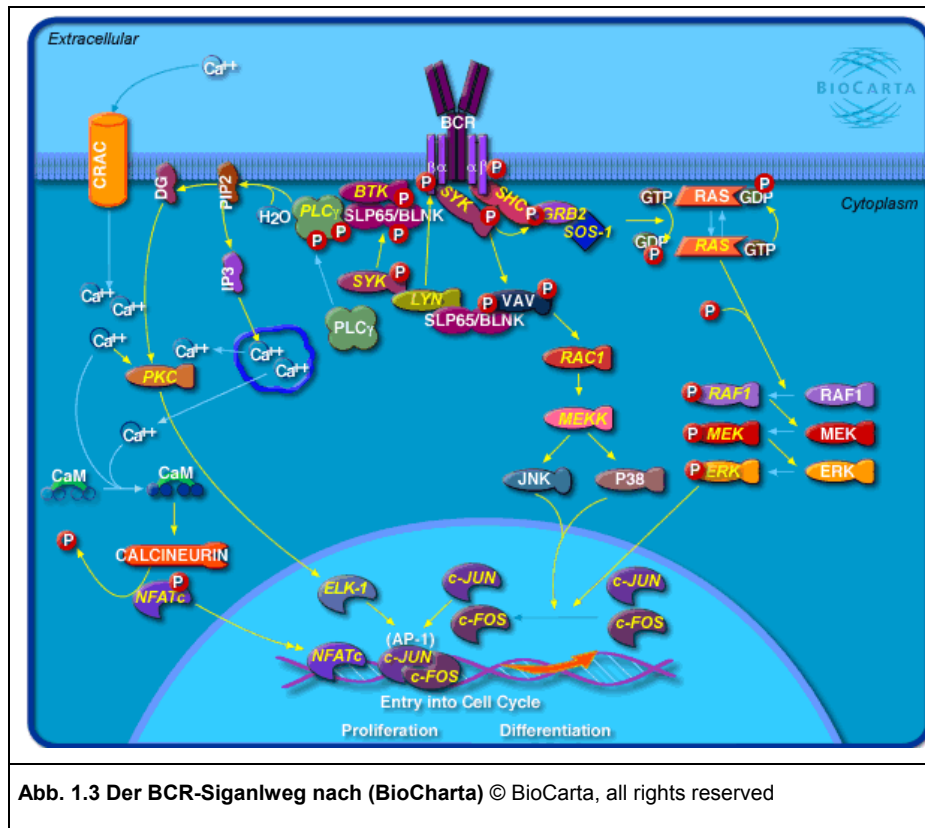


Abb. 1.3 Der BCR-Signalfweg nach (BioCharta) © BioCarta, all rights reserved

1.3.2. Die Bedeutung der Phospholipase-Cy2 (PLC γ 2)

PLC γ 2 wird im Wesentlichen nur in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert, vor allem in B-Zellen, Blutplättchen, NK-Zellen und Mastzellen. Dort wird sie durch Rezeptoren aktiviert, die selbst keine Tyrosinkinaseaktivität besitzen, wie z.B. der BCR (Marshall, Niirio et al. 2000). Anhand des BCR-Signalfwegs lässt sich erkennen, dass PLC γ 2 eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Immunantwort besitzt. Infolgedessen zeigt die *Knock-out*-Maus für PLC γ 2 Defekte in der Funktion von B-Zellen, Blutplättchen, Mastzellen und NK-Zellen (Wang, Feng et al. 2000). Ein anderes Mausmodell besitzt eine Punktmutation im PLC γ 2-Gen, die sogenannte Ali5-Mutation. Als Folge davon kommt es zu einer Hyperaktivität des Enzyms in Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Aus dieser Hyperaktivität resultierend, entwickeln die Mäuse schwere spontane Entzündungen und Autoimmunantworten (Yu, Constien et al. 2005).

1.4. Allergie und Anaphylaxie

Die IgE vermittelten Allergien haben sich in den letzten vier Jahrzehnten stark verbreitet und 1996 allein in Deutschland Kosten in Höhe von 3,5 Mrd. € verursacht (Wahn 2000). Sie gehören zu den schnellsten und potentiell stärksten Reaktionen des Immunsystems und können 5 bis 10 Minuten nach der Aufnahme des Allergens auftreten. Ihre starke Verbreitung in den westlichen Gesellschaften wird oft mit einer parallel dazu auftretenden Reduktion schwerer Infektionskrankheiten in Verbindung gebracht. Dies führte zur Entwicklung der sogenannten

Hygiene-Hypothese (Strachan 1989): Durch eine übertriebene Hygiene wird der Organismus während der Kindheit nur wenigen Krankheitserregern, Symbionten und Parasiten ausgesetzt, wodurch sich eine erhöhte Anfälligkeit für Allergien ergibt. Ursache hierfür könnte ein Verlust der T_H1 getriebene Herunterregulierung der T_H2 -Immunantwort bei Individuen sein, die früher Infektionen ausgesetzt waren. Bei einem geringeren Infektionsdruck könnte sich jedoch verstärkt der T_H2 -Teil des Immunsystems entwickeln (Folkerts, Walzl et al. 2000). Eine andere Erklärung betont die Rolle der regulatorischen T-Zellen. Diese könnten unter gewöhnlichen Umweltbedingungen stärker gegen inflammatorische T-Zellen (T_H1 und T_H2) aktiviert werden (Yazdanbakhsh, Kreamer et al. 2002).

Für eine IgE-Immunantwort sind drei Schritte notwendig: 1. Die Differenzierung von dendritischen Zellen zu DC2-Zellen, die 2. die Bildung von allergenspezifischen T_H2 -Zellen fördern, die nun wiederum 3. die Differenzierung von B-Zellen in IgE produzierende Plasmazellen induzieren (Poulsen and Hummelshoj 2007).

Eine besonders gefährliche allergische Reaktion ist die systemische Anaphylaxie, die sich durch einen Abfall des Blutdrucks und der Körpertemperatur sowie eine Verringerung der Beweglichkeit auszeichnet. Sie kann z.B. durch Insektenstiche, Medikamente oder Nahrungsmittel verursacht werden (Simons, Frew et al. 2007).

Es gibt drei Wege über die eine systemische Anaphylaxie ausgelöst werden kann. Der klassische Weg führt über IgE, Fc ϵ RI, Mastzellen, Histamin und PAF. Hierbei binden das allergenspezifische IgE, das von den Plasmazellen eines sensibilisierten Individuums produziert wird, an die Fc ϵ RI der Mastzellen. Nach einer Kreuzvernetzung der Fc ϵ RI durch die IgE-Allergenkomplexe werden die Mastzellen aktiviert und setzen daraufhin Histamin und PAF frei, die dann die Symptome der Anaphylaxie auslösen (Mukai, Obata et al. 2009).

Neben dem klassischen gibt es noch zwei alternative Wege der systemischen Anaphylaxie. Beide führen über IgG, Fc γ RIII und PAF. An dem einen sind Makrophagen, an dem anderen Basophile beteiligt (Mukai, Obata et al. 2009). Die alternativen Wege benötigen etwa 100 mal mehr Antigen als der klassische Weg. Ursache hierfür ist die deutlich höhere Affinität des Fc ϵ RI für IgE als die des Fc γ RIII für IgG. Außerdem bindet das Antigen direkt an das mastzellosoziierte IgE, während sich der Antigen-IgG-Komplex erst im Blut bzw. der Lymphflüssigkeit bilden muss, bevor er an den Fc ϵ RI bindet (Kinet 1999; Nimmerjahn and Ravetch 2005; Strait, Morris et al. 2006).

Gewöhnlich ist der antigenspezifische IgG-Spiegel deutlich höher als der entsprechende IgE-Spiegel. In diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass das IgG im Blut oder der Lymphe auf das Antigen trifft, bevor es an das mastzellosoziierte IgE binden kann. Daher kann antigenspezifisches IgG eine IgE vermittelte Anaphylaxie blockieren. Wenn nun der Antigenspiegel zu niedrig ist, um eine IgG vermittelte Anaphylaxie zu induzieren, kann ein hoher IgG-Level die Entwicklung beider anaphylaktischen Antworten verhindern. Beide anaphylaktischen Wege werden ausgelöst, wenn der Antigenspiegel die Kapazität der IgG-Antikörper übersteigt und sich Antigene an das mastzellosoziierte IgE binden kann. Für eine rein IgE vermittelte Anaphylaxie ist somit ein hoher antigenspezifischem IgE-Spiegel notwendig (Strait, Morris et al. 2006).

Neben dem FcεRI spielt auch der IgE-Rezeptor CD23 (FcεRII) für die Entwicklung von Allergien eine große Rolle. Er wird unter anderem in B-Zelle exprimiert und ist sowohl an einer Hoch- als auch an einer Herunterregulierung von IgE beteiligt. CD23 kommt in löslicher und membranständiger Form vor. Bei der Kreuzvernetzung von löslichem CD23 mit membranständigem IgE und CD21 der B-Zellen kommt es zu einer Hochregulation der IgE-Synthese. Die Bindung von IgE oder IgE-Antigenkomplexen an das membranständige CD23 führt dagegen zu Reduktion der IgE-Synthese (Hibbert, Teriete et al. 2005). Als Folge davon haben CD23 defiziente Mäuse einen etwa zweifach erhöhten IgE-Spiegel. Das spezifische IgE nach einer Immunisierung ist sogar 6 bis 12fach erhöht (Yu, Kosco-Vilbois et al. 1994).

1.4.2.1. Mastzellen

Mastzellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen. Es sind langlebige Zellen, die in der Nähe der Körperoberflächen vorkommen, einschließlich der Haut, der Atemwege und des Magen-Darmtraktes. Sie spielen eine wichtige Rolle bei T_H2- und IgE- assoziierten Immunantworten. Hierbei werden die Mastzellen mit Hilfe von IgE und dem Fcε-Rezeptor I aktiviert (bei Mäusen auch durch IgG1 und den Fcγ-Rezeptor III). Dies dient der Abwehr von bestimmten Parasiten, kann aber auch zu allergischen Krankheiten wie Anaphylaxie und Asthma führen (Metcalf, Baram et al. 1997).

Mastzellen besitzen auch eine wichtige Funktion bei der Abwehr von mikrobiellen Eindringlingen. Diese können die Mastzellen z.B. über Toll-like Rezeptoren aktivieren, von denen sie verschiedene besitzen: TLR2, 3, 4, 5, 7 und 9 (Marshall 2004). Ebenso sind sie zur Phagozytose befähigt (Malaviya, Ross et al. 1994) und in der Lage für Pathogene toxische Produkte wie Cathelicidine zu produzieren (Di Nardo, Vitiello et al. 2003).

Des Weiteren dienen sie den T-Zellen, über ihre MHC-Moleküle, als antigenpräsentierende Zellen. Sie unterstützen die Migration aktivierter T-Zellen in die Lymphknoten, etwa durch die Produktion des Chemotaxins IL-16. Sie spielen auch eine Rolle bei der Polarisierung der T-Zellantwort. So fördert das von Mastzellen produzierte Histamin eine Aktivierung der T_H1-Zellen über den H1-Rezeptor und unterdrückt eine Aktivierung von T_H1 und T_H2 durch den H2-Rezeptor (Jutel, Watanabe et al. 2001).

Einen großen Einfluss haben Mastzellen auf DCs. Die unreifen dendritischen Zellen in der Peripherie des Körpers nehmen exogene und endogene Antigene auf, haben aber nur begrenzte Fähigkeiten diese auch zu präsentieren, da sie nur wenige MHC- und kostimulative Moleküle exprimieren. Erst nach einer passenden Stimulation wandern die DCs in die Lymphknoten und beginnen mit der Expression großer Menge MHC II und kostimulativer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40. Mastzellen fördern die Migration und Reifung von DCs durch die Freisetzung von TNF, IL-1 (Steinman and Inaba 1999), IL-16 (Kaser, Duzendorfer et al. 1999), IL-18 (Cumberbatch, Dearman et al. 2001), CCL5 (Sozzani, Sallusto et al. 1995) und Prostaglandin E₂ (Kabashima, Sakata et al. 2003).

Einige Mastzelllinien exprimieren den CD40-Liganden und können so mit B-Zellen interagieren. In Gegenwart von IL-4 können sie auf diese Weise die Produktion von IgE auch in Abwesenheit von T-Zellen induzieren (Gauchat, Henchoz et al. 1993).

1.4.2.2. Basophile

Die Basophilen reifen im Knochenmark heran und zirkulieren anschließend im Blutstrom. Sie gehören zu den wichtigsten Quellen von IL-4 und besitzen die Fähigkeit in die Lymphknoten zu wandern, um dort die T_H2 -Polarisation zu fördern. Neben IL-4 produzieren sie noch eine Reihe weiterer Botenstoffe, wie Histamin, PAF oder IL-13 (Siracusa, Perrigoue et al.).

Einerseits produzieren sie IL-4 nach einer Kreuzvernetzung von Fc ϵ RI durch IgE-Komplexe, andererseits gibt es auch mehrere Stimuli, die eine IgE unabhängige IL-4 Produktion fördern. Dazu zählen „Superallergene“, die den Fc ϵ RI auch in Abwesenheit von spezifischem IgE kreuzvernetzen können (Marone, Rossi et al. 2007); Zytokine wie IL-3, GM-CSF (Schneider, Pollard et al. 1987), IL-33 (Smithgall, Comeau et al. 2008) und IL-18 (Yoshimoto, Tsutsui et al. 1999); TLR-Liganden (vor allem über TLR2 und TLR4) (Komiya, Nagase et al. 2006) und Kreuzvernetzungen über Oberflächenrezeptoren wie LIR7 (Sloane, Tedla et al. 2004) sowie von Parasiten oder Allergenen stammende Proteasen (Sokol, Barton et al. 2008).

Basophile können auch als APC fungieren, indem sie den CD4⁺ T-Zellen die Antigene über MHC II präsentieren (Sokol, Chu et al. 2009). Sie sind an der Initialisierung und Polarisierung der Immunantwort durch die Produktion von IL-4 und anderer Zytokine beteiligt. Dies gilt vor allem für TSLP und IL-25, die ebenfalls die T_H2 -Differenzierung fördern (Sokol, Barton et al. 2008). Auch bei der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen spielen Basophile eine Rolle. Durch Präsentation oder Kreuzpräsentation der Antigene über MHC I und durch die Produktion von IL-4 und IL-6 werden die naiven T-Zellen zu IL-10 produzierenden Zellen (Kim, Shen et al. 2009). Darüber hinaus können Basophile über CD40L und der Produktion von IL-4 und IL-13 B-Zellen aktivieren und den Isotypenwechsel induzieren (Yanagihara, Kajiwara et al. 1998).

Die meisten klinischen Symptome einer allergischen Reaktion werden durch Substanzen erzeugt, die Basophile und Mastzellen nach einer Kreuzvernetzung des Fc ϵ RI freisetzen, nachdem sie mit dem Allergen in Kontakt gekommen sind. Zu nennen sind hier vor allem Histamin, Leukotrien C₄, PAF, IL-4, IL-13, IL-6, TSLP, IL-25 und TNF- α . Darüber hinaus sind Basophile in der Lage, unabhängig von T- und Mastzellen, IgE-vermittelte chronische allergische Entzündungen zu verursachen (Mukai, Matsuoka et al. 2005).

Eine Anaphylaxie ist eine rasch verlaufende, lebensbedrohliche Reaktion, die entsteht, wenn IgE, das an den Fc ϵ RI von Mastzellen oder Basophilen gebunden ist, an ein Allergen bindet. Durch eine Kreuzvernetzung werden die Zellen aktiviert und setzen eine Reihe von Botenstoffen frei, die die Symptome der Anaphylaxie verursachen. Neben IgE kann auch IgG1, zusammen mit Fc γ RIII, eine Anaphylaxie vermitteln. Allgemein geht man davon aus, dass die IgE vermittelte Anaphylaxie dabei in erster Linie von Mastzellen verursacht wird, während die IgG1 vermittelte vor allem auf Basophile zurück geht (Tsujiura, Obata et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen diese strikte Aufteilung jedoch fraglich erscheinen.

1.5. Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die Toll-like Rezeptoren sind eine Familie von Transmembranrezeptoren, deren Ursprung 700 Millionen Jahren zurück liegt. Es sind 10 humane (TLR1-10) und 12 murine (TLR1-9, TLR11-13) TLRs bekannt (Takeda and Akira 2005). Man findet sie hauptsächlich auf Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch auf Neutrophilen, Eosinophilen und Epithelzellen. Sie erkennen für Pathogene typische Strukturen, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) (Medzhitov 2007). Diese Strukturen sind aber für alle Mikroben einer bestimmten Klasse charakteristisch, nicht nur für Pathogenen. Es ergibt sich somit das Problem zwischen Kommensalen und Pathogenen zu unterscheiden. Wie dies geschieht ist bis heute nicht vollständig geklärt und Thema intensiver Forschung.

Die TLRs in Säugetieren werden entweder auf der Plasmamembran oder in endosomalen/lysosomalen Organellen exprimiert. Die TLRs der Zelloberfläche erkennen konservierte mikrobielle Strukturen: TLR4 erkennt LPS (Lipopolysaccharide) gramnegativer Bakterien, die Heterodimere TLR1/TLR2 erkennen Lipoteichonsäure, ebenfalls von gramnegativen Bakterien. TLR2/TLR6 binden an bakterielle Lipoproteine und TLR5 an Flagellin. Im Gegensatz dazu erkennen die endosomalen TLRs hauptsächlich mikrobielle Nukleinsäuren. TLR3 besitzt doppelsträngige RNA, TLR7 einzelsträngige RNA (Heil, Hemmi et al. 2004) und TLR9 doppelsträngige DNA als Ligand. TLR8 erkennt auch doppelsträngige RNA, ist in murinen Zellen aber nicht funktionell (Iwasaki and Medzhitov).

Die Aktivierung der TLRs führt über eine Signalkaskade zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und IRF, was zur Expression einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, Typ I Interferone und Chemokine führt. TLRs können auch das adaptive Immunsystem aktivieren: Detektiert ein TLR auf einer dendritischen Zelle, z.B. eine Bakterienzelle, so wird diese durch Endozytose oder Phagozytose aufgenommen, prozessiert und durch den MHC den T-Zellen präsentiert. Die durch die TLR-Aktivierung freigesetzten Chemokine und kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86 sind ebenso für T-Zell-Aktivierung notwendig. B-Zellen exprimieren zahlreiche TLRs und können somit von diesen direkt aktiviert werden (Iwasaki and Medzhitov).

Neben ihrer Rolle als Detektoren für mikrobielle Strukturen sind TLRs auch an der Erkennung endogener Signale beteiligt, die durch Verletzungen freigesetzt werden. So können Chromatinfragmente und Komplexe aus Ribonukleinproteinen von toten Zellen freigesetzt werden. Wenn die Beseitigung apoptotischer Zellen nicht effizient genug verläuft, können diese Komplexe TLR7 und TLR9 auf DCs und B-Zellen aktivieren, was zur Entwicklung systemischer Autoimmunerkrankungen führt (Marshak-Rothstein and Rifkin 2007).

TLRs können auch auf andere Weise von endogenen Liganden aktiviert werden. Entzündungen und Verletzungen verursachen einen Abbau bzw. eine Akkumulation verschiedener Komponenten aus der extrazellulären Matrix. So können Fragmente aus Hyaluronsäure (HA), Biglykan und Versikan, die sich nach Verletzungen ansammeln oder von Tumorzellen freigesetzt werden, TLR2 und TLR4 auf Makrophagen aktivieren (Jiang, Liang et al. 2005; Schaefer, Babelova et al. 2005; Kim, Takahashi et al. 2009). Solche endogenen Aktivatoren scheinen aber keine adaptive Immunantwort auszulösen, im Gegensatz zur Stimulation von

TLR7 und 9, die zur Autoimmunität führen kann. Dass die Aktivierung der TLRs durch Mikroben zu einer anderen Immunantwort führt, als die durch endogene Liganden, könnte an der Beteiligung von Korezeptoren liegen. So aktiviert HA CD44 und TLR4, LPS dagegen nur TLR4 (Iwasaki and Medzhitov).

Der Signalweg aller TLRs, mit Ausnahme von TLR3, führt über den Adapter MyD88. TLR4 besitzt noch einen alternativen Weg über den Adapter TRIF, der einzige Adapter für TLR3 (O'Neill and Bowie 2007). Neben MyD88 besitzt auch noch UNC-93B eine zentrale Rolle, da es für den Transport von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 ins Endosom verantwortlich ist (Tabeta, Hoebe et al. 2006).

Die TLRs sind mit fast allen Krankheiten in Verbindung gebracht worden. Wie wichtig sind sie aber tatsächlich? TLR4 und TLR5 defiziente Mäuse leben ein normales Leben, auch in nicht steriler Umgebung. Dagegen zeigen genetische Untersuchungen am Menschen, dass nur wenige Individuen funktionsschädigende Mutationen der vier endosomalen TLRs besitzen. Diese TLRs müssen also einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt sein, der die Verbreitung solcher Mutationen verhindert. Dies deutet darauf hin, dass den endosomalen TLRs eine wichtig Funktion bei der Erkennung von Viren zukommt. Viele Menschen besitzen dagegen schädigende Mutationen der TLRs der Zelloberfläche (bis zu 23% bei TLR1). Sie scheinen daher weniger wichtig zu sein, ihre Rolle kann vermutlich von anderen Rezeptoren übernommen werden (Casanova, Abel et al.).

1.5.1. Endogene Retroviren (ERV)

Etwa 8% des humanen und 10% des murinen Genoms bestehen aus fossilen retroviralen Sequenzen (Villesen, Aagaard et al. 2004). Diese resultieren aus alten und neueren Infektionen von exogenen Retroviren, die ihr Genom erfolgreich in das der Keimzelllinien ihres Wirts eingebaut haben (Boeke and Stoye 1997). Ist ein Retrovirus erst einmal endogen geworden, überlebt der Provirus als Teil des Wirtsgenoms, auch ohne dass sich infektiöse Partikel bilden. Er ist allerdings auch dem Selektionsdruck ausgesetzt, der auf dem Wirtsgenom lastet. Viele endogenen Retroviren (ERV) verlieren daher die Fähigkeit sich zu replizieren. Im Mausgenom finden sich viele aktive ERVs, während es im menschlichen Genom keine gibt, mit HERV-K als mögliche Ausnahme (Stoye 2001).

Retroviren findet man im Genom aller Wirbeltiere. Es gibt sie aber sogar im Genom größerer und komplexerer DNA-Viren. Sie werden in Retroviren mit komplexen Genom (Lentiviren, Deltaviren und Spumaviren) und einfachem Genom (Alpha-, Beta-, Gamma-, und Epsilonretroviren) unterteilt. Nur die einfachen Retroviren können zu endogenen Retroviren werden (Weiss 2006). Das Murine Leukämievirus (MuLV) gehört zu den Gammaretroviren. Von ihm gibt es sehr viele verschiedene Stämme, von denen einige endogen sind. Sie finden sich in erster Linie in Mäusen und lassen sich in drei verschiedene Gruppen unterteilen: xenotrope, polytrope und ecotrope MuLVs. Xenotrope Viren können verschiedene Spezies befallen, nicht aber die, aus der sie sich entwickelt haben. Polytrope Viren können auch andere Spezies infizieren, als die des jetzigen Wirts. Ecotrope Viren schließlich können nur ihre gegenwärtige

Wirtsspezies infizieren. Von den xenotropen MuLVs gibt es 20 Kopien, von den polytrophen MuLVs 40 und von den ecotropen MuLVs nur wenige Kopien im Mausgenom. Von diesen drei ERV-Gruppen besitzen nur die xenotropen und ecotropen MuLVs infektiöse Mitglieder (Jenkins, Copeland et al. 1982; Khan 1984; Frankel, Stoye et al. 1990).

ERVs verändern den Phänotyp der Maus auf vielfältige Weise. Sie können die Expression von Wirtsgenen verändern oder proteinkodierende Sequenzen einführen. Meist kommt es aber zu Insertionen, die ein proteinkodierendes Gen zerstören, die Genexpression durch eine Beeinträchtigung des Spleißens verändern oder die Regulierung der Transkription modifizieren. So kann die Insertion von ERVs in somatische Zellen auch zur Bildung von Tumoren führen, insbesondere wenn Onkogene betroffen sind (Stocking and Kozak 2008). Entsprechend ist eine wirkungsvolle Abwehr von aktiven ERVs durch das Immunsystem von großer Bedeutung.

1.6. Das Nukleoporin Nup214

Die Kernmembran eukaryontischer Zellen enthält zahlreiche Kernporen (NPCs), durch die der Transport in und aus dem Zellkern erfolgt. Kleinere Moleküle bis ca. 5 kDa können frei durch die Kernpore diffundieren. Größere Moleküle werden mit Hilfe von Transportrezeptoren (Importinen und Exportinen) aktiv durch die Pore geschleust. Bei den Kernporen handelt es sich um 40 bis 60 MDa große makromolekulare Objekte, die sich aus rund 30 verschiedenen Nukleoporinen zusammensetzen. Etwa ein Drittel aller Nukleoporine enthält Phenylalanin-Glycin (FG) reiche Wiederholungssequenzen, die den Porenkanal ausfüllen (Peters 2009). Die Transportrezeptoren wechselwirken mit diesem Netzwerk von FG-Nukleoporinen während sie die Pore passieren. Andere Nukleoporine bilden das Porengerüst oder verankern sie in der Membran (Kohler and Hurt).

Neben ihrer Transportfunktion hat die Kernpore auch eine Funktion bei der Organisation und Topologie der Chromosomen, da sie als Andockstelle für das Chromatin dient. Des Weiteren reguliert sie die Transkription und hilft bei der Reparatur geschädigter DNA (Kohler and Hurt). Mehrere Nukleoporine sind mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht worden, so etwa Nup214 mit der Entstehung von Leukämie (von Lindern, van Baal et al. 1992; Kraemer, Wozniak et al. 1994). Auch werden einige Nukleoporine, wie etwa Nup88, in Tumoren stark überexprimiert (Martinez, Alonso et al. 1999).

Nup214 ist ein essentielles FG-Nukleoporin, das auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert ist. Es spielt eine wichtige Rolle beim Transport und der Freisetzung von mRNA in das Zytoplasma (Stewart 2007) und wechselwirkt über seine FG-Sequenzen mit den Transportrezeptoren. Besonders wichtig ist es für den Transport aus dem Kern, da es das Exportin Crm1 auf der cytoplasmatischen Seite bindet. Hier wird es dann für eine neue Exportrunde zurück in den Kern geschleust. Nup214 bildet ein Subkomplex mit Nup88. Beide Proteine scheinen sich dabei gegenseitig zu stabilisieren (Fornerod, van Deursen et al. 1997).

1.7. Die Bedeutung des Mausmodells in der immunologischen Forschung

In der immunologischen Forschung ist die Arbeit mit Mausmodellen heute nicht mehr weg zu denken. Durch die vielen Gemeinsamkeiten und geringen Unterschied zwischen dem murinen und humanen Immunsystem, ist die Verwendung von Mausmodellen oft die einzige Möglichkeit grundlegende Antworten in der Grundlagenforschung und der präklinischen Entwicklung von Medikamenten zu bekommen. Insbesondere die Erzeugung so genannter *Knock-out*-Mäuse hat die Maus als Forschungsobjekt populär gemacht. An den verschiedenen immunologischen Reaktionen sind eine Vielzahl von Genen und Proteinen beteiligt, die sich wechselseitig beeinflussen. Um deren Bedeutung aufzuklären, ist es mit Hilfe der Technik des *gene-targeting* möglich, gezielt einzelne Gene zu verändern, komplett auszuschalten oder ihre Regulation zu modifizieren (Galli-Taliadoros, Sedgwick et al. 1995).

Die Bedeutung des Mausmodells für die gesamte Medizin zeigt sich auch an der Vergabe des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin 2007. Dieser wurde an Martin Evans, Mario Capecchi und Oliver Smithies für ihre bahnbrechenden Arbeiten zur Erzeugung von *Knock-out*-Mäusen vergeben.

Das Grundkonzept für das *gene-targeting* durch homologe Rekombination ist relativ einfach: Zuerst wird ein *targeting*-Vektor hergestellt und in eine embryonale Stammzelllinie gebracht. Der Vektor enthält einen Selektionsmarker (gewöhnlich das Resistenzgen gegen Neomycin), der von homologen Bereichen des Zielgens flankiert wird. Die homologen Regionen ermöglichen die Insertion der veränderten Sequenz ins Genom der Stammzelle durch homologe Rekombination. Mit Hilfe des Selektionsmarkers können die veränderten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) identifiziert werden. Anschließend werden sie in Blastozysten (3,5 Tage alte Embryonen) injiziert. Die ES-Zellen sind nun in der Lage in jedes beliebige Gewebe zu differenzieren, einschließlich in Keimzellen. Die daraus entstehenden chimären Mäuse werden gekreuzt, um homo- und heterozygote *Knock-out*- (Ausschalten eines Gens) oder *Knock-in*-Mäuse (Einführen eines neuen Gens oder einer Mutation) zu erhalten (Galli-Taliadoros, Sedgwick et al. 1995).

Auch die Erzeugung von gewebsspezifischen Genmodifikationen ist mit dieser Technik möglich. Hierbei lässt der Targetvektor die Funktion des Gens unverändert und fügt nur Erkennungsschnittstellen für eine Rekombinase ein. Anschließend wird die Maus mit einer transgenen Maus verpaart, die diese Rekombinase mit Hilfe eines gewebsspezifischen Promotors in bestimmten Zellen oder Geweben exprimiert. So lässt sich beispielsweise eine Deletion nur in T-Zellen erzeugen, während in allen anderen Geweben das Gen unverändert bleibt (Pfeffer and Mak 1994).

Wichtig ist auch die Erzeugung sogenannter humanisierter Mausstämme mit Hilfe des *gen-targetings*. Hierbei werden murine Gene durch humane ausgetauscht. Mit diesen humanisierten Mäusen lassen sich menschliche Krankheiten oftmals noch besser untersuchen, als am reinen Mausmodell.

1.8. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war einerseits die Generierung zweier neuer Mausmodelle zur Analyse des TCR-Signalwegs bzw. von Typ-I-Allergien, andererseits die Untersuchung bereits bestehender Mausmodelle bezüglich der Aktivierung des angeborenen Immunsystems und IgE vermittelter allergischer Reaktionen (Abb. 1.4):

a) Generierung einer T-Zell-spezifischen PLCy1 *Knock-out*-Maus

Zuerst sollte der *targeting*-Vektor hergestellt und in ES-Zellen transfiziert werden. Anschließend sollten die gentechnisch veränderten ES-Zellen in Blastozysten injiziert und die daraus resultierenden chimären Mäuse gekreuzt werden, um schließlich *Knock-out*-Mäuse zu erhalten.

Dieses neue Mausmodell sollte zur Beantwortung folgende Fragen beitragen:

- Welche Bedeutung hat PLCy1 für die T-Zellentwicklung, insbesondere der T_{reg}?
- Welche Rolle spielt PLCy1 in der T-Zellvermittelten Autoimmunität?

b) Generierung einer transgenen *Knock-in*-Maus mit einer Überexpression von humanem IgE

Der bereits vorhandene *targeting*-Vektor sollte wie unter a) beschrieben zur Generierung einer *knock-in*-Maus verwendet werden, die eine starke Überexpression von humanem IgE zeigen sollte. Hierzu sollte das Gen für den löslichen Teil der schweren Kette von IgG1 durch den entsprechenden Teil von humanem IgE ersetzt werden. Diese Mäuse sollten anschließend mit humanen FcεRI transgenen Mäusen verpaart werden. Das daraus resultierende neue Mausmodell sollte dazu beitragen ein besseres Verständnis für IgE vermittelte Immunreaktionen im Menschen zu gewinnen.

c) Analyse von IgE-*knock-in*-Mäusen und CD23-*knock-out*-Mäusen

IgE-*knock-in*-Mäuse zeigen eine starke Überexpression von murinem IgE, bei den CD23-*knock-out*-Mäusen ist der *low-affinity* Rezeptor für IgE deletiert. Diese beiden Mausmodelle, sowie Kreuzungen zwischen ihnen, sollen dazu beitragen wichtige Fragen bezüglich IgE vermittelter Allergien zu klären:

- Welchen Einfluss hat ein erhöhter IgE-Spiegel auf eine systemische Anaphylaxie?
- Welche Rolle spielen Basophile bei der Entwicklung einer systemischen Anaphylaxie und welche Bedeutung haben hierbei IgE und IgG1?
- Wie ist der Einfluss von CD23 auf IgE vermittelte Allergien?
- Wie wird IgE auf molekularer und zellulärer Ebene reguliert?

d) Analyse des PLCy2^{Alis}-Mausmodells und TLR3,7,9-*knock-out*-Mäusen bezüglich einer B-Zellvermittelten Autoimmunität

Die PLCy2^{Alis}-Maus besitzt eine Punktmutation im Gen von PLCy2 und dient als Modell für Autoimmunerkrankungen wie SLE (systemischer Lupus erythematoses). PLCy2^{Alis}-Mäuse und *knock-out*-Mäuse für TLR3, 7 und/oder 9 sowie Kreuzungen zwischen den beiden Gruppen

sollten auf die Ausbildung von autoreaktiven Antikörpern untersucht werden. Die Analyse dieser Mäuse sollte einen Beitrag zur Beantwortung folgender Fragen leisten:

- Was sind die Ursachen und Mechanismen der B-Zellvermittelten Autoimmunität?
- Welche Bedeutung haben die Toll-like Rezeptoren 3, 7 und 9 bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen?

e) Analyse von *Knock-out*-Mäusen für TLR3, 7 und 9 sowie Kombinationen dieser

Dieses Modell soll dazu dienen neue Erkenntnisse über die Bedeutung der nukleinsäurebindenden TLRs bei der Abwehr von ERVs zu gewinnen:

- Welche Ursache hat die Entstehung von T-ALL in TLR3,7,9-*knock-out*-Mäusen?
- Wie ist der Mechanismus der T-ALL Entstehung?
- Wie groß ist die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 bei der Abwehr von ERVs und nach welchem Mechanismus erfolgt sie?

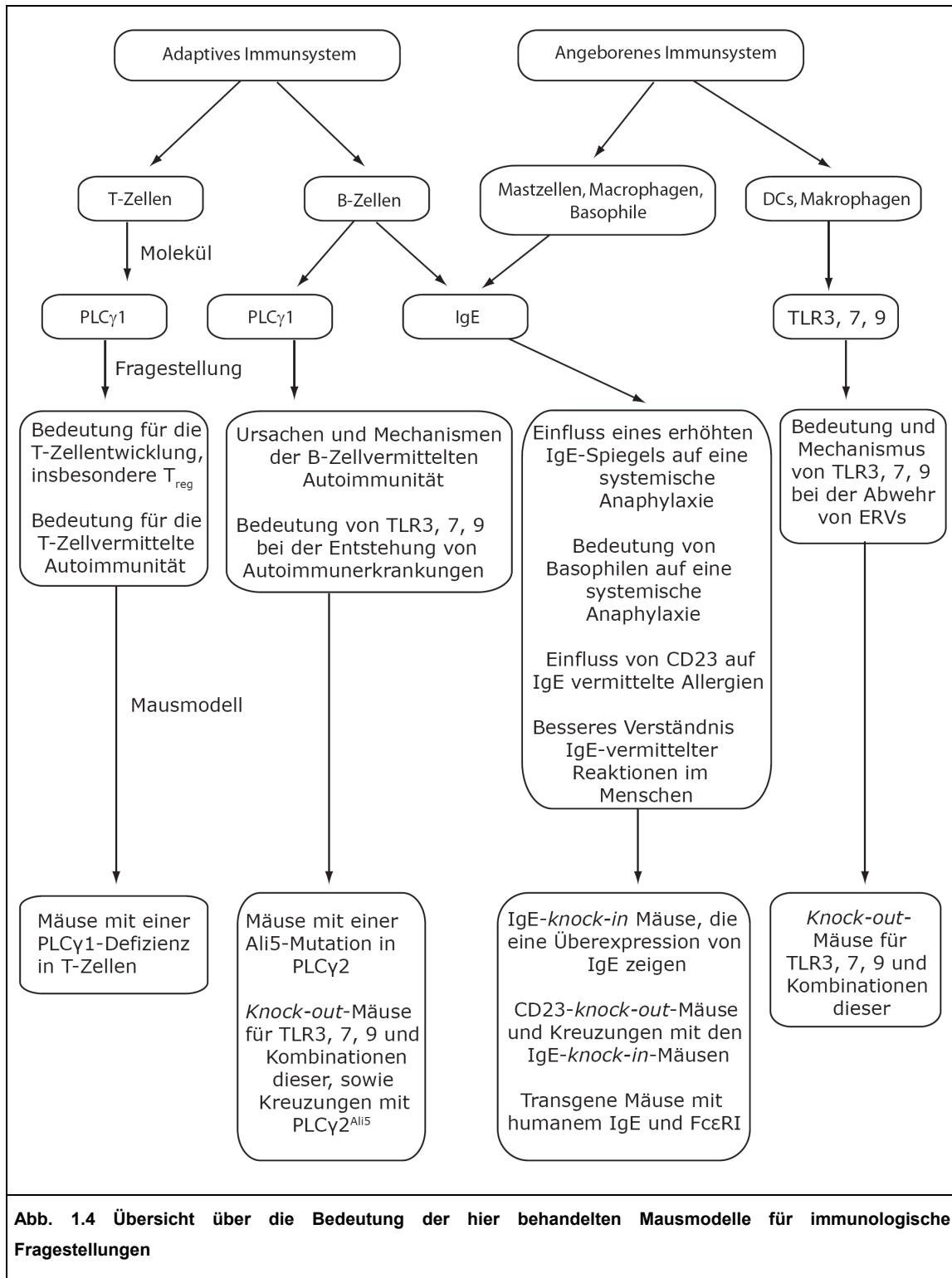


Abb. 1.4 Übersicht über die Bedeutung der hier behandelten Mausmodelle für immunologische Fragestellungen

2. Material

2.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer	OWL, Weilheim
Analysewaage R160P-D1	Sartorius GmbH, Göttingen
Bakterieninkubator Cytoperm	Heraeus, Hanau
β-Counter 1219 Rackbeta	LKB Instruments, Mt Waverley, Australien
Blot Modul Xcell II Mini Cell (EI9001)	Novex, San Diego, USA
Crosslinker Stratalinker 2400	Agilent Technologies, Waldbronn
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Basel
Elektroporator Gene Pulser x-cell	Biorad, Hercules, USA
ELISA-Waschgerät Skan Washer 400	Molecular Devices, Ismaning
Entwickler Optimax 2010	PROTEC, Oberstenfeld
Gel Imaging System	Fröbel Labor Technik, Lindau
Homogenisator Precellys	PeqLab, Erlangen
Hybridisierungsöfen	Hybaid, Heidelberg
Mikroskop Diavert	Leitz, Bielefeld
Mikroskop Wilovert	Will, Wetzlar
Ofen	Heraeus, Hanau
PCR-Maschine C1000 Thermal Cycler	Biorad, Hercules, USA
pH-Meter pH523	WTW, Weilheim
Phosphorimager BAS-1000	Fujifilm, Düsseldorf
Plattenphotometer Emax microplate reader	Molecular Devices, Ismaning
RT-PCR-Gerät Mini Opticon	Biorad, Hercules, USA
Schüttelinkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schwenkplatte Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
SDS-PAGE-Kammer Perfect Blue Twin S	PeqLab, Erlangen
Semi-Dry Blotter TE77XP	Hoefer, Holliston, USA
Spannungsquelle Standard PowerPack P25	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Power Erase 500	Novex, San Diego, USA
Spektrophotometer NanoDrop-1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hanau
Sterilbank LaminAir HLB2448	Heraeus, Hanau
Thermo-Schüttler TS-100	PeqLab, Erlangen
Thermometer	Testo AG, Lenzkirch
Tischzentrifuge Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L7-55 (SW41 Rotor)	Beckman Coulter, Krefeld

Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage EC 105	E-C Apparatus, USA
Wasserbad	WTW, Weilheim
Zählkammer Neubauer	W. Schreck, Hofheim
Zentrifuge Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge DS-15R	Beckman Coulter, Krefeld
Zellinkubator HERA cell 240	Heraeus, Hanau

2.2. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose (Ultra Pure)	Invitrogen, Karlsruhe
Ammonimperoxidisulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamidlösung	Serva, Heidelberg
Borsäure (H_3BO_3)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Denhardt's Lösung 10x	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
Diethanolamin ($\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a. 99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Formamid (CH_3NO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe

Natriumazid (NaN_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natronlauge 1N	Roth, Karlsruhe
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 32%	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl) 1M	Roth, Karlsruhe
4 N Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%	AppliChem, Darmstadt
Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Merck, Darmstadt

2.3. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
2x SDS-Probenpuffer	1,25 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8); 2 ml Glycerin; 4,6 ml 10%ige SDS-Lsg, Spatelspitze Bromphenolblau → ad 10 ml ddH ₂ O, vor Gebrauch Zugabe 800 µl 2-Mercaptoethanol
20x SSPE, pH 7,4	3 M NaCl; 0,2 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,02 M EDTA
10x DNA-Ligasepuffer	660 mM Tris-HCl, pH 7,6; 66 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT; 660 µM ATP
10x PBS	2g KCl; 2 g KH ₂ PO ₄ ; 80 g NaCl; 11,5 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O → ad 1 L mit ddH ₂ O
50x TAE	242 g Tris-Base; 57,1 ml Essigsäure (100%), 0,5 M EDTA (pH 8) → ad 1 L mit 1x PBS
5x TBE	54 g Tris-Base; 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) → ad 1 L mit ddH ₂ O
Blockpuffer (ELISA)	10 g BSA; 0,5 ml Tween 20 → ad 1 L 1x PBS

Blockpuffer (Western-Blot)	Waschpuffer + 5% Milchpulver
Blotting-Puffer (Western-Blot)	6 g Tris; 28,67 g Glycin → ad 1600 ml ddH ₂ O → vor Gebrauch Zugabe 400 ml Methanol
Denaturierungspuffer (Southernblot)	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Depurinierungspuffer (Southernblot)	0,25 M HCl
EDTA 0,5 M	18,61 g EDTA; 50 ml ddH ₂ O; mit NaOH auf pH 8 → ad 100 ml mit ddH ₂ O
FACS-Puffer	1x PBS; 3% FCS; 0,01% NaN ₃
Hybridisierungspuffer (Southernblot)	10 ml Formamid; 5 ml 20x SSC, pH 7,0; 2 ml Natriumphosphatpuffer pH 6,4; 2 ml Denhardt's Lösung; 400 µl 10%ige SDS- Lösung; 200 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml); 400 µl ddH ₂ O
Laufpuffer 20x SSC pH 7,0 (Southernblot)	350,6 g NaCl; 176,4 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ • 2H ₂ O → ad 2 L ddH ₂ O
Lyse-Puffer (Verdau Mäuseschwänze)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5% SDS; vor Gebrauch Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K
MACS-Puffer	1x PBS; 0,5% BSA; 2 mM EDTA
Neutralisierungspuffer pH 7,0 (Southernblot)	1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl
Proteinase-K-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,45% Tween 20; 0,5% Triton X-100; vor Gebrauch Zugabe von 200 µg/ml Proteinase K
Puffer G1 (pH 7,5)	320 mM Saccharose; 5 mM MgCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl; 1% Triton X-100
Puffer N2 (pH 6,3)	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ ; 15% Ethanol; 900 mM KCl; 0,15% Triton X-100
Puffer N3 (pH 6,3)	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ ; 15% Ethanol; 1150 mM KCl
Puffer N5 (pH 8,5)	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ ; 15% Ethanol; 1000 mM KCl
RIPA-Puffer	150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% Natrium- desoxycholat; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA; vor Gebrauch Zugabe von 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Pepstatin A
SDS-Laufpuffer	3,04 g Tris-Base; 14,42 g Glycin; 10 ml 10%ige SDS-Lösung → ad 1 L mit ddH ₂ O
Stripping-Puffer (Western-Blot)	1,9 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,7; 0,24 ml

	2-Mercaptoethanol; 6 ml 10%ige SDS-Lösung; 21,9 ml ddH ₂ O
Southernblot-Strippingpuffer	2x SSPE; 50% Formamid
Substratpuffer 1 (ELISA)	1 M Diethanolamin; 0,5 mM MgCl ₂ ; mit HCl auf pH 9,8
Substratpuffer 2 (ELISA)	7,3 g C ₆ H ₈ O ₇ ; 11,87 g Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O → ad 1 L ddH ₂ O
TBS	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl → mit HCl auf pH 7,6
Waschpuffer (ELISA)	500 ml 10x PBS; 2,5 ml Tween 20 → ad 5 L mit ddH ₂ O
Waschpuffer (Western-Blot)	1x PBS; 0,1% Tween 20 (pH 7,2 – 7,6)
Waschpuffer 1 (Southernblot)	1x SSC + 0,1% SDS
Waschpuffer 2 (Southernblot)	0,5x SSC + 0,1% SDS
Waschpuffer 3 (Southernblot)	0,1x SSC + 0,1% SDS

2.4. Enzyme und Reagenzien

Name	Hersteller
6x Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon Rot
10x NEBuffer 1 – 4	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
1668-PTO	TIB Molbiol, Berlin
Alkalische Phosphatase (CIP) 10000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
α - ³² P-dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Alum (Alu-Gel-S)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
CD43 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Dnase I (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim
dNTP Mix, 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
DOTAP Transfection Reagent	Roche, Mannheim
FMS-like Tyrosinkinase 3 (Flt3-) Ligand	TU München
Ganciclovir	Roche, Mannheim
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon Rot
Gene Ruler 1 kb Dann Ladder	Fermentas, St. Leon Rot
Geneticin (G418)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin Liquemin N 25000	Roche, Mannheim
Heringssperma-Dann	Promega, Mannheim
recombinant mouse IL-4	Preprotech, Hamburg

Kalbsthymus-Dann	Sigma-Aldrich, Steinheim
Klenow DNA-Polymerase I (large)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LIF (<i>leukaemia inhibitory factor</i>)	aus Zellüberstand, Genetics Institute, Boston, USA
Lipopolysaccharide aus <i>E. coli</i>	Difco Laboratories, Detroit, USA
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Steinheim
OPD (<i>ortho</i> -Phenyldiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Vantaa, Finnland
PNPP (<i>para</i> -Nitrophenylphosphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinaseinhibitor (complete mini)	Roche, Mannheim
Proteinleiter PageRuler Plus	Fermentas, St. Leon Rot
Proteinase K (10 mg/ml)	Roche, Mannheim
R848 (Resiquimod)	Coley Pharmaceutical Group, Düsseldorf
RapidStep™ ECL Reagent	Calbiochem, Bad Soden
RNase (500 µg/ml)	Roche, Mannheim
Red blood cell lysing buffer (RBL)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon Rot
TNP-OVA (2,4,6-Trinitrophenol-Ovalbumin)	Biosearch Technologies, Novato, USA
TRIZOL® (Tri Reagent)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.5. Kits

Name	Firma
Amersham Megaprime DNA Labeling Systems	GE Healthcare, München
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Wilmington, USA
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, Hercules, USA
iScript Select cDNA Synthesis Kit	Biorad, Hercules, USA
Mouse MCPT-1 ELISA Ready-SET-Go	eBioscience, Frankfurt a.M.
Nucleobond LB 100 Kit	Machery-Nagel, Düren
Nucleo Bond Xtra Maxi EF-Kit	Machery-Nagel, Düren
PeqGOLD plasmid Mini Prep Kit I	PeqLab, Erlangen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification-Kits	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.6. Zellkultur: Medien und Zusätze

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Darmstadt
DMEM (high glucose 4,5 g/L) without L-Glu	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS ^{def}	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS ⁺⁺	PAA, Cölbe
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Biochrom, Berlin
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA, Cölbe
Optimem	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Trypsin-EDTA (10x; 5 mg/ml Trypsin; 2,2 mg/ml EDTA)	PAA, Cölbe
Ultra Pure Wasser	Biochrom, Berlin

Die Medien wurden folgendermaßen komplettiert:

Medium	Zusammensetzung
DMEM compl.	DMEM; 10% FCS; 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 0,1% 2-Mercaptoethanol
ES-Zellmedium	DMEM; 15% FCS; 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 0,1% 2-Mercaptoethanol; 5 ml LIF
RPMI 1640 compl.	RPMI; 10% FCS; 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 0,1% 2-Mercaptoethanol

2.7. Bakterienkultur-Medien

Name	Hersteller
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe
SOC- <i>Outgrowth-Medium</i>	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

2.8. Antikörper

Spezifität	Markierung	Ursprung	Firma
anti-mouse IgM	-	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA

anti-mouse IgG1	-	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG2a	-	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse Ig2b	-	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG2c	-	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG3	-	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgE	-	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgM	HRP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG1	AP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG2a	AP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse Ig2b	AP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG2c	HRP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG3	AP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgE	AP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-mouse IgG	HRP	goat	Southern Biotech, Birmingham, USA
anti-rabbit IgG	HRP	goat	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
anti-mouse Nup214 C-Terminus	-	rabbit	Maarten Fornerod, Erasmus Universität, Rotterdam, Niederlande
anti-mouse Nup214 N-Terminus	-	mouse	Novus Biologicals, Littleton, USA
anti-mouse Nup88	-	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-mouse Notch-1 NICD	-	rabbit	GeneTex, Irvine, USA
anti-mouse β -Aktin	-	rabbit	Sigma-Aldrich, Steinheim
IgG, whole molecule	-	mouse	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
IgG, whole molecule	-	rat	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
anti-MuLV gp70 (83A25)	-	rat	Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, USA
anti-mouse B220	FITC	goat	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse B220	APC	rat	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD8	APC	rat	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD3e	FITC	hamster	BD Pharmingen, Heidelberg

anti-mouse CD4	FITC	rat	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD4	PE	rat	eBioscience, Frankfurt a.M.
anti-mouse CD23	PE	rat	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse IgE	FITC	rat	eBioscience, Frankfurt a.M.
anti-mouse IgG1	FITC	rat	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse FcεRI	PE	hamster	eBioscience, Frankfurt a.M.
anti-rat IgG2a	FITC	mouse	BioLegend, Uithoorn, Niederlande

2.9. Vektoren

Vektor	Insert	Hersteller
hulGE-DFV	schwere Kette murines IgG1 und humanes IgE	Philipp Yu, Institut für Immunologie, Marburg
pcDNA3.1(-)	PLCy1 Exon 27 bis 32, Ali5-Mutation in Exon 27	Invitrogen, modifiziert von Philipp Yu, Institut für Immunologie, Marburg
pPCR-Script	Neo-TK-Kassette eingerahmt von zwei loxP-Stellen	Stratagene, modifiziert von Philipp Yu, Institut für Immunologie, Marburg

2.10. Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
442	gaagctgggctggacgtaac	Metabion, Martinsried
644	actgctcgacattggtgga	Metabion, Martinsried
656	tcgtgacagaaggtggtagt	Metabion, Martinsried
657	ggacttctctgttttgca	Metabion, Martinsried
658	ccaacaatacaggggacagag	Metabion, Martinsried
659	tcaacctacaaacggaaagaa	Metabion, Martinsried
660	cctagtcagtgccagcctca	Metabion, Martinsried
662	gcagcgggtcaaggggaaga	Metabion, Martinsried
663	gcagcccagagtcacggagg	Metabion, Martinsried
664	gctggttaaggtcatagttgt	Metabion, Martinsried
758	caggcattccttcggtatg	Metabion, Martinsried
759	cagagtgatccccgtgtct	Metabion, Martinsried

2.11. Zelllinien

Name	Ursprung	Hersteller
Aho-2	T-Zelllymphom TLR379 ^{-/-}	Institut für Immunologie, Marburg
Baki-1	T-Zelllymphom TLR379 ^{-/-}	Institut für Immunologie, Marburg
EL-4	T-Zelllymphom C57BL/6	ATCC: Nr. TIB-39
Mize-8	T-Zelllymphom TLR379 ^{-/-}	Institut für Immunologie, Marburg
Teno-4	T-Zelllymphom TLR379 ^{-/-}	Institut für Immunologie, Marburg
Wuzel-5	T-Zelllymphom TLR379 ^{-/-}	Institut für Immunologie, Marburg
WEHI-231	B-Zelllymphom BALB/c	MPI für Immunologie, Dr. Lammert, Freiburg

2.12. Bakterienstämme

Name	Hersteller
NEB Express competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

2.13. Mausstämme

Stamm	Hersteller
TLR3 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Shizo Akira, Osaka, Japan
TLR7 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Shizo Akira, Osaka, Japan
TLR9 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Shizo Akira, Osaka, Japan
TLR37 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
TLR39 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
TLR79 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
TLR379 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
Unc93b1-3d mit C57BL/6 Hintergrund	Koichi Tabeta, Scripps Research Institute, La Jolla, USA
MyD88 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Shizo Akira, Osaka, Japan
C57BL/6	Institut für Immunologie, Marburg
IgE ^{w^t/kⁱ} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
IgE ^{kⁱ/kⁱ} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
IgE ^{w^t/kⁱ} mit BALB/c Hintergrund	Philipp Yu, TU München
IgE ^{kⁱ/kⁱ} mit BALB/c Hintergrund	Philipp Yu, TU München

BALB/c	Institut für Immunologie, Marburg
CD23 ^{+/-} IgE ^{wt/ki} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
CD23 ^{+/-} IgE ^{wt/ki} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
CD23 ^{-/-} IgE ^{wt/ki} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
CD23 ^{-/-} IgE ^{ki/ki} mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für Immunologie, Marburg
CD23 ^{-/-} mit C57BL/6 Hintergrund	Philipp Yu, Institut für Immunologie, Marburg

2.14. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
6-well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
12-well Platten	Costar Corning Inc., Niederlande
24-well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
48-well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Flachbodenplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Rundbodenplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Maxisorp Platten	Nunc Thermo Fisher, Roskilde, Dänemark
Cryorührchen	Sarstedt, Nürnberg
Dialysemembranen 0,025 µm	Millipore, Schwalbach
Elektroporations-Küvetten 1 mm	Roth, Karlsruhe
Elektroporations-Küvetten 4 mm GenePulser	Biorad, Hercules, USA
Filterspitzen	Sorenson Bioscience, Salt Lake City, USA
Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Handschuhe Nobaglove	NOBA Verbandmittel, Wetter
illustra Probe Quant G50 Micro Columns	GE Healthcare, München
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kombitips	Eppendorf, Hamburg
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nylon-Membran positively charged	Roche, Mannheim
Nylon-Sieb (70 µm) Cell Strainer 352350	Becton Dickinson, Heidelberg
Pasteurpipetten	Otto Kobe, Marburg
Plastikpipetten	Sarstedt, Nürnberg
PCR-Tubes	Biostep, Jahnsdorf
PvDF Immobilon-P Transfermembran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (Tubes) 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nürnberg
Spitzen	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,45 µm)	Sartorius, Aubagne, Frankreich
Streifentubes + Deckel	BioRad, Hercules, USA

Whatman-Papier GB003	Schleicher + Schuell, Dassel
Zellkulturschalen 10 cm	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturschalen 15 cm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 75 cm ² und 175 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen

3. Methoden

Im folgenden Kapitel werden die angewandten molekularbiologischen Methoden erläutert. Sämtliche Arbeiten mit lebenden Organismen wurden gemäß dem aktuellen Gentechnikgesetz (GenTG) durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S1. Alle mit kontaminierten Lösungen und Gefäße wurden 60 Minuten bei 121°C und einem Druck von 1,5 bar inaktiviert.

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der *in vitro*-Vervielfältigung (Amplifikation) beliebiger DNA-Abschnitte (Mullis and Faloona 1987). Die Reaktion wird in einem Thermocycler durchgeführt, der ein sich zyklisch wiederholendes Temperaturprogramm durchläuft. Dabei wird ausgehend vom entsprechenden DNA-Template (Vorlage) nur das gewünschte Fragment in großen Mengen amplifiziert. Da während der PCR teilweise sehr hohe Temperaturen herrschen, ist die Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen notwendig. Diese stammen ganz oder teilweise aus thermophilen Organismen. Hohe Temperaturen haben zudem den Vorteil, dass es während der DNA-Synthese zu weniger Fehlern kommt, da sich die einzelsträngige DNA und der Primer nur dann zusammenlagern (annealen) können, wenn es zu einer Watson-Crick-Paarung kommt. Bei niedrigeren Temperaturen wirken nicht-Watson-Crick-Paarungen dagegen weniger destabilisierend und erhöhen die Mutationsrate.

Als Startpunkt der Replikation dienen jeweils zwei ca. 20 bis 40 Basen lange synthetische Oligonukleotide (3'- und 5'-Primer). Diese müssen komplementär zum codierenden bzw. nichtcodierenden DNA-Strang sein und die Bereiche des zu amplifizierenden DNA-Fragments flankieren.

Die DNA-Amplifikation erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt werden die beiden komplementären DNA-Stränge des Templates voneinander getrennt, die DNA wird „aufgeschmolzen“ (denaturiert). Dies erfolgt bei Temperaturen von 92 bis 98°C. Im nachfolgenden Schritt wird auf eine spezifische Temperatur abgekühlt, bei der sich die einzelsträngige Template-DNA und der jeweilige Primer zusammenlagern (*primer annealing*). Diese sogenannte Hybridisierungstemperatur ist abhängig vom GC-Gehalt und der Länge der Primer.

Anschließend wird die Temperatur auf 72°C erhöht und die eigentliche DNA-Amplifikation beginnt. Die meisten verwendeten thermophilen DNA-Polymerasen besitzen in der Nähe dieser Elongationstemperatur ihre maximale Aktivität und sind bei niedrigen Temperaturen nicht oder kaum aktiv. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-

Fragments und der verwendeten Polymerase. Ist sie beendet, beginnt der nächste Reaktionszyklus erneut mit dem Denaturieren der DNA. Es werden üblicherweise ca. 30 bis 35 Zyklen durchlaufen, wobei sich aus einem einzigen Zielmolekül 1×10^9 bis 3×10^{10} Kopien gebildet haben. Endprodukt der Amplifikation ist das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment.

Der für die Klonierung verwendete PCR-Ansatz hatte die in der folgenden Tabelle angegebene Zusammensetzung:

PCR-Ansatz	
Plasmid-DNA	1 μ l (5,0 ng)
3'-Primer (100 pmol/ μ l)	2,5 μ l
5'-Primer (100 pmol/ μ l)	2,5 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1 μ l
5 x HF-Puffer	10 μ l
Phusion Polymerase	0,5 μ l
ddH ₂ O	32,5 μ l

Tab. 3. 1 Zusammensetzung PCR-Ansätze

Für die Klonierung wurde die PhusionTM High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Sie besitzt eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität und dadurch eine sehr geringe Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$ Fehler pro verlängertes Basenpaar). Die analytische PCR wurde dagegen mit der Taq-Polymerase durchgeführt, die keine 3' → 5' Exonukleaseaktivität besitzt.

3.1.2. DNA-Präparation aus PCR-Ansätzen

Die Aufreinigung der amplifizierten DNA aus den PCR-Ansätzen erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification-Kits (Qiagen). Hierbei wird die DNA unter Hochsalzbedingungen gefällt und an eine Silica-Membran gebunden (Vogelstein and Gillespie 1979). Es folgt ein Waschschrift, bei dem Enzyme und kleinere DNA-Fragmente von der Membran gespült werden. Anschließend wird das reine PCR-Produkt unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

Eine Mischung aus einem Teil PCR-Ansatz und fünf Teilen Bindungspuffer (PB) wurde auf eine *QIAquick-spin*-Säule aufgetragen und dann in einer Tischzentrifuge für eine Minute bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 750 μ l Waschpuffer (PE) auf die Säule gegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen. Der Durchfluss wurde verworfen und noch einmal zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule im Heizblock für ca. 10 min bei 37°C getrocknet, um die Ethanolreste zu entfernen. Abschließend wurden 30 μ l hochreines Wasser zugegeben und eine Minute bei RT inkubiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde dann nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erhalten.

3.1.3. Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly 1979) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der relativen Stabilität von Plasmid-DNA beim Übergang zu alkalischen Bedingungen. Aufgrund ihrer superhelikalen Struktur bleiben Plasmide bei diesem sogenannten „alkalischen Sturz“ intakt, während chromosomale DNA denaturiert wird. Nach der Neutralisation verbleibt die Plasmid-DNA in Lösung, während die RNA, die chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer ausgefällt werden.

3.1.3.1. Präparation von Plasmid-DNA im mini-Maßstab

Die Plasmide aus einer 3 ml *E. coli*-Übernachtskultur wurden mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab) aufgereinigt. Aus der Übernachtskultur wurden 2 ml entnommen und mit Hilfe einer Tischzentrifuge für 2 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Lösung I resuspendiert. Dieser Puffer enthält EDTA, das die für die Stabilität von Bakterienzellwänden essenziellen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen komplexiert und so die Zellyse einleitet. Außerdem enthält er RNase A zum Abbau der RNA. Dann wurden 250 µl Lösung II zugegeben, die Lösung mehrfach invertiert und 2 Minuten bei RT inkubiert. Durch den alkalischen Puffer kommt es zur vollständigen Lyse der Zellen. Er enthält darüber hinaus auch noch SDS, welches zur Bildung von Aggregaten aus denaturierten Proteinen und chromosomaler DNA führt, die nach der Neutralisation durch Zugabe von 250 µl Lösung III ausfallen. Die Lösung wurde erneut mehrmals invertiert und dann 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (13.000 rpm, RT) wurde das Zentrifugat auf eine HiBind[®]-Miniprep-Zentrifugensäule aufgetragen und für eine Minute zentrifugiert (13.000 rpm, RT). Nun erfolgte die Zugabe von 500 µl HB-Puffer und erneute Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm, RT) sowie ein abschließender Waschschriff mit 750 µl Waschpuffer und nochmaliger Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm, RT). Die Plasmid-DNA bleibt bei diesen Waschschriffen an die Säulenmatrix gebunden, da die Puffer die dafür notwendigen Hochsalzbedingungen schaffen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschriff (1 Minute, 13.000 rpm, RT) und die Trocknung des Pellets für 5 Minuten im Heizblock bei 37°C, um restliches Ethanol zu entfernen. Die Elution erfolgte durch Zusetzen von 50 µl hochreines Wasser und abschließender Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm, RT).

3.1.3.2. Präparation von Plasmid-DNA im maxi-Maßstab

Die Plasmid-DNA im maxi-Maßstab wurde mit Hilfe des Machery-Nagel Nucleo Bond Xtra Maxi EF-Kit aus einer 400 ml *E. coli*-Übernachtskultur gewonnen. Zunächst wurde die Bakterienkultur in einem Zentrifugenbecher für 15 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Zellpellet in 12 ml RES-EF-Puffer resuspendiert und anschließend mit 12 ml LYS-EF-Puffer vermischt. Dann wurde die Suspension 5 min bei RT stehen gelassen und währenddessen die AGX 100 Säule

und der Filter mit 35 ml EQU-EF-Puffer äquilibriert. Die Suspension wurde nun mit 12 ml NEU-EF-Puffer neutralisiert, mehrmals invertiert und dann 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde sie auf die Säule mit Filter appliziert und mit 10 ml FIL-EF-Puffer gewaschen. Der Filter wurde verworfen und die Säule erst mit 90 ml ENDO-EF-Puffer und dann mit 45 ml WASH-EF-Puffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml ELU-EF-Puffer. Anschließend wurde 10,5 ml Isopropanol zum Eluat gegeben, kräftig geschüttelt und für 45 min mit 4.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 5 ml 70%iges Ethanol zugesetzt und erneut zentrifugiert (15 min, 4.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Pellet für 15 min bei RT getrocknet. Das gereinigte DNA-Pellet wurde schließlich je nach Größe in 200 bis 500 µl hochreines Wasser aufgenommen.

3.1.4. Hydrolytische Spaltung von DNA

Für die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen von DNA, allg. als „Verdau“ bezeichnet, wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese erkennen bestimmte Tetra- oder Hexanukleotidsequenzen, die zumeist palindromisch aufgebaut sind. Dabei entstehen je nach verwendetem Enzym glatte (*blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'-überhängende Enden (*sticky ends*).

Analytische Restriktionsverdaue wurden in 20 µl-Ansätzen, präparative in 50 bis 200 µl-Ansätzen durchgeführt, je nach DNA-Menge. Gemäß den Angaben des Herstellers ist die DNA mit 0,2 bis 1 µl Enzym sowie der entsprechenden Menge Reaktionspuffer versetzt worden. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt und für 3 h bei einer Temperatur von 37°C oder über Nacht bei RT inkubiert. Um die zugegebenen Enzyme zu inaktivieren, wurden die präparativen Verdaue vor der weiteren Verwendung 20 min lang einer Temperatur von 65°C ausgesetzt.

3.1.5. Agarosegelelektrophorese

Bei der hier verwendeten horizontalen Agarosegelelektrophorese trennen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld ihrer Größe nach auf. Größere Fragmente bewegen sich langsamer durch die Poren der Agarose als kleinere. Über die Agarosekonzentration kann die Porengröße und die damit verbundene Trennleistung variiert werden. Bei kleinen Fragmenten wird üblicherweise eine Konzentration > 1% (w/v) verwendet, bei größeren hingegen eine Konzentration < 1% (w/v) Agarose.

Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde zunächst eine entsprechende Menge Agarose in TAE oder TBE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 50 bis 60°C in die Elektrophoreseapparatur mit eingesetztem Kamm gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde mit TAE bzw. TBE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt.

Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 (v/v) mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Als Größen- und Mengenstandard fungierte die Gene Ruler™ 100 bp bzw. 1 kb DNA-Leiter (Fermentas). Die DNA-Fragmente wurden bei einer Stromstärke von 40 bis 120 V getrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für ca. 10 min in einem

Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Bei diesem Prozess interkaliert das aromatische Ethidiumbromid zwischen den heterozyklischen Aromaten der Nukleotide der DNA. Durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 256 \text{ nm}$) fluoreszieren die DNA-Banden orange ($\lambda = 590 \text{ nm}$), so dass diese ausgeschnitten werden konnten oder ein Foto davon gemacht werden konnte.

Ethidiumbromid-Bad
500 ml dest. H ₂ O
1 mg Ethidiumbromid

3.1.6. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Aus einem präparativen Agarosegel wurde unter UV-Belichtung die gewünschte Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten. Um eine Schädigung der DNA zu minimieren, wurde dabei die Belichtungszeit so kurz wie möglich gehalten. Für die anschließende Extraktion und Aufreinigung der DNA wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Hierbei wird die DNA unter Hochsalzbedingungen an die Silica-Membran einer Säule gebunden, gereinigt und unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

Die unter UV-Licht ausgeschnittene DNA-Bande wurde gewogen (100 mg entsprechen 100 μl) und mit Hilfe des Qiaex II Gel Extraction Kits extrahiert. Das Gelstück wurde mit dem 3-fachen Volumen QX1-Puffer (plus dem 2-fachen Volumen Wasser bei DNA-Fragmenten von über 4 kb) versetzt. Dann wurde das Qiaex II für 30 sec gevortext und 10 bis 30 μg zur Gelsuspension gegeben. Die Suspension wurde 10 min bei 50°C inkubiert und alle 2 bis 3 min vortexiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde 30 sec zentrifugiert (13.000 rpm, RT), der Überstand verworfen, 500 μl QX1 zugegeben, gevortext und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 500 μl PE-Puffer zugeben, gevortext und erneut für 30 sec zentrifugiert (13.000 rpm, RT). Auch dieser Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Das resultierende Pellet wurde für 10 bis 30 min an der Luft bei RT getrocknet. Danach wurden 20 μl hochreines Wasser zugegeben, gevortext und für 5 min bei RT (DNA-Fragment $\leq 4 \text{ kb}$), 5 min bei 50°C (DNA-Fragment 4 bis 10 kb) bzw. 10 min bei 50°C (DNA-Fragment $> 10 \text{ kb}$) inkubiert. Es folgte ein abschließender Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde in eine frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

3.1.7. Generierung von *blunt ends*

Sind bei Insert und Vektor keine passenden Schnittstellen vorhanden, besteht die Möglichkeit beliebige Restriktionsendonukleasen zu verwenden und die entstehenden Überhänge aufzufüllen bzw. abzubauen. Dies geschieht mit Hilfe des sogenannten Klenow-Fragments, eines proteolytischen Spaltproduktes der *E. coli* DNA-Polymerase I. Es besitzt neben der Polymerisationsfähigkeit noch eine 3' \rightarrow 5' Exonukleaseaktivität aber keine 5' \rightarrow 3' Exonukleaseaktivität und ist in der Lage 5'-Überhänge aufzufüllen und 3'-Überhänge abzubauen.

Die verdaute DNA wurde zuerst für 20 min auf 65°C erhitzt, um die Restriktionsendonukleasen zu deaktivieren. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 25°C inkubiert und hatte typischer Weise folgende Zusammensetzung:

DNA	10 µg
Klenow	2 µl
Puffer 2	10 µl
dNTPs	0,33 µM
H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	100 µl

Anschließend wurde zur Aufreinigung der DNA eine Phenol/Chloroformextraktion durchgeführt.

3.1.8. Dephosphorylierung hydrolytisch gespaltener Vektor-Fragmente

Eine häufige Nebenreaktion bei der Insertion von DNA-Fragmenten in hydrolytisch gespaltene Vektor-DNA ist die sogenannte Religation, d.h. die durch die T4-DNA-Ligase katalysierte Kondensation der freien 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen des geschnittenen Vektors miteinander. Durch die Dephosphorylierung der freien 5'-Phosphatgruppe des Vektors mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (engl.: *calf intestine alkaline phosphatase*, CIP) wird diese Reaktion verhindert und die Effizienz der erwünschten Ligation beträchtlich erhöht. Besitz der Vektor *blunt ends*, so ist eine Dephosphorylierung zwingend notwendig, da es sonst fast sicher zu einer Religation kommt.

Für die Dephosphorylierungsreaktion wurde 0,5 µl CIP, 6 µl Puffer 3 und x µl Vektorlösung (nach Aufreinigung durch Phenol/Chloroformextraktion) mit ddH₂O auf 60 µl aufgefüllt. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei RT inkubiert und dann über eine Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

3.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von Insert- und Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt, die aus dem *E. coli*-Phagen T4 stammt. Dieses Enzym katalysiert in Gegenwart von ATP die Verknüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA.

Ein typischer Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und enthielt 1 µl T4-DNA-Ligase. Es wurde für 16 h bei 15°C im Thermocycler inkubiert. Das Insert wurde im Überschuss von 2-10:1 gegenüber dem Vektor zugesetzt.

3.1.10. Entsalzung der Ligationsansätze

Die Ligationsansätze wurden vor der Transformation in elektrokompente Zellen mit Hilfe von Dialysemembranen (Millipore, Porengröße 0,025 µm) gegen entionisiertes Wasser für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur entsalzt.

3.1.11. Transformation

Der Transfer von Fremd-DNA durch die Zellmembran von Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Dieser Prozess läuft mit geringer Effizienz auch in der Natur ab. Für eine wirkungsvollere Aufnahme von DNA müssen die Zellen vorbehandelt werden, es entstehen sogenannte kompetente Zellen.

Es gibt im wesentlichen zwei Verfahren, um Vektoren in Bakterien zu transferieren, die chemische Transformation und die Elektrotransformation. Bei der Elektrotransformation erfolgt die Aufnahme von Plasmiden nach einem elektrischen Impuls, der zur Elektroporation der Bakterienmembran führt und so die Aufnahme von Plasmiden erleichtert. Bei der chemischen Transformation wird die Aufnahme der Vektoren durch einen Hitzeschock ermöglicht. Die Elektrotransformation ist hierbei um den Faktor 1000 effizienter als die chemische Transformation (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

Die Elektrotransformation wurde für die Transformation von ligierten Vektoren mit einer Größe von über 10 kb verwendet, die chemische Transformation nach der Calciumchlorid-Methode (Sambrook, Fritsch et al. 1989) für kleinere und etablierte Vektoren genutzt.

3.1.11.1. Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

20 µl der bei -80°C eingefrorenen und auf Eis aufgetauten elektrokompenten Zellen wurden mit 1 µl Ligationsansatz in eine Elektroporationsküvette gegeben und am Elektroporationsgerät (Biorad) einem 1,8 kV-Puls von ca. 6 ms Dauer ausgesetzt. Der Ansatz wurde sofort mit 0,5 ml SOC-*Outgrowth-Medium* versetzt und eine Stunde bei 37°C und 220 rpm inkubiert. 50 µl dieser Lösung wurden auf einer antibiotikahaltigen (100 µg/ml Ampicillin) LB-Agarplatte ausgestrichen. Der Rest der Lösung wurde zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm), der Überstand abgegossen und das in 50 µl resuspendierte Pellet auf einer anderen LB-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.1.11.2. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die chemische Transformation wurden 20 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis mit 0,5 µl Plasmidlösung oder 2 µl Ligationsansatz versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und dann 30 sec bei 42°C im Wasserbad erwärmt („Hitzeschock“). Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden 500 µl SOC-*Outhgrowth-Medium* zugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37°C und 220 rpm inkubiert. 50 µl des Transformationsansatzes wurden abgenommen und auf einer mit Ampicillin

versetzten LB-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die restlichen Zellen wurden pelletiert (1 min, 13.000 rpm), der Überstand abgenommen, in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer anderen LB-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.1.12. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Um *E. coli* Bakterien für die Elektroporation kompetent zu machen wurde folgendes Verfahren angewandt: Es wurden 500 ml LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 220 rpm und 37°C kultiviert. Dann wurde die Zellsuspension in drei vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 3000 x g (\cong 6000 rpm beim JA14 Rotor) für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 ml eiskalte 1 mM Hepes pH 7,4 (steril filtriert) resuspendiert. Dann wurde erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in eiskalte 1 mM Hepes pH 7,4 resuspendiert. Es wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und das Pellet in 10 ml 1 mM Hepes pH 7,4 mit 10% (v/v) Glycerin (steril filtriert) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 10% (v/v) Glycerin (steril) resuspendiert. Schließlich wurden die Bakterien in 150 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.13. Überprüfung von loxP-Stellen auf Funktionalität

Um die Orientierung und Funktionalität der loxP-Stellen in Vektoren zu überprüfen, wurden Bakterien des Stamms *E. coli* BNN132-2Cre transformiert. Anschließend wurden die auf diese Weise durch Cre-Rekombinase veränderten Vektoren präpariert. Mit diesen wurden dann Bakterien des Stamms *E. coli* DH5 α transformiert, um größere Mengen der so gewonnenen Vektoren zu erhalten. Die so erhaltenen Plasmide wurden schließlich mit Restriktionsendonukleasen verdaut und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Anhand des Bandenmusters konnte dann auf die Funktionalität der loxP-Stellen geschlossen werden.

3.1.14. DNA-Sequenzanalyse

Die klonierten Vektoren mit den insertierten Genen wurden durch analytischen Verdau und anschließender Agarosegelelektrophorese auf passende Größe der Fragmente hin überprüft. Waren diese in Ordnung, wurden die Gene mittels DNA-Sequenzanalyse (von der Firma SeqLab) auf Mutationen hin untersucht.

Die der DNA-Sequenzanalyse zugrunde liegende Methode ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977): Durch Zugabe von fluoreszenzmarkierter ddNTPs bei einer modifizierten Amplifikation entstehen markierte DNA-Abbruchfragmente, die anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und photometrisch detektiert werden.

3.1.15. Stammhaltung von Bakterien

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 1 ml Glycerin sorgfältig vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

3.1.16. Isolierung von DNA aus der Schwanzspitze von Mäusen

Der Genotyp der Mäuse wurde mit Hilfe einer PCR bestimmt. Die zu diesem Zweck benötigte genomische DNA wurde aus der Schwanzspitze der Mäuse isoliert. Zuerst wurde die ca. 0,5 cm lange Schwanzspitze mit einer Schere abgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Lyse-Puffer dazu gegeben. Dann wurde über Nacht bei 56°C und 350 rpm im Thermoschüttler inkubiert, die Suspension für 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, um Haare und andere unverdaute Reste zu entfernen und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden 0,5 ml Isopropanol zugegeben, geschüttelt, die ausgefallene DNA mit einem Zahnstocher aus der Suspension gefischt und in 250 µl hochreines Wasser gelöst. Zur vollständigen Lösung wurde diese 3 h bei RT geschüttelt und dann bei -20°C eingefroren.

3.1.17. Präparation genomischer DNA aus Säugetierzellen

Da genomische DNA leicht durch Scherkräfte fragmentiert werden kann, darf sie weder gevortext noch durch kleine Öffnungen pipettiert werden.

Bei der Isolation von DNA aus Mausorganen wurden die Zellen vereinzelt, eine Erythrozytenlyse durchgeführt und zweimal mit PBS gewaschen. Die vereinzelteten Zellen aus der Zellkultur wurden ebenfalls zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde dann in 5 bis 10 ml Lysepuffer resuspendiert und bei 56°C über Nacht inkubiert. Nachfolgend wurde eine Phenol/Chloroform-extraktion durchgeführt. Hierbei wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform zugegeben und 30 min invertiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min bei RT. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Phenol/Chloroformextraktion noch zweimal wiederholt. Dann wurde das gleiche Volumen Chloroform zugegeben, geschüttelt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, zum Fällen der DNA ein Volumen Isopropanol zugegeben und geschüttelt. Die präzipitierte DNA konnte nun mit einem Zahnstocher gefischt und mit 70%igem Ethanol gewaschen werden. War die DNA-Menge zu gering, um auf diese Weise gefischt zu werden, wurde die Isopropanollösung für 30 min bei -20°C inkubiert und dann für 30 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde dann für ca. 5 min bei RT getrocknet und in hochreinem Wasser gelöst. Um eine vollständige und möglichst homogene Lösung zu erreichen wurde sie über Nacht bei 4°C geschüttelt.

3.1.18. Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Die genomische DNA aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurde mit Hilfe des Nucleobond LB 100 Kits isoliert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit PBS auf eine Konzentration von 10^7 Zellen pro ml eingestellt. Dann wurde ein Volumen eiskalter G1-Puffer und drei Volumen eiskaltes hochreines Wasser zugegeben. Die Suspension wurde 8x invertiert, 10 min auf Eis inkubiert und dann 15 min mit 3500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 1 ml eiskalter G1-Puffer und 3 ml eiskaltes hochreines Wasser zugegeben. Dann wurde 10 sec geschüttelt und erneut mit den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 5 ml G2-Puffer zugegeben und 30 sec geschüttelt. Anschließend wurden 10 µl Proteinase-K-Lösung zugegeben und 60 min bei 50°C inkubiert. Danach wurden die Säulen mit 2 ml N2-Puffer äquilibriert, 5 ml N2-Puffer zur DNA-Lösung gegeben und diese für 15 sec geschüttelt. Die Lösung wurde nun auf die Säule gegeben und dreimal mit je 4 ml N3-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml N5-Puffer. Zur Fällung der DNA wurden 3,5 ml Isopropanol zugegeben, geschüttelt, für 30 min bei RT inkubiert und dann für 45 min mit 4000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde für 15 min mit 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 10 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde hochreines Wasser zugegeben und zur vollständigen Lösung bei 4°C über Nacht geschüttelt. Gelagert wurde die DNA bei -20°C.

3.1.19. RNase-Verdau von DNA

Um die RNA-Verunreinigungen aus der DNA zu entfernen wurde ein RNase-Verdau durchgeführt. Dabei wurde die RNase (Roche) mit einer Konzentration von etwa 4 µg/ml eingesetzt. Die DNA wurde je nach Menge in 1 bis 2 ml Wasser aufgenommen, die RNase zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch eine Phenol/Chloroformextraktion gereinigt.

3.1.20. Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen

Bei der Isolation von RNA musste darauf geachtet werden, dass es zu keiner Kontamination mit RNasen kommt. Daher mussten Handschuhe getragen und RNase freie Materialien verwendet werden. Das Wasser zum Lösen der RNA wurde vorher mit DEPC (Diethylidicarbonat, auch Diethylpyrocarbonat) behandelt. Dieses hemmt RNasen, indem es ihre Histidinreste in N-Carboethoxyhistidin umwandelt.

Die Zellen wurden zuerst vereinzelt und einmal mit PBS gewaschen. Das Organ wurde je nach Größe in 5 bis 10 ml bzw. bis zu 50 Millionen Zellen in 5 ml TRIZOL[®] aufgenommen. Die Lösung wurde mehrmals auf und ab pipettiert, bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 0,2 ml Chloroform pro ml TRIZOL[®] zugegeben, 15 sec

geschüttelt und erneut für zwei bis drei Minuten bei RT inkubiert. Dann wurde für 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro ml TRIZOL[®] versetzt. Die Lösung wurde geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min mit 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und 1 ml 75%iges Ethanol pro ml TRIZOL[®] zugegeben. Die Suspension wurde gevortext und dann 5 min mit 7500 x g bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde 5 bis 10 Minuten bei RT getrocknet, in DEPC behandeltes Wasser gelöst und 10 min bei 55 bis 60°C inkubiert. Die gelöste RNA wurde bei -80°C eingefroren.

3.1.21. DNase-Verdau von RNA

Um DNA-Verunreinigungen der RNA zu beseitigen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 100 µg RNA mit 1 µl DNase (Roche) versetzt, 17 µl Probenpuffer zugegeben und mit DEPC behandeltem Wasser auf 170 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe von TRIZOL[®] aus der Lösung extrahiert.

3.1.22. Kontrolle der RNA-Integrität

Die Integrität der RNA wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Nicht degradierte RNA erkennt man an den zwei distinkten Banden für die 40 S und die 60 S rRNA.

3.1.23. Synthese von cDNA durch reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des Biorad iScript Select cDNA-Synthesis Kits in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um diese für die *Real-Time*-PCR einzusetzen. Die cDNA-Synthese erfolgte durch reverse Transkription der RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus dem Moloney-murine Leukämievirus. Als Primer wurden zufällig anlagernde Hexamer-Oligonukleotide (Random-Primer) verwendet, die ein vollständiges Umschreiben der zellulären RNA in cDNA ermöglichen.

Zunächst wurden 3 - 4 µg RNA mit DEPC behandeltem hochreinem Wasser auf 15 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und für 5 min auf 72°C erhitzt. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf Eis abgekühlt, für 30 sec mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert und 4 µl 5x iScript Select Reaction Mix sowie 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert, dann 60 min auf 42°C und schließlich zum Stoppen der Reaktion für 5 min auf 85°C erhitzt. Abschließend wurden noch 20 µl DEPC-Wasser zugegeben und die cDNA bei -20°C gelagert.

3.1.24. Real-Time-PCR

Die *Real-Time-PCR* ist eine Methode zur Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die am Ende jedes PCR-Zyklus

durchgeführt werden. Hier wurde eine SYBRGreen™-Detektion verwendet. Bei SYBRGreen™ handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der bei der Interkalation in doppelsträngige DNA und UV-Bestrahlung fluoresziert. In Abhängigkeit der Quantität amplifizierter DNA steigt somit die Fluoreszenzintensität an. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird als C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet.

Zur Normierung der Genexpression werden sogenannte Haushaltsgene (*Housekeeping-Gene*) verwendet. Diese Standards werden parallel zur eigentlichen Probe eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Gene (z.B. β -Aktin oder Tubulin), deren Expression in den untersuchten Zellen relativ genau bekannt ist. Der Bezug zu den Standards erlaubt eine verlässliche Aussage über die Anzahl spezifischer mRNA-Moleküle und damit über den Expressionsstatus eines bestimmten Gens.

Es wurde folgender Real-Time-PCR-Ansatz verwendet:

Thermo SYBRGreen™ Mix	12,5 μ l
Primer 1 (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 2 (100 pmol/ μ l)	1 μ l
cDNA	4 μ l
hochreines Wasser	6,5 μ l
Gesamtvolumen	25 μ l

Stufe	Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	95°C	5 min
Denaturierung	40	95°C	20 sec
Annealing		59°C	30 sec
Elongation		72°C	30 sec
Auffüllen Elongationslücken	1	72°C	10 min
Schmelzkurve	1	95°C	1 min
	1	55°C	1 min
Kühlung	1	4°C	∞

3.1.25. Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop (Thermo Scientific) photometrisch ermittelt. Hierzu wurden lediglich 1 μ l Probelösung benötigt. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Der Quotient 260/280 nm erlaubte darüber

hinaus eine Aussage über die Reinheit der Probe. Ein Wert von 1,8 oder höher zeigt dabei eine hohe Reinheit der DNA an. Reine RNA besitzt dagegen einen Wert von mindestens 2.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Kultur von Säugerzellen

Alle verwendeten Säugetierzellen wurden bei 37°C, 7,5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die T-Zelllinien Baki-1, Mize-8, Wuzel-5 und EL-4 wurden in RPMI-Medium mit 5% FCS gehalten. Teno-4 wurde in RPMI-Medium mit 10% FCS und Aho-2 (beides T-Zelllinien) sowie die B-Zelllinie WEHI 231 in DMEM mit jeweils 5% FCS kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage je nach Proliferationsrate passagiert. Primäre Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS kultiviert.

3.2.2. Präparation von Mausorganen

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die entnommenen Organe wurden auf Eis gelagert und unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet.

3.2.2.1. Präparation des Knochenmarks

Femura und Tibiae der Maus wurden freipräpariert und in eine Petrischale überführt. Die nachfolgenden Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Hier wurde der Knochenschaft geöffnet und das Knochenmark mit Hilfe einer 10 ml-Spritze, einer 24G Kanüle und rund 10 ml RPMI-Medium herausgespült. Die Zellen wurden mit einer 10 ml Pipette vereinzelt, für 7 min mit 1300 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und eine Erythrozytenlyse (siehe Kapitel 3.2.3) durchgeführt. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.2.2.2. Präparation von Milz und Thymus

Zur Präparation der Milz bzw. des Thymus wurden die Bauchdecke und der Brustkorb geöffnet, die Organe entnommen, vom umliegenden Gewebe befreit und in jeweils 10 ml RPMI überführt. Danach wurde unter der Sterilbank weitergearbeitet. Die Organe wurden mit dem Stößel einer 10 ml Spritze auf einem Metallsieb zerrieben. Danach wurden die Zellen mit einer 10 ml Pipette vereinzelt, für 7 min mit 1300 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und eine Erythrozytenlyse (siehe Kapitel 3.2.3) durchgeführt. Abschließend wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.2.3. Erythrozytenlyse

Um bei der Leukozytenisolation aus Milz, Knochenmark und Thymus eine Kontamination durch Erythrozyten zu verhindern, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierbei wurden die vereinzelt Zellen mit 7 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lyse durch Zugabe des gleichen Volumens RPMI-Mediums gestoppt und die Zellen 7 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer passenden Menge RPMI-Medium resuspendiert.

3.2.4. MACS-Aufreinigung von B-Zellen

Um die B-Zellen von den übrigen Milzzellen zu isolieren wurde eine MACS- (*magnetic cell separation*) Auftrennung mit CD43 MicroBeads (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD43, der mit einem etwa 50 nm großen Eisenoxid-Dextran-Partikel gekoppelt ist. Die MicroBeads werden zu der Zellsuspension gegeben und binden an den Oberflächenmarker. Anschließend werden die Zellen auf eine Säule gegeben, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Dieses können nur die nicht markierten Zellen passieren. In diesem Fall sind das überwiegend ruhende B-Zellen, da diese kein CD43 exprimieren.

Die Milzzellen wurden mit Hilfe eines 30 µm Zellsiebs von Zellklumpen, die die Säule verstopfen könnten, befreit und gezählt. Dann wurden die Zellen mit 1300 rpm für 7 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert. Dann wurde erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und 10^7 Zellen in 40 µl MACS-Puffer aufgenommen. Zu der Zellsuspension wurden 10 µl CD43 MicroBeads pro 10^7 Zellen gegeben, gemischt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen zugegeben, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Eine LS-Säule wurde in das Magnetfeld eines MACS-Separators platziert und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Dann wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen und dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss enthielt die gewünschten B-Zellen. Diese wurden zentrifugiert, das Pellet in RPMI-Medium aufgenommen und gezählt.

3.2.5. Stimulation von Milzzellen mit LPS und IL-4

Die Milzzellen wurden auf eine 6-Well-Platte in einer Konzentration von $5 - 6 \times 10^6$ Zellen pro Well ausplattiert und mit 20 µg/ml LPS sowie 50 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Die Unitdefinition bezieht sich hierbei auf die Wirkung von IL-4 auf TF-1 Zellen. Die Milzzellen wurden für vier bis fünf Tage im Brutschrank bei 37°C und 7,5 % CO₂ in RPMI-Medium kultiviert. Anschließend wurde der Überstand für ELISA-Messungen und die Zellen für FACS-Analysen und zur RNA-Gewinnung verwendet.

3.2.6. Stimulation von Milzzellen mit LPS, IL-4, CpG1668 und R848

Die Stimulation wurde in 24-Well Platten durchgeführt. Es wurden 10^6 Milzzellen pro Well benötigt. Die Zellen wurden in 500 μ l RPMI-Medium pro Well ausplattiert und die Stimuli im gleichen Volumen angesetzt und dazugegeben.

Die Stimuli hatten folgende Endkonzentration:

LPS	20 μ g/ml
IL-4	50 bzw. 500 U/ml
CpG 1668	1 μ M
R848	1 μ g/ml

Die stimulierten Zellen wurden für insgesamt sechs Tage im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert. Nach drei Tagen wurden Zellen für eine FACS-Analyse entnommen. Am Ende der Stimulation wurden die Überstände abgenommen und bis zur ELISA-Analyse bei -20°C gelagert.

3.2.7. MuLV-Isolation aus Zellüberständen

Nachdem die Baki-1 oder Aho-2 Zellen drei bis vier Tage kultiviert wurden, konnten die Murinen Leukämieviren (MuLV) aus dem Zellüberstand isoliert werden. Dazu wurden die Zellsuspension mit 1300 rpm für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Abtrennen restlicher Zellen und Zelltrümmern durch einen 0,45 μ m Filter filtriert. Es folgte eine Ultrazentrifugation (Rotor JLA 16.250) mit 16.000 rpm für 80 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 15 min in der restlichen Flüssigkeit auf Eis quellen gelassen. Das Pellet wurde in der Flüssigkeit resuspendiert, auf einen Saccharosegradienten (30 – 55%) gegeben und in einer Ultrazentrifuge (SW41 Rotor) mit 24.000 rpm für 18 h bei 4°C zentrifugiert. Im Saccharosegradienten bildeten die MuLV-Partikel einen Ring, der mit Hilfe einer Spritze isoliert werden konnte. Die Partikel wurden in ein SW41-Zentrifugationsröhrchen überführt, ca. 11 ml PBS zugegeben und mit 24.000 rpm für 70 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 15 min auf Eis in der restlichen Flüssigkeit quellen gelassen und anschließend resuspendiert. Die Viren wurden für RNA-Isolation und die Elektronenmikroskopie verwendet.

3.2.8. Stammhaltung von Säugerzellen

Die kultivierten Säugetierzellen wurden mit 1300 rpm für 7 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen einer halben 10 cm Platte in 1 ml eiskaltes Einfriermedium resuspendiert. Dann wurde 1 ml Zellsuspension in ein Einfrier Röhrchen pipettiert und für etwa

eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie über Nacht bei -80°C inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3. Kultur embryonaler Stammzellen

3.3.1. Gewinnung Embryonaler Fibroblasten

Verwendet wurden Embryonen von transgenen Mäusen, die ein Resistenzgen gegen Neomycin besaßen. Vier trächtige Mäuse wurden 13 Tage nach Befruchtung der Eizellen getötet, die Uteri entnommen und in eine Petrischale mit PBS gelegt. Anschließend wurden die Embryonen steril freipräpariert, der Kopf und die Leber entfernt und der Rest zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie in 20 ml PBS aufgenommen und mit Hilfe einer 60 ml Spritze zweimal durch eine 18-gauge Kanüle gepresst. Der Überstand wurde entfernt und 20 ml Trypsin/EDTA-Puffer zugegeben. Die Gewebesuspension wurde 1 h bei 37°C inkubiert und dann mit 20 ml PBS versetzt. Nach kurzer Sedimentation wurde der Überstand mit den vereinzelt embryonalen Fibroblasten (EF) abgenommen und zum Stoppen des Verdauens mit 20 ml DMEM-Medium versetzt. Dann wurde 6 min mit 1300 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 20 ml DMEM aufgenommen und die EF in eine 15 cm Petrischale ausplattiert. Zu den Geweberesten wurde erneut 20 ml Trypsin/EDTA-Puffer gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde wie oben beschrieben verfahren. Insgesamt wurden fünf Extraktionszyklen durchgeführt. Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt und die Zellen kultiviert bis die Schalen konfluent bewachsen waren. Dann wurden sie 1:4 gesplittet und wieder bis zur Konfluenz kultiviert. Abschließend wurden die EF aliquotiert und im flüssigen Stickstoff gelagert.

3.3.2. Kultur Embryonaler Fibroblasten

Die pluripotenten embryonalen Stammzellen müssen auf einem Rasen sogenannter Nährzellen (*feeder cells*) wachsen, um eine Differenzierung zu verhindern. Hier dienten die EF als Nährzellen. Sie produzieren u.a. LIF (*leukemia inhibitory factor*), der *in vitro* die Differenzierung der ES verhindert (Smith, Heath et al. 1988).

Die EF wurden alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:3 passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 10 ml Trypsin/EDTA für eine 15 cm Platte zugegeben und drei min bei RT inkubiert. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt, zum Inaktivieren des Trypsins 10 ml DMEM zugegeben, die Zellen abzentrifugiert (1300 rpm, 6 min, 4°C), in frischem Medium resuspendiert und schließlich auf neue Platten ausplattiert.

Werden die EF als Nährzellen in der ES-Zellkultur verwendet, muss ihre Proliferation gehemmt werden, da diese das Wachstum der ES-Zellen stören könnte. Dies geschieht mit Hilfe von Mitomycin C. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und 3 ml DMEM mit $10\ \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C auf eine 10 cm Platte gegeben. Die EF wurden 3 h bei 37°C inkubiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann wieder DMEM zugegeben.

3.3.3. Kultur embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die aus dem Inneren von 3,5 Tage alten Blastozysten gewonnen werden. Auch nach längerer Zeit in der Zellkultur sind sie in der Lage Zellen aller Gewebetypen zu bilden, einschließlich der Keimzellen. Hierzu müssen sie einem anderen Blastozysten injiziert werden.

Um die Differenzierung der ES-Zellen zu verhindern wurden sie auf einem Rasen von EF kultiviert und zusätzlich LIF zugegeben (Smith, Heath et al. 1988). Das LIF stammte aus dem Überstand einer mit dem LIF-Gen transfizierten Zelllinie (Genetics Institute, Boston). Die ES-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 15% FCS und 5 ml LIF-Überstand kultiviert. Sie wurden etwa alle 2 Tage im Verhältnis 1:4 passagiert, wie bei den EF beschrieben.

3.3.4. Transfektion embryonaler Stammzellen

Um die embryonalen Stammzellen mit dem Targetvektor zu transfizieren, wurden sie elektroporiert. Hierzu wurde der Targetvektor zuerst mit PvuI linearisiert, eine Phenol/Chloroformextraktion durchgeführt und der gefällte Vektor zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde er mit einer Endkonzentration von 1 µg/µl in hochreinem endotoxinfreiem Wasser aufgenommen. Vor der Transfektion wurde der linearisierte Targetvektor für 15 min auf 65°C erhitzt, um eventuell vorhandene Endotoxine abzutöten, einige Minuten bei RT inkubiert, kurz anzentrifugiert und dann auf Eis gestellt.

Für die Elektroporation wurden 2 – 5 x 10⁷ Zellen verwendet. Die ES-Zellen wurden vereinzelt, gezählt, mit PBS gewaschen, das Pellet in 700 µl PBS aufgenommen und in eine 4 mm Elektroporationsküvette (Biorad) gegeben. Die ES-Zellen wurden 5 min auf Eis inkubiert, 25 - 30 µg linearisierter Vektor zugegeben und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Elektroporation mit einem Biorad-Genpulsar durchgeführt (250 V, 500 µF) und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen in Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 auf 10 cm Platten passagiert, die mit Mitomycin C behandelten EF bewachsen waren.

3.3.5. Selektion transfizierter embryonaler Stammzellen

Da der Targetvektor eine Neomycin-Resistenz-Kassette besitzt, kann diese für eine Positivselektion verwendet werden (Mansour, Thomas et al. 1988). Dem Medium wurde 24 h nach der Elektroporation Geneticin (G418) in einer Konzentration von 0,4 mg/ml zugesetzt. Das Medium wurde alle 1 - 2 Tage gewechselt. Nach 8 - 12 Tagen hatten die überlebenden Kolonien eine Größe erreicht, dass sie mit bloßem Auge erkennbar waren und konnten isoliert werden.

3.3.6. Isolation einzelner ES-Zellklone

Nach 8 bis 12 Tagen waren die transfizierten und selektierten ES-Zellklone groß genug, um isoliert werden zu können. Hierzu wurden die mit ES-Klonen bewachsenen Platten einmal mit PBS gewaschen und dann 10 ml PBS hinzugefügt. Die einzelnen Klone wurden mit Hilfe einer 100 µl Pipette unter einem Mikroskop isoliert. Dabei wurde ein einzelner Klon von der Platte gelöst und zusammen mit 25 µl PBS in ein Well einer U96 Microtiterplatte gegeben, in der bereits 25 µl PBS vorgelegt waren. Dabei wurden die Klone so auf der Platte verteilt, dass für die nächsten Schritte eine Zwölfkanal-Multipette verwendet werden konnte. Es wurden nun 50 µl Trypsin/EDTA in jedes Well gegeben und der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl PBS in jedes Well gegeben und die Klone durch Auf- und Abpipettieren mit einer Multipette vereinzelt. Die Hälfte der Zellsuspension (100 µl) wurde auf einer mit EF bewachsenen 48er-Zellkulturplatte gegeben und weiter kultiviert. In jedes Well dieser Platte waren 1 ml Medium vorgelegt.

Die 96er-Platte mit den übrigen Zellen wurde 5 min mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 25 µl hochreinem Wasser und einer Inkubation für 15 min bei 80°C lysiert. Es folgte der Proteinverdau durch die Zugabe von 25 µl Proteinase-K-Puffer (200 µg/ml Proteinase K) und einer Inkubation bei 56°C über Nacht. Vorher wurde die Platte mit Folie umwickelt, um ein Entweichen der Flüssigkeit zu verhindern. Die so gewonnene DNA-Lösung wurde zum Nachweis der homologen Rekombination in den transfizierten ES-Zellen mittels PCR verwendet.

3.3.7. Nachweis der homologen Rekombination transfizierter ES-Zellen

Zum Nachweis, dass der Targetvektor durch homologe Rekombination in das Genom der transfizierten ES-Zellen eingebaut wurde, wurde eine Nested-PCR durchgeführt. Dabei werden zwei aufeinanderfolgende Amplifikationen durchgeführt, wodurch sich die Produktspezifität auch bei einer hohen Gesamtzyklenzahl erhöht. Bei der ersten Vervielfältigung werden Primer gewählt, die sich außerhalb des gewünschten PCR-Fragments befinden, sodass man ein größeres Amplicon erhält. Dieses wird dann als Matrize bei der zweiten PCR eingesetzt, wobei ein weiter innen liegendes Primerpaar zum Einsatz kommt.

Das Zelllysate von je fünf isolierten Kolonien wurde in einem PCR-Ansatz analysiert. Dieser hatte folgende Zusammensetzung:

1. PCR:

Zelllysate aus 5 Kolonien	je 1 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	1 µl
hochreines Wasser	18 µl
Taq-Mix (2x)	25 µl
Gesamtvolumen	50 µl

2. PCR:

Produkt der 1. PCR	5 μ l
Primer 3 (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 4 (100 pmol/ μ l)	1 μ l
hochreines Wasser	18 μ l
Taq-Mix (2x)	25 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

Wurde ein positiver 5er-Pool ermittelt, so wurde mit den Zelllysaten der einzelnen Klone eine weitere Nested-PCR durchgeführt, um den positiven Klon zu identifizieren. Hierfür wurden 5 μ l des Lysats eingesetzt.

3.3.8. Ausschneiden der Neo-TK-Kassette aus transfizierten

ES-Zellen

Um die Neo-TK-Kassette aus den mit dem Targetvektor transfizierten ES-Zellen herauszuschneiden, wurden die Zellen mit einem Expressionsvektor der Cre-Rekombinase transient transfiziert. Die Elektroporation wurde mit dem nicht linearisierten Vektor pTZ-CreN wie im Kapitel 3.3.4 beschrieben durchgeführt. Es wurden 10^7 Zellen mit 30 μ g Vektor transfiziert und 10^6 Zellen auf eine mit EF bewachsene 10 cm Platte ausplattiert. Die ES-Zellen durften nicht zu dicht ausgesät werden, um einen Bystandereffekt zu verhindern, d.h. die Übertragung der Thymidinkinase aus HSV durch *gap junctions* von Zellen mit Neo-TK-Kassette auf solche ohne.

Zwei Tage nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen im Verhältnis 1:3 passagiert und das Medium mit 2 μ M Ganciclovir versetzt. Ganciclovir ist ein Guanosin-Analogon und wird von der Thymidinkinase mit geringer Affinität als Substrat verwendet. Hierbei hat die im Targetvektor kodierte Thymidinkinase aus dem Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) eine rund 1000 mal höhere Affinität zu Ganciclovir als eine entsprechende Thymidinkinase aus Säugetieren. Das Enzym phosphoryliert Desoxythmidin zu Desoxythymidin-5'-monophosphat, einem wichtigen Ausgangsprodukt für die DNA-Synthese. Wird statt Thymidin aber Ganciclovir in die DNA eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch und in Folge dessen zur Induktion der Apoptose. Es überleben folglich nur die ES-Zellen, die keine Neo-TK-Kassette mehr besitzen. Je nachdem wann die Cre-Rekombinase die Kassette entfernt hat, können auch Mischklone entstehen, die aufgrund des Bystandereffekts auch absterben würden. Um dies zu vermeiden wurden die ES-Zellen vor der Zugabe von Ganciclovir vereinzelt und ausplattiert.

Nach dieser Negativselektion wurden die überlebenden Klone wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben isoliert. Ob die Neo-TK-Kassette korrekt ausgeschnitten wurde, konnte mit einer Nested-PCR analysiert werden (Kapitel 3.3.7).

3.3.9. Blastozysten-Injektion

Die Blastozysten-Injektion für die *Plcy1-Knockout*-Maus wurde von Prof. Dr. Ari Waisman und seinen Mitarbeitern an der Universität Mainz durchgeführt. Prof. Dr. Lars Nitschke und seine Mitarbeiter führten die Injektion für die humanisierte *IgE-knock-in*-Maus durch.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten ES-Zellen wurden in Trockeneis an ihren jeweiligen Bestimmungsort verschickt. Dort wurden 10 bis 20 ES-Zellen in 3,5 Tage alte Blastozysten von C57BL/6-Mäusen mit Hilfe einer Injektionsnadel und einem Mikromanipulator injiziert. Die Blastozysten wurden anschließend in den Uterus scheinchwangerer Mäuse eingesetzt. Der Chimärismus konnte etwa eine Woche nach der Geburt anhand der Fellfarbe bestimmt werden.

3.4. Anaphylaxieexperiment

3.4.1. Immunisierung von Mäusen mit TNP-OVA

Zur Immunisierung wurde das Antigen Ovalbumin (OVA, aus Hühnereiweiß), an welches das Hapten TNP (2,4,6-Trinitrophenol) gebunden war, verwendet. Es wurde zusammen mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum) verabreicht.

Zur Darstellung des Vakzins wurden 1,5 mg TNP-OVA zu 3 ml PBS gegeben und 1 ml Alum dazugetrofft. Anschließend wurde die Suspension 30 min bei RT rotiert, mit 3000 rpm für 6 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Dazu wurde das Pellet in 6 ml PBS resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zuletzt wurde es in 3 ml PBS resuspendiert.

Jeder Maus wurden 100 µg TNP-OVA mit Alum in einem Volumen von 200 µl injiziert. Die eine Hälfte wurde *i. p.*, die andere Hälfte *s. c.* verabreicht. Nach 14 Tagen wurde eine Boosterimmunisierung mit der gleichen Menge vorgenommen.

3.4.2. Systemische Anaphylaxie

Eine systemische Anaphylaxie wurde bei immunisierten Mäusen rund eine Woche nach der Boosterimmunisierung ausgelöst. Hierzu wurden 100 µl TNP-OVA (0,3 µg/µl) in die Schwanzvene injiziert. Die Körpertemperatur wurde vor der Injektion und im weiteren Verlauf in Zehnminutenabständen rektal ermittelt. Die Mäuse wurden 90 Minuten nach der Injektion getötet und Blut und Organe entnommen. Das Serum wurde bei -20°C eingelagert, die Organe mit Eindeckmedium bedeckt und bei -80°C eingefroren.

3.5. Analytische Methoden

3.5.1. Lyse von Zellen zur Proteingewinnung

Um Proteine für den Western-Blot zu gewinnen wurden die Zellen lysiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 10^7 Zellen in 200 µl RIPA-Puffer gegeben und für 30 min

bis 1 h bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde das Lysat für 20 min mit 12.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren.

3.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationen von Proteinlösungen wurden mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce) bestimmt. Die Analyse wurde auf einer 96-well Flachbodenplatte durchgeführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BSA bekannter Konzentration. Auch von den Proben wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe angelegt. Wichtig für eine korrekte Messung ist, dass der Standard und die Proben mit dem gleichen Puffer verdünnt wurden, in dem auch die Proteine gelöst waren.

Es wurden 25 µl Standardlösung bzw. Probe in ein Well gegeben und 200 µl Arbeitslösung (Reagenz A : Reagenz B im Verhältnis 50 : 1) zugefügt, kurz gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurde eine photometrische Messung bei 562 nm Wellenlänge durchgeführt, aus der die Proteinkonzentration ermittelt werden konnte.

3.5.3. Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE-Gel mit SDS-Probenpuffer versetzt. Dieser enthält sowohl SDS als auch β -Mercaptoethanol. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 10 min auf 95°C erhitzt.

3.5.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) wurde hier zur Vorbereitung von Western-Blots verwendet. Ähnlich wie bei der Agarosegelelektrophorese werden Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten aufgetrennt. Um eine Korrelation zwischen Ladung und Masse des Proteins herzustellen, werden sie mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt. Dieses lagert sich in einem bestimmten Verhältnis an das Protein, linearisiert es, indem es die innermolekularen hydrophoben Wechselwirkungen stört und überlagert durch seine negative Ladung die Eigenladung des Proteins. Eventuell vorhandene Disulfidbrücken werden durch die Zugabe des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol geöffnet. So behandelte Proteine werden jetzt nur noch nach ihrer molekularen Masse (Größe) getrennt.

Kleine Proteine besitzen eine größere elektrophoretische Mobilität und wandern schneller als größere Proteine. Dabei ist ihre relative Mobilität linear vom Logarithmus ihrer molekularen Masse abhängig. Über den Gehalt an Acrylamid kann die Trennleistung beeinflusst werden. Hochprozentige Gele eignen sich zum Trennen kleiner Proteine, niederprozentige Gele zur Trennung großer Proteine.

Die SDS-PAGE wurde mit Perfect Blue Twin S (Peqlab) Gelapparaturen durchgeführt. Je nach Proteingrößen wurden 7,5 bis 12%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet. Die Stromstärke betrug pro Gel 15 bis 20 mA.

Ein 7,5%iges SDS-Gel hatte folgende Zusammensetzung:

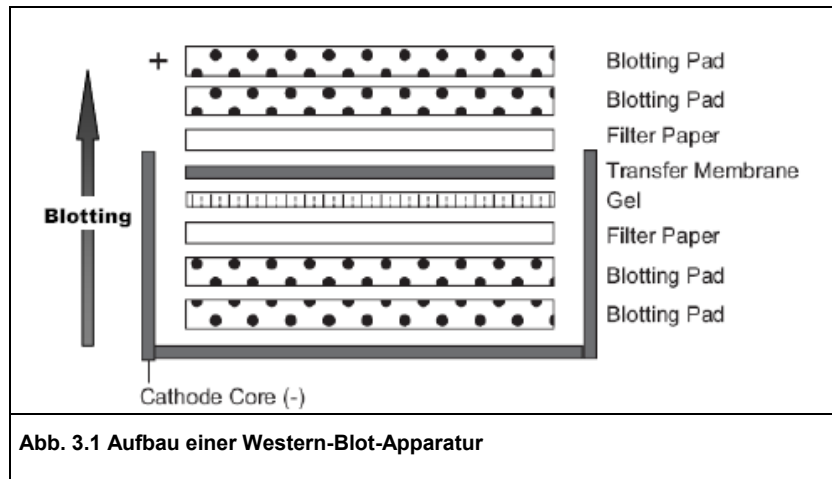
Chemikalie	Trenngel 7,5%	Sammelgel 4%
Acrylamidlösung	1,2 ml	326 µl
dest. H ₂ O	2,37 ml	1,35 ml
Trenngelpuffer	1,17 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,79 ml
TEMED	3,3 µl	2,25 µl
20% (w/v) APS	8,4 µl	5,6 µl

3.5.5. Western-Blot

Der Western-Blot dient der Übertragung von Proteinen von einem SDS-PAGE-Gel auf eine Membran, zur anschließenden Identifizierung durch Anwendung von Antikörpern oder zur Aminosäureanalyse.

3.5.5.1. Western-Blot nach dem Tank-Verfahren

Für das Western-Blotting nach dem Tank-Verfahren wurde das Xcell II Mini Cell System (Invitrogen) verwendet. Hierbei wurden mit Blotting-Puffer äquilibrierte Schwämme, Whatman-Papiere, Gel und Membran, wie in Abb. 3.1 dargestellt, zwischen Anode und Kathode geschichtet: Zuerst wurden drei Schwämme auf die Kathode gelegt, dann ein Whatman-Papier, das Gel, darauf die PVDF-Membran, ein Whatman-Papier und zuletzt vier Schwämme. Vor der Äquilibration in Blotting-Puffer wurde die Membran noch für 15 sec in Methanol inkubiert. Beim Zusammenbau wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Schichten luftblasenfrei aufgelegt wurden. Anschließend wurde das Blot-Modul mit Blotting-Puffer gefüllt und für 1,5 bis 4 h bei einer Spannung von 16 bis 25 V geblottet, abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins. Nach Beendigung des Laufs wurde die Membran an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.



3.5.5.2. Western-Blot nach dem Semi-dry-Verfahren

Das Western-Blotting nach dem Semi-dry-Verfahren wurde für kleinere Proteine mit dem TE77XP (Hoefer Scientific) durchgeführt. Auch hier wurde die PVDF-Membran zuerst 15 sec in Methanol inkubiert. Dann wurden die Whatman-Papiere, die Membran und das Gel in Blotting-Puffer äquilibriert. Zuerst wurden drei Whatman-Papiere auf die Anode gelegt, dann die Membran, das Gel und schließlich wieder drei Whatman-Papiere. Der Aufbau musste auch hier luftblasenfrei sein. Anschließend wurde die Kathode aufgelegt und für 1 h mit einem mA pro cm^2 geblottet. Die Membran wurde danach luftgetrocknet und bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

3.5.6. Immundetektion

Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Western-Blot-Membran zu verhindern, wurde diese für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einer Schwenkplatte in Blockpuffer (5% Magermilchpulver) inkubiert. Danach wurde die PVDF-Membran in einer Blockpufferlösung mit dem Primäantikörper für ein bis zwei Stunden bei RT geschwenkt. Um die nicht gebundenen Primäantikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer und danach einmal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Blockpufferlösung mit dem HRP markierten Sekundäantikörper für 1 h geschwenkt und danach wie oben beschrieben gewaschen. Dann wurde sie mit dem Substrat RapidStep™ ECL Reagent (Calbiochem) besprüht, 2 min inkubiert, und in eine Folie gelegt. Danach wurde die Membran in eine Entwicklerkassette platziert und ein Film aufgelegt. Die Belichtungszeit betrug je nach Signalstärke 10 sec bis 30 min. Schließlich wurde der Film mit Hilfe der Entwicklermaschine Optimax 2010 entwickelt.

3.5.7. Strippen von Western-Blot-Membranen

Eine Western-Blot-Membran kann mit verschiedenen Antikörpern behandelt werden, um unterschiedliche Proteine oder verschiedene Epitope des gleichen Proteins nachzuweisen. Der als erstes verwendete Antikörper muss von der Membran entfernt werden, wenn die nachzuweisenden Proteine gleich sind oder eine ähnliche Größe besitzen. Dies bezeichnet man als Strippen der Membran.

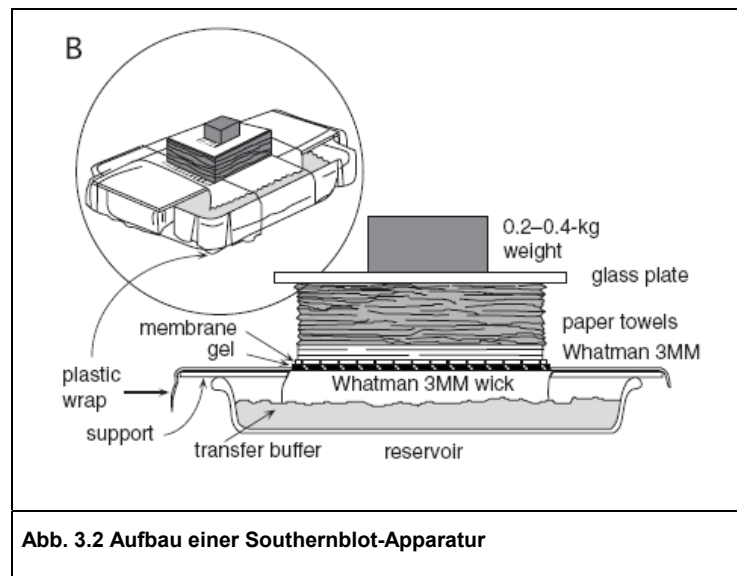
Zuerst wurde der Hybridisierungsofen auf 50°C vorgeheizt und die Membran dreimal für 15 min mit Western-Blot-Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die Membran in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß gelegt, 30 ml Stripping-Puffer zugegeben und für 40 min bei 50°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Anschließend wurde einmal mit PBS, einmal mit Waschpuffer und dann wieder mit PBS für je 15 min gewaschen. Danach wurde die Membran bei -20°C gelagert.

3.5.8. Southernblot

Der Southernblot (Southern 1992) ist eine Methode mit deren Hilfe DNA von einem Agarosegel auf eine Membran übertragen werden kann. Zuerst wurde die genomische DNA (7 bis 12 µg) mit einer Restriktionsendonuklease verdaut (über Nacht bei 37°C) und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit 40 V etwa 18 bis 20 h lang durchgeführt. Das Gel wurde im Ethidiumbromidbad gefärbt und zusammen mit einem Lineal zur Größenbestimmung fotografiert.

Das Gel wurde anschließend für 30 min unter ständigem Schwenken in 500 ml 0,25 M HCl inkubiert. Hierbei kommt es zu einer teilweisen Depurinierung der DNA (Wahl, Stern et al. 1979). Danach wurde das Gel mit Wasser abgespült und zweimal für je 20 min in 500 ml Denaturierungspuffer geschwenkt. Durch den basischen Denaturierungspuffer werden die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Nukleotiden zerstört und die DNA denaturiert. Bei diesem Vorgang und beim späteren Blotten kommt es an den depurinierten Stellen zur Spaltung der Phosphodiesterbindungen des DNA-Rückgrats und damit zur Fragmentierung der DNA. Dadurch lassen sich große DNA-Fragmente (über 5 kb) leichter aus dem Gel transferieren. Abschließend wurde das Gel mit Wasser abgespült und zur Neutralisation zweimal für je 20 min in 500 ml Neutralisationslösung geschwenkt.

Die Apparatur zum DNA-Transfer hatte folgenden Aufbau (Abb. 3.2): Auf eine mit Laufpuffer gefüllte Schale wurde eine Glasplatte gelegt. Auf diese wurde ein Whatman 3 MM Papier so gelegt, dass beide Enden in den Laufpuffer tauchten. Darauf wurde das Agarosegel mit der Unterseite nach oben gelegt, da die DNA bei der Elektrophorese nach unten sickert. Auf das Gel wurde eine passend zugeschnittene Nylonmembran gelegt und darauf drei mit Laufpuffer angefeuchtete Whatman Papiere. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Aufbau frei von Luftblasen war. Auf die Whatman Papiere wurden noch zwei Stapel Papiertücher, eine Glasplatte und darauf ein Gewicht von 0,2 bis 0,4 kg gelegt. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung mit dem Stratalinker 2400 (Auto crosslinking = 0,12 J/cm²) oder durch Backen bei 120°C für 0,5 h fixiert.



3.5.9. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die DNA-Sonden zur Identifizierung spezifischer DNA-Abschnitte auf den Southernblotmembranen wurden mit Hilfe des Amersham Megaprime DNA Labeling Systems (GE Healthcare) hergestellt. Zunächst wurde ein ca. 500 bp großes DNA-Fragment durch PCR oder Vektorverdau hergestellt, das aus der zu identifizierenden Sequenz besteht. Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, die passende Bande ausgeschnitten und eine Gelisolation durchgeführt.

Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden 50 ng der DNA, 5 μ l Random-Primer und x μ l Wasser für 5 min auf 100°C erhitzt und dann für 2 min auf Eis inkubiert. Die jetzt denaturierten DNA wurde anzentrifugiert und je 4 μ l dGTP, dTTP und dCTP sowie 5 μ l Reaktionspuffer, 5 μ l α -³²P-dATP und 2 μ l Klenow-DNA-Polymerase zugegeben (Gesamtvolumen 50 μ l). Die Lösung wurde gemischt, anzentrifugiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden dann 2 μ l 0,5 M EDTA-Lösung zugegeben.

Um die Lösung von nicht in die DNA eingebauten dNTPs zu befreien, wurde sie mit Hilfe von illustra Probe Quant G50 Micro Columns gereinigt. Zuerst wurden die Säulen gevortext, die Säule durch Abbrechen des unteren Verschlusses geöffnet und für eine Minute mit 2800 rpm zentrifugiert. Dann wurde sie mit der radioaktiv markierten DNA-Lösung beladen und für 2 min mit 2800 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

Nachfolgend wurde die Zerfallsrate mit Hilfe eines Betacounters (1219 Rackbeta, LKB Instruments) bestimmt. 1 μ l der DNA-Lösung wurde in ein spezielles Zählröhrchen pipettiert, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und in das Zählgerät gestellt. Dies bestimmte anschließend die Anzahl der β -Zerfälle pro Minute (CPM).

3.5.10. Hybridisierung membrangebundener DNA-Fragmente mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Southernblotmembran wurde kurz mit 5xSSC angefeuchtet und in einen verschließbaren Glaszylinder gelegt. Die Heringssperma-DNA wurde vor der Zugabe zum Hybridisierungspuffer im Ultraschallbad geschert und anschließend durch zehnmütiges Erhitzen auf 100°C denaturiert. Zur Prähybridisierung wurden 20 ml vorgewärmter Hybridisierungspuffer zugegeben und 2 h bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Anschließend wurde die mit ³²P markierte Sonde denaturiert, indem sie für 5 min auf 100°C erhitzt und dann sofort für 2 min auf Eis gestellt wurde. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde die Sonde zum Hybridisierungspuffer gegeben und über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer 1 für je 15 min bei 42°C gewaschen. Dann wurde mit einem Handzählgerät die radioaktive Strahlung gemessen. War diese noch zu hoch wurde zweimal mit Waschpuffer 2 für je 15 min bei 42°C gewaschen und erneut gemessen. Falls notwendig wurde dann noch zweimal mit Waschpuffer 3 unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Dann wurde die Membran in Plastikfolie eingewickelt und ein Phosphorimagerfilm aufgelegt. Der Film wurde zwischen 2 und 4 Tagen exponiert und anschließend vom Phosphorimager ausgelesen.

3.5.11. Strippen von Southernblotmembranen

Die gleiche Southernblotmembran kann mit verschiedenen DNA-Sonden behandelt werden. Besitzen die zu detektierenden DNA-Fragmente dabei eine ähnliche Größe, so muss die erste Sonde von der Membran entfernt werden. Dies wird als Strippen der Membran bezeichnet. Dazu wurde sie kurz in hochreinem Wasser gewaschen, in einen Glaszylinder platziert, 20 ml Southernblot-Strippingpuffer zugegeben und für 1 h bei 65°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Anschließend wurde sie kurz mit 2xSSC-Puffer gewaschen, in Frischhaltefolie eingewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.12. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem ELISA können Antigene, z.B. Zytokine oder Antikörper mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Zuerst wurde der spezifischer Antikörper in eine 96 Well Flachbodenplatte (Maxisorp) immobilisiert. Dazu wurde er in PBS verdünnt und 50 µl in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde die Platte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern wurden 250 µl Blockpuffer/Well zugegeben und erneut bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und 50 µl Probe (verdünnt in Blockpuffer) in jedes Well in Doppelbestimmung pipettiert. Außerdem wurde eine Standardreihe mit bekannter Konzentration pipettiert, damit eine Kalibrierungskurve zur

späteren Quantifizierung der Probe erstellt werden konnte. Als Leerkontrolle wurde in vier Wells nur Blockpuffer gegeben. Die Platte wurde für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Als Nächstes wurde die Platte dreimal mit Hilfe des Waschgerätes Skan Washer 400 (Molecular Devices) mit Waschpuffer gewaschen, der Überstand entfernt und 50 µl/Well Detektionsantikörperlösung verdünnt in Blockpuffer zugegeben. Dieser Sekundärantikörper bindet an ein anderes Epitop des Antigens als der immobilisierte Primärantikörper und ist an ein Enzym wie AP (Alkalische Phosphatase) oder HRP (*Horseradish Peroxidase*) gekoppelt. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT wurde die Platte erneut dreimal gewaschen, der Überstand entfernt und 100 µl/Well Substratlösung zugegeben. Das Substrat wird vom Enzym direkt oder indirekt in ein farbiges Produkt umgesetzt, das photometrisch erfasst werden konnte. Da seine Menge proportional zur Menge des Antigens ist, konnte das Antigen auf diese Weise quantifiziert werden.

Bei der Analyse von TNP-OVA spezifischen Antikörpern im Serum immunisierter Mäuse wurde TNP-OVA auf den ELISA-Platten immobilisiert. Als Standard wurde ein Serumpool immunisierter Mäuse verwendet.

Antigen	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgE
TNP-OVA	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
1. Standardverdünnung	1:50	1:250	1:50	1:50	1:40	1:20	1:10
logarithmische Verdünnungsreihe	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
1. Probenverdünnung	1:500	1:500	1:100	1:250	1:200	1:50	1:100
Logarithmische Verdünnungsreihe	1:3	1:3	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
Detektionsantikörper	1:10000	1:10000	1:10000	1:10000	1:10000	1:10.000	1:10000

Tabelle 1 Verdünnungen TNP-OVA spezifischer ELISA

Antigen	IgM	IgG1	IgG2b	IgE
Primärantikörper	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml
1. Standardverdünnung	1 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml
logarithmische Verdünnungsreihe	1:2	1:2	1:2	1:2
1. Probenverdünnung	1:500	1:1000	1:1000	1:50
Logarithmische Verdünnungsreihe	1:3	1:3	1:3	1:2
Detektionsantikörper	1:10000	1:10000	1:10000	1:10000

Tabelle 2 Verdünnungen ELISA zur Bestimmung der Totalkonzentration von Serumantikörpern

Antigen	IgM	IgG1	IgE
Primärantikörper	5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml
1. Standard-verdünnung	100 ng/ml	100 ng/ml	2 µg/ml
logarithmische Verdünnungsreihe	1:2	1:2	1:2
1. Proben-verdünnung	1:50	unverdünnt	unverdünnt
Logarithmische Verdünnungsreihe	1:2	1:2	1:2
Detektions-antikörper	1:10000	1:10000	1:10000

Tabelle 3 Verdünnungen ELISA zur Bestimmung der Konzentration von Antikörpern im Überstand von Milzzellkulturen

Alle Detektionsantikörper, außer der gegen IgM, waren AP gekoppelt. Zur Detektion wurden 100 µl Substratpuffer 1 zusammen mit dem Substrat PNPP (eine Tablette in 5 ml Substratpuffer) in jedes Well gegeben und die Reaktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Der Detektionsantikörper gegen IgM war HRP gekoppelt. Daher wurde Substratpuffer 2 und das Substrat OPD (eine Tablette in 20 ml Substratpuffer) verwendet. Zum Starten der Reaktion wurden noch 20 µl 30%iges Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Von dieser Lösung wurden 50 µl in jedes Well pipettiert. War der Farbumschlag stark genug, wurde die Reaktion mit 25 µl/Well 4N Schwefelsäure abgestoppt und die Platte bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

ELISA zum Nachweis von anti-DNA-Antikörper im Serum von Mäusen:

Hierzu wurde DNA auf einer ELISA-Platte immobilisiert. Um eine bessere Bindung der DNA an den Kunststoff zu ermöglichen, wurde die Platte vorher 2 h mit UV-Licht bestrahlt. Die DNA aus Kälberthymus wurde zum Denaturieren 4 min auf 99°C erhitzt, 10 min auf Eis inkubiert und dann auf eine Konzentration von 50 µg/ml mit TBS verdünnt. Hiervon wurden 70 µl in jedes Well gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, 250 µl/Well Blockpuffer zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Standard wurde ein Serumpool von Mäusen mit anti-DNA-Antikörpern verwendet. Die erste Standardverdünnung war 1:25, die erste Probenverdünnung 1:100, die logarithmische Verdünnungsreihe war bei beiden 1:2. Inkubiert wurde 2 h bei RT. Der Detektionsantikörper (HRP gekoppeltes rabbit anti-mouse IgG) wurde in einer Konzentration von 0,2 µg/ml verwendet und 1 h bei RT inkubiert. Es wurden immer 70 µl in jedes Well gegeben.

3.5.13. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie auch FACS- (*fluorescence-activated-cell-sorting*) Analyse genannt, ist eine Methode mit der Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität untersucht werden können. Der „*forward-scatter*“ unterscheidet die Zellen nach ihrer Größe, dabei liegt der

Detektor gegenüber vom Laser. Der „*side-scatter*“ bestimmt die Granularität der Zellen, indem der im rechten Winkel zum Laser angebrachte Detektor das Streulicht erfasst. Außerdem können Oberflächenmarker der Zellen mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, markiert werden. Die drei wichtigsten Fluoreszenzfarbstoffe sind hierbei Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC). Durch die Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, lassen sich mehrere Oberflächenmarker einer Zelle untersuchen. Während die Zellen durch eine Kapillare gesaugt werden, regen Laser unterschiedlicher Wellenlänge die Farbstoffe zur Fluoreszenz an, was von verschiedenen Detektoren gemessen wird. Auf diese Weise können Zellpopulationen und Subpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker und Morphologie unterschieden und untersucht werden.

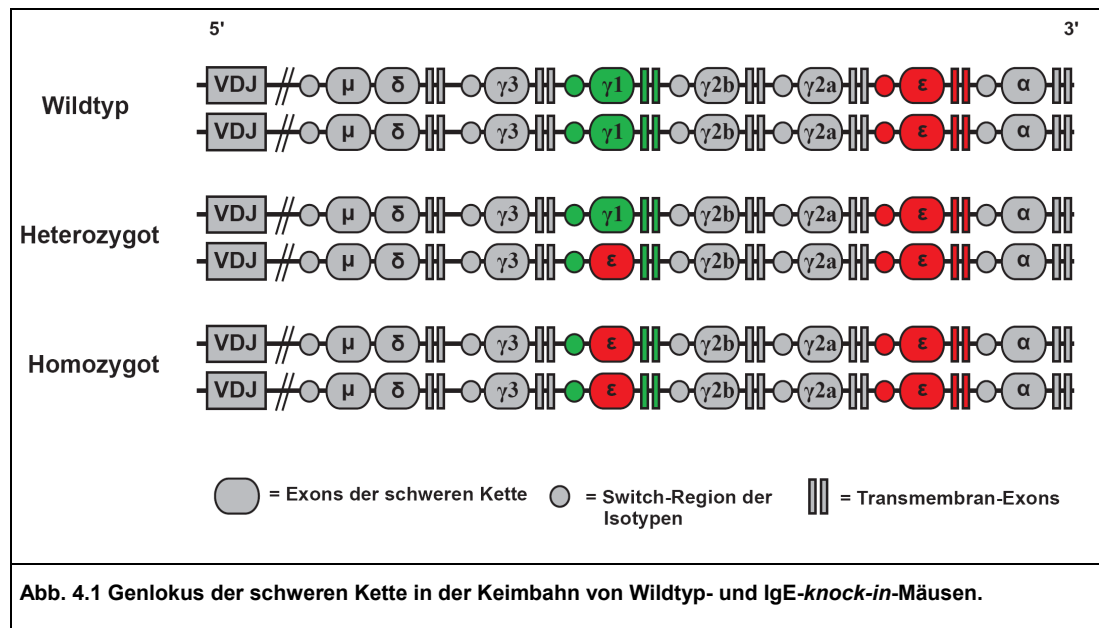
Für eine FACS-Färbung wurden etwa 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben, mit 1300 rpm für 7 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und 30 µl Fc-Block (Maus oder Ratten IgG, 133 µg/ml) zum Blocken der Fc-Rezeptoren zugegeben. Der Ansatz wurde für 7 min bei 4°C inkubiert, dann 30 µl Antikörper-Mix (0,2 bis 0,5 µg Antikörper in FACS-Puffer verdünnt) zugegeben, gemischt und für 40 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 150 bis 250 µl FACS-Puffer resuspendiert.

4. Ergebnisse

4.1. *Untersuchung der systemischen Anaphylaxie in murinen IgE-knock-in-Mäusen*

4.1.1. In *IgE-knock-in-Mäusen* ist der lösliche Teil der schweren Kette von murinem IgE in den IgG1-Genlocus eingeführt worden

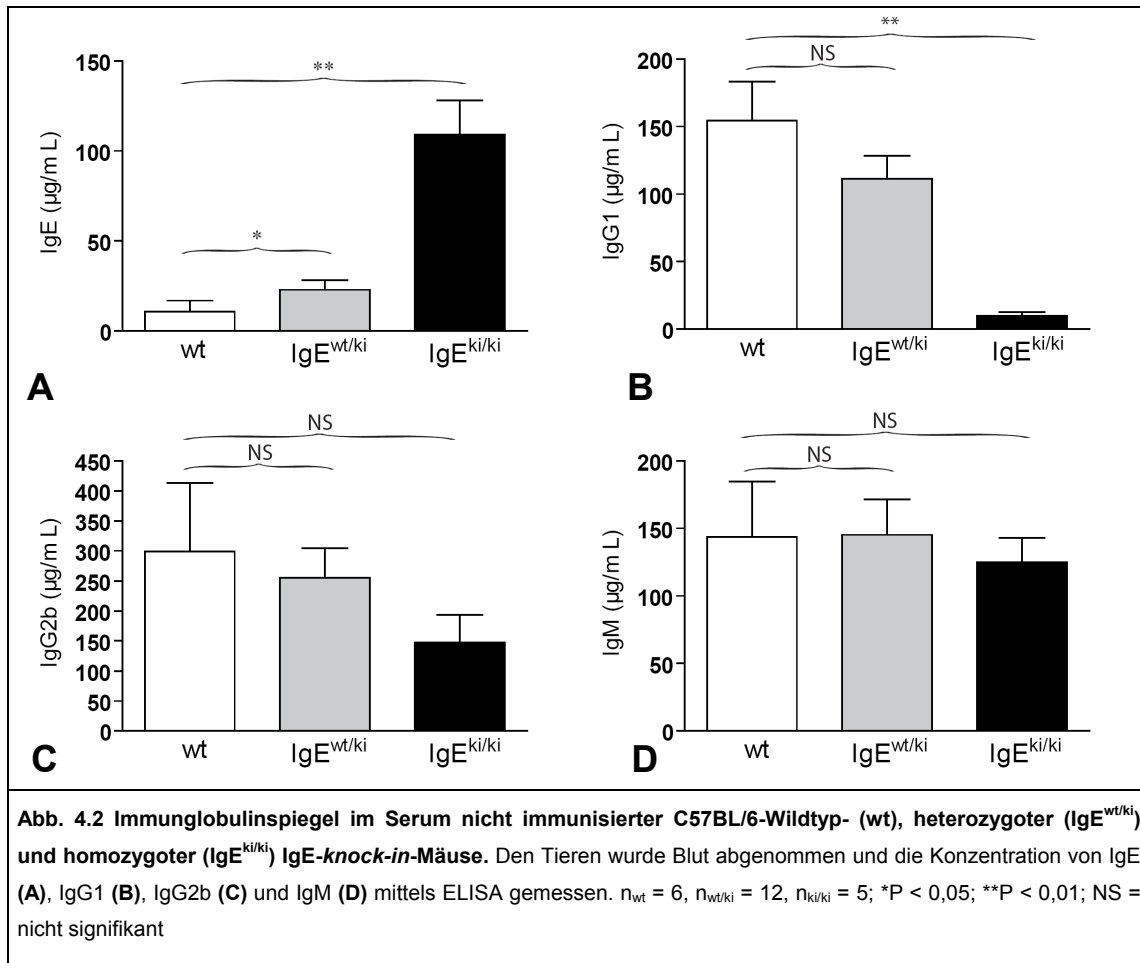
In Wildtyp-Mäusen wird die Expression von IgE streng kontrolliert. Um diese strenge Kontrolle zu umgehen, wurde in den *IgE-knock-in-Mäusen* der Regulationsmechanismus von IgG1 zu IgE transferiert. Erreicht wurde dies, indem das Gen für den löslichen Teil der schweren Kette von IgG1 durch den entsprechenden Teil von IgE ersetzt wurde. Das transferierte IgE liegt somit zwischen der *IgG1-class-switch*-Region und den IgG1-Transmembran-Exons (Abb. 4.1).



Da der Isotypenwechsel an der IgG1-switch-Region deutlich häufiger stattfindet, als der an der IgE-switch-Region, sollte es in den *Knock-in*-Mäusen zu einer vermehrten IgE-Produktion kommen. Außerdem sollten sich B-Zellen entwickeln, die chimäres membranständiges IgE besitzen und aus der Transmembranregion von IgG1 und dem löslichen Teil von IgE bestehen. Die Signaltransduktion dieser chimären Moleküle sollte der von IgG1 gleichen und ebenfalls zu einer erhöhten IgE-Expression führen (Karnowski, Yu et al. 2000). Eine weitere Folge dieser *Knock-in*-Strategie ist, dass die homozygoten Tiere ($IgE^{ki/ki}$) gleichzeitig IgG1-*knock-out*-Mäuse sind. Dies erlaubt es nicht nur die Bedeutung von IgE, sondern auch die von IgG1 bei allergischen Reaktionen zu untersuchen.

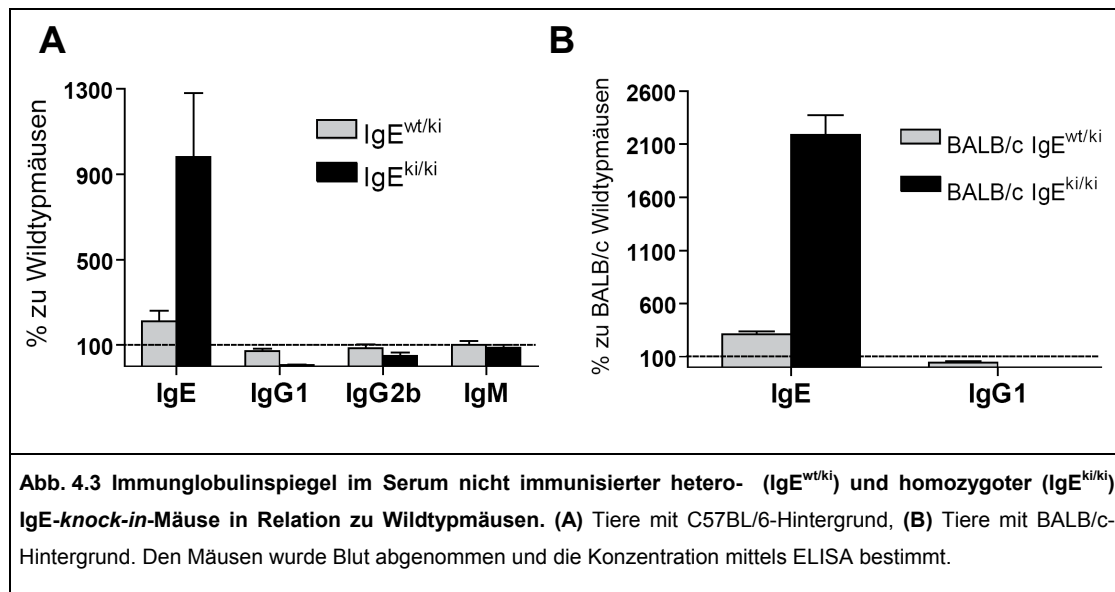
4.1.2. Überexpression von IgE im Serum von IgE-knock-in-Mäusen

Um die Funktionalität des *Knock-ins* zu überprüfen, wurde der IgE-, IgG1-, IgG2b- und IgM-Spiegel im Serum von zwei bis drei Monate alten homo- und heterozygoten IgE-*knock-in*-Mäusen mittels ELISA analysiert und mit Wildtypmäusen (wt) verglichen (Abb. 4.2 – 4.4).

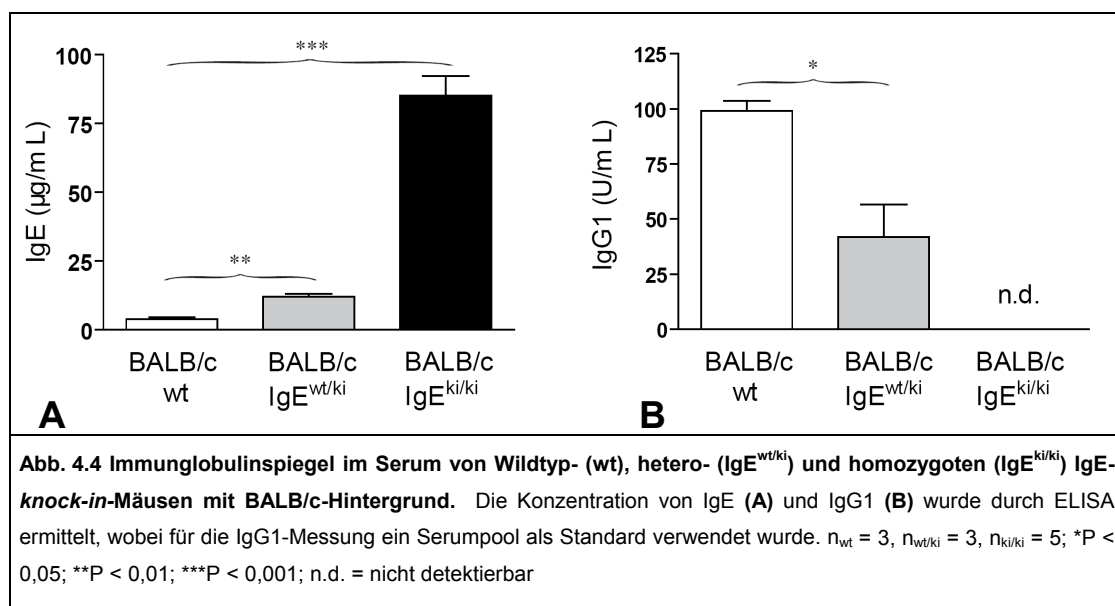


Der IgE-Spiegel war in den homozygoten *IgE-knock-in*-Mäusen mit rund 109 µg/ml etwa 10 mal höher als in C57BL/6-Kontrollmäusen. In den heterozygoten *IgE-knock-in*-Mäusen ($IgE^{wt/ki}$) war er mit 23 µg/ml ca. doppelt so hoch (Abb. 4.2.A). Die $IgE^{ki/ki}$ exprimierten kein IgG1, während die $IgE^{wt/ki}$, aufgrund der Deletion eines der IgG1-Allele, mit 110 µg/ml eine um 30% verringerte Expression zeigten, was allerdings keine signifikante Änderung darstellte (Abb. 4.2.B). Im IgG2b-Spiegel von $IgE^{wt/ki}$ und Wildtyp gab es keinen wesentlichen Unterschied, während er bei den $IgE^{ki/ki}$ mit 150 µg/ml um 50% niedriger lag (Abb. 4.2.C). Insgesamt gab es aber keine signifikanten Unterschiede im IgG2b-Spiegel zwischen Wildtyp- und *IgE-knock-in*-Mäusen. Mit 125 bis 145 µg/ml lag auch die IgM-Konzentration bei allen drei Genotypen auf vergleichbarem Niveau (Abb. 4.2.D).

Die Immunglobulinspiegel unterschieden sich also im Wesentlichen nur in einer erhöhten IgE-Konzentration bzw. der Abwesenheit von IgG1 (Abb. 4.3.A). Dies wurde auch durch die Analyse von *IgE-knock-in*-Mäusen mit BALB/c-Hintergrund bestätigt (Abb. 4.3.B / 4.4). So war der IgE-Spiegel bei BALB/c $IgE^{wt/ki}$ mit 12 µg/ml rund dreimal höher als bei BALB/c-Kontrollmäusen. Bei BALB/c $IgE^{ki/ki}$ zeigte sich sogar eine 22fach erhöhte Expression (Abb. 4.4.A). Auch hier war bei den homozygoten Tieren kein IgG1 nachweisbar, während die Konzentration bei den heterozygoten Mäusen um 60% signifikant niedriger war im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abb. 4.4.B). Mit dem BALB/c-Hintergrund fiel der Unterschied zwischen *IgE-knock-in*- und den Wildtypmäusen bezüglich IgE und IgG1 also noch größer aus, als beim C57BL/6-Hintergrund.



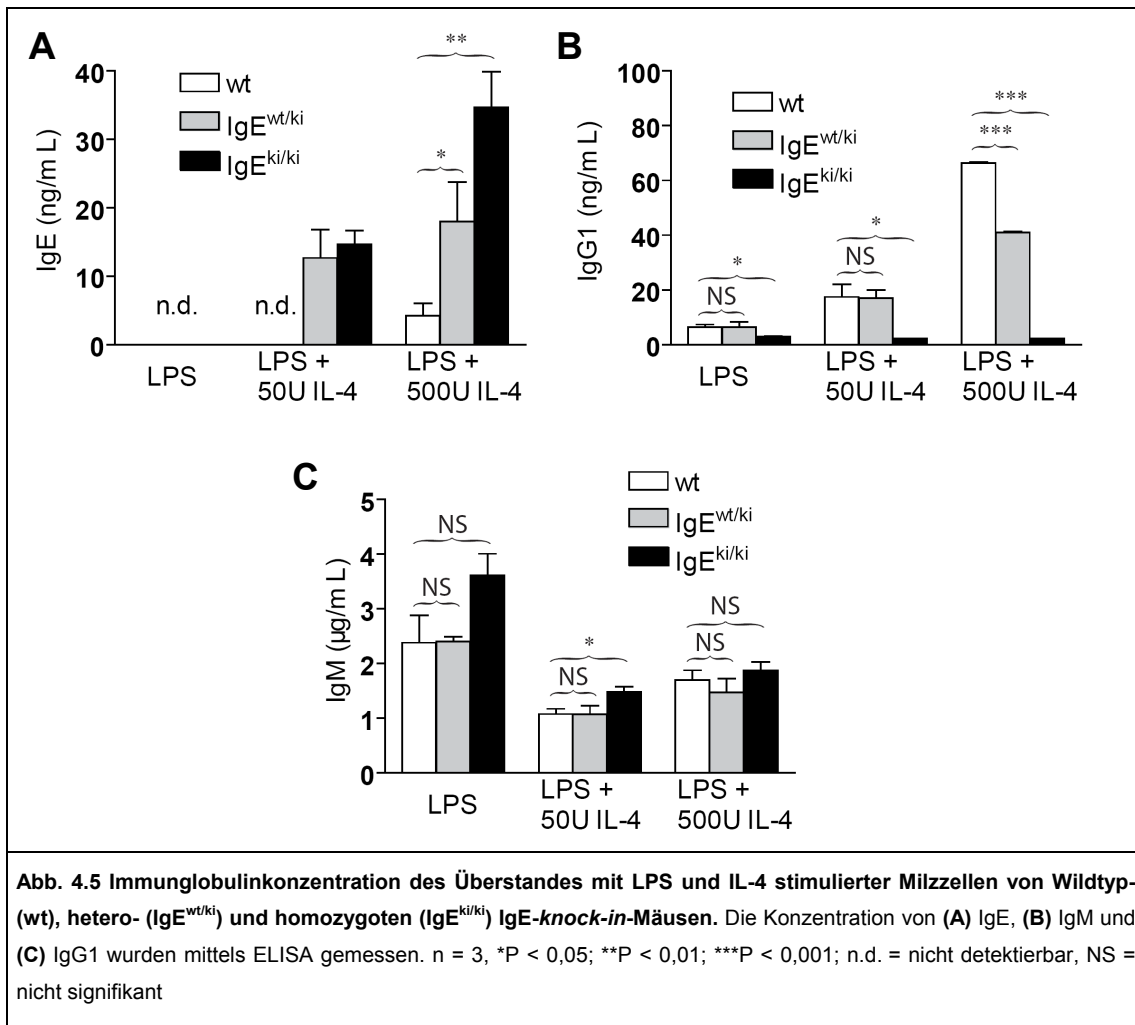
Diese Ergebnisse zeigen einerseits die Funktionalität des transferierten IgE-Gens. Die relativ geringe Erhöhung des IgE-Spiegels, verglichen mit dem Verhältnis von IgG1 zu IgE in WT-Mäusen, macht andererseits aber auch deutlich, dass die IgE-Konzentration im Serum nur teilweise von der Position des IgE-Gens abhängig ist.



4.1.4. Erhöhte IgE-Expression bei *in vitro* Stimulation von Milzzellen aus IgE-knock-in-Mäusen mit LPS und IL-4

Eine weitere Methode die Funktionalität des *Knock-ins* zu testen und die Abhängigkeit der IgE-Expression von IL-4 zu überprüfen ist die *in vitro* Stimulation von B-Zellen. Hierzu wurden Milzzellen zwei Monate alter Mäuse entsprechend Kapitel 3.2.5 mit LPS und IL-4 für vier Tage stimuliert und die Konzentration von IgE, IgG1 und IgM im Überstand mittels ELISA gemessen

(Abb. 4.5 / 4.6). Um den Isotypenwechsel zu IgE und IgG1 zu induzieren, wurde mit einer hohen (500 U/ml) und einer niedrigen (50 U/ml) Konzentration IL-4 stimuliert.



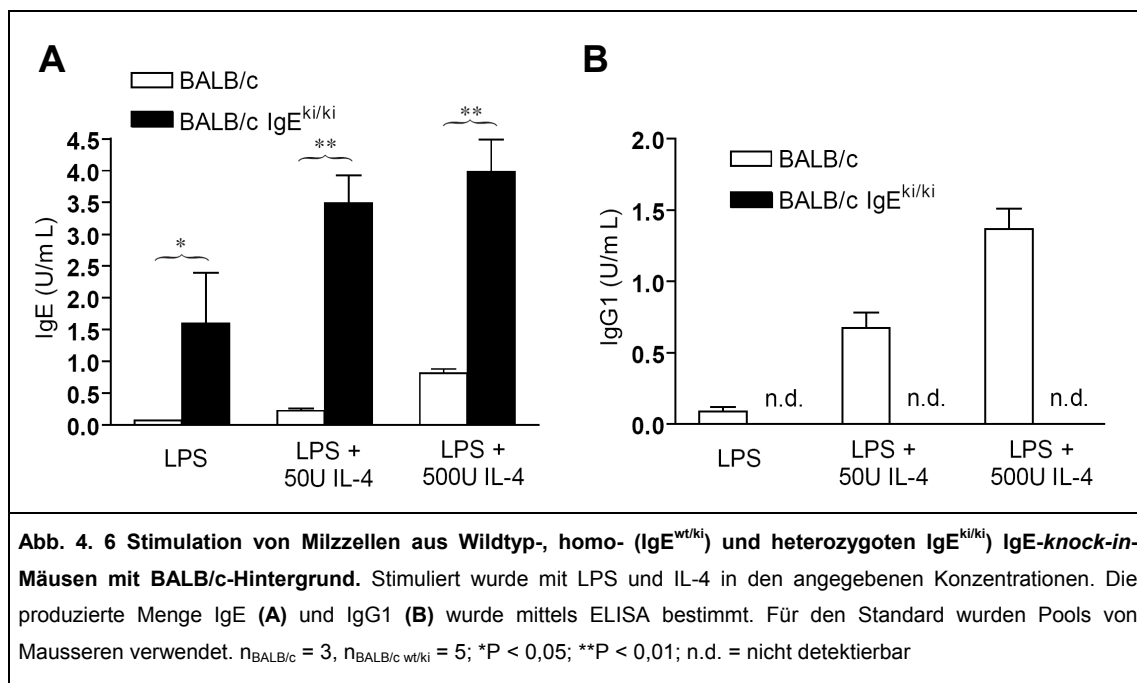
Wurden die isolierten Milzzellen ausschließlich mit LPS stimuliert, konnte weder beim WT, noch bei den homo- bzw. heterozygoten *Knock-in*-Mäusen IgE detektiert werden (Abb. 4.5.A). Nach zusätzlicher Zugabe einer geringen Konzentration von IL-4 zeigten die IgE^{wt/ki} bzw. IgE^{ki/ki} eine IgE-Expression von 13 bzw. 15 ng/ml. Dagegen produzierten die WT-Milzzellen auch unter diesen Bedingungen kein IgE. Erst bei einer erhöhten Dosis IL-4 war beim WT eine geringe Menge an IgE detektierbar, während sich die Konzentration bei den Milzzellen von IgE^{wt/ki} und IgE^{ki/ki} weiter erhöhte (Abb. 4.5.A).

Bei einer Stimulation von 500 U/ml IL-4 exprimierten die Milzzellen von IgE^{wt/ki}-Mäusen etwa 4 mal mehr IgE als die von Wildtypmäusen, bei den IgE^{ki/ki} waren es 8 mal mehr. Dies ist vergleichbar mit der Zunahme an IgE in den Seren der *Knock-in*-Mäuse (Kapitel 4.1.2).

Die IgM-Konzentration reduzierte sich nach Zugabe von IL-4. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Genotypen sind nicht vorhanden (Abb. 4.5.B). IgG1 konnte im Überstand der IgE^{ki/ki}-Milzzellen nicht detektierbar werden (Abb. 4.5.C). Wurde ausschließlich mit LPS stimuliert produzierten sowohl wt- als auch IgE^{wt/ki}-B-Zellen geringe Mengen an IgG1 von 6 ng/ml. Bei zusätzlicher Stimulation mit 50U/ml IL-4 erhöhte sich die Konzentration bei beiden

auf rund 17 ng/ml. Mit einer hohen Dosis IL-4 steigerte sich die Expression auf 66 ng/ml bei $IgE^{wt/ki}$, was einer Verringerung von 40% gegenüber dem WT entspricht (Abb. 4.5.C). Verglichen mit den Messungen der Mausseren ist dies eine signifikante Reduktion (Kapitel 4.1.2).

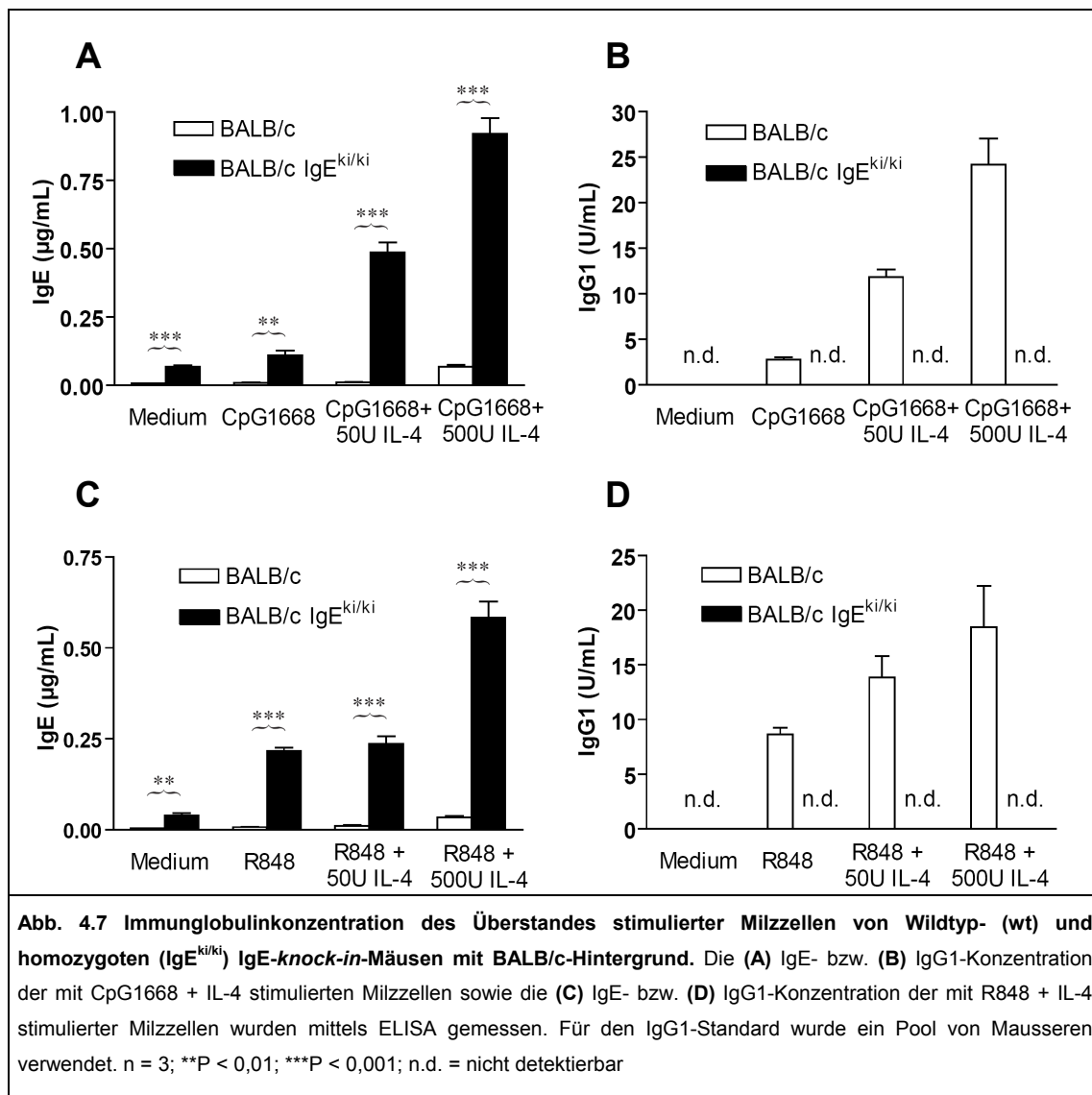
Ein Wechsel zum BALB/c-Hintergrund bestätigt die oben genannten Aussagen (Abb. 4.6). BALB/c- $IgE^{ki/ki}$ -Milzzellen produzierten allerdings schon bei einer reinen LPS-Stimulation geringe Mengen an IgE. Im Vergleich zum WT war nach zusätzlicher Stimulation mit IL-4 eine 9 bzw. 10fach erhöhte IgE-Expression der $IgE^{ki/ki}$ -Milzzellen nachweisbar (Abb. 4.6.A). IgG1 konnte im Überstand von BALB/c- $IgE^{ki/ki}$ -Milzzellen nicht detektierbar werden. Eine Stimulation mit LPS alleine reichte beim WT aus, geringe Mengen an IgG1 zu produzieren. Wurde zusätzlich mit einer niedrigen Dosis IL-4 stimuliert, erhöhte sich die Produktion um das Siebenfache, bei einer hohen Dosis IL-4 sogar um das Vierzehnfache (Abb. 4.6.B).



Die Ergebnisse zeigen, dass der Transfer des IgE-Gens in den IgG1-Genlocus schon bei einer Stimulation mit geringen Mengen IL-4 zu einer starken Überexpression von IgE führt. Beim BALB/c-Hintergrund kam es sogar zu einer geringen IgE-Expression, wenn ausschließlich mit LPS stimuliert wurde. Das IgE-Expressionsmuster in den *Knock-in*-Mäusen ähnelt damit dem IgG1-Expressionsmuster im WT. Die Produktion von IgE wird in den *Knock-in*-Mäusen somit weniger streng durch IL-4 kontrolliert als die im WT. In dieser Eigenschaft ähnelt es dem IgG1. Die IL-4-Abhängigkeit scheint außerdem bei Tieren mit BALB/c-Hintergrund geringer zu sein als bei denen mit C57BL/6-Hintergrund.

4.1.4. Die *in vitro* Stimulation von Milzzellen aus IgE-knock-in-Mäusen mit CpG 1668 bzw. R848 und IL-4 führt zur IgE-Überexpression

Um die in Kapitel 4.1.4 erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen wurden Milzzellen mit dem TLR9-Liganden CpG 1668 bzw. dem TLR7-Liganden R848 entsprechend Kapitel 4.2.6 für sechs Tage stimuliert. Zur Induktion des Isotypenwechsels zu IgE und IgG1 wurde erneut eine geringe und eine hohe Dosis IL-4 (50 bzw. 500 U/ml) zugegeben und die Konzentration dieser beiden Immunglobuline mittels ELISA bestimmt (Abb. 4.7).



Wurden die isolierten Milzzellen ausschließlich mit CpG 1668 stimuliert, konnte nur bei BALB/c-IgE^{ki/ki} eine geringe Menge an IgE gemessen werden. Wurde eine niedrige Dosis IL-4 zugegeben, zeigten die BALB/c-IgE^{ki/ki} eine IgE-Expression von 0,5 µg/ml, während die WT-Milzzellen auch unter diesen Bedingungen kein IgE produzierten. Erst bei einer hohen Konzentration von IL-4 konnte auch beim WT eine IgE-Expression von 0,07 µg/ml gemessen werden. Die Milzzellen der *Knock-in*-Mäuse produzierten unter diesen Bedingungen mit

0,9 µg/ml rund 13 mal mehr IgE als der WT (Abb. 4.7.A). IgG1 konnte im Überstand der BALB/c-IgE^{ki/ki}-Milzzellen nicht nachgewiesen werden. Wurde ausschließlich mit CpG 1668 stimuliert, zeigten die Milzzellen des Wildtyps bereits eine IgG1-Expression, die sich bei Zugabe einer geringen Konzentration IL-4 um das 4 fache erhöhte. Dieser Wert verdoppelte sich noch einmal bei Zugabe einer hohen Dosis IL-4 (Abb. 4.7.B).

Bei Stimulation mit R848 zeigte sich ein ähnliches Bild. Wurde nur mit R848 stimuliert, exprimierten die BALB/c-IgE^{ki/ki}-Milzzellen 0,23 µg/ml IgE. Dieser Wert blieb auch durch Zugabe einer geringen Menge IL-4 annähernd konstant. Der WT produzierte unter beiden Bedingungen kein IgE. Erst bei einer hohen Dosis IL-4 konnten beim WT 0,03 µg/ml IgE gemessen werden, während die BALB/c-IgE^{ki/ki}-Milzzellen mit 0,6 µg/ml die 20 fache Menge IgE exprimierten (Abb. 4.7.C). Im Überstand der BALB/c-IgE^{ki/ki}-Milzzellen konnte erneut kein IgG1 detektiert werden. Dagegen produzierten die entsprechenden Zellen des WT bereits IgG1, wenn sie ausschließlich mit R848 stimuliert wurden. Durch Zugabe einer geringen bzw. hohen Dosis IL-4 erhöhte sich die IgG1-Expression um 60 bzw. 100% (Abb. 4.7.D).

Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen von Kapitel 4.1.4. Die IgE-Expression in den *Knock-in*-Mäusen zeigt im Vergleich zum WT eine verringerte IL-4-Abhängigkeit, unabhängig davon, ob die B-Zellen über TLR4 (LPS), TLR7 (R848) oder TLR9 (CpG1668) stimuliert wurden. Das Expressionsmuster von IgE der BALB/c-IgE^{ki/ki}-Milzzellen ähnelt jeweils dem von IgG1 beim WT.

4.1.5. IgE-*knock-in*-Mäuse zeigen eine normale B-Zellentwicklung

Um herauszufinden, ob sich die B-Zellen in IgE-*knock-in*-Mäusen normal entwickeln, wurden Zellen aus Blut, Milz und Knochenmark mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Diese zeigte, dass es keinen signifikanten Unterschied in Anzahl und Verteilung der CD45R/B220⁺-CD23⁻ (vor allem B2-, keine B1-Zellen, Abb. 4.8.A) und CD45R/B220⁺-CD3e⁻-Zellen (alle B-Zellen, Abb. 4.8.B) im Blut von WT-, IgE^{wt/ki}- und IgE^{ki/ki}-Mäusen gibt. Das Gleiche gilt für die aus der Milz (Abb. 4.8.C) und dem Knochenmark (Abb. 4.8.D) stammenden CD45-B220⁺-CD23⁻-Zellen von WT- und IgE^{ki/ki}-Mäusen. Daraus lässt sich schließen, dass sich die B-Zellen in den IgE-*knock-in*-Mäusen normal entwickeln.

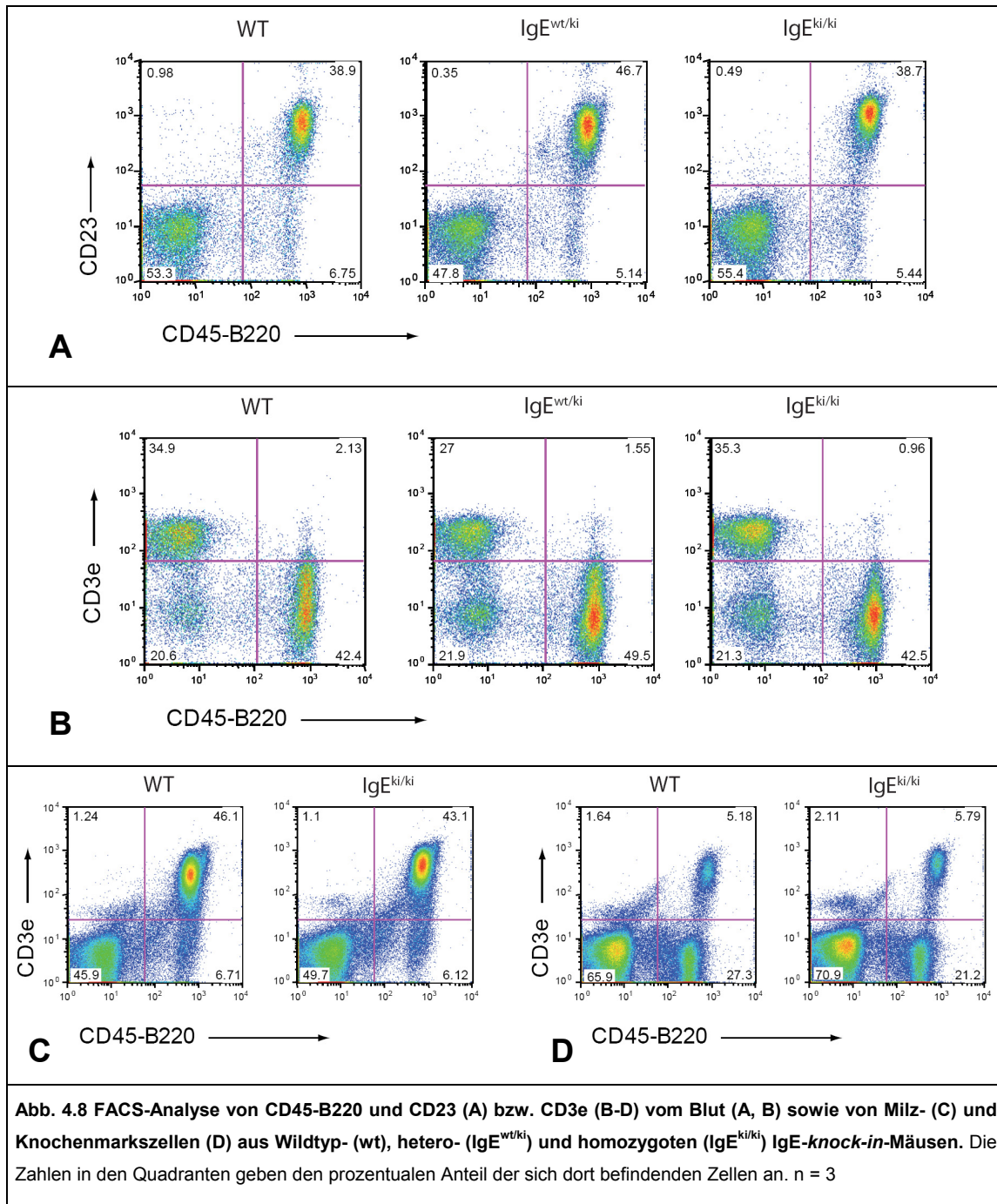


Abb. 4.8 FACS-Analyse von CD45-B220 und CD23 (A) bzw. CD3e (B-D) vom Blut (A, B) sowie von Milz- (C) und Knochenmarkszellen (D) aus Wildtyp- (wt), hetero- ($IgE^{wt/ki}$) und homozygoten ($IgE^{ki/ki}$) *IgE-knock-in*-Mäusen. Die Zahlen in den Quadranten geben den prozentualen Anteil der sich dort befindenden Zellen an. n = 3

4.1.6. B-Zellen von *IgE-knock-in*-Mäusen zeigen eine erhöhte Expression von membrangebundenem IgE

Eine weitere zu klärende Frage war, ob mit dem erhöhten IgE-Spiegel in den *IgE-knock-in*-Mäusen auch eine Erhöhung der B-Zellfrequenz einhergeht, die IgE auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da lösliches IgE an CD23 gebunden wird, das sich auf der Oberfläche von B-Zellen befindet, wurden zu diesem Zweck *CD23-knock-out*-Mäuse verwendet. In Abb. 4.9.A ist zu erkennen, dass der homozygote Genotyp dieser Mäuse kein CD23 auf der Oberfläche ihrer B-Zellen besitzt.

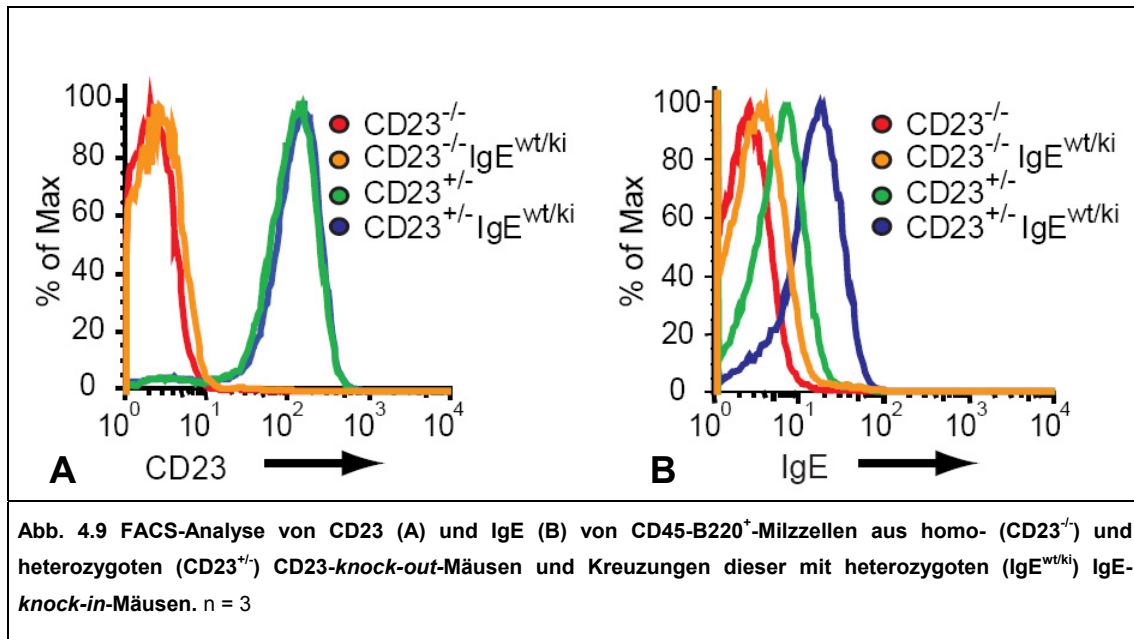


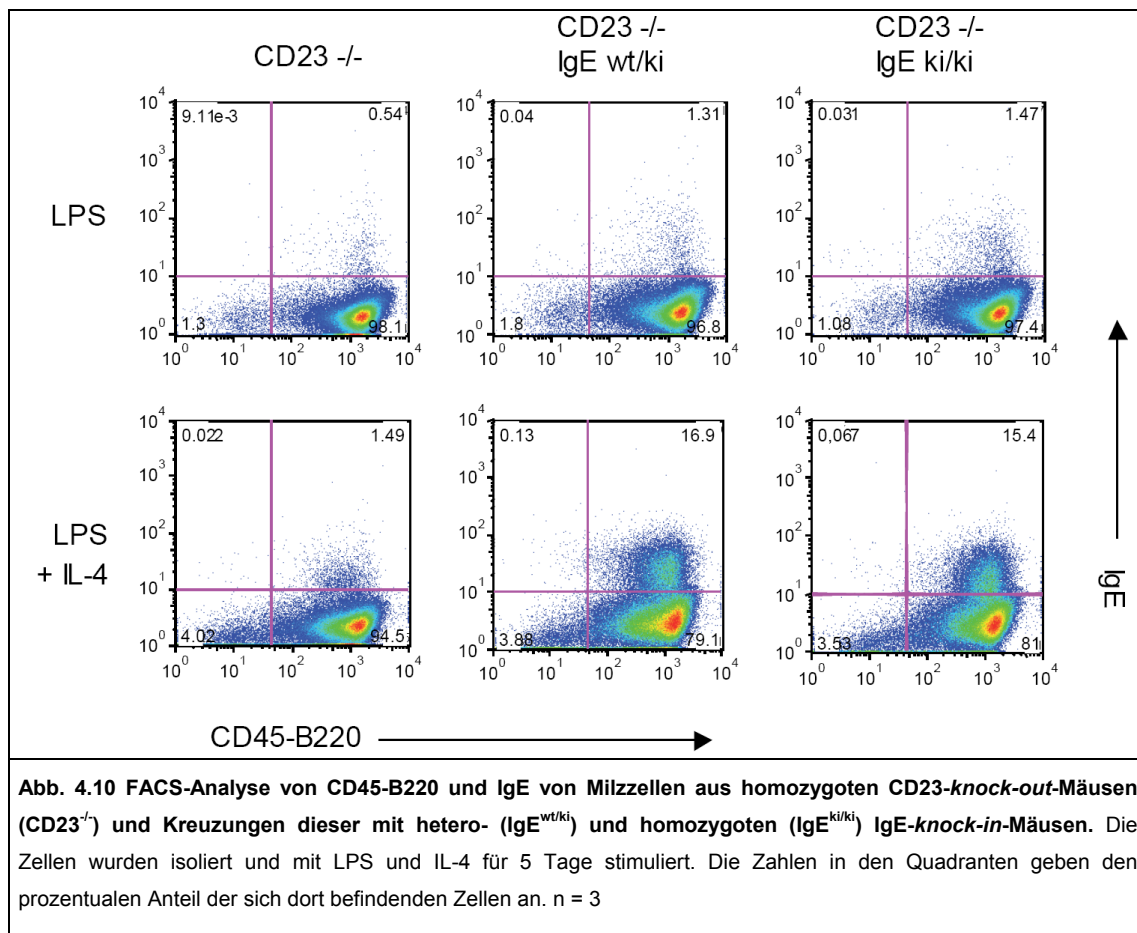
Abb. 4.9 FACS-Analyse von CD23 (A) und IgE (B) von CD45-B220⁺-Milzzellen aus homo- (CD23^{-/-}) und heterozygoten (CD23^{+/-}) CD23-knock-out-Mäusen und Kreuzungen dieser mit heterozygoten (IgE^{wt/ki}) IgE-knock-in-Mäusen. n = 3

Von hetero- und homozygoten CD23-knock-out-Mäusen (CD23^{+/-} und CD23^{-/-}) und Kreuzungen dieser mit heterozygoten IgE-knock-in-Mäusen (CD23^{+/-} IgE^{wt/ki} und CD23^{-/-} IgE^{wt/ki}) wurden FACS-Analysen der Milzzellen durchgeführt. In Abb. 4.9.B ist zu erkennen, dass die B-Zellen (CD45-B220⁺) von CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} etwas mehr IgE auf ihrer Oberfläche besitzen, als die von CD23^{-/-}. Da jedoch die gesamte Population davon betroffen ist, muss es sich um passiv gebundenes IgE handeln, das mit geringer Affinität an einen unbekanntes Rezeptor bindet, der sich auf allen B-Zellen befindet. Aufgrund des höheren IgE-Spiegels im Blut der CD23^{-/-} IgE^{wt/ki}-Mäuse bindet mehr lösliches IgE an diesen Rezeptor als bei den CD23^{-/-}-Mäusen. Auch CD23^{+/-} IgE^{wt/ki} besitzt auf seinen B-Zellen mehr membrangebundenes IgE als CD23^{+/-} bzw. CD23^{-/-} und CD23^{-/-} IgE^{wt/ki}. Ursache hierfür ist die passive Bindung von löslichem IgE an CD23. Da dies bei den CD23 defizienten Mäusen nicht möglich ist, zeigen CD23^{-/-} und CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} deutlich weniger IgE auf der B-Zelloberfläche. Dagegen führt der erhöhte IgE-Spiegel bei den IgE-knock-in-Mäusen zu einer vermehrten Bindung von IgE an CD23. Es konnte jedoch keine separate B-Zellpopulation mit membranständigem IgE (mIgE), das mit der Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert ist, in der Milz festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob solche B-Zellen überhaupt gebildet werden, wurden *in vitro* Stimulationen von Milzzellen aus CD23^{-/-}, CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} und CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} durchgeführt. Es wurde mit LPS und einer hohen Dosis IL-4 (500 U/ml) stimuliert und die Zellen für 5 Tage inkubiert (Kapitel 3.2.5). Die Zellen wurden anschließend für FACS-Analysen und zur RNA-Gewinnung verwendet.

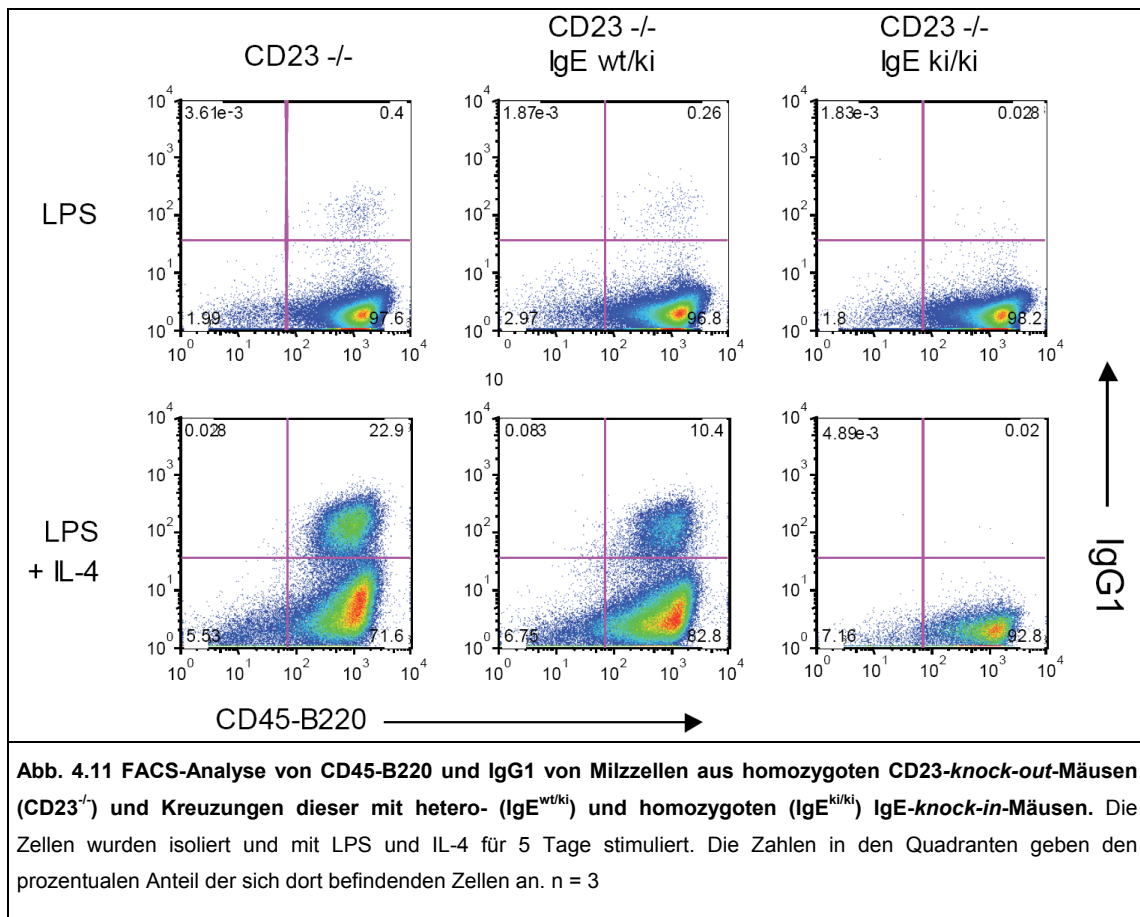
Wurde ausschließlich mit LPS stimuliert, sind bei allen drei Genotypen nur wenige B-Zellen mit mIgE zu erkennen. Hierbei besitzt CD23^{-/-} mit 0,5% die geringste Anzahl, bei CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} sind es 1,3% und die höchste Anzahl hat CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} mit 1,5% (Abb. 4.10). Wurde zusätzlich mit IL-4 stimuliert vergrößert sich die Menge der mIgE positiven B-Zellen in allen Genotypen deutlich, besonders aber in denen der IgE-knock-in-Mäuse. So verdreifachte sich ihre Anzahl bei den CD23^{-/-} auf 1,5%, während es bei den CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} und CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} mit 15 bis 17%

zu einer Erhöhung um das 10 bis 13fache kam. Zwischen den hetero- und homozygoten IgE-*knock-in*-Mäusen gab es dagegen keinen großen Unterschied (Abb. 4.10).



Bei alleiniger Stimulation mit LPS, entwickelten sich bei den CD23^{-/-} und den CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} einige Milzzellen zu membranständigen IgG1 (mIgG1) exprimierenden B-Zellen. Bei CD23^{-/-} betrug ihre Zahl rund 0,4%, bei CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} waren es etwa 30% weniger. Die CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} entwickelten keine mIgG1 exprimierenden B-Zellen (Abb. 4.11). Durch zusätzliche Gabe von IL-4 erhöhte sich die Anzahl der B-Zellen mit mIgG1 bei den CD23^{-/-} und CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} deutlich. Etwa 23% der CD23^{-/-}- und 10% der CD23^{-/-} IgE^{wt/ki}-Milzzellen besaßen mIgG1. Die Milzzellen aus heterozygoten IgE-*knock-in*-Mäusen entwickelten also 55% weniger mIgG1 exprimierende B-Zellen, als die aus reinen CD23^{-/-}-Mäusen (Abb. 4.11). Dagegen zeigten sich bei CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} auch nach zusätzlicher IL-4 Gabe keine weiteren Veränderungen, womit sich erneut zeigte, dass die homozygoten IgE-*knock-in*-Mäuse eine IgG1-Depletion aufweisen.

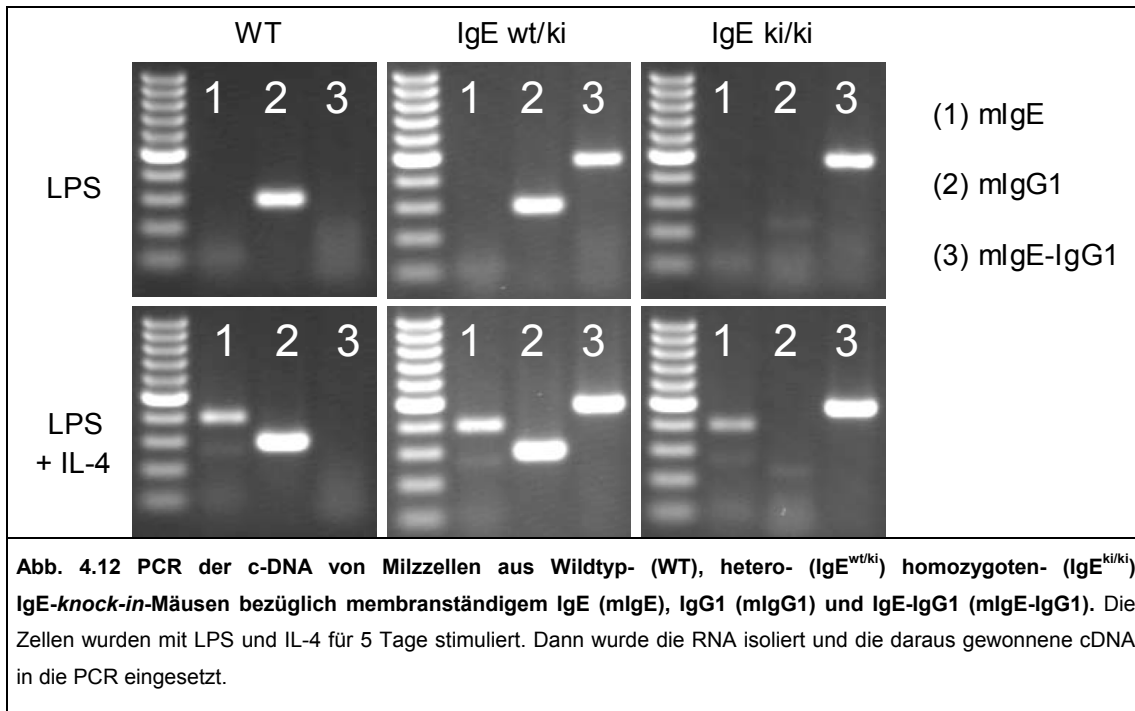
Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Erhöhung des IgE-Spiegels in den IgE-*knock-in*-Mäusen *in vitro* mit einer erhöhten Anzahl an B-Zellen einhergeht, die membranständiges IgE auf ihrer Oberfläche exprimieren. *In vivo* konnten diese Zellen in der Milz allerdings nicht nachgewiesen werden.



4.1.7. B-Zellen von IgE-knock-in-Mäusen weisen eine starke Expression von chimärem mIgE-IgG1 auf

Als nächstes wurde untersucht, unter welchen Bedingungen mIgE und mIgG1 transkribiert werden und ob es auch zur Transkription des chimären mIgE-IgG1 kommt, das aus dem löslichen Teil von IgE und der Transmembrandomäne von IgG1 besteht. Dazu wurde das Transkriptionsmuster von LPS und IL-4 stimulierten Milzzellen analysiert. Dann wurde eine PCR mit der cDNA der stimulierten Milzzellen bezüglich der Transkription von mIgE, mIgG1 und mIgE-IgG1 durchgeführt (Abb. 4.12).

Wurde der WT ausschließlich mit LPS stimuliert, kam es nur zur Transkription von mIgG1. Unter diesen Bedingungen wurden bei IgE^{wt/ki} sowohl mIgG1 als auch mIgE-IgG1, bei IgE^{ki/ki} nur mIgE-IgG1 transkribiert. Die zusätzliche Stimulation mit IL-4 führte bei den wt-Milzzellen neben mIgG1 auch zur Transkription von mIgE. IgE^{wt/ki}-Milzzellen transkribierten dann mIgE, mIgG1 und mIgE-IgG1, IgE^{ki/ki} mIgE und mIgE-IgG1 (Abb. 4.12).

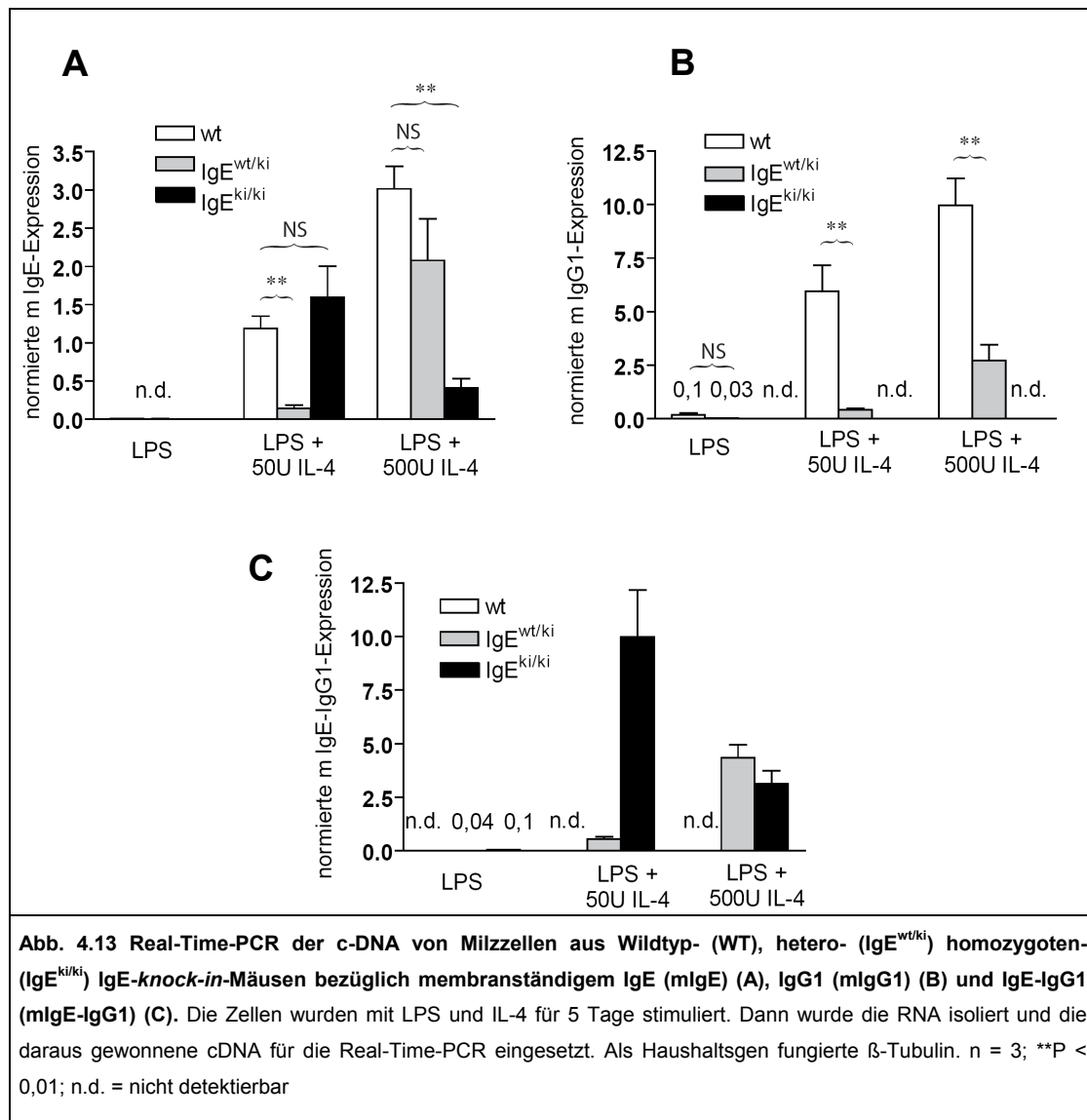


Um neben der qualitativen auch eine quantitative Aussage über die Transkription machen zu können wurde eine Real-Time-PCR (Kapitel 3.1.23) durchgeführt. Die Milzzellen von WT-, $IgE^{wt/ki}$ - und $IgE^{ki/ki}$ -Mäusen wurden fünf Tage mit LPS und einer niedrigen (50 U/ml) und einer hohen (500 U/ml) Konzentration IL-4 stimuliert (Abb. 4.13).

Wurde nur mit LPS stimuliert gab es bei allen drei Genotypen keine Transkription von mlgE. Bei einer zusätzlichen Stimulation mit einer geringen Menge IL-4 erhöhte sich die Transkriptionsrate beim WT auf 1,2 und bei $IgE^{ki/ki}$ auf 1,6 in Relation zu β -Tubulin, was kein signifikanter Unterschied darstellt. Bei den $IgE^{wt/ki}$ -Milzzellen blieb sie mit 0,1 sehr niedrig und erhöhte sich erst bei Zugabe einer hohen Konzentration IL-4 auf 2,1. Unter diesen Bedingungen lag die Expression der mRNA beim WT mit 3 auf einem vergleichbaren Niveau, während sie bei $IgE^{ki/ki}$ auf 0,4 sank (Abb. 4.13.A).

Wenn ausschließlich mit LPS stimuliert wurde, konnte beim WT und $IgE^{wt/ki}$ mit 0,1 bzw. 0,03 eine geringe Transkription von IgG1 festgestellt werden. $IgE^{ki/ki}$ exprimierte auch nach Zugabe von IL-4 keine mRNA von IgG1. Schon bei einer geringen Konzentration IL-4 betrug die Transkriptionsrate der wt-Milzzellen 5,8 und erhöhte sich bei einer hohen Konzentration auf 9,9. Die Werte für die $IgE^{wt/ki}$ -Milzzellen lagen dagegen mit 0,4 bzw. 2,7 deutlich niedriger als die des WTs (Abb. 4.13.B).

Die Stimulation mit LPS und IL-4 führte bei $IgE^{wt/ki}$ und $IgE^{ki/ki}$ zu einer Expression geringer Mengen mlgE-IgG1-mRNA. Beim WT konnte dagegen keine Transkription festgestellt werden. Bei einer kleinen Dosis IL-4 betrug die Transkriptionsrate der $IgE^{wt/ki}$ -Milzzellen 0,6 und erhöhte sich bei hoher Konzentration auf 4,4. Die $IgE^{ki/ki}$ -Milzzellen hatten dagegen schon bei einer geringen Dosis IL-4 eine hohe Transkriptionsrate von 9,8. Diese verringerte sich bei einer hohen Konzentration IL-4 auf 3,1. Wurde ausschließlich mit LPS stimuliert, kam es nur bei $IgE^{ki/ki}$ zu einer geringen Transkription von mlgE-IgG1 (Abb. 4.13.C).

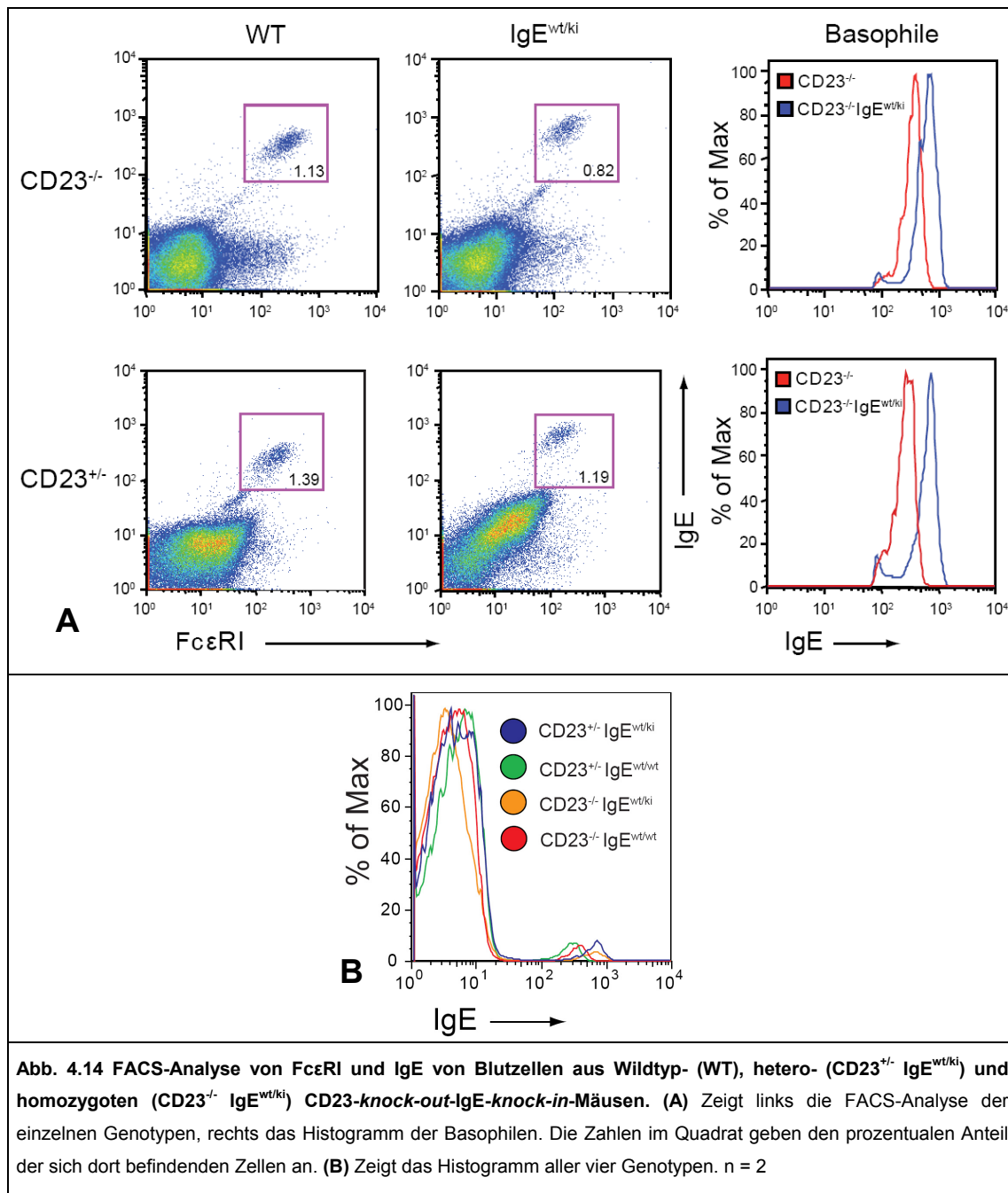


Anhand der PCR- und Real-Time-PCR-Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass die B-Zellen hetero- und homozygoter IgE-knock-in-Mäuse chimäres membranständiges IgE-IgG1 transkribieren. Die IgE^{ki/ki}-B-Zellen exprimierten schon bei ausschließlicher Stimulation mit LPS geringe Mengen mIgE-IgG1-mRNA. Hierin gleichen sie dem WT mit der Transkription von mIgG1. Schon bei Zugabe einer geringen Menge IL-4 kam es dann zu einer starken Transkription von mIgE-IgG1 bzw. IgG1. Somit zeigt sich auch hier eine verringerte Abhängigkeit von mIgE-IgG1 bezüglich IL-4 und eine große Ähnlichkeit zum Transkriptionsmuster von mIgG1 im WT.

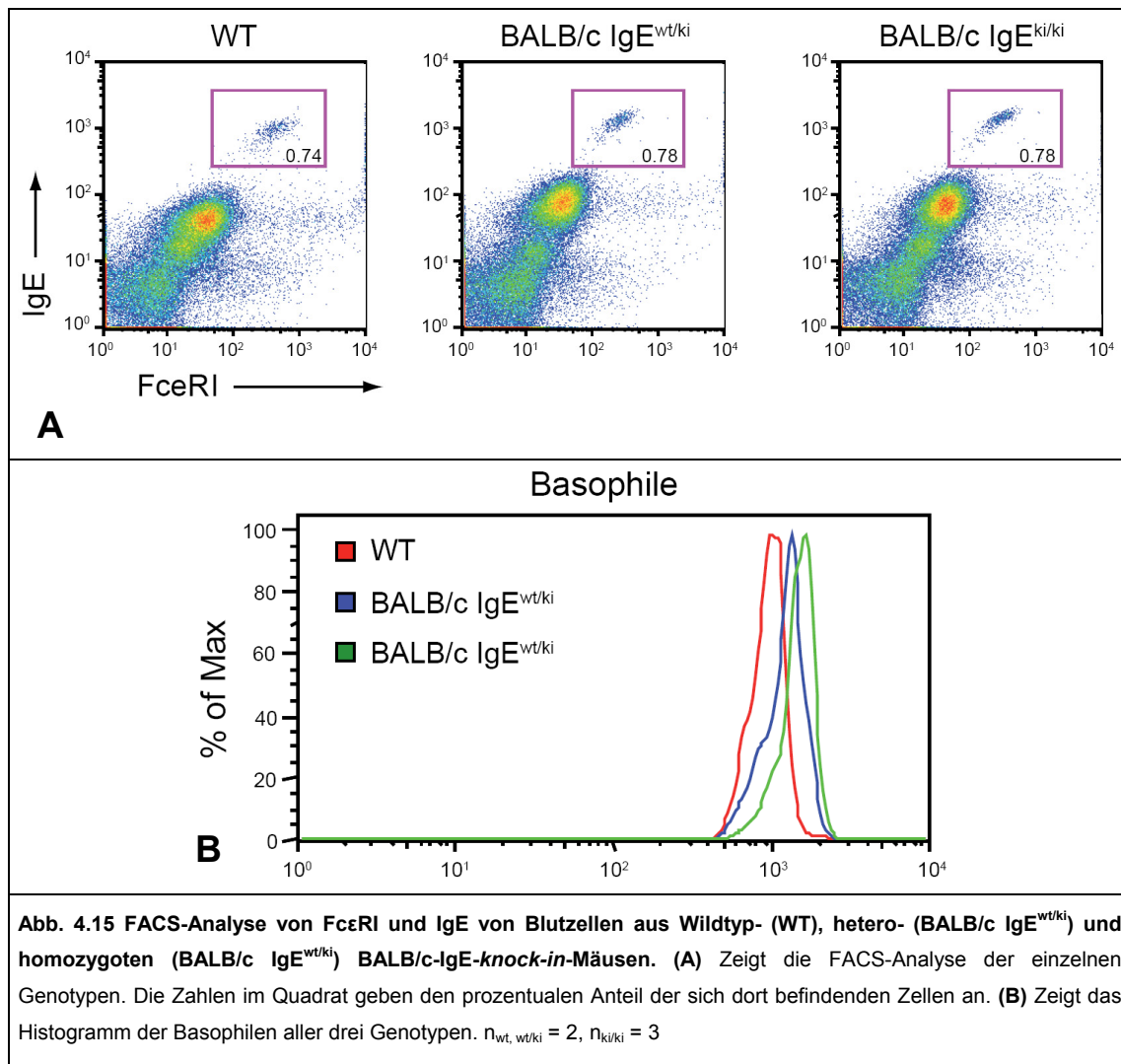
4.1.8. Ein erhöhter IgE-Spiegel führt zu einer verstärkten Bindung von IgE an Fc ϵ RI auf Basophilen

Um zu klären, ob ein erhöhter IgE-Spiegel auch zu einer verstärkten Bindung von IgE an den *high affinity* Rezeptor für IgE (Fc ϵ RI) auf Basophile führt, wurden FACS-Analysen von Blut, Milz und Knochenmark von WT und IgE-knock-in-Mäusen gemacht.

In Abb. 4.14 wurde das Blut von Wildtyp- und $CD23^{+/-} IgE^{wt/ki}$ - bzw. $CD23^{-/-} IgE^{wt/ki}$ -Mäusen auf $Fc\epsilon RI^+ IgE^+$ -Zellen (Basophile) untersucht. Es ist zu erkennen, dass die Zellen aller Genotypen zu rund 1% aus Basophilen bestanden. Die Basophilen der $IgE^{wt/ki}$ -Mäuse hatten aber über den $Fc\epsilon RI$ etwa doppelt soviel IgE gebunden. Hierbei spielte es keine Rolle, ob es sich um $CD23^{+/-}$ - oder $CD23^{-/-}$ -Mäuse handelte (Abb. 4.14.A und B).



Anschließend wurde auch das Blut von BALB/c $IgE^{wt/ki}$ - und BALB/c $IgE^{ki/ki}$ -Mäusen auf $Fc\epsilon RI^+ IgE^+$ -Zellen untersucht und mit dem WT verglichen. Alle drei Genotypen hatten mit rund 0,8% etwa gleich viele Basophile im Blut (Abb. 4.15.A). Das meiste IgE war an den Basophilen der homozygoten IgE-knock-in-Mäusen gebunden. Dann folgten die heterozygoten- und schließlich die wt-Basophilen (Abb. 4.15.B).



Neben dem Blut wurden auch die Basophilen aus der Milz und dem Knochenmark vom WT und BALB/c IgE^{ki/ki} untersucht. Beide Genotypen hatten mit 0,3% die gleiche Anzahl Basophilen in der Milz (Abb. 4.16.A), während es im Knochenmark der BALB/c IgE^{ki/ki}-Mäuse mit 1,1% etwas mehr waren, als in dem der wt-Mäuse mit 0,8% (Abb. 4.16.B). Im Vergleich zum WT hatten die BALB/c IgE^{ki/ki}-Basophilen beider Organe auch hier mehr IgE gebunden (Abb. 4.16).

Die Analyse der Basophilen zeigt somit, dass diese Zellen bei einem erhöhten IgE-Spiegel über den FcεRI mehr IgE auf ihrer Oberfläche binden. Auf die Anzahl der Basophilen im Blut und der Milz hat der IgE-Spiegel allerdings keinen Einfluss.

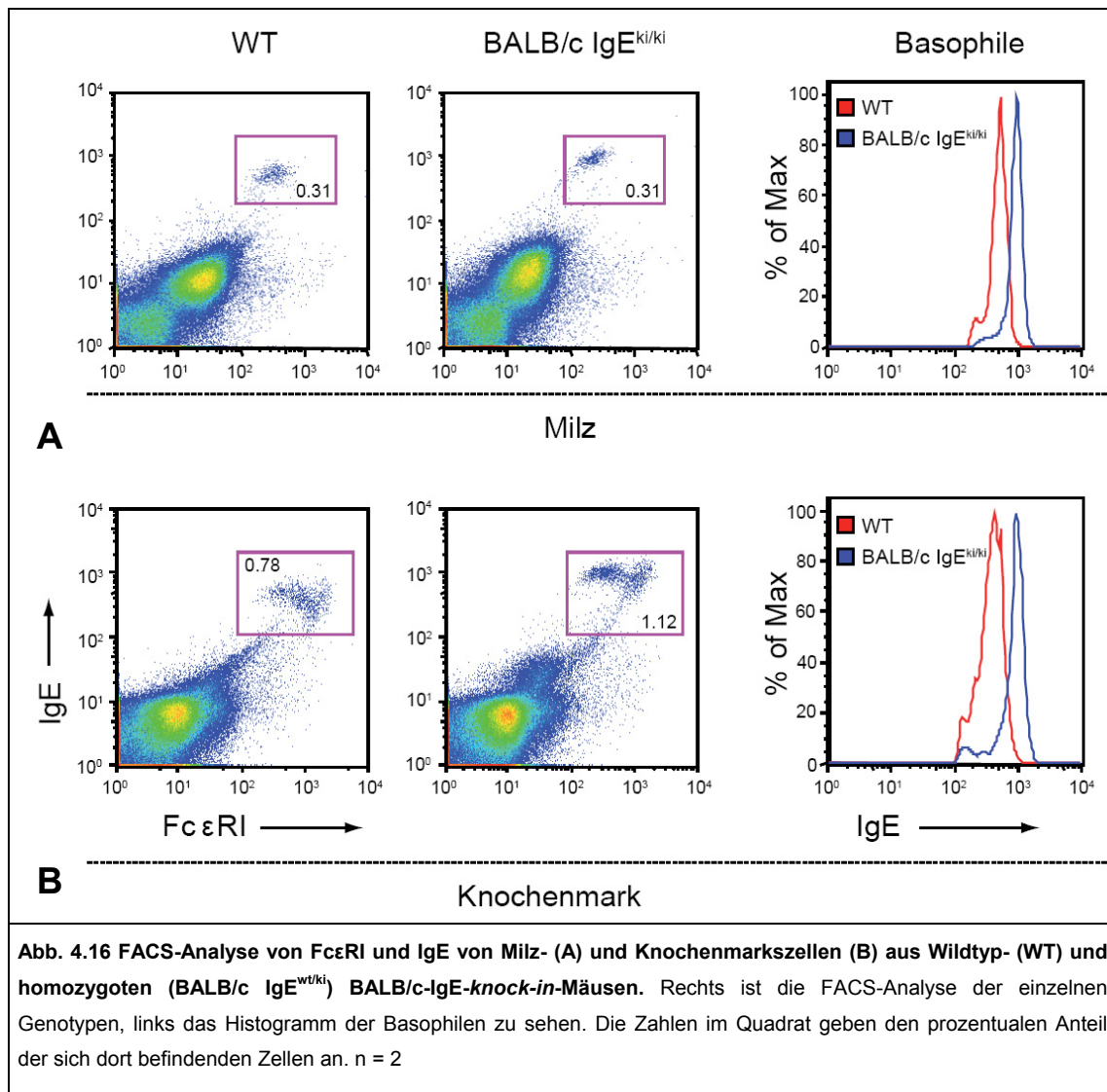


Abb. 4.16 FACS-Analyse von Fc ϵ RI und IgE von Milz- (A) und Knochenmarkszellen (B) aus Wildtyp- (WT) und homozygoten (BALB/c IgE^{wt/ki}) BALB/c-IgE-*knock-in*-Mäusen. Rechts ist die FACS-Analyse der einzelnen Genotypen, links das Histogramm der Basophilen zu sehen. Die Zahlen im Quadrat geben den prozentualen Anteil der sich dort befindenden Zellen an. n = 2

4.1.9. Überexpression von spezifischem IgE im Serum immunisierter IgE-*knock-in*-Mäuse

Um die IgE-Antwort auf ein spezifisches Antigen zu untersuchen wurden WT- und IgE-*knock-in*-Mäuse entsprechend Kapitel 3.4.1 mit dem Modell-Antigen TNP-OVA immunisiert. Anschließend wurde die Konzentration verschiedener TNP-OVA spezifischer Antikörperisotypen im Serum dieser Mäuse durch ELISA ermittelt (Abb. 4.17).

Der WT zeigte nach der Immunisierung mit 0,3 U/ml nur eine geringe Konzentration von TNP-OVA spezifischem IgE. Im Serum der IgE^{wt/ki} war der Wert mit 3,2 U/ml fast 11 mal höher, in dem der IgE^{ki/ki} mit 12,6 sogar 42 mal höher (Abb. 4.17.A). Dies ist ein deutlich größerer Unterschied im Vergleich zu der Konzentration von unspezifischem IgE im Serum nicht immunisierter Mäuse (Kapitel 4.1.2). Die spezifische IgG1-Konzentration lag in den IgE^{wt/ki} um 16% unter der des Wildtyps, was keine signifikante Änderung darstellt und mit dem unspezifischen IgG1-Wert nicht immunisierter Mäuse vergleichbar ist (Kapitel 4.1.2). Im Serum von IgE^{ki/ki}-Mäusen konnte kein TNP-OVA spezifisches IgE nachgewiesen werden (Abb. 4.17.B).

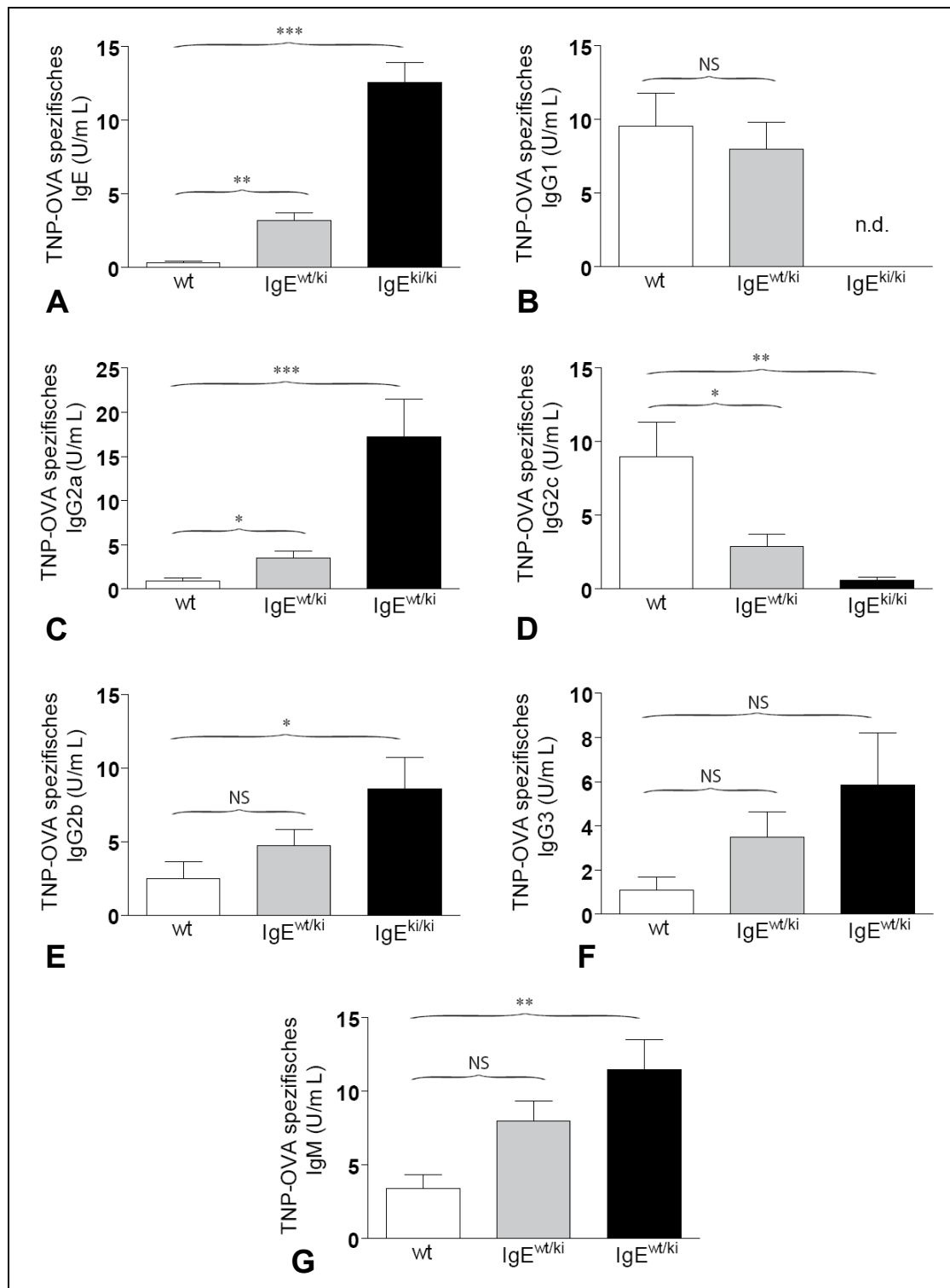


Abb. 4.17 Immunglobulinspiegel im Serum von Wildtyp- (wt), hetero- (IgE^{wt/ki}) und homozygoten (IgE^{ki/ki}) IgE-*knock-in*-Mäusen nach Immunisierung mit TNP-OVA. Die Konzentration von TNP-OVA spezifischem IgE (A), IgG1 (B), IgG2a (C), IgG2c (D), IgG2b (E), IgG3 (F) und IgM (G) wurde durch ELISA ermittelt, wobei für die Messungen ein Serumpool als Standard verwendet wurde. $n_{wt} = 6$, $n_{wt/ki} = 12$, $n_{ki/ki} = 5$; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; NS = nicht signifikant; n.d. = nicht detektierbar

Die Konzentrationsanalyse von TNP-OVA spezifischem IgG2a (Abb. 4.17.C) und IgG2c (Abb. 4.17.E) zeigte eine Besonderheit der IgE-*knock-in*-Mäuse. Diese wurden ursprünglich mit dem BALB/c-Hintergrund generiert und dann auf den C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt.

BALB/c-Mäuse besitzen statt des IgG2c- den IgG2a-Isotyp (Martin, Brady et al. 1998). Entsprechend zeigte sich, dass auch die IgE^{ki/ki}-Mäuse kein spezifisches IgG2c, wohl aber IgG2a besaßen. Im C57BL/6-WT war es genau umgekehrt. Im Serum der IgE^{wt/ki}-Mäuse konnten dagegen beide Isotypen nachgewiesen werden, allerdings in geringerer Menge als im WT (IgG2c) bzw. IgE^{ki/ki} (IgG2a) (Abb. 4.17. C und E). Ursache für diese Besonderheit ist die geringe Wahrscheinlichkeit für ein *crossing over* in der Nähe des veränderten Gens, in diesem Fall also der geringe Abstand zwischen den Genen von IgE und IgG2a bzw. IgG2c. Dadurch ist der BALB/c-Phänotyp bezüglich IgG2a bei den IgE^{ki/ki} erhalten geblieben, während die IgE^{wt/ki} diesbezüglich Chimären sind.

Auch beim TNP-OVA spezifischen IgG2b-Spiegel sind Unterschiede zwischen WT und IgE-*knock-in*-Mäusen zu erkennen. Betrug die Konzentration beim WT 2,5 U/ml, war sie bei den IgE^{wt/ki} mit 4,7 U/ml rund doppelt so hoch, was allerdings keine signifikante Änderung darstellt. Im Gegensatz dazu war der Wert bei den IgE^{ki/ki} mit 8,6 U/ml signifikant erhöht (etwa 3,5 mal höher, Abb. 4.17.D). Im Serum nicht immunisierter Mäuse waren dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von unspezifischem IgG2b zwischen WT- und IgE-*knock-in*-Mäusen zu erkennen (Kapitel 4.1.2). Ein ähnliches Bild zeigte die Analyse des spezifischen IgG3-Spiegels. Er betrug beim WT 1,1 U/ml, war bei den IgE^{wt/ki} 3 mal so hoch und bei den IgE^{ki/ki} mit 5,8 mehr als 5 mal höher (Abb. 4.17.F). Aufgrund der hohen Variabilität der Daten stellt dies jedoch keinen signifikanten Unterschied dar.

Waren bei den nicht immunisierten Mäusen keine Unterschiede im IgM-Spiegel zwischen den drei Genotypen zu erkennen (Kapitel 4.1.2), gilt dies nicht für den TNP-OVA spezifischen IgM-Spiegel. Er betrug beim WT 3,4 U/ml, erhöhte sich bei den IgE^{wt/ki} mit 8,0 um das 2,5 fache und bei den IgE^{ki/ki} mit 11,5 auf das 3,5 fache (Abb. 4.17.G). Allerdings ist nur der Unterschied zwischen WT und IgE^{ki/ki} auch signifikant.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die IgE-*knock-in*-Mäuse auf die Immunisierung mit dem Modell-Antigen TNP-OVA mit einer stark erhöhten IgE-Antwort reagieren. Auch eine leicht erhöhte IgG2b-, IgG3- und IgM-Antwort konnte registriert werden. Demgegenüber fiel die IgG1-Antwort bei den IgE^{wt/ki}-Mäusen geringer aus und fehlte bei den IgE^{ki/ki} vollständig.

4.1.10. Stark erhöhte Expression von spezifischem IgE im Serum von CD23^{-/-} IgE-*knock-in*-Mäusen

Als nächstes wurden CD23-*knock-out*-Mäuse und Kreuzungen dieser mit IgE-*knock-in*-Mäusen mit TNP-OVA immunisiert, um den Einfluss von CD23 auf die IgE-Immunantwort zu untersuchen.

Die Konzentration von TNP-OVA spezifischem IgE im Serum von CD23^{-/-}-Mäusen betrug 1,1 U/ml, in dem von IgE^{wt/ki} war sie mit 7,0 U/ml 6 mal höher und in dem von IgE^{wt/ki} war sie mit 20,3 U/ml 18 mal höher (Abb. 4.18.A). Der Anstieg des TNP-OVA spezifischen IgE-Spiegels der CD23 defizienten IgE-*knock-in*-Mäuse gegenüber den CD23-*knock-out*-Mäusen war damit etwa halb so groß wie der entsprechende Anstieg der IgE-*knock-in*-Mäuse gegenüber dem WT (Kapitel 4.1.9).

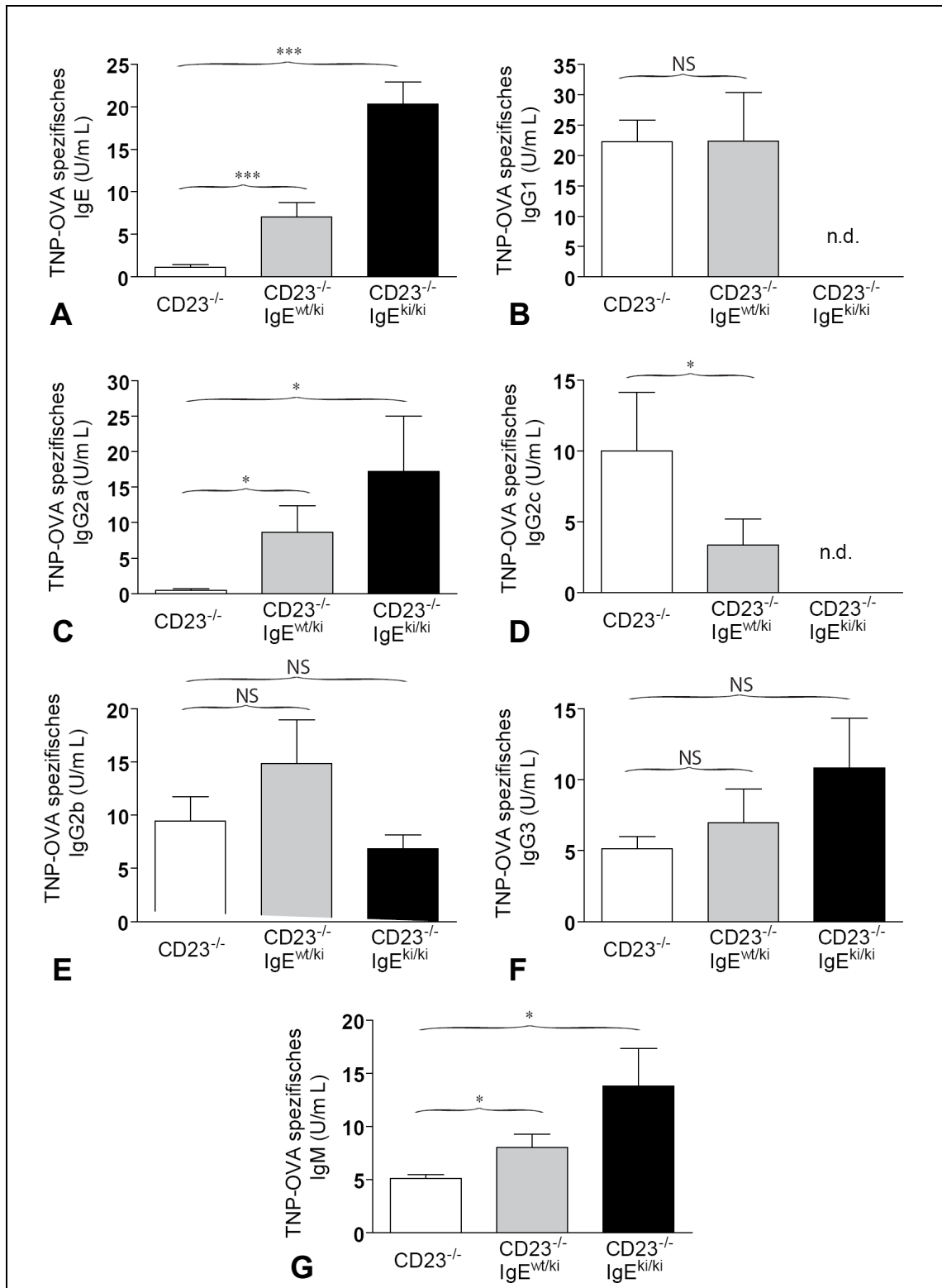


Abb. 4.18 Immunglobulinspiegel im Serum von homozygoten *CD23*^{-/-} und Kreuzungen dieser mit hetero- (*IgE*^{wt/ki}) und homozygoten (*IgE*^{ki/ki}) *IgE*-*knock-in*-Mäusen nach Immunisierung mit TNP-OVA. Die Konzentration von TNP-OVA spezifischem IgE (A), IgG1 (B), IgG2a (C), IgG2c (D), IgG2b (E), IgG3 (F) und IgM (G) wurde durch ELISA ermittelt, wobei für die Messungen ein Serumpool als Standard verwendet wurde. $n_{wt} = 9$, $n_{wt/ki} = 5$, $n_{ki/ki} = 7$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS = nicht signifikant; n.d. = nicht detektierbar

Die Konzentration von TNP-OVA spezifischen IgG1 lag im Serum vom WT und *IgE*^{wt/ki} mit 22,2 bzw. 22,4 U/ml etwa gleich hoch. Die *CD23* kompetenten *IgE*^{wt/ki} zeigten einen Rückgang um

16% gegenüber dem WT, was ebenfalls keiner signifikante Änderung entspricht (Kapitel 4.1.9). Im Serum von CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} konnte kein TNP-OVA spezifisches IgG1 festgestellt werden (Abb. 4.18.B).

Bezüglich TNP-OVA spezifischem IgG2a und IgG2c zeigt sich das gleiche Bild wie in Kapitel 4.1.9 beschrieben: Die homozygoten IgE-*knock-in*-Mäuse exprimieren statt IgG2c den Isotyp IgG2a, während die heterozygoten Mäuse beide Isotypen produzieren (Abb. 4.18.C und D). Bei der Messung der antigenspezifischen IgG2b-Konzentration ergab sich bei den CD23^{-/-} ein Wert von 9,5 U/ml, bei den CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} von 14,9 U/ml und bei den CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} von 6,8 U/ml, was keinem signifikanten Unterschied entspricht (Abb. 4.18.E). Hierin zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu den CD23 kompetenten IgE^{ki/ki}, bei denen der TNP-OVA spezifische IgG2b Spiegel gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht war (Kapitel 4.1.9). Die Analyse der antigenspezifischen IgG3-Konzentration ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Genotypen (Abb. 4.18.F). Verglichen mit den CD23 kompetenten IgE-*knock-in*-Mäusen (Kapitel 4.1.9) weisen die gemessenen Werte aber geringere Differenzen auf. So betrug der Wert bei den CD23^{-/-} 5,2 U/ml, erhöhte sich bei den CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} mit 7,0 U/ml um das 1,3 fache und verdoppelte sich bei den CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} auf 10,8 U/ml.

Abschließend wurde die Konzentration von TNP-OVA spezifischem IgM bestimmt. Sie betrug im Serum der CD23^{-/-} 5,1 U/ml, in dem von CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} war sie mit 8,0 U/ml 1,6 mal höher und in dem von CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} war sie mit 13,8 U/ml 2,7 mal höher (Abb. 4.18.G). Diese Steigerungsraten liegen etwas niedriger als die der CD23 kompetenten IgE-*knock-in*-Mäuse mit dem WT (Kapitel 4.1.9).

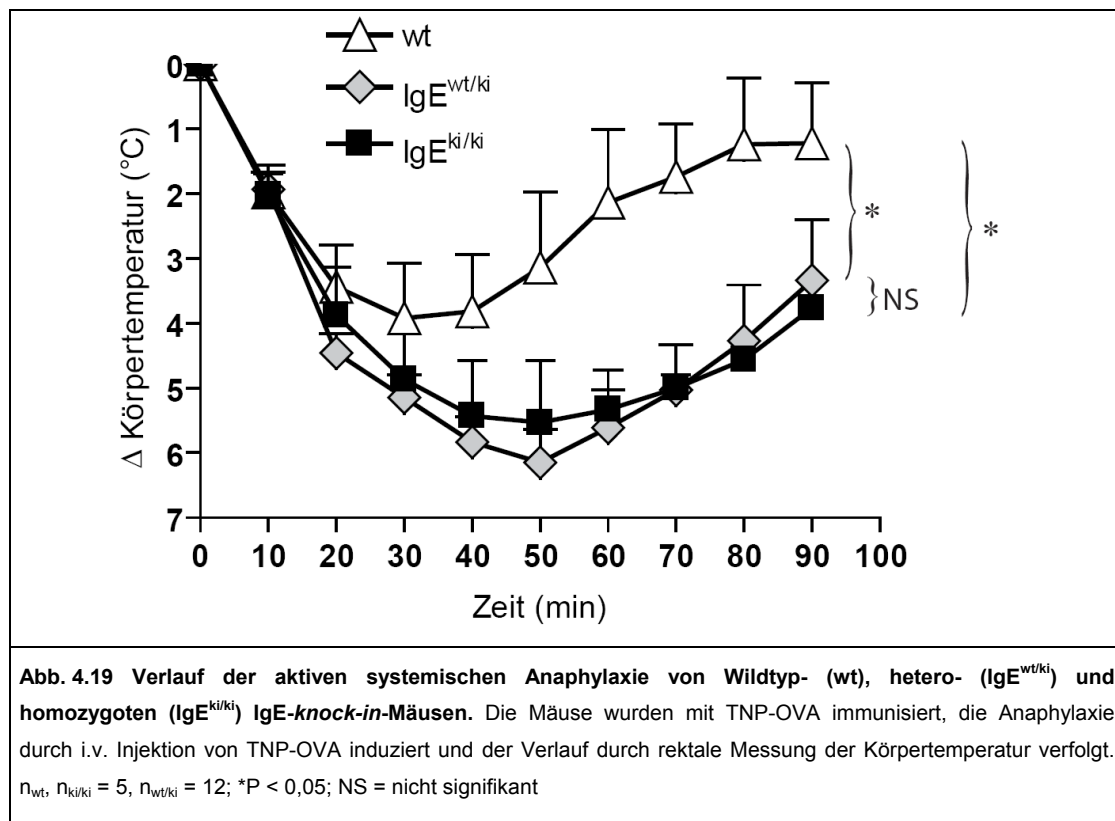
Die Ergebnisse zeigen, dass auch die CD23 defizienten IgE-*knock-in*-Mäuse auf die Immunisierung mit TNP-OVA mit einer stark erhöhten IgE-Antwort reagierten. Ebenso wie bei den CD23 kompetenten IgE-*knock-in*-Mäusen, konnte auch hier eine leicht erhöhte IgM-Antwort festgestellt werden. Demgegenüber veränderte sich die IgG1-Antwort bei den CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} gegenüber den CD23^{-/-} nicht und fehlte bei den CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} vollständig. Auffällig ist außerdem, dass das Fehlen von CD23 die in den IgE-*knock-in*-Mäusen beobachtete Überexpression von IgG2b verhinderte und von IgG3 verringerte (vgl. Kapitel 4.1.9).

4.1.11. Verstärkte aktive systemische Anaphylaxie in IgE-*knock-in*-Mäusen

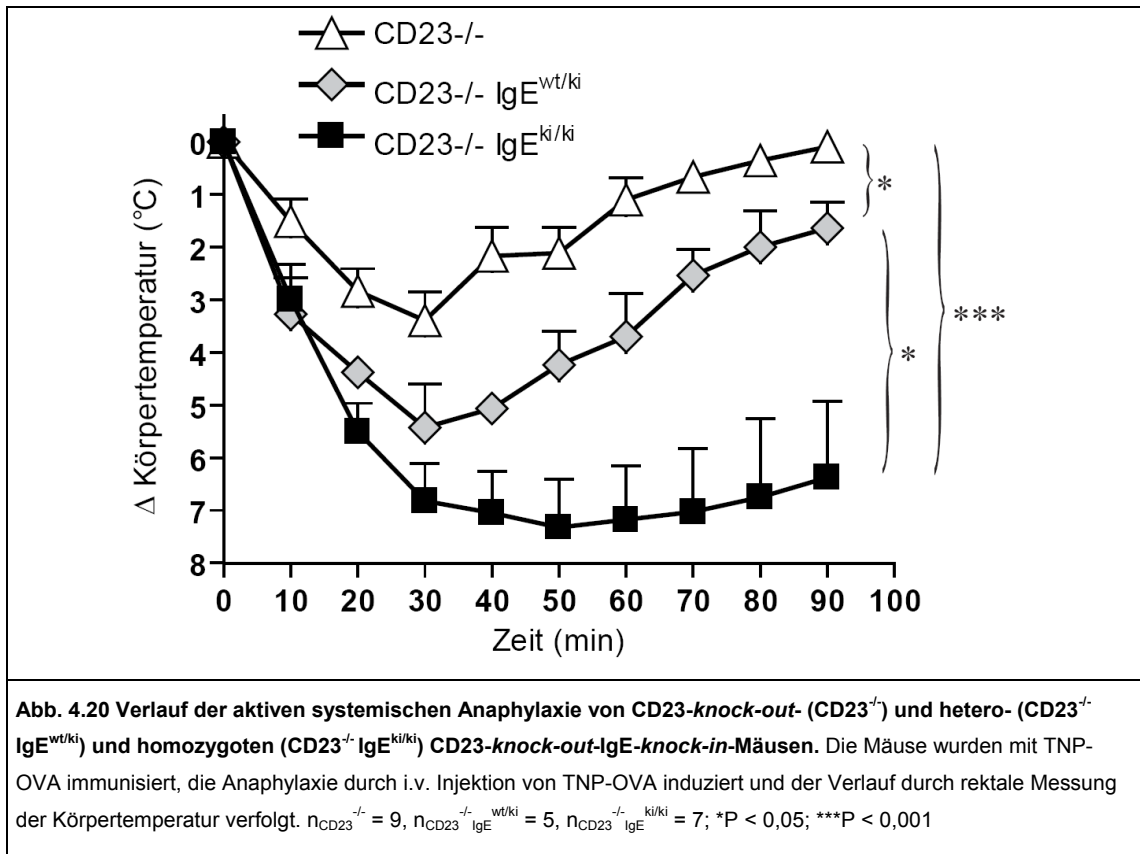
Eine weitere zu beantwortende Frage war, ob der nach der Immunisierung mit TNP-OVA beobachtete hohe Spiegel von polyklonalem antigenspezifischem IgE in den IgE-*knock-in*-Mäusen zu einer Veränderung der aktiven systemischen Anaphylaxie führt. Die Anaphylaxie wurde in den etwa drei Monate alten Mäusen entsprechend Kapitel 3.4.2 ausgelöst und der Verlauf durch Messung der Körpertemperatur dokumentiert.

In Abb. 4.19. ist zu erkennen, dass der Rückgang der Körpertemperatur bei den IgE^{wt/ki} und IgE^{ki/ki} stärker und länger anhaltend war als beim WT. Der Temperaturverlauf der beiden IgE-*knock-in*-Genotypen unterschied sich dabei kaum voneinander. Der maximale Temperaturrückgang betrug beim WT rund 4 °C, beim IgE^{wt/ki} 6 und beim IgE^{ki/ki} 5,5 °C. Ein

deutlicher Unterschied zwischen den *Knock-in*-Genotypen zeigte sich jedoch in der Sterberate. So starben 40% aller $IgE^{ki/ki}$ -Mäuse, aber keine $IgE^{wt/ki}$ - und wt-Mäuse (Abb. 4.21.B).

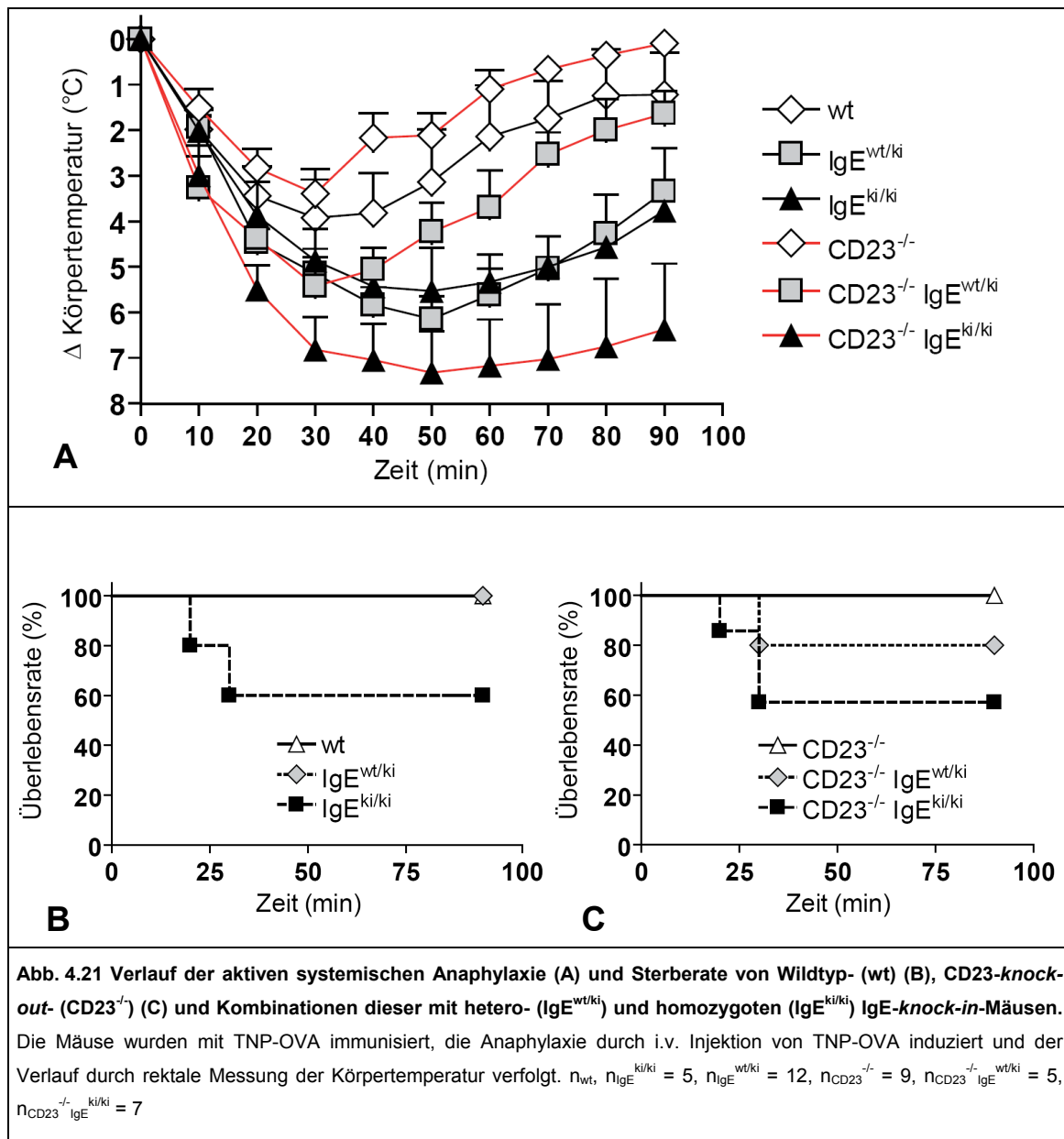


Um den Einfluss von CD23 auf die aktive systemische Anaphylaxie zu klären, wurde das gleiche Experiment mit CD23 defizienten *IgE-knock-in*-Mäusen durchgeführt (Abb. 4.20). Hier zeigten die $CD23^{-/-}$ -Mäuse mit maximal 3 °C den geringsten Temperaturabfall und die schnellste Erholung. Deutliche Unterschiede ergaben sich im Temperaturverlauf von $CD23^{-/-}$ $IgE^{wt/ki}$ und $CD23^{-/-}$ $IgE^{ki/ki}$. So hatten die $CD23^{-/-}$ $IgE^{wt/ki}$ -Mäuse einen maximalen Abfall der Körpertemperatur von 5,4 °C, konnten sich aber relativ rasch wieder erholen. Bei den $CD23^{-/-}$ $IgE^{ki/ki}$ -Mäusen konnte ein Temperaturabfall von über 7 °C und eine nur sehr langsame Erholung beobachtet werden. Auch in den Sterberaten unterscheiden sich die drei Genotypen. Von den $CD23^{-/-}$ starben keine Tiere, während 20% der $CD23^{-/-}$ $IgE^{wt/ki}$ und 43% der $CD23^{-/-}$ $IgE^{ki/ki}$ nicht überlebten (Abb. 4.21.C).



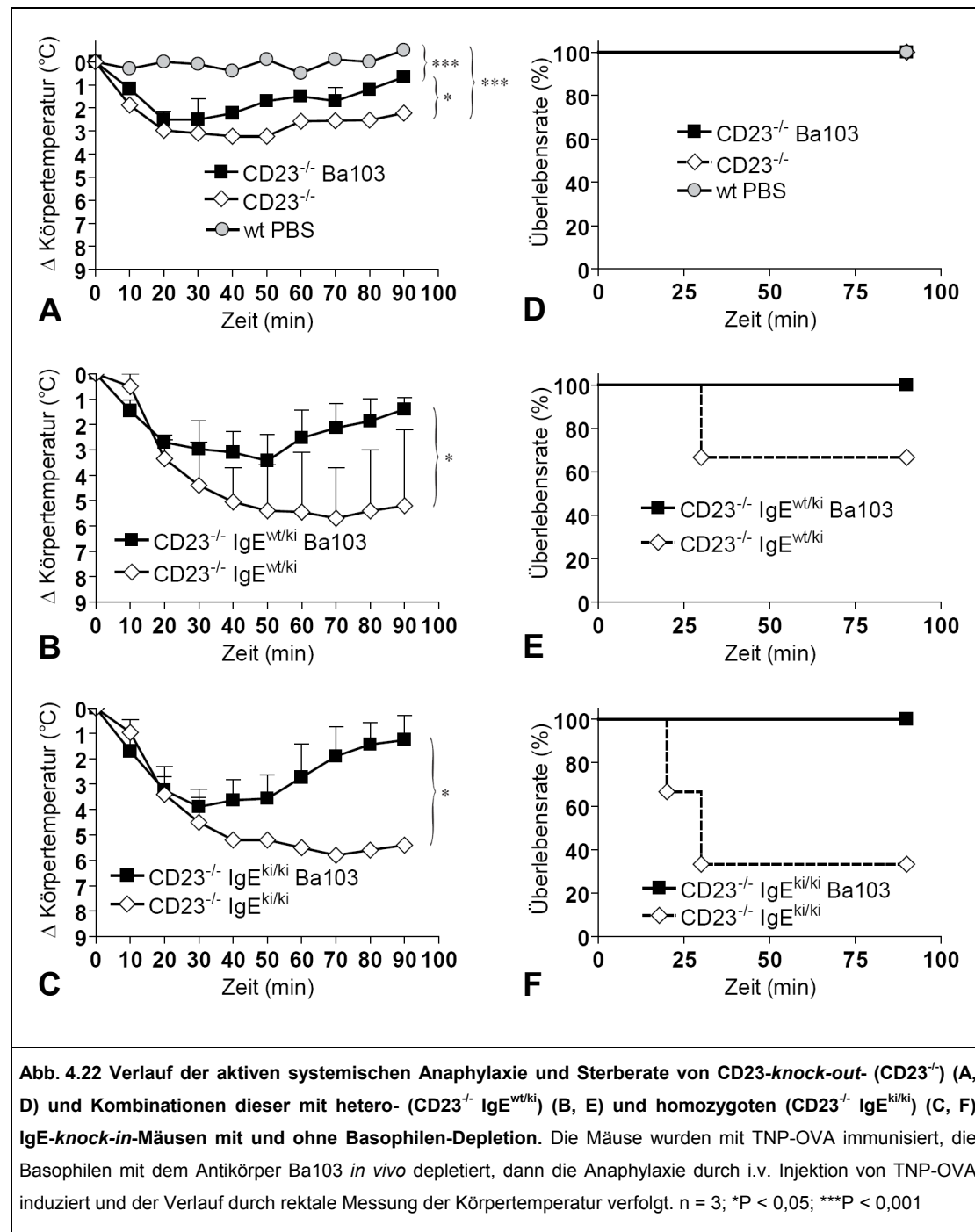
Vergleicht man den Temperaturverlauf aller sechs Genotypen miteinander zeigen sich deutliche Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten (Abb. 4.21.A): Der Temperaturabfall bei CD23^{-/-} war etwas geringer als beim WT, ansonsten verlaufen beide Kurven nahezu identisch. Vergleicht man CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} mit IgE^{wt/ki}, war bei letzterer ein stärkerer Temperaturrückgang zu beobachten. Nach dem Temperaturtiefpunkt kam es jedoch bei beiden zu einer raschen Erholung. Der Rückgang der Körpertemperatur war bei CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} am größten und die Erholung am langsamsten. Doch auch die IgE^{ki/ki} zeigten einen starken Temperaturabfall und eine langsame Erholung. Beide Genotypen hatten mit rund 40% die höchste Sterberate. Auffällig ist auch, dass von den heterozygoten IgE-*knock-in*-Mäusen nur die mit einer CD23-Depletion mit einer Rate von 20% starben (Abb. 4.21.B und C).

Die stärkste aktive systemische Anaphylaxie ließ sich also in den homozygoten IgE-*knock-in*-Mäusen beobachten. Diese zeichnen sich durch einen hohen spezifischen IgE-Spiegel und der Abwesenheit von IgG1 aus. Die geringste Anaphylaxie konnte dagegen im WT festgestellt werden, der nur wenig spezifisches IgE aber viel IgG1 besitzt. Zur Induktion der aktiven systemischen Anaphylaxie war somit das TNP-OVA spezifische IgE, nicht das IgG1 am wichtigsten. Somit lässt sich feststellen, dass die Hochregulation einer polyklonalen IgE-Antwort unmittelbar zu einer verstärkten IgE-vermittelten systemischen Anaphylaxie führte. Was die Bedeutung von CD23 auf die Anaphylaxie anbetrifft, so scheint eine CD23-Depletion diese bei Anwesenheit von IgG1 zu mildern, während es sie bei dessen Abwesenheit verschärft.



4.1.12. Ein erhöhter spezifischer IgE-Spiegel aktiviert Basophile in der aktiven systemischen Anaphylaxie

Um zu klären, ob Mastzellen oder Basophile die beobachtete aktive systemische Anaphylaxie (ASA) vermitteln, wurden die mit TNP-OVA immunisierten rund drei Monate alten Mäuse *in vivo* mit dem Antikörper Ba103 (anti-CD203R) behandelt. Dies führt nur zu einer Depletion der Basophilen, nicht aber der Mastzellen (Obata, Mukai et al. 2007). Anschließend wurde, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, eine Anaphylaxie ausgelöst und der Verlauf der Körpertemperatur gemessen. Hierbei wurden mit Ba103 behandelte $CD23^{-/-}$ - IgE -knock-in-Mäuse mit unbehandelten Mäusen verglichen (Abb. 4.22).



Die Depletion der Basophilen führte bei den CD23^{-/-}-Mäusen zu einem geringfügig niedrigeren Temperaturrückgang und einer rascheren Erholung als bei den unbehandelten Tieren (Abb. 4.22.A). Bei den mit Ba103 behandelten CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} und CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} war der Abfall der Körpertemperatur deutlich niedriger als bei den unbehandelten Mäusen (rund 2 °C weniger). Auch konnten sich die Tiere wesentlich schneller erholen (Abb. 4.22.B und C). Auf die Sterberate hatte die Basophilendepletion ebenfalls starke Auswirkungen. Sie betrug bei den unbehandelten CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} 67%, während keines der behandelten Tiere starb (Abb. 4.22.F). Bei den unbehandelten CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} betrug sie 33%, auch hier starb keines der mit dem Antikörper behandelten Mäuse (Abb. 4.22.E). Daraus lässt sich schließen, dass eine aktive

systemische Anaphylaxie, bei einem stark erhöhten Spiegel von spezifischem IgE, in erster Linie durch Basophile und weniger durch Mastzellen aktiviert wird.

4.1.13. Die Aktivierung von Mastzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion einer IgE-vermittelten aktiven systemischen Anaphylaxie in IgE-*knock-in* Mäusen

Um zu überprüfen, ob neben den Basophilen auch Mastzellen bei der Induktion einer IgE-vermittelten aktiven systemischen Anaphylaxie eine Rolle spielen, wurde die Konzentration von MMCP1 (mouse mast cell protease 1) im Serum anaphylaktischer Mäuse gemessen. Dieses Enzym ist spezifisch für eine IgE-vermittelte ASA und wird nur in Mastzellen, nicht aber in Basophilen produziert.

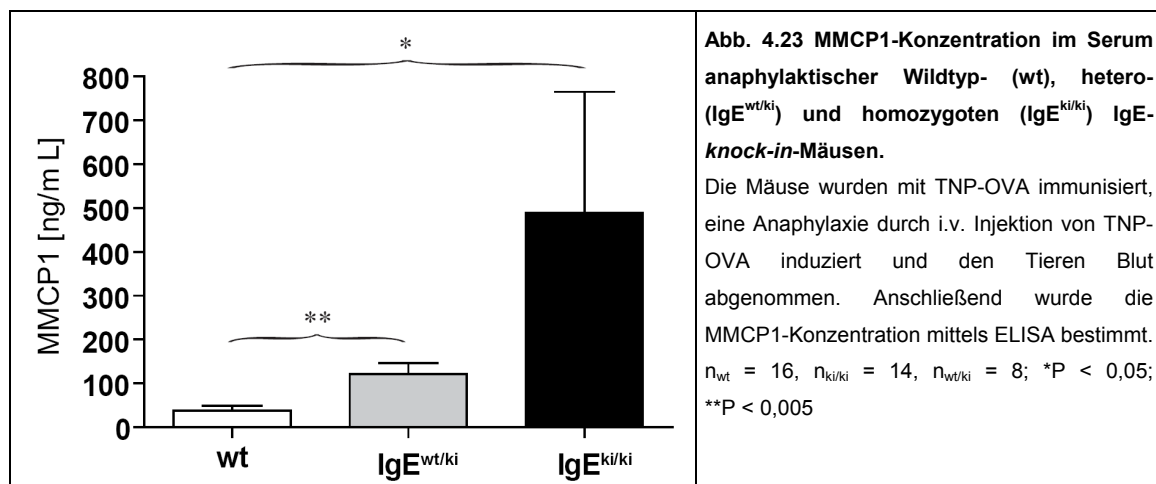
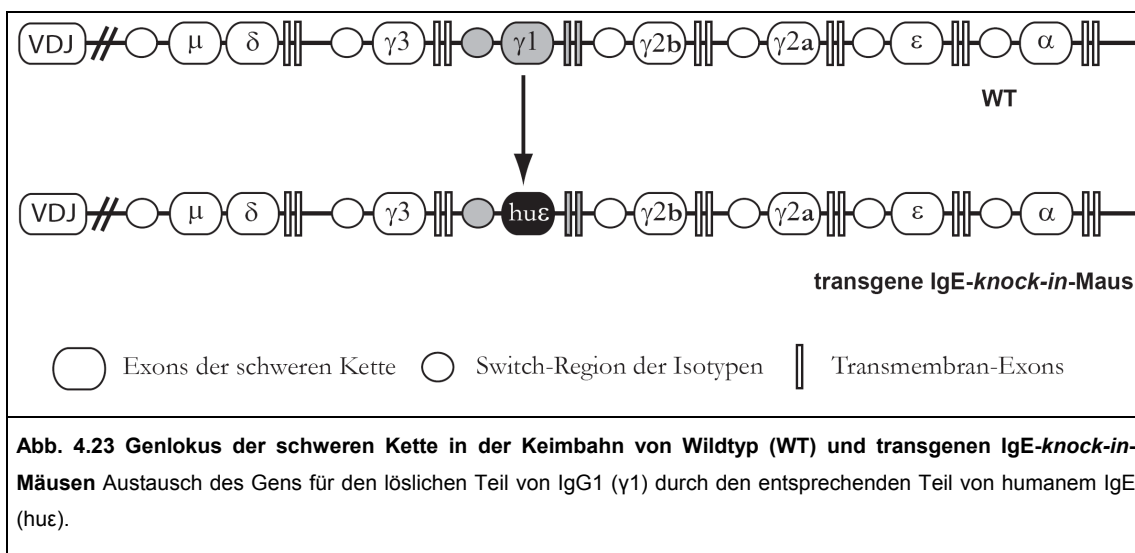


Abb. 4.23 zeigt im Serum von IgE^{ki/ki} mit 490 ng/ml die höchste MMCP1-Konzentration. Sie ist zwölf mal höher als die des WT mit 40 ng/ml. Aber auch in den IgE^{wt/ki} lag sie mit 120 ng/ml noch drei mal höher als im WT. Die Konzentration von MMCP1 korreliert also mit der Stärke der Anaphylaxie und deutet auf einen bedeutenden Beitrag der Mastzelldegranulierung bei der Induktion einer IgE-vermittelten ASA auch in IgE-*knock-in*-Mäusen hin.

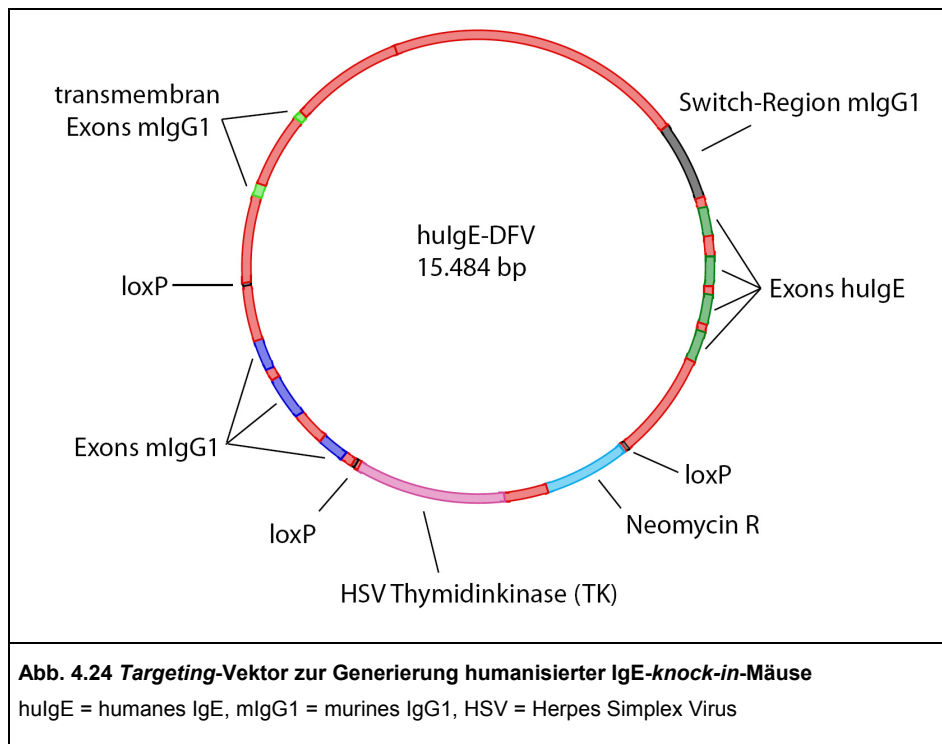
4.2. Generierung transgener Knock-in-Mäuse mit Überexpression von humanem IgE

4.2.1. Strategie zur Generierung humanisierter IgE-knock-in-Mäuse

Zur Generierung einer transgenen *Knock-in*-Maus, die eine Überexpression von humanem IgE (hulgE) aufweisen sollte, wurde das Gen für den löslichen Teil der schweren Kette von IgG1 durch den entsprechenden Teil von humanem IgE ersetzt. Das humane IgE liegt somit zwischen der IgG1- *class-switch*-Region und den IgG1-Transmembran-Exons (Abb. 4.23). Der Genlocus der schweren Kette ähnelt somit dem der IgE-*knock-in*-Mäuse (Kapitel 4.1.1). Wie bei diesen, sollte auch hier der Regulationsmechanismus von IgG1 zu IgE transferiert werden, um eine Überexpression von humanem IgE zu ermöglichen.



Als *targeting*-Vektor diente der Vektor hulgE-DFV (Abb. 4.24) (Dr. Philipp Yu, Universität Marburg). Die Exons, die den löslichen Teil von humanem IgE codieren, sind am 5'-Ende von der *class-switch*-Region und am 3'-Ende von den Exons des murinen IgG1 (mlgG1) flankiert, um eine homologe Rekombination in die genomische DNA der ES-Zellen zu ermöglichen. Zwischen den hulgE- und mlgG1-Exons liegt die Selektionskassette mit dem Resistenzgen gegen Neomycin und dem Gen für die Thymidinkinase (TK) aus dem Herpes Simplex Virus (HSV). Die Selektionskassette wird von zwei loxP-Stellen eingerahmt. Hierbei handelt es sich um Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase, die in der Lage ist den Bereich zwischen zwei loxP-Stellen mit der gleichen Orientierung zu entfernen. Eine weitere loxP-Stelle befindet sich zwischen den mlgG1-Exons für den löslichen Teil und der Transmembrandomäne von mlgG1.



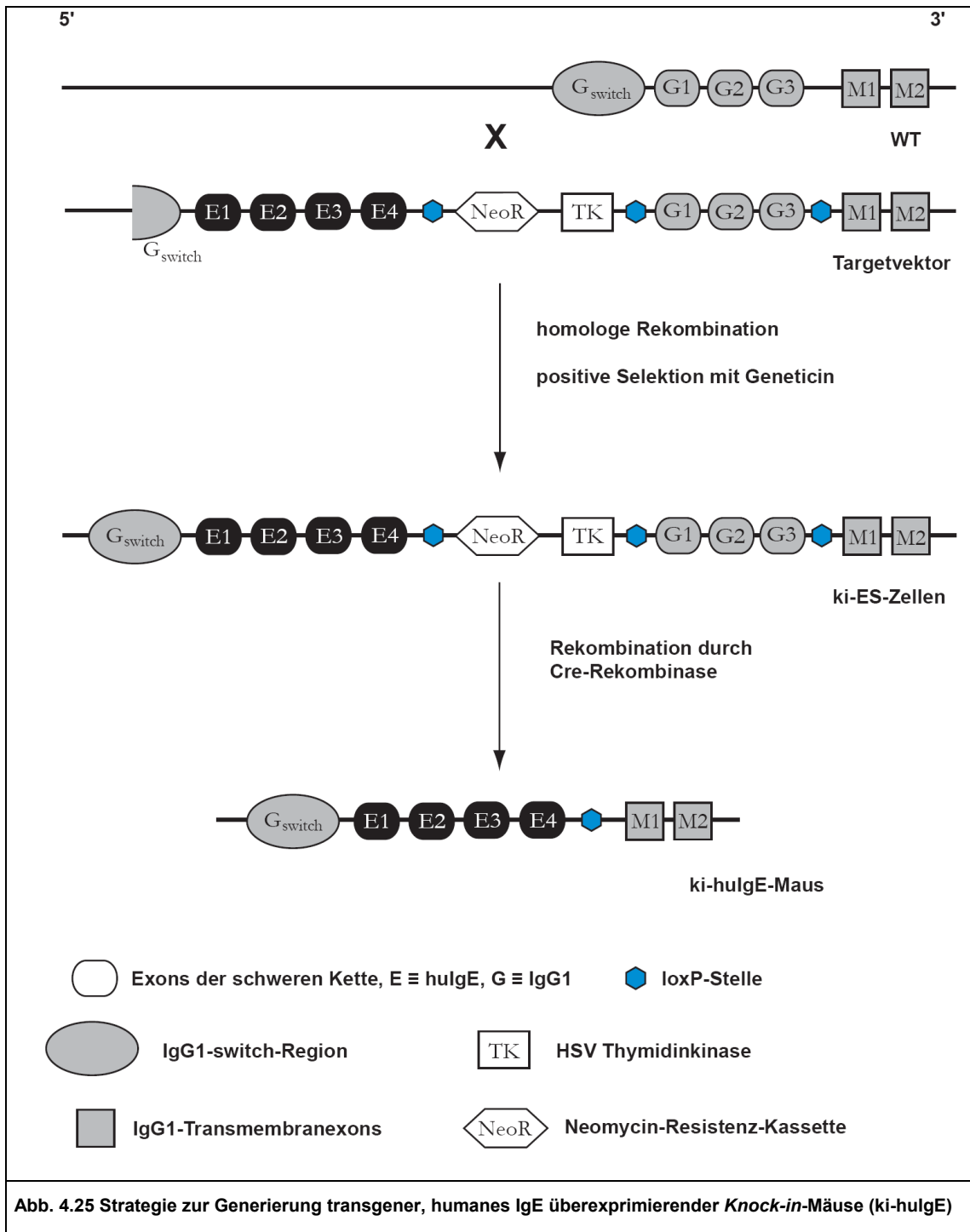
Zur Generierung der humanisierten IgE-knock-in-Mäuse (ki-hulgE) wurde folgende Strategie angewendet (Abb. 4.25): Zunächst werden embryonale Stammzellen mit dem linearisierten Targetvektor transfiziert. Aufgrund der homologen Bereiche des *targeting*-Vektors kommt es zur homologen Rekombination mit der genomischen DNA der ES-Zellen. Um die Zellen zu identifizieren, bei denen der Targetvektor erfolgreich ins Genom eingebaut wurde, folgt eine Selektion mit Geneticin. Diese Behandlung überleben nur ES-Zellen mit einem Neomycin-Resistenzgen. Die ki-hulgE-ES-Zellen werden anschließend in Blastozysten injiziert und diese in den Uterus scheinträchtiger Mäuse implantiert. Die daraus resultierenden chimären Mäuse werden anschließend mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen verpaart. Haben sich ki-hulgE-ES-Zellen zu Keimzellen entwickelt, so entfernt die Cre-Rekombinase in den frühen Embryonalzellen die zwischen den loxP-Stellen liegende Selektionskassette und mlgG1-Exons. Auf diese Weise gehen aus einer solchen Verpaarung ki-hulgE-Mäuse hervor.

4.2.2. Generierung transgener ki-hulgE-ES-Zellen

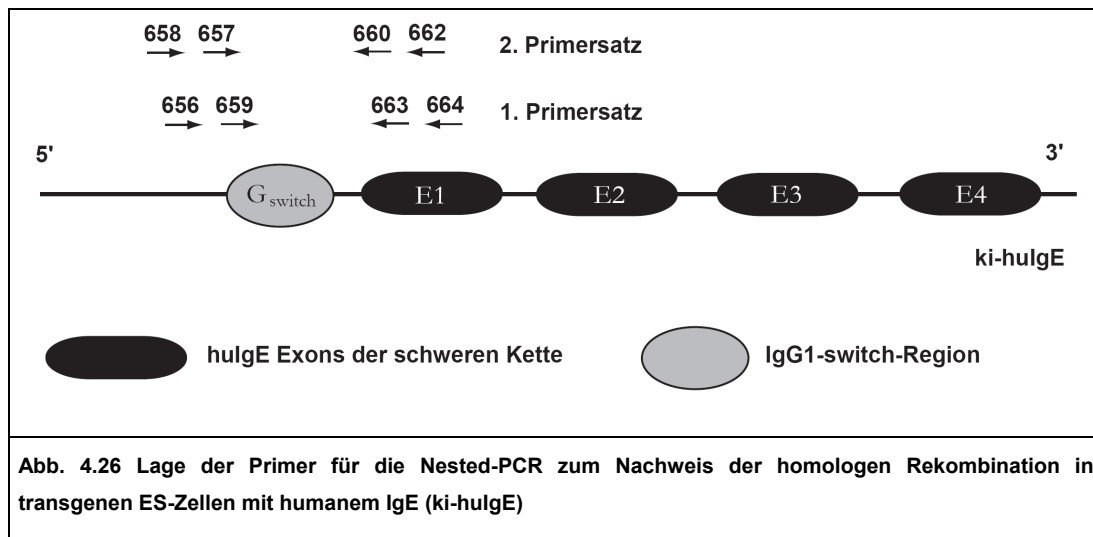
Die ES-Zellen wurden mit dem durch XhoI linearisierten *targeting*-Vektor hulgE-DFV transfiziert, die veränderten ES-Zellen durch Zugabe von Geneticin selektiert, die überlebenden Klone isoliert und die homologe Rekombination mit Hilfe einer Nested-PCR nachgewiesen (siehe Kapitel 3.3.4 bis 3.3.7).

Insgesamt wurden 1130 Zellklone isoliert. Das Zelllysate von je fünf Klonen wurde in einem PCR-Ansatz analysiert. Die Lage der Primer ist in Abb. 4.26 zu sehen. Sie wurden so gewählt, dass die 5'-Primer außerhalb des Vektorbereichs binden und die 3'-Primer an die hulgE-Exons. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass nur die Insertion durch homologe Rekombination ein positives Signal liefert, nicht der zufällige Einbau an einer beliebigen Stelle des Genoms. Für die

Analyse der Pools wurde der 1. Primersatz verwendet. Insgesamt konnten fünf positive Pools identifiziert werden. Abb. 4.26.A zeigt drei davon.

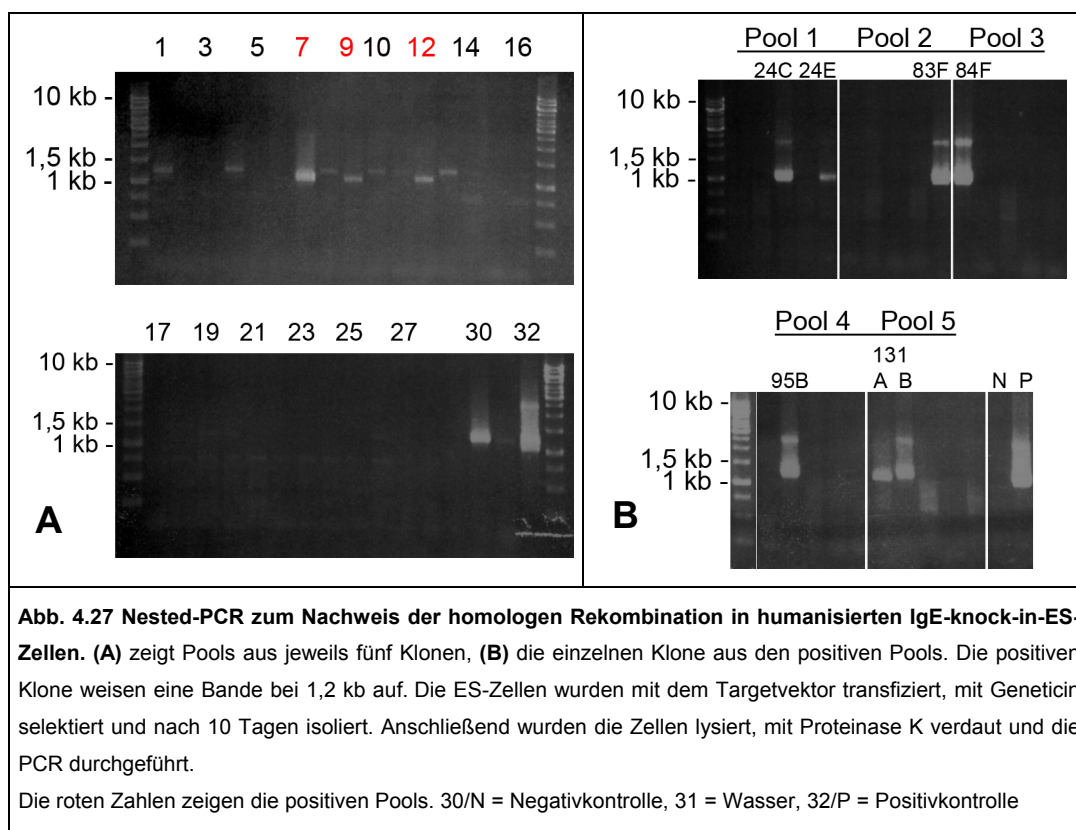


Zur Identifikation der positiven Zellklone innerhalb eines Pools wurde eine weitere Nested-PCR mit den Zelllysaten der einzelnen Klone durchgeführt. Da der 1. Primersatz auch unspezifische Banden zeigte, wurde die Nested-PCR mit einem 2. Primersatz wiederholt. Hierbei konnten sieben positive Klone identifiziert werden (Abb. 4.27.B).

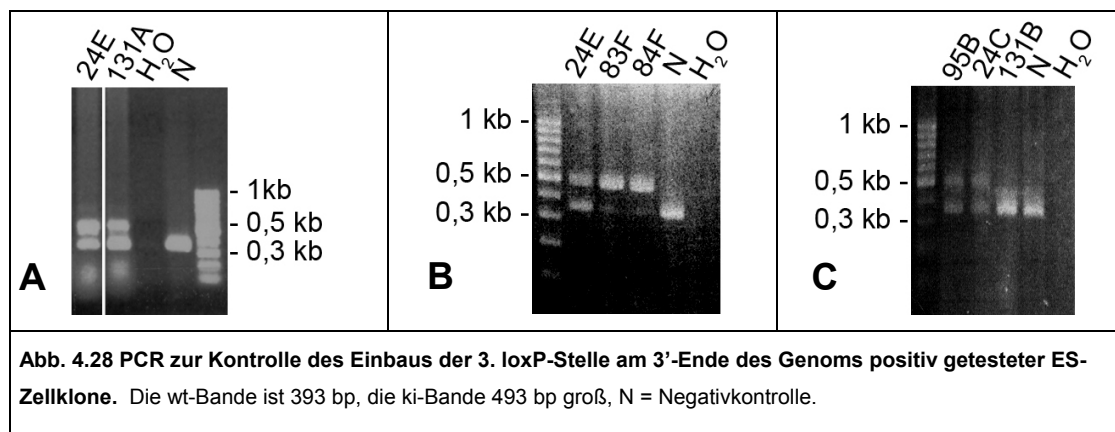


Für die Nested-PCR wurden folgende Programme verwendet:

			1. PCR	2. PCR
1. Initialisierung :	4 min	94°C		
2. Denaturierung:	35 sec	94°C	} 20 Zyklen	} 35 Zyklen
3. Primer annealing:	35 sec	57°C		
4. Elongation:	80 sec	72°C		
5. Lücken auffüllen	5 min	72°C		

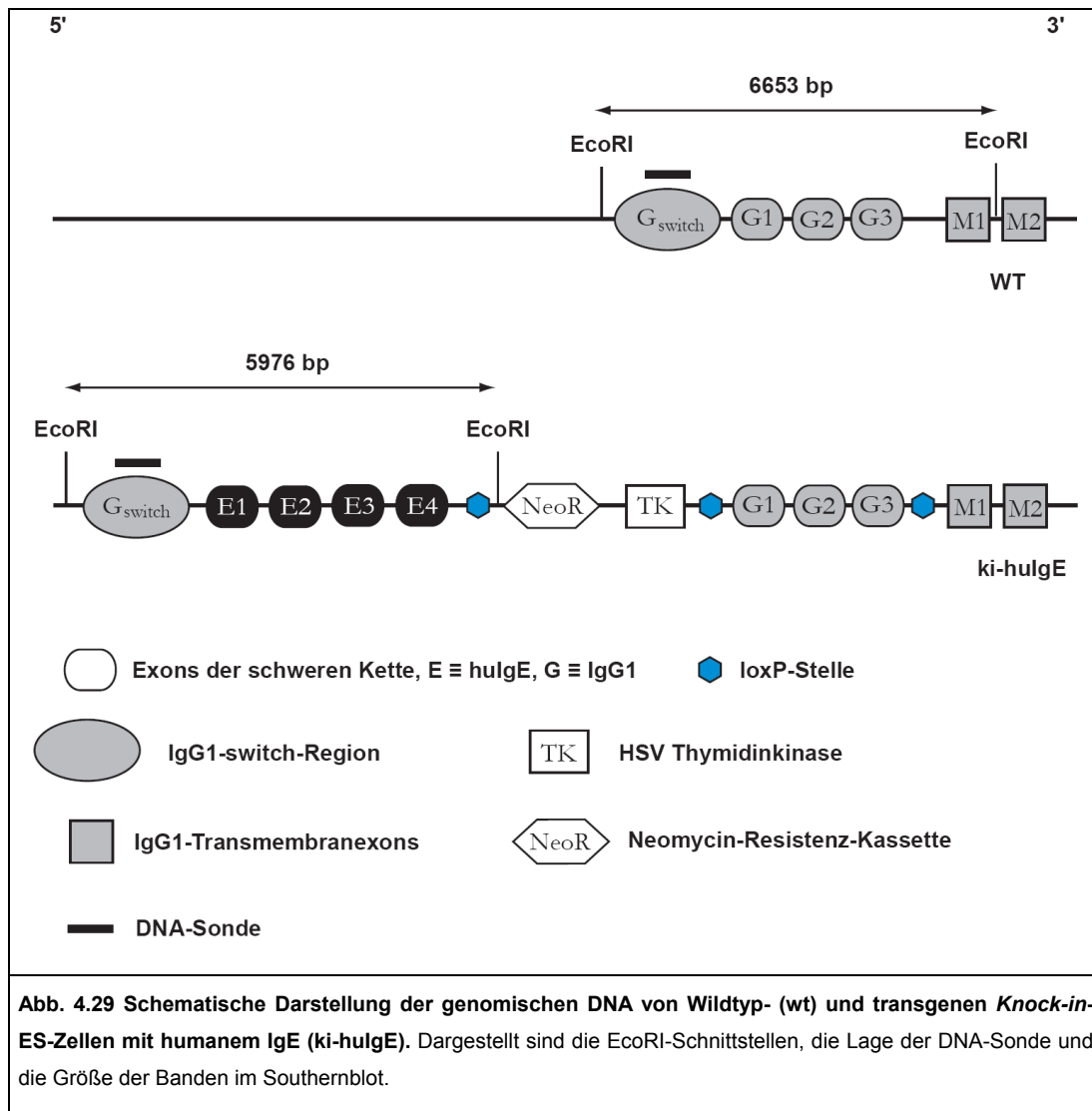


Da die 3. loxP-Stelle am 3'-Ende für die *Knock-in*-Strategie von entscheidender Bedeutung ist, wurde mit Hilfe einer PCR überprüft, ob diese durch homologe Rekombination ins Genom der ES-Zellen eingebaut wurde. Weil der Targetvektor mit großer Wahrscheinlichkeit nur in ein Chromosom inseriert, müssen die positiven Klone eine wt-Bande (393 bp) und eine ki-Bande (493 bp) aufweisen. Die Klone bei denen die homologe Rekombination vor der 3. loxP-Stelle abgebrochen wurde, zeigen dagegen nur die wt-Bande. Dies ist nur bei Klon 131B der Fall (Abb. 4.28.C). Somit konnten sechs ES-Zellklone identifiziert werden, bei denen der *targeting*-Vektor, einschließlich der 3. loxP-Stelle, durch homologe Rekombination vollständig ins Genom integriert wurde: 24C, 24E, 83F, 84F, 95B und 131A (Abb. 4.28.A, B, C).

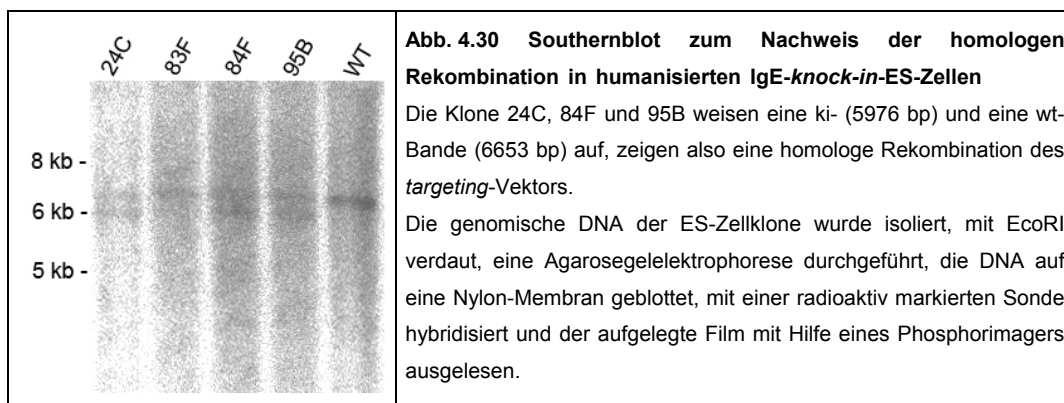


Um sicher zu stellen, dass es zu einer fehlerfreien Integration des *targeting*-Vektors ins Genom der durch PCR positiv getesteten ki-hulgE-ES-Zellklone gekommen ist, wurde dies bei vier von ihnen mittels Southernblot überprüft. Dazu wurde die genomische DNA aus den Klonen isoliert und mit *EcoRI* verdaut. Die Restriktionsendonuklease wurde so gewählt, dass sich eine Schnittstelle außerhalb und eine innerhalb des Vektors befindet. Dies gewährleistet, dass nur ein ES-Klon mit einem homolog rekombinierten *targeting*-Vektor eine ki-Bande definierter Größe bildet. Außerdem müssen wt- und ki-Bande gut unterscheidbare Größen aufweisen (Abb. 4.29).

Die DNA-Sonde „SW3“ (483 bp) wurde durch PCR hergestellt und radioaktiv markiert (siehe Kapitel 3.5.8 bis 3.5.10). Sie bindet an der *class-switch*-Region von IgG1, außerhalb des *targeting*-Vektors. Dies garantiert, dass an einer zufälligen Stelle inserierte Vektoren nicht markiert werden. ES-Klone mit einer korrekten Integration des Vektors ins Genom zeigen somit eine wt-Bande mit einer Größe von 6653 bp und eine ki-Bande von 5976 bp (bei heterozygoter Integration).



Aus Abb. 4.30 geht hervor, dass drei der vier untersuchten ki-hulgE-ES-Zellklone eine korrekte homologe Rekombination des *targeting*-Vektors aufweisen: 24C, 84F und 95B. Bei Klon 83F ist dagegen keine ki-Bande zu erkennen.



4.2.3. Blastozysteninjektion und Entstehung chimärer Mäuse

Die humanisierten IgE-*knock-in*-ES-Zellen von Klon 95B wurden zur Blastozysteninjektion zu Prof. Lars Nitschke (Universität Erlangen) geschickt (siehe Kapitel 3.3.9). Aus der ersten Injektion entwickelten sich zwei Männchen mit einem Chimärismus von 10% bzw. 60% und ein Weibchen mit 30%. Der Chimärismus lässt sich anhand der Fellfarbe abschätzen, da die ES-Zellen von BALB/c-Mäusen stammen und die Blastozysten von C57BL/6. Je höher der Anteil weißen Fells ist, desto höher ist auch der Chimärismus.

Nach der Geschlechtsreife wurden die chimären Mäuse mit BALB/c-Cre-Deleter-Mäusen (Schwenk, Baron et al. 1995) verpaart, um die Selektionskassette und die mIgG1-Exons zu entfernen (siehe Abb. 4.25). Die braune Fellfarbe der Nachkommen zeigte jedoch, dass sich die ki-hulgE-ES-Zellen nicht zu Keimzellen entwickelt hatten. Aus einer zweiten Blastozysteninjektion mit ES-Zellen des Klons 24C entwickelten sich zwei hochchimäre Männchen. Aus Verpaarungen mit BALB/c-Cre-Deleter-Mäusen gingen aber erneut nur Mäuse mit brauner Fellfarbe hervor. Folglich konnten sich auch die ES-Zellen aus Klon 24C nicht zu Keimzellen entwickeln.

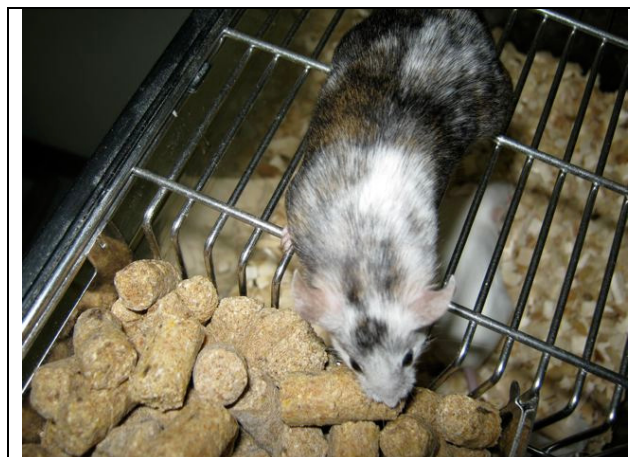


Abb. 4.31 Chimäre IgE-*knock-in*-Maus

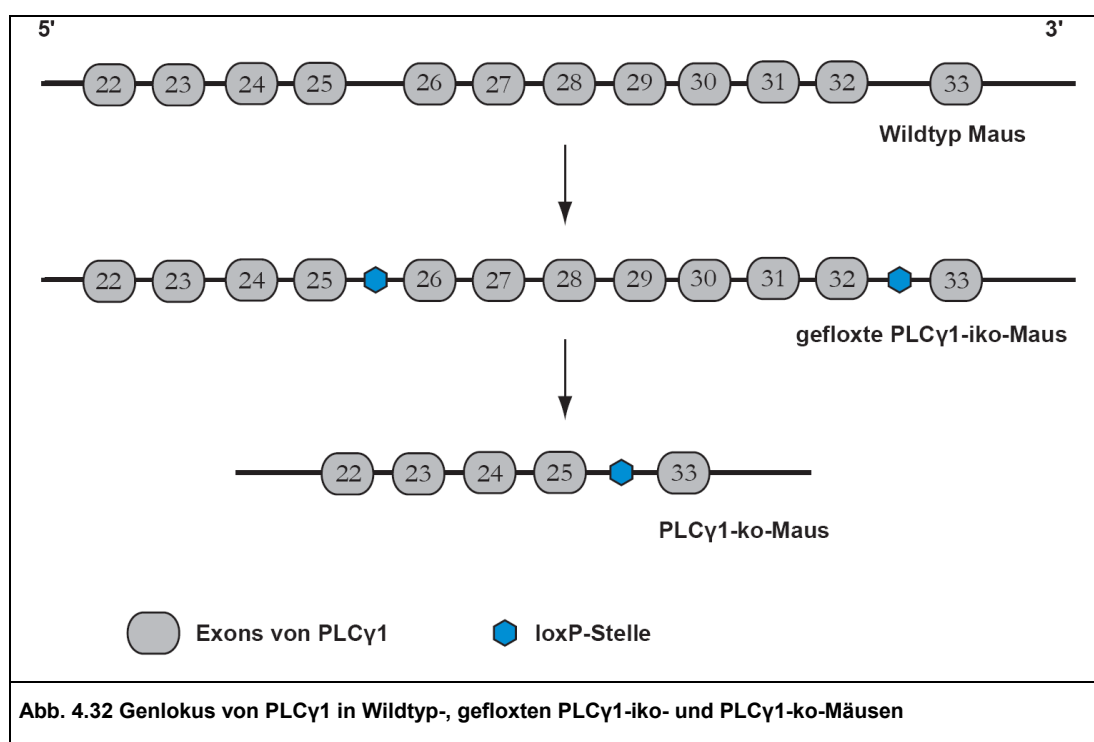
4.3. Generierung von Mäusen mit induzierbarem Knock-out von PLCy1

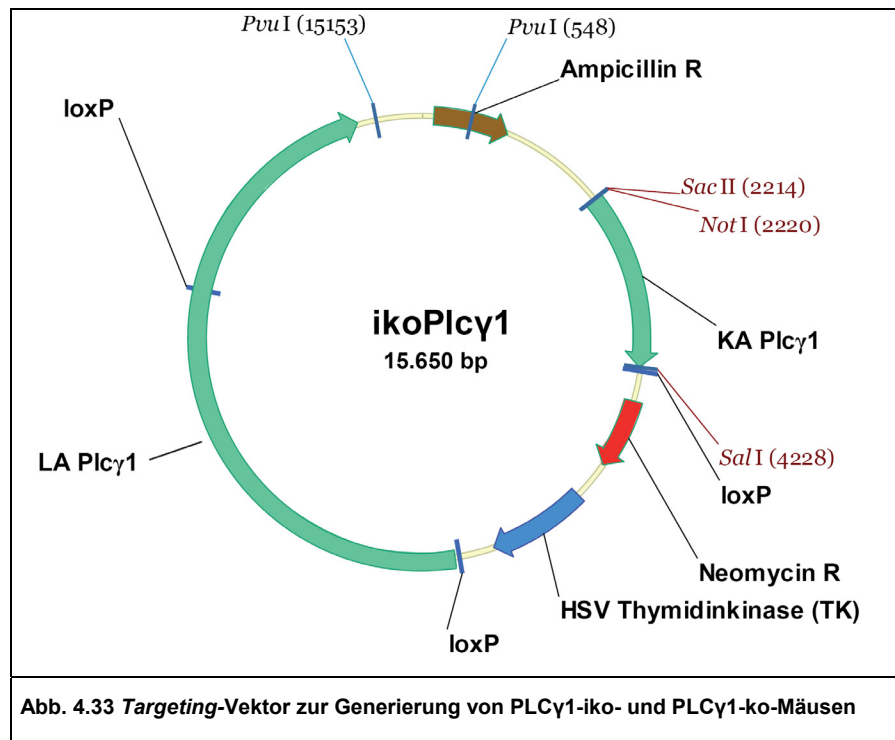
4.2.1. Strategie zur Generierung von Mäusen mit induzierbarem Knock-out von PLCy1 (PLCy1-iko-Mäuse)

Wie in Kapitel 1.3.1 erwähnt ist die Phospholipase-Cy1 (PLCy1) für die intrazelluläre Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren und dem TCR von essenzieller Bedeutung. Dies hat zur Folge, dass ein konditioneller *Knock-out* zum Absterben der Embryonen am Tag 9 führt. Um dieses Problem zu umgehen, sollte eine Maus mit induzierbarem *Knock-out* generiert werden. Hierzu sollte eine loxP-Stelle zwischen Exon 25 und 26 sowie zwischen Exon 32 und 33

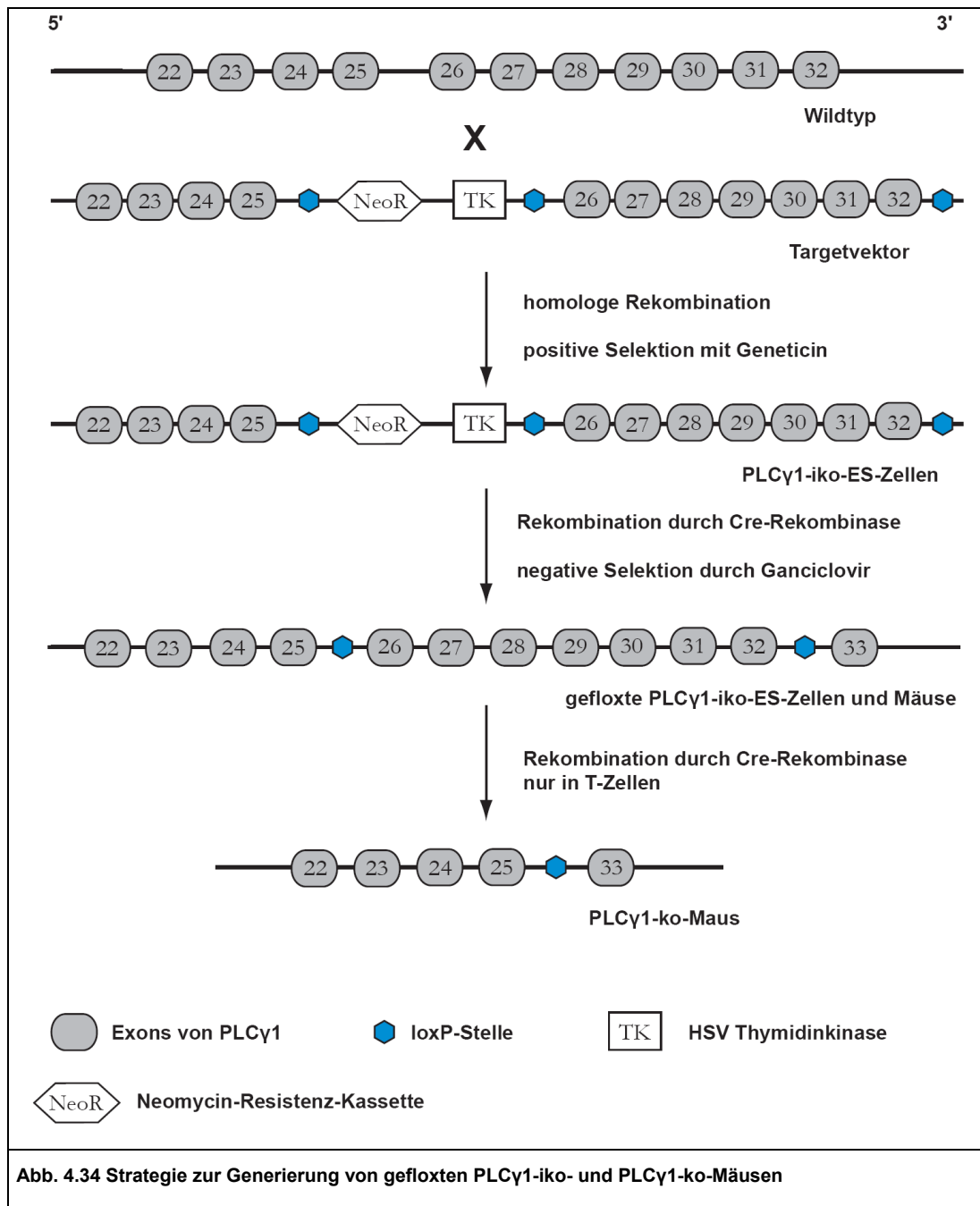
eingeführt werden (Abb. 4.31). Aus einer solchen geflochtenen PLC γ 1-iko-Maus lassen sich anschließend durch eine Deletion der Exons 26 bis 32 gewebsspezifische PLC γ 1-ko-Mäuse generieren (Abb. 4.31).

Als *targeting*-Vektor wurde der Vektor ikoPLC γ 1 verwendet (Abb. 4.32). Dieser besteht aus einem kurzen Arm (KA) der Exons 22 bis 25 und einem langen Arm (LA) der Exons 26 bis 32 von PLC γ 1. Zwischen den Exons 32 und 33 wurden eine loxP-Stelle eingefügt. Zwischen langem und kurzem Arm liegt eine von loxP-Stellen eingerahmte Selektionskassette (Neo-TK-Kassette) mit dem Resistenzgen gegen Neomycin und dem Gen der HSV-Thymidinkinase. Der kurze Arm und die Bereiche des langen Arms hinter der 3. loxP-Stelle am 3'-Ende ermöglichen die homologe Rekombination des *targeting*-Vektors ins Genom der ES-Zellen. Zur Selektion in Bakterien enthält der Vektor außerdem noch eine Resistenzkassette gegen Ampicillin.



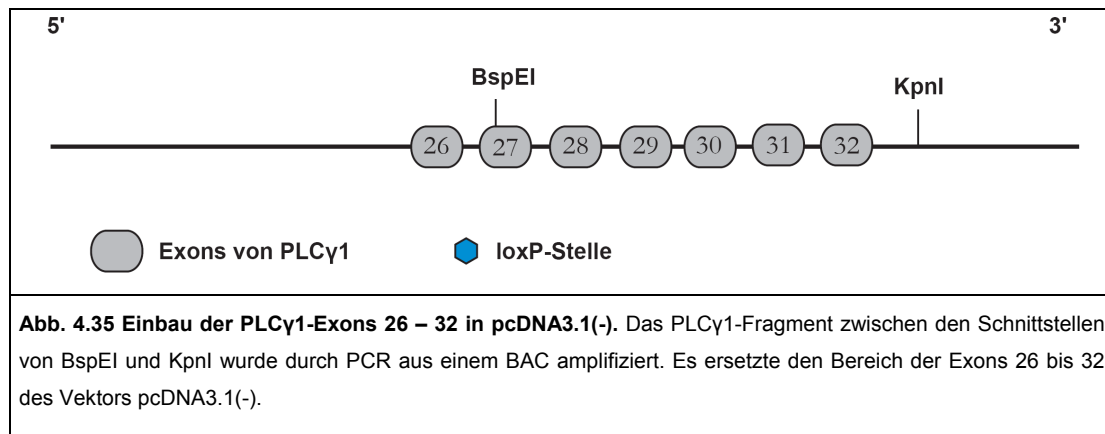


Zur Generierung der PLC γ -iko-Mäuse wurde folgende Strategie angewendet (Abb. 4.33): Als erstes werden embryonale Stammzellen mit dem linearisierten Targetvektor transfiziert. Dieser wird durch homologe Rekombination in die genomische DNA der ES-Zellen eingebaut. Anschließend werden die rekombinanten ES-Zellen mit Hilfe von Geneticin selektiert, gefolgt von einer transienten Transfektion der überlebenden Zellen mit einem Cre-Rekombinase-Expressionsvektor und negativer Selektion durch Ganciclovir. Die Cre-Rekombinase entfernt die zwischen zwei loxP-Stellen gleicher Orientierung liegende Selektionskassette. Die Behandlung mit Ganciclovir überleben nur die rekombinanten ES-Zellen, die keine HSV-Thymidinkinase mehr besitzen. Die so entstandenen PLC γ -iko-ES werden in Blastozysten injiziert und diese in den Uterus scheinträchtiger Mäuse implantiert. Die daraus entstehenden chimären Mäuse werden mit BALB/c-Mäusen verpaart, um heterozygote gefloxt PLC γ -iko-Mäuse zu erhalten. Diese werden mit Tieren verpaart, die eine zell- oder gewebsspezifische Expression der Cre-Rekombinase aufweisen, in diesem Fall in T-Zellen. Dies führt bei homozygoten Mäusen zu einem spezifischen *Knock-out* von PLC γ 1 in T-Zellen.

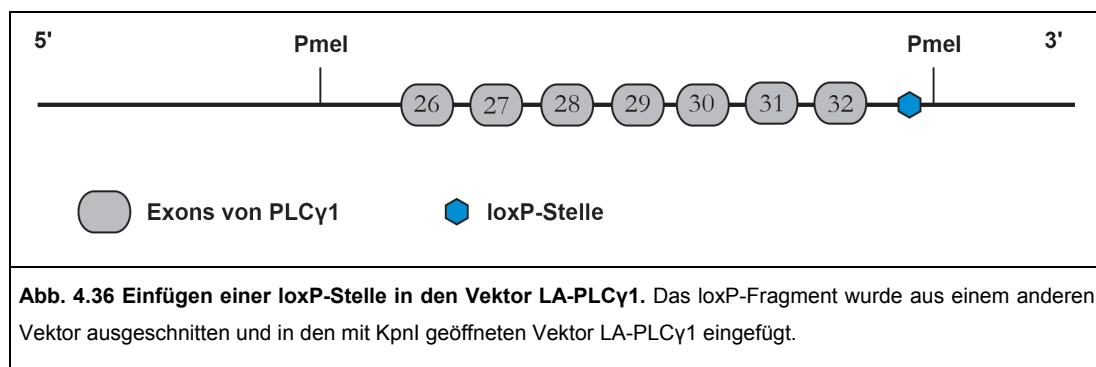


4.2.3. Klonierung des Targetvektors iko-PLCγ1

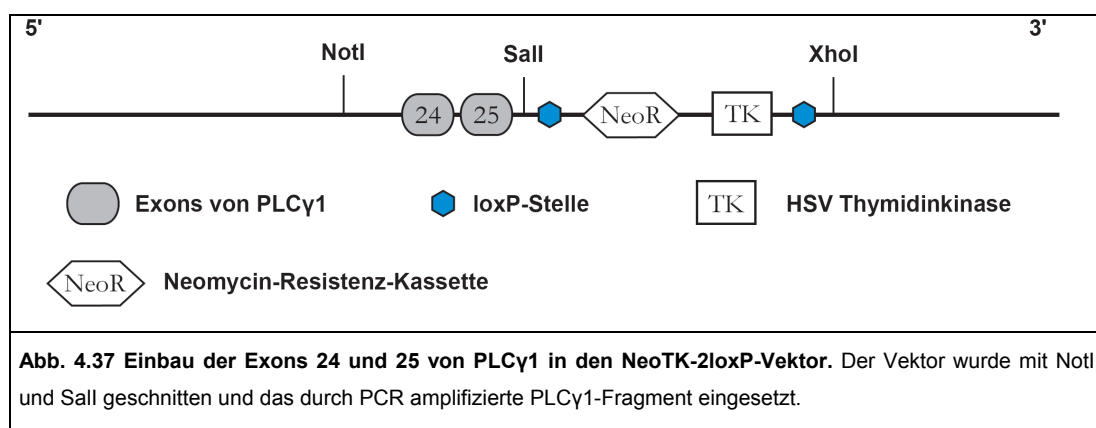
Zunächst wurde der Vektor, der den langen Arm von PLCγ1 enthielt, kloniert (LA-PLCγ1). Mittels PCR wurde ein 3,5 kb großes Fragment der Exons 27 bis 32 aus einem BAC (RPCI-23-285D4) amplifiziert und in einen Vektor auf Basis von pcDNA3.1(-) (Invitrogen) eingefügt. Dieser Vektor enthielt bereits die PLCγ1-Exons 26 bis 32, allerdings mit einer eingefügten Mutation in Exon 27, die auf diese Weise entfernt wurde (Abb. 4.34).



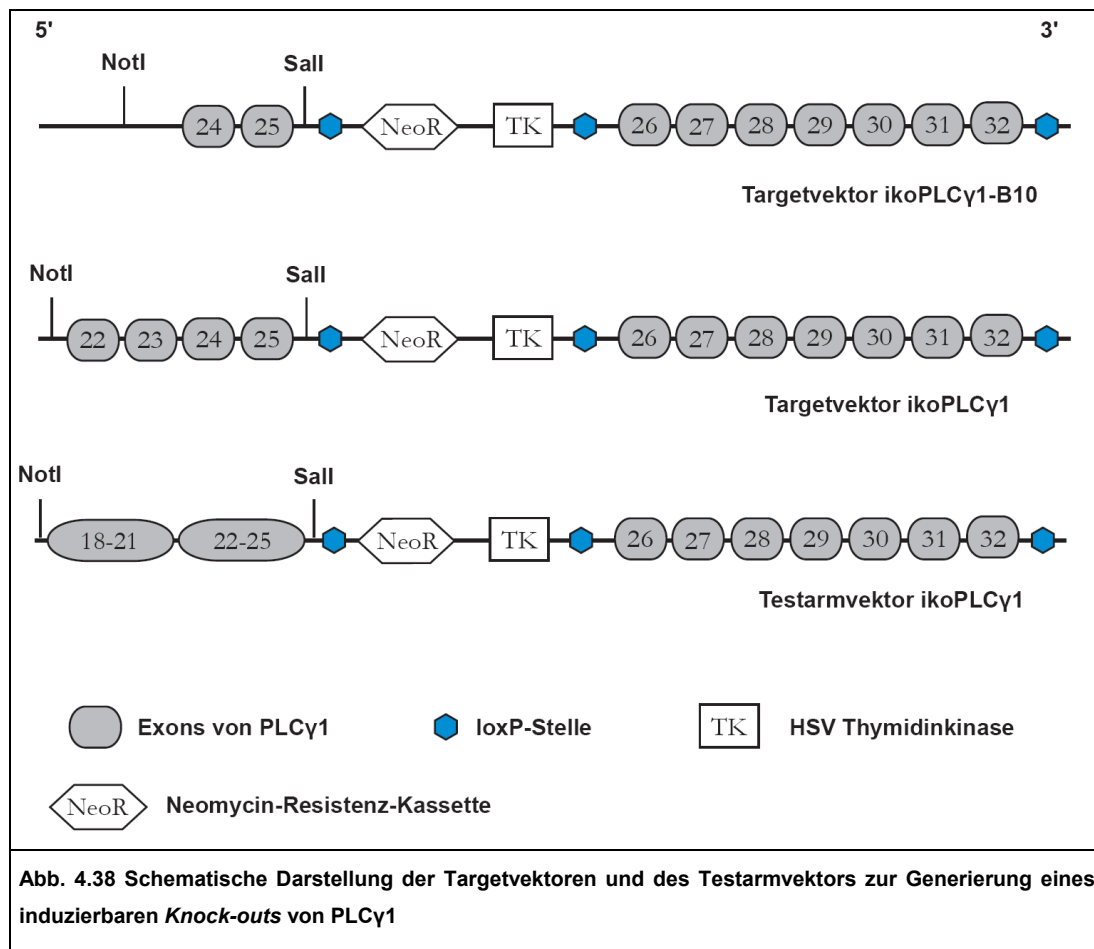
Anschließend wurde eine loxP-Stelle in das Intron stromabwärts von Exon 32 eingefügt. Die loxP-Sequenz ist 34 bp, das ganze Fragment 92 bp groß. Es wurde aus dem Vektor Neo-TK-2loxP mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten und *blunt-ends* generiert. Anschließend wurde der LA-PLCy1-Vektor mit KpnI geschnitten, *blunt-ends* generiert, dephosphoryliert und das loxP-Fragment eingefügt (Abb. 4.35).



Als Nächstes wurde der Vektor mit dem kurzen Arm von PLCy1 kloniert (KA-PLCy1). Hierzu wurde ein 850 bp großes Fragment von PLCy1, das die Exons 24 und 25 enthielt, durch PCR amplifiziert, wobei der BAC-Klon RPCI-23-285D4 erneut als Template fungierte. Gleichzeitig wurden Schnittstellen für NotI und Sall eingefügt. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den Vektor NeoTK-2loxP eingefügt. Hierbei handelt es sich um einen Vektor auf Basis von pPCR-Script (Stratagene) mit einer Neo-TK-Kassette, die von zwei loxP-Stellen eingerahmt ist (Abb. 4.36).



Die beiden Vektoren KA-PLC γ 1 und LA-PLC γ 1 mit eingebauter loxP-Stelle wurden nun zur Konstruktion des Targetvektors ikoPLC γ 1-B10 verwendet. Dazu wurde der lange Arm mit PmeI ausgeschnitten und in den mit XhoI geschnittenen KA-PLC γ 1-Vektor eingefügt (Abb. 4.37). Der entstandene Targetvektor wurde zur Transfektion von ES-Zellen verwendet. Es konnte aber keine homologe Rekombination in die genomische DNA nachgewiesen werden. Um die homologe Rekombination zu erleichtern wurde daher der kurze Arm verlängert.

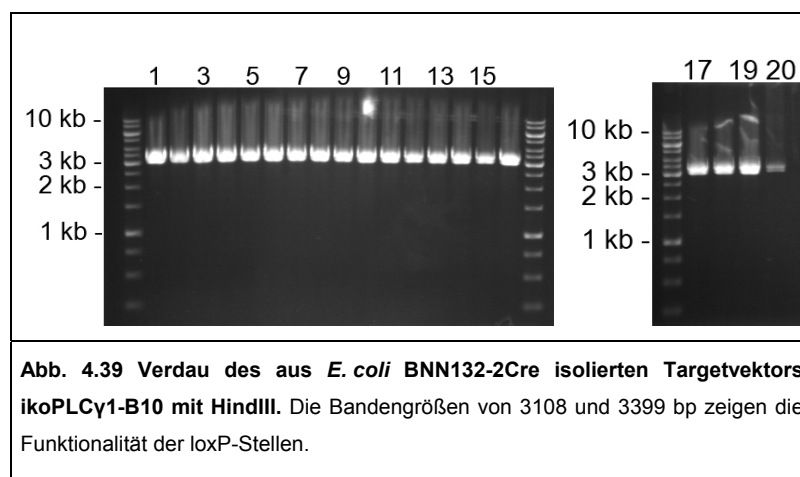


Es wurden zwei verschiedene Konstrukte angefertigt (Abb. 4.37): Der Targetvektor ikoPLC γ 1 mit einem kurzen Arm aus den Exons 22 bis 25 (2 kb) und der Testarmvektor ikoPLC γ 1, dessen kurzer Arm aus den Exons 18 bis 25 (4 kb) besteht. Zunächst wurden die entsprechenden Konstrukte mittels PCR und dem BAC-Klon RPCI-23-285D4 hergestellt, wobei Schnittstellen für NotI und Sall eingefügt wurden. Dann wurde der alte kurze Arm aus dem Targetvektor ikoPLC γ 1-B10 mit Hilfe von NotI und Sall ausgeschnitten und durch die neuen Konstrukte ersetzt.

4.2.4. Funktionalität der loxP-Stellen im Targetvektor

Damit die *Knock-out*-Strategie erfolgreich ist, müssen alle drei loxP-Stellen des *targeting*-Vektors die gleiche Orientierung besitzen. Nur dann kann die Cre-Rekombinase den

dazwischen liegenden DNA-Abschnitt herausschneiden. Haben die loxP-Stellen dagegen eine entgegengesetzte Orientierung, so wird der Abschnitt invertiert. Um die Funktionalität zu überprüfen wurden Cre-Rekombinase exprimierende Bakterien des Stamms *E. coli* BNN132-2Cre mit dem Targetvektor ikoPLC γ 1-B10 transformiert. Sind die loxP-Stellen funktionell, so wird der Bereich zwischen den beiden äußeren loxP-Stellen herausgeschnitten. Dies geschieht aufgrund der permanenten und hohen Konzentration der Cre-Rekombinase in den Bakterien und kann entweder in einem Schritt oder, unter Verwendung der mittleren loxP-Stelle, in zwei Schritten geschehen. Der auf diese Weise durch die Cre-Rekombinase modifizierte Targetvektor wurde mit HindIII verdaut. Dabei entstanden zwei Banden mit einer Größe von 3108 und 3399 bp (Abb. 4.38). Dies zeigt, dass der Bereich zwischen den äußeren loxP-Stellen ausgeschnitten wurde, die loxP-Stellen also funktionell sind.

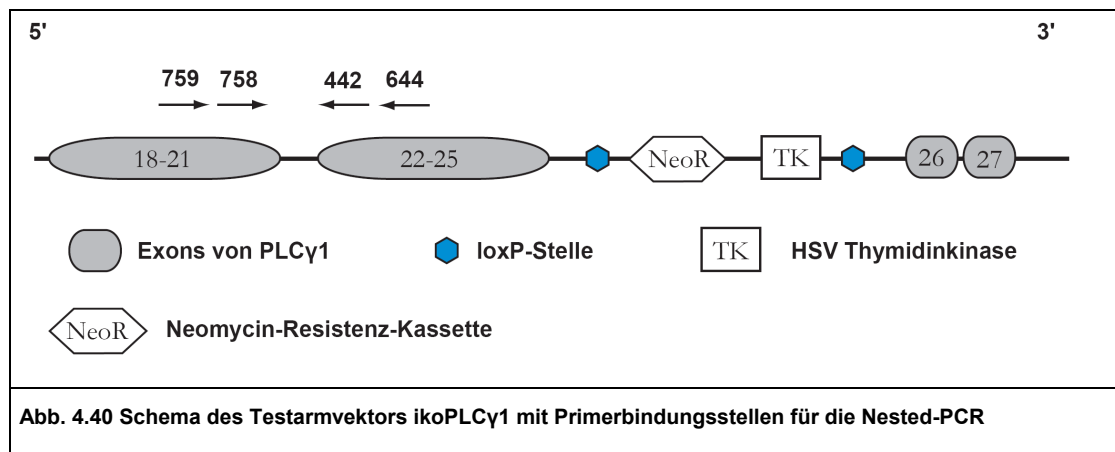


4.2.4. Optimierung der Nested-PCR zum Nachweis der homologen Rekombination des *targeting*-Vektors ikoPLC γ 1

Um die Nested-PCR zum Nachweis der homologen Rekombination des Targetvektors ikoPLC γ 1 in die genomische DNA von ES-Zellen zu optimieren, wurde der Testarmvektor ikoPLC γ 1 verwendet (Abb. 4.37 und 4.39). Im Gegensatz zum Targetvektor besitzt er die Exons 18 bis 21 am 5'-Ende und somit auch die Bindungsstellen für die 5'-Primer der Nested-PCR. Diese zeigt somit auch bei einem zufälligen Einbau des Testarmvektors eine homologe Rekombination an.

Der Vektor wurde mit PvuI linearisiert und zur Transfektion von ES-Zellen verwendet. Mit Hilfe von Geneticin wurden die positiven Klone selektiert, isoliert und mit den Zelllysaten Nested-PCR-Analysen durchgeführt. Als optimal erwiesen sich die in Kapitel 3.3.7 aufgeführten Reaktionsansätze und folgende Programme:

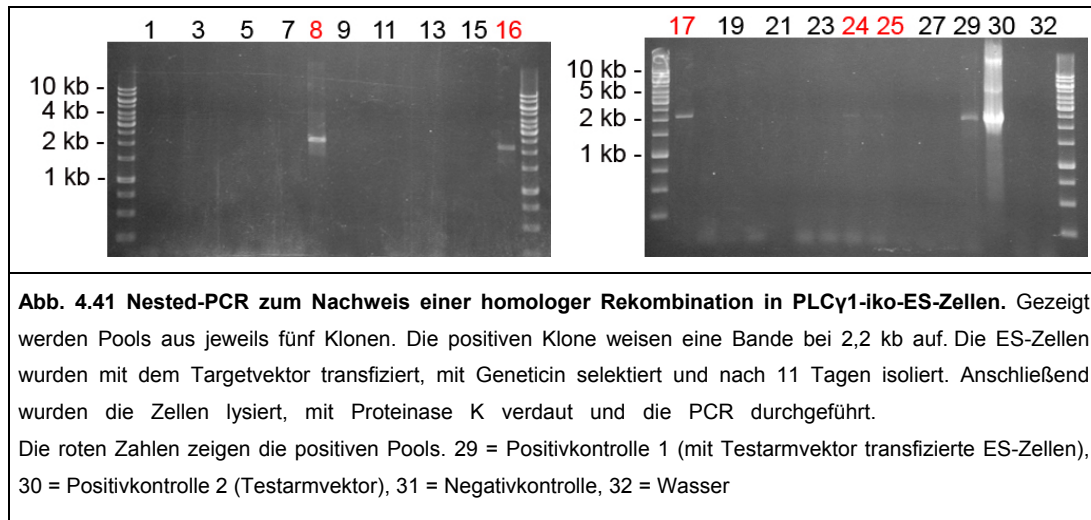
	1. PCR		2. PCR	
Initialisierung	3 min	95°C	3 min	95°C
Denaturierung	30 sec	95°C	30 sec	95°C
Primer annealing	30 sec	55,8°C	30 sec	56,3°C
Elongation	144 sec	72°C	132 sec	72°C
Lücken auffüllen	5 min	72°C	5 min	72°C



4.2.5. Generierung von PLC γ 1-iko-ES-Zellen

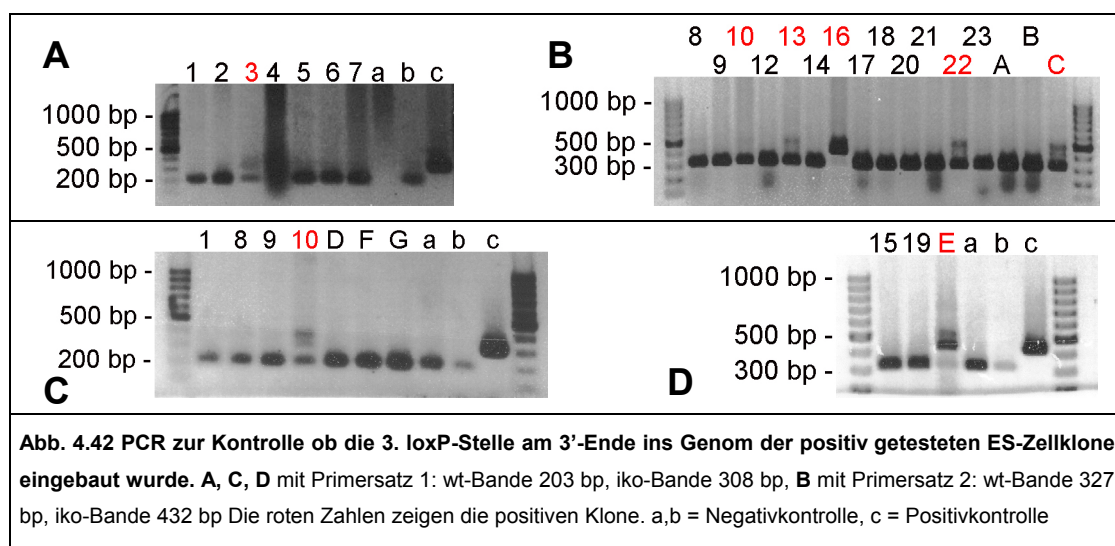
Die ES-Zellen wurden mit dem durch PvuI linearisierten Targetvektor ikoPLC γ 1 transfiziert und die veränderten Zellen durch Zugabe von Geneticin selektiert. Dann wurden die überlebenden Klone isoliert und die homologe Rekombination mit Hilfe der in Kapitel 4.2.4 entwickelten Nested-PCR nachgewiesen.

Insgesamt wurden 1300 Zellklone isoliert und das Zelllysate von je fünf Klonen in einem PCR-Ansatz analysiert. Die Lage der Primer ist identisch mit der im Testarmvektor (Abb. 4.39). Beim Targetvektor binden die 5'-Primer aber außerhalb des Vektors. Die PCR liefert also nur dann ein positives Signal, wenn der Targetvektor durch homologe Rekombination ins Genom eingebaut wurde. Abb. 4.40 zeigt 5 der insgesamt 40 positiven Pools.



Zur Identifikation der positiven Klone innerhalb eines Pools wurde eine zweite Nested-PCR, unter Verwendung der Zelllysate der einzelnen Klone, durchgeführt. Hierbei konnten insgesamt 30 positive Klone identifiziert werden (Abb. 4.42).

Da die 3. loxP-Stelle am 3'-Ende auch bei der Erzeugung eines induzierbaren *Knock-outs* von PLCy1 von entscheidender Bedeutung ist, wurde mit Hilfe einer PCR überprüft, ob diese durch homologe Rekombination in die genomische DNA der ES-Zellen eingebaut wurde. Dabei wurden zwei verschiedene Primersätze verwendet, um Fehler durch unspezifische Bindungen zu vermeiden. Da die homologe Rekombination mit hoher Wahrscheinlichkeit nur auf einem Chromosom stattfindet, zeigen die Klone mit der 3. loxP-Stelle sowohl die wt- als auch die iko-Bande (Abb. 4.41). Insgesamt konnten sieben Klone identifiziert werden, bei denen der Targetvektor, inklusive der 3. loxP-Stelle, durch homologe Rekombination inseriert wurde.



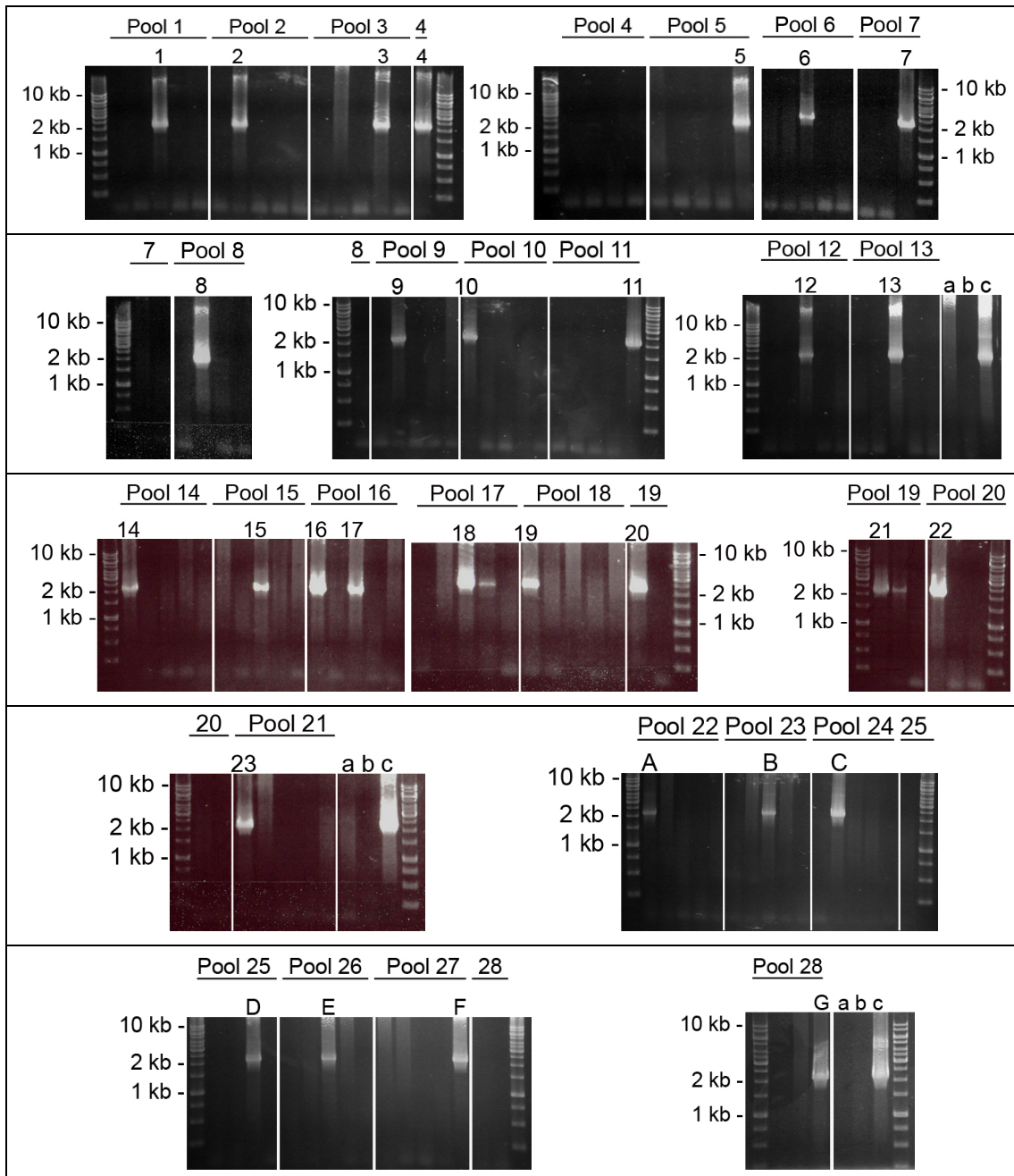
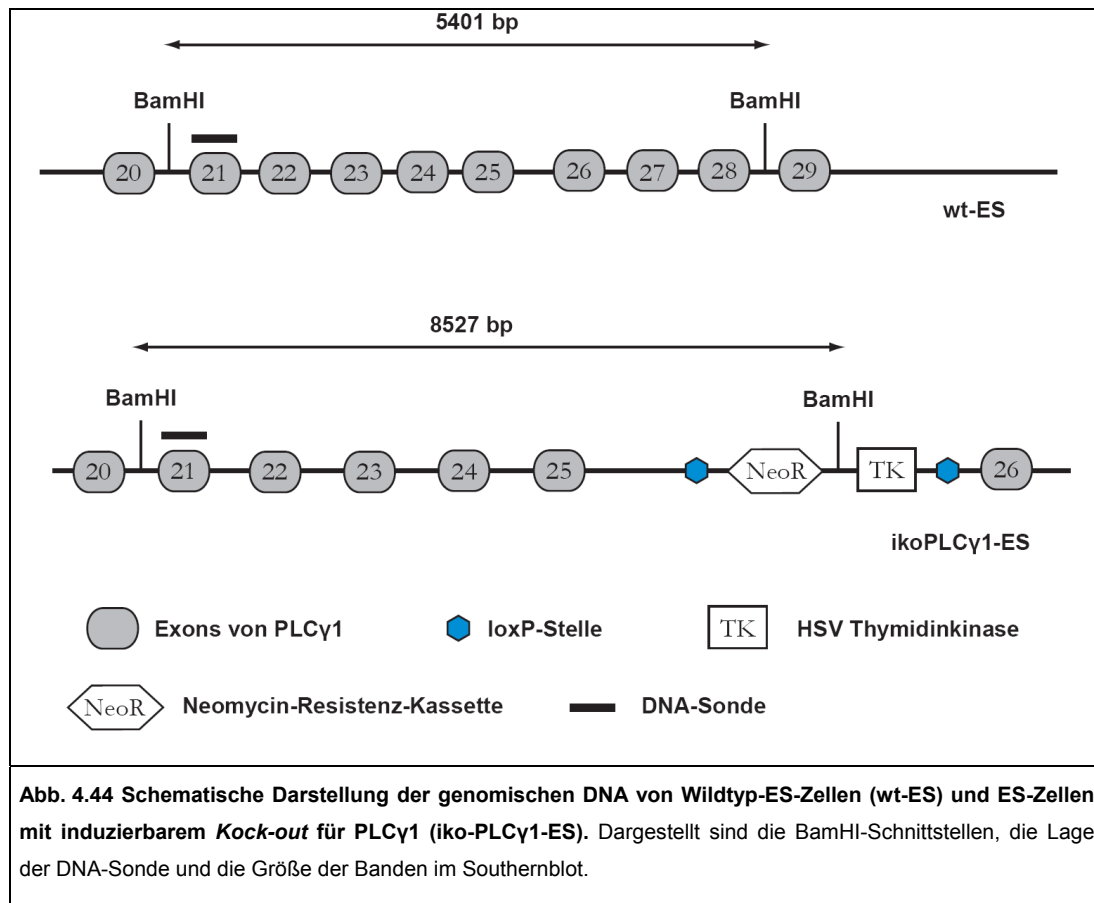


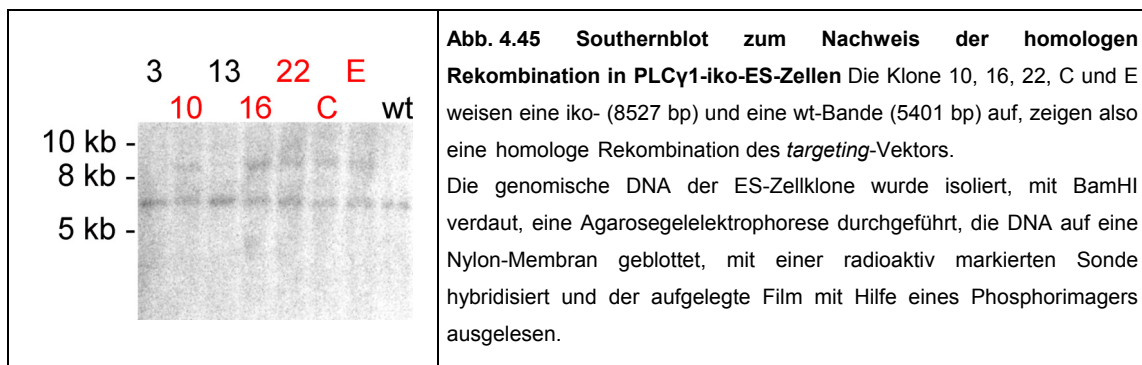
Abb. 4.43 Nested-PCR zum Nachweis der homologen Rekombination in PLCy1-iko-ES-Zellen. Gezeigt werden die einzelnen Klone aus den positiven Pools. Die positiven Klone weisen eine Bande bei 2,2 kb auf. Die ES-Zellen wurden mit dem Targetvektor transfiziert, mit Geneticin selektiert und nach 11 Tagen isoliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, mit Proteinase K verdaut und die PCR durchgeführt.
a = Negativkontrolle, b = Wasser, c = Positivkontrolle

Von den sieben positiv getesteten PLCy1-iko-ES-Zellen wurde ein Southernblot durchgeführt, um sicher zu stellen, dass es zu einer fehlerfreien Integration des Targetvektors ins Genom gekommen ist. Dazu wurde die genomische DNA aus den Klonen isoliert und mit BamHI verdaut. Wie in Kapitel 4.2.2 erläutert, muss die Restriktionsendonuklease eine Schnittstelle außerhalb und eine innerhalb des Vektors haben und zu leicht unterscheidbaren wt- und iko-Bandengrößen führen (Abb. 4.43).



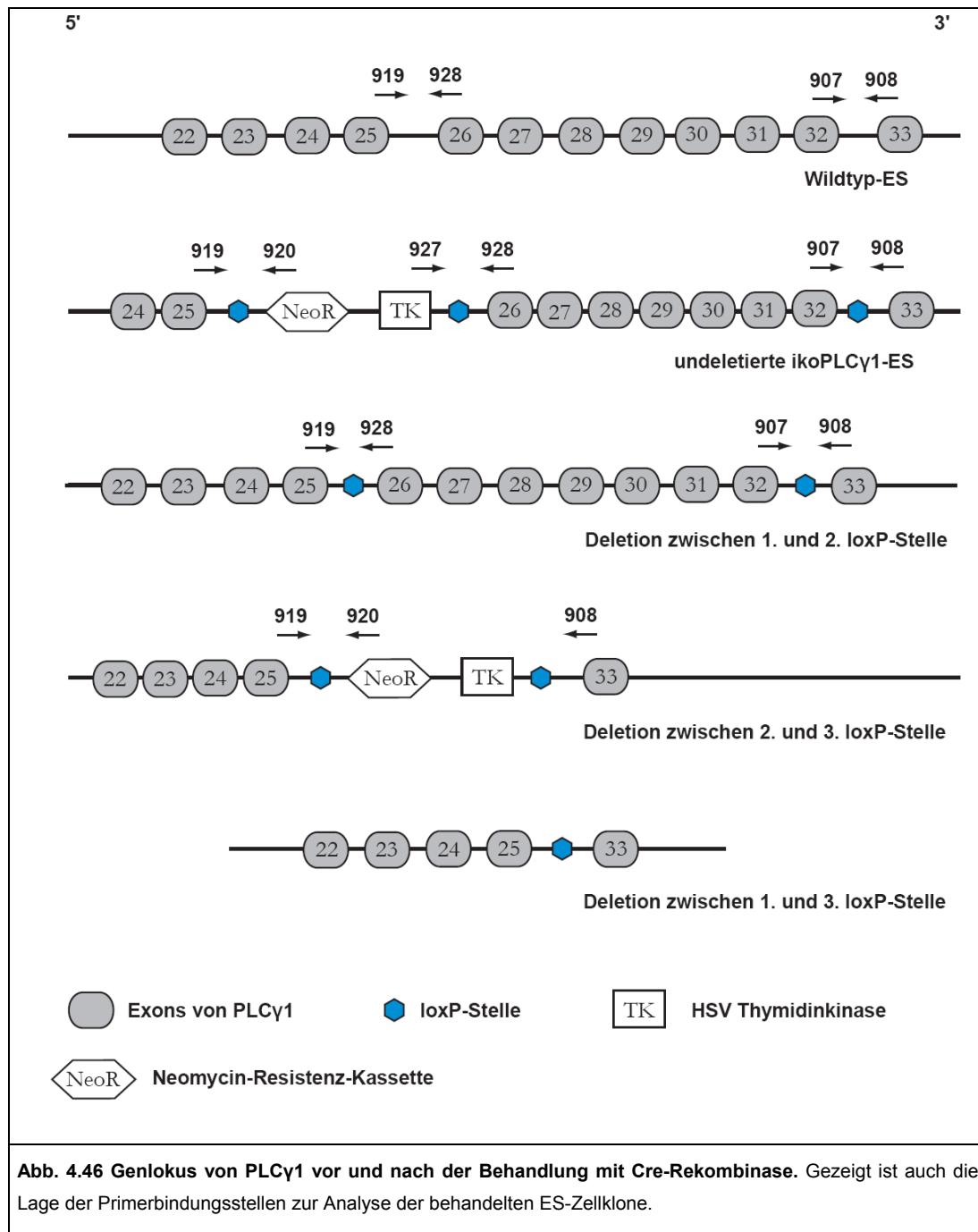
Die DNA-Sonde „L-Sonde“ (481 bp) wurde mittels PCR hergestellt und radioaktiv markiert. Sie bindet an Exon 21, außerhalb des Targetvektors, um nur homolog rekombinierte DNA-Abschnitte zu markieren. Ein heterozygoter ES-Zellklon mit einer korrekten Integration des *targeting*-Vektors ins Genom zeigt somit eine 5401 bp große wt-Bande und eine 8527 bp große iko-Bande.

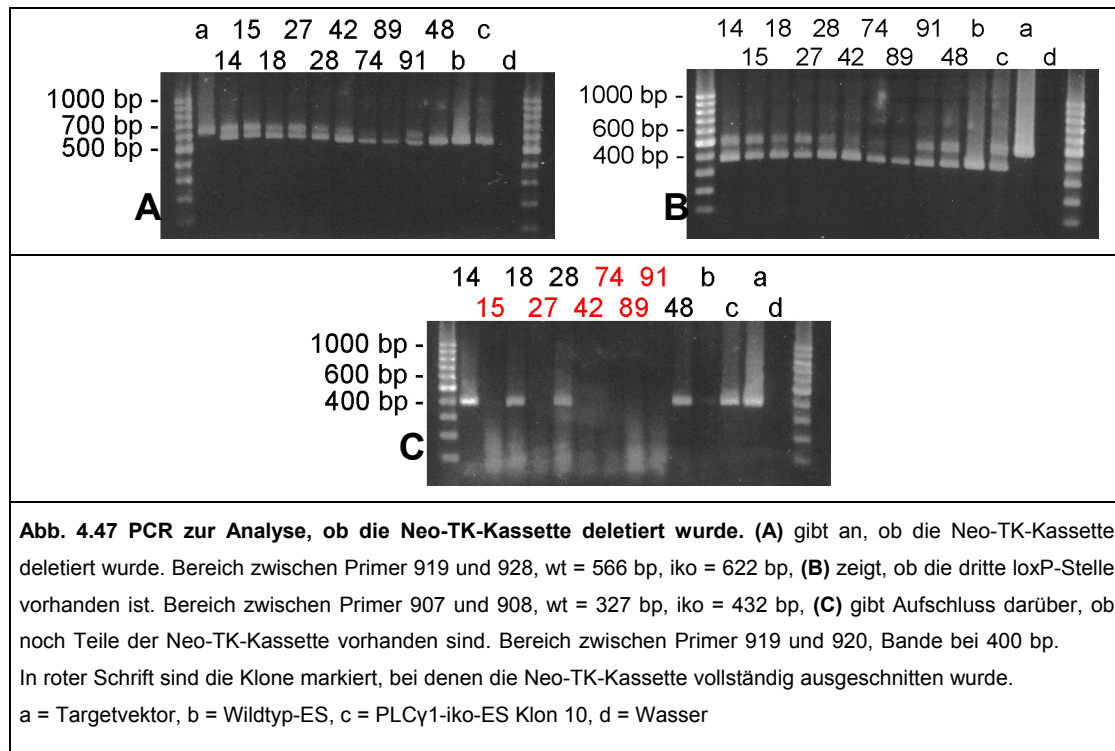
Aus Abb. 4.44 geht hervor, dass fünf der sieben durch PCR positiv getesteten PLCγ1-iko-ES-Zellklone eine korrekte homologe Rekombination des Targetvektors aufweisen: 10, 16, 22, C und E. Die Klone 3 und 13 zeigen dagegen keine iko-Bande.



4.2.6. Generierung von geflochtenen PLCy1-iko-ES-Zellen

Um geflochte PLCy1-iko-ES-Zellen zu gewinnen, musste die Selektionskassette (Neo-TK-Kassette) mit Hilfe der Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden. Dies wurde durch die transiente Transfektion von PLCy1-iko-ES Klon 10 mit dem Cre-Rekombinase-Expressionsvektor pTZ-CreN erreicht (siehe Kapitel 3.3.8). Da der Targetvektor drei loxP-Stellen besitzt, kann die Cre-Rekombinase auch drei verschiedene DNA-Abschnitte entfernen (Abb. 4.45). Das dabei nur die Neo-TK-Kassette entfernt wurde, konnte mittels PCR festgestellt werden (Abb. 4.45 und 4.46).





Zuerst wurde überprüft, ob die Neo-TK-Kassette entfernt wurde (Abb. 4.46.A). War dies der Fall, so zeigte sich eine wt-Bande bei 566 bp und eine iko-Bande bei 622 bp. Von den 110 isolierten Klonen wiesen neun eine Deletion der Neo-TK-Kassette auf. Als Nächstes musste sicher gestellt werden, dass bei der Deletion die dritte loxP-Stelle am 3'-Ende nicht verloren gegangen war (Abb. 4.46B). Die Klone, bei denen sie noch vorhanden war, zeigten eine wt-Bande von 327 bp und eine iko-Bande von 432 bp. Dabei stellte sich heraus, dass alle Klone mit deletierter Neo-TK-Kassette die dritte loxP-Stelle besaßen.

Als Letztes wurde eine PCR durchgeführt, um zu analysieren, ob in allen Zellen der einzelnen Klone die Neo-TK-Kassette entfernt wurde (Abb. 4.46.C). War dies nicht der Fall, zeigte die PCR eine Bande bei 400 bp. Dadurch stellte sich heraus, dass von den neun Klonen, die die Selektionskassette deletiert hatten, drei Mischklone waren. Nur in sechs Klonen war in allen Zellen die Neo-TK-Kassette entfernt worden. Somit konnten sechs gefloxt PLCy1-iko-ES-Zellklone generiert werden: 15, 27, 42, 74, 89 und 91.

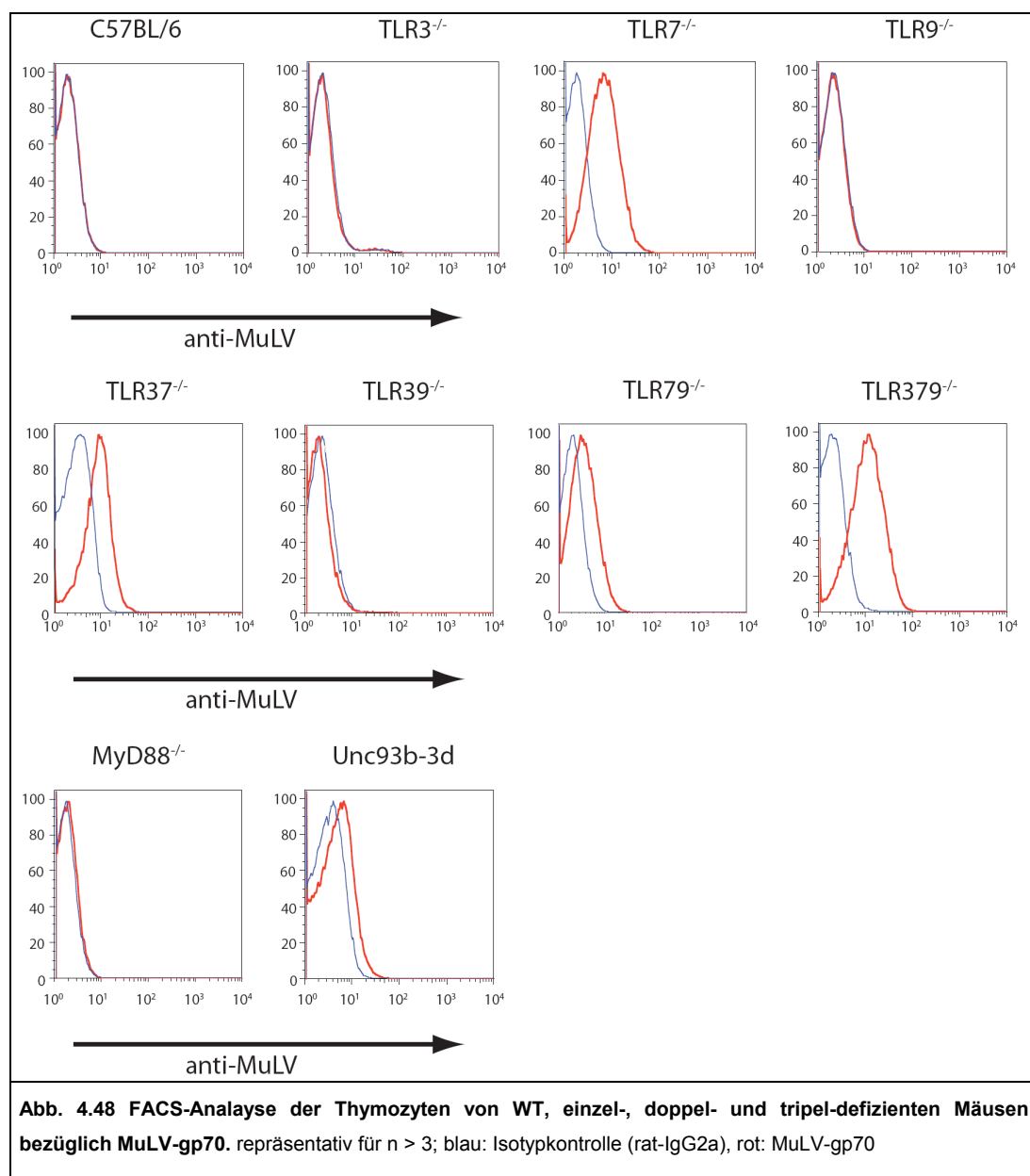
4.2.7. Blastozysteninjektion und Entstehung chimärer Mäuse

Die gefloxten PLCy1-iko-ES-Zellklone 15 und 91 wurden zur Blastozysteninjektion zu Prof. Ari Waisman (Universität Mainz) geschickt (siehe Kapitel 3.3.9). Es wurden zwei Injektionen durchgeführt, aus der sich insgesamt drei hochchimäre Männchen entwickelten. Nach der Geschlechtsreife wurden diese mit BALB/c-Mäusen verpaart, aus denen jedoch nur Mäuse mit brauner Fellfarbe hervorgingen. Die ES-Zellen konnten sich also nicht zu Keimzellen entwickeln.

4.4. Die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 bei der Abwehr endogener Retroviren (ERV) und ERV induzierter Tumorerkrankungen

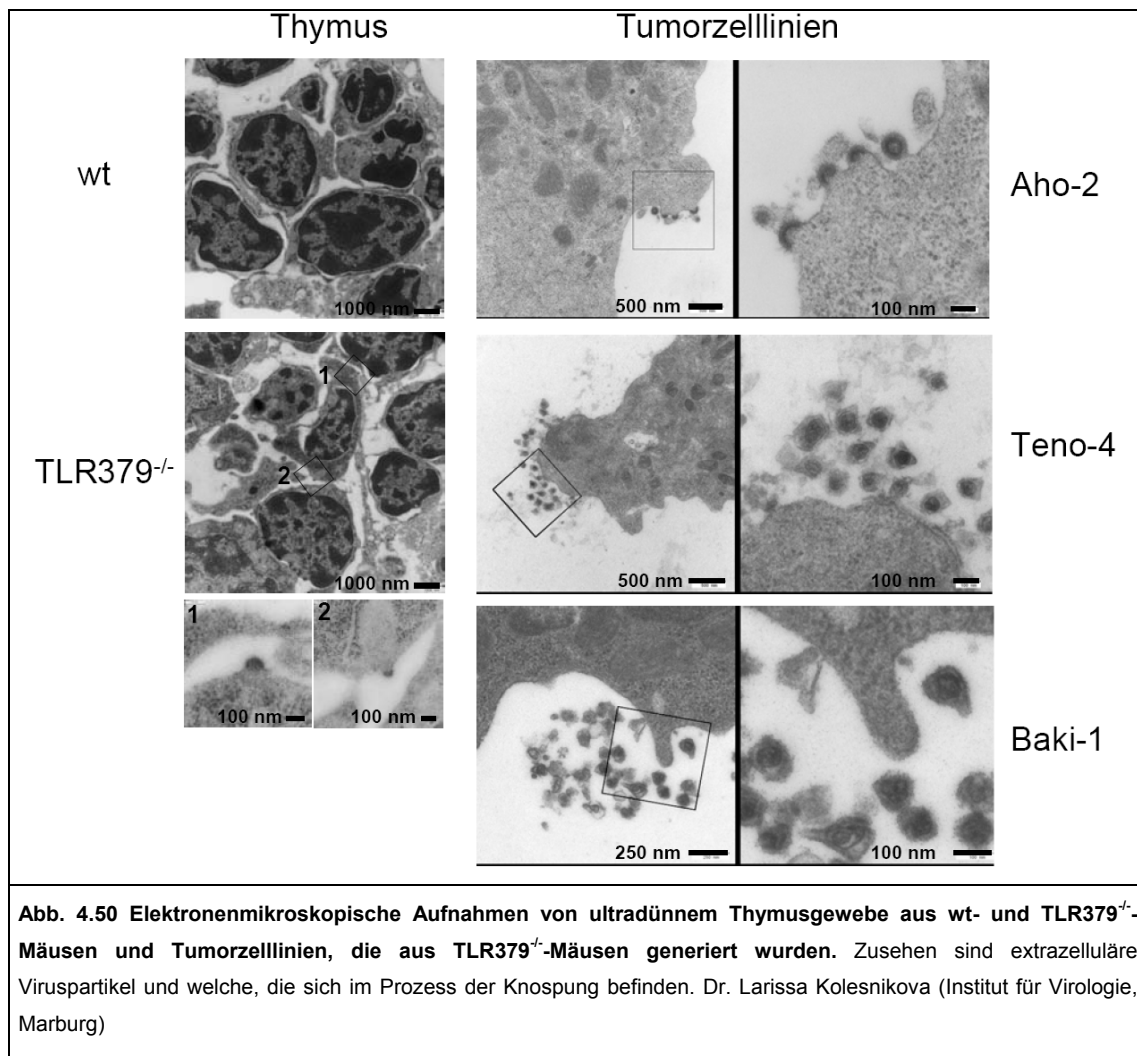
4.4.1. TLR7 defiziente Mäuse zeigen *in vivo* eine spontane, unkontrollierte Virämie

Um zu klären, ob und welche Bedeutung die nukleinsäureerkennenden Toll-like Rezeptoren 3, 7 und 9 für die Abwehr endogener Retroviren haben, wurden FACS-Analysen der Thymozyten aus WT, einfach-, doppel- und tripel-defizienten Mäusen durchgeführt (Abb. 4.48).



Auch Thymozyten aus Unc93b1-3d- und MyD88^{-/-}-Tieren wurden analysiert. Die Unc93b1-3d-Mäuse besitzen eine Mutation im Protein Unc93b1, die den Transport von TLR3, 7 und 9 ins

zeigen MuLVs im extrazellulären Raum und im Prozess der Knospung (Abb. 4.50). Im Thymusgewebe von wt-Mäusen sind dagegen keine Viruspartikel erkennbar.

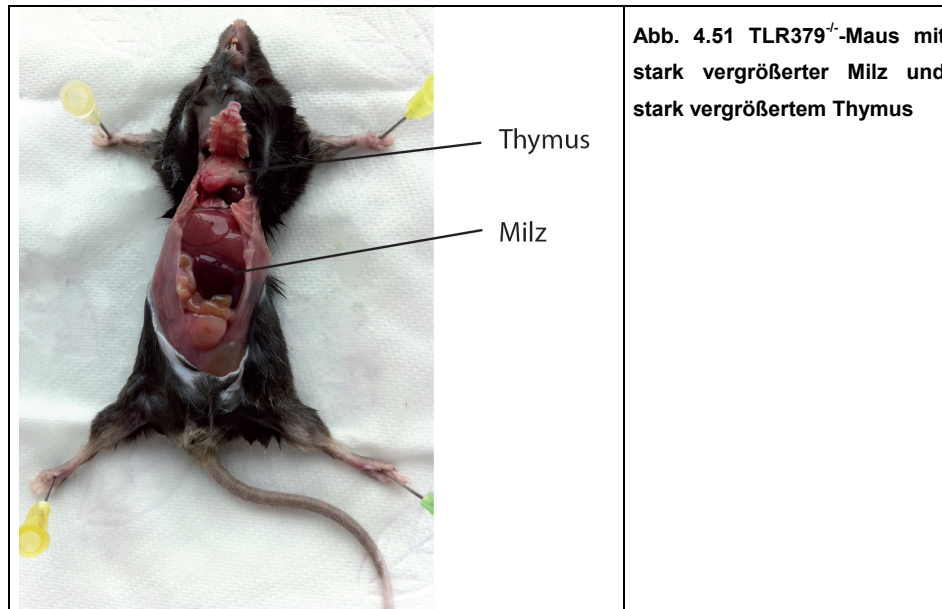


Sequenzanalysen und Verpaarungsexperimente mit infizierten und nicht infizierten Mäusen von Dr. Philipp Yu (Institut für Immunologie, Marburg) konnten den Virus als Murines Leukämievirus mit endogenem Ursprung identifizieren. Womit gezeigt werden konnte, dass TLR7 defiziente Mäuse eine spontane, unkontrollierte MuLV-Virämie entwickeln, die aus der Aktivierung einer endogenen Form des MuLV entstanden ist.

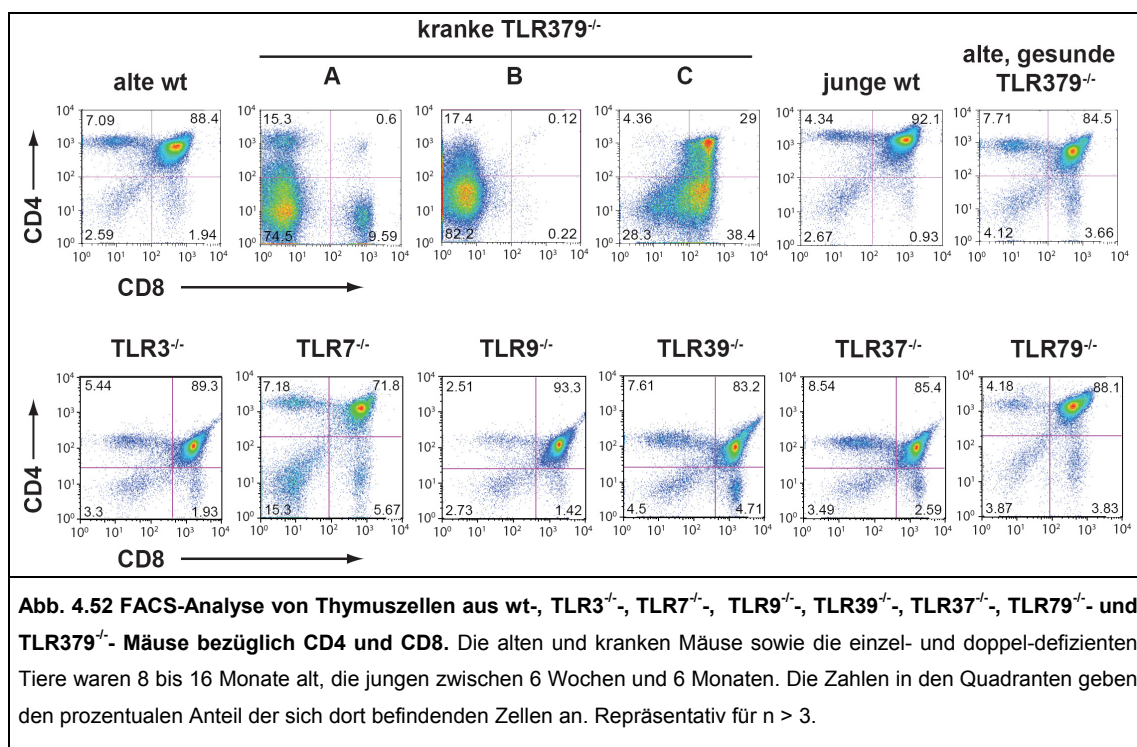
4.4.2. TLR379^{-/-}-Mäuse entwickeln eine prä-T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL)

Bei Untersuchungen an TLR3, 7 und 9 tripel-defizienten Mäusen, konnte eine deutlich erhöhte Sterblichkeit festgestellt werden (Slomka 2009). Außerdem zeigten insbesondere ältere Tiere (ein Jahr oder älter) häufig stark vergrößerte Milzen, Thymi und/oder Lymphknoten (Abb. 4.51). Die in Zusammenarbeit mit Heike Slomka (Institut für Immunologie, Marburg) durchgeführten FACS-Analysen zeigten im Thymus von älteren, kranken TLR379^{-/-}-Mäusen eine deutlich

veränderte CD4/CD8-Relation im Vergleich zum WT oder gesunden TLR379^{-/-}-Mäusen (Abb. 4.52). Bei gesunden Tieren dominieren die CD4⁺CD8⁺ doppel-positiven T-Zellen mit einem Anteil von 70 bis 90%. Bei den kranken TLR379^{-/-} stellen jedoch die doppel-negativen (CD4⁻CD8⁻) bzw. einfach-positiven (CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺) T-Zellen mit insgesamt bis zu 99% den Hauptteil der Thymozyten.



Auch die untersuchten TLR3^{-/-}, TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR39^{-/-}, TLR37^{-/-} und TLR79^{-/-}-Mäuse zeigten keine Veränderungen im CD4/CD8-Verhältnis im Vergleich zum WT und wiesen auch keine vergrößerten Milzen, Thymi oder Lymphknoten auf (Abb. 4.52).



Eine von Dr. L. Quintanilla-Fend (Institut für Pathologie, Universität Tübingen) durchgeführte histologische Untersuchung von Milz- und Thymusgewebe kranker TLR379^{-/-}-Mäuse ergab eine prä-T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL). Die H&E-Färbung zeigt beim WT eine normale Verteilung von weißer und roter Pulpa in der Milz. Im Thymus sind Cortex und Medulla deutlich abgegrenzt. Das Milz- und Thymusgewebe aus kranken TLR379^{-/-}-Mäusen zeigt dagegen eine diffuse Zellverteilung (Abb. 4.53).

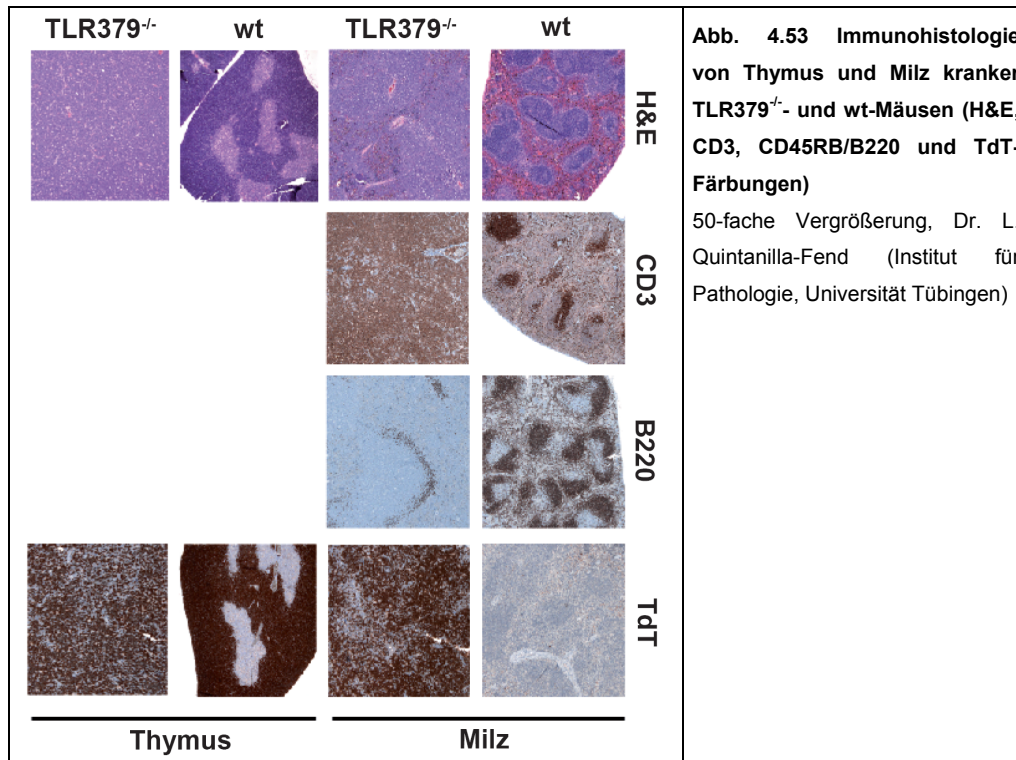


Abb. 4.53 Immunohistologie von Thymus und Milz kranker TLR379^{-/-}- und wt-Mäusen (H&E, CD3, CD45RB/B220 und TdT-Färbungen)

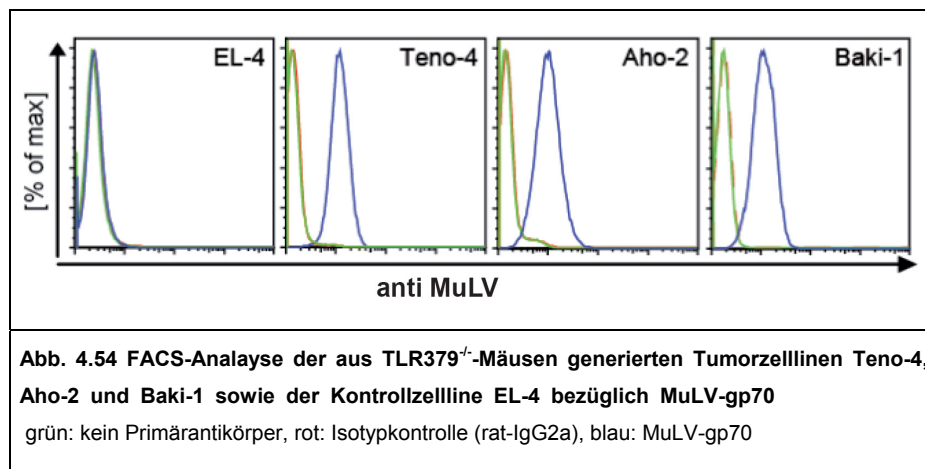
50-fache Vergrößerung, Dr. L. Quintanilla-Fend (Institut für Pathologie, Universität Tübingen)

Die CD3- und TdT-Färbung (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase, wird während der frühen Stadien der B- und T-Zellentwicklung exprimiert) kennzeichnet gemeinsam eine prä-T-Zell akute lymphatische Leukämie. Daneben wurden auch die B220⁺-Zellen (B-Zellen) der Milz angefärbt. Im Milzgewebe des WTs zeigt sich eine normale Verteilung von T-Zellen (CD3⁺-Zellen) in der PALS-Region (*periarteriolar lymphoid sheath*) und von B-Zellen in der Corona der weißen Pulpa. In der Medulla des Thymus lassen sich TdT-negative (reife T-Zellen), im Cortex TdT-positive Zellen (unreife T-Zellen) nachweisen, während in der Milz keine TdT-positiven Zellen zu finden sind. Im Milzgewebe der TLR379^{-/-}-Mäuse zeigt sich dagegen ein ganz anderes Bild: Der Anteil der B-Zellen ist stark zugunsten der T-Zellen gesunken, welche eine diffuse Verteilung aufweisen. Hierbei handelt es sich größtenteils um infiltrierte CD3⁺TdT⁺-prä-T-Zellen. Ähnlich ist das Bild im Thymus. Auch hier zeigt sich eine diffuse Verteilung infiltrierter CD3⁺TdT⁺-prä-T-Zellen, die ein sogenanntes Sternenhimmel-Muster in der TdT-Färbung verursachen.

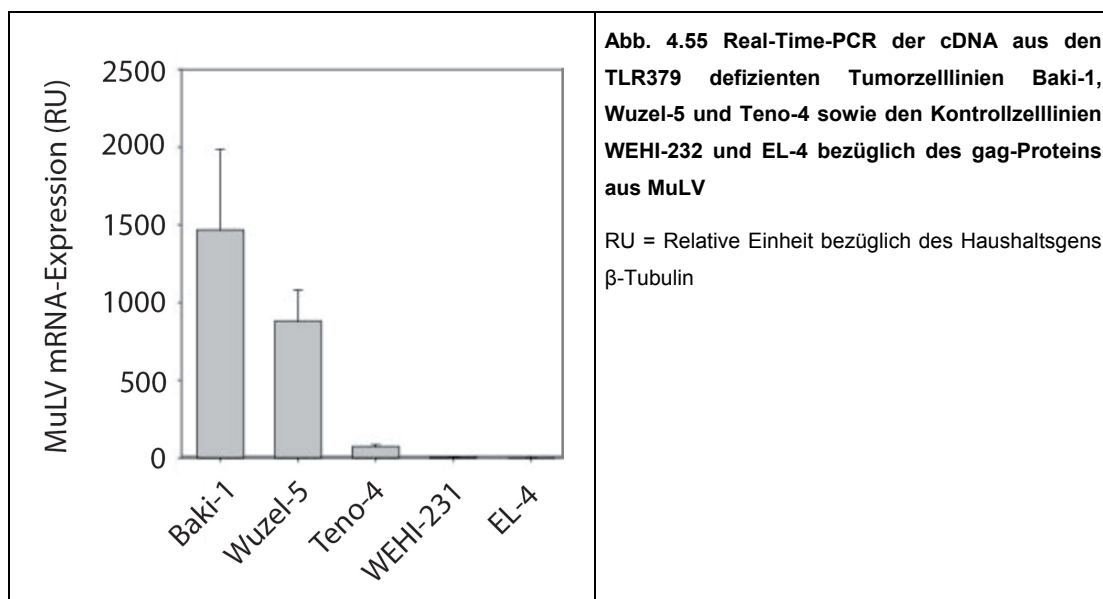
Somit konnte gezeigt werden, dass ältere TLR379^{-/-}-Mäuse häufig an einer prä-T-Zell akuten lymphatischen Leukämie erkranken, im Gegensatz zu C57BL/6, einzel- und doppel-defizienten Mäusen. Auffällig ist, dass keine der TLR7^{-/-}-, TLR37^{-/-}- und TLR79^{-/-}-Mäuse eine T-ALL-Erkrankung aufweist, obwohl sie eine Virämie zeigen.

4.4.3. Tumorzelllinien aus TLR379^{-/-}-Mäusen exprimieren große Mengen MuLV

Aus dem Thymus und der Milz von kranken TLR379^{-/-}-Mäusen konnten fünf Tumorzelllinien isoliert werden: Baki-1, Aho-2, Teno-4, Wuzel-5 und Mize-8. In Abb. 4.50 ist zu erkennen, dass die drei untersuchten Zelllinien Baki-1, Teno-4 und Aho-2 Viruspartikel freisetzen. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei tatsächlich um Murine Leukämieviren handelt, wurden FACS-Analysen bezüglich des gp70-Proteins des MuLV durchgeführt. Abb. 4.54 zeigt in allen drei Zelllinien eine starke MuLV-Expression, im Gegensatz zur Kontrollzelllinie EL-4, deren Ursprung ein T-Zell-Lymphom einer C57BL/6-Maus ist.



Als Nächstes wurde von drei verschiedenen Tumorzelllinien eine Real-Time-PCR bezüglich des gag-Proteins aus MuLV durchgeführt (Abb. 4.55). Sie zeigt bei allen drei TLR379 defizienten Zelllinien eine starke Expression der MuLV-mRNA, insbesondere bei Baki-1 und Wuzel-5. Dagegen ist in den Kontrollzelllinien EL-4 und WEHI-231 (einem B-Zell-Lymphom aus einer BALB/c-Maus) keine MuLV-mRNA-Expression festzustellen.



TLR379^{-/-}-Mäuse weisen also eine erhöhte T-ALL-Anfälligkeit auf und die aus ihren Tumoren isolierten Zelllinien zeigen eine starke Expression von MuLV-Partikeln endogenen Ursprungs. Die endosomalen, nukleinsäureerkennenden TLRs scheinen also für die Abwehr von endogenen Retroviren und der Entstehung von T-ALL eine wichtige Rolle zu spielen.

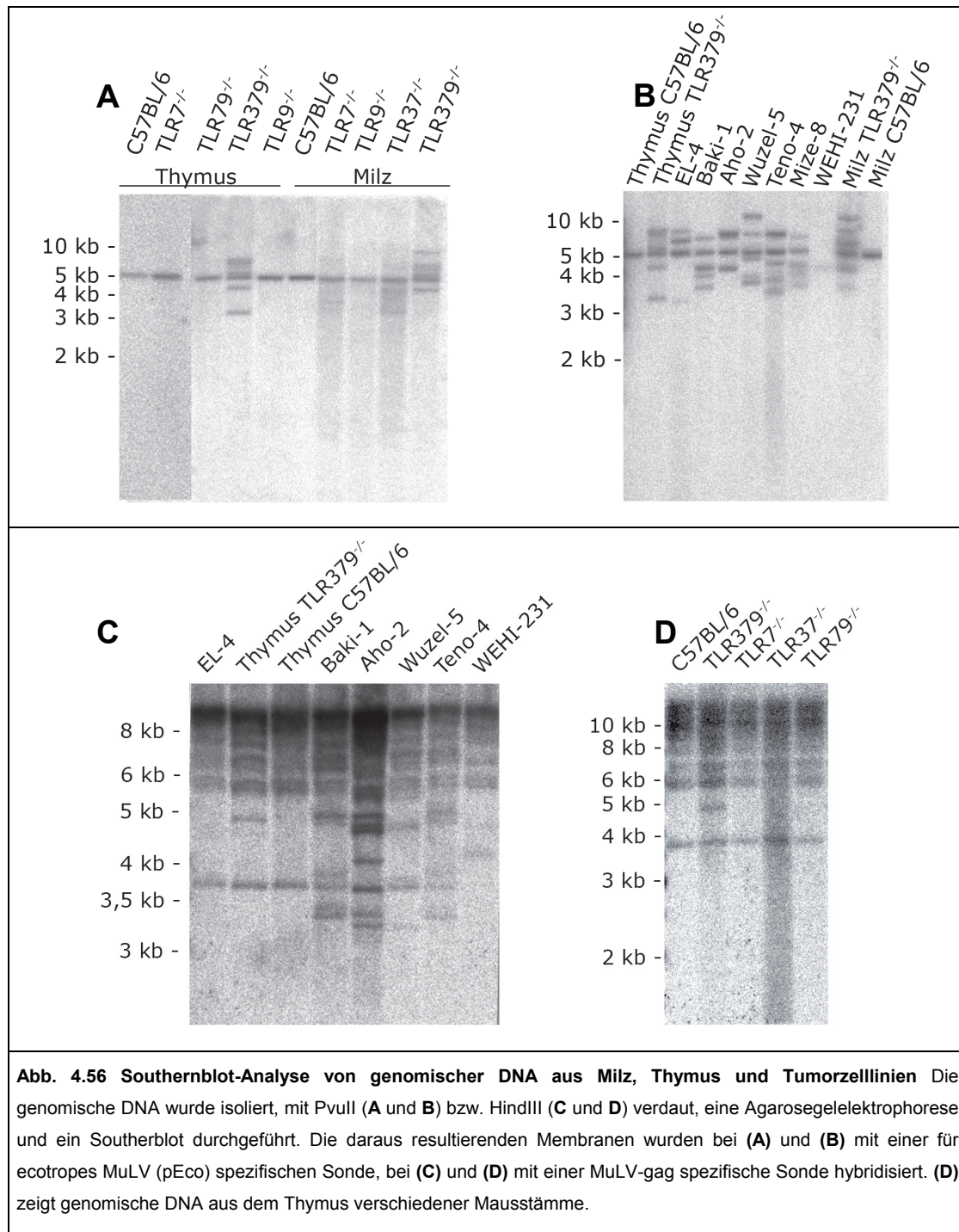
4.4.4. Die Neuintegration von aktivierten MuLVs in T-zellspezifische Onkogene führt zur Entstehung von T-ALL in TLR379^{-/-}-Mäusen

Als Nächstes wurde ein möglicher Mechanismus untersucht, wie die MuLV-Virämie in den TLR379^{-/-}-Mäusen zur Entstehung von Tumoren führen könnte. Eine Möglichkeit ist die Neuintegration der aktivierten MuLVs ins Wirtsgenom, was zur Aktivierung T-zellspezifischer Onkogene führen könnte. Um zu überprüfen, ob eine solche Neuintegration stattgefunden hat, wurden Southernblots von Milzen und Thymi verschiedener Mausgenotypen sowie von den aus TLR379^{-/-}-Mäusen isolierten Tumorzelllinien durchgeführt. Dabei wurde zunächst die pEco-DNA-Sonde verwendet, die eine ecotrope Form des MuLV erkennt. Dieser Provirus befindet sich nun einmal im Genom des C57BL/6-Stamms und wird Emv-2 genannt. In Abb. 4.56.A und B ist zu erkennen, dass es ausschließlich in der Milz und im Thymus von TLR379^{-/-}-Mäusen zu Neuintegrationen von MuLV-DNA ins Wirtsgenom gekommen ist. Hier sind bis zu fünf zusätzliche Insertionen von MuLV-Providiren zu sehen. Alle übrigen Genotypen (C57BL/6, TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR37^{-/-} und TLR79^{-/-}) zeigen dagegen nur die für Emv-2 typische Bande bei rund fünf kb. Diese Bande ist auch bei allen Tumorzelllinien aus den TLR379^{-/-}-Mäusen und EL-4 zu erkennen, fehlt aber bei WEHI-231, da diese aus dem BALB/c-Stamm generiert wurde. Auffällig ist, dass das Bandenmuster aus Milz und Thymus von TLR379^{-/-} nicht vollständig übereinstimmt, obwohl die DNA von den gleichen Mäusen stammt. Es gibt jeweils eine Integrationsstelle in dem einen Organ, die in dem anderen Organ nicht vorhanden ist.

Alle aus TLR379^{-/-}-Mäusen gewonnenen Tumorzelllinien zeigen Neuintegrationen von MuLV-Providiren (Abb. 4.56.B). Bei Baki-1 sind es vier, bei Aho-2 drei, bei Wuzel-5 fünf, bei Teno-4 und Mize-8 jeweils vier. Dabei besitzt jede Zelllinie ein individuelles Bandenmuster, lediglich die Emv-2-Bande ist bei allen vorhanden. Interessanterweise besitzt auch die Kontrollzelllinie EL-4 drei zusätzliche MuLV-Integrationsstellen.

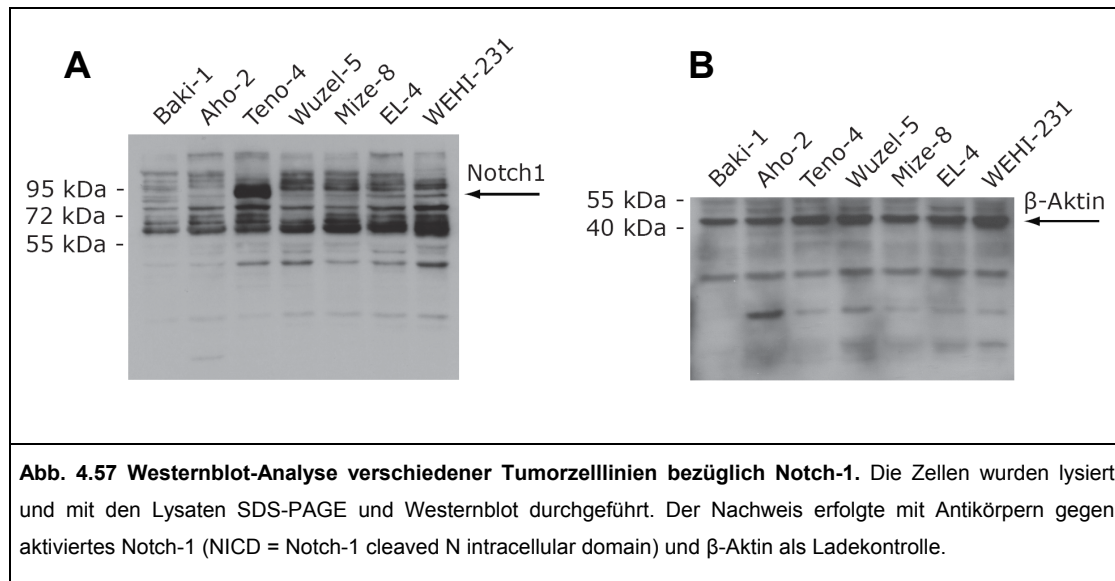
Die Southernblotanalysen wurden auch noch mit einer zweiten DNA-Sonde durchgeführt. Diesmal wurde eine Sonde verwendet, die eine Sequenz des Gens des MuLV-gag-Proteins erkennt. Sie ist nicht spezifisch für die ecotrope MuLV-Variante und ist daher in der Lage sehr viel mehr Integrationsstellen anzuzeigen (Abb. 4.56.C und D). Die Emv-2-Bande ist hier rund 3,7 kb groß und findet sich in den Genomen aller auf C57BL/6 basierender Mäuse und Zelllinien. In Abb. 4.56.C und D ist zu erkennen, dass es lediglich im Thymus der TLR379^{-/-}-Mäuse zu einer Neuintegration ins Wirtsgenom gekommen ist, nicht jedoch in C57BL/6, TLR7^{-/-}, TLR37^{-/-} und TLR79^{-/-}. Dies bestätigt die Ergebnisse mit der pEco-Sonde. Allerdings ist nur eine

zusätzliche Bande erkennbar. Weitere Banden könnten sich aber im schlecht aufgelösten Bereich oberhalb von 5,5 kb befinden, indem C57BL/6 insgesamt rund 60 Banden besitzt.



Die Analyse der Zelllinien zeigt in allen TLR379^{-/-}-Tumorzelllinien zusätzliche Integrationsstellen des MuLV-Provirus unterhalb des Bereichs von 5,5 kb: fünf bei Baki-1, sechs bei Aho-2, drei bei Wuzel-5 und vier bei Teno-4 (Abb. 4.56.C). Vergleicht man dies Ergebnis mit dem der pEco-Sonde (Abb. 4.56.B), so sind bei Baki-1 eine und bei Aho-2 sogar drei zusätzliche Integrationsstellen vorhanden, die mit der pEco-Sonde nicht nachzuweisen waren. Bei Wuzel-5

sind es dagegen zwei weniger, die sich vermutlich im Bereich oberhalb von 5,5 kb befinden. Bei Teno-4 zeigen pEco- und gag-Sonde gleich viele Neuintegrationsstellen an.

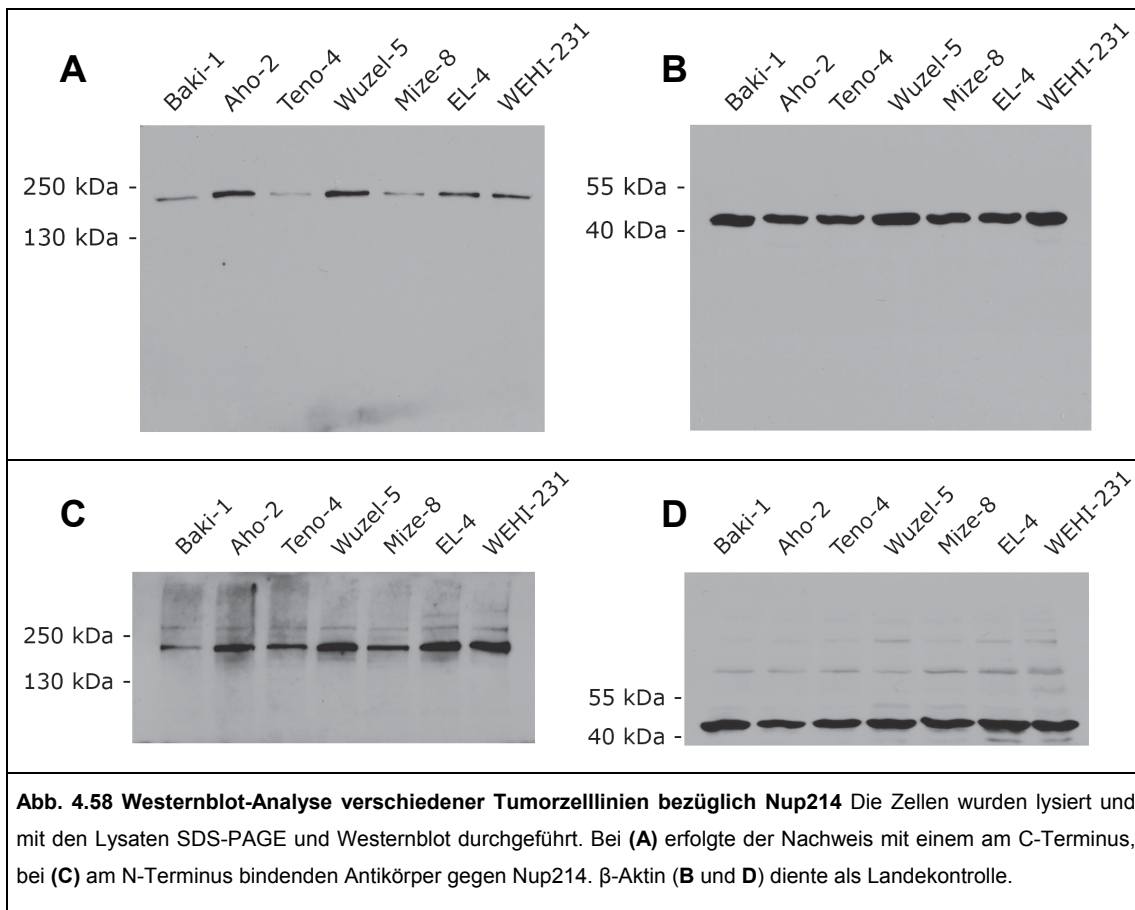


Heike Slomka konnte nachweisen, dass es in der Tumorzelllinie Teno-4 zu einer Insertion des MuLV-Provirus zwischen den letzten 150 bp des kodierenden Teils des Notch-1-Gens und dem 3'-UTR (untranslatierter Bereich), das ein destabilisierendes AU reiches regulatorisches Element (ARE) enthält, gekommen ist. Des weiteren konnte sie eine Insertion im Gen des Kernporenproteins Nup214 nachweisen. In den Zelllinien Baki-1, Teno-4 und Mize-8 befindet sich der Provirus in einem Intron zwischen den Exons 16 und 17.

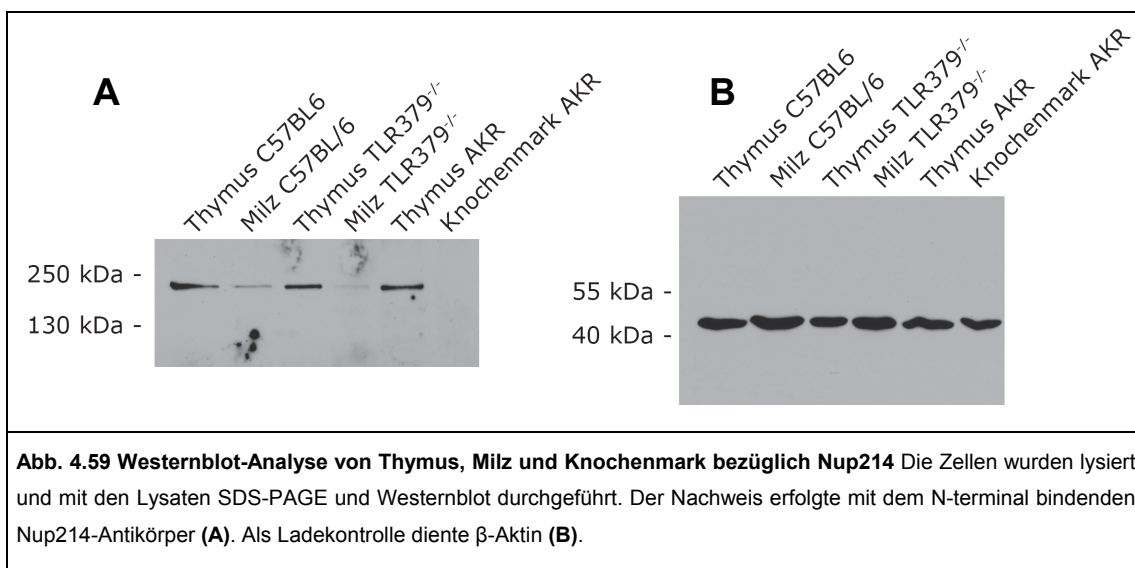
Um die Auswirkungen dieser Insertionen in die beiden Onkogene auf Proteinebene zu untersuchen, wurden verschiedene Westernblots mit den aus TLR379^{-/-}-Mäusen generierten Tumorzelllinien und den Kontrollzelllinien EL-4 und WEHI-231 durchgeführt. In Abb. 4.57 ist zu erkennen, dass die Insertion von MuLV in das Notch-1-Gen von Teno-4 zu einer starken Überexpression des Proteins führt. Als Nächstes wurde die Proteinexpression von Nup214 analysiert. In Abb. 4.58.A wurde hierbei ein Antikörper verwendet, der am C-terminalen Teil von Nup214 bindet, während sich der Antikörper in Abb. 4.58.C an einen N-terminalen Teil von Nup214 anlagert. Abb. 4.58.A zeigt daher nur die unveränderte wt-Form des Proteins, da der mutierten Form der C-terminale Teil aufgrund der Virusinsertion fehlt. In Abb. 4.58.C ist dagegen sowohl die mutierte als auch die wt-Form von Nup214 zu sehen, da der N-Terminus von der Insertion nicht betroffen ist. Beide Abbildungen zeigen eine deutliche Reduktion der Nup214-Expression in den Zelllinien mit einer Insertion im Nup214-Gen: Baki-1, Teno-4 und Mize-8.

Normiert auf EL-4 beträgt die Nup214-Expression (wt- und mutierte Form):

Baki-1	Aho-2	Teno-4	Wuzel-5	Mize-8	EL-4	WEHI-231
0,1	1,0	0,6	1,1	0,5	1	1,2



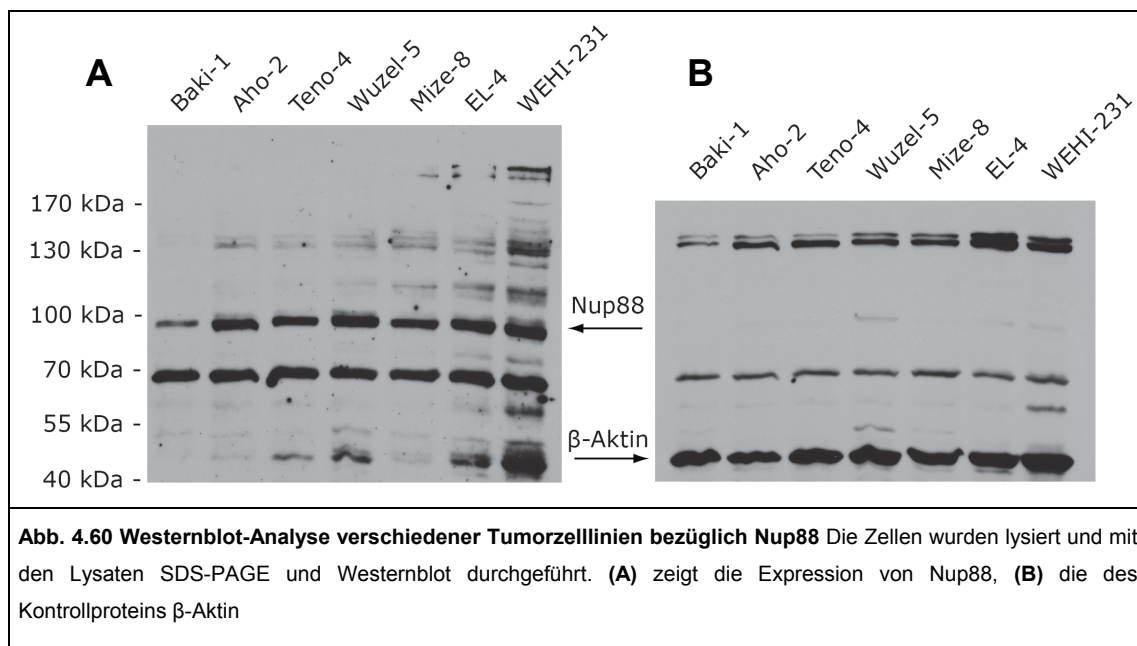
Um zu klären, warum Nup214 ein bevorzugtes Ziel für die Virusintegration in T-Zellen ist, wurden Westernblot-Analysen von Nup214 in Thymus, Milz und Knochenmark von C57BL/6-, TLR379^{-/-} und AKR-Mäusen durchgeführt (Abb. 4.59).



Bei AKR-Mäusen handelt es sich um einen Stamm, der eine AKR-Virämie (ein ecotropes MuLV) in allen Geweben zeigt. Zu erkennen ist, dass es im Thymus aller drei Stämme eine deutlich stärkere Expression von Nup214 gibt, als in der Milz. Im Knochenmark der AKR-Mäuse konnte

gar kein Nup214 nachgewiesen werden. Die starke Expression von Nup214 im Thymus erleichtert die Integration des Virusgenoms in die Wirts-DNA, was das Nup214-Gen zu einem bevorzugten Ziel für das MuLV in T-Zellen macht.

Da Nup214 zusammen mit Nup88 einen Subkomplex der Kernpore bildet, wurden die Auswirkungen der verringerten Nup214-Expression auf die Nup88-Expression mittels Westernblot untersucht (Abb. 4.60). Hier ist zu erkennen, dass eine Reduktion der Nup214-Expression auch zu einer Reduktion der Nup88-Expression führt (Baki-1, Teno-4 und Mize-8). Auffällig ist, dass in Baki-1, welches die geringste Nup214-Expression aufweist, auch die Nup88-Expression am schwächsten ist.



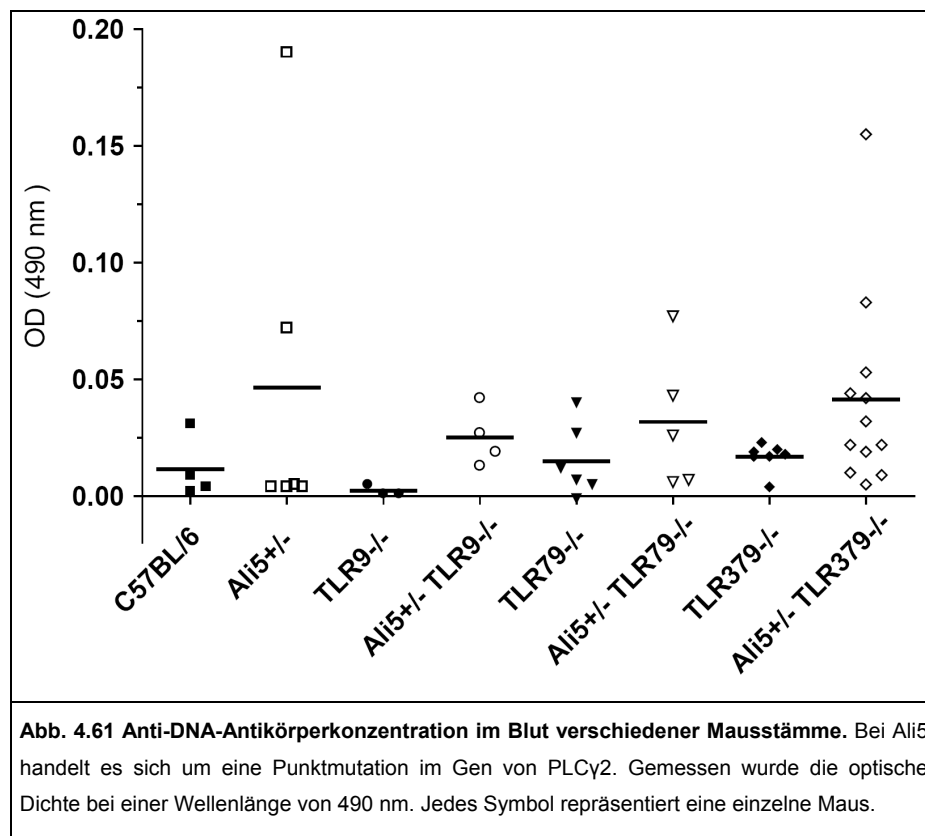
Es konnte somit gezeigt werden, dass es in der Milz und im Thymus von TLR379^{-/-}-Mäusen zu Neuintegrationen des aktivierten MuLV ins Wirtsgenom kommt. Gleiches konnte für die aus TLR379^{-/-}-Mäusen generierten Tumorzelllinien dargestellt werden. Des weiteren wurde nachgewiesen, dass die Insertion des MuLV-Provirus in die Onkogene Nup214 und Notch-1 zu einem deutlich veränderten Expressionsmuster der kodierten Proteine führt. Diese virusinduzierte Deregulierung T-zellspezifischer Onkogene könnte zur Entstehung der T-ALL beigetragen haben.

4.4.5. TLR379^{-/-}-Mäuse zeigen eine erhöhte Produktion autoreaktiver anti-DNA-Antikörper

Um zu Analysieren, welche Rolle die endosomalen, nukleinsäureerkennenden TLRs auf Autoimmunreaktionen haben, wurde die Menge von anti-DNA-Antikörpern im Blut verschiedener Mausstämmen mittels ELISA untersucht. Zunächst wurden 3 bis 5 Monate alte C57BL/6-, Ali5^{+/-}-, TLR9^{-/-}-, Ali5^{+/-}-TLR9^{-/-}-, TLR79^{-/-}-, Ali5^{+/-}-TLR79^{-/-}-, TLR379^{-/-}- und Ali5^{+/-}-TLR379^{-/-}-Mäuse analysiert. Die Ali5-Mäusen besitzen eine Punktmutation im Gen von PLC γ 2,

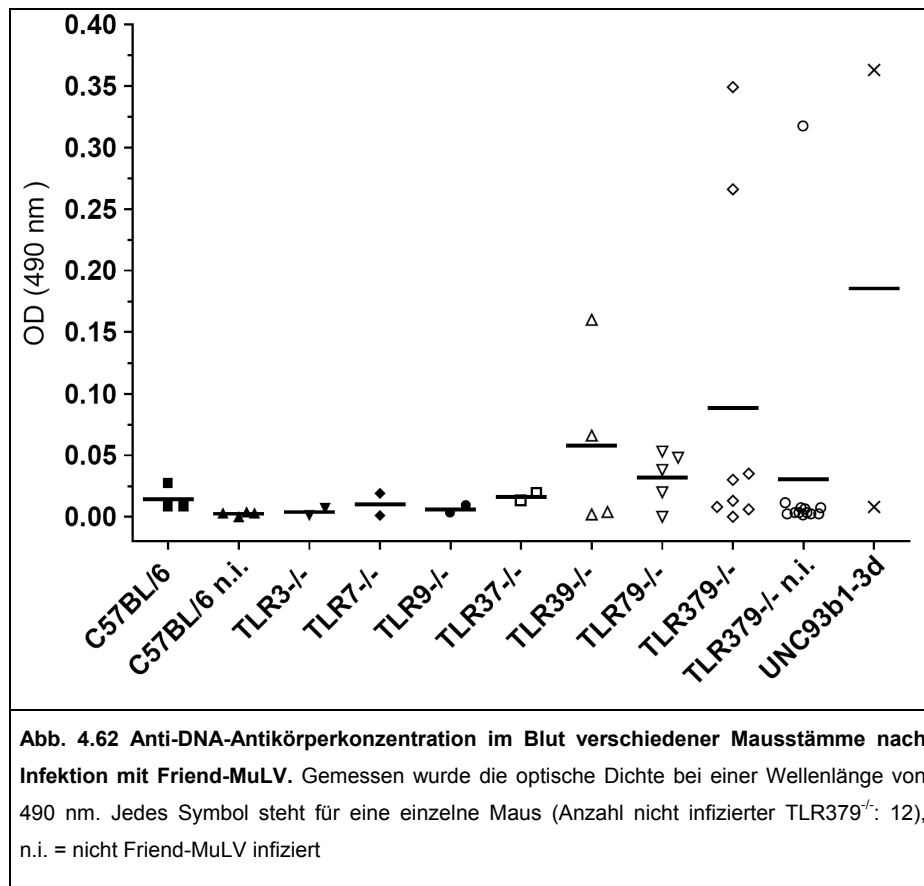
die zu einer erhöhten Autoimmunreaktion führt. Diese Tiere wurden mit TLR-*knock-out*-Mäusen gekreuzt.

Abb. 4.61 ist zu entnehmen, dass die Mäuse mit Ali5-Mutation eine höhere Menge anti-DNA-Antikörper entwickelten, als die Tiere ohne eine solche Mutation. Die stärkste Autoimmunreaktion zeigten Ali5^{+/-} und Ali5^{+/-}-TLR379^{-/-}. Dabei waren bei den Ali5^{+/-}-TLR379^{-/-} viele Tiere mit einem moderat erhöhten anti-DNA-Antikörper-Spiegel zu beobachten, während es bei den Ali5^{+/-} nur zwei von vier Mäusen gab, die einen hohen Spiegel aufwiesen. Etwas niedriger lag der Spiegel bei den Ali5^{+/-}-TLR79^{-/-}. Die geringste Autoimmunantwort unter den Ali5-Mäusen zeigte schließlich Ali5^{+/-}-TLR9^{-/-}.



Auch bei den Mäusen ohne Ali-5-Mutation wiesen die TLR379^{-/-} die stärkste und die TLR9^{-/-} die schwächste Autoimmunantwort auf. Etwas geringer als bei den TLR379^{-/-} war die anti-DNA-Antikörperproduktion der TLR79^{-/-}, die sich bei den C57BL/6 dann noch einmal leicht verringerte.

Um zu Analysieren welche Auswirkungen eine Virusinfektion auf die Autoimmunantwort von mindestens 5 Monate alten TLR3^{-/-}, 7^{-/-} und 9^{-/-}-Mäuse hat, wurden diese mit dem exogenen Retrovirus Friend-MuLV (1500 U pro Maus) infiziert und die anti-DNA-Antikörperkonzentration gemessen (Abb. 4.62). Zunächst ist festzustellen, dass die Autoimmunitätsreaktion in den infizierten C57BL/6 und TLR379^{-/-} stärker war als in den nicht infizierten. Auch hier zeigen die nicht infizierten TLR379^{-/-}-Mäuse eine stärkere Autoimmunantwort als die C57BL/6.



Betrachtet man die infizierten Mäuse, so liegen die anti-DNA-Antikörper-Spiegel der Einzel-*knock-out*-Mäuse (TLR3^{-/-}, TLR7^{-/-} und TLR9^{-/-}) etwa auf gleichem Niveau, leicht niedriger als der der C57BL/6-Mäuse. TLR37^{-/-} hat ungefähr die gleiche Konzentration von anti-DNA-Antikörpern im Blut wie C57BL/6. Die stärkste Autoimmunreaktion zeigen die Unc93b1-3d und die TLR379^{-/-}, die beide keine nukleinsäureerkennenden TLRs exprimieren können. Etwas schwächer als bei diesen ist die Autoimmunantwort bei den TLR39^{-/-} und TLR79^{-/-}. Einen erhöhten anti-DNA-Antikörper-Spiegel zeigen somit TLR9 defiziente Mäuse, bei denen auch einer oder beide RNA erkennende TLRs fehlen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass TLR379^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Autoimmunreaktion aufweisen. In etwas geringerem Ausmaß gilt dies auch für TLR9 defiziente Tiere bei denen nur einer der beiden RNA erkennenden TLRs fehlt. Im Gegensatz dazu zeigen TLR9^{-/-}-Mäuse eine verminderte Autoimmunantwort. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Virusinfektion insbesondere bei TLR379^{-/-}-Mäusen zu einer Erhöhung des anti-DNA-Antikörper-Spiegels führt.

5. Diskussion

5.1. Aktive systemische Anaphylaxie wird in IgE-knock-in-Mäusen durch IgE und nicht durch IgG1 vermittelt

Gegenwärtig ist es nicht möglich Allergien tatsächlich und dauerhaft zu heilen. Meist werden nur die Symptome z.B. mit Antihistaminika oder Corticosteroiden behandelt. Die einzige Therapie allergischer Erkrankungen stellt bis heute die Hyposensibilisierung dar. Sie führt jedoch meist nicht zu einer dauerhaften Heilung, ist zeit- und kostenintensiv und kann zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen führen (Luger, Wegmann et al.). Da es außerdem in den letzten Jahren und Jahrzehnten zu einem drastischen Anstieg allergischer Erkrankungen, insbesondere in den Industrieländern gekommen ist, müssen dringend neue, sichere und zuverlässige Therapieformen gefunden werden. Zur Entwicklung neuer Therapiestrategien, die IgE als Zielmolekül haben, ist es notwendig die Regulationsmechanismen der IgE-Expression zu verstehen und die biologische Funktion von IgE während der Immunantwort zu analysieren.

Die IgE-knock-in-Mäuse wurden generiert (Philipp Yu, unpublizierte Daten), um Erkenntnisse über die Bedeutung von IgE und IgG1 bei allergischen Reaktionen zu gewinnen. Bei gesunden Menschen, wie auch bei der Wildtypmaus, wird die IgE-Expression streng kontrolliert. Dies hat zur Folge, dass die IgE-Konzentration im Serum unter normalen Umständen um rund zwei Größenordnungen unter der von IgG liegt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich die IgE-Konzentration im Serum naiver homozygoter IgE-knock-in-Mäuse gegenüber dem Wildtyp verzehnfacht hat, also nur noch eine Größenordnung unterhalb von IgG liegt (Abb. 4.2.A und 4.3.A). Der IgE-Spiegel des Wildtyps lag bei den Messungen allerdings im Mikrogrammbereich und damit deutlich über den in der Literatur (Burton and Oettgen) beschriebenen Werten. Ursache hierfür war vermutlich, dass die angegebene Standardkonzentration bei den Messungen niedriger war als die Tatsächliche. Dies hatte zwar zur Folge, dass sich die Absolutwerte der IgE-Konzentration erhöhten, hatte jedoch keinen Einfluss auf die relativen Werte.

Obwohl das IgE in den IgE-knock-in-Mäusen den genetischen Regulationsmechanismen von IgG1 unterliegt, bleibt die Konzentration im Serum homozygoter Mäuse um eine Größenordnung unterhalb der von IgG1. Eine Ursache hierfür könnten die deutlich unterschiedlichen Halbwertszeiten von IgE und IgG1 im Plasma sein. Sie beträgt für IgE nur 12 h während sie für IgG1 mit 144 bis 192 h eine Größenordnung höher ist (Vieira and Rajewsky 1988). Verantwortlich für die unterschiedlichen Halbwertszeiten zwischen IgE und IgG1 ist vermutlich der Neonatale Fcγ-Rezeptor (FcRn), der IgG mit hoher Affinität bindet. Endothelzellen nehmen das IgG durch Pinozytose auf, wo es gebunden an den FcRn im Lumen der Endosomen vor dem Abbau geschützt ist. Anschließend wird es wieder an die Zelloberfläche transportiert und ins Blut freigesetzt (Ghetie, Hubbard et al. 1996), (Ghetie and Ward 2000), (Lu, Zhao et al. 2007), (Roopenian, Christianson et al. 2003). Auch der postulierte negative regulatorische Effekt

durch CD23 (Yu, Kosco-Vilbois et al. 1994) könnte zum geringeren IgE-Spiegel beigetragen haben.

Wie aufgrund der *Knock-in*-Strategie zu erwarten war, zeigen die homozygoten IgE-*knock-in*-Mäuse eine vollständige IgG1-Defizienz (Abb. 4.2.B und 4.3). Interessanterweise ist der IgG1-Spiegel im Serum heterozygoter Mäuse nicht signifikant reduziert, obwohl ihnen ein IgG1-Allel fehlt. Auch die IgG2b-Konzentration weist keine signifikante Änderung gegenüber dem Wildtyp auf, liegt tendenziell aber niedriger. Ursache für beide Phänomene könnte ein leicht erhöhtes IL-4-Niveau sein, was einerseits zu einer verstärkten Expression von IgG1 führen würde, um das fehlende Allel zu kompensieren, andererseits den Isotypenwechsel zu IgG2b hemmen würde (Huston 1997). Auch die IgM-Konzentration in den *Knock-in*-Mäusen zeigt gegenüber dem WT keine signifikante Veränderung, was auf eine normale humorale Immunantwort vor dem Isotypenwechsel hindeutet.

Ein Wechsel vom C57BL/6- zum BALB/c-Hintergrund bestätigt im Wesentlichen die Aussagen. Die IgE-Expression liegt bei den BALB/c-*knock-in*-Mäusen allerdings etwas höher als bei denen mit C57BL/6-Hintergrund (Abb. 4.4.A). Ursache hierfür könnte das bei BALB/c gegenüber C57BL/6 erhöhte IL-4-Niveau sein (Trunova 2011). Auch hier produzieren die homozygoten Tiere kein IgG1, während die Expression bei den heterozygoten, im Gegensatz zu den entsprechenden C57BL/6-Mäusen, signifikant um 60% verringert wurde. Dies könnte durch die unterschiedliche IL-4-Regulation in den beiden Mausstämmen verursacht worden sein, die dafür sorgt, dass die IL-4-Expression im BALB/c-*knock-in*-Stamm gegenüber dem WT nicht zunimmt und so die Wirkung des fehlenden IgG1-Allels voll zum Tragen kommt.

Für den Isotypenwechsel zu IgG1 ist eine viel niedrigere IL-4-Konzentration notwendig, als für den zu IgE (Snapper, Finkelman et al. 1988). Um zu überprüfen, ob sich diese Eigenschaft bei den *Knock-in*-Mäusen auf das IgE übertragen hat, wurden Milzzellen mit LPS und IL-4 stimuliert. Hier zeigte sich, dass die IgE-*knock-in*-Zellen IgE bereits bei einer geringen Konzentration (50 U/ml) IL-4 exprimieren, im Gegensatz zu den wt-Zellen (Abb. 4.5.A). Letztere produzierten IgE erst bei Stimulation mit einer hohen (500 U/ml), IgG1 dagegen schon bei Stimulation mit einer niedrigen Konzentration IL-4 (Abb. 4.5.A und B). Somit konnte der Nachweis für eine geringere IL-4-Abhängigkeit der IgE-Expression in IgE-*knock-in*-Mäusen erbracht werden.

Die Expressionsmuster von IgE in den IgE^{ki/ki} und von IgG1 im WT gleichen sich weitgehend. Anders als im Serum liegen die Mengen von IgE im Überstand der IgE^{ki/ki}-Zellen und von IgG1 im Überstand der wt-Zellen auf vergleichbarem Niveau. Dies könnte daran liegen, dass sich die Halbwertszeiten der beiden Isotypen *in vitro* nicht wesentlich unterscheiden, da der Abbau der Immunglobuline *in vivo* hauptsächlich von der Leber durchgeführt wird (Henderson, Baynes et al. 1982).

Auch *in vitro* konnte die IgG1-Defizienz homozygoter IgE-*knock-in*-Mäuse bestätigt werden (Abb. 4.5.B). Bei Stimulation mit einer geringen Menge IL-4 konnte zwischen den wt- und IgE^{w^t/ki}-Mäusen kein signifikanter Unterschied in der IgG1-Produktion festgestellt werden. Hier gleichen sich also die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse (Abb. 4.2.B). Bei Stimulation mit einer hohen Konzentration IL-4 produzierte IgE^{w^t/ki} dagegen signifikant 40% weniger IgG1 als der WT.

Auch dies lässt sich mit einer höheren IL-4-Produktion der *Knock-in*-Mäuse erklären: Die verwendeten Milzzellen enthielten nicht nur B-Zellen, sondern auch IL-4 produzierende T_H2-Zellen. Exprimieren die IgE^{wt/ki}- T_H2-Zellen mehr IL-4 als die entsprechenden wt-Zellen, könnte dies für einen verstärkten Isotypenwechsel in Richtung IgG1 sorgen und so den Verlust eines IgG1-Allels ausgleichen. Werden jedoch hohe Mengen IL-4 hinzugefügt, ist der Anteil von endogenem IL-4 an der Gesamtmenge zu gering und es gibt keinen nennenswerten IL-4-Konzentrationsunterschied im Medium von wt- und IgE^{wt/ki}-Milzzellen. Folglich geht die IgG1-Expression der IgE^{wt/ki}-B-Zellen signifikant zurück.

Bei der IgM-Expression zeigten sich auch *in vitro* keine wesentlichen Unterschiede zwischen wt- und IgE-*knock-in*-Mäusen. Nach Zugabe von IL-4 kam es bei allen drei Genotypen zu einem ungestörten Isotypenwechsel von IgM in Richtung IgE bzw. IgG1, wodurch sich die IgM-Konzentration verringert (Snapper, Finkelman et al. 1988).

Ein Wechsel zum BALB/c-Hintergrund bestätigt die Ergebnisse der Stämme auf C57BL/6-Basis. Die BALB/c-IgE^{ki/ki}-B-Zellen produzierten allerdings schon ohne Zugabe von exogenem IL-4 beträchtliche Mengen IgE (Abb. 4.6.A), im Gegensatz zu den entsprechenden C57BL/6-Zellen (Abb. 4.5.A). Bei Zugabe geringer Mengen IL-4 verstärkte sich die Expression, aber auch die BALB/c-wt-Zellen exprimierten jetzt geringe Mengen IgE, was die C57BL/6-Zellen bei dieser Konzentration nicht taten. Ursache dürfte die höhere endogene IL-4-Produktion der BALB/c-T_H1-Zellen im Vergleich zu den entsprechenden C57BL/6-Zellen sein (Trunova 2011). Erneut gleichen sich die Expressionsmuster von IgE in den homozygoten IgE-*knock-in*-Mäusen und von IgG1 im WT. Hierbei spielt es keine Rolle, ob mit LPS, CpG1668 oder R848 stimuliert wurde (Abb. 4.6 und 4.7).

Somit konnte die Funktionalität der *Knock-in*-Strategie *in vivo* und *in vitro* bestätigt werden. Mit den IgE-*knock-in*-Mäusen liegt also ein Modell vor, mit dem sich der Einfluss der genetischen Region auf die Regulation der IgE-Synthese studieren lässt. Bei der bisher verwendeten klassischen transgenen Strategie war dies aufgrund der Positionseffekte nicht möglich. Hierbei wurden die Gene für TNP-OVA spezifisches IgE an zufälliger Stelle ins Genom der Mäuse eingebaut (Matsuoka, Taya et al. 1999), (Adamczewski, Kohler et al.). Die Folge davon war eine veränderte Regulation des exprimierten rekombinanten IgEs und ein monoklonaler Ursprung. Dies erlaubt nur einen unzureichenden Einblick in die Regulation der IgE-Synthese und daher eine stark eingeschränkte Aussagekraft bezüglich der Regulierung der Allergieentstehung. Demgegenüber wird in den IgE-*knock-in*-Mäusen die natürliche VDJ-Genregion verwendet und es kommt zur Entwicklung von polyklonalen IgE-Antikörperantworten gegen jedes verabreichte Antigen und nicht nur eine monoklonale IgE-Produktion gegen ein einzelnes Modellantigen.

Die B-Zellen von IgE-*knock-in*-Mäusen weisen eine normale Entwicklung auf (Abb. 4.8). Von besonderem Interesse sind dabei solche mit membranständigem IgE auf ihrer Oberfläche. Die Kenntnisse über die Funktion von membrangebundenem IgE sind auch heute noch sehr begrenzt. Bekannt ist, dass die Transmembrandomäne von IgE für eine T-Zellabhängige IgE-vermittelte Immunantwort unverzichtbar ist und der zytoplasmatische Teil die Quantität und Qualität des produzierten IgEs mitbestimmt (Achatz, Nitschke et al. 1997). Die mRNA der löslichen, wie auch der membranständigen Form der schweren Kette von IgE werden aus der

gleichen Vorläufer mRNA durch alternatives Spleißen erzeugt. Dabei wird in aktivierten B-Zellen 20 bis 100 mal mehr mRNA der löslichen Form produziert als von Membran-IgE. Als Ursache hierfür gilt eine unterschiedliche Polyadenylierungsfrequenz der beiden mRNA-Formen. Die Polyadenylierung hat einen positiven Effekt auf die mRNA-Stabilität, ihren Export aus dem Nukleus und die Translation. Beim Genlocus der schweren Kette aller Immunglobuline befindet sich eine Polyadenylierungsstelle zwischen dem letzten Exon des löslichen Teils und dem ersten Exon der Transmembrandomäne. Einzigartig sind allerdings die drei Polyadenylierungsstellen am 3'-Ende, hinter den Transmembranexons von IgE. Diese haben eine starke Abweichung von der Konsensussequenz, im Gegensatz zu allen anderen Isotypen, bei denen auch nur eine solche Stelle vorhanden ist. Als Folge davon wird der mRNA des Membran-IgEs seltener ein Poly(A)-Schwanz angehängt, wodurch es letztlich zu einer geringeren Expression von membranständigem IgE kommt (Karnowski, Achatz-Straussberger et al. 2006). Dies wiederum hat Konsequenzen für die IgE-Konzentration im Blut: Die Expression von Membran-IgE ist notwendig für das Überleben von B-Zellen, die einen Isotypenwechsel in Richtung IgE durchlaufen haben (Achatz, Nitschke et al. 1997). Eine geringe Expression von mIgE senkt daher die Anzahl an IgE positiven Zellen und damit den IgE-Titer im Serum.

In den IgE-*knock-in*-Mäusen stammen die Transmembranexons und auch die nachfolgende Polyadenylierungsstelle des transferierten IgEs dagegen von IgG1. Daher sollte die Anzahl von B-Zellen mit membranständigem IgE deutlich höher sein als beim WT. In der Milz konnten sie *in vivo* jedoch nicht gefunden werden (Abb. 4.9.B). Zu beobachten war allerdings eine stärkere Absättigung der IgE-Bindung an CD23 aufgrund der höheren IgE-Konzentration im Plasma der *Knock-in*-Mäuse verglichen mit dem WT. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die B-Zellen der CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} etwas mehr IgE auf ihrer Oberfläche hatten als die der CD23^{-/-}. Da die gesamte B-Zellpopulation davon betroffen war, muss es sich um eine passive Bindung an einen Rezeptor handeln, der auf allen B-Zellen exprimiert wird und IgE mit geringer Affinität bindet. Hierbei könnte es sich um FcγRII (CD32) handeln, einem Rezeptor mit geringer Affinität zu IgG, der bei hoher Konzentration auch IgE mit geringer Affinität bindet (Takizawa, Adamczewski et al. 1992; Gould, Sutton et al. 2003).

Bei *in vitro*-Experimenten, bei denen Milzzellen aus wt- und CD23^{-/-}-IgE-*knock-in*-Mäusen mit LPS und IL-4 stimuliert worden waren, konnten bei letzteren deutlich erhöhte Mengen von B-Zellen mit membranständigem IgE festgestellt werden (Abb. 4.11). Auch hier ähneln sich die Expressionsmuster von IgE in den *Knock-in*-Mäusen und von IgG1 im WT: Bei Stimulation mit LPS alleine sind nur wenige IgE⁺-Zellen bei CD23^{-/-} IgE^{wt/ki}/IgE^{ki/ki} und nur wenige IgG1⁺-Zellen beim WT und CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} entstanden (Abb. 4.10 und 4.11). Wurde durch Zugabe von IL-4 der Isotypenwechsel induziert, so stieg der Anteil IgE⁺-Zellen bei den *Knock-in*-Mäusen auf rund 15%, während die IgG1⁺-Zellen beim WT etwa 23% aller Zellen ausmachten. Hierbei sind zwei Dinge bemerkenswert: 1. Es gibt weniger IgE⁺-Zellen bei den *Knock-in*-Mäusen als IgG1⁺-Zellen beim WT. 2. Es gibt ebenso viele IgE⁺-Zellen in den heterozygoten wie in den homozygoten CD23^{-/-}-IgE-*knock-in*-Mäusen. Wäre die Menge der IgE⁺-Zellen einzig von der Switch-Region und der Polyadenylierungsstelle hinter den Transmembranexons abhängig, müsste die Anzahl

von IgE positiven Zellen in den *Knock-in*-Mäusen ebenso groß sein wie die der IgG1 positiven Zellen im WT. Außerdem sollte es in den heterozygoten nur etwa halb so viele IgE⁺-Zellen geben wie in den homozygoten Mäusen. Es muss also weitere Mechanismen geben, die die Expression von membranständigem IgE beeinflussen, z.B. posttranslationale Prozesse.

Das Transkriptionsmuster von mIgE, mIgG1 und mIgE-IgG1 stimmt gut mit der Expression der entsprechenden Proteine auf den B-Zellen überein (Abb. 4.10 bis 4.12). Auch gibt es große Ähnlichkeiten in der Transkription zwischen mIgE-IgG1 in den homozygoten Zellen und von mIgG1 in wt-Zellen. So gibt es eine verringerte IL-4-Abhängigkeit bei der mIgE-IgG1-mRNA-Synthese, was sich daran erkennen lässt, dass es bereits bei einer Stimulation mit LPS alleine bzw. mit LPS und einer geringen Menge IL-4 zu einer Transkription gekommen ist. Unter diesen Bedingungen kam es dagegen nicht zu einer mIgE-mRNA-Expression.

In Abb. 4.13.C ist zu sehen, dass es bei den homozygoten IgE-*knock-in*-Milzzellen zu einem quantitativen Rückgang der mIgE-IgG1-Transkription kommt, wenn mit 500 U/ml statt mit 50 U/ml IL-4 stimuliert wurde. Dabei erreicht die mIgE-IgG1-mRNA-Expression bei der hohen IL-4-Konzentration vermutlich früher ihren Höhepunkt, als bei der niedrigen Konzentration. Anschließend wird die mIgE-IgG1-Transkription und -Expression herunterreguliert, während sich die Expression der löslichen Form erhöht. Dies erklärt, warum bei 500 U/ml IL-4 weniger mIgE-IgG1-mRNA, aber mehr lösliches IgE exprimiert wird als bei 50 U/ml (Abb. 4.5).

Das Ergebnis zeigt, dass das chimäre membranständige IgE-Molekül *in vitro* auf die Zelloberfläche transportiert werden kann, wenn auch mit einer etwas geringeren Effizienz als natürliches IgG1. *In vivo* konnten in der Milz allerdings keine B-Zellen mit membranständigem IgE gefunden werden. Bisher gibt es nur indirekte Nachweise für die Existenz von Oberflächen-IgE auf B-Zellen des WTs (Achatz, Nitschke et al. 1997). Auch transgene Mäuse zeigten *in vivo* keine detektierbaren Mengen von mIgE exprimierenden Zellen (Adamczewski, Kohler et al. 1991). Daraus ergibt sich, dass solche Zellen in Mäusen (auch in IgE-*knock-in*-Mäusen) generell selten sind oder sie eine andere Lokalisierung als die Milz haben. Möglicherweise spielen IgE positive B-(Gedächtnis-)Zellen *in vivo* keine große Rolle, da sich IgE exprimierende Plasmazellen aus IgG positiven B-Gedächtniszellen entwickeln können (Jung, Siebenkotten et al. 1994; Luger 2003). Möglicherweise befinden sich aber im Knochenmark der *Knock-in*-Mäuse größere Mengen B-Zellen mit membranständigem IgE. So konnte nachgewiesen werden, dass sich IgE sekretierende Plasmoblasten aus IgE-IgG1-chimären *knock-in*-Mäusen (KN1-Mäuse) effizienter in Richtung des Chemokins CXCL12 in Plasmazellnischen des Knochenmarks bewegen als entsprechende wt-Zellen (Achatz-Straussberger, Zaborsky et al. 2008).

B-Zellen mit membrangebundenem IgE auf der Oberfläche könnten wichtige Angriffspunkte bei der Allergitherapie sein. So konnte mit Hilfe eines Antikörpers gegen mIgE die Menge von antigenspezifischem IgE im Serum deutlich gesenkt werden (Feichtner, Infuhr et al. 2008). Die Interaktion zwischen Antikörper und mIgE induziert eine rezeptorvermittelte Apoptose der betroffenen IgE-B-Gedächtniszellen und hindert sie daran sich zu IgE sekretierenden Plasmoblasten und Plasmazellen zu differenzieren. Auch der in der Asthmatherapie eingesetzte humanisierte monoklonale Antikörper Omalizumab, der an die Fc-Region des IgE-Moleküls bindet, wirkt möglicherweise nicht nur weil er an löslichem IgE bindet, sondern auch an

membrangebundenem IgE (Achatz, Achatz-Straussberger et al. 2006; Feichtner, Infuhr et al. 2008). Die Therapie von Allergien im Menschen könnte also von einem besseren Verständnis von Membran-IgE positiven Zellen profitieren und ihrer *in vivo* Expression und Lokalisierung.

Nach der Immunisierung mit dem Modellantigen TNP-OVA kommt es in den *Knock-in*-Mäusen zu einer starken Expression von TNP-OVA spezifischem IgE. So bildeten die $IgE^{wt/ki}$ 11 mal mehr und die $IgE^{ki/ki}$ 42 mal mehr spezifisches IgE als der WT (Abb. 4.17.A). Bei der Expression von spezifischem IgG1 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen $IgE^{wt/ki}$ und dem WT, während $IgE^{ki/ki}$ kein spezifisches IgG1 produzieren konnte (Abb. 4.17.B).

Unerwartet war ein im Vergleich zum WT signifikanter Anstieg beim TNP-OVA spezifischen IgG2b-Spiegel, was bei der Totalkonzentration naiver Mäusen nicht zu beobachten gewesen ist (Abb. 4.17.E und 4.2.C). Auch die antigenspezifische IgG3- und IgM-Spiegel der *Knock-in*-Mäuse weisen eine Erhöhung auf, auch wenn diese zum Teil nicht signifikant ist (Abb. 4.17.F und G). Ursache hierfür könnte sein, dass die B-Zellen der *Knock-in*-Mäuse, aufgrund des höheren IgE-Niveaus, über CD23 verstärkt IgE-Antigenkomplexe aufnehmen. Diese auf der Zelloberfläche befindlichen Komplexe könnten dann benachbarte Dendritische Zellen dazu anregen über Pinozytose oder Endozytose Antigene aufzunehmen. Alternativ zu diesem Mechanismus ist es auch vorstellbar, dass die B-Zellen die CD23-IgE-Antigenkomplexe über Endozytose aufnehmen und dann über endosomale Partikel zu den Dendritischen Zellen transportieren. Anschließend präsentieren diese das Antigen den $CD4^+$ -T-Zellen (Henningsson, Ding et al.). Dies könnte die spezifische Immunantwort verstärken und zu einer erhöhten IgG- und IgM-Expression führen. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass es in CD23 defizienten *IgE-knock-in*-Mäusen keine verstärkte antigenspezifische IgG2b-Expression gibt und die Überexpression von IgG3 und IgM schwächer ausfällt (Abb. 4.18.F und G). Weitere Studien müssen den genauen Mechanismus der Überexpression von antigenspezifischem IgG2b, IgG3 und IgM in den *Knock-in*-Mäusen aufklären.

Im Übrigen kommt es auch in den immunisierten CD23 defizienten *IgE-knock-in*-Mäusen zu einem starken Anstieg der TNP-OVA spezifischen IgE-Konzentration im Serum. Dieser fällt im Vergleich zu $CD23^{-/-}$ -Tieren aber nur halb so stark aus wie der von *Knock-in*-Mäusen mit dem WT. Ursache dürfte der im Vergleich zum WT erhöhte IgE-Spiegel in den CD23 defizienten Tieren sein (Yu, Kosco-Vilbois et al. 1994). Auch hier exprimieren die homozygoten Tiere kein antigenspezifisches IgG1, während es diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen dem WT und den heterozygoten Mäusen gibt.

Mit den immunisierten Mäusen wurden Anaphylaxieexperimente durchgeführt. Bei der Induktion einer Anaphylaxie werden im wesentlichen zwei verschiedene Paradigmen diskutiert. Das klassische Paradigma besagt, dass IgE sensibilisierte Mastzellen mit Histamin als Mediator die dominanten Faktoren sind (Khodoun, Strait et al.). Der alternative Weg führt dagegen über IgG1 sensibilisierte Basophile mit PAF als Mediator (Tsuji-mura, Obata et al. 2008). Die Bedeutung dieser IgG1-vermittelten Anaphylaxie ist allerdings umstritten. Sie konnte noch niemals außerhalb des Labors nachgewiesen und auch beim Menschen noch nicht beobachtet werden (Finkelman 2007). Bei den Schlüsselexperimenten hierzu wurde eine passive systemische Anaphylaxie (PSA) induziert, indem allergenspezifisches IgG1 oder IgE injiziert und die

Anaphylaxie durch die i.v. Injektion des Allergens ausgelöst wurde. Die Depletion der Basophilen mit Hilfe des Antikörpers Ba103 zeigte dabei eine essenzielle Rolle von IgG1 und nicht von IgE. Die Verwendung der PSA hat gegenüber der aktiven systemischen Anaphylaxie (ASA) jedoch gravierende Nachteile: Die Reaktion ist von monoklonaler Natur, es kommt nicht zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses und nicht zur Voraktivierung beteiligter Zellen. Außerdem kann die Menge an Antikörpern nicht durch Regulationsprozesse beeinflusst werden. All diese Dinge beeinflussen jedoch eine systemische Anaphylaxie unter natürlichen Bedingungen. Die PSA ist also ein sehr artifizielles und somit fehleranfälliges Modell.

Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass der Basophilenanteil im Blut von *wt*- und *Knock-in*-Mäusen rund 1% aller Zellen betrug. Des Weiteren zeigte sich, dass auf den Basophilen der *Knock-in*-Mäusen etwa doppelt so viel IgE durch passive Bindung an FcεRI gebunden war als an denen des WTs, verursacht durch den höheren IgE-Spiegel (Abb. 4.14.A und B). Somit konnte in den *Knock-in*-Mäusen sowohl an B-Zellen (durch CD23), als auch an Basophilen (durch FcεRI) *in vivo* eine starke passive Absättigung an IgE festgestellt werden.

Durch die größere Absättigung der FcεRI mit IgE kommt es nach Zugabe des Antigens zu einer stärkeren Kreuzvernetzung und somit zu einer verstärkteren Aktivierung der Basophilen, was eine höhere Freisetzung von ASA auslösenden Botenstoffen zur Folge hat.

Die stärkste Anaphylaxie konnte bei IgE^{ki/ki}-Mäusen beobachtet werden, da sie einen starken Temperaturrückgang und eine Sterberate von 40% aufwiesen (Abb. 4.19 und 4.21.B). Insgesamt war der Temperaturrückgang bei den IgE^{ki/ki}- und IgE^{wt/ki}-Mäusen größer und länger anhaltend als beim WT. Bemerkenswert ist, dass es keinen Unterschied beim Temperaturabfall zwischen den homo- und heterozygoten Tieren gab, aber nur homozygote Mäuse starben. Möglicherweise ist der beobachtete Temperaturrückgang der maximal höchste, der mit dem Überleben der IgE^{ki/ki} vereinbar ist, d.h. bei einer noch stärkeren ASA sterben die Tiere und ein weiterer Temperaturabfall ist nicht zu beobachten.

Vergleicht man den Temperaturrückgang und die Sterbekurven von CD23 defizienten mit CD23 kompetenten IgE-*knock-in*-Mäusen (Abb. 4.21), so kann man feststellen, dass es bei den CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} den stärksten Temperaturrückgang, die langsamste Erholung und die höchste Sterberate gab. Sie zeigten auch einen deutlicheren Temperaturrückgang und eine langsamere Erholung als IgE^{ki/ki}. Dagegen war der Temperaturabfall bei den CD23^{-/-} IgE^{wt/ki} geringer als bei den IgE^{wt/ki}. Sie wiesen allerdings eine Sterberate von 20% auf, während keines der IgE^{wt/ki}-Tiere starb. Den geringsten Temperaturrückgang zeigten schließlich die CD23^{-/-}-Mäuse, der etwas niedriger ausfiel als der des WTs. Betrachtet man nur den Temperaturrückgang, so ist zu erkennen, dass dieser bei den CD23 defizienten Tieren weniger stark ist, wenn diese IgG1 exprimieren (CD23^{-/-} und CD23^{-/-} IgE^{wt/ki}). Deutlicher fällt der Temperaturabfall allerdings bei CD23^{-/-} IgE^{ki/ki} aus, die IgG1 defizient sind. Ein hoher antigenspezifischer IgG-Spiegel ist in der Lage eine IgE induzierte Anaphylaxie zu blockieren oder abzumildern (siehe Kapitel 1.5) (Strait, Morris et al. 2006). Es ist bekannt, dass immunisierte CD23 defiziente Mäuse nicht nur eine erhöhte spezifische IgE-Konzentration, sondern auch ein erhöhtes IgG1-Niveau aufweisen (Yu, Kosco-Vilbois et al. 1994; Lewis, Rapsomaniki et al. 2004). Daher ist es möglich, dass der erhöhte spezifische IgG1-Spiegel die IgE induzierte Anaphylaxie in den CD23 defizienten

Mäusen abmildert. In den $CD23^{-/-}$ $IgE^{ki/ki}$ ist dies jedoch nicht möglich und die höhere IgE-Konzentration führt zur Ausbildung einer verstärkten ASA. Allerdings starben 20% der $CD23^{-/-}$ $IgE^{wt/ki}$, jedoch keine $IgE^{wt/ki}$. Ursache hierfür könnte die Sensibilität des Gleichgewichts zwischen IgG1 und IgE sein. Liegt die spezifische IgE-Konzentration höher oder die IgG1-Konzentration niedriger, kann das IgG1 nicht mehr genug Antigene blockieren, was eine Verstärkung der ASA und den Tod der Tiere zur Folge hat. Die genaue Bedeutung von CD23 in einer IgE-vermittelten ASA in *IgE-knock-in*-Mäusen muss allerdings noch durch weitere Analysen aufgeklärt werden.

Da die Anaphylaxie IgE vermittelt war, zeigt der Nachweis von MMCP1 im Serum anaphylaktischer Mäuse (Abb. 4.23). Dieses Enzym wird durch die Degranulierung von Mastzellen frei und dient als Marker für eine IgE-induzierte ASA (Khodoun, Strait et al.). Die MMCP1-Konzentration ist dabei im Serum der *IgE-knock-in*-Mäuse deutlich erhöht, insbesondere der homozygoten Tiere. Sie korreliert also mit der IgE-Konzentration und der Stärke der Anaphylaxie.

Insgesamt konnte die stärkste Anaphylaxie bei homozygoten *IgE-knock-in*-Mäusen beobachtet werden, die sich durch einen sehr hohen spezifischen IgE-Spiegel und einer Defizienz von IgG1 auszeichnen. Etwas geringer fiel sie bei den heterozygoten Tieren aus, die viel spezifisches IgE und IgG1 besitzen. Die geringste ASA zeigte schließlich der WT, der wenig spezifisches IgE, aber viel IgG1 besitzt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass antigenspezifisches IgE für die Induktion der ASA von größerer Bedeutung ist als IgG1. Die Hochregulation einer polyklonalen IgE-Antwort führt in den *IgE-knock-in*-Mäusen also unmittelbar zu einer verstärkten IgE-vermittelten ASA.

Die Depletion der Basophilen mit Hilfe des Antikörpers Ba103 hatte bei den $CD23^{-/-}$ -Mäusen nur einen geringen Effekt (Abb. 4.22.A). Der Temperaturabfall war etwas geringer als bei den unbehandelten Tieren. Im Gegensatz dazu war der Temperaturrückgang in den behandelten $CD23^{-/-}$ -*IgE-knock-in*-Mäusen deutlich geringer als in den unbehandelten (Abb. 4.22.B und C). Besonders groß war der Unterschied dabei in der späten Phase der Anaphylaxie nach 60 bis 90 Minuten. Hier lag die Körpertemperatur bei den unbehandelten Mäusen um 3 bis 4 °C niedriger. Einen großen Unterschied gibt es auch in der Sterberate: Nach der Basophilendepletion überlebten alle Tiere die Anaphylaxie, während von den unbehandelten *Knock-in*-Mäusen 30 bis 60% starben. Auf dem Höhepunkt der ASA nach 30 bis 40 Minuten reagierten auch die behandelten $CD23^{-/-}$ -*IgE-knock-in*-Mäuse mit einer substanziellen Anaphylaxie. Sie erholten sich allerdings schneller als die unbehandelten Tiere.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die IgE-sensibilisierten Basophilen für den starken Rückgang der Körpertemperatur während der späten Phase der ASA und den Tod einiger Mäuse verantwortlich sind. In der frühen Phase sind dagegen auch sensibilisierte Mastzellen bei einer IgE dominierten ASA von großer Bedeutung. Dafür spricht auch die erhöhte Konzentration von MMCP1 im Serum anaphylaktischer *IgE-knock-in*-Mäuse (Abb. 4.23). Dieses Enzym wird nicht von Basophilen, sondern nur durch die IgE-vermittelte Degranulierung von Mastzellen freigesetzt (Ugajin, Kojima et al. 2009). Die vorliegenden Ergebnisse sprechen außerdem gegen eine wichtige Rolle der Aktivierung von Basophilen durch IgG1 und FcγRIII

(Miyajima, Dombrowicz et al. 1997; Tsujimura, Obata et al. 2008). Statt dessen zeigen die Depletionsexperimente, dass antigenspezifisches IgE, welches über FcεRI auf Basophile gebunden ist, eine entscheidende Bedeutung bei anaphylaktischen Prozessen *in vivo* haben. Dies wird durch Daten unterstützt, dass das Molekül Allergin-1, welches eine IgE spezifische Hypersensibilisierung inhibiert, auf Mastzellen aber nicht auf Basophilen exprimiert wird (Hitomi, Tahara-Hanaoka et al.).

Eine Beteiligung des antigenspezifischen IgG2a, IgG2b und IgG3 an der ASA-Induktion ist dabei sehr unwahrscheinlich. Einerseits wurden für die Anaphylaxie-Experimente auch CD23^{-/-}-IgE-*knock-in*-Mäuse verwendet, die keine erhöhte Expression von spezifischem IgG2b zeigten und auch keine signifikante Überexpression von IgG3 aufwiesen, sich aber, wie die reinen IgE-*Knock-in*-Mäuse, durch eine deutlich verstärkte Anaphylaxie auszeichneten. Zum anderen wurde für die Immunisierung das Adjuvans Alum (Aluminiumhydroxid) verwendet, das die Immunantwort in Richtung T_H2 lenkt, womit IgG1 als dominanter IgG-Isotyp gebildet wird (Marrack, McKee et al. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit, dass eine ASA bei einem stark erhöhtem spezifischen IgE-Spiegel in erster Linie durch Basophile und weniger durch Mastzellen induziert wird. Allerdings haben auch Mastzellen einen Anteil an der ASA-Induktion, da nach der Basophilendepletion noch ein substanzialer Rückgang der Körpertemperatur beobachtet werden konnte. Um die exakte Beteiligung von Basophilen und Mastzellen in einer IgE-vermittelten Anaphylaxie zu klären, sind Studien mit basophil- oder mastzelldefizienten Mäusen notwendig (Dudeck, Dudeck et al.; Ohnmacht, Schwartz et al.). Beim basophildefizienten Mausmodell Mcpt8Cre konnte bei der ASA kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden (Ohnmacht, Schwartz et al.). Auch bei den CD23^{-/-}-Mäusen konnte durch die Basophilendepletion nur ein geringer Effekt beobachtet werden (Abb. 4.22.A). Somit unterstützen diese Daten die Hypothese, dass Basophile für eine IgG1-vermittelte ASA nicht notwendig sind (Ohnmacht, Schwartz et al.).

Es konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung von IgE-*knock-in*-Mäusen mit einem beliebigen Antigen zu einer starken IgE-Immunantwort führt. Ein solches aktives Immunisierungsmodell ist näher an der dynamischen *in vivo* Situation von Allergiekranke, wo polyklonale und oligoklonale Antikörperantworten verschiedener Isotypen induziert werden. Allerdings entwickeln die Tiere keine spontanen Allergien, was zeigt, dass Allergien nicht alleine von einer hohen IgE-Konzentration im Serum abhängig sind. Ein hoher Spiegel von spezifischem IgE zeigt lediglich an, dass eine Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Antigen stattgefunden hat. Für die Allergieentstehung müssen also eine Reihe weitere Faktoren von Bedeutung sein. Auch beim Menschen führt ein hoher spezifischer IgE-Spiegel nicht automatisch zur Entstehung einer Allergie, erhöht aber die Wahrscheinlichkeit dafür (Bodtger, Poulsen et al. 2003; Bodtger 2004).

Mit den IgE-*knock-in*-Mäusen wurde ein Mausmodell generiert, mit dem der genetische Einfluss auf die Regulation der IgE-Expression erforscht werden kann. Es kann auch in der Allergieforschung von großem Nutzen sein und neue Erkenntnisse über die nach wie vor rätselhafte nützliche Funktion von IgE in der Immunhomöostase bringen. So kann es zur

Erforschung des postulierten protektiven Effekts von IgE bei Parasiteninfektionen dienen (Joseph, Aurialt et al. 1983; Capron and Capron 1994; Gounni, Lamkhioued et al. 1994; Gurish, Bryce et al. 2004).

5.2. Generierung einer transgenen hulGE-knock-in-Maus

Das Ziel bei der Generierung einer transgenen hulGE-knock-in-Maus war es, eine Maus zu erzeugen die humanes IgE überexprimiert, indem der Regulationsmechanismus von IgG1 zu hulGE transferiert wird, ähnlich den IgE-knock-in-Mäusen. Anschließend sollten die Tiere mit einer transgenen Maus mit humanisiertem FcεRI (Fung-Leung, De Sousa-Hitzler et al. 1996) verpaart werden. Bisherige Tiermodelle sind aufgrund der speziesabhängigen Interaktion zwischen IgE und FcεRI limitiert, da humanes IgE nicht an einen murinen FcεRI bindet. Mit dem neuen Mausmodell wäre es möglich ein besseres Verständnis von IgE-vermittelten Reaktionen im Menschen zu bekommen.

Es könnte insbesondere bei der Erforschung allergischer Reaktionen wertvolle Erkenntnisse liefern. So würde es eine genauere Analyse des Verlaufs, der Entwicklung und der Zellinteraktionen in allergischen Reaktionen ermöglichen. Dabei bestünde die Möglichkeit die Reaktionen auf eine Vielzahl verschiedener Allergene zu studieren. Es wäre auch das ideale Tiermodell, um Allergitherapien zu entwickeln und zu testen. Bisher war dies aufgrund des Unterschieds zwischen humanem und murinem IgE nicht möglich. So könnte auch die Wirkung von Substanzen wie Omalizumab (Gould and Sutton 2008) *in vivo* analysiert werden, die an Serum- oder Membran-IgE binden oder den FcεRI blockieren.

In dieser Arbeit konnten erfolgreich transgene hulGE embryonale Stammzellen generiert werden, aus denen auch mehrere chimäre Mäuse hervorgegangen sind. Die verwendeten ki-hulGE-ES-Zellklone haben sich jedoch nicht zu Keimzellen entwickelt. Über die möglichen Ursachen und das weitere Vorgehen siehe Kapitel 5.3.

5.3. Generierung von PLCγ1-iko-Mäusen

PLCγ1 ist vor allem für die intrazelluläre Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren und dem T-Zellrezeptor von essenzieller Bedeutung. Obwohl die Phospholipasen und ihre enzymatische Aktivität seit langem bekannt sind, ist der Regulationsmechanismus von PLCγ1 und seine *in vivo* Bedeutung nur ansatzweise verstanden (Patterson, van Rossum et al. 2005). Die große Bedeutung von PLCγ1 verdeutlicht sich auch daran, dass ein konditioneller *Knock-out* zum Absterben der Embryonen am Tag neun führt (Ji, Winnier et al. 1997). Aus diesem Grunde sollte das Enzym, unter Verwendung des cre/loxP-Systems, nur in T-Zellen ausgeknockt werden (Rajewsky, Gu et al. 1996).

Das neue Mausmodell soll insbesondere neue Erkenntnisse über die Entstehung und Behandlung von Autoimmunerkrankungen liefern. Von besonderem Interesse ist dabei die Frage welche Rolle PLCγ1 bei der Negativselektion von T-Zellen im Thymus spielt. So wurde gezeigt, dass eine Punktmutation im Signaltransduktionsmolekül ZAP70, welches PLCγ1

aktiviert, die Selektion von autoaggressiven T-Zellen verändert. Dies führt in den betroffenen Mäusen zu Immunerkrankungen ähnlich der Rheumatoiden Arthritis (Sakaguchi, Takahashi et al. 2003). Eine weitere Studie zeigte, dass die Aktivierung von PLC γ 1 durch das Adaptermolekül LAT für die Generierung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) notwendig ist. Dort konnte in einer *Knock-in*-Maus, die eine Punktmutation im LAT-Gen aufweist, die die Bindung von LAT an PLC γ 1 verhindert, eine lymphoproliferative Autoimmunerkrankung nachgewiesen werden, die sich durch das Fehlen von T_{reg} auszeichnet (Koonpaew, Shen et al. 2006). Dies deutet daraufhin, dass PLC γ 1 eine Schlüsselrolle bei der Selektion von autoreaktiven T-Zellen und der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen spielt.

Das PLC γ 1-iko-Mausmodell sollte daher neue Erkenntnisse über die Funktion von PLC γ 1 bei der Entstehung und Entwicklung von Autoimmunität liefern und insbesondere die Rolle dieses Enzyms bei der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen aufklären.

Im Laufe dieser Arbeit konnte der Vektor für den induzierbaren *knock-out* für PLC γ 1 erfolgreich kloniert werden. Des Weiteren konnten sowohl PLC γ 1-iko-, als auch gefloxt PLC γ 1-iko-ES-Zellen generiert werden. Letztere wurden für die Blastozysteninjektion verwendet, aus denen sich auch chimäre Mäuse entwickelten. Wie schon bei den *hulgE-knock-in*-ES-Zellen gelang jedoch keine erfolgreiche Keimbahntransmission. Diese ist von mehreren Faktoren abhängig: der Art der Mutation, des genetischen Hintergrunds der ES-Zellen, der Qualität der ES-Zellen vor und nach der Manipulation, der Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten und dem nachfolgenden Transfer in die scheinträchtigen Mäuse.

Die gefloxten iko-PLC γ 1-Mäuse sollten PLC γ 1 normal exprimieren können und keinen Phänotyp aufweisen. Auch die *hulgE*-Mäuse sollten infolge der Genmanipulation keine Überlebensnachteile haben, keinesfalls sollte sie aber letal sein. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass sich die ES-Zellen aufgrund der genetischen Manipulation nicht zu Keimzellen entwickeln konnten. Auch dass die fehlende Keimbahntransmission ihre Ursache in einer fehlerhaften Blastozysteninjektion und -implantation hat ist wenig wahrscheinlich, da die Prozeduren von erfahrenen Fachleuten an zwei unterschiedlichen Orten durchgeführt worden sind. Vermutlich hat daher die Qualität der ES-Zellen die Keimbahntransmission verhindert, zumal sich eine Qualitätsverschlechterung zuerst in einem Verlust der Fähigkeit zur Keimbahnbesiedelung äußert (Zwaka and Thomson 2005). So kann sich die Qualität der ES-Zellen durch die Elektroporation und das wiederholte Passagieren verschlechtern. Auch sind während der Kultur der ES-Zellen wiederholt Probleme mit dem Zellinkubator aufgetreten. Ein weiteres Problem könnte durch das Wechseln der FCS-Charge während der ES-Zellkultur entstanden sein (Joyner 2000).

Nach wie vor erscheint die Generierung von *hulgE*-ki- und PLC γ 1-iko-Mäusen, aufgrund ihrer Bedeutung in der Allergie- bzw. Autoimmunitätsforschung, sinnvoll. Dementsprechend könnten weitere, bisher noch nicht verwendete ES-Klone für die Blastozysteninjektion verwendet werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Vektoren an ein Labor zu schicken, das ES-Zellen hoher Qualität besitzt sowie über Erfahrung und Materialien zur ES-Zellkultur und -Manipulation verfügt.

5.4. Die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 bei der Abwehr endogener Retroviren

Es gibt zahlreiche intrinsische Mechanismen und Moleküle die an der Abwehr von exogenen und endogenen Retroviren beteiligt sind (Wolf and Goff 2008). Wenig ist jedoch darüber bekannt, ob auch das angeborene Immunsystem und dabei insbesondere die endosomalen, nukleinsäureerkennenden Toll-like Rezeptoren 3, 7 und 9 eine Rolle bei der Erkennung und Kontrolle von endogenen Retroviren spielen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thymozyten aus TLR7^{-/-}, TLR37^{-/-}, TLR79^{-/-}, TLR379^{-/-} und Unc93B1-3d-Mäusen das MuLV-Protein gp70 exprimierten, nicht jedoch die aus C57BL/6-, TLR3^{-/-}, TLR9^{-/-} und TLR39^{-/-}-Mäusen (Abb. 4.48). Damit konnte das MuLV in allen TLR7 defizienten Tieren nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer Real-Time-PCR konnte darüber hinaus eine starke gag-mRNA-Expression im Milzgewebe von TLR7 defizienten Mäusen gezeigt werden (Abb. 4.49). Des Weiteren gelang es auch, das MuLV durch elektronenmikroskopische Aufnahmen im Thymusgewebe von TLR379^{-/-} nachzuweisen (Abb. 4.50). Überraschenderweise exprimieren die MyD88^{-/-}-Thymozyten kein gp70, obwohl bei ihnen der TLR7-Signalweg blockiert ist. Andererseits konnte eine MuLV-gag-Transkription nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass eine retrovirale Infektion mit nachfolgender mRNA-Synthese stattgefunden hat, für den Zusammenbau der Viruskomponenten und die Verbreitung des fertigen Retrovirus' aber Moleküle der MyD88-Transduktion notwendig sind (Iannello, Boulassel et al.; Jude, Pobezińska et al. 2003).

Keine der untersuchten älteren C57BL/6, TLR3^{-/-}, TLR7^{-/-}, TLR37^{-/-}, TLR39^{-/-} und Unc93b1-3d-Mäuse zeigte ein abnormales Verhältnis von CD4 zu CD8 im Thymus oder wiesen Krankheitssymptome auf. Ganz im Gegensatz zu den älteren TLR379^{-/-}-Tieren. Ihre Thymozyten zeigten deutliche Veränderungen in den Prozentzahlen und der Verteilung der einzelnen Subpopulationen: Es dominierten CD4⁺ oder CD8⁺ einfach positive oder CD4⁻CD8⁻ doppelt negative T-Zellpopulationen (Abb. 4.52). Demgegenüber waren in den T-Zellsubpopulationen aus dem Thymus von jungen TLR379^{-/-}-Mäusen (sechs Wochen bis sechs Monate) keine Auffälligkeiten zu erkennen. 87% der erkrankten TLR379^{-/-} wiesen deutliche Vergrößerungen von Thymus, Milz und/oder Lymphknoten auf. Histologische Untersuchungen identifizierten diese Erkrankung als spontane prä-T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL). Diese Krankheit konnte ausschließlich bei älteren TLR379^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden, bei keinem der anderen untersuchten Stämme und führt bei diesem Stamm zu einer deutlich verkürzten durchschnittlichen Lebensdauer.

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass TLR7 eine spontane MuLV-Expression *in vivo* verhindert. Auffällig ist dabei, dass keine der TLR7^{-/-}, TLR37^{-/-} und TLR79^{-/-}-Mäuse eine T-ALL-Erkrankung aufwiesen, obwohl sie eine Virämie zeigten. Auch Unc93b1-3d erkrankte nicht an T-ALL, trotz Virämie und obwohl es keinen funktionsfähigen TLR3, 7 und 9 besitzt. Ursache könnte die Stärke der Virämie sein. Sie ist bei den Unc93b1-3d um eine Größenordnung niedriger als bei TLR379^{-/-} und auch bei den übrigen TLR7 defizienten Mausstämmen schwächer ausgeprägt. Aufgrund der geringen Lebenserwartung einer Maus könnte dieser

Unterschied ausreichen, warum nur die TLR379^{-/-}-Mäuse an T-ALL erkranken. Das bedeutet, dass alle drei endosomalen, nukleinsäureerkennenden TLRs für die Abwehr von endogenen Retroviren und der sie verursachenden Tumorerkrankungen von Bedeutung sind, TLR7 aber besonders wichtig ist.

Warum die MuLV-Expression in Unc93b1-3d so viel niedriger ist als in TLR379^{-/-}, obwohl beide Stämme keine endosomalen TLRs besitzen, könnte an den unterschiedlichen Folgen liegen, die das Ausknocken von TLR3, 7 und 9 und die Mutation im Transportprotein Unc93b1 auf molekularer Ebene verursacht. Möglicherweise hat die Mutation des Unc93b1-Gens eine Störung der MuLV-Expression zur Folge.

Aus T-ALL erkrankten TLR379^{-/-}-Mäusen konnten fünf verschiedene Tumorzelllinien isoliert werden, die sich alle durch eine MuLV-Expression auszeichneten. Alle zeigten im Southernblot mit der Emv-2 spezifischen Probe pEco (Chattopadhyay, Lander et al. 1980) ein komplexes, individuelles Muster mit bis zu fünf zusätzlichen Banden, die aufgrund von Neuintegrationen des aktivierten endogenen MuLV-Retrovirus' ins Zellgenom entstanden sind (Abb. 4.56.B). Überraschenderweise besaßen auch C57BL/6-stämmige EL-4-Zellen drei zusätzliche MuLV-Integrationsstellen. Obwohl die Zellen heute kein MuLV mehr exprimieren, müssen sie dies zu einem früheren Zeitpunkt getan haben, wodurch die zusätzlichen Integrationsstellen entstanden sind. Dies ist insofern erstaunlich, da die Zelllinie chemisch durch die Verwendung von 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) erzeugt worden ist. Hierbei handelt es sich um eine stark kanzerogene Substanz deren Abbauprodukte mit der DNA reagieren und so Mutationen verursachen (RamaKrishna, Devanesan et al. 1992). Hierbei könnte es auch zu Veränderungen gekommen sein, in deren Folge es zu einer kurzzeitigen Aktivierung von endogenem MuLV gekommen ist.

Der Southernblot mit der EMV-2 spezifischen Sonde zeigt im Thymus und der Milz von TLR379^{-/-}-Mäusen eine Reihe zusätzlicher Integrationsstellen, während in C57BL/6, den einzel- und doppel-TLR-defizienten Mäusen nur die Bande des ursprünglichen EMV-2-Provirus zu erkennen ist (Abb. 4.56.A und B). Somit konnte nur in TLR379^{-/-}-Mäusen generierten T-ALL-Tumoren sowie im Thymus- und Milzgewebe dieses Stamms eine zufällige und unkontrollierte MuLV-Neuintegration nachgewiesen werden, während alle anderen untersuchten Stämme mit TLR7-Defizienz (TLR7^{-/-}, TLR37^{-/-} und TLR79^{-/-}) trotz MuLV-Virämie keine Reintegrationsereignisse aufwiesen. Die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 wird noch dadurch unterstrichen, dass der C57BL/6-Hintergrund im allgemeinen nicht für die Expression von endogenen Retroviren und eine spontane Entwicklung von T-Zelllymphomen anfällig ist (Chattopadhyay, Lander et al. 1980).

Es ist erstaunlich, dass es mit Ausnahme von TLR379^{-/-}, bei keiner TLR7 defizienten Maus, trotz MuLV-Virämie, zu einer Neuintegration ins Genom gekommen ist. Die Virämie ist in diesen Tieren teilweise jedoch erheblich schwächer als im Tripel-Knockout. Dadurch könnte sich auch die Neuintegration ins Genom verringern. Bei einer zufälligen Integration der Virus-DNA ins Genom sollte es im Southernblot keine klaren Banden, sondern nur einen feinen, schwer zu detektierenden Schmier geben. Diskrete Banden sollten nur entstehen, wenn es Stellen im Genom gibt, an denen sich das Virus bevorzugt integriert, beispielsweise in ein stark

transkribiertes Gen, an einer leicht zugänglichen Stelle. Eine andere Möglichkeit ist die starke Proliferation einer Zelle mit einem bestimmten Integrationsmuster, was ein Zeichen für einen Tumor oder einer Vorerkrankung hierfür wäre. Ist die Virämie geringer, so kommt es auch seltener zu Integrationen in bevorzugte Stellen und zu Tumorauslösenden Integrationen. Dementsprechend könnte es auch bei TLR7^{-/-}, TLR37^{-/-} und TLR79^{-/-} zu Neuintegrationen kommen, allerdings sind sie seltener, dadurch schwerer zu detektieren und wirken sich *in vivo* kaum aus.

Im Southernblot (Abb. 4.56.A) fällt auf, dass das Bandenmuster der DNA aus Milz und Thymus von TLR379^{-/-}-Mäusen nicht vollständig übereinstimmt, obwohl die DNA von den selben Mäusen stammt. Es gibt jeweils eine Integrationsstelle in dem einen Organ, die in dem anderen Organ nicht vorhanden ist. Ursache hierfür könnte das unterschiedliche Transkriptionsmuster von unreifen T-Zellen im Thymus und reifen T-Zellen in der Milz sein, wodurch sich auch die bevorzugten Integrationsstellen unterscheiden sollten. Eine andere Möglichkeit könnte in eine Vorerkrankung der Tiere liegen. Vom Thymus ausgehend könnten malignen prä-T-Zellen die Milz infiltriert haben. Anschließend kam es in beiden Organen zu unterschiedlichen Neuintegrationen des MuLV.

Mit Hilfe einer inversen PCR konnte die MuLV-Integration in die Gene von Notch-1 und Nup214 mehrerer Tumorzelllinien festgestellt werden. Dadurch kam es zu einer deutlichen Reduktion der Nup214-Expression. Da nur ein Gen von der Integration betroffen sein sollte, ist eine Reduktion von rund 50% zu erwarten, falls keine weiteren Faktoren hinzukommen. Dies war bei Teno-4 und Mize-8 auch der Fall, nicht aber bei Baki-1, das eine Reduktion von etwa 90% aufwies (Abb. 4.58). Weitere Neuintegrationen des MuLV und deren Folgen könnten zu der stärkeren Reduktion beigetragen haben. Parallel zur Senkung der Nup214-Produktion fiel auch die Expression von Nup88, die in der Kernpore zusammen einen Subkomplex bilden und sich gegenseitig stabilisieren (Fornerod, van Deursen et al. 1997). Sowohl Nup214, als auch Nup88 sind mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht worden (von Lindern, van Baal et al. 1992; Kraemer, Wozniak et al. 1994; Martinez, Alonso et al. 1999). So führt in 5% aller menschlichen T-ALLs eine chromosomale Translokation zu einem Fusionsprotein von Nup214 und c-Abl. Das Fusionsprotein besteht aus einem abgeschnittenen Nup214, dem die Phe-Gly-reiche (FG-) Domäne fehlt (Xu and Powers 2009). Auch die MuLV-Insertion der Tumorzelllinien Baki-1, Teno-4 und Mize-8 in das Intron zwischen Exon 16 und 17 des Nup214-Gens führt zu einem Verlust der C-terminalen FG-Domäne. Ob eine solches verkürztes Nup214 auch eine kanzerogene Wirkung hat ist allerdings unklar. In den Westernblotanalysen konnte es nicht nachgewiesen werden. Es dürfte daher wenn überhaupt nur in geringen Mengen exprimiert werden. Das eine Verringerung von Nup214 bzw. Nup88 eine kanzerogene Wirkung hat ist in der Literatur bisher ebenfalls nicht beschrieben worden.

Die Tumorzelllinie Teno-4 zeigt neben der MuLV-Integration in das Nup214-Gen auch eine Reintegration in die letzten 150 bp der kodierenden Region von Notch-1 und dem 3' UTR, das ein destabilisierendes AU reiches regulatorisches Element (ARE) enthält (Hodson, Janas et al.). Als Folge davon kam es zu einer dramatischen Hochregulation der Notch-1-Expression (Abb.

4.57). Hierbei gilt eine Disregulation der Notch-1-Expression als wichtiger Auslöser von Lymphomen, sowohl in Mäusen, wie auch im Menschen (Screpanti, Bellavia et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die T-ALL-Erkrankung in TLR379^{-/-}-Mäusen durch die Neuintegration von aktivierten endogenen MuLV in T-zellspezifischen, protoonkogenen Genloci wie Notch-1 verursacht wird, was zu einer Deregulierung in frühen T-Zellen führt.

Murine Leukämieviren können komplexe Rekombinationsprozesse mit ecotropen und polytropen Retroviren durchlaufen, was zu einer spontanen MuLV-Expression, genomischer Neuintegration und nachfolgender Tumorbildung führen kann (Stoye, Moroni et al. 1991). Die in den TLR379^{-/-}-Mäusen und den aus ihnen isolierten Tumorzelllinien gefundenen MuLVs sind wahrscheinlich aus dem einzigen ecotropen MuLV- Provirus in C57BL/6-Mäusen entstanden, dem sogenannten Emv-2. Dieser ist aufgrund einer Punktmutation des pol-Gens allerdings nicht in der Lage sich zu replizieren (Li, Huang et al. 1999). Sequenzanalysen der isolierten MuLVs von Dr. Yu konnten zeigen, dass es bei ihnen durch eine Punktmutation (eine Umwandlung von C zu G im Nukleotid 3576) zu einer Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit gekommen ist. Dies geschah möglicherweise durch Rekombinationsprozesse von Emv-2 mit den zahlreichen polytropen MuLV-Proviren. Ein Zeichen dafür, dass solche Rekombinationsereignisse stattgefunden haben und immer noch stattfinden, zeigt der Unterschied zwischen den Southernblots mit der Emv-2 spezifischen (pEco-) und der unspezifischen (gag-) Sonde (Abb. 4.56. B und C). Hier sind mit der gag-Sonde zusätzliche Integrationsstellen in Baki-1 und Aho-2 nachgewiesen worden. Diese Zelllinien besitzen also reintegrierte Proviren mit eco- und polytropen MuLV-env-Genen. Ob auch infektiöse Rekombinante MuLV-Partikel existieren, die polytrope env-Gene akquiriert haben, muss durch weitere Studien geklärt werden. Eine weitere Möglichkeit, wie das exprimierte MuLV erzeugt worden sein könnte, sind Sequenzmodifikationen durch retrovirale Restriktionsmechanismen der Zelle, beispielsweise durch Apobec3-Proteine (Jern, Stoye et al. 2007). Auch hier sind zur Klärung weitere Untersuchungen notwendig.

Es ist bekannt, dass TLR3, 7 und 9 bei der Abwehr exogener Retroviren eine Rolle spielen, etwa bei der Erkennung von exogenem MuLV, HIV oder lentiviralen Vektoren (Breckpot, Escors et al.; Mandl, Barry et al. 2008). Ihre Rolle bei der Erkennung und Kontrolle von endogenen Retroviren und der von ihnen verursachten malignen Tumoren wurde bisher jedoch nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Bedeutung der endosomalen neukleinsäureerkennenden TLRs (Blasius and Beutler) in diesem Bereich. Es muss dabei noch geklärt werden, wie die retrovirale RNA oder die DNA-Zwischenprodukte ins Endosom gelangen können, da die Replikation des Retrovirus' im Zytoplasma stattfindet. Denkbar sind Autophagie (Bortoluci and Medzhitov), ein aktiver Transport retroviraler RNA durch endosomale Vesikel (Basyuk, Galli et al. 2003) oder die Aufnahme von retrovirusinfizierten Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben neue Einsichten über die grundlegenden Mechanismen der Immunabwehr gegen Retroviren. Auch wenn diese an einem Mausmodell gewonnen wurden, könnten sie zu einem besseren Verständnis der Interaktionen von Retroviren mit dem angeborenem Immunsystem im Menschen führen. Die Rolle von humanem endogenen

Retroviren (HERV) wird dabei kontrovers diskutiert (Kurth and Bannert). Zur Zeit sind allerdings keine replikationskompetente HERVs bekannt. Es konnten aber ein infektiöses HERV rekonstruiert werden (Dewannieux, Harper et al. 2006). Inwiefern der geplante Einsatz von TLR7- und TLR9-Inhibitoren gegen Autoimmunerkrankungen wie SLE die Kontrolle über die HERVs stören könnte, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die im Endosom lokalisierten nukleinsäureerkennenden TLRs nicht nur essenzielle Teile des angeborenen Immunsystems zur Abwehr von exogenen und damit körperfremden Retroviren sind, sondern auch eine wichtige Rolle beim Aufspüren und der Kontrolle von aktivierten endogenen und somit körpereigenen Retroviren spielt.

5.5. Die Bedeutung von TLR3, 7 und 9 bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Es gibt zahlreiche Studien die einen Zusammenhang zwischen Virusinfektionen und der Entstehung von Autoimmunität herstellen. So wird z.B. diskutiert, ob die Multiple Sklerose eine durch Virusinfektionen ausgelöste Autoimmunerkrankung ist (Grigoriadis and Hadjigeorgiou 2006). Die Autoimmunität könnte dadurch entstehen, dass durch die Virusinfektion zahlreiche Zellen zerstört werden und so viele körpereigene Substanzen frei werden, die sich normalerweise im Innern der Zelle befinden. Dadurch könnten beispielsweise Chromatinfragmente und Komplexe aus Ribonukleinproteinen entstehen, die TLR9 oder TLR7 aktivieren (Marshak-Rothstein and Rifkin 2007).

Die Produktion von Anti-DNA-Antikörpern ist ein Kennzeichen für entzündliche Autoimmunerkrankungen wie SLE (Lipsky 2001; Mok and Lau 2003). Dabei ist nicht bekannt, wie körpereigene doppelsträngige DNA immunologisch aktiv werden kann. Eine Möglichkeit ist die Bildung von Komplexen aus körpereigenen Antigenen und DNA (Leadbetter, Rifkin et al. 2002). Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein DNA-vermitteltes TLR9-Signal, zusammen mit dem BCR-Signal zur Entstehung von autoreaktiven Antikörpern führt (Zwei-Rezeptor-Paradigma) (Leadbetter, Rifkin et al. 2002; Wang and Krieg 2003; Wang and Krieg 2004; Christensen, Kashgarian et al. 2005; Lau, Broughton et al. 2005). Andere Ergebnisse zeigen dagegen, dass die Entwicklung von Anti-DNA-Antikörpern unabhängig von TLR9 ist oder ihre Entwicklung durch TLR9 sogar unterdrückt wird (Wu and Peng 2006; Yu, Wellmann et al. 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine erhöhte Autoimmunität in TLR379^{-/-}-Mäusen (Abb. 4.61), was sich in einer relativ hohen Anti-DNA-Antikörperkonzentration widerspiegelt. Auch in TLR79^{-/-} konnte eine erhöhte Anti-DNA-Antikörperkonzentration nachgewiesen werden. Sie lag allerdings niedriger als bei TLR379^{-/-}. Die Stärke der Autoimmunität korreliert also mit der Stärke der beobachteten Virämie in diesen Mausstämmen (Abb. 4.48) und kommt daher als Ursache in Frage. Die Ali5-Mutation führt dann zu einer Verstärkung der Autoimmunitätsreaktion in den beiden Mausstämmen.

Des Weiteren konnte in TLR9^{-/-}-Mäusen nur eine geringe Menge an Anti-DNA-Antikörpern nachgewiesen werden und auch die Ali5-TLR9^{-/-} zeigten einen geringeren Anti-DNA-Antikörpertiter als die TLR9 kompetenten Ali5-Mäuse. Dies spricht für eine Rolle von TLR9 bei der Entstehung von autoreaktiven Antikörpern. Im Gegensatz zu den auch TLR9 defizienten TLR379^{-/-}-Mäusen entwickeln die TLR9^{-/-}-Tiere keine Virämie, was für die Virusinfektion als Ursache der erhöhten Autoimmunität in TLR379^{-/-}-Mäusen spricht.

Die Infektion mit einem exogenen Retrovirus verstärkt die Autoimmunitätsreaktion, insbesondere bei TLR379^{-/-}. Da gezeigt werden konnte, dass TLR3, 7 und 9 eine wichtige Rolle bei der Abwehr von endogenen und exogenen Retroviren haben, ist die Virämie in diesem Stamm vermutlich besonders groß. Die dadurch verursachten stärkeren Zellschädigungen könnten dann eine verstärkte Autoimmunität ausgelöst haben. Da TLR9 hier als DNA-Sensor nicht in Frage kommt, muss es auch andere DNA-Rezeptoren geben, die zur Entwicklung von Anti-DNA-Antikörpern führen, beispielsweise das zytoplasmatisch lokalisierte DAI.

Somit lässt sich feststellen, dass TLR3, TLR7 und TLR9 für die Abwehr von exogenen und endogenen Retroviren und die von ihnen verursachten Tumor- und Autoimmunitätskrankungen von Bedeutung sein könnten.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus vier verschiedenen Teilprojekten zusammen: der Untersuchung einer aktiven systemischen Anaphylaxie in IgE-*knock-in*-Mäusen, der Generierung transgener *Knock-in*-Mäuse mit Überexpression von humanem IgE, der Erzeugung von Mäusen mit induzierbarem *Knock-out* von PLC γ 1 und der Bedeutung von TLR3, TLR7 und TLR9 bei der Abwehr endogener Retroviren (ERV) und der durch ERVs verursachten Tumorerkrankungen.

Im 1. Projekt wurden IgE-*knock-in*-Mäuse untersucht, bei denen IgE in den IgG1 Lokus insertiert wurde und IgE damit wie IgG1 reguliert wird. In diesen Mäusen konnte, bei normaler B- und T-Zellentwicklung, *in vivo* und *in vitro* eine starke Überexpression von IgE festgestellt werden. *In vitro* Analysen bestätigten eine Expression von membrangebundenem IgE auf der Oberfläche ihrer B-Zellen. Außerdem war die Menge passiv an den Fc ϵ RI gebundenen IgEs etwa doppelt so hoch wie bei Wildtyp-Mäusen. Die mit dem Modellantigen TNP-OVA immunisierten Tiere zeigten darüber hinaus eine drastische Erhöhung von antigenspezifischem IgE. Durch eine i.v. Injektion von TNP-OVA wurde dann eine aktive systemische Anaphylaxie (ASA) ausgelöst, die in den IgE-*knock-in*-Mäusen deutlich stärker ausfiel, als in den Kontrollen. Somit konnte festgestellt werden, dass eine ASA in IgE-*knock-in*-Mäusen durch IgE und nicht durch IgG1 vermittelt wird. Eine Basophilendepletion mittels Ba103-Antikörpern ergab des Weiteren, dass eine IgE- vermittelte ASA, bei einem stark erhöhten Spiegel von spezifischem IgE, in erster Linie durch Basophile und weniger durch Mastzellen aktiviert wird.

Ziel des 2. Projekts war die Generierung einer *knock-in*-Maus, die eine starke Überexpression von humanem IgE zeigen sollte, um ein besseres Verständnis für IgE vermittelte Reaktionen im Menschen zu erhalten. Aufgabe des 3. Teilprojekts war es eine Maus mit einem induzierbarem *Knock-out* der Phospholipase-C γ 1 (PLC γ 1) zu generieren. Hierzu wurden zwei loxP-Stellen ins Gen von PLC γ 1 eingeführt. Aus einer solchen geflochten PLC γ 1-iko-Maus lassen sich, durch eine Deletion der von den loxP-Stellen eingerahmten Exons, gewebsspezifische PLC γ 1-ko-Mäuse erzeugen. Auf diese Weise können z.B. Mäuse konstruiert werden, bei denen PLC γ 1 ausschließlich in T-Zellen deletiert ist, um die Bedeutung von PLC γ 1 für die T-Zellentwicklung, insbesondere der regulatorischen T-Zellen, aufzuklären. Es konnten erfolgreich entsprechende Targetvektoren und ES-Zellen generiert werden. Allerdings fand nach der Blastozysteninjektion, trotz einer hoher Chimerität der Nachkommen, keine Keimbahntransmission statt.

Im letzten Teil wurde die Bedeutung der endosomalen, nukleinsäureerkennenden Toll-like Rezeptoren 3, 7 und 9 für die Abwehr endogener Retroviren und der von ihnen ausgelösten Tumorerkrankungen mit Hilfe entsprechender *Knock-out*-Mäuse untersucht. Dabei konnte eine spontane, unkontrollierte Virämie des Murinen Leukämievirus (MuLV) in TLR7 defizienten Mäusen festgestellt werden. Allerdings entwickelten nur TLR3, TLR7 und TLR9 tripel defiziente Tiere eine durch das Virus ausgelöste prä-T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL). Die Insertion des MuLV-Provirus in die Onkogene Nup214 und Notch-1 führte dabei zu einer Deregulierung der Proteinexpression, die zur Entstehung der T-ALL beigetragen haben könnte. Auch konnte gezeigt werden, dass TLR379^{-/-}-Mäuse erhöhte Autoimmunreaktionen aufweisen.

6.1 Summary

The current study consists of four different projects: the study of active systemic anaphylaxis (ASA) in IgE knock-in mice, the generation of transgenic knock-in mice overexpressing human IgE, the generation of mice with an inducible knock-out of PLC γ 1 and the relevance of TLR3, TLR7 and TLR9 in controlling endogenous retroviruses (ERV) and ERV induced tumours.

In the first project IgE knock-in mice were analysed. In these mice the regulatory mechanism of IgG1 was transferred to IgE. As a result they show a strong overexpression of IgE *in vivo* and *in vitro* during a normal B and T cell development. *In vitro* analyses confirmed the expression of membrane bound IgE on the surface of their B-cells. Furthermore twice as much IgE bound to Fc ϵ RI could be detected in IgE knock-in mice than in their wild type littermates. In mice immunized with the model antigen TNP-OVA an extreme increase of antigen specific IgE was shown. By injecting mice with TNP-OVA an ASA was triggered, that was much stronger in IgE knock-in mice than in the controls. Therefore it could be determined that an ASA in IgE knock-in mice is mediated by IgE and not by IgG1. Moreover the depletion of basophils by Ba103 antibodies showed that an IgE mediated ASA is activated predominantly by basophils and less by mast cells when there is a high specific IgE level.

The second project was the generation of knock-in mice with a strong overexpression of human IgE. The new model should add to a better understanding of IgE mediated reactions in humans. In the third project a mouse with an inducible knock-out of the phospholipase-C γ 1 (PLC γ 1) should be generated. Therefore two loxP sites were inserted in the gene of PLC γ 1. It is possible to generate tissue specific PLC γ 1-iko mice from such floxed mice by a deletion of the loxP flanked exons. In this way it is possible to generate mice e.g. with a knock-out only in T cells to analyse the importance of PLC γ 1 in T cell development especially in regulatory T cells. The appropriate targeting vectors and embryonal stem cells could be generated successfully. But after the injection into blastocystes no germ line transmission occurred despite a high chimerity of the offspring.

In the last part of this study the importance of the endosomal nucleic acid recognizing toll like receptors 3, 7 and 9 for controlling endogenous retroviruses and tumours they induce was analysed by use of corresponding knock-out mice. Thereby a spontaneous uncontrolled viremia of the murine leukemia virus (MuLV) in TLR7 deficient mice was detected. But only TLR3, TLR7 and TLR9 triple deficient animals developed virus induced pre-T-cell acute lymphoblastic lymphomas (T-ALL). The insertion of the MuLV provirus into the oncogenes Nup214 and Notch-1 leads to a deregulation of the corresponding proteins, which could contribute to the development of T-ALL. Additionally an increased autoimmune reaction in TLR379^{-/-} mice could be shown.

I. Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
AP-1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APC	antigen presenting cell
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar
BCL10	B-cell lymphoma 10
BCR	B-cell receptor
BLNK	B-cell linker
BSA	bovine serum albumine
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CARD11	caspase recruitment domain-containing protein 11
CARMA1	CARD-containing MAGUK protein 1
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CIP	calf intestine phosphatase
comp.	complete
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRAC	calcium release-activated calcium channel
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAG	Diacylglycerin
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosobant Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERV	endogenes Retrovirus
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Flt3	FMS-like Tyrosinkinase 3
Gag	group-specific antigen
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GPCR	G protein-coupled receptor
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GRAP	GRB2 related adaptor protein

GTP	Guanosintriphosphat
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IP3	Inositoltriphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITK	IL-2 inducible T-cell kinase
i.v.	intravenous
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAT	linker of activated T cells
LIF	leukemia inhibitory factor
LIR7	leukocyte immunoglobulin-like receptor 7
LPS	Lipopolysaccharid
MAML1	mastermind like protein 1
MALT1	mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
MAP3K	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MHC	major histocompatibility complex
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MMCP1	mouse mast cell protease 1
MuLV	murines Leukämievirus
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NPC	nuclear pore complex
OVA	Ovalbumin
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS ⁺⁺	PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PBS ^{def}	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PAF	platelet activating factor
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ 1/2	Phospholipase-C γ 1/2
PRR	Pattern recognition Rezeptor
RBPJ	recombining binding protein suppressor of hairless
RIG-I	retinoid acid inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SH2	src homology 2
Shc	Src homology 2 domain containing
SLE	systemischer Lupus erythematodes
STIM	stromal interaction molecule
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TCR	T-Zellrezeptor
TCRB	T-cell receptor beta chain
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNP	2,4,6-Trinitrophenol
TLR	Toll-like Rezeptor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VDJ	variable diverse joining
wt	wildtyp
ZAP70	zeta-chain-associated protein kinase 70

II. Literaturverzeichnis

- Achatz-Straussberger, G., N. Zaborsky, et al. (2008). "Migration of antibody secreting cells towards CXCL12 depends on the isotype that forms the BCR." *Eur J Immunol* **38**(11): 3167-77.
- Achatz, G., G. Achatz-Straussberger, et al. (2006). "Regulation of the IgE response at the molecular level: impact on the development of systemic anti IgE therapeutic strategies." *Chem Immunol Allergy* **91**: 204-17.
- Achatz, G., L. Nitschke, et al. (1997). "Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response." *Science* **276**(5311): 409-11.
- Adamczewski, M., G. Kohler, et al. (1991). "Expression and biological effects of high levels of serum IgE in epsilon heavy chain transgenic mice." *Eur J Immunol* **21**(3): 617-26.
- Anderton, S. M. (2006). "Avoiding autoimmune disease--T cells know their limits." *Trends Immunol* **27**(5): 208-14.
- Aster, J. C., W. S. Pear, et al. (2008). "Notch signaling in leukemia." *Annu Rev Pathol* **3**: 587-613.
- Bae, S. S., Y. H. Lee, et al. (1998). "Src homology domains of phospholipase C gamma1 inhibit nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells." *J Neurochem* **71**(1): 178-85.
- Basyuk, E., T. Galli, et al. (2003). "Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles." *Dev Cell* **5**(1): 161-74.
- Beck, E. G. (2007), Biokurs 2007, www.biokurs.de/skripten/12/bs12-54.htm
- BioCharta. San Diego, USA, http://www.biocarta.com/pathfiles/h_bcrpathway.asp
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Blasius, A. L. and B. Beutler "Intracellular toll-like receptors." *Immunity* **32**(3): 305-15.
- Bodtger, U. (2004). "Prognostic value of asymptomatic skin sensitization to aeroallergens." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **4**(1): 5-10.
- Bodtger, U., L. K. Poulsen, et al. (2003). "Asymptomatic skin sensitization to birch predicts later development of birch pollen allergy in adults: a 3-year follow-up study." *J Allergy Clin Immunol* **111**(1): 149-54.
- Boeke, J. D. and J. P. Stoye (1997). "Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements."
- Bonilla, F. A. and H. C. Oettgen "Adaptive immunity." *J Allergy Clin Immunol* **125**(2 Suppl 2): S33-40.
- Bortoluci, K. R. and R. Medzhitov "Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR." *Cell Mol Life Sci*.
- Breckpot, K., D. Escors, et al. "HIV-1 lentiviral vector immunogenicity is mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7." *J Virol* **84**(11): 5627-36.
- Burton, O. T. and H. C. Oettgen "Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases." *Immunol Rev* **242**(1): 128-43.
- Capron, M. and A. Capron (1994). "Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis." *Science* **264**(5167): 1876-7.
- Casanova, J. L., L. Abel, et al. "Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics." *Annu Rev Immunol* **29**: 447-91.
- Chattopadhyay, S. K., M. R. Lander, et al. (1980). "Structure of endogenous murine leukemia virus DNA in mouse genomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(10): 5774-8.
- Christensen, S. R., M. Kashgarian, et al. (2005). "Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus." *J Exp Med* **202**(2): 321-31.
- Cumberbatch, M., R. J. Dearman, et al. (2001). "Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha- and IL-1beta-dependent mechanism." *Immunology* **102**(3): 323-30.
- Dewannieux, M., F. Harper, et al. (2006). "Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements." *Genome Res* **16**(12): 1548-56.
- Di Nardo, A., A. Vitiello, et al. (2003). "Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide." *J Immunol* **170**(5): 2274-8.
- Dudeck, A., J. Dudeck, et al. "Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens." *Immunity* **34**(6): 973-84.
- Espagnolle, N., D. Depoil, et al. (2007). "CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase Cgamma1/calcium pathway at the immunological synapse." *Int Immunol* **19**(3): 239-48.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." *Science* **272**(5258): 50-3.
- Feichtner, S., D. Infuhr, et al. (2008). "Targeting the extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE by passive immunization blocks IgE synthesis in vivo." *J Immunol* **180**(8): 5499-505.

- Finkelman, F. D. (2007). "Anaphylaxis: lessons from mouse models." *J Allergy Clin Immunol* **120**(3): 506-15; quiz 516-7.
- Fischer, C. Biokurs 2007. Denver.
- Folkerts, G., G. Walzl, et al. (2000). "Do common childhood infections 'teach' the immune system not to be allergic?" *Immunol Today* **21**(3): 118-20.
- Fornerod, M., J. van Deursen, et al. (1997). "The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88." *Embo J* **16**(4): 807-16.
- Frankel, W. N., J. P. Stoye, et al. (1990). "A linkage map of endogenous murine leukemia proviruses." *Genetics* **124**(2): 221-36.
- Fu, C., C. W. Turck, et al. (1998). "BLNK: a central linker protein in B cell activation." *Immunity* **9**(1): 93-103.
- Fung-Leung, W. P., J. De Sousa-Hitzler, et al. (1996). "Transgenic mice expressing the human high-affinity immunoglobulin (Ig) E receptor alpha chain respond to human IgE in mast cell degranulation and in allergic reactions." *J Exp Med* **183**(1): 49-56.
- Galli-Taliadoros, L. A., J. D. Sedgwick, et al. (1995). "Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice." *J Immunol Methods* **181**(1): 1-15.
- Gauchat, J. F., S. Henchoz, et al. (1993). "Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils." *Nature* **365**(6444): 340-3.
- Ghetie, V., J. G. Hubbard, et al. (1996). "Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice." *Eur J Immunol* **26**(3): 690-6.
- Ghetie, V. and E. S. Ward (2000). "Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn." *Annu Rev Immunol* **18**: 739-66.
- Gilliet, M., W. Cao, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases." *Nat Rev Immunol* **8**(8): 594-606.
- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, et al. (2004). "NKT cells: what's in a name?" *Nat Rev Immunol* **4**(3): 231-7.
- Gong, Q., A. M. Cheng, et al. (2001). "Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency." *Nat Immunol* **2**(1): 29-36.
- Gould, H. J. and B. J. Sutton (2008). "IgE in allergy and asthma today." *Nat Rev Immunol* **8**(3): 205-17.
- Gould, H. J., B. J. Sutton, et al. (2003). "The biology of IGE and the basis of allergic disease." *Annu Rev Immunol* **21**: 579-628.
- Gounni, A. S., B. Lamkhioued, et al. (1994). "The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy?" *J Allergy Clin Immunol* **94**(6 Pt 2): 1214-6.
- Grigoriadis, N. and G. M. Hadjigeorgiou (2006). "Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis." *J Autoimmune Dis* **3**: 1.
- Gurish, M. F., P. J. Bryce, et al. (2004). "IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*." *J Immunol* **172**(2): 1139-45.
- Gururajan, M., J. Jacob, et al. (2007). "Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets." *PLoS One* **2**(9): e863.
- Hara, H., T. Wada, et al. (2003). "The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation." *Immunity* **18**(6): 763-75.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-9.
- Henderson, L. A., J. W. Baynes, et al. (1982). "Identification of the sites of IgG catabolism in the rat." *Arch Biochem Biophys* **215**(1): 1-11.
- Henningsson, F., Z. Ding, et al. "IgE-mediated enhancement of CD4+ T cell responses in mice requires antigen presentation by CD11c+ cells and not by B cells." *PLoS One* **6**(7): e21760.
- Hibbert, R. G., P. Teriete, et al. (2005). "The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21." *J Exp Med* **202**(6): 751-60.
- Hippen, K. L., A. M. Buhl, et al. (1997). "Fc gammaRIIB1 inhibition of BCR-mediated phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization is integrated by CD19 dephosphorylation." *Immunity* **7**(1): 49-58.
- Hitomi, K., S. Tahara-Hanaoka, et al. "An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions." *Nat Immunol* **11**(7): 601-7.
- Hodson, D. J., M. L. Janas, et al. "Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia." *Nat Immunol* **11**(8): 717-24.
- Huston, D. P. (1997). "The biology of the immune system." *Jama* **278**(22): 1804-14.
- Iannello, A., M. R. Boulassel, et al. "HIV-1 causes an imbalance in the production of interleukin-18 and its natural antagonist in HIV-infected individuals: implications for enhanced viral replication." *J Infect Dis* **201**(4): 608-17.

- Irvin, B. J., B. L. Williams, et al. (2000). "Pleiotropic contributions of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) to T-cell antigen receptor-mediated signaling: reconstitution studies of a PLC-gamma1-deficient Jurkat T-cell line." *Mol Cell Biol* **20**(24): 9149-61.
- Ishikawa, H., T. Naito, et al. (2007). "Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics." *Immunol Rev* **215**: 154-65.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." *Science* **327**(5963): 291-5.
- Jenkins, N. A., N. G. Copeland, et al. (1982). "Organization, distribution, and stability of endogenous ecotropic murine leukemia virus DNA sequences in chromosomes of *Mus musculus*." *J Virol* **43**(1): 26-36.
- Jern, P., J. P. Stoye, et al. (2007). "Role of APOBEC3 in genetic diversity among endogenous murine leukemia viruses." *PLoS Genet* **3**(10): 2014-22.
- Ji, Q. S., G. E. Winnier, et al. (1997). "Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 2999-3003.
- Jiang, D., J. Liang, et al. (2005). "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan." *Nat Med* **11**(11): 1173-9.
- Joseph, M., C. Auriault, et al. (1983). "A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes." *Nature* **303**(5920): 810-2.
- Joyner, A. (2000). "Gene Targeting, a practical approach."
- Jude, B. A., Y. Pobezinskaya, et al. (2003). "Subversion of the innate immune system by a retrovirus." *Nat Immunol* **4**(6): 573-8.
- Jung, S., G. Siebenkotten, et al. (1994). "Frequency of immunoglobulin E class switching is autonomously determined and independent of prior switching to other classes." *J Exp Med* **179**(6): 2023-6.
- Jutel, M., T. Watanabe, et al. (2001). "Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors." *Nature* **413**(6854): 420-5.
- Kabashima, K., D. Sakata, et al. (2003). "Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells." *Nat Med* **9**(6): 744-9.
- Karnowski, A., G. Achatz-Straussberger, et al. (2006). "Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells." *Eur J Immunol* **36**(7): 1917-25.
- Karnowski, A., P. Yu, et al. (2000). "The road to the production of IgE is long and winding." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(3 Pt 2): S71-5.
- Kaser, A., S. Dunzendorfer, et al. (1999). "A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells." *J Immunol* **163**(6): 3232-8.
- Kassis, J., J. Moellinger, et al. (1999). "A role for phospholipase C-gamma-mediated signaling in tumor cell invasion." *Clin Cancer Res* **5**(8): 2251-60.
- Khan, A. S. (1984). "Nucleotide sequence analysis establishes the role of endogenous murine leukemia virus DNA segments in formation of recombinant mink cell focus-forming murine leukemia viruses." *J Virol* **50**(3): 864-71.
- Khodoun, M. V., R. Strait, et al. "Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(30): 12413-8.
- Kim, S., T. Shen, et al. (2009). "Basophils can directly present or cross-present antigen to CD8 lymphocytes and alter CD8 T cell differentiation into IL-10-producing phenotypes." *J Immunol* **183**(5): 3033-9.
- Kim, S., H. Takahashi, et al. (2009). "Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis." *Nature* **457**(7225): 102-6.
- Kinet, J. P. (1999). "The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology." *Annu Rev Immunol* **17**: 931-72.
- Kohler, A. and E. Hurt "Gene regulation by nucleoporins and links to cancer." *Mol Cell* **38**(1): 6-15.
- Kolsch, V., P. G. Charest, et al. (2008). "The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling." *J Cell Sci* **121**(Pt 5): 551-9.
- Komiya, A., H. Nagase, et al. (2006). "Expression and function of toll-like receptors in human basophils." *Int Arch Allergy Immunol* **140** Suppl 1: 23-7.
- Koonpaew, S., S. Shen, et al. (2006). "LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development." *J Exp Med* **203**(1): 119-29.
- Kraemer, D., R. W. Wozniak, et al. (1994). "The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1519-23.
- Kurosaki, T. and S. Tsukada (2000). "BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals." *Immunity* **12**(1): 1-5.

- Kurth, R. and N. Bannert "Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses." *Int J Cancer* **126**(2): 306-14.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lau, C. M., C. Broughton, et al. (2005). "RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement." *J Exp Med* **202**(9): 1171-7.
- Leadbetter, E. A., I. R. Rifkin, et al. (2002). "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors." *Nature* **416**(6881): 603-7.
- Lewis, G., E. Rapsomaniki, et al. (2004). "Hyper IgE in New Zealand black mice due to a dominant-negative CD23 mutation." *Immunogenetics* **56**(8): 564-71.
- Li, M., X. Huang, et al. (1999). "Sequence and insertion sites of murine melanoma-associated retrovirus." *J Virol* **73**(11): 9178-86.
- Lin, H. Y., J. Xu, et al. (1998). "Identification of the cytoplasmic regions of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 which play important roles in induction of neurite outgrowth in PC12 cells by FGF-1." *Mol Cell Biol* **18**(7): 3762-70.
- Lin, J. and A. Weiss (2001). "T cell receptor signalling." *J Cell Sci* **114**(Pt 2): 243-4.
- Lipsky, P. E. (2001). "Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity." *Nat Immunol* **2**(9): 764-6.
- Lu, W., Z. Zhao, et al. (2007). "Over-expression of the bovine FcRn in the mammary gland results in increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice." *Immunology* **122**(3): 401-8.
- Luger, E. O. (2003). "[Regulation of IgE Expression]." *Allergologie* **26**: 440-445.
- Luger, E. O., M. Wegmann, et al. "Allergy for a lifetime?" *Allergol Int* **59**(1): 1-8.
- Malaviya, R., E. A. Ross, et al. (1994). "Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria." *J Immunol* **152**(4): 1907-14.
- Mandl, J. N., A. P. Barry, et al. (2008). "Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections." *Nat Med* **14**(10): 1077-87.
- Mansour, S. L., K. R. Thomas, et al. (1988). "Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes." *Nature* **336**(6197): 348-52.
- Marone, G., F. W. Rossi, et al. (2007). "Role of superallergens in allergic disorders." *Chem Immunol Allergy* **93**: 195-213.
- Marrack, P., A. S. McKee, et al. (2009). "Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium." *Nat Rev Immunol* **9**(4): 287-93.
- Marshak-Rothstein, A. and I. R. Rifkin (2007). "Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease." *Annu Rev Immunol* **25**: 419-41.
- Marshall, A. J., H. Niiro, et al. (2000). "Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway." *Immunol Rev* **176**: 30-46.
- Marshall, J. S. (2004). "Mast-cell responses to pathogens." *Nat Rev Immunol* **4**(10): 787-99.
- Martin, R. M., J. L. Brady, et al. (1998). "The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice." *J Immunol Methods* **212**(2): 187-92.
- Martinez, N., A. Alonso, et al. (1999). "The nuclear pore complex protein Nup88 is overexpressed in tumor cells." *Cancer Res* **59**(21): 5408-11.
- Matsuoka, K., C. Taya, et al. (1999). "Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo." *Int Immunol* **11**(6): 987-94.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." *Nature* **449**(7164): 819-26.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." *Immunol Rev* **173**: 89-97.
- Melief, C. J. (2003). "Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming?" *Eur J Immunol* **33**(10): 2645-54.
- Metcalf, D. D., D. Baram, et al. (1997). "Mast cells." *Physiol Rev* **77**(4): 1033-79.
- Miyajima, I., D. Dombrowicz, et al. (1997). "Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis." *J Clin Invest* **99**(5): 901-14.
- Mizuguchi, M., M. Yamada, et al. (1991). "Phospholipase C isozymes in neurons and glial cells in culture: an immunocytochemical and immunochemical study." *Brain Res* **548**(1-2): 35-40.
- Mok, C. C. and C. S. Lau (2003). "Pathogenesis of systemic lupus erythematosus." *J Clin Pathol* **56**(7): 481-90.

- Mukai, K., K. Matsuoka, et al. (2005). "Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells." *Immunity* **23**(2): 191-202.
- Mukai, K., K. Obata, et al. (2009). "New insights into the roles for basophils in acute and chronic allergy." *Allergol Int* **58**(1): 11-9.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Nguyen, H. H., M. Zemlin, et al. (2007). "Heterosubtypic immunity to influenza A virus infection requires a properly diversified antibody repertoire." *J Virol* **81**(17): 9331-8.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2005). "Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding." *Science* **310**(5753): 1510-2.
- Nitta, T., S. Murata, et al. (2008). "Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation." *Adv Immunol* **99**: 59-94.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **7**(5): 353-64.
- Obata, K., K. Mukai, et al. (2007). "Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation." *Blood* **110**(3): 913-20.
- Ohnmacht, C., C. Schwartz, et al. "Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths." *Immunity* **33**(3): 364-74.
- Palomero, T., W. K. Lim, et al. (2006). "NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18261-6.
- Patterson, R. L., D. B. van Rossum, et al. (2005). "Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling." *Trends Biochem Sci* **30**(12): 688-97.
- Peters, R. (2009). "Translocation through the nuclear pore: Kaps pave the way." *Bioessays* **31**(4): 466-77.
- Pfeffer, K. and T. W. Mak (1994). "Lymphocyte ontogeny and activation in gene targeted mutant mice." *Annu Rev Immunol* **12**: 367-411.
- Poulsen, L. K. and L. Hummelshoj (2007). "Triggers of IgE class switching and allergy development." *Ann Med* **39**(6): 440-56.
- Qiagen. Hilden, www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=427.
- Rajewsky, K., H. Gu, et al. (1996). "Conditional gene targeting." *J Clin Invest* **98**(3): 600-3.
- RamaKrishna, N. V., P. D. Devanesan, et al. (1992). "Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene." *Chem Res Toxicol* **5**(2): 220-6.
- Roopenian, D. C., G. J. Christianson, et al. (2003). "The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs." *J Immunol* **170**(7): 3528-33.
- Roos, J., P. J. DiGregorio, et al. (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function." *J Cell Biol* **169**(3): 435-45.
- Saito, K., K. F. Toliyas, et al. (2003). "BTK regulates PtdIns-4,5-P₂ synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity." *Immunity* **19**(5): 669-78.
- Sakaguchi, N., T. Takahashi, et al. (2003). "Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice." *Nature* **426**(6965): 454-60.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (2009). "Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity." *Eur J Immunol* **39**(8): 2076-82.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Schaefer, L., A. Babelova, et al. (2005). "The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages." *J Clin Invest* **115**(8): 2223-33.
- Schmidlin, H., S. A. Diehl, et al. (2009). "New insights into the regulation of human B-cell differentiation." *Trends Immunol* **30**(6): 277-85.
- Schneider, E., H. Pollard, et al. (1987). "Histamine-producing cell-stimulating activity. Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induce de novo synthesis of histidine decarboxylase in hemopoietic progenitor cells." *J Immunol* **139**(11): 3710-7.
- Schwenk, F., U. Baron, et al. (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells." *Nucleic Acids Res* **23**(24): 5080-1.
- Screpanti, I., D. Bellavia, et al. (2003). "Notch, a unifying target in T-cell acute lymphoblastic leukemia?" *Trends Mol Med* **9**(1): 30-5.
- Sekiya, F., B. Poulin, et al. (2004). "Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1. Tyrosine 783 phosphorylation is not sufficient for lipase activation." *J Biol Chem* **279**(31): 32181-90.

- Shin, H. M., L. M. Minter, et al. (2006). "Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention." *Embo J* **25**(1): 129-38.
- Sigal, L. J., S. Crotty, et al. (1999). "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-hematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen." *Nature* **398**(6722): 77-80.
- Simons, F. E., A. J. Frew, et al. (2007). "Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches." *J Allergy Clin Immunol* **120**(1 Suppl): S2-24.
- Siracusa, M. C., J. G. Perrigoue, et al. "New paradigms in basophil development, regulation and function." *Immunol Cell Biol* **88**(3): 275-84.
- Sloane, D. E., N. Tedla, et al. (2004). "Leukocyte immunoglobulin-like receptors: novel innate receptors for human basophil activation and inhibition." *Blood* **104**(9): 2832-9.
- Slomka, H. (2009). "Analyse retroviral induzierter Erkrankungen in Toll-like-Rezeptor defizienten Mäusen." *Diplomarbeit*.
- Smith, A. G., J. K. Heath, et al. (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." *Nature* **336**(6200): 688-90.
- Smithgall, M. D., M. R. Comeau, et al. (2008). "IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells." *Int Immunol* **20**(8): 1019-30.
- Snapper, C. M., F. D. Finkelman, et al. (1988). "Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4." *J Exp Med* **167**(1): 183-96.
- Sokol, C. L., G. M. Barton, et al. (2008). "A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses." *Nat Immunol* **9**(3): 310-8.
- Sokol, C. L., N. Q. Chu, et al. (2009). "Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response." *Nat Immunol* **10**(7): 713-20.
- Song, L. L., Y. Peng, et al. (2008). "Notch-1 associates with IKKalpha and regulates IKK activity in cervical cancer cells." *Oncogene* **27**(44): 5833-44.
- Southern, E. M. (1992). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975." *Biotechnology* **24**: 122-39.
- Sozzani, S., F. Sallusto, et al. (1995). "Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines." *J Immunol* **155**(7): 3292-5.
- Steinman, R. M. and K. Inaba (1999). "Myeloid dendritic cells." *J Leukoc Biol* **66**(2): 205-8.
- Stewart, M. (2007). "Ratcheting mRNA out of the nucleus." *Mol Cell* **25**(3): 327-30.
- Stocking, C. and C. A. Kozak (2008). "Murine endogenous retroviruses." *Cell Mol Life Sci* **65**(21): 3383-98.
- Stoye, J. P. (2001). "Endogenous retroviruses: still active after all these years?" *Curr Biol* **11**(22): R914-6.
- Stoye, J. P., C. Moroni, et al. (1991). "Virological events leading to spontaneous AKR thymomas." *J Virol* **65**(3): 1273-85.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." *Bmj* **299**(6710): 1259-60.
- Strait, R. T., S. C. Morris, et al. (2006). "IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking." *J Clin Invest* **116**(3): 833-41.
- Suh, P. G., J. I. Park, et al. (2008). "Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes." *BMB Rep* **41**(6): 415-34.
- Tabeta, K., K. Hoebe, et al. (2006). "The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9." *Nat Immunol* **7**(2): 156-64.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol* **17**(1): 1-14.
- Takizawa, F., M. Adamczewski, et al. (1992). "Identification of the low affinity receptor for immunoglobulin E on mouse mast cells and macrophages as Fc gamma RII and Fc gamma RIII." *J Exp Med* **176**(2): 469-75.
- Tangye, S. G. and D. M. Tarlinton (2009). "Memory B cells: effectors of long-lived immune responses." *Eur J Immunol* **39**(8): 2065-75.
- Tanigaki, K. and T. Honjo (2007). "Regulation of lymphocyte development by Notch signaling." *Nat Immunol* **8**(5): 451-6.
- Thompson, B. J., S. Buonamici, et al. (2007). "The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia." *J Exp Med* **204**(8): 1825-35.
- Tkaczyk, C., M. A. Beaven, et al. (2003). "The phospholipase C gamma 1-dependent pathway of Fc epsilon RI-mediated mast cell activation is regulated independently of phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* **278**(48): 48474-84.
- Trunova, G. (2011). "Morphofunctional Characteristic of the Immune System in BALB/c and C57Bl/6 Mice." *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*
- Tsujimura, Y., K. Obata, et al. (2008). "Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis." *Immunity* **28**(4): 581-9.

- Turley, S. J., K. Inaba, et al. (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." *Science* **288**(5465): 522-7.
- Tuveson, D. A., R. H. Carter, et al. (1993). "CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase." *Science* **260**(5110): 986-9.
- Ugajin, T., T. Kojima, et al. (2009). "Basophils preferentially express mouse Mast Cell Protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells." *J Leukoc Biol* **86**(6): 1417-25.
- Vieira, P. and K. Rajewsky (1988). "The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice." *Eur J Immunol* **18**(2): 313-6.
- Villesen, P., L. Aagaard, et al. (2004). "Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome." *Retrovirology* **1**: 32.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(2): 615-9.
- von Lindern, M., S. van Baal, et al. (1992). "Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene." *Mol Cell Biol* **12**(8): 3346-55.
- Wahl, G. M., M. Stern, et al. (1979). "Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(8): 3683-7.
- Wahn, U. (2000). *Spezialbericht Allergien*. S. B. (Hrsg.), Metzler-Poeschel.
- Wang, D., J. Feng, et al. (2000). "Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors." *Immunity* **13**(1): 25-35.
- Wang, Y. and A. M. Krieg (2003). "Synergy between CpG- or non-CpG DNA and specific antigen for B cell activation." *Int Immunol* **15**(2): 223-31.
- Wang, Y. and A. M. Krieg (2004). "Induction of autoantibody production but not autoimmune disease in HEL transgenic mice vaccinated with HEL in combination with CpG or control oligodeoxynucleotides." *Vaccine* **22**(20): 2641-50.
- Weiss, R. A. (2006). "The discovery of endogenous retroviruses." *Retrovirology* **3**: 67.
- Weng, A. P., A. A. Ferrando, et al. (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." *Science* **306**(5694): 269-71.
- Wolf, D. and S. P. Goff (2008). "Host restriction factors blocking retroviral replication." *Annu Rev Genet* **42**: 143-63.
- Wu, X. and S. L. Peng (2006). "Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus." *Arthritis Rheum* **54**(1): 336-42.
- Xu, S. and M. A. Powers (2009). "Nuclear pore proteins and cancer." *Semin Cell Dev Biol* **20**(5): 620-30.
- Yanagihara, Y., K. Kajiwara, et al. (1998). "Cultured basophils but not cultured mast cells induce human IgE synthesis in B cells after immunologic stimulation." *Clin Exp Immunol* **111**(1): 136-43.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, et al. (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." *Science* **296**(5567): 490-4.
- Ye, K. and S. H. Snyder (2004). "PIKE GTPase: a novel mediator of phosphoinositide signaling." *J Cell Sci* **117**(Pt 2): 155-61.
- Yoshimoto, T., H. Tsutsui, et al. (1999). "IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13962-6.
- Yu, P., R. Constien, et al. (2005). "Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C gamma 2 that specifically increases external Ca²⁺ entry." *Immunity* **22**(4): 451-65.
- Yu, P., M. Kosco-Vilbois, et al. (1994). "Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23." *Nature* **369**(6483): 753-6.
- Yu, P., U. Wellmann, et al. (2006). "Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE." *Int Immunol* **18**(8): 1211-9.
- Zhang, S. L., Y. Yu, et al. (2005). "STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane." *Nature* **437**(7060): 902-5.
- Zwaka, T. P. and J. A. Thomson (2005). "A germ cell origin of embryonic stem cells?" *Development* **132**(2): 227-33.

IV. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Oldenburg:

Al-Shamery, Beckhaus, Butte, Hagen, Höpner, Kittel, Köll, Martens, Metzger, Müller, Oltmanns, Pade, Uhl, Weber, Weidenbruch, Witte und Zeeck

in Marburg:

Bauer, Bertram, Essen, Geyer, Hampp, Harbrecht, Koert, Marahiel, Neumüller, Schrader, Schween, Sundermeyer, Uhl, Wendorff und Yu.

V. Publikationen

Wolger Lübben, Anna Okhrimenko, Christian Stöberl, Adriana Neves, Volker Schmidt, Klaus Pfeffer, Sonja Dehnert, Stefanie Beil, Stefan Bauer, Gert Riethmüller, David Vöhringer and Philipp Yu ***IgE knock-in mice reveal a key role for IgE in basophil-mediate active systemic anaphylaxis***

(Eingereicht 2012)

Philipp Yu, Wolger Lübben, Heike Slomka, Janine Gebler, Madlen Konert, Chengcong Cai, Luisa Neubrandt, Olivia Prazeres da Costa, Stephanie Beil, Sonja Dehnert, Karolin Döhne, Andreas Kaufmann, Marianne Nain, Leticia Quintanilla-Martinez, Sabrina Bettio, Barbara Schnierle, Larissa Kolesnikova, Stephan Becker, Markus Schnare & Stefan Bauer ***Differential role of nucleic acid recognizing Toll-like receptors in the control of spontaneous endogenous retrovirus (ERV) viremia and protection against ERV-induced tumors***

(Eingereicht 2012)

VI. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Bauer und Dr. Philipp Yu für die Möglichkeit im Institut für Immunologie zu promovieren, die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas, die hervorragende Betreuung sowie für wertvolle konstruktive Anregungen.

Für die Durchführung elektronenmikroskopischer Aufnahmen bedanke ich mich bei Dr. Larissa Kolesnikova (Institut für Virologie, Marburg) und für die histologischen Untersuchungen von Mausgeweben bei Dr. L. Quintanilla-Fend (Institut für Pathologie, Universität Tübingen).

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Lars Nitschke (Universität Erlangen) und Prof. Dr. Ari Waisman (Universität Mainz) und ihren Mitarbeitern für die Blastozysten-Injektionen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, die für eine angenehme Atmosphäre und eine gute Zusammenarbeit gesorgt haben. Besonders hervorzuheben sind hierbei Steffi und Sonja für ihre tatkräftige Unterstützung und interessanten Gespräche.

Außerdem danke ich Janine, Karo, Cornelius, Jessi, Heike und Jenny für amüsante Stunden in und außerhalb des Labors. Besonders bedanke ich mich bei Anna für ihre Hilfe beim Klone „picken“ und ihr freundliches Wesen.

Nicht zu vergessen Iris, die mich durch die vielen „geklauten“ Pommes vor einer Acrylamidvergiftung bewahrt hat. Maria danke ich für ihre Gesellschaft beim mittäglichen Festmal und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich auch bei Elfriede, die mit ihrer Fröhlichkeit immer für gute Laune im Labor gesorgt hat und leider viel zu früh von uns gegangen ist.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.