

Studien zur molekularen Kommunikation des Adapterproteins SLP-65 mit anderen Signalmolekülen in B-Lymphozyten

Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Annika Grabbe

April 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2001 bis Januar 2005 in der Arbeitsgruppe Biochemie I der Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Herrn

Prof. Dr. Jürgen Wienands

durchgeführt. Bei ihm möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit bedanken, insbesondere für sein stetiges Interesse und seine Bereitschaft über Experimente zu diskutieren sowie seine besondere Fähigkeit nicht nur zu motivieren, sondern auch mit konstruktiver Kritik zu unterstützen. Außerdem haben die sehr gute Ausstattung des Arbeitsplatzes und vielen Möglichkeiten Projekte in die Tat umzusetzen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr. L. Weber
Referent:	Prof. Dr. J. Wienands
Koreferent:	Prof. Dr. H. Tschesche
zusätzliche Prüfer:	Prof. Dr. G. Lück, Dr. M. Letzel
Termin der mündlichen Prüfung:	17. Juni 2005

Danksagung

Prof. Dr. Harald Tschesche möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken.

Prof. Dr. Christian Herrmann gebührt ein großer Dank für die Unterstützung bei den Kristallisationsexperimenten sowie ITC-Messungen und für seine stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Eckhard Hofmann danke ich für die fruchtbare Kooperation bei den Kristallisationsexperimenten und besonders für die Analyse der Röntgenstruktur.

Bei Prof. Dr. Michael Famulok und Dr. Ipsita Roy möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Identifizierung SLP-65-bindender Aptamere bedanken.

Dr. Jörg Bartsch möchte ich für die Bereitstellung des Luminometers danken.

Meinen Blockpraktikanten Mareke Oley und Markus Brockmann möchte ich für die Unterstützung bei der Klonierung der SLP-76 cDNA bzw. der Optimierung der Aufreinigungsbedingungen von rekombinantem SLP-65 danken.

Stephan Ewers danke ich für die Hilfe bei der Aufreinigung der Grb2-Domänen während seines Blockpraktikums und für die Analyse der Phosphorylierung der SLP-65-SH2-Mutanten im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Den Kollegen aus Göttingen und Ehemaligen der BCI aus Bielefeld danke ich für das super Arbeitsklima und den außerordentlich guten Zusammenhalt in auch nicht einfachen Phasen der Arbeit – und natürlich für die legendären Partys!

Meine engen Freundinnen Ilka Beeck und Tanja Derschum haben mir in nicht ganz leichten Momenten den Rücken gestärkt. Danke für eure Unterstützung, Motivation und Freundschaft.

Kai Becker danke ich dafür, dass er in den letzten anderthalb Jahren für einen Ausgleich gesorgt hat und für mich da war.

Meiner Familie, die mich immer motiviert und an mich geglaubt hat, möchte ich für ihre Unterstützung danken. Besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungen	VI
II	Symbole für Aminosäuren	IX
III	Symbole für Nucleotide	X
1	Einleitung	1
1.1.	Protein-Interaktionsdomänen und Signalkaskaden	6
1.2.	Die SLP-Familie der Adapterproteine	7
1.2.1.	SLP-76	8
1.2.2.	SLP-65	9
1.2.3.	Charakterisierung und funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen SLP-Proteinen und Mitgliedern der Grb2-Familie	12
1.3.	Molekulare Mechanismen der EBV-vermittelten Signalleitung über LMP2A	13
2	Problemstellung	15
3	Zusammenfassung	16
4	Material	18
4.1.	Materialien	18
4.2.	„Kits“	18
4.3.	Geräte	19
4.4.	Chemikalien und Reagenzien	20
4.4.1.	Puffer und Medien	21
4.4.2.	Enzyme	23
4.4.3.	Antikörper	23
4.5.	Zelllinien	25
4.5.1.	Suspensionszellen	25

4.5.2. Adhärente Zelllinien	26
4.5.3. Bakterienstämme	26
4.6. Vektoren	27
4.7. cDNAs	28
4.8. Oligonucleotide	28
4.9. Klonierte Konstrukte	30
4.10. Peptide	31
4.11. Computersoftware	31
5 Methoden	32
5.1. Molekularbiologische Methoden	32
5.1.1. Anzucht und Lagerung von Bakterien	32
5.1.2. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	32
5.1.3. Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	32
5.1.4. RNA-Präparation aus K46	32
5.1.5. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	33
5.1.6. Reverse Transkription von mRNA (RT-PCR)	33
5.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986)	33
5.1.8. Sicherung von PCR-Produkten mit Hilfe der T/A-Klonierung	34
5.1.9. Klonierung von PCR-Produkten in den pENTR-TOPO Vektor	35
5.1.10. Klonierung über das Gateway-System (Invitrogen)	35
5.1.11. Enzymatische Modifikation von DNA	35
5.1.12. Agarose-Gelelektrophorese	36
5.1.13. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	36
5.1.14. DNA-Sequenzierung	36
5.2. Zellbiologische Methoden	36
5.2.1. Kulturbedingungen	36
5.2.2. Kultivierung von nicht-adhärenen Zellen	36
5.2.3. Kultivierung von adhärenen Zellen	37
5.2.4. Bestimmung der Zellzahl	37
5.2.5. Auftauen und Einfrieren von Zellen	37

5.2.6. Transfektion von PlatE mit „FuGENE“ zur Produktion rekombinanter Viren (modifiziert nach Morita et al., 2000)	37
5.2.7. Erzeugung von stabilen DT40-Transfektanden durch Elektroporation	37
5.2.8. Transfektion von DT40 Zellen für den Reportergenassay	38
5.2.9. Transfektion mit rekombinanten Retroviren	38
5.2.10. Infektion von DT40 Zellen mit rekombinanten Retroviren	38
5.2.11. Bestimmung von Oberflächen IgM am Durchflusszytometer	39
5.2.12. Beladung von Zellen mit dem calciumionensensitiven Fluorophor Fluo-3	39
5.2.13. Ca ²⁺ -Messungen am Durchflusszytometer (Engelke et al., 2002)	39
5.3. Proteinbiochemische Methoden	40
5.3.1. Expression rekombinanter Proteine	40
5.3.2. Affinitätschromatographie	42
5.3.3. Gelfiltration	42
5.3.4. Ultrafiltration	43
5.3.5. Bradford-Test zur Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration	43
5.3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
5.3.7. Western Blotting	44
5.3.8. Proteinsequenzierung	44
5.3.9. Immunpräzipitationen (IPs)	44
5.3.10. Affinitätspräzipitationen (APs)	44
5.3.11. MAPK-Aktivierung	45
5.4. Reportergenassay	45
5.4.1. Luciferase-basierter Reportergenassay für die Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NFAT/AP-1	45
5.5. Biophysikalische Methoden	48
5.5.1. Isotherme Titrationskalorimetrie	48
5.6. Kristallographische Methoden	50
5.6.1. Kristallisation	50
6 Ergebnisse	52
6.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung von SLP-Proteinen und Bindungspartnern von SLP-65	52

6.1.1. SLP-65	52
6.1.2. SLP-76	54
6.1.3. Aufreinigung von SLP-65-Bindungspartnern für <i>in vitro</i> -Interaktionsstudien	55
6.1.4. Anwendungen der rekombinanten Proteine	57
6.2. Biochemische Charakterisierung der SH3-bindenden Region von SLP-65	59
6.2.1. Identifizierung der SLP-65-bindenden SH3-Domäne von Grb2	59
6.2.2. Identifizierung des atypischen SH3-bindenden Motivs von SLP-65	61
6.2.3. Kristallisation und Strukturaufklärung des Komplexes mGrb2[C-SH3]/65-Pro	64
6.2.4. Interaktion zwischen SLP-65 und Grb2 in humanen Zellen	67
6.3. Welche Rolle spielt das atypische SH3-Bindemotiv von SLP-65 in der Signalleitung des BCRs?	69
6.3.1. Rekonstitution SLP-65-defizienter DT40 B-Zellen mit verschiedenen chSLP-65-Mutanten	69
6.3.2. Rekonstitution der <i>slp-65</i> ^{-/-} DT40 mit einer chSLP-65-Deletionsmutante	71
6.3.3. Kontrolle der Grb2[C-SH3]-Bindekapazität der chSLP-65-Deletionsmutante Δ 261-269	72
6.3.4. Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die BCR-Signalleitung	73
6.3.5. Einfluss der verschiedenen chSLP-65-Mutanten auf das BCR-induzierte Ca ²⁺ -Signal	75
6.3.6. Ist SLP-65 beteiligt an der Grb2-vermittelten Regulation des extrazellulären Ca ²⁺ -Einstroms?	76
6.3.7. Aktivierung der MAPK-Signalwege durch die chSLP-65 Deletionsmutante	77
6.3.8. Hat Δ 261-269 Einfluss auf die BCR-induzierte c-Fos Expression?	80
6.3.9. Einfluss von Δ 261-269 auf die NFAT/AP-1-Aktivierung	81
6.4. Bedeutung der SH2-Domäne von SLP-65 für die Signalleitung vom BCR	85
6.4.1. Inaktivierung der SLP-65-SH2-Domäne durch eine Trippel-Mutation bzw. Deletion	85
6.4.2. Wird SLP-65 mit inaktiver SH2-Domäne noch phosphoryliert?	88
6.4.3. Einfluss der SLP-65-SH2-Domäne auf das Ca ²⁺ -Signal	89
6.5. Selektive Signalleitung über SLP-65 in EBV-infizierten B-Zellen	90
6.5.1. Untersuchung der SLP-65 Funktion in der konditionalen LCL-Linie EREB2.5	90
6.5.2. Ca ²⁺ -Mobilisierung in EREB2.5-Zellen	91

6.5.3. Phosphorylierungsmuster der Proteine des Calcium-Initiationskomplexes in EREB2.5-Zellen	92
6.5.4. Phosphorylierung der einzelnen Tyr-Motive von SLP-65 in EREB2.5-Zelle	95
6.5.5. Interaktionsverhalten von SLP-65 mit seinen Bindungspartnern in EREB2.5-Zellen	96
7 Diskussion	100
7.1. Identifizierung und Charakterisierung des atypischen SH3-bindenden Motivs von SLP-65	102
7.2. Die funktionelle Bedeutung der atypischen SH3-Bindestelle von SLP-65	104
7.2.1. Einfluss auf das BCR-initiierte Ca ²⁺ -Signal	105
7.2.2. Regulation der MAPK-Signalwege	105
7.2.3. Regulation von Transkriptionsfaktoren	106
7.2.4. Wie reguliert die SH3-bindende Domäne die Aktivierung der MAPK bzw. die Genexpression?	107
7.2.5. Welche biologische Relevanz könnte die atypische SH3-Bindestelle haben?	110
7.3. Die funktionelle Bedeutung der SH2-Domäne von SLP-65 für die Signalleitung vom BCR	111
7.4. Selektive Signalleitung über die Phosphotyrosinmotive von SLP 65 in EBV-infizierten B-Zellen	113
8 Literaturverzeichnis	116
9 Anhang	132
9.1. Aminosäuresequenz von mSLP-65	132
Abbildungsverzeichnis	133
Tabellenverzeichnis	135

I Abkürzungen

A	Ampere
ADAP	<i>adhesion and degranulation promoting adapter molecule</i>
ALL	Akute Lymphoblastoide Leukämie
ATCC	<i>American type culture collection</i>
AP	Affinitätspräzipitation
APS	Ammoniumpersulfat
BASH	<i>B cell adaptor containing SH2 domain</i>
BCR	B-Zell-Antigenrezeptor (<i>B cell antigen receptor</i>)
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Btk	<i>bruton's tyrosine kinase</i>
Cbl	<i>casitas B cell-lineage lymphoma</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ch	<i>chicken</i>
CMV	Cytomegalievirus
CrkL	<i>CT10 regulator of kinase-like</i>
CS	<i>chicken serum</i>
Δ	Deletion
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythrin
EBNA	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F(ab)	antigenbindendes Fragment
Fc	kristallisierbares Fragment von Antikörpern
FcR	Fc-Rezeptor
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
Flag	Epitop-Tag: DYDDDDDK (Sigma-Aldrich)
Fluo-3	4-(2,7-Dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'-(ethylenedioxy)dianilin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Fyn	<i>Fgr/yes-related novel PTK</i>
g	Erdbeschleunigung
Gads	Grb2-related adapter protein
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK-3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
h	human
HPK-1	<i>hematopoietic progenitor kinase-1</i>
HRPO	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
Itk	<i>Interleukin-2 inducible T-cell kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	<i>latent membrane protein</i>
LTR	retrovirale <i>long terminal repeat</i> -Sequenz
Lyn	<i>Lck/yes-related novel kinase</i>
m	Maus
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mcs	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
mM	millimolar

μM	micromolar
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger- RNA</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor for κ-gene in B-cells</i>
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC- γ 1/2	Phospholipase C- γ 1/2
pre-BCR	<i>pre-B cell antigen receptor</i>
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
PV	Pervanadat
pY	Phosphotyrosin
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SH	<i>Src-homology region</i>
SLP-65	<i>SH2 domain-containing leukocyte protein of 65 kDa</i>
SLP-76	<i>SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>

TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
Tec	<i>Tyrosine kinase expressed in hematocellular carcinoma</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vav	<i>Vav oncogene</i>
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
xid	X-gekoppelte Immundefizienz
XLA	X-gekoppelte Agammaglobulinämie
Y	Tyrosin

II Symbole für Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S

Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

III Symbole für Nucleotide

Nucleotid	Abkürzung
Desoxyadenin	A
Desoxycytosin	C
Desoxyguanin	G
Desoxythymin	T

1 Einleitung

Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato beschrieben 1890 erstmals Antikörper unter dem Begriff Anti-Toxine. Sie identifizierten diese als Komponenten des Blutserums eines Tetanus-Toxin-infizierten Kaninchens, die spezifisch an den Krankheitserreger binden (von Behring und Kitasato, 1890). Für die Regulation und Funktion der Antikörper formulierte zunächst Paul Ehrlich 1900 die Seitenketten-Theorie (Ehrlich, 1900). F. McFarlane Burnet entwickelte daraus 1959 die Theorie der klonalen Selektion. Demnach sollten viele verschiedene Zellen vorhanden sein, die potenziell dazu in der Lage sind, Antikörper zu produzieren. Jede dieser Zellen kann Antikörper unterschiedlicher Spezifität hervorbringen, die in membrangebundener Form vorliegen und als Rezeptoren für Antigene dienen. Durch die Bindung des Antigens wird die Zelle angeregt zu proliferieren, was zu vielen identischen Nachkommen bzw. Klonen führt, die wiederum Antikörper der gleichen Spezifität freisetzen können. Das Erkennen ubiquitärer Autoantigene hingegen führt zur Beseitigung, d.h. negativen Selektion des Klons (Burnet, 1959). Die klonale Selektion ist das Hauptprinzip der erworbenen Immunität. James Gowen identifiziert Lymphozyten als Grundeinheiten der klonalen Selektion, indem er diese Zellen aus Ratten entfernte und einen Verlust aller bekannten Immunreaktionen beobachtete (Gowen et al., 1961). Zu den zwei Hauptgruppen der Lymphozyten gehören die B-Zellen, die im Knochenmark, und T-Zellen, die im Thymus reifen. Die Hauptaufgabe der B-Zellen besteht darin, nach Kontakt mit dem Antigen und Aktivierung durch T-Helferzellen entsprechende Antikörper zu sezernieren, die daraufhin zur Eliminierung des Fremd-Antigens durch Neutralisation, Opsonisierung oder Aktivierung des Komplementsystems beitragen. Die Vielfalt der Antigenrezeptoren entsteht durch die zufällige, somatische Rekombination von einigen hundert Gensegmenten (Schatz et al., 1992; Wagner und Neuberger, 1996).

Während der B-Zell-Entwicklung muss gewährleistet werden, dass diese mit Fremd-Antigenen interagieren können, um zur Aktivierung der Immunantwort beizutragen. Gleichzeitig muss aber die Bindung von Selbst-Antigenen ausgeschlossen werden, die in Autoreaktivität resultieren könnte. Dazu durchlaufen B-Zellen während der Entwicklung verschiedene Kontrollpunkte, die sicherstellen, dass die somatische Rekombination zu funktionellen, nicht autoreaktiven Antigenrezeptoren führt. Zwei wichtige und kritische Hürden sind dabei die Oberflächen-Expression und Signalleitung des *pre-B cell antigen receptors* (pre-BCR) und des *B cell antigen receptors* (BCR). Die Expression des pre-

BCRs, bestehend aus der μ -H-Kette, der Ersatz L-Kette und dem Ig- α /Ig- β Heterodimer, bestimmt den Allelausschluss der H-Kette und resultiert in klonaler Expansion sowie Differenzierung in das nächste Entwicklungsstadium (Reichlin et al., 2001). Die nächste große Hürde besteht in der Expression des BCRs. Diese kennzeichnet den Allelausschluss der L-Kette. Der BCR besteht aus einem membranständigen Immunglobulin der Klasse M (mIgM) sowie der Signaluntereinheit Ig- α /Ig- β . Nachdem diese unreifen B-Zellen auf Selbst-Toleranz überprüft wurden, exprimieren sie zusätzliche BCR mit einer mIgD-Komponente, verlassen das Knochenmark und wandern in die peripheren Lymphgewebe. Die Herstellung des Rezeptorrepertoires ist somit unabhängig vom Zusammentreffen mit Antigenen. Reife, naive IgM- und IgD-exprimierende Zellen zirkulieren durch die peripheren lymphatischen Organe, bis sie auf ein Antigen treffen. Nachdem diese B-Zellen mit einem Antigen und einer spezifischen T-Helferzelle interagiert haben, sind sie aktiviert, beginnen zu proliferieren und in Plasmazellen, die große Mengen löslicher Antikörper sezernieren, oder in langlebige Gedächtniszellen zu differenzieren (Goodnow et al., 1995; Loffert et al., 1994). Im Zuge der Affinitätsreifung durch somatische Hypermutationen kann auch ein Isotypenwechsel der Immunglobuline stattfinden. IgG ist der häufigste Isotyp im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten, während IgA in Sekreten und IgE hauptsächlich in extrazellulären Flüssigkeiten auftreten (Janeway et al., 1967).

Für diese strikte Regulation der B-Zell-Entwicklung ist die Signaltransduktion vom pre-BCR und BCR von essenzieller Bedeutung. Eine Blockade dieser Signale, wie sie in der genetisch bedingten Erkrankung X-gekoppelte Agammaglobulinämie (XLA) vorkommt, führt dazu, dass die B-Zell-Entwicklung in der pre-B-Zell-Phase endet. Daher können keine reifen B-Zellen oder Antikörper gebildet werden. Die Krankheit beruht auf einem oder mehreren Defekt(en) in dem Gen für die Bruton-Tyrosinkinase (Btk) (Khan et al., 1995).

Der BCR scheint auch in der Abwesenheit eines Antigens ein Überlebenssignal (*maintenance signal*) weiterzuleiten, da die induzierbare Deletion der mIg schweren Kette des BCRs zu einer raschen Eliminierung der B-Zellen führt (Lam et al., 1997; Reth und Wienands, 1999). Die Signale des pre-BCRs und des BCRs können nicht von dem kurzen, drei Aminosäure (AS) umfassenden intrazellulären Teil der μ -Kette weitergeleitet werden. Dafür ist das signalleitende, Disulfid-verbrückte Ig- α /Ig- β Heterodimer zuständig. Dieses ist hochkonserviert und jede Kette verfügt über eine extrazelluläre sowie intrazelluläre Domäne, eine Transmembran-Region und evolutionär konservierte Signalmotive. Die cytoplasmatischen Domänen von Ig- α und Ig- β verfügen über so

genannte *tyrosin-based activation motifs* (ITAMs) (zur Übersicht: Sayegh et al., 2000). mIgM benötigt das Ig- α /Ig- β Heterodimer, um auf die Zelloberfläche zu gelangen, da die Transmembrandomäne von IgM polare AS-Reste enthält, die durch das Heterodimer in der Membran abgeschirmt werden. Durch die Bindung von oligomeren oder multivalenten Antigenen an den BCR wird die Quervernetzung und Clusterbildung der Rezeptoren ausgelöst, wodurch die Signalkaskade aktiviert wird. Die exakte Struktur dieses BCR-Oligomers und auch der Mechanismus für die Aktivierung sind noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass die Antigenrezeptoren in einem vorgeformten Komplex vorliegen, möglicherweise sogar in räumlicher Nähe mit den signalleitenden Molekülen (Schamel und Reth, 2000; Wienands et al., 1996). Nach der Quervernetzung lokalisieren die BCR in den Signalplattformen der Zellmembran, den *lipid rafts*, in denen Src-Kinasen angereichert sind. Eine der wichtigsten Eigenschaften der *lipid rafts* ist die Fähigkeit, bestimmte Proteine aufzunehmen oder auszuschließen (Cheng et al., 1999; Aman und Ravichandran, 2000). Diese Translokation der BCR führt zur Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen (PTKs), die dann eine Reihe von Substraten phosphorylieren. Die Phosphorylierung der ITAMs von Ig- α und Ig- β ermöglichen die Bindung der Kinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) über ihre zwei SH2-(*Src-homology 2*)-Domänen, woraufhin Syk selbst durch die Src-Kinasen phosphoryliert und aktiviert wird (Leo et al., 2002; Veillette et al., 2002; Wienands, 2000). Zwei Substrate von Syk sind *SH2-containing leukocyte protein of 65 kDa* (SLP-65, auch *B cell linker protein* (BLNK) oder *B cell adaptor containing SH2-domain* (BASH) genannt) und die Phospholipase-C- γ 2 (PLC- γ 2). Diese bilden mit der Tec-Kinase Btk den Calcium-Initiationskomplex. SLP-65 gehört zu der Gruppe der Adapterproteine, deren charakteristische Eigenschaft darin besteht, keine intrinsische, enzymatische Aktivität zu besitzen. SLP-65 fungiert als Kern einer Signaleinheit, die für die Aktivierung von PLC- γ 2 durch die Phosphorylierung der Kinasen Syk und Btk verantwortlich ist (Kurosaki und Tsukada, 2000). Außerdem wird die Aktivierung von Btk durch Syk von SLP-65 vermittelt (Baba et al., 2001). Aktivierte PLC- γ 2 spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). DAG rekrutiert verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) an die Plasmamembran. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER) und bewirkt so die Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ (Leo et al., 2002). Ein erhöhter cytosolischer Ca²⁺-Spiegel führt zur Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Enzyme. Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert Serin- und Threoninreste des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T cells* (NFAT). Das ermöglicht die Translokation von NFAT in den Zellkern, wo es an Konsensus-Sequenzen der DNA bindet und so die Genexpression reguliert. Die Rephosphorylierung von NFAT

durch Kinasen wie GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*) lösen den anschließenden Kernexport aus (zur Übersicht: Serfling et al., 2004; Horsley und Pavlath, 2002).

Die Aktivierung von PKC resultiert zusammen mit der erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor κB* (NF- κB). Die Aktivierung von NF- κB zieht einen anti-apoptotischen Effekt nach sich, was mit einer onkogenen Kapazität einhergeht. NFAT kontrolliert im Gegensatz zu NF- κB das adaptive Immunsystem, indem es den Aktivierungs-induzierten Zelltod in T- und B-Zellen unterstützt und als Tumorsuppressor wirkt.

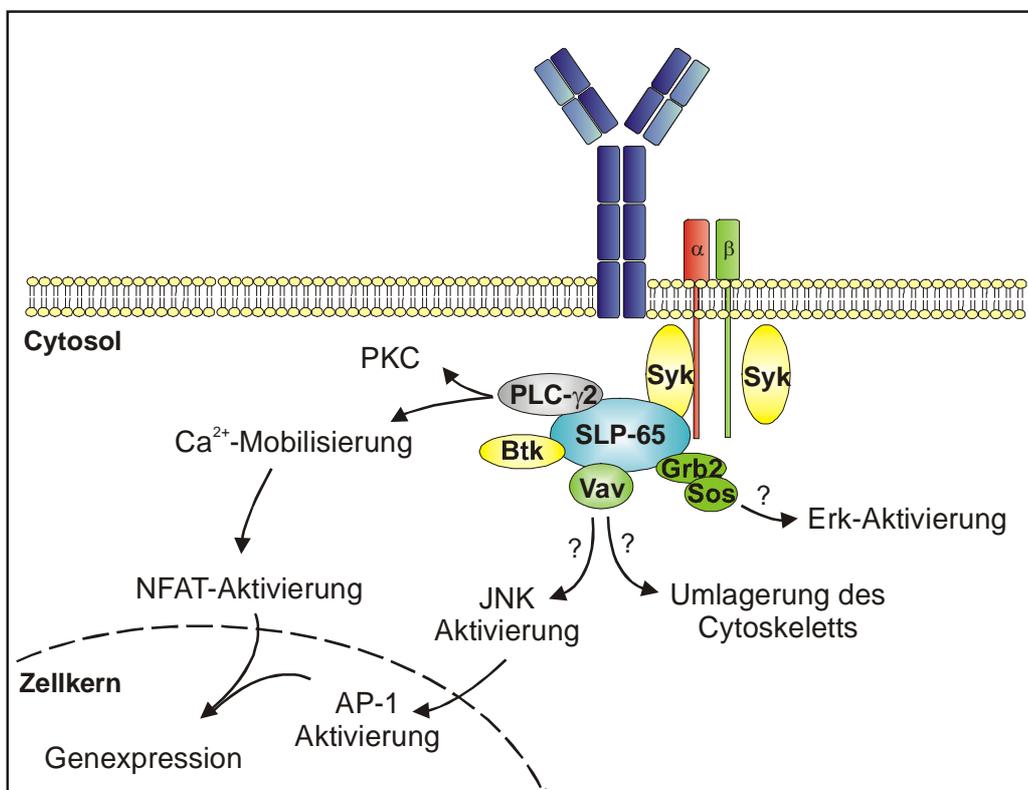


Abb. 1.01 Signalwege, die nach BCR-Quervernetzung aktiviert werden

Nach Stimulation der B-Zellen über den Antigenrezeptor wird eine Phosphorylierungskaskade aktiviert, die zur Phosphorylierung der ITAMs führt, an die Syk bindet. Syk phosphoryliert weitere Proteine, wie z.B. SLP-65, das Btk rekrutieren kann. Btk und Syk aktivieren PLC- γ 2, die daraufhin IP₃ und DAG produziert. IP₃ löst den Einstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern aus und DAG aktiviert PKC. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme und dadurch die Aktivierung von NFAT, während PKC NF- κB aktiviert. Der dritte Hauptsignalweg wird durch GEFs, wie z.B. Vav und Sos initiiert, die kleine GTPasen, wie z.B. Ras und Rho, aktivieren, die dann die MAPK-Kaskade aktivieren. MAPKs können in den Zellkern translocieren und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 aktivieren.

Ein weiterer Signalweg, der auch zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, wird durch *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) vermittelt. MAPK partizipieren an verschiedenen zellulären Reaktionen auf extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Transkriptionsregulation, Apoptose oder Überleben der Zellen, maligne Transformation und Regulation des Zellzyklus. MAP-Kinase-Kaskaden werden alle nach dem gleichen Schema aktiviert. Nach Quervernetzung des BCRs werden kleine GTPasen durch den Austausch von GDP gegen GTP, vermittelt von *guanine-nucleotide exchange factors* (GEF), aktiviert. Diese aktivierten GTPasen aktivieren ihrerseits das erste Enzym der Kaskade, eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK). Diese phosphoryliert das zweite Enzym, eine MAPKK, die dann die MAPK an zwei Stellen, einem Tyrosin- und einem Threoninrest phosphoryliert. Diese doppelt phosphorylierte, aktivierte MAPK kann in den Zellkern translocieren und Transkriptionsfaktoren aktivieren. Die Signalleitung vom BCR führt über die Aktivierung der GEFs *Son of sevenless* (Sos) und *Ras guanine-nucleotide releasing protein* (RasGRP) zur Aktivierung von GTPasen der Ras-Familie. Diese aktiviert die über die Phosphorylierungskaskade Ras/Raf/Mek die MAPK Erk (*extracellular signal regulated kinase*) (Oh-hora et al., 2003). Erk phosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor Elk-1, der daraufhin in der Zellkern wandert und die Transkription weiterer Gene initiiert, z.B. von c-Fos. Die Signalleitung über den BCR und den BCR-Corezeptorkomplex, bestehend aus CD19, CD21 und CD81, führt zur Aktivierung des GEFs Vav. Die Aktivierung von Vav induziert die Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie, die dann die MAPK JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 aktivieren. JNK phosphoryliert und aktiviert die Transkriptionsfaktorfamilie Jun. p38 aktiviert den Transkriptionsfaktor Elk-1, der die Expression von c-Fos reguliert. Jun bildet mit c-Fos den heterodimeren Transkriptionsfaktorkomplex AP-1. AP-1 assoziiert mit NFAT. Dieser ternäre Komplex, aktiviert über die drei verschiedenen Signalwege 1) Ca²⁺-Mobilisierung, 2) Ras/Raf/Erk-Aktivierung und 3) Rho/Rac/JNK-Aktivierung, reguliert die Expression vieler Gene, die z.B. zur Kontrolle des Zellzyklus oder -tods beitragen. Eine ausbalancierte Aktivierung von NFAT und AP-1 ist wichtig für eine effektive Immunantwort (zur Übersicht: Robinson und Cobb, 1997; Ballard, 2001; Plataniias, 2003).

Die Signalleitung vom TCR unterscheidet sich in einigen Punkten von der des BCRs, obwohl viele B-Zell-homologe Proteine in T-Zellen exprimiert werden. Nach Ligation des TCRs werden die PTKs Fyn und Lck der Src-Familie aktiviert und phosphorylieren die ITAMs der CD3 Untereinheiten des TCRs, was die Aktivierung und Bindung von ZAP-70 (*ζ-chain-associated protein of 70 kDa*), einer Kinase der Syk-Familie, nach sich zieht.

ZAP-70 phosphoryliert dann LAT (*linker of activated T-cells*) und SLP-76 (*SH2-domain-containing protein of 76 kDa*). Phosphoryliertes LAT rekrutiert sowohl Gads (*Grb2-related adaptor protein*) als auch PLC- γ 1. SLP-76 wird indirekt über die konstitutive Assoziation mit Gads an LAT, bzw. an der Plasmamembran lokalisiert. PLC- γ 1 ist außerdem über die SH3-(*Src-homology 3*)-Domäne an SLP-76 gebunden. Die Aktivierung von PLC- γ 1 durch ZAP-70 und I κ k (*Interleukin-2 inducible T-cell kinase*) resultiert in der Produktion von IP₃ und DAG, was zur Freisetzung von Ca²⁺ und der Aktivierung der PKC führt - analog zu der Aktivierung von PLC- γ 2 in B-Zellen durch Syk und Btk. LAT ist in T-Zellen von wesentlicher Bedeutung für die Ausbildung des Calcium-Initiationskomplexes. Ein funktionell vergleichbares Protein konnte in B-Zellen bisher noch nicht identifiziert werden. Die Rekrutierung des Calcium-Initiationskomplexes an die Membran ist – im Gegensatz zu T-Zellen – in B-Zellen noch nicht aufgeklärt (zur Übersicht: Janssen und Zhang, 2003; Abraham und Weiss, 2004).

1.1. Protein-Interaktionsdomänen und Signalkaskaden

Die Antigenrezeptoren initiieren Signale, die in der Zelle weitergeleitet und amplifiziert werden müssen. Signalkaskaden, die durch den BCR oder TCR ausgelöst werden, lösen Effekte wie z.B. Aktivierung, Differenzierung, Apoptose oder Proliferation aus. Dazu reicht ein simpler „An-/Aus“-Mechanismus nicht aus, sondern die Signale müssen zusätzlich in den Parametern Intensität und Dauer variiert werden können. Diese molekularen Mechanismen zu verstehen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Adapterproteine wurden erst vor einigen Jahren als zentrale Organisatoren und Regulatoren solcher Signalkaskaden erkannt. Anhand der Tatsache, dass sie über keine intrinsische katalytische Aktivität verfügen, wurde ihre Bedeutung lange unterschätzt. Es ist mittlerweile bekannt, dass sie nicht nur Signalkomplexe über konstitutive oder induzierbare Interaktionen organisieren, sondern außerdem auch die Aktivität von Effektormolekülen regulieren. Sie haben eine gerüstbildende Funktion, die die subzelluläre Lokalisation von Signalkomplexen vorgibt. Dadurch gelangen Enzyme in die räumliche Nähe ihrer Regulatoren oder Substrate (zur Übersicht: Jordan et al., 2003). Das Fehlen eines Adapterproteins kann drastische Folgen haben. Mäuse, denen z.B. das ubiquitäre Protein Grb2 fehlt, sind nicht lebensfähig. Grb2 ist ein kleines Protein, das nur aus zwei terminalen SH3- und einer zentralen SH2-Domäne besteht (Saxton et al., 2001). SH2- und PTB-(*phosphotyrosine-binding domains*) Domänen binden an Phospho-

tyrosinmotive und bieten die Möglichkeit einer stimulationsabhängigen Interaktion bzw. Signaltransduktion. SH3-Domänen hingegen binden wie auch WW-Domänen an prolinreiche Sequenzen. Phospholipide, insbesondere Phosphoinositole interagieren mit *pleckstrin-homology* (PH)-, FYVE- oder ENTH-Domänen und induzieren so eine Membranrekutierung von Effektormolekülen (zur Übersicht: Pawson et al., 2002). Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten SH2- und SH3-Domänen kurz vorgestellt.

SH2-Domänen binden stimulationsabhängig an Phosphotyrosinmotive und tragen dadurch zu der temporären Formation von Signalkomplexen bei. Außerdem können SH2-Domänen eine regulatorische Funktion besitzen. Die Bindung der Tandem-SH2-Domänen von Syk an doppelt phosphorylierte ITAMs verstärkt z.B. die Kinase-Aktivität durch eine Konformationsänderung des Moleküls (Johnson et al., 1995). SH3-Domänen vermitteln im Gegensatz zu SH2-Domänen konstitutive Wechselwirkungen mit prolinreichen Motiven. Alle SH3-Domänen besitzen eine evolutionäre und gruppenspezifische Faltung, bestehend aus fünf β -Strängen, die ein β -Fass bilden (Musacchio et al., 1992). Liganden der SH3-Domänen binden über eine links-gängige Polyprolin-Typ II helikale Konformation und haben das Konsensus-Motiv XP-x-XP (XP ist ein Dipeptid, das von einem AS-Rest getrennt wird), wobei beide Orientierungen möglich sind. Mittlerweile wurden verschiedene SH3-Erkennungssequenzen identifiziert, die in acht Klassen für SH3-Liganden eingeteilt wurden (Cesareni et al., 2002). Interessanterweise wurde ein atypisches SH3-Bindemotiv der Sequenz PxxxRxxKP identifiziert, dass die Bindung zwischen SLP-76 und Grb2-Familienmitgliedern vermittelt (Lewitzky et al., 2001) und in Kap. 1.2.3 detailliert beschrieben wird.

1.2. Die SLP-Familie der Adapterproteine

Die SLP-Familie der Adapterproteine umfasst SLP-76, SLP-65 und *cytokine-dependent hematopoietic cell linker* (Clnk). Diese drei Mitglieder teilen nur eine geringe Sequenz-, dafür aber eine ausgeprägte Strukturhomologie. Sie besitzen alle eine saure N-terminale Region, mehrere Tyrosin-Phosphorylierungsmotive, eine zentrale prolinreiche Region und eine C-terminale SH2-Domäne (zur Übersicht: Wu und Koretzky, 2004).

Da das dritte Mitglied Clnk oder auch MIST (*mast cell immunoreceptor signal transducer*) genannt in aktivierten T-Zellen, IL-2 aktivierten NK-Zellen und Mastzellen exprimiert wird,

konzentriert sich die Beschreibung der SLP-Adapter auf SLP-65 und -76 (Cao et al., 1999; Goitsuka et al., 2000).

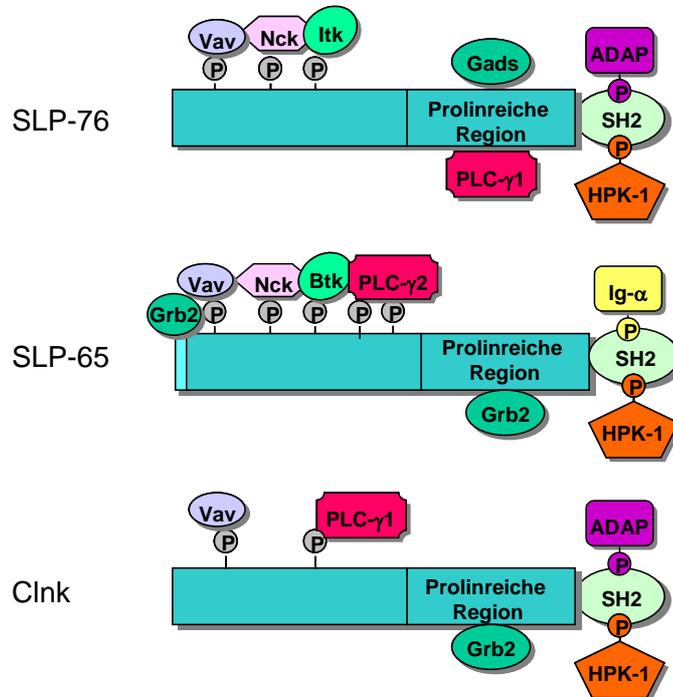


Abb. 1.02 Domänenstruktur und Bindungspartner der SLP-Proteine

SLP-76, SLP-65 und Clnk besitzen die gleiche Domänenstruktur. Diese besteht aus einer N-terminalen sauren Domäne, mehreren Tyrosin-Phosphorylierungsmotiven, einer zentralen prolinreichen Region und einer C-terminalen SH2-Domäne. Außerdem sind die bekannten Bindungspartner und die jeweils interagierende Domäne der SLP-Proteine dargestellt. An die SH2-Domänen kann nur einer der dargestellten Interaktionspartner binden.

1.2.1. SLP-76

SLP-76 wurde 1995 in einem *Screen* für Substrate von TCR-aktivierten PTKs über einen *in vitro* Grb2-Bindungsassay identifiziert. SLP-76 wird in hämatopoetischen Zellen exprimiert und wurde intensiv in der T-Zelllinie Jurkat untersucht. In diesen und primären T-Zellen wird SLP-76 nach TCR-Stimulation phosphoryliert (Jackman et al., 1995). Durch die Überexpression des Adapterproteins in Jurkat T-Zellen konnte eine verstärkte TCR-vermittelte Aktivierung von Erk, NFAT und IL-2 beobachtet werden (Motto et al., 1996). Eine Deletion der N-terminalen sauren Domäne, einem Abschnitt der prolinreichen Region oder der C-terminalen SH2-Domäne, hebt die SLP-76-vermittelten Effekte auf die NFAT-

Aktivierung wieder auf (Musci et al., 1997). Die Phosphotyrosinmotive von SLP-76 werden von ZAP-70 phosphoryliert, wodurch SLP-76 induzierbar mit Vav1, Nck und Itk interagiert (Fischer et al., 1998; Sells et al., 1997; Snapper et al., 1998). Die prolinreiche Region vermittelt die konstitutive Bindung zu Gads, einem Mitglied der Grb2-Familie, und PLC- γ 1. Die SH2-Domäne bindet phosphoryliertes ADAP (*adhesion and degranulation promoting adapter molecule*) und die Serin/Threonin-Kinase HPK-1 (*hematopoietic progenitor kinase-1*) (Wardenburg et al., 1996; Su et al., 1999; Wunderlich et al., 1999; Yablonski et al., 2001). ADAP ist an der Regulation von CD69 und IL-2 sowie der TCR-induzierten Aktivierung der Integrine LFA-1 und VLA-4 beteiligt und verbindet so SLP-76 mit dem Integrin-vermittelten *inside-out signalling* (Peterson et al., 2001). HPK-1 wurde als negativer Regulator der TCR-Signaltransduktion beschrieben, indem es die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und Erk inhibiert, aber die Aktivierung von JNK1 unterstützt (Liou et al., 2000). Obwohl SLP-76 über die Interaktion zu Grb2 identifiziert wurde, konnte später gezeigt werden, dass SLP-76 eine höhere Affinität zu dem Grb2-homologen Protein Gads, das in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, aufweist (Liu et al., 2003). Die SH2-Domäne von Gads bindet an das phosphorylierte Transmembran-Adapterprotein LAT und verhilft so SLP-76 an die Membran bzw. in die *lipid rafts*. Dort leitet ein multimolekularer Komplex die TCR-initiierten Signalprozesse weiter (Asada et al., 1999; Zhang et al., 1998).

SLP-76 defiziente Mäuse wurden 1998 generiert. 60 % dieser Tiere starben aufgrund schwerer subkutaner Blutungen im pränatalen Entwicklungsstadium. Ausgewachsene Tiere haben sehr kleine Thymi, es fehlen periphere T-Zellen und Lymphknoten und sie bluten im Peritoneum. Im Gegensatz dazu entwickeln sich die Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie die B-Zellen normal. Der Verlust peripherer T-Zellen kann auf eine Blockade der Thymozyten-Entwicklung in der CD4/CD8 doppelt negativen Phase zurückgeführt werden, wenn die Signalleitung des pre-TCRs erstmals benötigt wird (Pivniouk et al., 1998).

1.2.2. SLP-65

Das zweite Mitglied der SLP-Familie wurde 1998 identifiziert und ist unter den Namen SLP-65, BLNK und BASH bekannt (Wienands et al., 1998; Fu et al., 1998; Goitsuka et al., 1998). SLP-65 wurde als Substrat von PTKs nach BCR-Stimulation entdeckt und wird in B-Zellen und Makrophagen exprimiert. Obwohl es über die gleiche Domänenstruktur verfügt wie SLP-76, teilen die beiden Proteine nur eine 33 %-ige Proteinsequenz-homologie. SLP-65 besitzt fünf zum Teil evolutionär hochkonservierte Tyrosin-

Phosphorylierungsmotive, deren Bindung an SH2-Domänen-tragende Interaktionspartner im Detail untersucht wurde. Demnach binden Nck und Vav an das Motiv YENP, Btk an YEPP und PLC- γ 2 an YVVP, YIVP und YIEP (Chiu et al., 2002). Da SLP-65 nicht nur stimulationsabhängig, sondern auch konstitutiv mit Grb2 interagiert, wurde die prolinreiche Domäne für Interaktionen mit einer oder beiden Grb2-SH3-Domänen vorgeschlagen (Fu et al., 1998; Wienands et al., 1998). Gads wird in B-Zellen nur schwach exprimiert. Die SH2-Domäne von SLP-65 interagiert auch mit HPK-1. Ein B-Zell-ADAP wurde bisher noch nicht identifiziert. Ein weiterer Bindungspartner der SLP-65-SH2-Domäne ist pY204 von Ig- α (Ishiai et al., 1999; Sauer et al., 2001; Engels et al., 2001). Die Untersuchung von SLP-65-defizienten DT40 B-Zellen ergab, dass SLP-65 essenziell für die BCR-vermittelte Ca²⁺-Mobilisierung sowie die Phosphorylierung von PLC- γ 2 und wichtig für die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk, p38 und JNK ist (Ishiai et al., 1999). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass PLC- γ 2 und Btk an dasselbe phosphorylierte SLP-65 Molekül binden müssen, damit PLC- γ 2 durch Syk und Btk aktiviert werden kann. Eine SLP-65-Mutante, deren PLC- γ 2- und Btk-bindende Tyrosin- in Phenylalaninreste ausgetauscht wurden, löst keine Ca²⁺-Freisetzung mehr aus und bewirkt eine Reduktion der NFAT-Aktivierung. Die Rekonstitution der SLP-65-defizienten DT40 Zellen mit einer SLP-65 Mutante, bei der die fünf für die Signalleitung wichtigen Tyrosine durch Phenylalanine ausgetauscht wurden, führt zu einer verminderten Erk- und JNK-Aktivierung und zur vollständigen Inhibition der p38-Aktivierung. Das bedeutet, dass die Phosphotyrosinmotive von SLP-65 eine wichtige Rolle bei der Ca²⁺-Mobilisierung und Aktivierung der MAPK spielen (Chiu et al., 2002).

Obwohl für SLP-65 eine zentrale Funktion für die Ausbildung des Calcium-Initiationskomplexes nachgewiesen wurde, ist noch unklar, wie SLP-65 an die Membran rekrutiert wird. Eine Hypothese besagt, dass ein LAT-homologes Molekül in B-Zellen vorhanden sein muss. Die Entdeckung von NTAL (*non-T cell activation linker*) (Brdicka et al., 2002), welches nach BCR-Stimulation phosphoryliert wird und mit Grb2 interagiert, konnte diese These nicht unterstützen, da es zum einen nicht mit SLP-65 assoziiert und zum anderen NTAL-defiziente Mäuse keine signifikanten Defizite bei der Freisetzung von Ca²⁺ aufweisen (mündliche Mitteilung von Dipl. Biochem. Kai Dittmann). Ein anderes Modell besagt, dass kein B-Zell-LAT notwendig ist, da SLP-65 über die SH2-Domäne direkt an den BCR über Ig- α rekrutiert werden kann. Für dieses Modell sprechen auch die Rekonstitutionsexperimente an SLP-65-defizienten DT40-Zellen. Um das Ca²⁺-Signal wieder herzustellen, sind beide, SLP-76 und LAT notwendig, um die Abwesenheit von SLP-65 zu kompensieren (Wong et al., 2000). Das bedeutet, dass SLP-65 entweder die

Funktionen von SLP-76 und LAT vereint, oder, dass SLP-76 nicht an einen noch unbekanntem Membrananker in B-Zellen bindet. Gegen den Vorschlag von Ig- α als Membrananker von SLP-65 sprechen Daten, bei denen der Austausch des SLP-65-bindenden Tyrosinrestes gegen Phenylalanin von Ig- α immer noch zur Ca²⁺-Mobilisierung führt, d.h. SLP-65 wird unabhängig von Ig- α an die Membran rekrutiert (Kabak et al., 2002).

Eine weitere Hypothese besagt, dass das kürzlich entdeckte Leucin-Zipper-Motiv am N-Terminus von SLP-65 notwendig für die Membranrekrutierung ist (Köhler et al., 2005). Ob dieses Motiv allein ausreicht, um SLP-65 in die Nähe der anderen Signalmoleküle zu bringen, ist noch nicht geklärt. Daten aus Experimenten, bei denen die SLP-76-defiziente T-Zelllinie J14 mit SLP-65 versucht wurde zu rekonstituieren, machten deutlich, dass SLP-65 die Defizite in der Ca²⁺-Mobilisierung nicht kompensieren kann. Erst wenn Syk und SLP-65 in diesen J14-Zellen coexprimiert werden, ist wieder ein Einstrom von Ca²⁺ zu beobachten. Dabei kann die Funktion von Syk nicht auf die Phosphorylierung von SLP-65 zurückgeführt werden, da 1.) SLP-65 auch von ZAP-70 phosphoryliert wird und 2.) Syk mit einer inaktiven Kinase-Domäne auch die Funktion, d.h. Ca²⁺-Freisetzung, erfüllt. Das spricht dafür, dass der Leucin-Zipper von SLP-65 alleine nicht ausreicht, um SLP-65 an der Membran in die Nähe der anderen Effektormoleküle zu lokalisieren, sondern Syk eine Adapterfunktion bei der Membranrekrutierung von SLP-65 übernimmt (unveröffentlichte Daten von Dr. Abulizi Abudula). Wie SLP-65 und Syk miteinander interagieren ist noch unklar. In diesem Zusammenhang stellt die Frage nach der Bedeutung der SH2-Domäne von SLP-65 für die Signalleitung vom BCR, insbesondere für die Ca²⁺-Freisetzung, eine zentrale Rolle dar – sie sollte im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet werden.

Die Untersuchung SLP-65-defizienter Mäuse untermauert die zentrale Bedeutung von SLP-65 für die Signalleitungskette ausgehend vom pre-BCR bzw. BCR. Während SLP-65-defiziente Mäuse lebensfähig und gesund sind und eine normale T-Zell-Entwicklung aufweisen, ist die B-Zell-Entwicklung im Stadium der großen pre-B-Zellen teilweise blockiert. In diesem Entwicklungsstadium müssen erstmals Signale vom pre-BCR weitergeleitet werden, um in das nächste Stadium zu wechseln. Bei SLP-65-defizienten Mäusen besteht kein kompletter Block in der B-Zell-Entwicklung (Pappu et al., 1999; Jumaa et al., 1999; Hayashi et al., 2000). Diese Beobachtung wird durch die endogene Expression von LAT und SLP-76 in pre-B-Zellen erklärt, die das Fehlen von SLP-65 bis zu einem bestimmten Grad ausgleichen können (Su und Jumaa, 2003). Der Phänotyp der SLP-65-defizienten Mäuse ähnelt sehr stark dem der *xid* (X-gekoppelte Immundefizienz)

Maus. Diese natürlich vorkommende Maus hat einen oder mehrere Defekt(e) im *btk* Gen, die zur Inaktivierung von Btk führen (Khan et al., 1995). Die humane Variante dieser Erkrankung (XLA) ist durch eine vollständige Abwesenheit von B-Zellen charakterisiert, die bei der Mehrheit der Patienten auf das Fehlen von Btk zurückgeführt wird (Sideras et al., 1994). 15 % der XLA-Patienten besitzen allerdings funktionsfähiges Btk, was auf den Defekt anderer Proteine der B-Zell-Signalleitung schließen lässt. Tatsächlich wurden Mutationen im *slp-65* Gen bei diesen Patienten gefunden (Minegishi et al., 1999). Der humane Phänotyp XLA ist weitaus stärker ausgeprägt als der von *xid*, da keine B-Zellen mehr in der Peripherie vorhanden sind. Außerdem wurde SLP-65 mit der Akuten Lymphoblastoiden Leukämie (ALL), der verbreitetsten Form von Krebs bei Kindern, in Verbindung gebracht. Auch diese Krankheit wird durch einen Block in der pre-B-Zell-Entwicklung gekennzeichnet, der bei ca. 50 % der untersuchten Patienten auf eine geringe oder fehlende Expression von SLP-65 zurückgeführt wird. Die Expression von SLP-65 in diesen pre-B-Zellen führt zur Aufhebung der Blockade. Daher wurde SLP-65 wie auch Btk die Eigenschaft als Tumorsuppressor-Protein zugeschrieben (Jumaa et al., 2003; Flemming et al., 2002; Kersseboom et al., 2003). In humanen B-Zellen werden zwei SLP-65 Isoformen exprimiert. Der kürzeren Variante fehlen 23 Aminosäuren (AS) in der prolinreichen Region (AS 203-225), was eine Reduktion des Molekulargewichts um 2 kDa ausmacht. Die Bedeutung dieser zweiten Isoform wurde noch nicht geklärt.

1.2.3. Charakterisierung und funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen SLP-Proteinen und Mitgliedern der Grb2-Familie

Bisher wurde nur die konstitutive Interaktion zwischen SLP-76 und Gads im Detail untersucht. Die Bindung konnte auf die C-terminale SH3-Domäne von Gads und das Motiv RxxK in der prolinreichen Region von SLP-76 zurückgeführt werden. Die SLP-76 Sequenz PxxxRxxKP wurde als atypische, neue Erkennungssequenz einer SH3-Domäne über *in vitro*-Bindungsstudien und Kristallstrukturanalyse identifiziert (Lewitzky et al., 2001; Harkioliaki et al., 2003). Das atypische SH3-Bindemotiv formt keine Polyprolin Typ II Helix, sondern legt sich wie eine Klammer um das β -Fass. Im Vergleich dazu bindet die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 Polyprolin Typ II PxxPxR Motive (Sparks et al., 1996). Durch die Rekonstitution von SLP-76-defizienten Mäusen und Zellen mit einer SLP-76-Deletionsmutante, der die Gads-bindende Region fehlte, wurde die Bedeutung des Motivs für die Signalleitung, ausgehend vom TCR, untersucht. Diese Mäuse bzw. Zellen zeigten eine reduzierte Ca^{2+} -Mobilisierung nach Stimulation über den TCR und eine verminderte Erk- sowie NFAT-Aktivierung. Diese Ergebnisse wurden auf die

induzierbare Rekrutierung von SLP-76 an LAT über Gads zurückgeführt, da nach Anfügen eines Membranankers SLP-76 die Gads-bindende Region nicht mehr benötigte, um die Defekte in der Ca^{2+} -Freisetzung, CD69-Expression oder NFAT-Aktivierung auszugleichen (Singer et al., 2004; Yablonski et al., 2001). Die Bindung von Grb2 an SLP-65 bzw. Clnk wurde zwar beschrieben, aber es wurde noch nicht diskriminiert, welche Grb2-Domäne zu der Bindung beiträgt, bzw. ob die prolinreichen Regionen von SLP-65 und Clnk auch ein atypisches SH3-bindendes Motiv besitzen. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion zwischen Grb2 und SLP-65 im Detail untersucht werden. In B-Zellen wurde bisher kein LAT-homologes Transmembran-Adapterprotein identifiziert. Daher ist es sehr wichtig zu klären, welche Bedeutung die konstitutive SLP-65/Grb2-Interaktion auf die Signalleitung vom BCR hat, da eine Membranrekrutierung wie im Fall der SLP-76/Gads Interaktion eher unwahrscheinlich ist.

1.3. Molekulare Mechanismen der EBV-vermittelten Signalleitung über LMP2A

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein onkogenes Herpesvirus, das humane B-Zellen über den Rezeptor CD21 erkennt und infiziert. EBV kann die infektiöse Mononukleose, auch bekannt als Pfeiffersches Drüsenfieber, sowie bösartige Tumore, wie z.B. das Burkitt- und Hodgkin-Lymphom oder das nasopharyngal Karzinom auslösen (Rickinson und Kieff, 1996; Longnecker, 1998). Wie alle Herpesviren ist EBV in der Lage, in den infizierten Zellen in verschiedenen Latenzstadien zu persistieren. In der latenten Phase werden nur einige wenige virale Proteine, wie das *EBV-associated nuclear antigen* (EBNA) 1 und das *integral latent membrane protein* (LMP) 2A, exprimiert. Infiziert man B-Zellen *in vitro* mit EBV, werden sie immortalisiert und als lymphoblastoide Zelllinie (LCL) bezeichnet. Die Signaltransduktion, ausgehend vom BCR, wird durch LMP2A entkoppelt, so dass die Zellen nicht mehr auf ein Antigen reagieren können, aber trotzdem nicht durch Apoptose sterben, sondern gleichzeitig mit einem bisher noch nicht charakterisierten Überlebenssignal versorgt werden (Miller et al., 1993; Miller et al., 1994; Longnecker und Miller, 1996). LMP2A ist ein Transmembranprotein, dessen N- und C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind. Der N-Terminus verfügt über acht potenzielle Tyrosin-Phosphorylierungsmotive, über die LMP2A mit SH2-tragenden Signalmolekülen, wie z.B. Lyn und Syk, interagieren kann. Auffällig ist, dass die Syk-bindenden Phosphotyrosinmotive in einem ITAM angeordnet sind, dass verglichen zu den Ig- α /Ig- β ITAMs in entgegengesetzter Orientierung vorliegt (Merchant et al., 2000; Gökhan Yigit,

Diplomarbeit). Die funktionelle Bedeutung dieses „atypischen“ ITAMs ist Gegenstand aktueller Forschung. Außerdem besitzt der N-Terminus von LMP2A zwei konservierte prolinreiche Regionen, die E3-Ubiquitin-Ligasen der Nedd4-Familie binden, die zur Regulation von Src-Kinasen beitragen (Longnecker et al., 2000; Winberg et al., 2000). Über die C-terminale cytoplasmatische Domäne ist noch wenig bekannt. Es wird aber eine Funktion zur Selbstaggregation vermutet (Matskova et al., 2001). Lyn sowie Syk liegen in LCLs konstitutiv aktiv und gebunden an LMP2A vor, das in den *rafts* lokalisiert ist. Man geht davon aus, dass LMP2A den BCR aus den *rafts* verdrängt und außerdem die für die Signalinitiation wichtigen Moleküle, wie Lyn und Syk, abzieht (Dykstra et al., 2001; Ikeda et al., 2001). Dadurch wird die BCR-vermittelte Aktivierung der Zellen verhindert und führt zum Verbleiben der B-Zellen im latenten Zustand, wodurch das Virus der Eliminierung durch das Immunsystem entgeht. Neben Syk und Lyn liegt auch SLP-65 in LCLs konstitutiv phosphoryliert vor. Im Gegensatz dazu kann PLC- γ 2 nicht phosphoryliert werden und verbleibt im inaktiven Zustand, obwohl Syk und SLP-65, zwei Proteine des Calcium-Initiationskomplexes, konstitutiv aktiv sind. Die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von Btk wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Es ist zwar bekannt, dass SLP-65 konstitutiv phosphoryliert vorliegt, aber das Ausmaß dieser Phosphorylierung ist schwächer als das, das nach BCR-Quervernetzung in ruhenden Zellen auftritt (Engels et al., 2001). Es ist nicht geklärt, ob SLP-65 allgemein schwächer phosphoryliert wird oder ob nur einzelne Tyrosinreste phosphoryliert vorliegen und andere nicht. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, welche Signalwege, d.h. Phosphotyrosinmotive das Virus über die Signalleitung von LMP2A selektiv nutzt oder abschaltet, indem diese Motive phosphoryliert werden oder nicht.

Adapterproteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Koordination biochemischer Signalleitungsketten, die für die Lymphozyten-Entwicklung und -Funktion von lebensnotwendiger Bedeutung sind. Die Defizienz des B-Zell-Adapters SLP-65 wirkt sich dramatisch auf die B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung aus, was auch an den Phänotypen der humanen Erkrankungen XLA und ALL zu erkennen ist. Adapterproteine dienen allein über ihre Protein-Interaktionsdomänen als molekulare Gerüste, um Signalmoleküle räumlich und zeitlich zu koordinieren. Daher ist es nicht nur für die Grundlagenforschung wichtig, sondern auch für die Therapie von malignen Zell-Transformationen, die Interaktionsdomänen von SLP-65 im Detail zu charakterisieren und SLP-65-vermittelte Signalwege aufzuschlüsseln.

2 Problemstellung

Das Adapterprotein SLP-65 übernimmt eine zentrale Aufgabe bei der Signaltransduktion nach Stimulation der Zellen über den BCR. Es bildet den Kern des Calcium-Initiationskomplexes, der die für die Differenzierung und Aktivierung erforderlichen Signale vom BCR weiterleitet (Kurosaki und Tsukada, 2000). Ein Gendefekt führt dazu, dass keine B-Zellen mehr das Knochenmark verlassen, was schwere Immunsuffizienzen nach sich zieht. Der Entwicklungsstopp resultiert in einer Akkumulation der pre-B-Zellen, deren erhöhte Proliferationskapazität in maligne Transformationen umschlagen kann (Conley et al., 2000). SLP-65 ist aber nicht nur für die BCR-vermittelte Signaltransduktion von essenzieller Bedeutung, sondern darüber hinaus für Signale, die die Persistenz des Epstein-Barr-Virus ermöglichen. Das virale Protein LMP2A moduliert gezielt die SLP-65-vermittelten Signalwege, um die Aktivierung der B-Zellen zu inhibieren und so dem Immunsystem zu entgehen (Engels et al., 2001).

Da sich diese funktionellen Eigenschaften von SLP-65 allein auf die Protein-Interaktionsdomänen zurückführen lassen, sollte im Rahmen dieser Studie die Bedeutung der SH3-bindenden- und der SH2-Domäne *in vivo* untersucht werden. Bisher wurde nur ein Bindungspartner der prolinreichen Domäne, Grb2, postuliert (Fu und Chan, 1997; Wienands et al., 1998). Diese Interaktion sollte bestätigt und biochemisch charakterisiert werden, um das SH3-bindende Motiv zu identifizieren. Anhand der Ergebnisse sollte die funktionelle Bedeutung dieser Bindestelle *in vivo* untersucht werden.

Es wurden bereits erste Untersuchungen zur Funktion der SH2-Domäne durchgeführt. Die Inaktivierung über eine Punktmutation in dem Konsensus-Motiv beeinflusste *in vivo* nicht die Signalleitung vom BCR. Neue Studien geben Grund zu der Annahme, dass eine Punktmutation oft nicht ausreicht, um SH2-Domänen zu inaktivieren (Wosning und Reth, 2004). Daher sollten weitere Mutationen zeigen, ob die SH2-Domäne *in vivo* eine Rolle bei der BCR-initiierten Signalkaskade spielt.

Neben diesen beiden Domänen besitzt SLP-65 am N-Terminus fünf Phosphotyrosinmotive, deren Bindungspartner bekannt sind (Chiu et al., 2002). Untersuchungen an LCLs haben im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen gezeigt, dass SLP-65 nicht mehr induzierbar, dafür aber konstitutiv phosphoryliert wird (Engels et al., 2001). Basierend auf diesen Daten sollte die Signalleitung in EBV-infizierten Zellen untersucht werden, um herauszufinden, welche SLP-65-vermittelten Signalwege von LMP2A selektiv inhibiert oder aktiviert werden.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Bedeutung der prolinreichen Region sowie die der SH2-Domäne von SLP-65 für die Signaltransduktion vom BCR untersucht werden. Zum anderen sollte die Frage beantwortet werden, welche der SLP-65-vermittelten Signalwege in EBV-infizierten Zellen moduliert werden und es dem Virus ermöglichen der Immunantwort zu entgehen.

Um die Bedeutung der prolinreichen Region *in vivo* untersuchen zu können, wurde zunächst die Bindung zwischen SLP-65 und Grb2, dem einzigen bisher bekannten konstitutiven Interaktionspartner, biochemisch charakterisiert. Es konnte eine bislang nur postulierte Assoziation über *in vitro*-Interaktionsstudien bestätigt und darüber hinaus charakterisiert werden. Zudem gelang es nachzuweisen, dass nur die C-terminale SH3-Domäne und stimulationsabhängig die SH2-Domäne von Grb2 an SLP-65 binden. Für SLP-65 wurde bei den Interaktionsstudien ein atypisches SH3-bindendes Motiv in der zentralen prolinreichen Region identifiziert. Auf der Basis dieser Daten wurde dieses Motiv inaktiviert und die Auswirkung auf die Signalleitung vom BCR in dem B-Zell-Modellsystem DT40 *slp-65*^{-/-} untersucht. Erstmals wurde für die atypische SH3-Bindestelle von SLP-65 eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung der MAPK JNK und p38 festgestellt. Weiterhin wurde gezeigt, dass dieser inhibitorische Effekt von den MAPK über c-Fos auf den Transkriptionsaktivator AP-1 übertragen wird. Ein Reporterassay belegte, dass sich diese regulatorische Funktion bis hin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NFAT/AP-1 auswirkt. Dabei handelt es sich um eine zusätzliche Funktion des SH3-bindenden Motivs, da dieser Effekt nicht über die konstitutive Bindung an Grb2 vermittelt wird. Damit wurde in dieser Studie erstmals gezeigt, dass nicht nur die Phosphotyrosinmotive von SLP-65 eine aktivierende (Chiu et al., 2002), sondern, dass außerdem das atypische SH3-bindende Motiv eine negative, regulatorische Funktion auf den Transkriptionsfaktor NFAT/AP-1 ausübt.

Die SH2-Domäne von SLP-65 wurde über AS-Austausche bzw. -Deletionen inaktiviert und diese Mutanten in dem DT40 *slp-65*^{-/-}-Modellsystem analysiert. Es stellte sich heraus, dass die SH2-Domäne von essenzieller Bedeutung für das BCR-initiierte Ca²⁺-Signal, aber dagegen nicht für die Phosphorylierung von SLP-65 erforderlich ist. Diese Daten belegen erstmals eine funktionelle Bedeutung der SLP-65-SH2-Domäne für die Signalleitung vom BCR.

Bisher wurden EBV-beeinflusste Veränderungen der Signaltransduktion in LCL-Linien analysiert, die den Nachteil haben sehr unterschiedliche Phänotypen zu besitzen. Daher wurde in dieser Studie ein konditionales LCL-System angewandt und für die Analyse der Signaltransduktion von infizierten im Vergleich zu ruhenden Zellen etabliert. Die Untersuchung der Phosphotyrosinmotive von SLP-65 gelang über phosphospezifische Antikörper und Affinitätspräzipitationen mit den SH2-Domänen der Interaktionspartner von phosphoryliertem SLP-65. Die Daten wurden durch die Analyse des Aktivierungszustands von Btk abgerundet und zeigen, dass Btk nicht mehr von SLP-65 rekrutiert werden kann, da der entsprechende Tyr-Rest in EBV-infizierten Zellen nicht phosphoryliert wird. Das führt dazu, dass Btk nicht aktiviert wird und dadurch auch die Aktivierung von PLC- γ 2 inhibiert ist. Demnach konnte der molekulare Mechanismus identifiziert werden, in welcher Form EBV die Phosphorylierung von SLP-65 moduliert, um die Formation des Calcium-Initiationskomplexes zu inhibieren.

Die in dieser Studie erhobenen Daten leisten einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der SLP-65-vermittelten Signalleitung vom BCR bzw. in EBV-infizierten Zellen. Die SH3-bindende und die SH2-Domäne haben eine essenzielle Bedeutung für die BCR-initiierte Signalleitung, die in der Modulation der Genexpression resultiert. Darüber hinaus stehen diese Erkenntnisse im Gegensatz zu den Funktionen der entsprechenden Domänen des verwandten Proteins SLP-76. Es handelt sich um strukturell verwandte Proteine, die aber in ihrem jeweiligen Zellsystem sehr unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen.

4 Material

4.1. Materialien

Aufkonzentrierungseinheiten

- Amicons, Ausschlussgrenze 10, 30 und 50 kDa
- Vivaspins, Ausschlussgrenze

ECL-Detektionsreagenz

ECL-Filme (Hyperfilm™ECL™)

Kulturröhrchen- und Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen

Plastikwaren Zellkultur

Elektroporationsküvetten 4mm

SeaKem LE Agarose

Proteingrößenstandard

1 kb DNA-Größenstandard

Blotting-Papier

Protein A/G-Agarose

Ni-NTA Superflow

Glutathion-Sepharose 4FastFlow

Gelfiltrationssäulen

- HILoad 16/60 Superdex 200 pg
- HILoad 16/60 Superdex 75 pg

Sterilfilter

Nitrocellulose (Hybond™ECL™)

Transfektionsreagenz „FuGENE“

Millipore

Vivascience

Amersham

Amersham

Greiner, Nunc

Greiner, Corning, TPP

Peqlab Biotechnologie
GmbH (EQUIBIO)

BMA

NEB, Sigma

Fermentas

Schleicher & Schell

Santa Cruz Biotech.,
Inc.

Qiagen

Amersham

Amersham

Roth

Amersham

Roche

4.2. „Kits“

Präparationskits für Plasmid-DNA

(NucleoSpin Plasmid, NucleoBond PC100 und PC500)

RNeasy Mini Kit, Präparation von Gesamt-RNA
aus eukaryotischen Zellen

QIAshredder, Homogenisierung von Zelllysaten

Macherey-Nagel

Qiagen

Qiagen

Extraktionskit für DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen	
▪ NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
▪ QIAX II Gel Extraction	Qiagen
Klonierungssysteme für PCR-Produkte	
▪ TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor	Invitrogen
▪ pENTR/SD/D-TOPO Cloning Kit	Invitrogen
Gateway-System	Invitrogen
Kombinierte Detektion von Luciferase und β -Galactosidase Aktivität („Dual-Light System“)	Applied Biosystem

4.3. Geräte

Autoklaven	Webeco
Begasungsbrutschrank HeraCell	Heraeus
Blotapparatur „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“	Biorad
Durchflusscytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
Elektrophoresekammern	
▪ für SDS-PAGE	Biorad
▪ für DNA-Gele	Werkstatt Univ. Bielefeld
Elektroporator Gene Pulser System	Biorad
Filmentwicklermaschine Optimax Typ TR	MS-Laborgeräte
Fotokamera COOLPIX 995	Nikon
Luminometer MiniLumat LB 9506	Perkin Elmer
Mikroskop Leitz DMIL	Leitz
PCR-Cycler PTC-200	Biozym
pH-Meter PHM62 Standard	Hillerkus
RNA/DNA Calculator GeneQuant II	Pharmacia
Schüttelinkubator Incubator Shaker Model G-25	New Brunswick Scientific Co., Inc.
Schüttler	Renner-GmbH, Fröbel Labor-Technik
Sicherheitswerkbank HeraSafe Typ H	Heraeus
Sonifier Cell Disruptor B-15	Branson
Spannungsquellen Power-Pac 200, 300 und 1000	Biorad
Thermomixer 5436	Eppendorf

UV/Vis Spectrophotometer Ultraspec 4000	Pharmacia
Waagen	
▪ Feinwaage R160P	Sartorius
▪ LabStyle 3002	Mettler Toledo
Water Purification System Milli-Q	Millipore
Zentrifugen	
▪ Kühlzentrifuge Sorvall RC 5B Plus und RC-3B	Kendro
▪ Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
▪ Biofuge pico 3324	Haereus
▪ Multifuge 3 S-R	Haereus
▪ Tischzentrifuge	Kisker

4.4. Chemikalien und Reagenzien

Agar Agar	Roth
β -Estradiol	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	GERBU Biotechnik GmbH
Blasticidin S HCl	Invitrogen
Bromphenolblau (BPB)	Serva
Chicken serum (CS)	Sigma
Coomassie Blue R 250	Merck
Coomassie Plus-200 Bradford Reagenz	Pierce
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fluo-3-AM	Molecular Probes, Inc.
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Gibco
Glycerin (87%)	Roth
Glycin	J.T. Baker
IGEPAL CA-630 (NP-40)	Sigma

Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	AppliChem
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin (200 mM)	PAA
Magermilchpulver	Lasana
Methanol	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumazid	J.T. Baker
Natriumdesoxycholat	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS)	J.T. Baker
Natriumorthovanadat	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA
Pluronic F-127	Molecular Probes, Inc.
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma
Protease-Inhibitorcocktail "Complete EDTA-free"	Roche
Protease-Inhibitorcocktail	Sigma
Puromycin	Invitrogen
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA
RPMI 1640	PAA
Peptone	Roth
Thrombin aus Rinderplasma	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Roth
Yeast Extract	Roth

4.4.1. Puffer und Medien

Alle Puffer und Medien werden in doppelt destilliertem Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) angesetzt. Medien für *E. coli* werden für 30 min bei 125°C autoklaviert und bei 4°C gelagert. FCS und CS für die Kultivierung eukaryotischer Zellen werden für 20 min bei 56°C inaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle Puffer und Medien werden, wenn nicht anders angegeben, bei RT gelagert.

Agarplatten	LB-Medium 1,5% (w/v) Agar
Beladungspuffer	RPMI 1640 5% (v/v) FCS; 0,05% (w/v) Pluronic; 1,5 μM Fluo3-AM

Blockpuffer	PBST bzw. TBST 5 % BSA
DNA-Probenpuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25% (w/v) BPB; 15% Ficoll; 4°C
Fluo3-Stammlösung	1 mM Fluo3-AM in DMSO, -20°C
Krebs-Ringer-Lösung	140 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM D-Glukose; 10 mM HEPES pH 7,4; alternativ 0,5 mM EGTA oder 1 mM CaCl ₂ ; autoklaviert, 4°C
Laemmli-Puffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 2 mM EDTA; 20 % (v/v) Glycerin; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
LB-Medium	10 g/l Peptone; 5 g/l Yeast Extract; 10 g/l NaCl; 4°C
LB-Amp Medium	LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 4°C
LB-Kan Medium	LB-Medium; 50 µg/ml Kanamycin; 4°C
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,8 ; 137 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA pH 8,0 ; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 10 % (v/v) Glycerin ; 1% NP-40
Ni-NTA Lyse Puffer (65)	20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 2 mM β-Mercaptoethanol; pH 8,0
Ni-NTA Lyse Puffer (76)	Lyse-Puffer (65) statt 150mM 200 mM NaCl
Ni-NTA Wasch-Puffer (65)	20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 2 mM β-Mercaptoethanol; pH 8,0
Ni-NTA Wasch-Puffer (76)	Wasch-Puffer (65) statt 150 mM 200 mM NaCl
Ni-NTA Elutions-Puffer (65)	20 mM Tris/HCl ; 150 mM NaCl ; 250 mM Imidazol ; 2 mM β-Mercaptoethanol; pH 8,0
Ni-NTA Elutions-Puffer (76)	Elutions-Puffer (65) statt 150 mM NaCl 200 mM NaCl
Ni-NTA Lyse Puffer (P)	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl ; 10 mM Imidazol ; pH 8,0
Ni-NTA Wasch-Puffer (P)	Lyse-Puffer (P); 20 mM Imidazol
Ni-NTA Elutions-Puffer(P)	Lyse-Puffer (P); 250 mM Imidazol
PBS	137,5 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,6 mM Na ₂ HPO ₄
PBST	PBS 0,1 % (w/v) Tween-20
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 137,5 mM NaCl; 0,5 mM EDTA pH 8,0; 2 mM Na ₃ VO ₄ ; 1 % (v/v) NP-40; 1 % (v/v) Glycerol; 0,5 % (w/v) Na-desoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇
RPMI	RPMI 1640; 2 mM Glutamin; 50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin; 4°C

SDS-PAGE

- - Laufpuffer 25 mM Tris ; 192 mM Glycin ; 3,5 mM SDS
- - Trenngelpuffer 1,5 mM Tris/HCl pH 8,8 ; 0,4% (w/v) SDS
- - Sammelgelpuffer 500 mM Tris/HCl pH 6,8 ; 0,4% SDS

Stripping Puffer 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 100 mM β -Mercaptoethanol

TAE-Puffer 40 mM Tris/Essigsäure (HAc) pH 7,8; 1 mM EDTA pH 8,0

TBST 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween-20

TFB I Puffer 50 mM $MnCl_2$; 100 mM KCl ; 10 mM $CaCl_2$; 30 mM KOAc pH 6,8; 15% (v/v) Glycerin; mit HAc auf auf pH 6,1 einstellen ; sterilfiltrieren ; 4°C

TFB II Puffer 75 mM $CaCl_2$; 10 mM KCl ; 10 mM MOPS ; 15% (v/v) Glycerin ; mit KOH auf pH 7,0 einstellen ; sterilfiltrieren ; 4°C

Transferpuffer 39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) NaN_3 ; 20% (v/v) Methanol

4.4.2. Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen wurden von New England Biolabs bezogen. Die DNA-Polymerasen stammen von Promega (Pfu) und New England Biolabs (Taq). Die Reverse Transkriptase aus MMLV wurde von Gibco, die Alkalische Phosphatase von Roche und die T4-Ligase von Promega verwendet.

Alle Enzyme wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

4.4.3. Antikörper

Antikörper als Primärantikörper für Western Blot wurden in der angegebenen Verdünnung in PBST mit 1% BSA und 0.01% NaN_3 angesetzt. Eine Ausnahme bildeten die Antikörper von NEB. Diese wurden in TBST und den o.a. Zusätzen verdünnt.

Antikörper	Immunogen	Spezies	Hersteller	Anwendung und Verdünnung
AffiniPure F(ab') ₂ Fragmente	Mensch IgM, Fc _{5μ}	Ziege	Dianova	<i>in vitro</i> Stimulation von Ramos und EREB 2-5
Aktin	Mensch Aktin	Kaninchen	Sigma	WB 1:2000
BLNK (Klon 2C9)	Mensch SLP-65	Maus	Covance	WB 1:1000 IP 1μg/1x10 ⁷ Zellen

Btk (C-20)	Maus Btk	Ziege	Santa Cruz Biotech., Inc.	WB 1: 1000 IP 1,6 µg/1x10 ⁷ Zellen
Btk (M-138)	Mensch Btk	Kaninchen	Santa Cruz Biotech., Inc.	WB 1:1000
c-Cbl (Klon 17)	Mensch c-Cbl	Maus	Transduction Lab.	WB 1:5000
c-Jun (60A8)	Mensch c-Jun	Kaninchen	NEB	WB 1:1000
ERK	Mensch/Ratte ERK 1	Kaninchen	Promega	WB 1:1000
ERK (pan ERK)	Ratte ERK2	Maus	BD	WB 1:5000
Flag (M2)	Flag [®]	Maus	Sigma	WB 1: 1000
Grb2 (Klon 3F2)	Mensch Grb2	Maus	Upstate Biotech.	WB 1:1000
GST	GST	Kaninchen	Molecular Probes	WB 1:3000
Hühner IgM (Klon M-4)	Hühner IgM (schwere Ketten)	Maus	Biozol	<i>in vitro</i> Stimulation von DT40
KARLA	Maus SLP-65	Kaninchen	J. Wienands	WB 1:500
p38 MAP Kinase	Mensch p38	Kaninchen	NEB	WB 1:1000
Phospho-BLNK (Tyr96)	Mensch SLP-65 pTyr ⁹⁶	Kaninchen	NEB	WB 1:1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7)	Mensch pThr ¹⁸⁰ /pTyr ¹⁸² p38 MAP	Kaninchen	NEB	WB 1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) E10	Mensch p44 MAPK	Maus	NEB	WB 1:2000
Phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) (98F2)	Mensch SAPK/JNK	Kaninchen	NEB	WB 1:1000
Phosphotyrosin (Klon 4G10)	Phosphotyramin	-	Upstate Biotech.	WB 1:500 IP 2-4 µg/1x10 ⁷ Zellen
PLC-γ2 (Q-20)	Mensch PLC-γ2	Kaninchen	Santa Cruz	WB 1:1000

			Biotech., Inc.	IP 1,6 µg/1x10 ⁷ Zellen
PTP1C/SHP1	Mensch PTP1C	Maus	BD	WB 1:500
SAPK/JNK	Mensch JNK2	Kaninchen	NEB	WB 1:1000
SLP-76	Mensch SLP-76	Schaf		
Syk (4D10)	Mensch Syk	Maus	Santa Cruz Biotech., Inc.	WB 1:1000 IP 1 µg/1x10 ⁷ Zellen
Ziege F(ab') ₂ -anti- Human IgM-FITC	Mensch IgM	Ziege	Southern Biotech. Inc.	FACS-Analyse 1:200

Tab. 4.1 Primärantikörper

Sekundärantikörper für Western Blot

Antikörper	Immunogen	Spezies	Hersteller
Maus IgG, HRPO-konjugiert	Maus IgG (schwere und leichte Ketten)	Ziege	Pierce
Kaninchen IgG HRPO-konjugiert	Kaninchen IgG	Ziege	Pierce
Ziege IgG, HRPO-konjugiert	Ziege IgG	Kaninchen	Pierce

Tab. 4.2 Sekundärantikörper

4.5. Zelllinien

4.5.1. Suspensionszellen

Ramos (ATCC CRL 1596)

Diese reife humane B-Zelllinie entstammt dem Burkitt-Lymphom und exprimiert IgM auf der Zelloberfläche.

K46

Bei K46 handelt es sich um eine murine B-Zell-Lymphoblasten-Zelllinie, die aus BALB/c-Mäusen stammt (Kim et al., 1979). Diese reife B-Zelllinie exprimiert membranständiges IgG2a/ κ auf der Zelloberfläche.

EREB2.5

EREB2.5 stellt ein Modellsystem für eine humane konditionale lymphoblastoide B-Zelllinie dar. Sie wurde durch die Infektion von Nabelschnurblut mit EBNA-2 defekten EBV-Partikeln (P3H1) und einem Virus, das ein Fusionsprotein aus dem Östrogenrezeptor und EBNA-2 enthielt, etabliert. Dieses Fusionsprotein kann nur dann in den Kern gelangen, wenn Östrogen zugesetzt wird, und somit die Zellen zum proliferieren anregen (Kempkes et al, 1995).

DT40 (ATCC CRL 2111)

Diese Hühner B-Zelllinie entstammt einem bursalen Lymphom aus einem „Hyline SC“ Huhn, welches durch Infektion mit ALV („avian leukosis virus“) etabliert wurde. DT40 exprimieren IgM auf der Oberfläche.

4.5.2. Adhärente Zelllinien**PlatE**

Die Helferzelllinie PlatE, zur Produktion rekombinanter Retroviren, basiert auf der Zelllinie HEK293T. HEK293T Zellen wurden stabil mit gag-pol und env (ecotroph) von MMLV transfiziert. Die Gene stehen unter der Kontrolle des EF1 α Promotors. Beide Konstrukte wurden über eine IRES direkt mit den Selektionsmarkern Blasticidin (gag-pol) und Puromycin (env) verbunden (Morita et al., 2000)

4.5.3. Bakterienstämme

E. coli Stamm	Genotyp	Hersteller
XL-1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn 10 (Tet ^r)]	Stratagene
DH5 α	F Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZY A-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	Promega
TOP10	F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1	Invitrogen

	nupG	
TOP10 F'	F' $\{\text{lacI}^q \text{Tn10}(\text{Tet}^r)\}$ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^r) endA1 nupG	Invitrogen
BL21(DE3)	F' ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen

Tab. 4.3 Bakterienstämme

4.6. Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Hersteller
<i>Klonierungsvektoren</i>		
pCRII-TOPO	TOPO <i>cloning site</i> , Polylinker, Amp ^r , Kan ^r , α -Peptid des <i>LacZ</i> Gens	Invitrogen
pENTR/SD/D-TOPO	TOPO <i>cloning site</i> , Kan ^r , attL1 und attL2 Rekombinationserkennungssequenzen, die die Klonierung in einen Gateway™ <i>Destination vector</i> erlauben (Landy, 1989)	Invitrogen
<i>Expressionsvektoren für Bakterien</i>		
pET15b	Amp ^r , T7lac Promotor, N-terminaler His-Tag, Thrombin Schnittstelle, Polylinker	Novagen
pGEX-4T-1	tac Promotor, lac I ^q Gen, Amp ^r , GST-Gen vor dem Polylinker ermöglicht die Expression eines GST-Fusionsproteins, das durch Thrombin gespalten werden kann	Amersham
<i>Expressionsvektoren für Säugerzellen</i>		
pApuro II	Hühnchen β -Aktin Promotor, Amp ^r , Puromycin ^r , Polylinker	Takata et al., 1994
<i>Vektoren zur Produktion rekombinanter Retroviren</i>		
pHCMV-VSV-G	Zur Pseudotypisierung rekombinanter Retroviren, VSV-G vom <i>vesicular stomatitis</i> Virus unter der Kontrolle des CMV-Promotors, Amp ^r	Labor Dr. Manfred Jücker, UKE Hamburg
pMSCV-puro	5'- und 3' LTRs, Ψ von MESV, Puro ^r , Amp ^r	Clontech

Tab. 4.4 Vektoren

4.7. cDNAs

Die cDNAs für Maus und Hühner SLP-65 lagen bereits in der Arbeitsgruppe vor (Skp-Orf mSLP-65 bzw. pApuroll-ch65). Die Sequenzen für SLP-76, Grb2, c-Cbl und Syk wurden mittels RT-PCR aus K46 B-Zellen amplifiziert.

4.8. Oligonucleotide

Die verwendeten Primer wurden von MWG-Biotech bzw. Invitrogen synthetisiert.

Primer	Anwendung	Sequenz 5'→3'	Annealing Temperatur (°C)
SLP65-F-NdeI	Klonierung von mSLP-65 in pET15b	GGGGGCCATATGGACAA GCTGAATAAGATA	49
SLP65-R-BamHI	Klonierung von mSLP-65 in pET15b	TGGCACGGATCCTTATG AAACCTTCACAGCA	49
65-R→K fw	Mutagenese mSLP-65 Arg248Lys	CATCCCCACTACCAAAG GCTGGGAAGAAGC	57
65-R→K rev	Mutagenese mSLP-65 Arg248Lys	GCTTCTTCCCAGCCTTTG GTAGTGGGGATG	57
ΔSH2-R-XhoIΔHis	Klonierung von mSLP-65ΔSH2 in pET15b	CCGCGGCTCGAGTTAGG GCTTACCGAGCAGTT	46
SLP76-F-NdeI	Klonierung von mSLP-76 in pET15b	TCTCGTCATATGGCCTTG AAGAATGTCC	49
SLP76-R-BamHI	Klonierung von mSLP-76 in pET15b	TTGGCTGGATCCCTACA GACAGCCTGCAG	49
ch65-FlagN-fw	Klonierung von chSLP-65 in pENTR	CACCATGGACTACAAGG ACGACG	53
BASH-Grb2[SH3]-fw	Mutagenese Arg265Ala im chSLP-65	CCACCTGTAACCGCGTT CACTAAGCCACTT	55
BASH-Grb2[SH3]-rev	Mutagenese Arg265Ala im chSLP-65	AAGTGGCTTAGTGAACG CGGTTACAGGTGG	55
BASH	Mutagenese Lys268Ala im	GTAACCGCGTTCCTACTGC	60

K268A fw	chSLP-65	GCCACTTCCTGCT	
BASH K268A rev	Mutagenese Lys268Ala im chSLP-65	AGCAGGAAGTGGCGCAG TGAACGCGGTTAC	60
ch65- Δ 261-269 fw	Deletion der AS 261-269 im chSLP-65	GAAGAACTTTCACTACTT CCTGCTACACGTGCTCA G	60
ch65- Δ 261-269 fw	Deletion der AS 261-269 im chSLP-65	ACGTGTAGCAGGAAGTG GTGAAAGTTCTTCCTCTT C	60
ch65- ENTR-fw	Klonierung von chSLP-65 in pENTR	CACCATGGACAAGCTGA ACAAACTC	49
ch65-rev	Klonierung von chSLP-65 in pENTR	TTAAGAACTCTTACAAT ATATTTCAAGTTT	49
ch65- Δ SH2-rev	Deletion der chSLP-65 SH2-Domäne	TTATGCTTTACTATGAAC GCCAG	49
ch65-GAL- fw	Mutagenese Arg468Gyl, Lys469Ala, Ser470Leu im chSLP-65	GGATCTTTTCTAATAGGA GCGCTTTCTGGACAGGA TTCA	55
ch65-GAL- rev	Mutagenese Arg468Gyl, Lys469Ala, Ser470Leu im chSLP-65	TGAATCCTGTCCAGAAAG CGCTCCTATTAGAAAAGA TCC	55
Grb2-T-fw	Klonierung von mGrb2 in pGEX-4T-1	CTGGTTCCGCGTGGATC CATGGAAGCCATCGCCA AATATGA	52
Grb2-rev	Klonierung von mGrb2 in pGEX-4T-1	GCGGCCGCTCTTAGACG TTCCGGTTCACTG	52
Grb2-N SH3	Klonierung der N- terminalen SH3 Domäne von mGrb2 in pGEX-4T-1	GCGGCCGCTCTTACGGA TGTGGTTTCATTTCTATG	55
Grb2-C SH3	Klonierung der C- terminalen SH3 Domäne von mGrb2 in pGEX-4T-1	CTGGTTCCGCGTGGATC CATGCCACAGCAGCCAA CCTAC	55
Grb2[SH2]- EcoRI-fw	Klonierung der mGrb2 SH2- Domäne in pGEX-4T-1	TTAGAATTCGAAATGAAA CCACATCCG	53
Grb2[SH2]-	Klonierung der mGrb2 SH2-	TTTGCGGCCGCTTCAT	53

NotI-rev	Domäne in pGEX-4T-1	GGCATCTGTTCTATGTCC	
c-Cbl[SH2] fw	Klonierung der maus c-Cbl SH2-Domäne in pGEX-4T-1	CTGATCGGGCTCATGAA G	51
c-Cbl[SH2] rev	Klonierung der maus c-Cbl SH2-Domäne in pGEX-4T-1	GCGGCCGCTTATAAACC TGTCAGGTCAGG	51

Tab. 4.5 Oligonucleotide

Primer für DNA-Sequenzierungen

Primer	Target	Sequenz 5'→3'
65-seq/intern	mSLP-65	AAAGACCTCCTTGAGGATGAG
76-intern	mSLP-65	ACCAACTCCATGTACATCGAC
ch65-intern	chSLP-65	TCCCTGCCATCTCCTGCTGC

Tab. 4.6 Oligonucleotide für Sequenzierungen

4.9. Klonierte Konstrukte

Proteinkürzel	cDNA	Vektor	kloniert über/von
mSLP-65	Maus SLP-65 R248K	pET15b	NdeI/BamHI
mSLP-65 Δ SH2	Maus SLP-65 AS 1-346	pET15b	NdeI/BamHI
mSLP-76	Maus SLP-76	pET15b	NdeI/BamHI
Grb2	Maus Grb2	pGEX-4T-1	EcoRI/NotI
Grb2[N-SH3]	N-terminale SH3 Domäne Maus Grb2	pGEX-4T-1	EcoRI/NotI
Grb2[SH2]	SH2 Domäne Maus Grb2	pGEX-4T-1	EcoRI/NotI
Grb2[C-SH3]	C-terminale SH3 Domäne Maus Grb2	pGEX-4T-1	EcoRI/NotI
ch65wt	Huhn SLP-65 mit N- terminalem Flag-Epitop	pApuro II	EcoRI
R265A	Huhn SLP-65 mit N- terminalem Flag-Epitop Arg265Ala	pMSCV-puro	Gateway-System
R265A / K268A	Huhn SLP-65 mit N- terminalem Flag-Epitop Arg265Ala; Lys268Ala	pMSCV-puro	Gateway-System

Δ261-269	Huhn SLP-65 mit N-terminalem Flag-Epitop	pApuro II	EcoRI
ch65fl	Huhn SLP-65 <i>full length</i>	pMSCV-puro	Gateway-System
GAL	Huhn SLP-65 (Arg468Gyl, Lys469Ala, Ser470Leu)	pMSCV-puro	Gateway-System
ΔSH2	Huhn SLP-65 (AS 1-441)	pMSCV-puro	Gateway-System

Tab. 4.7 Verwendete Konstrukte

4.10. Peptide

Peptid	Quelle	AS-Sequenz	Hersteller
65-Pro	Maus/Mensch SLP-65 (AS 202-214)	Biotin-KAPMVNRSTKPNS-NH ₂	Jerini

Tab. 4.8 Peptide

4.11. Computersoftware

CellQuest Pro	Becton Dickinson Immunocytometry Systems
Corel Draw 10	Corel Corporation Limited
Corel Photopaint 10	Corel Corporation Limited
FlowJo alias 3.5.3	Stanford University, Tree Star, Inc.
Mac OS 9.2	Apple Computer, Inc.
MS Office 2000	Microsoft GmbH
Windows XP	Microsoft GmbH

5 Methoden

5.1. Molekularbiologische Methoden

5.1.1. Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 250 rpm. LB-Medium oder -Agar versetzt mit dem Antibiotikum, über dessen Resistenzgen das Plasmid verfügte, wurde dazu mit einer Einzelkolonie der transformierten Bakterien angeimpft. Für eine Langzeitlagerung wurde die Kultur mit 50% (v/v) Glycerin versetzt und bei –80°C eingefroren.

5.1.2. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Bakterien erfolgte modifiziert nach Hanahan (1983). Dazu wurde die entsprechende Bakterienkultur in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} 0,45-0,55 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt, für 10 min bei 4°C und 2000xg die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 1/5 des Kulturvolumens eiskaltem TFB I Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Sedimentation wurde das Pellet in 1/25 des Kulturvolumens eiskaltem TFB II Puffer aufgenommen. Diese kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte nach Herstellerangaben (Novagen).

5.1.3. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte mit dem „NucleoSpin-Plasmid“ bzw. „NucleoBond“ Kit von Macherey-Nagel an Silicagel-Membranen gemäß den Herstellerangaben. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde direkt für DNA-Sequenzierungen verwendet.

5.1.4. RNA-Präparation aus K46

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus der murinen B-Zelllinie K46 wurde das RNeasy-Kit von Qiagen benutzt. Dazu wurden $3-4 \times 10^6$ Zellen lysiert, das Zelllysate mit Hilfe des QIAshredder Kits homogenisiert und an Silicagel gereinigt. Die Gesamt-RNA wurde mit

Wasser eluiert und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Diese Gesamt-RNA wurde direkt für die RT-PCR weiter verwendet.

5.1.5. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von RNA und DNA kann photometrisch bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt werden. Eine OD_{260nm} von 1, gemessen in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280} sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen und beschreibt die Verunreinigung der Nucleinsäure mit Proteinen.

5.1.6. Reverse Transkription von mRNA (RT-PCR)

Für die reverse Transkription von RNA in DNA wurde zuerst 1 µg Gesamt-RNA mit ddH₂O auf 12 µl aufgefüllt und für 3 min bei 70°C hitzedenaturiert und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Folgender 20 µl Ansatz wurde für die RT-PCR mit Produkten von Gibco gewählt (schriftliche Mitteilung von Dr. Peter Nielsen, MPI für Immunbiologie, Freiburg).

Komponente	Menge/Konzentration
RNA	1 µg
5x Reaktionspuffer	1x
oligo dT ₁₂₋₁₈	5 ng/µl
dNTPs	500 µM
RNase Inhibitor	1 U
DTT	2,5 mM
Mo-MLV reverse Transkriptase	10 U

Tab. 5.1 Standard RT-PCR Ansatz

5.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986)

Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen, enzymatischen Amplifikation von DNA zwischen zwei Oligonucleotid-Fragmenten, die in gegenläufiger Orientierung an die komplementären DNA-Stränge gebunden sind. Die PCRs wurden nach einem modifizierten Standardprotokoll (Saiki et al., 1988) mit dem PCR-Cycler PTC-200 von Biozym durchgeführt.

Für die Mutagenese von DNA-Sequenzen wurde ein 25 µl Ansatz und für die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die weiter kloniert werden sollten, ein 50 µl Ansatz gewählt. Dafür wurde folgender Standard-PCR-Ansatz verwendet:

Komponente	Konzentration
DNA-Templat	0,4 ng/μl
5'-Primer	1 pmol/μl
3'-Primer	1 pmol/μl
dNTPs	0,2 mM
Puffer	1x
Pfu- bzw. Taq-Polymerase	0,06 U/μl

Tab. 5.2 Standard PCR-Ansatz

Das PCR-Programm wurde wie folgt abgestimmt:

Schritt	Temperatur & Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94°C; 30 s	1
Denaturierung	94°C; 30 s	29
Primeranlagerung	TM-5°C; 20 s -1 min	
Polymerisation	72°C; 30 s pro 1 kb (Pfu) bzw. 1 min pro 1 kb (Taq)	
Extension	72°C; 7 min	1
Lagerung	4°C; ∞	1

Tab. 5.3 Standard PCR-Programm

Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt, aufgereinigt und mit dem TOPO-Cloning Kit gesichert, oder im Fall der Mutagenese-PCR mit DpnI das Templat hydrolysiert und für Transformation von TOP10F' Zellen eingesetzt.

5.1.8. Sicherung von PCR-Produkten mit Hilfe der T/A-Klonierung

Die Taq DNA-Polymerase hat die Eigenschaft, an den 3'-Enden der PCR-Produkte zusätzlich ein A anzufügen. Dies kann man sich für die Ligation mit einem Klonierungsvektor zunutze machen, wobei das DNA-Fragment mit einem Vektor, der über einen T-Überhang an den 5'-Enden verfügt, ligiert wird. Für diese Reaktion wurde das TOPO-Cloning Kit mit dem Vektor pcRII-TOPO (Invitrogen) verwendet.

5.1.9. Klonierung von PCR-Produkten in den pENTR-TOPO Vektor

Mit Hilfe des pENTR-TOPO Cloning Kits von Invitrogen wurden PCR-Produkte in vorgegebener Orientierung in den Vektor pENTR-TOPO-SD/D kloniert, um diese dann weiter über das Gateway-System in die entsprechenden Expressionsvektoren umklonieren zu können. Diese Klonierungsstrategie wurde für die chSLP-65 Konstrukte laut Herstellerangaben angewandt.

5.1.10. Klonierung über das Gateway System (Invitrogen)

Das Gateway-System von Invitrogen basiert auf der Rekombination von DNA-Sequenzen zwischen spezifischen *Attachment-sites* des Bakteriophagen λ . Dadurch ist eine unidirektionale Klonierung von einem so genannten „Entry“-Vektor in einen „Destination“-Vektor ohne Restriktions- und Ligationsschritte möglich (Bushman et al, 1985; Weisberg und Landy, 1983; Hartley et al, 2000).

Das Gateway-System wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet, um chSLP-65 von dem pENTR-Vektor in den „Destination“-Vektor pMSCV-puro zu klonieren.

5.1.11. Enzymatische Modifikation von DNA

DNA-Restriktion

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifisch palindrome Sequenzen und hydrolysieren die DNA-Helix. Die so erhaltenen Fragmente erlauben die Charakterisierung und sind Komponenten für weitere Klonierungsschritte. Die Restriktionsenzyme wurden von NEB und Fermentas bezogen und laut Herstellerangaben eingesetzt.

Dephosphorylierung

Die Restriktion eines Vektors mit nur einem einzigen Enzym könnte zu einer anschließenden Religation führen. Um dies zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA, gemäß den Herstellerangaben, mit Hilfe einer Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, Roche) am 5'-Ende dephosphoryliert.

Ligation

Die Verknüpfung von 3'-OH und 5'-Phosphatgruppen der DNA wird unter ATP Spaltung von der T4-Ligase katalysiert. Das Enzym wurde von Promega bezogen und wie empfohlen verwendet.

5.1.12. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Proben aufgetrennt, charakterisiert und isoliert. Die Proben und der DNA-Längenstandard (1 kb Leiter, Fermentas bzw. NEB) wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer nach Standardvorschrift aufgetrennt (Sambrook et al., 1998). Die DNA-Fragmente wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und bei UV-Bestrahlung (302 nm) durch Fluoreszenz (590 nm) visualisiert.

5.1.13. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden durch Excision aus dem Gel mit Hilfe des „NucleoSpin Extract II“- bzw. dem „QIAEX II Gel Extraction“-Kit isoliert.

5.1.14. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech nach der Didesoxymethode durchgeführt (Sanger et al., 1977).

5.2. Zellbiologische Methoden

5.2.1. Kulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und 5 % CO₂ kultiviert. Adhärenente Zellen wurden auf speziell beschichteten Platten kultiviert, die aufgrund ihrer rauen, hydrophilen Oberfläche die Anheftung der Zellen begünstigen. Suspensionszellen wurden auf unbeschichteten Platten kultiviert.

5.2.2. Kultivierung von nicht-adhärenenten Zellen

Die humanen B-Zelllinien Ramos und EREB 2.5 wurden in RPMI mit 10% FCS kultiviert, wobei letztere auf Platten für adhärenente Zellen mit 1 µM Östrogen und mindestens einer Zelldichte von 5x10⁵/ml gehalten wurden. Die Hühner B-Zelllinie DT40 wurde in RPMI 10 % FCS 1 % CS 50 µM β-Mercaptoethanol kultiviert und sollte eine Dichte von 2x10⁶ Zellen/ml nicht überschreiten.

Abschalten der EBNA-2 Expression in EREB 2.5 Zellen

Um die Expression von EBNA 2.5 zu unterdrücken, wurden die EREB 2.5 Zellen dreimal mit RPMI 10 % FCS gewaschen und in einer Dichte von 7x10⁵ Zellen/ml in östrogenfreiem Medium ausgesät. Die Zellen können maximal fünf Tage weiter kultiviert werden, proliferieren aber nicht mehr.

5.2.3. Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die Zelllinie PlatE wurde in DMEM 10 % FCS unter Selektionsdruck mit 10 µg/ml Blastidin und 2 µg/ml Puromycin kultiviert. Um die Zellen zu expandieren oder einen Medienwechsel durchzuführen, wurde das Medium abgenommen und mit einem Volumen einer Trypsin/EDTA-Lösung für 1 min bei 37°C inkubiert, so dass gerade die Oberfläche der Petrischale bedeckt war. Anschließend wurden die Zellen in DMEM 10 % FCS aufgenommen und ausgesät.

5.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer geeigneten verdünnten Probe und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

5.2.5. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Für die Lagerung wurden $1-1,5 \times 10^7$ Zellen bei 300xg und 4°C für 4 min pelletiert und in 1 ml RPMI 10 % FCS und 10 % DMSO (Ramos, DT40, EREB 2.5), bzw. DMEM 10 % FCS und 10 % DMSO (PlatE) resuspendiert, in ein Einfrierröhrchen umgefüllt und bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend sofort mit 10 ml des entsprechenden Mediums verdünnt, abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und ausgesät.

5.2.6. Transfektion von PlatE mit „FuGENE“ zur Produktion rekombinanter Viren (modifiziert nach Morita et al., 2000)

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 30 % auf 6 cm Petrischalen (TPP) ausgesät. Für die Transfektion wurden 200 µl serumfreies Medium mit 7,5 µl FuGene, 0,6 µg VSV-G und 2,5 µg Plasmid-DNA gemischt, 15-20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben, bei denen zuvor das Medium gegen das der zu infizierenden Zellen ausgetauscht wurde. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde der Überstand für die Infektion der DT40 Zellen eingesetzt.

5.2.7. Erzeugung von stabilen DT40-Transfektanden durch Elektroporation

Die entsprechende cDNA wurde in den Vektor pApuro II kloniert, über Nacht mit Ahd I linearisiert und über Silica-Membranen aufgereinigt. Pro Transfektion wurden 15-30 µg linearisiertes Plasmid eingesetzt. Anschließend wurden die DT40 Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml mit PBS eingestellt und 1 ml mit der DNA in einer Elektroporationsküvette für 15 min auf Eis inkubiert. Die Elektropora-

tion erfolgte mit einem GenePulser von Biorad bei den Einstellungen 250 V und 975 μF . Die elektroporierten Zellen wurden in 50 ml auf 37°C vorgewärmten RPMI 10 % FCS resuspendiert und auf zwei 24-well Platten ausgesät. Nach 1-2 Tagen wurde das gleiche Volumen an Selektionsmedium (DT40 Medium 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin) zugegeben.

5.2.8. Transfektion von DT40 Zellen für den Reporteragenassay

Für Reporteragenexperimente wurden Plasmide für die Expression von Luciferase (pNFAT-luc) und β -Galaktosidase (pCMV- β) über Elektroporation transient in DT40 Zellen eingebracht. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben vorbereitet, bei 300 V und 975 μF elektroporiert und in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in DT40 Medium ausgesät.

5.2.9. Transfektion mit rekombinanten Retroviren

Die Transfektion von DT40 Zellen erfolgte mit rekombinanten Retroviren der so genannten dritten Generation. D.h., dass durch die getrennte Expression der Virusproteine gag-pol und env in einer Helferzelllinie (PlatE) rekombinationsinkompetente Viren erzeugt werden. Die zu transfizierende cDNA wurde über das Gateway-System (Invitrogen) in einen retroviralen Vektor (pMSCV-puro) kloniert, der über das Verpackungssignal Ψ , 5'- und 3'-LTRs (*long terminal repeats*) und das Resistenzgen Puromycin^R verfügt. Ψ steuert die Inkorporation der viralen Transkripte in den Viruskern, und die LTRs enthalten Sequenzen für die reverse Transkription, Integration und Transkription. Env codiert für virale membranständige Glykoproteine, die die Infektionsfähigkeit der Viren festlegen. Das *vesicular stomatitis* Virus verfügt über besonders infektiöse Hüllproteine. Durch die Co-Transfektion von VSV-G und dem retroviralen Plasmid werden in eco- oder amphotrophen Helferzelllinien Viren mit den VSV-G Hüllproteinen produziert (Pseudotypisierung). In Zellen, die kein gag-pol und env exprimieren, findet keine Virusproduktion statt.

5.2.10. Infektion von DT40 Zellen mit rekombinanten Retroviren (Engelke et al., 2002)

Die rekombinanten Viren wurden, wie zuvor beschrieben, mit Hilfe der Helferzelllinie PlatE hergestellt. Die zu infizierenden DT40 Zellen wurden in einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ mit DT40 Medium eingestellt, 1 ml der Zellsuspension mit 1,5 ml Virusüberstand und 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybren gemischt und für 20-24 h auf einer 6-well Platte kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 300xg und 4°C pelletiert, in 2 ml frischem Medium aufgenommen und erneut infiziert. Nach 8 h Inkubation im Brutschrank, wurde das Medium gegen das Selektionsmedium (DT40 Medium 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin) ausgetauscht. Die Transfektions-effizienz

wurde bei jeder Transduktion mit einem EGFP-Konstrukt (pMSCV-puro/EGFP) mittels FACS-Analyse überprüft.

5.2.11. Bestimmung von Oberflächen IgM am Durchflusszytometer

Zur Analyse von Oberflächen IgM wurden 5×10^5 - 1×10^6 Zellen bei 300xg pelletiert, mit 2 ml PBS gewaschen und in 200 μ l PBS und 1:200 verdünnten Maus-anti-Hühner-IgM (DT40) bzw. Ziege F(ab')₂-anti-Human IgM (Ramos, EREB 2.5) FITC-gekoppelten Antikörpern für 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen in 500 μ l PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer untersucht.

5.2.12. Beladung von Zellen mit dem calciumionensensitiven Fluorophor Fluo-3

Für eine anschließende Ca^{2+} -Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen zuvor mit dem Acetoxymethylester des Fluorophors Fluo-3 beladen. Die Esterform des Farbstoffs ist membrangängiger als die entsprechende Carbonsäure und wird im Cytosol von Esterasen hydrolysiert. Das Detergenz Pluronic F-127 erleichtert die Aufnahme des Farbstoffs und unterbindet in der Zelle die Kompartimentierung in den verschiedenen Zellmembranen.

Die Beladung der Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Dr. Michael Engelke (Engelke et al., 2002). Dazu wurden 1×10^6 Zellen bei 300xg pelletiert und in 700 μ l RPMI 5 % FCS (plus 0,5 % CS für DT40 Zellen) resuspendiert. Unter leichtem Vortexen wird die Farbstofflösung (0,015 % Pluronic F-127; 1,5 μ M Fluo-3 AM) dazu gegeben und im Dunkeln bei leichtem Schütteln (Thermomixer Eppendorf, Stufe 8) für 25 min bei 30° inkubiert. Anschließend wurden 700 μ l RPMI 10 % FCS (plus 1 % CS für DT40 Zellen) hinzugegeben und für weitere 10 min im Dunkeln bei 37°C geschüttelt. Nachdem die Zellen zweimal mit je 800 μ l Krebs-Ringer-Lösung 1 mM CaCl_2 gewaschen wurden, wurden sie in 600 μ l Krebs-Ringer-Lösung mit 1 mM CaCl_2 oder 0,5 mM EGTA resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

5.2.13. Ca^{2+} -Messungen am Durchflusszytometer (Engelke et al., 2002)

Für die Ca^{2+} -Messungen am Durchflusszytometer wurden die zuvor beladenen Zellen für „add-back“ Messungen in Krebs-Ringer-Lösung 0,5 mM EGTA und für andere Messungen in Krebs-Ringer-Lösung 1 mM CaCl_2 resuspendiert und am FACS analysiert. Nach Aufnahme des Basissignals für 20-25 sec erfolgte die Stimulation der Zellen (10 μ g/ml Maus-anti-Huhn IgM für DT40 und 10 μ g/ml Ziege F(ab')₂-anti-Human IgM für Ramos und E-REB 2.5). Bei „add-back“ Messungen wurde nach 5 min 55 sec 1 mM CaCl_2 zugegeben.

Die Daten wurden mit dem Programm FlowJo ausgewertet und nach Excel exportiert. Bei vergleichenden Messungen wurde der Beladungszustand bis zu einer Abweichung von 10 % normiert.

5.3. Proteinbiochemische Methoden

5.3.1. Expression rekombinanter Proteine

Expression von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde das „GST Gene Fusion System“ von Amersham verwendet. Dazu wurden die verschiedenen cDNAs in den Vektor pGEX-4T-1 (Amersham) kloniert, bzw. zur Verfügung gestellt und nach Transformation des Expressionsstamms BL21(DE3), exprimiert. Die Expression des GST-Fusionsproteins wird über den *tac*-Promotor gesteuert, der über das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid) aktiviert wird. Der Vektor verfügt zusätzlich über das *lac I^q* Gen, das für den Repressor des *tac*-Promotors codiert und somit auch dazu beiträgt, dass kein GST-Fusionsprotein in Abwesenheit von IPTG gebildet wird. Außerdem codiert der Bereich zwischen der GST cDNA und dem Polylinker für eine Thrombin-Erkennungssequenz, so dass die Möglichkeit besteht, GST nach der Aufreinigung abzuspalten.

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen im großen Maßstab wurden 4,2 l LB-Amp Medium mit 60 ml einer frischen \bar{u} N-Kultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,6-0,8 kultiviert. Anschließend wurde die Expression durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert. Durch das Abzentrifugieren der Zellen bei 3000xg und 4°C und dem Einfrieren des Pellets bei -20°C wurde die Protein-Synthese gestoppt. Wurden GST-Fusionsproteine für Affinitätspräzipitationen aus Zellysaten benötigt, reichte auch ein mittlerer Maßstab von 500 ml Kulturvolumen aus.

Die Expressionsbedingungen, wie Temperatur vor und nach Induktion, und Expressionsdauer wurden zunächst im kleinen Maßstab (50 ml Kulturvolumen) optimiert. Die folgende Tabelle gibt die genauen Expressionsparameter für die einzelnen GST-Fusionsproteine wieder.

GST-Fusionsprotein	Expressionstemperatur [°C]	Expressionsdauer [h]
GST-Btk[SH2]	RT	3
GST-c-Cbl	30	3,5
GST-CrkL[SH2]	37	4
GST-Grb2	37	4
GST-Grb2[N-SH3]	37	4
GST-Grb2[SH2]	37	4
GST-Grb2[C-SH3]	37	4
GST-PLC γ 2[SH2] ₂	30	2,5

Tab. 5.4 Expressionsbedingungen für die verschiedenen GST-Fusionsproteine

Expression von His-Tag Proteinen

Für die Expression von His-Tag Proteinen wurde der Vektor pET15b aus dem „pET System“ von Novagen ausgewählt. Der Vektor bietet die Möglichkeit der Fusion mit einem N-terminalen Tag bestehend aus sechs Histidinen, der durch eine Thrombinspaltung entfernt werden kann. Nach Zugabe von IPTG wird die T7 RNA Polymerase, codiert vom Bakteriengenom, gebildet und die Translation des rekombinanten Proteins, das unter der Kontrolle des T7 Promotors steht, wird initiiert. Der T7/lac Promotor (Studier et al., 1990; Dubendorff und Studier, 1991) besitzt zusätzlich in der Nähe des 5'-Endes eine lac Operatorsequenz. Zudem ist die Information für den Repressor lacI codiert, so dass die Expression des Zielproteins vor der Zugabe von IPTG vollständig blockiert ist.

Für die Expression als His-Tag Protein wurden die verschiedenen Maus cDNAs über NdeI/BamHI in den Vektor pET15b kloniert und nach Transformation von BL21(DE3) exprimiert.

Die Expressionsbedingungen wurden im kleinen Maßstab optimiert. Für die Expression im großen Maßstab wurden 4,2 l LB-Amp Medium mit 60 ml einer frischen üN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 0,6-0,8 kultiviert und dann die Expression über die Zugabe von IPTG induziert. Beendet wurde die Proteinsynthese wie o.a..

His-Tag Protein	IPTG-Konzentration [mM]	Expressions-temperatur [°C]	Expressionsdauer [h]
(His) ₆ -SLP-65	1	37	6
(His) ₆ -SLP-65 Δ SH2	0,8	30	5
(His) ₆ -SLP-76	0,8	37	5

Tab. 5.5 Expressionsbedingungen für die His-Tag Proteine

5.3.2. Affinitätschromatographie

Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden affinitätschromatographisch über Glutathion (GSH)-Sephrose aufgereinigt. Dazu wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut, in 20 ml PBS/g Bakterienpellet resuspendiert und einer Ultraschalllyse unterzogen. Nach der Zugabe von 0,6 % Triton X-100 wurde das Lysat erst 15 min auf Eis inkubiert und dann durch Zentrifugation bei 4°C und 6000xg für 25 min geklärt. Anschließend wurde das Lysat filtriert und zu der GSH-Sephrose (Bindevmögen 1 ml pro 3 mg GST) gegeben und für mind. 1 h bis max. 24 h im Rotator bei 4°C inkubiert. Zum Waschen wurde das Gemisch in den Säulenkörper umgefüllt, an die GradiFrac-Anlage angeschlossen und mit 10 Säulenvolumen PBS gespült. Die Elution erfolgte entweder mit GSH-Elutionspuffer oder über eine Thrombinspaltung (20 NIH Units pro Großexpression in PBS, bei 4°C für 16-20 h), so dass gleichzeitig das GST entfernt wurde. Nach der Thrombinspaltung sind zusätzlich die AS Gly und Ser am N-Terminus vorhanden.

Aufreinigung von His-Tag Proteinen

Die Aufreinigung von His-Tag Proteinen erfolgt mit Hilfe der Metallchelate-Chromatographie über Nickel-Nitrilo-triacetat (Ni-NTA)-Superflow. Die Lyse der Zellen erfolgte mit dem entsprechenden Ni-NTA Lyse-Puffer analog zu dem Protokoll für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen (s.o). Gewaschen wurde die Matrix mit Ni-NTA Wasch-Puffer und eluiert entweder über Thrombin (20 NIH Units pro Großexpression in Wasch-Puffer bei 4°C für 16-20 h) oder Ni-NTA Elutions-Puffer. Nach der Thrombinspaltung sind zusätzlich die AS Gly, Ser und His am N-Terminus vorhanden.

5.3.3. Gelfiltration

Proteine, die für Kristallisationsexperimente oder Bindungsstudien benötigt wurden, wurden nach der Affinitätschromatographie weiter über Gelfiltration aufgereinigt. Gearbeitet

wurde mit Superdex S75 und S200 Säulen von Amersham. Die folgende Tabelle gibt die verwendeten Puffersysteme wieder.

Protein	Puffer	Superdex-Säule
SLP-65	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTE	S200
SLP-65	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0; 300 mM NaCl	S75
(His) ₆ -SLP-65 Δ SH2	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0; 300 mM NaCl	S75
SLP-76	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 2 mM DTE	S200
Grb2	20 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 150 mM NaCl; 2 mM DTE	S75
Grb2[N-SH3]	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM NaCl	S75
Grb2[C-SH3]	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM NaCl	S76

Tab. 5.6 Puffer für Aufreinigungen über Superdex-Säulen

5.3.4. Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente der Konzentrierung von Proteinen, die über die Affinitätschromatographie oder Gelfiltration aufgereinigt wurden. Es wurden die Zentrifugationsröhrchen vom Typ „Amicon“ (Millipore) und „Vivaspin“ (Vivascience) verwendet.

5.3.5. Bradford-Test zur Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration

Die Total-Proteinkonzentration von Lysaten und aufgereinigten Proben wurde nach Bradford et al. (1976) mit dem „Coomassie Plus Reagent“ von Pierce bestimmt.

5.3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden nach ihrer Größe mittels SDS-PAGE unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen, die durch β -Mercaptoethanol bzw. Natriumdodecylsulfat (SDS) eingestellt wurden, aufgetrennt (Laemmli, 1970). Für die Elektrophorese wurden 10 bzw. 15 %ige Polyacrylamid-(PAA)-Trenn- und 5 %ige Sammelgele (Sambrook et al, 1989) in vertikalen Gelkammern (Biorad) verwendet. Der Nachweis der aufgetrennten Proteine erfolgte entweder über anschließendes Western Blotting oder durch Anfärbung mit „Coomassie Brilliant Blue R250“ (Serva).

5.3.7. Western Blotting

Dieser spezifische Nachweis von Proteinen über Antikörper-Erkennung (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981) wurde durch das Übertragen von Proteinbanden aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (Millipore) bei 16 V für 40 min mit der Blottingapparatur „Transfer-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“ (Biorad) und anschließender Anfärbung erzielt. Vor dem immunochemischen Nachweis wurden freie Bindungsstellen auf der Membran zuerst mit Blockpuffer für 1 h bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 h – üN in der angegebenen Verdünnung in PBST bzw. TBST. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min wurde der Blot mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelten Sekundärantikörper (1:10.000 verdünnt in PBST bzw. TBST) für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proteine über das ECL System von Amersham detektiert.

5.3.8. Proteinsequenzierung

Für die Sequenzierung von Proteinen wurden diese über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen geblottet und über Coomassie-Blue angefärbt. Die entsprechenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten und über den automatisierten Edman-Abbau (Edman und Begg, 1967) sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von Frau Böker (Biochemie I, AG Tschesche, Universität Bielefeld) mit dem „Protein Sequencer 810/910 (Knauer) durchgeführt.

5.3.9. Immunpräzipitationen (IPs)

Für IPs wurden 5×10^6 – 1×10^7 unstimulierte oder stimulierte Zellen in Lysepuffer mit Proteinase-Inhibitoren (Sigma) lysiert und nach einer Inkubation von 10 min auf Eis der Zelldebris für 10 min bei 11.000xg und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das geklärte Lysat erst für 1 h mit dem entsprechenden Antikörper bei 4 °C im Rotator inkubiert und dann für eine weitere Stunde mit 20 µl Protein A/G Agarose (Santa Cruz Biotech.) rotiert. Die Matrix wurde dreimal mit Lysepuffer gewaschen, dann in 15-30 µl Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C aufgekocht und über SDS-PAGE und Western Blotting die aufgereinigten Proteine analysiert.

5.3.10. Affinitätspräzipitationen (APs)

Für Affinitätspräzipitationen mit GST-Fusionsproteinen wurden $2-3 \times 10^7$ unstimulierte oder stimulierte Zellen mit Lysepuffer (plus Proteinase-Inhibitoren) lysiert, für 10 min auf Eis inkubiert und der Zelldebris abgetrennt (s.o.). Anschließend wurde das Lysat für 1 h bei

4°C im Rotator mit 10 µg GST und 20 µl Glutathion-Sepharose vorgeklärt. Der Überstand wurde dann mit 10 µg des entsprechenden, frisch aufgereinigten GST-Fusionsproteins und 20 µl Glutathion-Sepharose üN bei 4°C im Rotator inkubiert. Die Matrix wurde wie o.a. gewaschen und in Laemmli-Puffer aufgekocht.

5.3.11. MAPK-Aktivierung

Die Aktivierung der *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) Erk, JNK und p38 erfolgt über die Phosphorylierung von Ser und Thr Resten. Gegen diese phosphorylierten Motive gibt es spezifische Antikörper, so dass der Aktivierungszustand durch Western Blotting analysiert werden kann.

Lysate von unstimulierten und stimulierten DT40 Zellen wurden in RIPA-Puffer mit Inhibitoren lysiert, 10 min auf Eis inkubiert und der Zelldebris abzentrifugiert (s.o.). Die Gesamt-Proteinkonzentration wurde über den Bradford-Test bestimmt, mit Laemmli-Puffer auf 5,5 µg/µl eingestellt, und die Lysate für 10 min bei 95°C aufgekocht. Auf das PAA-Gel wurden pro Spur zwischen 75-100 µg Gesamt-Protein aufgetragen. Nach Auftrennung über SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting, wurde die Membran für 1 h mit TBST 5 % Milchpulver blockiert und der Primärantikörper in der angegebenen Verdünnung in TBST üN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min, wurde für 1 h bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Der weitere Verlauf entsprach dem Western Blotting Protokoll.

5.4. Reporteragenassay

5.4.1. Luciferase-basierter Reporteragenassay für die Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NFAT/AP-1

Eine gängige und sehr sensitive Methode, um die Regulation der Transkription - induziert durch einen externen Stimulus - zu untersuchen, ist die Expression der rekombinanten Luciferase des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) als Reporteragen unter der Kontrolle ausgesuchter Promotoren. Die *Photinus* Luciferase katalysiert unter Verbrauch von ATP die Oxidation des artifiziellen Substrats D-Luciferin zu D-oxy-Luciferin und führt zu einer Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm (Lindqvist et al., 1994). Das emittierte Licht kann durch den Photomultiplier eines Luminometers quantifiziert werden.

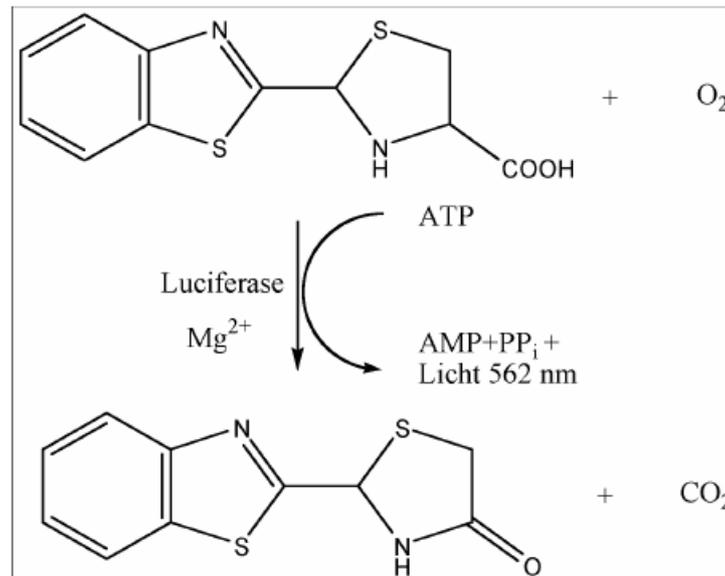


Abb. 5.01 Mechanismus der durch die Luciferase katalysierten Reaktion

NFAT/AP-1-Aktivierung

Für die Untersuchungen zur BCR-vermittelten Aktivierung des *Nuclear Factor of Activated T cells* (NFAT) wurde das Plasmid pNFAT-luc aus dem Labor von Dr. Gerald Crabtree (Stanford University, Stanford, USA) verwendet. Plasmid und Protokoll wurden freundlicherweise von Dr. Tilman Brummer (Garvan Institute, Sydney, Australien) zur Verfügung gestellt.

Das Plasmid pNFAT-luc verfügt über drei Tandem Kopien des NFAT Elements, kloniert in 5'-Richtung vom minimalen Interleukin-2 (IL-2) Promotor (Position -89 bis +51) und das Luciferase Reportergen. Das NFAT Element ist identisch mit dem distalen NFAT:AP-1 Element (Position -268 bis -257) am 5'-Ende des humanen IL-2 Promotors (Durand et al., 1988). Untersuchungen zur NFAT-Aktivierung, die ein sehr ähnliches Konstrukt beinhalteten, zeigten, dass Phorbol ester (PMA) und Ionomycin nur in Kombination in der Lage dazu waren, die Expression des Reportergens auszulösen (Fiering et al., 1990). Diese Daten demonstrieren, dass NFAT (vermittelt durch Ionomycin) und AP-1 (vermittelt durch PMA) beide aktiviert werden müssen, um die hohe Affinität des NFAT:AP-1 Elements zu gewährleisten (Serfling et al., 2000; Macian et al., 2001). Das Reportergenkonstrukt pNFAT-luc scheint auf alle Mitglieder der NFATc Familie zu reagieren und kann in den verschiedensten Zelltypen eingesetzt werden¹.

¹ (<http://crablab.stanford.edu/crablab/clones/clones.html>)

Für den Luciferase Assay wurden 5×10^6 - 1×10^7 DT40 Zellen, wie beschrieben, mit dem Plasmid pNFAT-luc (10 µg) und dem *lacZ*-Expressionsvektor pCMVβ (20 µg) cotransfiziert. Das ermöglicht die Normierung der gemessenen Luciferase-Aktivität auf die Transfektionseffizienz, die durch die Messung der β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt werden kann. Außerdem wurde ein Aliquot der Zellen ohne DNA transfiziert, um die Hintergründe der Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivitäten zu messen.

Nach der Transfektion wurden die Zellen in RPMI 10 % FCS 1 % CS für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1 % FCS 0,1 % CS und einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml für 12 h kultiviert. Die Stimulation erfolgte bei einer Zelldichte von 3×10^6 /ml mit 10 µg/ml Maus-anti-Huhn IgM (M4) für 6 h. Für die Messung wurden 2×10^6 Zellen pelletiert und in 20 µl Lysepuffer 0,5 mM DTE (Applied Biosystems) lysiert, 10 min auf Eis inkubiert und dann der Zelldebris bei 11000xg für 5 min abzentrifugiert. Für die Messung der Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität wurde das „Dual Light System“ von Applied Biosystems verwendet und die Lysate nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Messung wurde an dem Luminometer MiniLumat LB 9506 (Perkin Elmer) durchgeführt. Es wurden folgende Einstellungen gewählt:

Einstellungen (Luminometer)	β-Galaktosidase	Luciferase
Sample volume	250 µl	350 µl
Delay time	2 sec	2 sec
Measure time	3 sec	5 sec

Tab. 5.7 Einstellungen am Luminometer

Pro Messung wurden 10 µl Lysat eingesetzt, von dem erst der Luciferase- und dann der β-Galaktosidase-Wert bestimmt wurde. Für Lysate von jeder Transfektion wurden jeweils ein Doppelwert für die Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität gemessen und der Mittelwert bestimmt. Die Luciferase Werte wurden durch die β-Galaktosidase Werte dividiert, um die Transfektionseffizienz einzubeziehen, anschließend der höchste Luciferase Wert auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte entsprechend relativiert.

5.5. Biophysikalische Methoden

5.5.1. Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Kalorimetrie ist ein klassisches Verfahren, um chemische Reaktionen quantitativ zu untersuchen und thermodynamisch zu beschreiben. Thermodynamische Daten, wie die Stöchiometrie (n), Assoziationskonstante (K_a), Änderungen der freien Energie (ΔG), der Entropie (ΔS) und der Wärmekapazität (ΔC_p), können wichtige Informationen über die Eigenschaften einer nicht kovalenten Bindung liefern, wie sie z.B. bei Protein-Komplexen vorkommen. Jede Reaktion ist mit einer Enthalpie-Änderung (ΔH), d.h. Abgabe oder Aufnahme von Wärme, verbunden. Mit Hilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) kann die Änderung der Enthalpie wie auch der freien Energie gemessen und damit Aussagen über die Natur der Bindung und die Affinität der Bindungspartner getroffen werden. Außerdem können Änderungen der Entropie und die Wärmekapazität bestimmt werden, die wiederum Informationen über Beziehung zwischen Struktur und Funktion von Biomolekülen liefern, was zum Verständnis von biochemischen und biologischen Prozessen beiträgt. Das ITC besteht aus einer Referenz- und einer Probenzelle, zwischen denen eine sehr kleine und genau messbare Temperaturdifferenz besteht. In der Probenzelle wird eine Lösung des Bindungspartners A vorgelegt, die Lösung des Interaktionspartners B in eine Spritze gefüllt und schrittweise in die Probenzelle injiziert. Beide Zellen weisen eine höhere Temperatur auf als die genau thermostatisierte Umgebung, d.h. es ist ein Heizstrom nötig, um ihre Temperatur konstant zu halten. Nach jeder Injektion aus der Spritze führt die Bildung des Komplexes AB zu einer zusätzlichen Wärmeauf- oder abgabe, die das Kalorimeter durch Anpassung der Heizleistung kompensiert und eine Bindung dadurch detektiert. Durch Integration der veränderten Heizleistung erhält man die freigesetzte Wärme, die gegen das steigende molare Verhältnis der Konzentrationen aufgetragen wird. An die experimentellen Daten kann eine theoretische Kurve (nach Gleichung 1) angepasst werden, die die Assoziationskonstante K_a des Komplexes, dessen Bindungsenthalpie ΔH sowie die stöchiometrische Zusammensetzung ergibt (Wiseman et al., 1989; Pierce et al., 1999).

ITC-Messungen wurden am MPI für Molekulare Physiologie in Dortmund bzw. am Institut für Physikalische Chemie I der Universität Bochum unter der Anleitung von Prof. Christian Herrmann durchgeführt. ITC wurde eingesetzt, um die Bindungskonstanten (K_a) in Lösung zu bestimmen. Die aufgrund der Ligandenbindung freigesetzte Wärme kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$Q = V_0 \Delta H_a [M]_t K_a [L] / (1 + K_a [L]) \quad (\text{Gleichung 1})$$

Wobei V_0 das Volumen der Zelle, ΔH_a die Bindungsenthalpie pro Mol Ligand, $[M]_t$ die totale Makromolekülkonzentration (gebundene und freie Fraktionen), K_a die Bindungskonstante und $[L]$ die freie Ligandenkonzentration ist. Für einen Liganden L, der an ein Makromolekül bindet, ist die Bindungskonstante K_a definiert durch:

$$K_a = [\text{besetzte Bindungsstellen}] / [\text{freie Bindungsstellen}] [L]$$

Die Dissoziationskonstante K_d ergibt sich aus dem reziproken Wert von K_a .

Die Änderung der freien Enthalpie ist gegeben durch:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (\text{Gleichung 2})$$

Wobei ΔH^0 die Standard Enthalpie- und ΔS^0 die Entropie-Änderungen für einfache Bindungsstellen darstellen. Die Parameter K_a , ΔH^0 und die Stöchiometrie (n) wurden direkt in einem einzelnen Experiment durch eine nicht-lineare Anpassung der kalorimetrischen Daten nach der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Für die Fehlerberechnung müssen Parameter, wie z.B. die Bestimmung der Proteinkonzentration und Messungenauigkeiten berücksichtigt werden. Daher wird bei der K_d -Bestimmung ein Fehler von 30 % angenommen (mündliche Mitteilung Prof. Dr. Herrmann, Fakultät für Chemie, Univ. Bochum).

Üblicherweise wurde bei 25°C gemessen, wobei die Proteinkonzentration in der Zelle zwischen 25-70 μM und die in der Spritze zwischen 0,25-1 mM lag. Es wurden jeweils 8 μl Injektionen titriert. Die Puffer richteten sich nach der Löslichkeit der Interaktionspartner und wurden wie folgt gewählt:

Komplex	Puffersystem
mSLP-65 (20 μM) / mGrb2 (200 μM)	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTE
mSLP-65 (25 μM) / mGrb2[C-SH3] (250 μM)	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTE
mSLP-65(25 μM) / mGrb2[N-SH3] (250 μM)	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTE

65-Pro Peptid (25 μ M) / mGrb2[C-SH3] (250 μ M)	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM NaCl
mSLP-65 (250 μ M) / Ig- α pTyr ²⁰⁴ Peptid (25 μ M)	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM DTE

Tab. 5.8 Puffersysteme für ITC-Messungen

5.6. Kristallographische Methoden

5.6.1. Kristallisation

Prinzip der Züchtung von Proteinkristallen

Kristallkeime wachsen nur in übersättigten Lösungen, da diese die treibende thermodynamische Kraft für die Kristallisation liefern. Wird das Lösungsmittel z.B. durch Verdampfen entfernt, wird das Löslichkeitslimit überschritten, und das System ist übersättigt. Wenn eine feste Phase, wie z.B. Präzipitat oder Kristalle, vorhanden ist, können die Proteine die Lösung verlassen und sich dort anlagern. Ein Kristall entsteht aber nicht spontan, wenn die Lösung übersättigt ist, da dafür Energie – analog zur Aktivierungsenergie – notwendig ist. Ein stabiler Keim ist ein Molekül-Aggregat mit bestimmten physikalischen Eigenschaften, das neue Moleküle schneller anlagert, als andere in Lösung gehen.

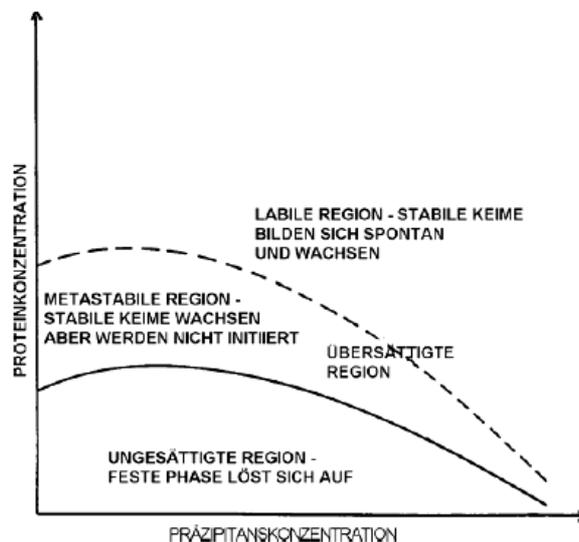


Abb. 5.02 Kristallisationsparameter

Es gibt zwei Regionen oberhalb der Sättigung. In der metastabilen Region wird die Kristallbildung unterstützt, aber es findet keine stabile Keimbildung statt. Die labile Region wird charakterisiert durch Kristallwachstum und Keimbildung (McPherson, 1990).

Ideales Kristallwachstum beginnt mit Keimen, die in der labilen Phase gerade oberhalb der Phasengrenze gebildet werden. Das Kristallwachstum vollzieht sich dann langsam, und die Lösung geht in die metastabile Phase über, in der keine weiteren Keime wachsen und die Kristalle weiterwachsen.

Kristallisationsexperimente

Die Kristallisationsexperimente wurden in der AG von Prof. Herrmann am MPI für Molekulare Physiologie in Dortmund bzw. Institut für Physikalische Chemie I, Universität Bochum und in der AG von Dr. Hofmann, Fakultät für Biologie, Abteilung Biophysik an der Universität Bochum, durchgeführt.

Kristalle wurden nach der Methode des hängenden oder sitzenden Tropfens (McPherson, 1990) gezüchtet. Um möglichst vieler Parameter für Kristallisationsbedingungen zu untersuchen, wurden die Kits „Crystal Screen“, „Crystal Screen II“ und „PEG/Ion Screen“ von Hampton Research verwendet.

Für die Vermessung eines Kristalls wurde dieser mit einem Nylonloop in Kryolösung überführt, die entweder aus der „Mutterlösung“ mit 20 % Glycerin oder nur aus Paraffin bestand und bei 100 K in den Röntgenstrahl gehalten. Die Datensätze wurden am *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF), Grenoble, France von Dr. Hofmann gemessen und anschließend ausgewertet.

Für die Kristallisation des SLP-65 Peptids 65-Pro und der C-terminalen SH3 Domäne von Grb2 wurde die mGrb2[C-SH3] in 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM NaCl in einer Konzentration von 10 mg/ml und das Peptid in ddH₂O eingesetzt. Es wurden Tropfen in den stöchiometrischen Verhältnissen 1:3 und 1:5 (Protein zu Peptid) angesetzt.

6 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die prolinreiche Region und die SH2-Domäne des Adapterproteins SLP-65 im Detail charakterisiert werden. Die Defizienz dieses Proteins in SLP-65-defizienten Mäusen oder in humanen Erkrankungen, wie z.B. ALL, löst schwere Immunsuffizienzen aus (Jumaa et al., 2003). Das verdeutlicht die essenzielle Funktion dieses Moleküls für die B-Zell-Differenzierung und -Aktivierung, die allein auf die Protein-Interaktionsdomänen des Adapters zurückzuführen ist. Die Tyrosin-Phosphorylierungsmotive von SLP-65 und deren Bindungspartner wurden bereits identifiziert sowie ihre Bedeutung für die BCR-Signalkaskade beschrieben (Chiu et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurde die funktionelle Bedeutung der zentralen prolinreichen Region und der C-terminal lokalisierten SH2-Domäne noch nicht aufgeklärt. Daher sollten in dieser Arbeit diese beiden Domänen im Detail untersucht werden. Die prolinreiche Region sollte durch *in vitro*-Interaktionsstudien zunächst biochemisch charakterisiert werden. Anhand dieser Ergebnisse sollte die Bedeutung der SH3-bindenden Region und die der SH2-Domäne *in vivo* für die BCR-induzierten Signalwege untersucht werden.

6.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung von SLP-Proteinen und Bindungspartnern von SLP-65

6.1.1. SLP-65

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Bindungseigenschaften und die Struktur des Adapterproteins SLP-65 im Detail untersucht werden. Für *in vitro*-Interaktionsstudien und Kristallisationsexperimente müssen ausreichende Mengen des gereinigten Proteins zur Verfügung stehen. Daher wurde die cDNA von murinem SLP-65 (mSLP-65) in den bakteriellen Expressionsvektor pET15b kloniert und nach Transformation von BL21(DE3) Zellen als Fusionsprotein mit einem N-terminalen *Tag*, bestehend aus sechs His-Resten, rekombinant hergestellt. Die Aufreinigung des cytoplasmatisch gelösten Proteins erfolgte nach Ultraschall-Lyse über Metallchelate-Chromatographie an einer Ni-NTA Matrix. Eine anschließende Thrombin-Spaltung, um den His-*Tag* zu entfernen, zeigte, dass sich eine zusätzliche Thrombin-Schnittstelle innerhalb des Proteins befand. Diese konnte mittels Proteinsequenzierung identifiziert und durch den Austausch von Arg248Lys mutiert werden (nicht gezeigt). Nach erfolgreicher Abspaltung des His-*Tags* wurde mSLP-65 weiter über eine Gelfiltration gereinigt. Der His-*Tag* wurde für die Identifizierung bindender Ap-

tamere an dem Protein belassen. Die korrekte Proteinsequenz wurde über Sequenzierung nachgewiesen. Abbildung 6.01 dokumentiert den Aufreinigungsverlauf für das rekombinante mSLP-65.

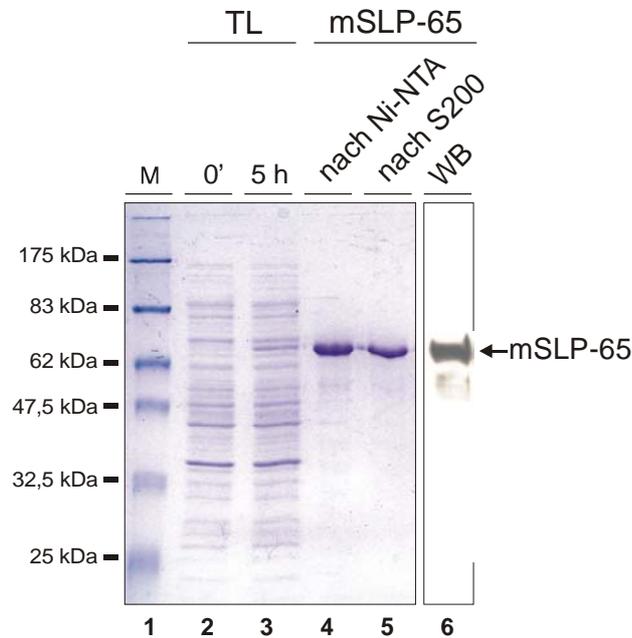


Abb. 6.01 Expression und Reinigung von mSLP-65 (10 %-iges PAA-Gel; Coomassie gefärbt)

In Spur 2 und 3 wurden Totallysate der BL21(DE3) Zellen, transfiziert mit pET15b-mSLP-65R248K Klon 2, vor und 5 h nach Induktion mit IPTG aufgetragen. Spur 4-6 zeigen den Aufreinigungsverlauf nach Affinitätschromatographie über Ni-NTA Superflow (Spur 4), Thrombin-Spaltung und anschließender Gelfiltration über Superdex S200 (Spur 5). Das gereinigte Protein wurde über Detektion mit anti-KARLA mittels Western Blotting (WB) identifiziert. Spur 1 zeigt den Proteingrößenstandard von NEB.

Die Aufreinigungsschritte und der Nachweis eines exprimierten Proteins werden in Abb. 6.01 für mSLP-65 exemplarisch gezeigt.

mSLP-65 wurde in zwei verschiedenen Puffersystemen gereinigt. Für anschließende Kristallisationsexperimente wurden Tris-Puffer und für die Identifizierung interagierender Aptamere Phosphat-Puffer eingesetzt. Für *in vitro*-Bindungsstudien mittels ITC (s. Kap. 6.2) wurde mSLP-65 in beiden Puffersystemen verwendet. Phosphat-Puffer eignen sich weniger für Kristallisationsexperimente, da sich, durch das Verdampfen des Lösungsmittels bei der Methode des „Sitzenden oder Hängenden Tropfens“, der pH-Wert der Probe ändern kann, was sich wiederum auf die Konstitution des Proteins auswirken könnte. Die Aufreinigungsqualität unterschied sich in den beiden Puffersystemen nicht. Die Ausbeute an mSLP-65 betrug im Schnitt 0,7 mg/g Bakterienpellet.

Für die Identifizierung SLP-65-bindender Aptamere wurde komplettes SLP-65 und, um zu bestimmen an welche Proteinregion diese binden, ein um die SH2-Domäne verkürztes SLP-65 (mSLP-65 Δ SH2) eingesetzt. Diese Deletionsmutante wurde analog zu mSLP-65 kloniert und exprimiert. Für die Abspaltung des His-Tags bestand keine Notwendigkeit. Abb. 6.02 zeigt das Fusionsprotein nach Expression und Reinigung.

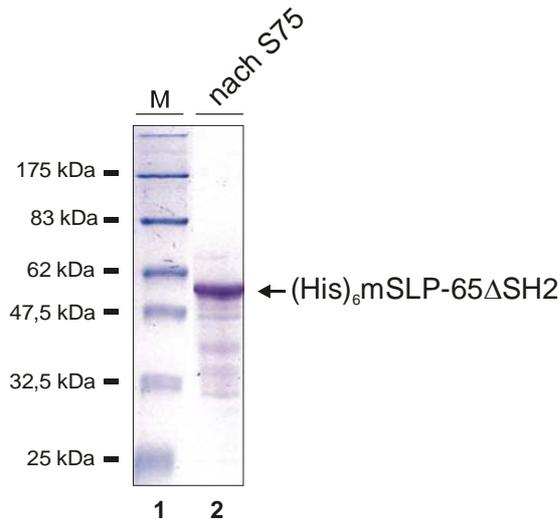


Abb. 6.02 Gereinigtes $(\text{His})_6\text{mSLP-65}\Delta\text{SH2}$ (10 %-iges PAA-Gel; Coomassie gefärbt)

Spur 1 zeigt den Proteingrößenstandard von NEB. BL21(DE3) Zellen transformiert mit pET15b-mSLP-65 Δ SH2 Klon 2 exprimierten nach Induktion durch IPTG das rekombinante Protein für 5 h. Dann wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Protein über Ni-NTA Superflow und Gelfiltration (S 75) gereinigt. Das gereinigte Protein $(\text{His})_6\text{mSLP-65}$ ist in Spur 2 dargestellt.

6.1.2. SLP-76

Die Namensgebung von SLP-65 erfolgte anhand der allgemeinen Strukturhomologie zu dem Adapterprotein SLP-76, das ein paar Jahre zuvor in T-Zellen und Makrophagen identifiziert wurde (Jackman et al., 1995). Um weitere vergleichende Studien zur Bindungsspezifität und Struktur durchführen zu können, wurde die cDNA von murinem SLP-76 (mSLP-76) aus EL-4 T-Zellen über RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pET15b kloniert. Die Aufreinigung erfolgte analog zu mSLP-65. Das gereinigte Protein ist in Abbildung 6.03 gezeigt.

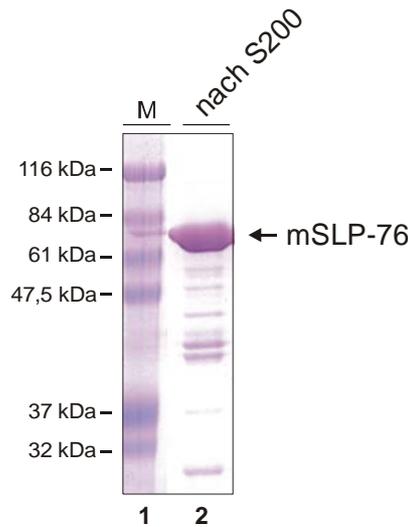


Abb. 6.03 mSLP-76 nach Expression und Reinigung (10%-iges PAA-Gel, Coomassie gefärbt)

In Spur 1 ist der Proteingrößenstandard von Sigma zu sehen. Spur 2 zeigt mSLP-76 nach Expression in BL21(DE3) Zellen, Zellyse und Aufreinigung über Ni-NTA Superflow, Thrombin-Spaltung und Gelfiltration (S200).

6.1.3. Aufreinigung von SLP-65-Bindungspartnern für *in vitro*-Interaktionsstudien

Grb2

Die Interaktion zwischen Grb2 und SLP-65 wurde schon vor acht Jahren beschrieben. Es wurde eine konstitutive sowie induzierbare Wechselwirkung der beiden Proteine postuliert (Fu und Chan, 1997; Wienands et al., 1998). Um die genauen Interaktionsdomänen von Grb2 zu identifizieren, die zu der Bindung an SLP-65 beitragen, sollten in dieser Studie die Domänen einzeln als GST-Fusionsproteine rekombinant hergestellt und dann für ITC-Messungen mit mSLP-65 sowie Affinitätspräzipitationen eingesetzt werden (Kap. 6.2).

Grb2 besteht aus zwei terminalen SH3-Domänen und einer zentralen SH2-Domäne (Suen et al., 1993). Die cDNA von murinem Grb2 wurde aus K46 mRNA über RT-PCR amplifiziert. Vollständiges Grb2 sowie die einzelnen Domänen wurden in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert und nach Transformation von BL21(DE3) Zellen als GST-Fusionsproteine exprimiert. Die cytoplasmatisch gelösten Proteine wurden über Affinitätschromatographie an Glutathion (GSH)-Sephrose gereinigt. Der N-terminale GST-Rest wurde entweder mit Thrombin abgespalten oder für Affinitätspräzipitationen am Protein belassen. Anschließend wurden die Proteine weiter über Gelfiltration gereinigt. Die gereinigten GST-Fusionsproteine sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Die berechneten Molekulargewichte liegen bei je 7 kDa für die SH3-Domänen, 10 kDa für die SH2-

Domäne und 25 kDa für das komplette mGrb2. Außerdem müssen bei den GST-Fusionsproteinen 26 kDa für die GST-Komponente addiert werden. Die Effizienz der Abspaltung von GST wird für mGrb2 exemplarisch gezeigt (Abb. 6.04, Spur 6).

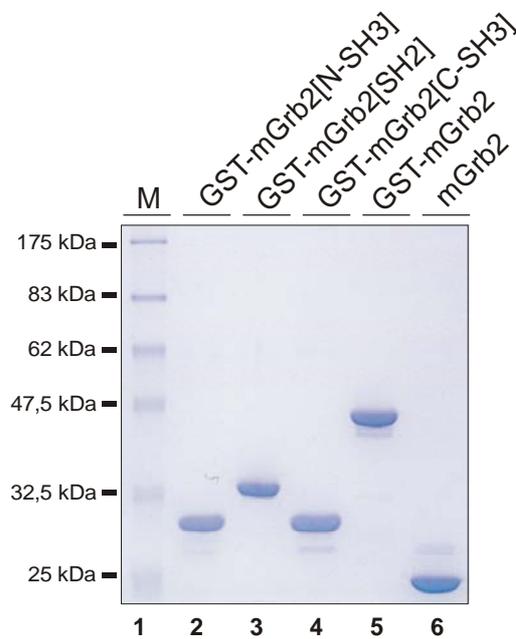


Abb. 6.04 Gereinigte GST-Fusionsproteine der einzelnen mGrb2-Domänen (10 %-iges PAA-Gel, Coomassie gefärbt)

In Spur 1 wurde der Proteingrößenstandard von Sigma aufgetragen. Die Spuren 2-5 zeigen die verschiedenen GST-mGrb2-Fusionsproteine nach Expression in BL21(DE3), Zellyse und Reinigung über GSH-Sepharose und Gelfiltration (S75). Exemplarisch ist mGrb2 nach Abspaltung des GST-Tags durch Thrombin dargestellt (Spur 6).

Die Ausbeute der gereinigten GST-Fusionsproteine lag bei ca. 0,6 mg/g Bakterienpellet und für die Grb2-Domänen ohne GST bei ca. 0,2 mg/g.

Btk, Cbl, CrkL und PLC- γ 2

SLP-65 verfügt über fünf Tyr-Reste, die induzierbar phosphoryliert werden können und somit Bindestellen für SH2-Domänen anderer Proteine der Signalleitungskette bilden. Als solche SH2-Domänen-enhaltenden Proteine wurden die Tec-Kinase Btk, die Ubiquitin-E3 Ligase Cbl, das Proto-Oncoprotein CrkL, Grb2 und PLC- γ 2 identifiziert (Su et al., 1999; Yasuda et al., 2000; Engels et al., 2001b; Ishiai et al., 1999). Um die Phosphorylierung der einzelnen Tyr-Reste von SLP-65 in EBV-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infi-

zierten Zellen untersuchen zu können, wurden diese SH2-Domänen-enthaltenden Bindungspartner als GST-Fusionsproteine für Affinitätspräzipitationen rekombinant hergestellt. Die cDNAs der SH2-Domänen von CrkL, Btk und PLC- γ 2 lagen bereits in dem Vektor pGEX-4T-1 vor, während die SH2-Domänen von Grb2 (s.o.) und Cbl noch kloniert werden mussten. Die cDNA der SH2-Domäne von murinem Cbl (mCbl[SH2]) wurde über RT-PCR aus K46 mRNA amplifiziert und in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert. Die GST-Fusionsproteine wurden in BL21(DE3) Zellen exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Die gereinigten GST-SH2-Fusionsproteine sind in Abb. 6.05 gezeigt.

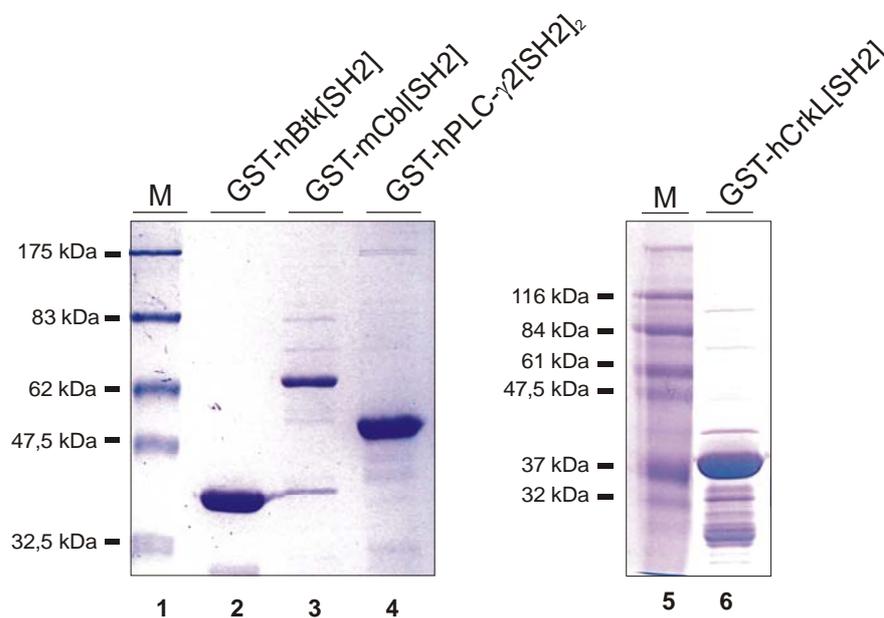


Abb. 6.05 Reinigung verschiedener GST-SH2-Fusionsproteine (10 %-iges PAA-Gel, Coomassie-Färbung)

In Spur 1 und 5 sind die Proteingrößenstandards aufgetragen (Spur 1 Sigma, Spur 5 NEB). BL21(DE3) Zellen wurden mit GST-hBtk[SH2] bzw. -mCbl[SH2] Klon 2A bzw. -hPLC- γ 2[SH2]₂ bzw. -hCrkL[SH2] transformiert. Gezeigt sind die exprimierten Proteine (s. Kap. 5.3.1) nach Zellyse und Reinigung über GSH-Sepharose.

6.1.4. Anwendungen der rekombinanten Proteine

In der folgenden Tabelle werden noch einmal alle rekombinant synthetisierten und gereinigten Proteine aufgeführt und die Experimente, für die sie hergestellt bzw. eingesetzt wurden.

Protein	Anwendung			
	Kristallographie	ITC	Affinitäts- präzipitationen	Aptamer- Identifizierung
mSLP-65	+	+	-	-
(His) ₆ -mSLP-65	+	-	-	+
(His) ₆ -mSLP-65 Δ SH2	+	-	-	+
mSLP-76	+	-	-	-
(His) ₆ -mSLP-76	+	-	-	+
mGrb2	+	+	-	-
GST-mGrb2	-	-	+	+
mGrb2-[N-SH3]	-	+	-	-
GST-mGrb2 [N-SH3]	-	-	+	-
GST-mGrb2[SH2]	-	-	+	-
mGrb2[C-SH3]	+	+	-	-
GST-mGrb2 [C-SH3]	-	-	+	-
GST-hBtk[SH2]	-	-	+	-
GST-mCbl[SH2]	-	-	+	-
GST-hCrkL[SH2]	-	-	+	-
GST-hPLC- γ 2[SH2] ₂	-	-	+	-

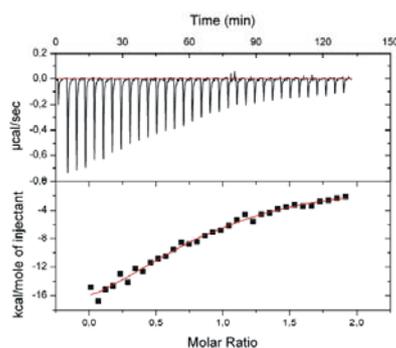
Tab. 6.1 Verwendung der rekombinant hergestellten Proteine

6.2. Biochemische Charakterisierung der SH3-bindenden Region von SLP-65

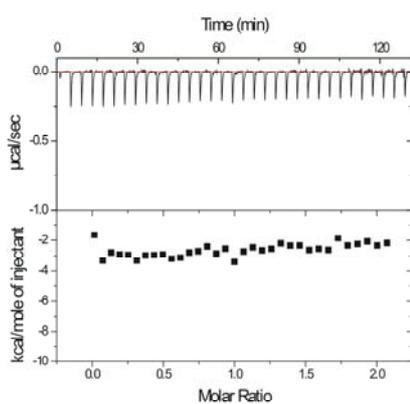
6.2.1. Identifizierung der SLP-65-bindenden SH3-Domäne von Grb2

Ein postulierter Bindungspartner, der mit der zentralen prolinreichen Region von SLP-65 interagiert, ist Grb2 (Fu und Chan, 1997; Wienands et al., 1998). Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten die rekombinant hergestellten Proteine mSLP-65 (s. Kap. 6.1.1.) und komplettes Grb2 sowie die einzelnen Domänen (s. Kap. 6.1.3) für Isotherme Titrationskalorimetrie-(ITC)-Messungen eingesetzt werden. Die ITC bietet den Vorteil, die direkte Interaktion zwischen zwei oder mehreren Bindungspartnern sowie deren Affinität zu messen und außerdem die Stöchiometrie des Komplexes zu bestimmen. ITC ist im Detail in Kapitel 5.5.1 beschrieben. Kurz zusammengefasst wird für die ITC-Messung ein Bindungspartner in einer Messzelle vorgelegt, deren Temperatur über einen Heizstrom kontrolliert und über den Vergleich mit einer Referenzzelle reguliert wird. Der Bindungspartner wird in festgelegten Zeitintervallen zutitriert. Eine Bindung führt zu einer Zu- oder Abnahme der Reaktionsenthalpie, die zu einer Temperaturänderung der Mess- im Vergleich zu Referenzzelle führt. Das System detektiert diese Abweichung und gleicht sie durch die Regulation des Heizstroms aus. Die Leistung, die für die Aufrechterhaltung des isothermen Zustands aufgebracht werden muss, kann in die entsprechende Bindungsenthalpie umgerechnet werden. Außerdem können Parameter wie die Dissoziationskonstante K_d und Stöchiometrie n des Komplexes bestimmt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Messmethode liegt darin, die direkte Interaktion von Molekülen bestimmen zu können.

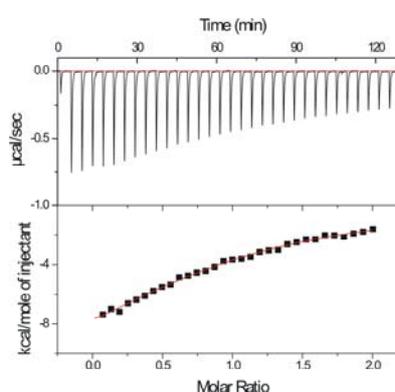
Für die ITC-Messungen wurde mSLP-65 in Kombination mit vollständigem mGrb2, mGrb2[N-SH3] oder mGrb2[C-SH3] eingesetzt. Eine mögliche Interaktion mit der mGrb2[SH2] konnte nicht bestimmt werden, da mSLP-65 unphosphoryliert vorlag.



a) mSLP-65/mGrb2



b) mSLP-65/ mGrb2[N-SH3]



c) mSLP-65/mGrb2[C-SH3]

Abb. 6.06 ITC-Messungen von mSLP-65 und den mGrb2-Varianten

Für die ITC-Messungen wurden 2 ml mSLP-65 (25 μM) in der Messzelle vorgelegt. Dazu wurden insgesamt 350 μl der jeweiligen mGrb2-Variante (250 μM) in kurzen Zeitintervallen titriert. Die obere Kurve zeigt die Heizleistung in $\mu\text{cal/sec}$ in Abhängigkeit von der Zeit bzw. den Titrationsschritten. Durch Integration erhält man die freigesetzte Wärme, die im unteren Abschnitt gegen das steigende Verhältnis der Konzentrationen von mSLP-65 und mGrb2 (a), mGrb2[N-SH3] (b) bzw. mGrb2[C-SH3] (c) aufgetragen wurde. Durch das Anpassen einer theoretischen Kurve (rot) kann die Bindungskonstante K_a , die Bindungsenthalpie sowie das stöchiometrische Verhältnis bestimmt werden.

In Abb. 6.06a ist eine Änderung der Heizleistung festzustellen, d.h. mSLP-65 und mGrb2 assoziieren direkt miteinander. Um zu diskriminieren, welche der beiden SH3-Domänen von Grb2 diese Interaktion vermittelt, wurden die einzelnen Domänen für eine ITC-Messung mit mSLP-65 eingesetzt. In Abb. 6.06b können lediglich kleine Änderungen der Heizleistung beobachtet werden, die auf die Verdünnungswärme der zutitrierten Lösung zurückzuführen sind. Die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 bindet somit nicht an mSLP-65. Im Abb. 6.06c ist die ITC-Messung von mSLP-65 und der C-terminalen SH3-Domäne von mGrb2 dargestellt. Hier ist eine typische Titrationskurve zu sehen, d.h. zu

Beginn bindet viel von dem zutitrierten mGrb2[C-SH3] an mSLP-65 in der Zelle, und mit zunehmender Sättigung dieses Komplexes wird die freigesetzte Wärme immer geringer.

Die aufgewendete Heizleistung kann in die freigesetzte Bindungsenthalpie und damit die Dissoziationskonstante umgerechnet werden (s. Kap. 5.5.1.). Die folgende Tabelle gibt die ITC-Messungen und die ausgewerteten Daten wieder.

Komplex	K_d [μM]
mSLP-65 / mGrb2	6 ± 2
mSLP-65 / mGrb2[N-SH3]	keine Bindung zu detektieren
mSLP-65 / mGrb2[C-SH3]	20 ± 6

Tab. 6.2 Dissoziationskonstanten der ITC-Messungen von mSLP-65 und mGrb2

Diese Daten belegen, dass nur die C-terminale SH3-Domäne von mGrb2 eine direkte Bindung mit mSLP-65 eingeht. Über die freie Enthalpie (s. Kap. 5.5.1, Gl. 2) kann man aus den beiden gemessenen K_d -Werten, unter der Annahme, dass es sich nicht um eine kooperative Bindung handelt, den potenziellen K_d -Wert für die Bindung der mGrb2[N-SH3] berechnen. Dieser würde bei 289 mM liegen. Demnach bindet eindeutig nur die C-terminale SH3-Domäne. Der kleine Unterschied zwischen den beiden bestimmten K_d -Werten kann auf Messungenauigkeiten zurückgeführt werden. Die Stöchiometrie der beiden gemessenen Interaktionen lag bei 1:1. Anhand dieser Messungen kann die postulierte, konstitutive Interaktion zwischen SLP-65 und Grb2 nicht nur bestätigt werden, sondern zusätzlich auf die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 eingegrenzt werden.

6.2.2. Identifizierung des atypischen SH3-bindenden Motivs von SLP-65

In Kapitel 6.2.1. wurde durch die Messung biochemischer Parameter mittels ITC die konstitutive Interaktion zwischen SLP-65 und Grb2 auf die C-terminale SH3-Domäne zurückgeführt. Für diese Domäne wurde in der Literatur die atypische Konsensus-Erkennungssequenz PxxxRxxKP (wobei x für eine beliebige Aminosäure steht) beschrieben (Lewitzky et al., 2001). Diese Sequenz ist auch in dem verwandten Protein SLP-76 zu finden und vermittelt die Interaktion zu der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 sowie des Grb2-Familienmitglieds Gads (Lewitzky et al., 2001; Harkiolaki et al., 2003). Die Erkennungssequenz ist auch in SLP-65 an der AS-Position 204-212 von humanem und murinem SLP-65 zu finden. Daher wurde das Peptid 65-Pro synthetisiert, dass die AS 202-

214 von humanem bzw. murinem SLP-65 umfasst und die Sequenz **KAPMVNRSTKPNS** hat. Die Interaktion dieses Peptids mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 sollte über Affinitätspräzipitationen sowie eine ITC-Messung analysiert werden.

Affinitätspräzipitation von Grb2 über das SLP-65-Peptid 65-Pro

Für die Affinitätspräzipitationen wurden Grb2-defiziente DT40 Zellen verwendet, die entweder mit chGrb2wt oder einer chGrb2-Mutante rekonstituiert wurden, deren C-terminale SH3-Domäne durch einen AS-Austausch (W193K) inaktiviert wurde (Stork et al., 2004). Die Präzipitation von chGrb2 über das SLP-65-Peptid 65-Pro aus diesen Zellen sollte zeigen, dass das Peptid Grb2 und insbesondere nur die Grb2[C-SH3]-Domäne bindet. Das Peptid ist N-terminal biotinyliert und ermöglicht dadurch die Immobilisierung an Streptavidin-Agarose. Die so präzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert.



Abb. 6.07 Präzipitation von chGrb2wt und chGrb2W193K über das Peptid 65-Pro (n=2)

Lysate von unstimulierten DT40 *grb2*^{-/-} Zellen (je 2x10⁷), die entweder mit chGrb2wt (Spur 1 und 2) oder einer Mutante mit einer inaktiven C-terminalen SH3-Domäne (W193K, Spur 3 und 4) rekonstituiert wurden, wurden einer Affinitätspräzipitation (AP) mit dem biotinylierten Peptid 65-Pro über Streptavidin-Agarose unterzogen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (10%-iges Gel) aufgetrennt und über Grb2-Immunoblotting analysiert. Die aufgetragenen Totallysate (TL) dienen dem Vergleich der chGrb2 Expression in den beiden Zelllinien (1x10⁶ Zellen/Spur).

Die Analyse der Totallysate (Spur 2 und 4) in Abb. 6.07 zeigt, dass beide Zellpopulationen gleiche Mengen an chGrb2 exprimieren. Über das Peptid 65-Pro kann nur chGrb2wt (Spur 1) präzipitiert werden. chGrb2 mit inaktiver [C-SH3]-Domäne ist nicht mehr in der Lage an das Peptid zu binden (Spur 3). Damit kann das atypische SH3-bindende Motiv PxxxRxxKP für SLP-65 sowie dessen spezifische Interaktion mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 bestätigt werden.

ITC-Messung des SLP-65-Peptids 65-Pro mit Grb2[C-SH3]

Durch eine ITC-Messung sollte zusätzlich die Bindung zwischen dem atypischen SH3-Bindemotiv von SLP-65 und der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 nachgewiesen werden. Dafür wurde mGrb2[C-SH3] und das Peptid 65-Pro eingesetzt.

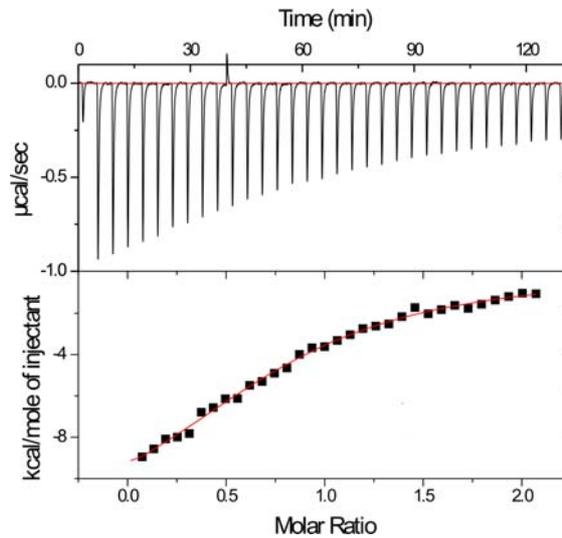


Abb. 6.08 ITC-Messung der Bindung 65-Pro und Grb2[C-SH3]

Für die ITC-Messung wurden 2 ml 65-Pro ($25 \mu\text{M}$) in der Messzelle vorgelegt und $350 \mu\text{l}$ mGrb2[C-SH3] ($250 \mu\text{M}$) schrittweise zugegeben. Die Integration der aufgewandten Heizleistung ergibt die Kurve im unteren Teil der Abbildung. Die Berechnung der biochemischen Parameter ergab einen K_d von $9 \pm 3 \mu\text{M}$ und ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1.

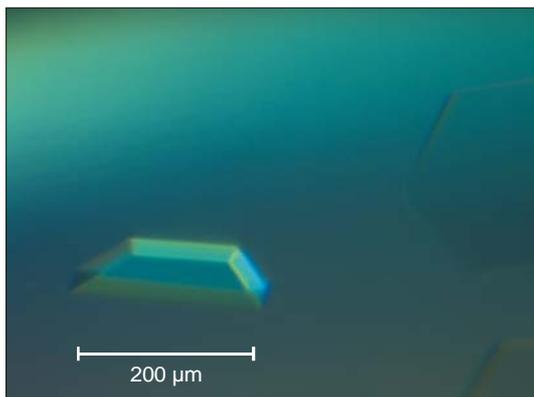
Abb. 6.08 zeigt, dass das SLP-65-Peptid 65-Pro und Grb2[C-SH3] direkt miteinander interagieren. Bei dieser Messung wurde ein K_d von $9 \pm 3 \mu\text{M}$ und ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 bestimmt. Der K_d -Wert ist fast identisch mit dem der für die Bindung zwischen mSLP-65 und mGrb2 bestimmt wurde ($K_d=6 \pm 2 \mu\text{M}$, Abb. 6.06). Demnach bindet nur die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 an das atypische SH3-Bindemotiv PxxxRxxKP von SLP-65.

Folglich wurde in dieser Arbeit die konstitutive Interaktion zwischen Grb2 und SLP-65 bestätigt. Zusätzlich konnten die für die Bindung verantwortlichen Regionen der beiden Proteine identifiziert werden.

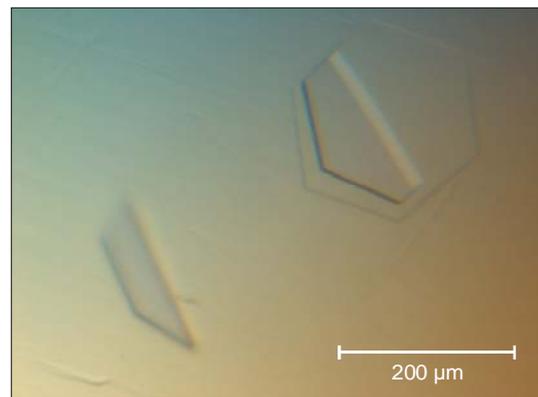
6.2.3. Kristallisation und Strukturaufklärung des Komplexes mGrb2[C-SH3]/65-Pro

Der Nachweis und die biochemische Charakterisierung der Bindung der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 und SLP-65 wurden in Kapitel 6.2.1 und 6.2.2 beschrieben. Die genaue Konformation dieses Komplexes sollte durch die Aufklärung der Röntgenstruktur untersucht werden. Ein vergleichbare Struktur, bestehend aus der C-terminalen Domäne des Grb2-verwandten Proteins Gads und einem SLP-76 Peptid wurde vor zwei Jahren aufgeklärt (Harkiolaki et al., 2003).

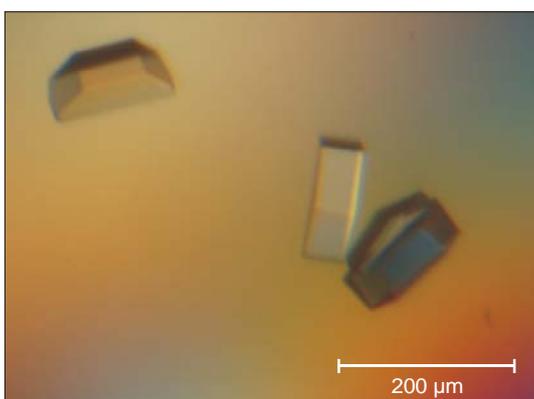
Die Kristallisationsexperimente wurden in Bochum, Fakultät für Biologie, Abteilung Biophysik, in der Arbeitsgruppe von Dr. Hofmann durchgeführt. Der Komplex wurde in einem Verhältnis 1:3 und 1:5 (Peptid zu Protein) aus den Komponenten mGrb2[C-SH3] (10 mg/ml) und dem Peptid 65-Pro angesetzt. Die Kristalle wurden nach der Methode des „Sitzenden Tropfens“ (McPherson, 1990) gezüchtet. Die Proteine kristallisierten unter den in Abb. 6.09 mit aufgeführten Pufferbedingungen.



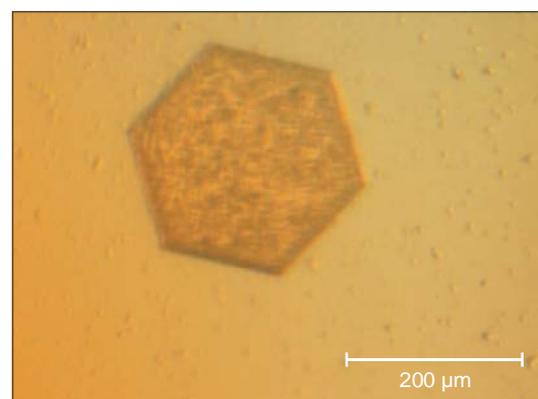
Crystal Sreen, Lsg. 3, 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$



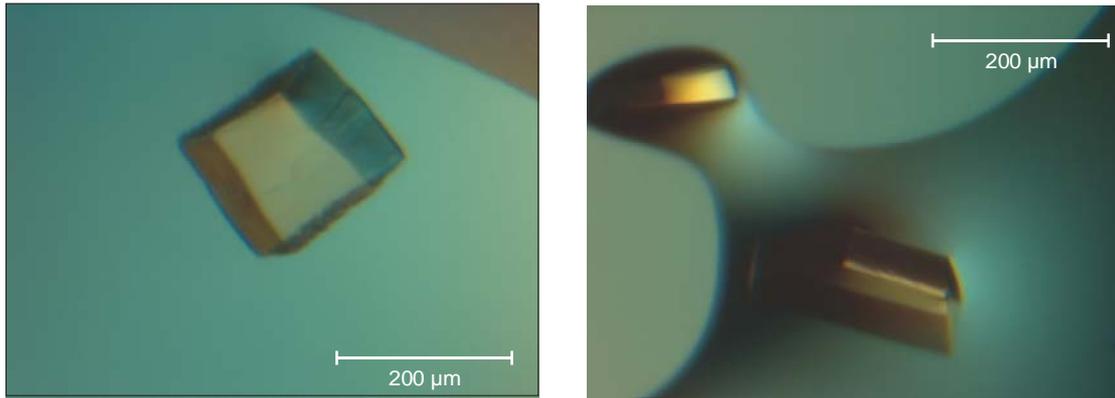
Crystal Sreen, Lsg. 11,
0,1 M $\text{Na}_3\text{-citrat}$ pH 5,5; 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$



Crystal Screen, Lsg. 35, 0,1 M HEPES/NaOH;
0,8 M NaH_2PO_4 ; 0,8 M KH_2PO_4



Crystal Screen, Lsg. 37,
0,1 M NaAc pH 4,6; 8 % PEG 4000



Crystal Screen, Lsg. 47,
0,1 M NaAc pH 4,6; 8 % PEG 4000

Crystal Screen, Lsg. 48,
0,1 M Tris/HCl pH 8,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$

Abb. 6.09 Kristalle der Ansätze mGrb2[C-SH3]/65-Pro in Lösungen von Hampton Research

Der Komplex bestehend aus mGrb2[C-SH3] (10 mg/ml) und dem SLP-65-Peptid 65-Pro wurde in einem stöchiometrischen Verhältnis 1:5 angesetzt und in Puffern des Kits „Crystal Screen“ von der Firma Hampton Research nach der Methode des „Sitzenden Tropfens“ kristallisiert.

Es wurden Kristalle, die bei den Bedingungen 35, 37 und 48 angesetzt wurden (Abb. 6.09), in Bochum und am Synchrotron in Grenoble röntgenkristallographisch vermessen. Alle Kristalle wachsen in Raumgruppe P3 (1) 21 mit den Axen a, b 40,5 Å und c zwischen 136,5 und 137,8 Å. Die Unterschiede bewegen sich im normalen Bereich für cryogegekühlte Kristalle und kommen nicht durch eine andere Packung zustande.

Bedingung	Kristallname	Kantenlängen a bzw. b und c [Å]	Auflösung [Å]
35	csh365pro_6	40,5 / 137,7	1,55
37	csh365pro_8	40,4 / 136,5	-
47	csh365pro_5	40,4 / 137,0	-
48	csh365pro_2	40,5 / 137,8	1,3
48	csh365pro_3	40,6 / 137,0	2,0

Tab. 6.3 Kristallparameter

Als Strukturmodell für den molekularen Ersatz wurde die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 (AS 159-215) aus der Komplexstruktur mit der N-SH3-Domäne von Vav verwendet (Proteindatenbank, Zugangsnr. 1GCQ) (Nishida et al., 2001).

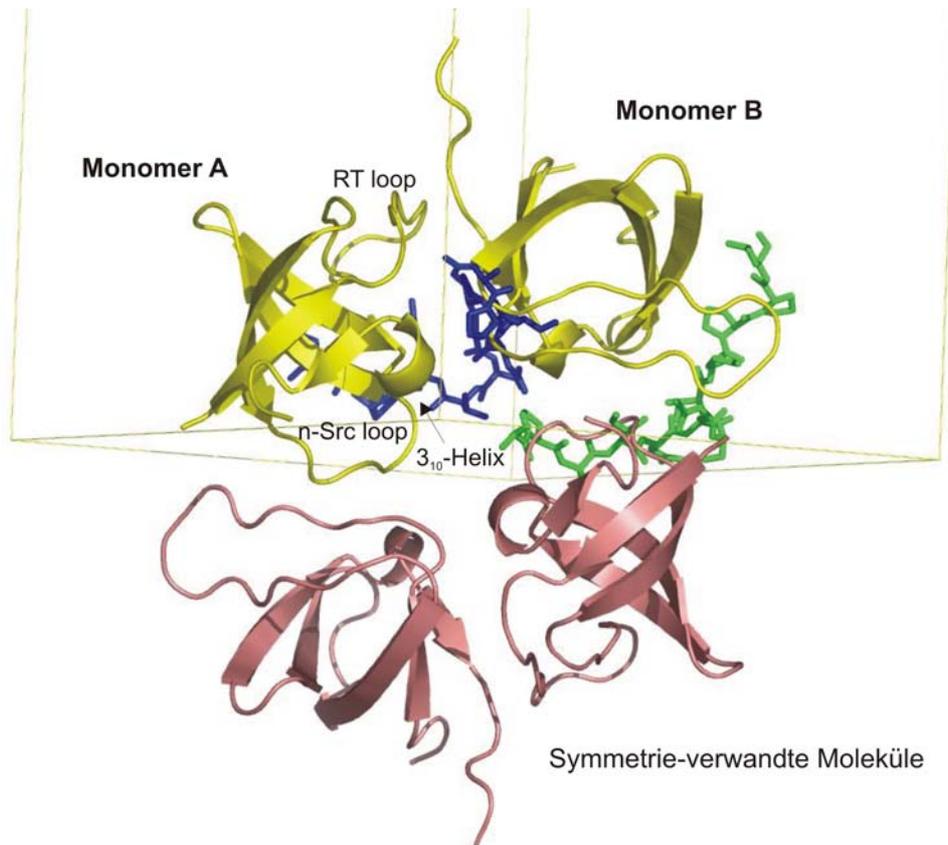


Abb. 6.10 Struktur der mGrb2[C-SH3]-Dimere in der Ribbon- und das fehlende SLP-65-Peptid 65-Pro in der Stick-Darstellung (Pymol)

Die Struktur von mGrb2[C-SH3] zeigt zwei asymmetrisch angeordnete Moleküle (Monomer A und B) in der Einheitszelle. In rosa sind zwei Symmetrie-verwandte mGrb2[C-SH3] Moleküle dargestellt. Das fehlende Peptid 65-Pro wurde an der zu erwartenden Position, die aus der Struktur der Gads[C-SH3]-Domäne im Komplex mit einem SLP-76-Peptid abgeleitet wurde, eingefügt (in blau für Monomer A und grün für Monomer B).

Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 1,3 Å bestimmt und bis zu einem R_{Crys} -Faktor von 22,0 % (R_{free} -Faktor 24,8 %) verfeinert.

In der Einheitszelle liegen zwei Grb2[C-SH3]-Moleküle in einer asymmetrischen Orientierung vor (Monomer A und B, gelb) (Abb. 6.10). Außerdem sind zwei Symmetrie-verwandte Moleküle (rosa) dargestellt. Es ist die typische β -Fass-Struktur der SH3-Domänen zu erkennen, die aus fünf β -Strängen gebildet wird. Außerdem sind der *RT loop*, der zur Orientierung des prolinreichen Motivs beiträgt, der *n-Src loop* sowie die 3_{10} -Helix zu sehen. Nach Analyse der Elektronendichte konnte das SLP-65-Peptid nicht in der Struktur lokalisiert werden. Aus der bereits bekannten Struktur der Grb2-verwandten Gads[C-SH3]-Domäne im Komplex mit dem SLP-76 Peptid (1OEB) wurde die Position

eines möglicherweise gebundenen Peptids abgeleitet. Diese wurde in Abb. 6.10 über eine Stick-Darstellung (Peptid in blau im Komplex mit Monomer A und in grün entsprechend mit Monomer B) rekonstruiert. Es ist durch diese Überlagerung leicht zu erkennen, dass die Bindestelle der Peptide durch die Dimerisierung der SH3-Domänen sterisch blockiert ist. Die gleiche Bindungsorientierung der Moleküle gilt für die Struktur der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 im Komplex mit einem Sos-Peptid (3GBQ) (Guruprasad et al., 1995). Daher wird allgemein für SH3-Domänen diese gezeigte Bindungsstelle angenommen. Es ist in diesem Zusammenhang unklar, ob die Dimerisierung der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne ein Artefakt der Kristallisation ist oder eine physiologisch relevante Bedeutung hat.

6.2.4. Interaktion zwischen SLP-65 und Grb2 in humanen Zellen

Die konstitutive Interaktion von SLP-65 und Grb2 wurde mehrfach postuliert und in dieser Arbeit bestätigt. Da das rekombinante mSLP-65 aber nicht phosphoryliert vorliegt, konnte die Interaktion mit der Grb2-SH2-Domäne nicht analysiert werden. Um diese stimulationsabhängige Bindung und die Interaktion der einzelnen Grb2-Domänen mit SLP-65 *in vivo* zu belegen, wurde mit den verschiedenen GST-mGrb2-Fusionsproteinen aus humanen B-Zell-Lysaten präzipitiert.

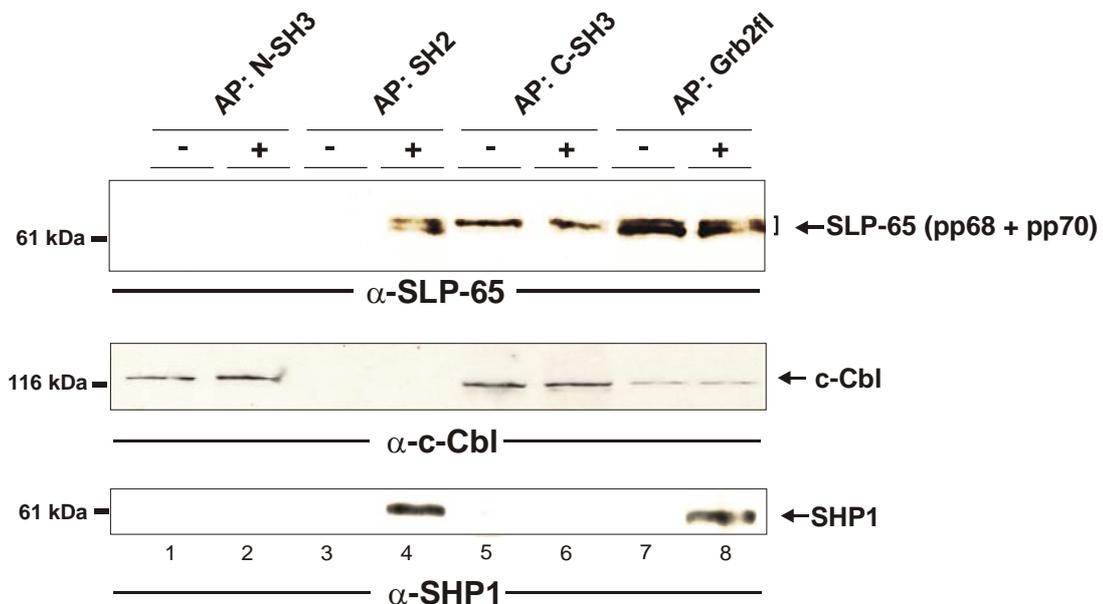


Abb. 6.11 Identifizierung der SLP-65-bindenden Domäne(n) von Grb2 (n=5)

Ramos-Zell-Lysate von je 2×10^7 unstimulierten (0') bzw. für 3 min stimulierten (3') Zellen wurden einer Affinitätspräzipitation mit GST-Grb2-Fusionsproteinen unterzogen. Dazu wurden GST-mGrb2[N-SH3] (Spur 1 und 2), GST-mGrb2[SH2] (Spur 3 und 4), GST-mGrb2[C-SH3] (Spur 5 und 6) und GST-mGrb2 (Spur 7 und 8) eingesetzt. Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE (10%-iges PAA-Gel) wurden die Proteine mittels Western Blotting analysiert. SLP-65-Antikörper (oben) wurden eingesetzt, um über die verschiedenen mGrb2-Domänen präzipitiertes SLP-65 zu identifizieren. Die Detektion von c-Cbl (mitte) und SHP1 (unten), als bekannte Bindungspartner von Grb2, dienten der Kontrolle der einzelnen GST-Grb2 Fusionsproteine.

Die Detektion von präzipitiertem c-Cbl und SHP1 dienten als Positivkontrolle für die GST-mGrb2-Fusionsproteine. c-Cbl wird von den terminalen SH3-Domänen von Grb2 gebunden und SHP1 von der zentralen SH2-Domäne (Sparks et al., 1996; Buday et al., 1996; Oehrl et al., 1998; Ganju et al., 2000). Beide SH3-Domänen sowie vollständiges Grb2 interagieren konstitutiv mit c-Cbl (Spur 1 und 2, 5-8). Die SH2-Domäne und das komplette Protein binden stimulationsabhängig SHP1 (Spur 4 und 8). In den hier verwendeten humanen B-Zell-Lysaten wurden zwei SLP-65-Proteinbanden detektiert. Nur in humanen Zellen treten zwei SLP-65-Isoformen auf. Die Analyse von präzipitiertem hSLP-65 (oberer Blot) zeigt, dass nur die C-terminale SH3-Domäne konstitutiv (Spur 5 und 6) und die SH2-Domäne von Grb2 induzierbar (Spur 4 und 8) mit SLP-65 assoziiert. Für die SH2-Domäne von Grb2 wurde als Erkennungsmotiv pYxNx (x=beliebige AS) beschrieben (Buday, 1999). Das Motiv YENP ist in allen SLP-65 Orthologen enthalten. Abb. 6.11 zeigt auch, dass nicht beide humanen Isoformen pp68 und pp70 in gleichem Ausmaß von der C-terminalen SH3-Domäne präzipitiert werden (Spur 5 und 6). Beide Isoformen werden in gleichen Mengen von Grb2 als auch der SH2-Domäne präzipitiert. Der Vergleich der AS-Sequenzen der beiden humanen Isoformen zeigt, dass der alternativen Spleißvariante (pp68) 23 AS von Position 201-225 fehlen (Abb. 6.12).

pp70	188	IHPTESSSPPEKAPMVNRSTKPNSSSTPASPPGTASGRNSGAW
pp68	188	IHPTESSSPPEK-----GRNSGAW

65-Pro		KAPMVNRSTKPN

Abb. 6.12 Ausschnitt des AS-Sequenzvergleichs der beiden humanen SLP-65-Isoformen und die Sequenz des Peptids 65-Pro

In dem AS-Abschnitt 201-225 ist die Konsensus-Sequenz PxxxRxxKP enthalten, welche in dieser Arbeit als atypische SH3-Bindestelle identifiziert wurde.

Folglich zeigt der obere Blot in Abb. 6.11 eine Zusammenfassung der bisher gezeigten Ergebnisse: 1.) Nur die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 interagiert konstitutiv mit SLP-65, 2.) die SH2-Domäne von Grb2 bindet stimulationsabhängig und 3.) das SH3-bindende Motiv von SLP-65 muss in dem AS-Bereich 201-225 von SLP-65 liegen, da nur die obere Isoform mit mGrb2[C-SH3] assoziiert. Diese Punkte wurden im Detail untersucht und die entsprechenden biochemischen Parameter über ITC-Messungen bestimmt (Kapitel 6.2.).

In dieser Studie wurde in der zentralen prolinreichen Region von SLP-65 ein atypisches SH3-Bindemotiv identifiziert. Dieses interagiert konstitutiv mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2. Auffällig ist, dass genau dieses atypische Bindemotiv nicht in der Spleißvariante von SLP-65 enthalten ist, die nur in humanen Zellen exprimiert wird.

6.3. Welche Rolle spielt das atypische SH3-Bindemotiv von SLP-65 in der Signalleitung des BCRs?

Um die funktionelle Bedeutung der atypischen SH3-Binderegion von SLP-65 *in vivo* zu analysieren, wurde das B-Zell-Modellsystem DT40 herangezogen. Die SLP-65-defiziente DT40-Zelllinie wurde in dem Labor von Prof. Kurosaki in Osaka, Japan, generiert (Ishiai et al., 1999) und sollte mit SLP-65-Varianten, die Mutationen in dem Bereich der atypischen SH3-Bindestelle trugen, rekonstituiert werden.

6.3.1. Rekonstitution SLP-65-defizienter DT40 B-Zellen mit verschiedenen chSLP-65 Mutanten

Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der atypischen SH3-Bindestelle von SLP-65 für die Signalleitung vom BCR sollte das Motiv durch verschieden AS-Austausche inaktiviert werden. Die Analyse des atypischen SH3-bindenden Motivs von SLP-76 ergab eine essenzielle Rolle für die Aminosäuren R und K in dem Motiv PxxxRxxKP, d.h. Peptide, bei denen entweder R oder K gegen A ausgetauscht waren, wurden über ITC-

Messungen auf die Bindung des Grb2-verwandten Proteins Gads hin untersucht, und es konnte keine Bindung mehr beobachtet werden (Harkiolaki et al., 2003). Daher wurden mittels PCR-Mutagenese diese beiden Aminosäurereste einzeln und in Kombination gegen Alanin ausgetauscht. Die cDNAs dieser beiden Mutanten chSLP-65R256A und R256A/K268A wurden in den Vektor pMSCV-puro kloniert. *Slp-65^{-/-}* DT40 Zellen wurden mit chSLP-65wt sowie den beiden Mutanten, die alle über ein N-terminales Flag-Epitop verfügten, retroviral transduziert. Die Puromycin-resistenten Zellen wurden über Western Blotting auf chSLP-65 Expression hin untersucht.

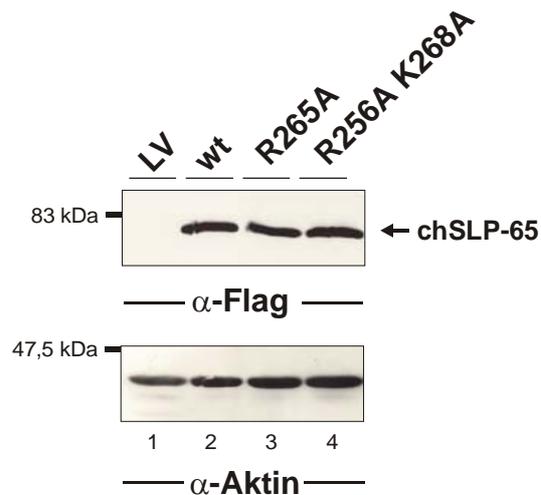


Abb. 6.13 Rekonstitution von *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen mit verschiedenen chSLP-65-Mutanten

Totallysate von je 1×10^6 unstimulierten Zellen wurden über SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert. Die *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen wurden mit dem Vektor pMSCV-puro (Spur 1), chSLP-65wt (Spur 2), chSLP-65R265A (Spur 3) und chSLP-65R256A/K268A (Spur 4) retroviral transduziert und selektioniert. Die Expression von chSLP-65 wurde mit Antikörpern gegen das N-terminale Flag-Epitop analysiert. Die Detektion von Aktin diente der Ladungskontrolle.

Die Analyse der Totallysate nach Transduktion der SLP-65-defizienten DT40-Zellen zeigt in Abb. 6.13, dass chSLP-65wt (Spur 2) sowie die beiden Mutanten (Spur 3 und 4) in gleichem Ausmaß exprimiert werden.

Bindung der chSLP-65 Punktmutanten an mGrb2[C-SH3]

Um zu überprüfen, ob die ausgetauschten AS-Reste zu einer Inaktivierung des SH3-Bindemotivs von chSLP-65 führen, wurden die chSLP-65-Mutanten R256A und R256A/K268A auf die Bindung an mGrb2[C-SH3] untersucht. Dazu wurden Affinitätspräzipitationen mit GST-mGrb2[C-SH3] durchgeführt. Murines und Hühner Grb2 sind in ihrer AS-Sequenz zu 95 % homolog, was die Untersuchung der Bindung des mGrb2 an chSLP-65 erlaubt.

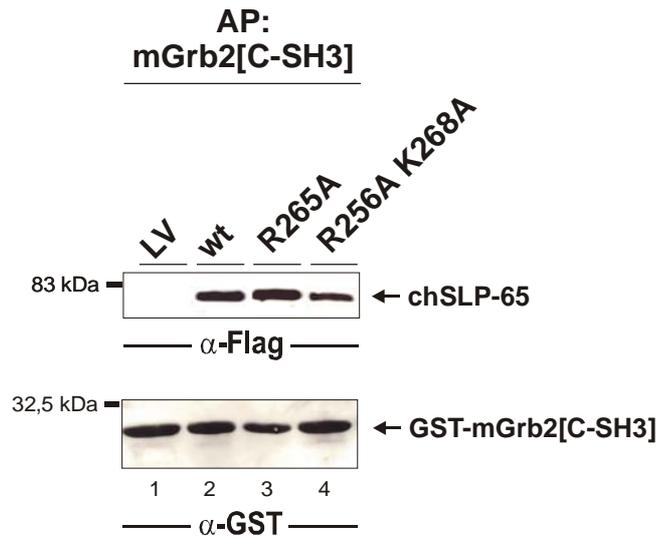


Abb. 6.14 Präzipitation der chSLP-65 Punktmutanten über mGrb2[C-SH3]

Lysate von je 2×10^7 unstimulierten Zellen, transduziert mit dem Leervektor pMSCV-puro (Spur 1), chSLP-65wt (Spur 2), chSLP-65R265A (Spur 3) sowie chSLP-65R265A/K268A (Spur 4), wurden einer Affinitätspräzipitation mit GST-mGrb2[C-SH3] unterzogen. Die gebundenen Proteine wurden über SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt und nach Western Blotting über α -Flag (oben) und α -GST (unten) detektiert.

Durch die Einführung der Punktmutation bzw. –mutationen sollte die Interaktion zu der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 unterbunden werden. Vergleicht man aber die Mengen an präzipitiertem chSLP-65 in Abb. 6.14, erkennt man, dass auch der Austausch von zwei AS die Bindung an mGrb2[C-SH3] nur leicht schwächt (Spur 4). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Daten zur Bestimmung der essenziellen AS des atypischen SH3-Bindemotivs von SLP-76. Für SLP-76-Peptide, bei denen entweder R oder K gegen A ausgetauscht waren, konnte *in vitro* keine Bindung an die SH3-Domäne mehr detektiert werden (Harkiolaki et al., 2003). Abb. 6.14 zeigt dagegen, dass der Austausch von beiden AS *in vivo* die Bindung zu der SH3-Domäne nur leicht beeinträchtigt (Spur 4). Folglich reicht der Austausch von zwei AS nicht aus, um das atypische SH3-Bindemotiv von SLP-65 *in vivo* zu inaktivieren.

6.3.2. Rekonstitution der *slp-65*^{-/-} DT40 mit einer chSLP-65-Deletionsmutante

Über PCR-Mutagenese wurde das SH3-bindende Motiv von chSLP-65 daraufhin deletiert. Dafür wurden die AS ausgewählt, die in den SLP-65-Orthologen aus Huhn, Maus und Mensch konserviert sind (AS 261-269). Da das Expressionslevel von chSLP-65 nach retroviraler Transduktion der Zellen zuvor sehr niedrig war und nur etwa 10 % der Expres-

sion von chSLP-65 in DT40wt Zellen entsprach, wurde für diese Rekonstitutionen ein Vektor mit einem Hühner β -Aktin Promotor verwendet. Nach Klonierung in den Vektor pApuro II und Transfektion der *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen wurden Puromycin-resistente Klone auf Expression von chSLP-65wt und Δ 261-269 mittels Western Blotting untersucht.

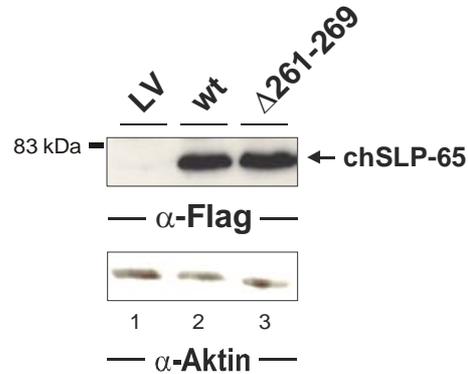


Abb. 6.15 Rekonstitution der *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen mit chSLP-65wt bzw. Δ 261-269

Totallysate von je 1×10^6 unstimulierten *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen, rekonstituiert mit chSLP-65wt (Spur 2; Klon I D4) oder chSLP-65 Δ 261-269 (Spur 3; Klon I C4) bzw. mit pApuro II transfiziert (Spur 1), wurden durch SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt und über Western Blotting analysiert. Die Expression von chSLP-65 wurde über Antikörper gegen das N-terminale Flag-Epitop untersucht. Die Detektion von Aktin diente der Ladungskontrolle.

Für weitere Experimente wurden folgende Klone ausgesucht, die gleiche Mengen an chSLP-65 exprimieren.

Zelllinie	Verwendete Klone
DT40 <i>slp-65^{-/-}</i> chSLP-65wt FlagN	I D4; I C1; II C2
DT40 <i>slp-65^{-/-}</i> chSLP-65 Δ 261-269 FlagN	I C4; II B6; I B2

Tab. 6.4 Verwendete DT40 *slp-65^{-/-}* chSLP-65wt bzw. Δ 261-269 Klone

6.3.3. Kontrolle der Grb2[C-SH3]-Bindekcapazität der chSLP-65-Deletionsmutante Δ 261-269

Um zu überprüfen, ob die Deletionsmutante chSLP-65 Δ 261-269 die Fähigkeit verloren hat, konstitutiv an Grb2 zu binden, wurden erneut Affinitätspräzipitationen mit GST-mGrb2[C-SH3] durchgeführt.

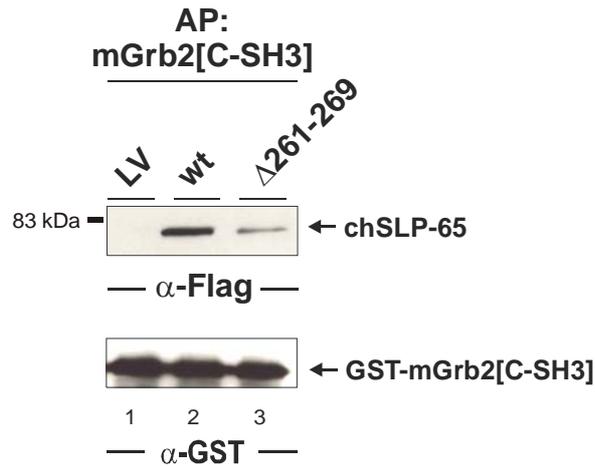


Abb. 6.16 Präzipitation von chSLP-65 über mGrb2[C-SH3]

Lysate von 2×10^7 unstimulierten *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen, rekonstituiert mit chSLP-65wt (Spur 2) sowie der Deletionsmutante chSLP-65 Δ 261-269 (Spur 3) als auch mit pApuro II transfizierte Zellen (Spur 1) wurden einer Affinitätspräzipitation mit GST-mGrb2[C-SH3] unterzogen. Es werden repräsentative Ergebnisse der Klone I D4 (chSLP-65wt) und I C4 (Δ 261-269) gezeigt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt und über Western Blotting mit α -Flag (oben) und α -GST (unten) analysiert.

Auch die Deletionsmutante Δ 261-269 konnte von mGrb2[C-SH3] präzipitiert werden (Abb.6.16, Spur 3). Es ist zwar eine Reduzierung der Bindekapazität im Gegensatz zu chSLP-65wt (Spur 2) zu sehen, aber es ist immer noch eine schwache Wechselwirkung vorhanden. Diese kann nicht auf eine Interaktion mit GST zurückgeführt werden, da vor jeder Affinitätspräzipitation mit GST-Fusionsproteinen über GST vorpräzipitiert wurde. Es muss sich um ein Hintergrund-Signal oder eine indirekte Bindung handeln, da eine weitere Bindestelle für die konstitutive SLP-65/Grb2 Interaktion durch ITC-Messungen (s. Kapitel 6.2.) ausgeschlossen wurde.

6.3.4. Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die BCR-Signalleitung

Die induzierbaren, temporären Interaktionen von Proteinen, wie sie für die Weiterleitung eines Signals notwendig sind, werden zum Hauptteil durch Phosphorylierung von Tyrosin-Resten und die Bindung von Proteinen mit SH2-Domänen vermittelt. Diese Bindung ist nur so lange stabil, bis das Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen wieder verschoben wird und die Tyrosin-Reste wieder dephosphoryliert werden. Daher sollte der Zeitverlauf der BCR-vermittelten Phosphorylierung analysiert werden. Um den Einfluss der chSLP65-Deletionsmutanten auf den Phosphorylierungsstatus der Zellen nach BCR-Quervernetzung zu untersuchen, wurde ein Zeitverlauf der Stimulation aufgenommen. Die Totallysate der chSLP-65-defizienten und der mit chSLP-65wt bzw. chSLP-65 Δ 261-269

rekonstituierten Zellen wurden nach Auftrennung über SDS-PAGE mittels Western Blotting auf ihr Phosphorylierungsmuster durch die Detektion mit α -pTyr analysiert.

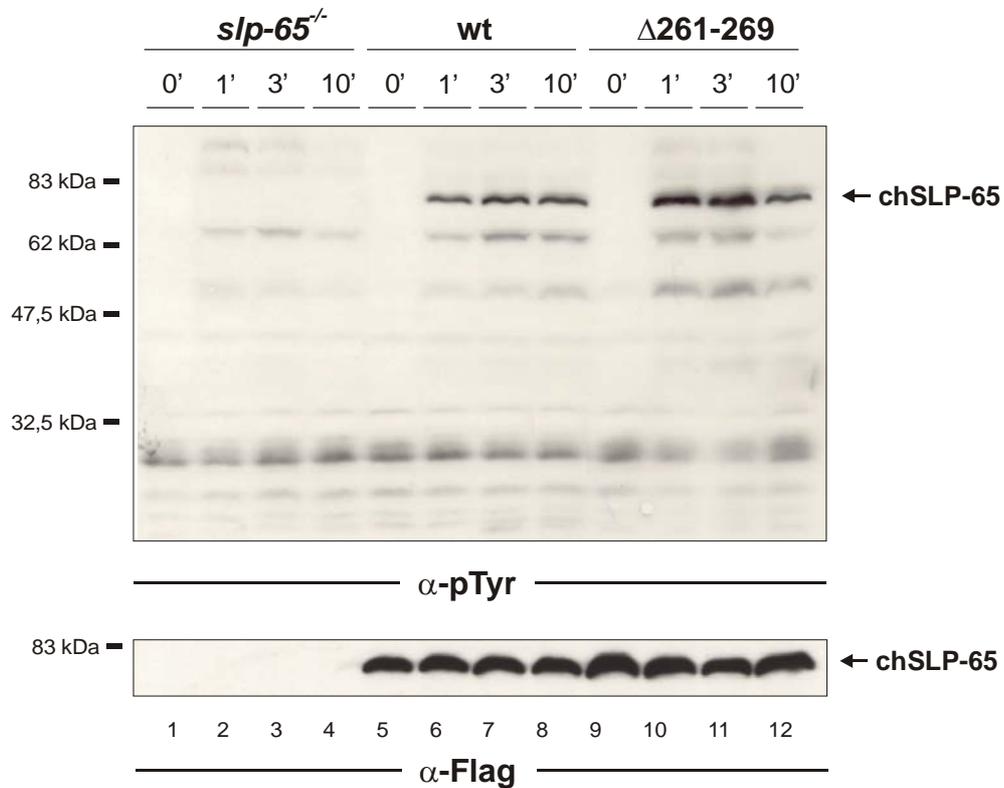


Abb. 6.17 Tyrosin-Phosphorylierungsmuster der rekonstituierten *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen mit chSLP-65wt bzw. Δ 261-269

Unstimulierte (0') und stimulierte (1', 3', 10') DT40 *slp65^{-/-}* Zellen, und solche die mit chSLP-65wt (*wt*; Klon II C2) und der Deletionsmutante chSLP-65 Δ 261-269 (Δ 261-269; Klon I B2) rekonstituiert wurden, wurden in RIPA Puffer lysiert und durch SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt. Pro Spur wurden 90 μ g Gesamtproteinmenge aufgetragen. Mittels Western Blotting wurde das Phosphorylierungsmuster (oben) und die Expression von chSLP-65 (unten) analysiert.

Bei den chSLP-65-defizienten DT40-Zellen ist nur eine schwache Änderung des Phosphorylierungsmusters nach BCR-Stimulation zu erkennen, wie auch schon publiziert wurde (Ishiai et al., 1999). Ein deutlicher Unterschied ist zu verzeichnen, wenn die Zellen wieder mit chSLP-65wt rekonstituiert werden (Spur 5-8). Zwischen denen mit chSLP-65wt und der Deletionsmutante (Spur 9-12) rekonstituierten Zellen ist nur ein geringer Unterschied im Phosphorylierungsmuster zu erkennen. Die Deletionsmutante übt demnach

kaum einen Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierungskaskade aus. Dies ist zusätzlich ein wichtiger Hinweis auf die korrekte Faltung bzw. Funktionalität der Deletionsmutante.

6.3.5. Einfluss der verschiedenen chSLP-65-Mutanten auf das BCR-induzierte Ca^{2+} -Signal

Da SLP-65 den Kern des Calcium-Initiationskomplexes bildet (Kurosaki und Tsukada, 2000), sollte die Auswirkung der Deletion in der SH3-bindenden Region von SLP65 auf die BCR-initiierte Ca^{2+} -Freisetzung untersucht werden. Die Messung von intrazellulärem Ca^{2+} erfolgte im Durchflusszytometer über den calciumionensensitiven Fluorophor Fluo-3. Nach Stimulation der Zellen über den BCR steigt die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration an, die über die Fluoreszenz des Farbstoffs detektiert wird.

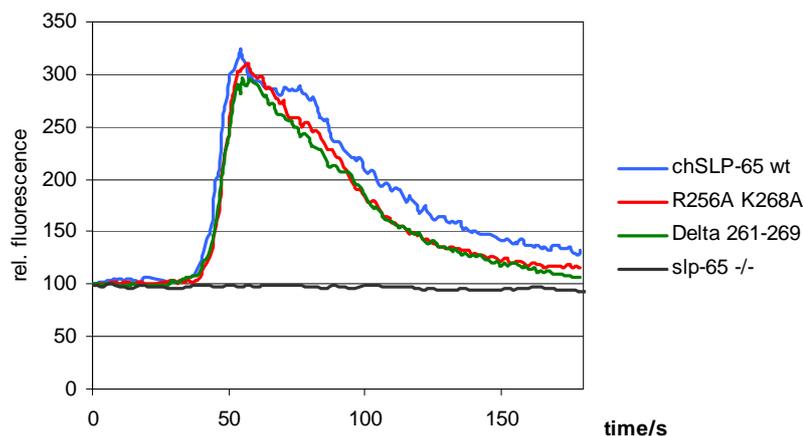


Abb. 6.18 Ca^{2+} -Einstrom aus intrazellulären Speichern vermittelt durch chSLP-65wt bzw. $\Delta 261-269$

SLP-65-defiziente Zellen sowie die, die mit chSLP-65wt bzw. R256A/K268A oder $\Delta 261-269$ rekonstituiert wurden, wurden einer Ca^{2+} -Messung unterzogen. Dazu wurden sie nach Aufnahme des Basissignals mit Maus-anti-Huhn IgM (M4; 10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert.

Abb. 6.18 zeigt, dass keine signifikante Änderung des Ca^{2+} -Signals in den Zellen, die chSLP-65 $\Delta 261-269$ im Vergleich zu denen, die chSLP-65wt exprimieren, festgestellt werden kann. Allgemein wurde beobachtet, dass die Ca^{2+} -Signale von Klonen aus einer Transfektion sehr heterogen waren und nicht mit einem unterschiedlichen Expressionslevel korrelierten. Daher wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die atypische SH3-Bindestelle keinen Einfluss auf die Amplitude oder Dauer der BCR-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ausübt.

6.3.6. Ist SLP-65 beteiligt an der Grb2-vermittelten Regulation des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms?

Die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration wird nicht nur durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER erhöht, sondern zusätzlich strömt induzierbar extrazelluläres Ca^{2+} durch die Plasmamembran in die Zelle (zur Übersicht: Berridge, 1997; Berridge et al., 2000). Da kürzlich Grb2 als negativer Regulator der Ca^{2+} -Mobilisierung in B-Zellen identifiziert wurde, sollte der Einfluss der Deletionsmutanten von SLP-65, deren konstitutive Bindung an Grb2 inhibiert ist, auf den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} untersucht werden. Die Rolle von Grb2 als negativer Regulator resultiert darin, dass in *grb2*^{-/-} DT40-Zellen ein Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} zu beobachten ist, im Gegensatz zu DT40wt Zellen, die kein extrazelluläres Ca^{2+} mobilisieren. Für diese regulatorische Funktion von Grb2 sind die C-terminale SH3- und die zentrale SH2-Domäne von essenzieller Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass Grb2 um die Bindung zu NTAL mit einem noch nicht identifizierten Inhibitor des Ca^{2+} -Einstroms konkurriert. Die induzierbare Bindung über die SH2-Domäne von Grb2 an phosphoryliertes NTAL rekrutiert den Komplex in die *lipid rafts*, wodurch eine Bindung an den Inhibitor unterbunden wird (Stork et al., 2004).

Eine Unterscheidung der Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem extrazellulären Raum und intrazellulären Speichern gelingt mit einer so genannten *add back*-Messung (s. Kap. 5.2.13). Dabei werden die Zellen zunächst in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} stimuliert. Wenn das Basisniveau wieder erreicht ist, d.h. die intrazellulären Speicher leer sind, wird durch Zugabe von Ca^{2+} der Einstrom aus dem extrazellulären Raum ermöglicht.

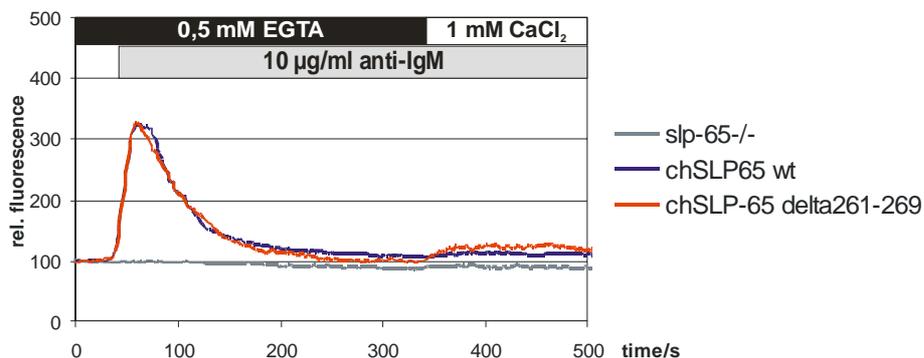


Abb. 6.19 *Add back*-Messung rekonstituierter *slp-65*^{-/-} DT40 Zellen

Es wurden SLP-65-defiziente Zellen und solche, die mit chSLP-65wt bzw. $\Delta 261-269$ rekonstituiert wurden für *add back*-Messungen eingesetzt. Die Zellen wurden in Anwesenheit von EGTA mit Maus-anti-Huhn IgM (M4; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und nach 360 sec wurde 0,1 mM Ca^{2+} zugesetzt.

Der Einstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, d.h. bis zur Zugabe von CaCl_2 , vermittelt durch die Deletionsmutante im Vergleich chSLP-65wt, unterscheidet sich nicht signifikant. Nach der Zugabe von Ca^{2+} ist ein kleiner Anstieg des Ca^{2+} -Signals bei den Zellen, die die Deletionsmutante $\Delta 261-269$ exprimieren, zu erkennen, der auf Messschwankungen zurückzuführen ist. Die Funktion von Grb2 als negativer Regulator des Ca^{2+} -Signals scheint somit nicht von einer konstitutiven Interaktion mit SLP-65 abhängig zu sein.

6.3.7. Aktivierung der MAPK-Signalwege durch die chSLP-65 Deletionsmutante

Weitere Signalmoleküle, die nach BCR Stimulation aktiviert werden, sind die drei *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) Erk, JNK und p38. Die MAPK-Kaskade wird durch Phosphorylierung und/oder durch die Interaktion mit kleinen G-Proteinen der Ras/Rho-Familie aktiviert (Roux und Blenis, 2004). Die genauen Mechanismen für die Aktivierung der MAPK-Signalwege sind insbesondere für B- und T-Zellen noch wenig untersucht. SLP-65-defiziente DT40-Zellen zeigen erhebliche Defekte bei der Aktivierung von Erk, JNK und p38 nach Stimulation über den BCR. Die MAPK-Effektorfunktion von SLP-65 wurde bislang nur auf die Tyrosin-Phosphorylierungsmotive zurückgeführt (Chiu et al., 2002).

Erk-Aktivierung

Neben der reduzierten Erk-Aktivierung in SLP-65-defizienten Zellen ist außerdem bekannt, dass Grb2 auch eine Rolle bei der Aktivierung dieser MAPK spielt (Chiu et al., 2002). Grb2-defiziente Zellen zeigen eine verminderte Erk-Aktivierung nach BCR-Quervernetzung (Hashimoto et al., 1998). Für die Untersuchung der MAPK Erk, JNK und p38 wurden Antikörper verwendet, die spezifisch die phosphorylierten Tyr- und Thr-Reste dieser Kinasen erkennen. Es wurde jeweils ein Zeitverlauf der Stimulation von DT40 *slp-65^{-/-}* Zellen, die entweder chSLP-65wt (Abb. 6.20 Spur 5-8) bzw. $\Delta 261-269$ (Spur 9-12) exprimieren, aufgenommen. Als Kontrolle dienten vektortransfizierte Zellen (Spur 1-4).

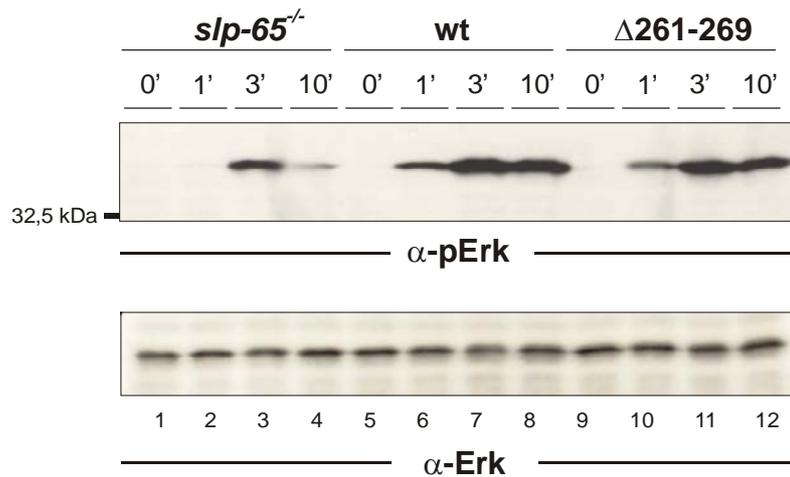


Abb. 6.20 Einfluss der SLP-65-Deletionsmutante auf die Erk-Aktivierung

Unstimulierte (0') und stimulierte (1', 3', 10') DT40 *slp65*^{-/-} Zellen und die, die mit chSLP-65wt (Spur 5-8; Klon II C2) sowie der Deletionsmutante chSLP-65 Δ 261-269 (Spur 9-12; Klon I B2) rekonstituiert wurden, wurden in RIPA-Puffer lysiert und durch SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt. Pro Spur wurden 90 μ g Gesamtproteinmenge aufgetragen. Durch Western Blotting wurde die stimulationsabhängige Phosphorylierung von Erk (oben) analysiert. Die Detektion von Erk diente der Ladungskontrolle (unten). Es wurden von jeder Transfektion zwei Klone untersucht (wt Klon I C1; Δ 261-269 Klon I C4).

Es ist deutlich zu sehen, dass die Verminderung der Erk-Aktivierung der SLP-65-defizienten Zellen (Spur 1-4) wieder aufgehoben wird, wenn sie mit chSLP-65wt rekonstituiert werden (Spur 5-8). Weiterhin ist kaum ein Unterschied in der Phosphorylierung von Erk bei den Δ 261-269 Klonen (Spur 9-12) im Vergleich zu den chSLP-65wt exprimierenden Klonen zu erkennen. Damit ist ein Einfluss der atypischen SH3-Bindestelle auf die Erk-Aktivierung unwahrscheinlich.

JNK-Aktivierung

Die BCR-initiierte JNK-Aktivierung ist in SLP-65-defizienten Zellen defekt (Chiu et al., 2002). Um zu überprüfen, ob die Deletionsmutante einen Einfluss auf die JNK-Aktivierung ausübt, wurden für die SLP-65-defizienten Zellen und die, die mit chSLP-65wt bzw. Δ 261-269 rekonstituiert wurden, ein Zeitverlauf der Stimulation über den BCR aufgenommen. Die Totallysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Phosphorylierung von JNK durch Western Blotting und α -pJNK detektiert.

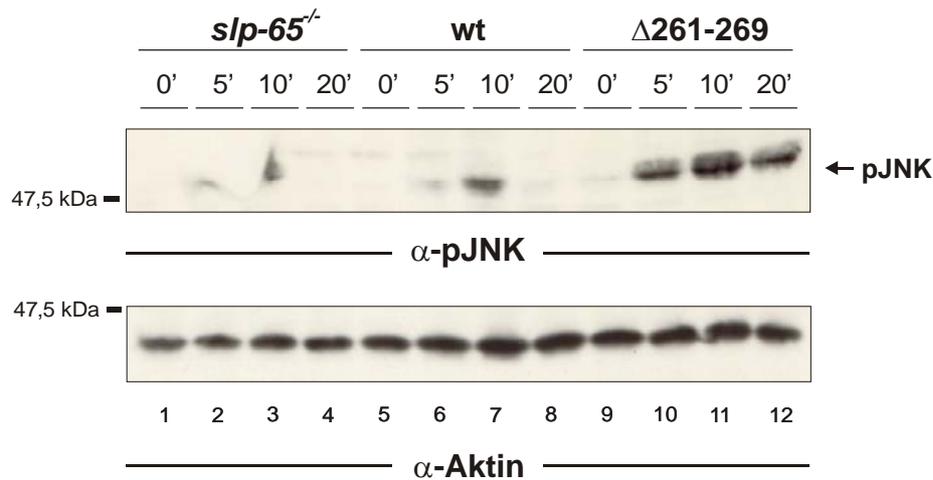


Abb. 6.21 Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die JNK-Aktivierung

Für die Untersuchung der JNK-Aktivierung wurden chSLP-65wt (Spur 5-8; Klon I D4) sowie chSLP-65 Δ 261-269 (Spur 9-12; Klon II B6) exprimierende DT40 *slp-65^{-/-}* Zellen mit Maus-anti-Huhn IgM (M4; 10 μ g/ml) stimuliert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Als Kontrolle dienten vektortransfizierte Zellen (Spur 1-4). Die Totallysate wurden mittels SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt und über Western Blotting analysiert. Pro Spur wurden 100 μ g Gesamt-Proteinmenge aufgetragen. Die Analyse der JNK-Aktivierung wurde über phospho-JNK-spezifische Antikörper untersucht. Parallel wurden die selben Proben auf Expression von Aktin untersucht. Dieses Ergebnis wurde mit dem chSLP-65wt exprimierenden Klon I C1 bzw. dem Δ 261-269 Klon I C4 verifiziert.

Abb. 6.21 zeigt den Einfluss der Deletionsmutante auf die JNK-Aktivierung. Zellen, die mit der Deletionsmutante rekonstituiert wurden, weisen eine schnellere und stärkere Phosphorylierung von JNK nach Stimulation über den BCR auf (Spur 9-12), als die Zellen, die chSLP-65wt exprimieren (Spur 5-8). Folglich hat die Deletionsmutante einen aktivierenden Einfluss auf die Aktivierung von JNK. Also übt das atypische SH3-Bindemotiv von SLP-65 eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung der MAPK JNK aus.

p38-Aktivierung

Auch die Aktivierung der MAPK p38 ist in SLP-65-defizienten Zellen völlig defekt (Chiu et al., 2002). Für die Analyse der p38-Aktivierung nach BCR-Quervernetzung, vermittelt durch die Deletionsmutante im Vergleich zu wildtypischen und SLP-65-defizienten Zellen, wurde ein Zeitverlauf der Stimulation analog zur Analyse der JNK-Aktivierung aufgenommen.

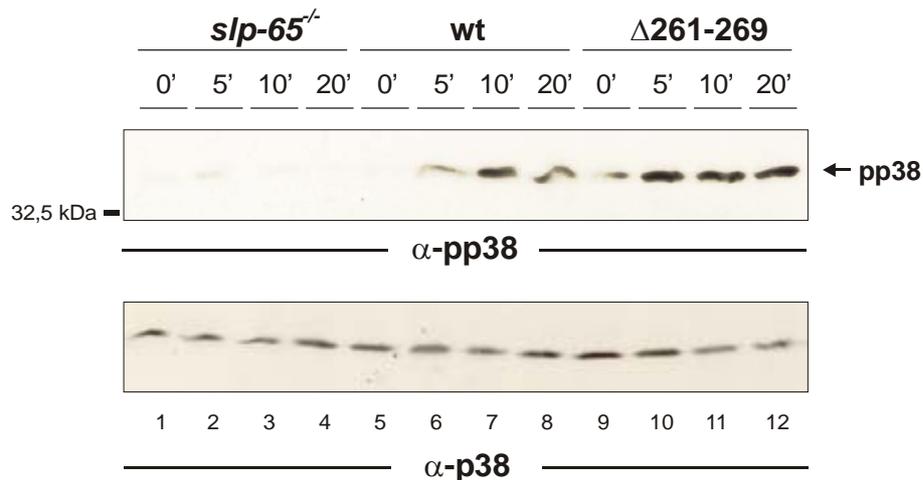


Abb. 6.22 Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die p38-Aktivierung

Totallysate von stimulierten, vektortransfizierten DT40 *slp65^{-/-}* Zellen (Spur 1-4) und den Klonen chSLP-65wt I C1 (Spur 5-8) und der chSLP-65-Deletionsmutante I B2 (Spur 9-12) wurden in RIPA-Puffer lysiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose wurde die Phosphorylierung (oben) und die Expression von p38 (unten) detektiert. Dieses Experiment wurde mit den Klonen chSLP-65wt I D4 und $\Delta 261-269$ II B6 wiederholt und die Daten bestätigt.

Die Expression von SLP-65 wurde als essenziell für die Aktivierung von p38 und JNK beschrieben (Chiu et al., 2002). Abb. 6.21 und 6.22 bestätigen diese Ergebnisse; in SLP-65-defizienten Zellen werden p38 und JNK nicht aktiviert. Die Blockierung dieser Signalwege wird durch die Expression von chSLP-65wt (Spur 5-8) wieder aufgehoben. Im Gegensatz dazu findet in den Zellen, die die Deletionsmutante exprimieren, eine verstärkte Phosphorylierung bzw. Aktivierung von p38 statt (Spur 9-12).

Das PxxxRxxKP SH3-Bindemotiv von SLP-65 übt demnach eine negative, regulatorische Funktion auf die Aktivierung von p38 sowie JNK aus. Damit konnte neben den Phosphorylierungsmotiven von SLP-65 (Chiu et al., 2002) in dieser Studie zusätzlich die atypische SH3-Bindestelle als regulatorischer Bestandteil von SLP-65 für die Aktivierung der MAPK JNK und p38 identifiziert werden.

6.3.8. Hat $\Delta 261-269$ Einfluss auf die BCR-induzierte c-Fos Expression?

Ein Substrat von JNK ist die Transkriptionsfaktorfamilie Jun. Jun bildet zusammen mit c-Fos den heterodimeren Transkriptionsaktivator AP-1. Die Expression von c-Fos wird wiederum von dem Transkriptionsfaktor Elk-1 reguliert. Elk-1 ist ein Substrat der MAPK p38. Um zu überprüfen, ob die verstärkte Aktivierung der MAPK p38, vermittelt durch die Deletionsmutante (s. Kap. 6.3.7), auch zu einer verstärkten c-Fos-Expression führt, sollte die

stimulationsabhängige Expression des Transkriptionsfaktors untersucht werden. Dazu wurden SLP-65-defiziente Zellen und die, die chSLP-65wt bzw. $\Delta 261-269$ exprimieren für eine Stunde über den BCR stimuliert und die Totallysate nach SDS-PAGE durch Western Blotting auf die Expression von c-Fos analysiert.

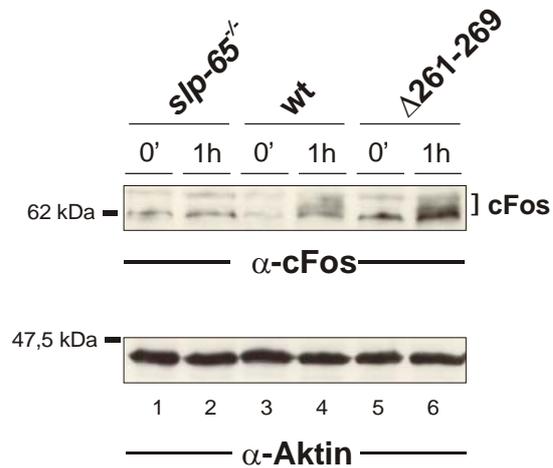


Abb. 6.23 Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die BCR-vermittelte Expression von c-Fos

Totallysate von 1×10^6 stimulierten (1 h) und unstimulierten (0') Zellen wurden mittels SDS-PAGE (10 %-iges PAA-Gel) aufgetrennt und über Western Blotting analysiert. Es werden die Klone chSLP-65wt I D4 (Spur 3 und 4) und chSLP-65 $\Delta 261-269$ II B6 (Spur 5 und 6) gezeigt. Als Negativkontrolle wurden vektortransfizierte Zellen (Spur 1 und 2) verwendet. Die Detektion von Aktin diente der Ladungskontrolle.

Nach einstündiger Stimulation zeigen die $\Delta 261-269$ Klone eine stärkere Induktion der c-Fos-Expression (Spur 6) als die mit chSLP-65wt rekonstituierten Zellen (Spur 4). Erwartungsgemäß ist in SLP-65-defizienten Zellen keine Induktion der c-Fos-Expression zu sehen (Spur 2). Demnach resultiert die Verstärkung der p38-Aktivierung, vermittelt durch die Deletionsmutante im Vergleich zu wildtypischen Zellen, über die Aktivierung von Elk-1 in einem Anstieg der c-Fos-Expression.

6.3.9. Einfluss von $\Delta 261-269$ auf die NFAT/AP-1-Aktivierung

In Kapitel 6.3.7. und 6.3.8. wurden eine regulatorische Funktion des atypischen SH3-Bindemotivs auf die BCR-initiierte Aktivierung der MAPK JNK und p38 sowie die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos nachgewiesen. Jun, das Substrat von JNK, und c-Fos bilden zusammen den Transkriptionsaktivator AP-1. Dieser dimerisiert mit Proteinen der NFAT-Familie und führt zur Bildung des ternären Komplexes NFAT/AP-1, der die Ex-

pression vieler Gene im Zuge der Immunantwort reguliert (Macian et al., 2001). Um den Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutanten auf die NFAT/AP-1-Aktivierung zu untersuchen, wurde ein Reportergenassay eingesetzt.

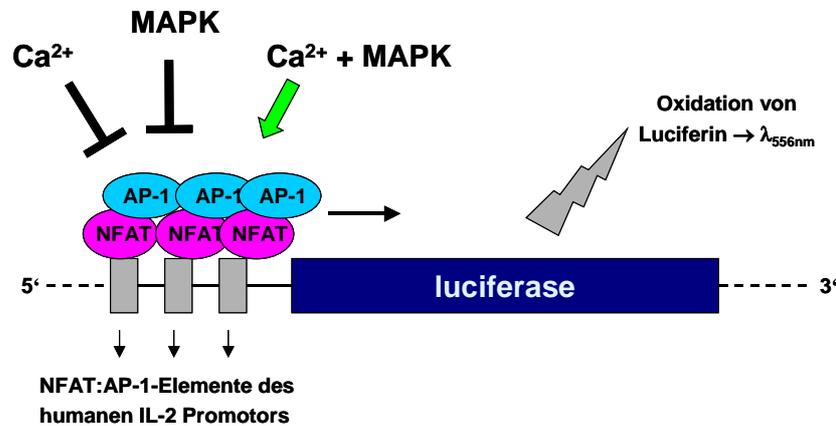


Abb. 6.24 Luciferase-basiertes Reporterkonstrukt pNFAT-luc

Das Plasmid pNFAT-luc enthält ein Luciferase-basiertes Reporterkonstrukt. Das Enzym steht unter der Kontrolle von drei distalen NFAT:AP-1-Elementen. Nur die Aktivierung der MAPK-Signalwege in Kombination mit einem Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NFAT/AP-1, der dann die Transkription der Luciferase initiiert. Die Luciferase oxidiert das artifizielle Substrat D-Luciferin zu D-oxy-Luciferin. Das führt zu einer Lichtemission, die vom Luminometer detektiert wird.

Das Luciferase-basierte Reporterkonstrukt pNFAT-luc, schematisch dargestellt in Abb. 6.24, ermöglicht die Analyse der Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NFAT/AP-1. Nur die Aktivierung der MAPK-Kaskade in Kombination mit der Freisetzung von Ca^{2+} resultiert in einer Transkription der Luciferase, deren Aktivität über die Umsetzung des Substrats Luciferin bestimmt wird. Die zu untersuchenden Zellen werden zusätzlich mit einem β -Galaktosidase-Expressionsvektor cotransfiziert, um auf die Transfektionseffizienz normieren zu können.

Für den Reportergenassay wurden SLP-65-defiziente DT40-Zellen sowie chSLP-65wt- und $\Delta 261-269$ -exprimierende Zellen mit dem Reporterkonstrukt und dem β -Galaktosidase-Expressionsvektor cotransfiziert. Die Zellen wurden für sechs Stunden über den BCR stimuliert, lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (s. Kap. 5.4.1.).

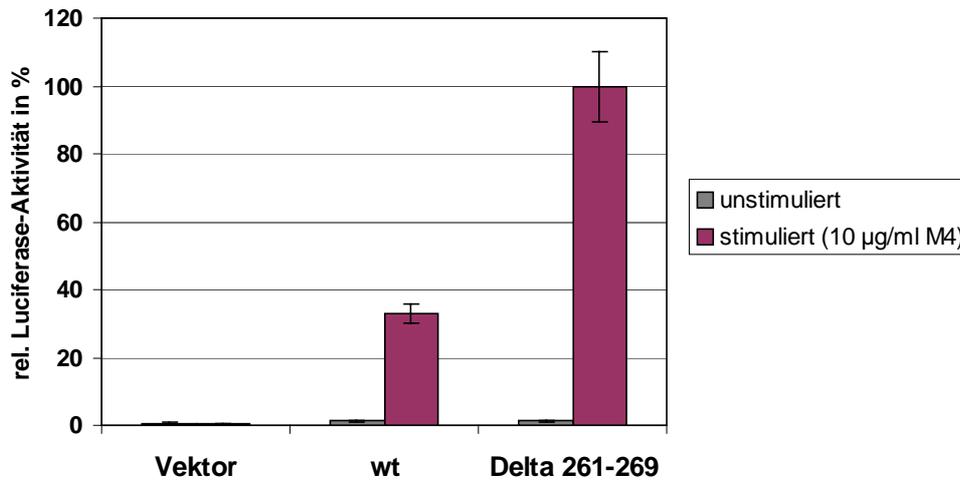


Abb. 6.25 Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die NFAT/AP-1-Aktivierung

Je 1×10^7 chSLP-65wt- bzw. $\Delta 261-269$ -exprimierende *slp-65*^{-/-} DT40 Zellen wurden mit pNFAT-luc und pCMV- β transient cotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden je 2×10^6 Zellen für 6 h mit Maus-anti-Huhn IgM (M4; 10 µg/ml) stimuliert, lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Über die Cotransfektion mit pCMV- β wurde die Transfektionseffizienz ermittelt. Pro Konstrukt wurden 3 Klone jeweils zweimal transfiziert. Für die Auswertung wurden zunächst die Luciferase-Werte anhand der β -Galaktosidase-Werte normiert und dann die max. Luciferase-Aktivität auf 100 % gesetzt.

Abb. 6.25 zeigt, dass SLP-65-defiziente Zellen vor und nach Stimulation nicht in der Lage sind NFAT/AP-1 zu aktivieren. Das kann auf die Defekte in der Aktivierung der MAPK-Signalwege und der Ca^{2+} -Freisetzung zurückgeführt werden (Chiu et al., 2002). Werden die Zellen mit chSLP-65wt rekonstituiert, ist wieder eine stimulationsabhängige NFAT/AP-1-Aktivierung zu messen. Demgegenüber zeigen die $\Delta 261-269$ Klone eine, verglichen mit wildtypischen Zellen, dreifach verstärkte Luciferase- bzw. NFAT/AP-1-Aktivierung. Dieses Ergebnis wurde für je drei Klone durch jeweils zwei unabhängige Transfektionen reproduziert. Damit kann der atypischen SH3-Bindungsstelle eindeutig eine inhibierende Funktion für die Aktivierung von NFAT/AP-1 zugeordnet werden.

Um zu überprüfen, ob diese inhibierende Funktion über die konstitutive Bindung an Grb2 vermittelt wird, wurde der Reporterassay mit Grb2-defizienten Zellen, die entweder mit chGrb2wt (wt) oder mit einer chGrb2-Mutante (W193K), deren C-SH3-Domäne inaktiviert wurde, durchgeführt. Sollte für den beobachteten inhibitorischen Effekt von SLP-65 auf die NFAT/AP-1-Aktivierung die Bindung an die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 erfor-

derlich sein, würde man erwarten, dass Zellen mit inaktiver Grb2[C-SH3] (W193K) auch eine verstärkte NFAT/AP-1-Aktivierung aufweisen.

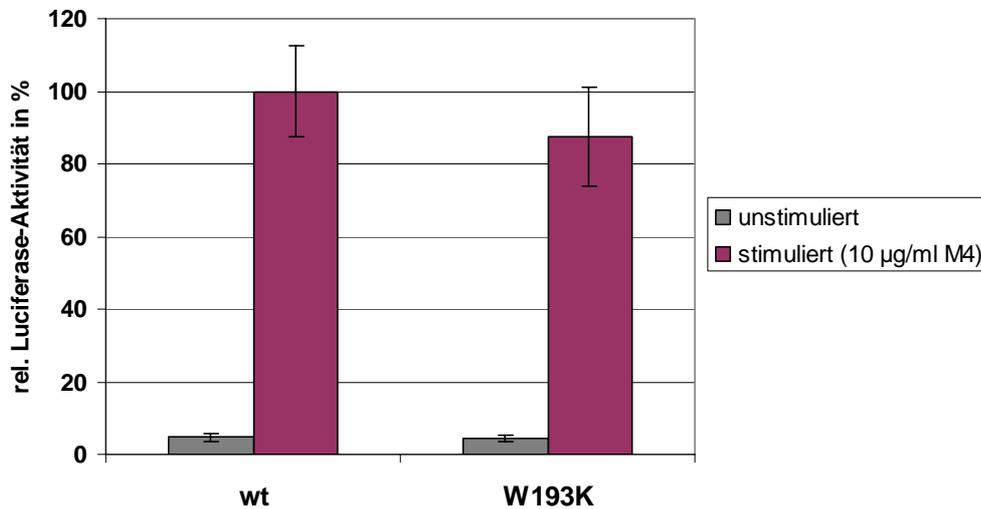


Abb. 6.26 Einfluss der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne auf die NFAT/AP-1-Aktivierung

Es wurden je 1×10^7 *grb2*^{-/-} DT40 Zellen mit chGrb2wt (wt) oder chGrb2W193K (W193K) retroviral transduziert und transient mit dem Reporterplasmid pNFAT-luc und pCMV- β cotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden je 2×10^6 Zellen für 6 h mit 10 µg/ml Maus-anti-Huhn IgM (M4) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die Luciferase-Aktivität über eine zweifache Messung bestimmt. Die Transfektion wurde zweimal durchgeführt.

Die Auswertung des Reporterassays zur NFAT/AP-1-Aktivierung, vermittelt durch die Grb2-Mutante W193K im Vergleich zu Grb2wt (Abb. 6.26), zeigt, dass die Luciferase-Aktivität sich geringfügig unterscheidet, aber beide Zellpopulationen fast im gleichen Ausmaß NFAT/AP1 nach BCR-Quervernetzung aktivieren. Die Vermutung, dass die inhibitorische Wirkung von chSLP-65 auf die NFAT/AP-1-Aktivierung die Bindung an die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 erfordert, konnte nicht bestätigt werden. Somit besitzt die SH3-bindende Domäne von SLP-65 neben der Fähigkeit konstitutiv mit Grb2 zu interagieren zusätzlich eine regulatorische Funktion bei der NFAT/AP-1-Aktivierung.

Erstmals konnte in dieser Studie ein Ca²⁺-unabhängiger Signalweg für die Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NFAT/AP-1 allein über die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde für das atypische SH3-bindende Motiv von SLP-65 ein negativer regulatorischer Einfluss auf die NFAT/AP-1-Aktivierung gezeigt, der durch die Expressionsanalyse der AP-1 Komponente c-Fos belegt wurde.

6.4. Die Bedeutung der SH2-Domäne von SLP-65 für die Signalleitung vom BCR

SLP-65 besitzt neben der prolinreichen Region eine C-terminale SH2-Domäne, deren Funktion noch unbekannt ist. Die Bedeutung der SH2-Domäne für die Signalleitung vom BCR herauszuarbeiten, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Diese wurde zuerst von Kai Dittmann während seiner Diplomarbeit untersucht. Die SH2-Domäne wurde durch eine Punktmutation (R468L) inaktiviert und SLP-65-defiziente DT40-Zellen mit dem Konstrukt transfiziert. Eine Auswirkung auf das BCR-vermittelte Ca^{2+} -Signal war nicht festzustellen, obwohl die Bindung zu Ig- α *in vitro* inhibiert war (Kai Dittmann, Diplomarbeit). Die Mutation des Arg-Restes fand eine breite Anwendung, um SH2-Domänen im Allgemeinen zu inaktivieren. Neuere Untersuchungen von SH2-Domänen zeigen allerdings, dass der Austausch von Arginin gegen Alanin häufig nicht ausreichend ist, um diese zu inaktivieren (Wossning und Reth, 2004). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob durch weitere Punktmutationen oder durch die Deletion der SH2-Domäne von SLP-65 eine Auswirkung auf die Signalleitung vom BCR nachgewiesen werden kann.

6.4.1. Inaktivierung der SLP-65-SH2-Domäne durch eine Trippel-Mutation bzw. Deletion

Für die vollständige Inaktivierung der chSLP-65-SH2-Domäne wurde das Motiv FLIRKS (AS 465-470) in FLIGAL mittels PCR auf DNA-Ebene, analog der Mutation der Syk[C-SH2] Domäne (Kurosaki et al., 1995), mutiert. Außerdem wurde durch eine weitere PCR die SH2-Domäne in einem zweiten Konstrukt deletiert. Diese beiden Mutanten chSLP-65 GAL und chSLP-65 Δ SH2 sowie chSLP-65wt wurden über das Gateway-System (Kap. 5.1.10.) in den Vektor pMSCV-puro kloniert und DT40 *slp-65*^{-/-} Zellen retroviral transduziert. Die Puromycin-resistenten Zellen wurden anschließend auf Expression von chSLP-65 mittels Western Blotting untersucht. Dazu wurde chSLP-65 über chSLP-65-Antikörper präzipitiert und anschließend detektiert (s. Abb. 6.27).

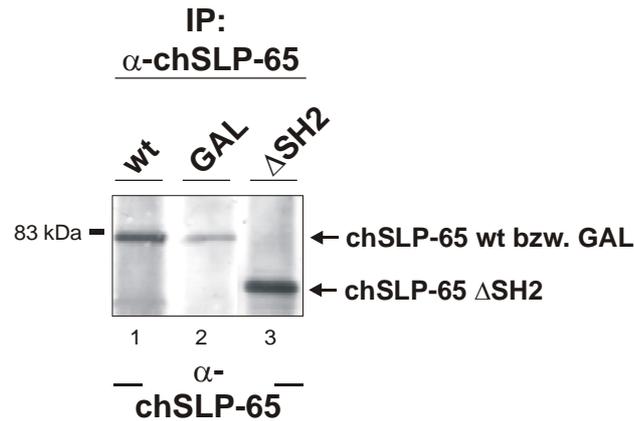


Abb. 6.27 Expression von chSLP-65wt, GAL und Δ SH2 in *slp-65^{-/-}* DT40 Zellen

Aus je 3×10^7 unstimulierten Zellen wurden über chSLP-65-Antikörper chSLP-65wt (Spur 1), GAL (Spur 2) sowie Δ SH2 (Spur 3) präzipitiert. Die IPs wurden auf ein 10 %-iges PAA-Gel aufgetragen, aufgetrennt und durch Western Blotting und α -pTyr analysiert. Die Transfektion wurde zweimal wiederholt. Der Gesamtproteininhalt wurde außerdem über den Bradford-Test kontrolliert und normiert.

Abb. 6.27 zeigt, dass die drei chSLP-65-Konstrukte nicht im gleichen Ausmaß exprimiert werden. Obwohl die Transfektion zweimal wiederholt wurde, konnte keine Zellpopulationen mit entsprechend höherer chSLP-65GAL Expression (Spur 2) erhalten werden. Dagegen war die Expression von chSLP-65wt (Spur 1) und Δ SH2 (Spur 3) immer annähernd gleich. Um zu überprüfen, ob die chSLP-65-Mutanten die Fähigkeit verloren haben, über die SH2-Domäne zu interagieren, aber trotzdem funktionell sind, wurden APs mit einem Ig- α -Peptid und mGrb2 durchgeführt.

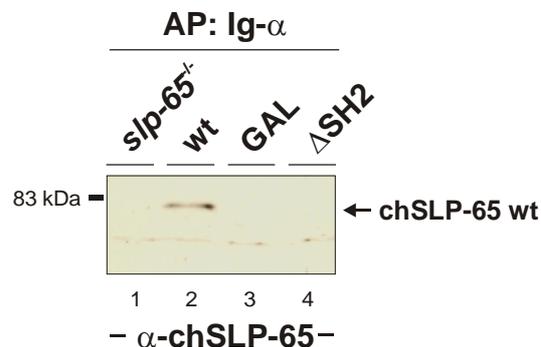


Abb. 6.28 Überprüfung der Inaktivierung der chSLP-65-SH2-Domäne

Für die AP mit dem Ig- α Peptid C-pPepII wurden Lysate von je 2×10^7 Zellen der Zellpopulationen DT40 *slp-65^{-/-}* chSLP-65wt, GAL bzw. Δ SH2 eingesetzt. Als Kontrolle dienten vektortransfizierte Zellen. Die APs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert.

Wie in Abb. 6.28 dargestellt, kann nur chSLP-65wt (Spur 2) über das Ig- α -Peptid präzipitiert werden. Erwartungsgemäß wurden die Mutanten GAL (Spur 3) und Δ SH2 (Spur 4) nicht präzipitiert, da auch schon die Punktmutante chSLP-65 R468L nicht mehr an das Ig- α Peptid binden konnte (Kai Dittmann, Diplomarbeit).

Um die Funktionalität und korrekte Faltung des restlichen Proteins der mutierten chSLP-65-Konstrukte nachzuweisen, wurden Affinitätspräzipitationen mit GST-mGrb2 durchgeführt.

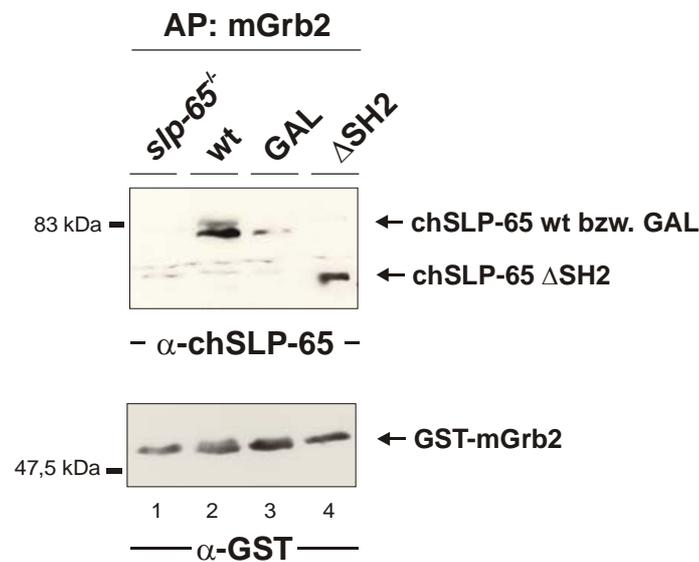


Abb. 6.29 Kontrolle der Grb2-Interaktionsfähigkeit der chSLP-65 Proteine wt, GAL und Δ SH2

Für die Affinitätspräzipitation mit GST-mGrb2 wurden Lysate von je 2×10^7 unstimulierten Zellen der Populationen DT40 $slp-65^{-/-}$ chSLP-65wt, GAL und Δ SH2 verwendet. Als Kontrolle wurden vektortransfizierte Zellen verwendet. Die APs wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blotting und α -chSLP-65 untersucht. Die Detektion von GST diente dem vergleichbaren Einsatz der GST-Fusionsproteine für die AP.

Alle drei chSLP-65-Varianten wurden über mGrb2 präzipitiert. Auch hier fällt auf, dass die GAL-Mutante, aufgrund des niedrigeren Expressionslevels, schwächer gebunden wird (Spur 3). Diese Experimente zeigen, dass bei beiden chSLP-65-Mutanten GAL und Δ SH2 die SH2-Domäne inaktiviert wurde, aber generell die Proteine korrekt gefaltet sind.

6.4.2. Wird SLP-65 mit inaktiver SH2-Domäne noch phosphoryliert?

Um zu überprüfen, ob sich eine Inaktivierung der SH2-Domäne auf die Phosphorylierung von SLP-65 auswirkt, wurde die Phosphorylierung der beiden Mutanten im Vergleich zu chSLP-65wt nach BCR-Quervernetzung analysiert. Diese Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Stephan Ewers im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.

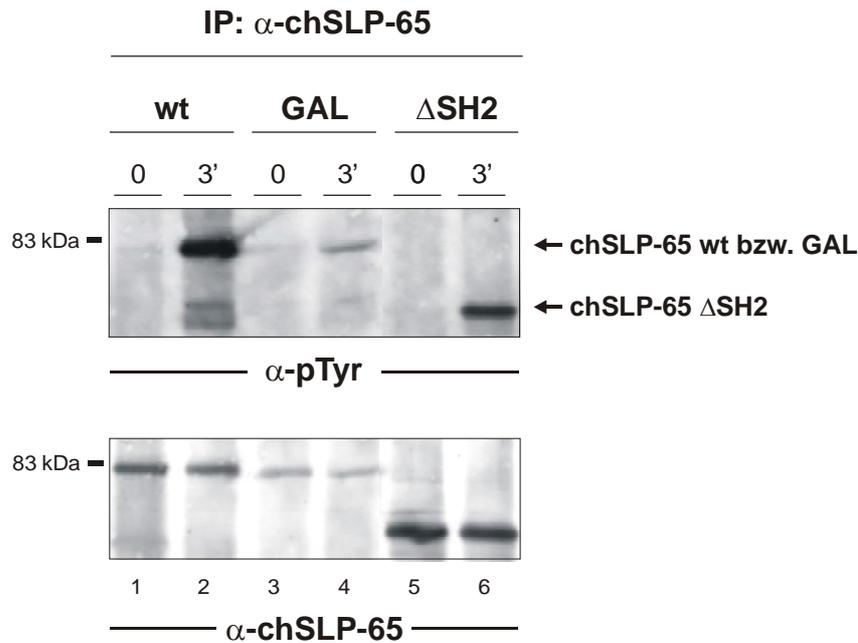


Abb. 6.30 Überprüfung der Phosphorylierung von chSLP-65wt, GAL und Δ SH2 nach BCR-Stimulation

Für die IP mit chSLP-65-Antikörpern wurden Lysate von je 3×10^7 unstimulierten (0) oder für 3 min (3') stimulierten Zellen eingesetzt. Es wurden chSLP-65wt (Spur 1 und 2), GAL (Spur 3 und 4) sowie Δ SH2 (Spur 5 und 6) exprimierende DT40 *slp-65*^{-/-} Zellen eingesetzt. Die Gesamt-Proteinmenge der Lysate wurden außerdem über den Bradford-Test kontrolliert. Die Ladekontrolle erfolgte über die Detektion mit chSLP-65-Antikörpern. Dass es sich bei den präzipitierten Proteinen um chSLP-65 handelt, wurde durch den Vergleich mit SLP-65 defizienten Zellen kontrolliert.

Nach Stimulation der Zellen über den BCR wird nicht nur chSLP-65wt (Spur 2), sondern auch die Mutanten GAL (Spur 4) und Δ SH2 (Spur 6) phosphoryliert. Die Signalintensität der Mutanten (Spur 4 und 6) ist zwar schwächer im Vergleich zum wt (Spur 2), aber sie ist deutlich vorhanden. Die SH2-Domäne ist demnach für die Phosphorylierung von SLP-65 nicht erforderlich.

6.4.3. Einfluss der SLP-65-SH2-Domäne auf das Ca²⁺-Signal

Um die Auswirkung der Trippel-Mutation bzw. Deletion der SH2-Domäne von SLP-65 auf die Signalleitung vom BCR zu analysieren, wurden mit den chSLP-65wt, GAL und Δ SH2 exprimierenden Zellen Ca²⁺-Messungen durchgeführt (s. Kap. 5.2.13.).

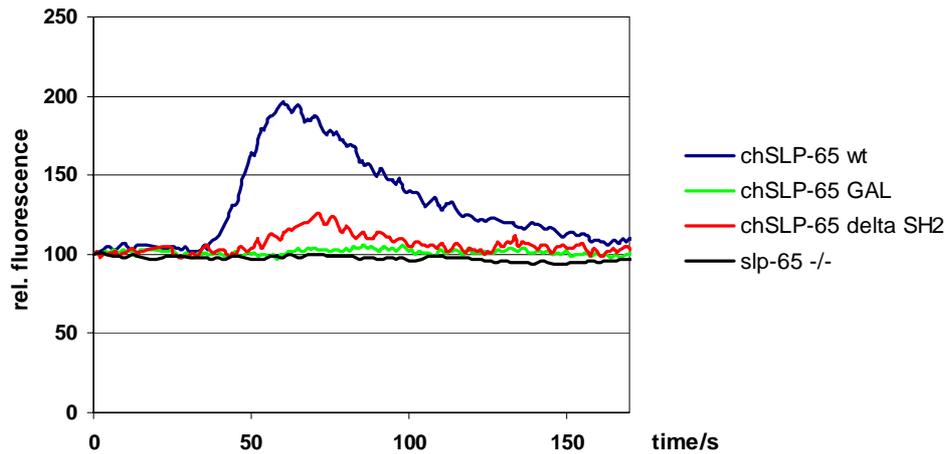


Abb. 6.31 Einfluss von chSLP-65wt, GAL und Δ SH2 auf das Ca²⁺-Signal

DT40 *slp-65*^{-/-} Zellen, die mit chSLP-65wt (blau), -GAL (grün) oder - Δ SH2 (rot) rekonstituiert wurden, wurden einer Ca²⁺-Messungen unterzogen. Als Kontrolle dienen vektortransfizierte Zellen (schwarz). Nach 25 sec Vorlaufzeit wurden die Zellen mit Maus-anti-Huhn IgM (M4; 10 μ g/ml) stimuliert und das Ca²⁺-Signal für 3 min aufgenommen.

Die Ca²⁺-Messung in Abb. 6.31 zeigt deutlich eine Reduktion des Signals bei den chSLP-65GAL (grün) bzw. Δ SH2 (rot) exprimierenden im Vergleich zu wildtypischen Zellen (blau). Die Kurve für GAL- liegt unterhalb der der Δ SH2-exprimierenden Zellen, was wahrscheinlich auf das niedrigere Expressionslevel der GAL-Mutante zurückgeführt werden kann. Es ist aber klar zu erkennen, dass die chSLP-65-SH2-Deletionsmutante, deren Expressionslevel mit dem wt vergleichbar ist, einen deutlichen Einfluss auf das Ca²⁺-Signal ausübt. Folglich kann der SLP-65-SH2-Domäne eine essenzielle Rolle in der Signalleitung vom BCR zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Inaktivierung der SLP-65-SH2-Domäne *in vivo* gezeigt werden, dass diese von wesentlicher Bedeutung für das BCR-initiierte Ca²⁺-Signal ist. Im Gegensatz dazu ist sie für die Phosphorylierung von SLP-65 nicht zwingend erforderlich. Neben den Tyrosin-Phosphorylierungsmotiven konnte in dieser Studie auch die

SH2-Domäne als wichtige Domäne für die Ca^{2+} -Mobilisierung nach Stimulation über den BCR nachgewiesen werden.

6.5. Selektive Signalleitung über SLP-65 in EBV-infizierten B-Zellen

Das Epstein-Barr-Virus blockiert die Signaltransduktion vom BCR, versorgt die Zellen aber gleichzeitig mit einem Überlebenssignal. Dafür moduliert das viruseigene Protein LMP2A die Signalleitung über SLP-65, indem es einige Signalwege nutzt und andere reprimiert (Engels et al., 2001). Es ist aber noch ungeklärt, warum EBV-infizierte Zellen kein Ca^{2+} mehr mobilisieren können, obwohl die Komponenten des Calcium-Initiationskomplexes SLP-65 und Syk konstitutiv phosphoryliert, d.h. aktiv vorliegen. Diese Fragestellung sollte in dieser Arbeit beantwortet werden. Zunächst wurde die Phosphorylierung der zweiten Kinase des Calcium-Initiationskomplexes Btk analysiert. Außerdem sollte geklärt werden, ob die konstitutive, aber schwächere Phosphorylierung von SLP-65 in EBV-infizierten Zellen auf die Modifikation aller fünf Tyr-Reste zurückzuführen ist oder, ob nur einige Motive selektiv durch das Virus genutzt werden. Um im Detail zu charakterisieren, welche der fünf YxxP-Motive in LCLs phosphoryliert vorliegen oder nicht, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden die entsprechenden SH2-Domänen-beinhaltenden Interaktionspartner als GST-Fusionsproteine hergestellt, aufgereinigt und für Affinitätspräzipitationen aus LCL-Lysaten eingesetzt. Zum anderen wurden die in der Gruppe von Prof. A. Chan, Genentech Inc., San Francisco, USA, hergestellten phosphospezifischen-SLP-65-Antikörper für Western Blotting-Experimente eingesetzt.

6.5.1. Untersuchung der SLP-65-Funktion in der konditionalen LCL-Linie EREB2.5

Ein Problem bei der Analyse der Signalleitung in LCLs sind die großen Unterschiede von verschiedenen Zelllinien je nach Herkunft der Zellen. Daher wurde die konditionale LCL-Linie EREB2.5 für die Untersuchung der SLP-65-Funktion herangezogen. Für diese konditionale EBV-infizierte B-Zelllinie wurde *EBV nuclear antigen 2* (EBNA2), der Transkriptionsfaktor, der für das transformierende Potenzial des Virus verantwortlich ist, unter die Kontrolle des Östrogen-Rezeptors gesetzt. In Anwesenheit von Östrogen wird EBNA2 exprimiert und die Zellen proliferieren, d.h. sie repräsentieren den LCL-Zustand. Wird Östrogen entzogen, stellen die Zellen das Wachstum ein und verharren in der G_1 - und G_2 -Phase des Zellzyklus. In dieser ruhenden Phase überleben die Zellen für ca. 72 h, bevor sie in die Apoptose gehen (Kempkes et al., 1995). In diesem konditionalen Modell für

EBV-infizierte B-Zellen war es möglich die Signalleitung über SLP-65 im ruhenden und infizierten Zustand an nur einer Zelllinie zu untersuchen.

6.5.2. Ca^{2+} -Mobilisierung in EREB2.5-Zellen

EBV-infizierte Zellen reagieren auf die Quervernetzung des BCR nicht mit einer Mobilisierung von Ca^{2+} , da LMP2A die Signalleitungskette vom BCR entkoppelt. Daher wurde das Ca^{2+} -Signal als Marker für den ruhenden oder infizierten Zustand eingesetzt. Um zu bestimmen, wann die Zellen den ruhenden Zustand nach Östrogen-Entzug erreicht haben, wurden Ca^{2+} -Messungen vor und ein bzw. zwei Tagen nach Entzug des Hormons durchgeführt.

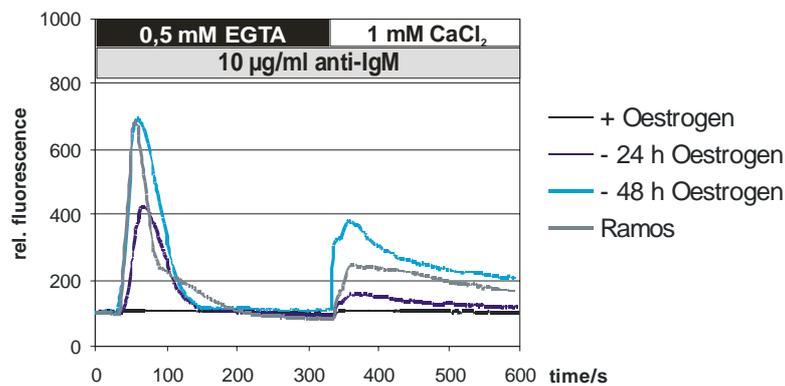


Abb. 6.32 Ca^{2+} -Signal der EREB2.5-Zellen vor und nach Östrogen-Entzug

EREB2.5 vor und 1 bzw. 2 d nach Östrogenentzug wurden einer *add back*-Messung unterzogen. Nach 25 sec wurden die Zellen mit Ziege-anti-human IgM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und nach 360 sec 0,1 mM Ca^{2+} zugesetzt. Die humane B-Zelllinie Ramos wurde als Kontrolle eingesetzt.

Die Ca^{2+} -Messungen der EREB2.5-Zellen vor und nach Entzug des Hormons im Vergleich zu der humanen B-Zelllinie Ramos, dargestellt in Abb. 6.32 zeigt, dass nach einer Depletionszeit von 48 h das Ca^{2+} -Signal der EREB2.5-Zellen sein Maximum erreicht. Demnach ist die Expression der EBNA2-kontrollierten Gene nach zwei Tagen komplett abgeschaltet und die Zellen befinden sich im ruhenden Zustand. Das intrazellulär freigesetzte Ca^{2+} ist in der Amplitude des Signals mit dem der Ramos Zelllinie vergleichbar, aber der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} unterscheidet sich in der Höhe des Signals.

Für den Vergleich von ruhenden und infizierten Zellen wurden für die folgenden Experimente EREB2.5-Zellen mit Östrogen bzw. nach zwei Tagen Östrogen-Entzug eingesetzt.

6.5.3. Phosphorylierungsmuster der Proteine des Calcium-Initiationskomplexes in EREB2.5-Zellen

Untersuchungen von LCLs zeigten, dass Syk konstitutiv aktiv vorliegt. PLC- γ 2 hingegen wird nach Stimulation nicht aktiviert, worauf die Defekte in der Ca²⁺-Freisetzung zurückgeführt werden (Engels et al., 2001). Um diese Ergebnisse für die EREB2.5-Zellen zu reproduzieren und damit als konditionales LCL-System auch für die Untersuchung der Signaltransduktion vom BCR zu etablieren, wurden die Proteine des Calcium-Initiationskomplexes Syk, PLC- γ 2, SLP-65 präzipitiert und ihr Phosphorylierungsmuster mittels Western Blotting analysiert.

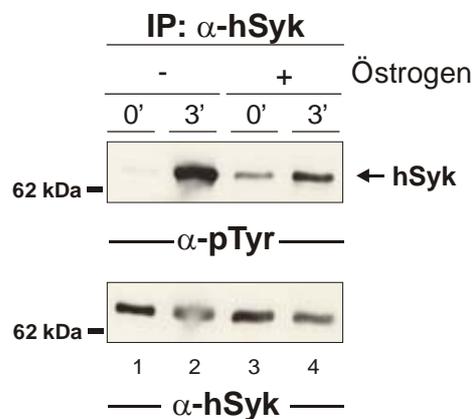


Abb. 6.33 Phosphorylierungsmuster von Syk vor und nach BCR-Stimulation in EREB2.5-Zellen

Für die IP mit hSyk-Antikörpern wurden Lysate von je 1×10^7 unstimulierten (0') bzw. stimulierten (3') Zellen vor (+) und nach 2 d (-) Östrogenentzug eingesetzt. Die IPs wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blotting untersucht. Nach Detektion der Phosphorylierung durch pTyr-Antikörper wurde der Blot mit α -hSyk entwickelt, um die Auftragung gleicher Proteinmengen zu überprüfen.

Nach Östrogen-Entzug befinden sich die Zellen in der ruhenden Phase und Syk wird nach Stimulation des BCRs phosphoryliert (Spur 1 und 2). Unter Östrogen-Zugabe sind die Zellen im EBV-infizierten Zustand, und Syk liegt konstitutiv phosphoryliert vor (Spur 3 und 4). Das Phosphorylierungsmuster von Syk entspricht demzufolge, wie erwartet, dem von ruhenden bzw. infizierten Zellen.

Als zweites Protein des Calcium-Initiationskomplexes wurde PLC- γ 2 untersucht.

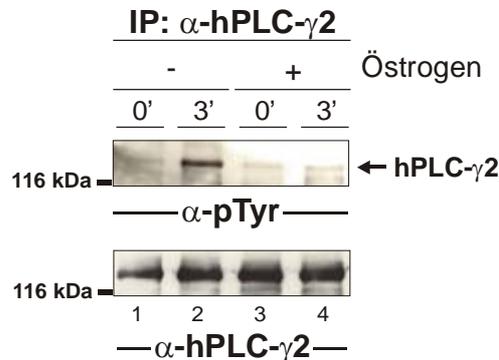


Abb. 6.34 Phosphorylierungsmuster von PLC- γ 2 vor und nach BCR-Quervernetzung in EREB2.5-Zellen

Für die IP mit hPLC- γ 2-Antikörpern wurden Lysate von je 1×10^7 unstimulierten (0') bzw. stimulierten (3') Zellen vor (+) und nach 2 d Östrogenentzug (-) verwendet. Die IPs wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert. Nach Detektion mit pTyr-Antikörpern wurde der Blot für die Ladungskontrolle mit α -hPLC- γ 2 entwickelt.

Erwartungsgemäß wird PLC- γ 2 in den ruhenden Zellen nach Stimulation über den BCR phosphoryliert (Spur 1 und 2), während dies in den Zellen des EBV-infizierten Phänotyps nicht zu beobachten ist (Spur 3 und 4). Dieses Ergebnis korreliert auch mit der Ca^{2+} -Messung der EREB2.5-Zellen (Abb. 6.32).

Für SLP-65, den Adapter des Calcium-Initiationskomplexes, wurde in der Literatur eine konstitutive Phosphorylierung in LCLs beschrieben (Engels et al., 2001).

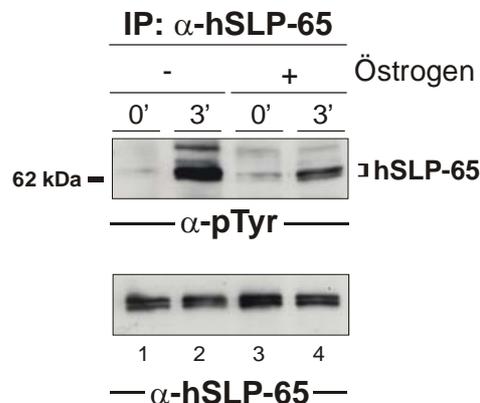
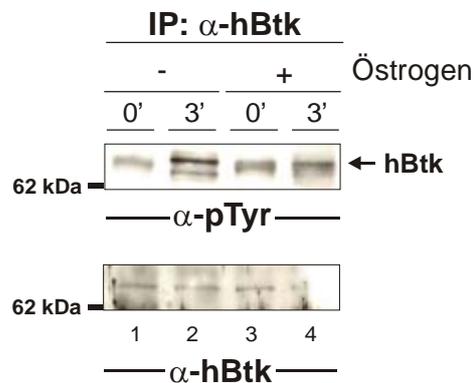


Abb. 6.35 Phosphorylierungsmuster von SLP-65 vor und nach BCR-Stimulation in EREB2.5-Zellen

Für die IP mit hSLP-65 Antikörpern wurden Lysate von 1×10^7 unstimulierten (0') bzw. stimulierten (3') Zellen vor (+) und nach 2 d (-) Östrogenentzug eingesetzt. Die IPs wurden erst über SDS-PAGE aufgetrennt und dann durch Western Blotting analysiert. Die Detektion erfolgte mit pTyr-Antikörpern und α -hSLP-65 für die Ladungskontrolle.

SLP-65 wird in ruhenden sowie EBV-infizierten Zellen nach Rezeptorstimulation phosphoryliert (Abb. 6.35, Spur 2 und 4). SLP-65 liegt in infizierten Zellen nicht konstitutiv phosphoryliert vor (Spur 3), sondern wird auch stimulationsabhängig phosphoryliert, aber in einem schwächeren Ausmaß im Vergleich zu ruhenden Zellen. In diesem Punkt unterscheiden sich die EREB2.5-Zellen von anderen LCLs.

Für Btk als zweite Kinase des Calcium-Initiationskomplexes wurde erstmals das Phosphorylierungsmuster untersucht.

**Abb. 6.36 Phosphorylierungsmuster von Btk vor und nach Stimulation über den BCR in EREB2.5-Zellen**

Für die IP mit hBtk-Antikörpern (C-20) wurden Lysate von 1×10^7 unstimulierten (0') bzw. stimulierten (3') Zellen vor (+) und nach (-) Östrogenentzug eingesetzt. Die IPs wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blotting analysiert. Nach Detektion mit pTyr-Antikörpern wurde der Blot mit α -hBtk (M-138) Antikörpern für die Ladungskontrolle entwickelt.

Es ist deutlich eine Phosphorylierung von Btk nach Stimulation in den ruhenden Zellen zu erkennen (Abb. 6.36, Spur 1 und 2, oben). Zellen im EBV-infizierten Zustand phosphorylieren Btk - wenn überhaupt - nur schwach (Spur 3 und 4, unten). Das würde bedeuten,

dass Btk in EBV-infizierten Zellen nicht aktiviert wird und damit auch PLC- γ 2 nicht phosphoryliert und aktiviert werden kann.

6.5.4. Phosphorylierung der einzelnen Tyr-Motive von SLP-65 in EREB2.5-Zellen

Obwohl in EBV-infizierten Zellen die Signalleitung vom BCR bis zu PLC- γ 2 unterbrochen ist, da die Lipase nach BCR-Quervernetzung nicht mehr aktiviert werden kann, ist Syk, eine der beiden Kinasen, die PLC- γ 2 phosphoryliert, konstitutiv aktiv. Btk scheint nicht oder nur schwach phosphoryliert zu werden, und SLP-65 liegt auch schwächer phosphoryliert vor. Btk bindet über die SH2-Domäne an phosphoryliertes SLP-65. Um zu überprüfen, ob das Virus selektiv einzelne Tyr-Motive von SLP-65 für die virale Signalleitung nutzt, d.h. phosphoryliert und andere Signalwege durch Inhibition der Modifikation „abschaltet“, wurde die Phosphorylierung der fünf Tyr-Motive einzeln untersucht. Dazu wurden phosphospezifische Antikörper für SLP-65 eingesetzt (Chiu et al., 2002).

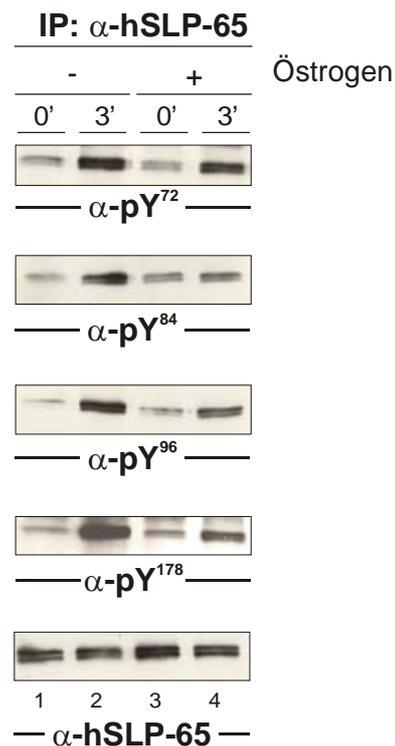


Abb. 6.37 Analyse der SLP-65-Phosphorylierung in EREB2.5-Zellen mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper

Für die IP mit hSLP-65-Antikörpern wurden Lysate von je 1×10^7 unstimulierten (0') bzw. stimulierten (3') Zellen vor (+) und nach 2 d (-) Östrogenentzug verwendet. Die IPs wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blotting mit phosphospezifischen-hSLP-65-Antikörpern analysiert. Die Detektion mit α -hSLP-65 diente der Ladungskontrolle.

Der Anstieg der SLP-65 Phosphorylierung ist für alle Tyr-Motive nach BCR Stimulation in den ruhenden Zellen zu erkennen (Spur 1 und 2). Y72 besitzt das Konsensus-Motiv YENP, das der Erkennungssequenz YxNx der Grb2[SH2] Domäne entspricht (Buday, 1999). Außerdem wurden die SH2-Domänen von Vav und Nck als Bindungspartner von Y72 identifiziert (Chiu et al., 2002). Dieses Tyr-Motiv wird in EBV-infizierten Zellen etwas schwächer als in ruhenden Zellen, aber auch stimulationsabhängig phosphoryliert. Y84 liegt als YVMP Motiv vor. Diese Sequenz ist nicht so hoch konserviert und liegt im chSLP-65 als YVVP vor, woran PLC- γ 2 bindet (Chiu et al., 2002). In EBV-infizierten Zellen ist die Phosphorylierung dieses Tyr-Restes nicht induzierbar. Die Stärke des Signals entspricht dem aus unstimulierten ruhenden Zellen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass Y84 in EBV-infizierten Zellen kaum phosphoryliert wird. Als weitere Bindungsstellen für PLC- γ 2 wurden die chSLP-65 Motive Y¹⁹⁴IVP und Y²⁰⁵IEP beschrieben. Diese ähneln den hSLP-65 Motiven Y¹⁷⁸VVP und Y¹⁸⁹IHP. Die Phosphorylierung von Y189 konnte nicht untersucht werden, da die Antikörper nicht spezifisch genug waren. Der dritte potenzielle PLC- γ 2-interagierende Tyrosinrest Y178 wird in infizierten Zellen stimulationsabhängig phosphoryliert, aber schwächer als in ruhenden Zellen. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass zwei der drei Tyr-Motive von SLP-65 (84 und 178), die nach dem derzeitigen Kenntnisstand für die Bindung von PLC- γ 2 verantwortlich sind und zu der Formierung des Calcium-Initiationskomplexes beitragen, im Vergleich zu ruhenden Zellen nicht signifikant phosphoryliert werden. Weiterhin führt die Mutation der entsprechenden zwei Tyr- in Phe-Reste von chSLP-65 (Y103, Y194) dazu, dass kein Ca²⁺ mehr mobilisiert werden kann (Chiu et al., 2002). Daher besteht die Möglichkeit, dass PLC- γ 2 in EBV-infizierten Zellen nicht an SLP-65 rekrutiert und anschließend von Btk und Syk aktiviert werden kann.

Y96 liegt in dem konservierten Motiv YEPP vor, das als Bindestelle für die SH2-Domäne von Btk beschrieben wurde (Chiu et al., 2002). Die Phosphorylierung dieses Motivs erfolgt in infizierten Zellen auch stimulationsabhängig, aber schwächer als in ruhenden Zellen. Das könnte zur Folge haben, dass auch Btk nicht an SLP-65 rekrutiert werden kann und so nicht in die räumliche Nähe von PLC- γ 2 gelangt, um die Lipase zu aktivieren.

6.5.5. Interaktionsverhalten von SLP-65 mit seinen Bindungspartnern in EREB2.5-Zellen

Ein weiterer Ansatz, um zu überprüfen, ob spezielle Tyr-Motive von SLP-65 in EBV-infizierten Zellen phosphoryliert werden, oder nicht für die Signalleitung einbezogen werden, besteht darin, SLP-65 über seine Bindungspartner zu präzipitieren. Dazu wurden die

SH2-Domänen von Btk, Cbl, CrkL, Grb2 und PLC- γ 2 als GST-Fusionsproteine rekombinant hergestellt (s. Kap. 6.1.3.) und für Affinitätspräzipitationen aus EREB2.5-Lysaten vor und nach Östrogen-Entzug sowie Rezeptor-Quervernetzung eingesetzt.

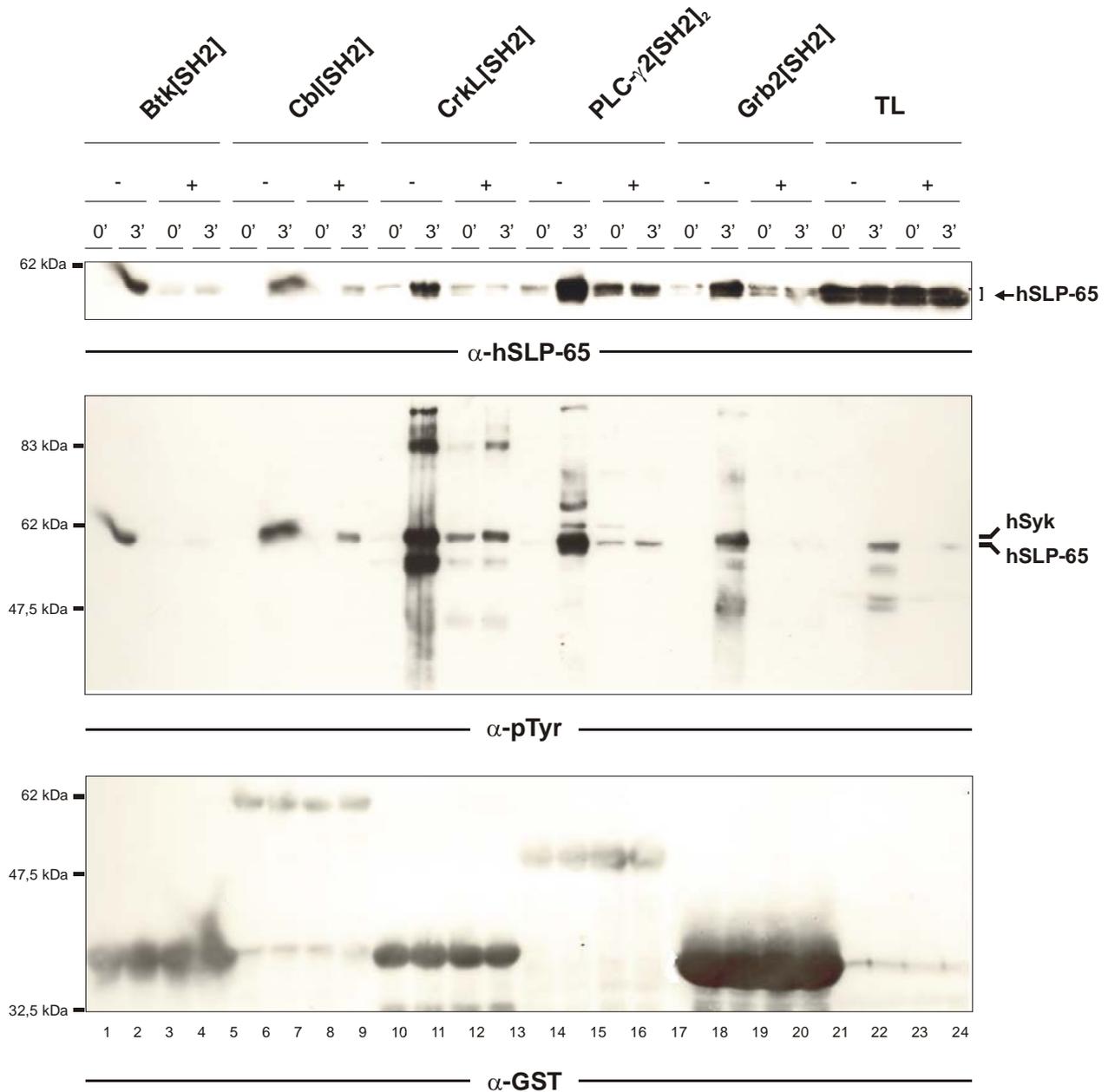


Abb. 6.38 Interaktion von SLP-65 und seinen stimulationsabhängigen Bindungspartnern in EREB2.5-Zellen (n=3)

Für die APs mit den verschiedenen SH2-Domänen (s. Kap. 6.1.3.) wurden über GST vorgeklärte Lysate von je 2×10^7 unstimulierten (0') bzw. stimulierten (3') Zellen, vor (+) und nach 2 d Östrogenentzug (-) eingesetzt. Nach der Auftrennung über SDS-PAGE wurden die APs über Western Blotting und α -hSLP-65, α -pTyr und α -GST analysiert.

Allgemein ist auch bei diesem Experiment zu beobachten, dass SLP-65 in EBV-infizierten Zellen schwächer phosphoryliert wird als in ruhenden. Da die Affinität der einzelnen SH2-Domänen zu den entsprechenden Tyr-Motiven nicht unbedingt gleich ist, bzw. die Qualität der GST-Fusionsproteine unterschiedlich ist, ist die Menge von präzipitiertem SLP-65 durch verschiedene SH2-Domänen nicht aussagekräftig. Als Normierung wird die Menge von präzipitiertem SLP-65 mit der gleichen SH2-Domäne aus ruhenden Zellen herangezogen.

SLP-65 wird in ruhenden Zellen nach Stimulation von allen SH2-Domänen präzipitiert. Die anschließende Detektion mit pTyr-Antikörpern zeigt, dass die SLP-65-Antikörper viel sensitiver sind. Z.B. ist bei der AP mit der Btk[SH2]-Domäne (Spur 1-4, oben) noch präzipitiertes SLP-65 zu erkennen, während die pTyr-Antikörper dies nicht mehr detektieren. Es kann sich dabei nicht um unphosphoryliertes SLP-65 handeln, da bei unstimulierten, ruhenden Zellen keine SLP-65 Bande zu sehen ist (Spur 1). Die Interaktion von SLP-65 und Btk scheint in EBV-infizierten Zellen kaum vorhanden zu sein (Spur 3 und 4), d.h. Y96 von SLP-65 wird nicht signifikant phosphoryliert, was mit den Daten der phosphospezifischen SLP-65-Antikörpern korreliert (Abb. 6.37) .

Die Bindung der PLC- γ 2-Tandem-SH2-Domänen an SLP-65 ist in EBV-infizierten im Vergleich zu ruhenden Zellen auch stark beeinträchtigt (Spur 13-16). Diese Beobachtung stimmt auch mit der Analyse der Phosphorylierung von SLP-65 überein, da die PLC- γ 2 bindenden Tyr-Reste 84 und 178 auch nicht signifikant phosphoryliert vorliegen (Abb. 6.37).

Die Bindung von SLP-65 an die SH2-Domänen von Cbl (Spur 7 und 8), CrkL (11 und 12) und Grb2 (19 und 20) ist in infizierten Zellen – wenn überhaupt - nur sehr schwach zu detektieren. Cbl wurde als Konkurrent für die PLC- γ 2/SLP-65 Interaktion beschrieben (Yasuda et al., 2000). Die atypische Cbl[SH2]-Domäne bindet an das Konsensus-Motiv D(N/D)xpY (Lupher et al., 1997), welches als konservierte DDSY Sequenz in murinem, humanem und Huhn SLP-65 in unmittelbarer Nähe der beiden PLC- γ 2-Bindestellen vorhanden ist. Was die Bindung von CrkL und Grb2 an SLP-65 für funktionelle Bedeutung haben, ist noch unklar.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass die Assoziation von SLP-65 mit den Komponenten Btk und PLC- γ 2 des Calcium-Initiationskomplexes vermindert ist, was auf die fehlende oder schwächere Phosphorylierung der entsprechenden Tyr-Reste von SLP-65 in EBV-infizierten B-Zellen zurückzuführen ist. Zusätzlich konnte erst-

mals gezeigt werden, dass Btk in EBV-infizierten Zellen nicht aktiviert werden kann. Dadurch konnten wichtige Aspekte zu Erklärung des fehlenden Ca^{2+} -Signals in EBV-infizierten Zellen beigetragen werden.

7 Diskussion

Die exakte Ausführung der Signaltransduktion in Lymphozyten erfordert die Organisation einer Vielzahl von Molekülen in signalleitenden Komplexen, die zudem noch räumlich und zeitlich koordiniert werden müssen. Innerhalb der letzten Jahre ist die Notwendigkeit für das Verständnis der genauen Lokalisation und Vernetzung von Signalmolekülen mehr und mehr erkannt worden. Untersuchungen, die sich diesen molekularen Prozessen widmen, richten den Fokus auf Proteine, die die Eigenschaft besitzen andere Moleküle zu rekrutieren und so die Aktivierung ihrer Bindungspartner zu ermöglichen. Im Zentrum entsprechender Studien stehen Adapterproteine. Obwohl Adapterproteine keine enzymatische Aktivität besitzen, sind sie häufig dafür verantwortlich, Effektormoleküle in unmittelbarer Nähe ihrer Substrate zu lokalisieren. Diese Aufgabe bewältigen sie über ihre Protein-Interaktionsdomänen, die Gerüste für multimolekulare Protein-Komplexe bilden (Jordan et al., 2003). Die essenzielle Bedeutung dieser Adapterproteine wird durch genetisch-bedingte Defekte beim Menschen deutlich, wie sie bei ALL und einer bestimmten Form der XLA auftreten. Dabei handelt es sich um einen Defekt des Adapterproteins SLP-65, der zu malignen Transformationen von B-Zellen führen kann (Fleming et al., 2003; Jumaa et al., 2003). Patienten, denen dieses Gen komplett fehlt, besitzen keine ausgereiften B-Zellen, was zu schweren Immunsuffizienzen führt (Minegishi et al., 1999). Die Rekonstitution dieser defekten Zellen mit dem Adapterprotein SLP-65 führt hingegen zum Wachstumsstopp der Tumore und zur Aufhebung der Blockade in der B-Zell-Entwicklung (Flemming et al., 2002; Jumaa et al., 2003). SLP-65 ist nicht allein für die BCR-vermittelte Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen unabdingbar, sondern darüber hinaus auch für die Signale des Epstein-Barr-Virus. Das virale Protein LMP2A entkoppelt BCR-initiierte Signalkaskaden und nutzt selektiv SLP-65-vermittelte Signalwege, um die infizierten B-Zellen mit einem Überlebenssignal zu versorgen (Engels et al., 2001). Dadurch ermöglicht es SLP-65, EBV in diesen Zellen der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen und in einem latenten Zustand zu persistieren. Darüber hinaus wird EBV mit einer Vielzahl von B-Zell-Tumoren assoziiert, wie z.B. dem Burkitt- oder Hodgkin-Lymphom. Darum ist die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die die Grundlage bilden, in welcher Art und Weise SLP-65 seine Bindungspartner rekrutiert und in Komplexen koordiniert, ausschlaggebend für das Verständnis der B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung sowie von EBV-modulierten Signalwegen. Daher waren die Ziele dieser Arbeit die funktionelle Bedeutung der SH3-

bindenden Domäne und der SH2-Domäne bei der BCR-induzierten Signaltransduktion zu analysieren. In Bezug auf die Signale von EBV sollte geklärt werden, welche Signalwege in infizierten Zellen durch die Phosphorylierung von SLP-65 selektiv moduliert werden.

Die Tyrosin-Phosphorylierungsmotive von SLP-65 wurden bezüglich ihrer Bindungspartner und ihrer Bedeutung für die BCR-vermittelte Signalleitung von Chiu et al. analysiert (Chiu et al., 2002). Diese Daten und Methoden wurden in der vorliegenden Studie auf die Untersuchung EBV-initiiertes Signalkaskaden übertragen, um im Detail zu charakterisieren, welche Signalwege das Virus über SLP-65 an- bzw. ausschaltet. Belegt wurden diese Daten durch Bindungsstudien mit den SH2-Domänen enthaltenden Interaktionspartnern von phosphoryliertem SLP-65. Demnach ist die Interaktion mit den Komponenten Btk und PLC- γ 2 des Calcium-Initiationskomplexes in EBV-infizierten Zellen durch eine reduzierte SLP-65-Phosphorylierung inhibiert.

Die funktionelle Bedeutung und die Bindungseigenschaften der prolinreichen Region von SLP-65 sind noch weitgehend unklar. Für die SH3-bindende Region des verwandten Proteins SLP-76 wurde eine wichtige Funktion bei der Membranrekrutierung von SLP-76 durch Gads an LAT beschrieben. Diese Interaktion ist von zentraler Bedeutung für das TCR-induzierte Ca^{2+} -Signal (Myung et al., 2001; Singer et al., 2004). In dieser Arbeit wurde ein atypisches SH3-bindendes Motiv in der prolinreichen Region von SLP-65 über *in vitro*-Interaktionsstudien identifiziert. Diese Daten ermöglichten die Inaktivierung des Motivs und die Analyse der funktionellen Bedeutung *in vivo*. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die atypische SH3-Bindestelle eine regulatorische Funktion auf die MAPK JNK und p38 ausübt. Darüber hinaus wird die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos und die Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NFAT/AP-1 von diesem Motiv reguliert.

Als weiteres Protein-Interaktionsmodul beinhaltet SLP-65 eine C-terminale SH2-Domäne, deren Funktion noch nicht geklärt wurde. Daher wurde die SH2-Domäne von SLP-65 inaktiviert und die Auswirkung *in vivo* analysiert. Erstmals konnte dieser Interaktionsdomäne eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung von Ca^{2+} zugeschrieben werden. Diese Funktion korreliert dagegen nicht mit der Phosphorylierung von SLP-65, d.h. für diese Modifikation ist die SH2-Domäne nicht erforderlich.

7.1. Identifizierung und Charakterisierung des atypischen SH3-bindenden Motivs von SLP-65

Als bisher einzigen Hinweis bezüglich der SH3-bindenden Region von SLP-65 wird in der Literatur eine konstitutive Interaktion mit Grb2 postuliert (Fu und Chan, 1997; Wienands et al., 1998). Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Darüber hinaus ließen sich die exakten Interaktionsdomänen von SLP-65 als auch von Grb2 identifizieren sowie die Bindungsparameter bestimmen. Über *in vitro* Interaktionsstudien wurde die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 als einzige, konstitutiv mit SLP-65 interagierende Domäne bestimmt (Abb. 6.6). Die konstitutive Interaktion wurde auf der Seite von SLP-65 auf eine atypische SH3-Bindestelle zurückgeführt. Diese basiert nicht auf einem PxxP-Motiv, sondern auf einem PxxxRxxKP-Motiv (Abb. 6.8). Dieses Motiv ist auch verantwortlich für die Interaktion zwischen den SLP-65- bzw. Grb2- verwandten Molekülen SLP-76 bzw. Gads. Gads bindet wie Grb2 über die C-terminale SH3-Domäne an den SLP-Adapter (Harkiolaki et al., 2003). Bis zu diesem Punkt scheint eine sehr große Übereinstimmung bezüglich der Bindungspartner und -eigenschaften zwischen SLP-65 und SLP-76 zu bestehen. Beide SLP-Adapter assoziieren über eine atypische SH3-bindende Region mit der C-terminalen SH3-Domäne eines Proteins aus der Grb2-Familie. Die Unterschiede dieser Interaktionen werden jedoch deutlich, wenn die K_d -Werte mit einbezogen werden. Dazu wurde in dieser Arbeit der K_d -Wert für die Interaktion zwischen SLP-65 und der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 über ITC-Messungen bestimmt (Abb. 6.6 und 6.8). Bei dem Vergleich mit dem bekannten K_d -Wert der SLP-76/Gads[C-SH3] Interaktion ($K_d = 0,18 \mu\text{M}$) stellte sich heraus, dass der K_d -Wert für SLP-65/Grb2[C-SH3] mit $6 \pm 2 \mu\text{M}$ um das 50-fache größer ist (Abb. 6.6 und 6.8, Harkiolaki et al., 2003). Ein 50 mal größerer K_d -Wert bedeutet, dass diese Interaktion bedeutend schwächer ist. Die Messergebnisse sind sehr gut zu vergleichen, da bei beiden - der publizierten als auch der in dieser Studie durchgeführten - ITC-Messungen ein SLP-76- bzw. SLP-65-Peptid und nur die jeweilige C-terminale SH3-Domäne eingesetzt wurden. Außerdem ist für SLP-76 auch die Dissoziationskonstante für die Bindung an Grb2[C-SH3] bekannt (Lewitzky et al., 2001). Dieser K_d liegt - ähnlich wie für die Bindung SLP-65/Grb2[C-SH3] - bei $10 \mu\text{M}$. Das bedeutet, dass die Bindungseigenschaften zwischen Grb2 und SLP-76 bzw. Grb2 und SLP-65 sehr ähnlich sind. Allgemein wurde für die Interaktionen zwischen prolinreichen Regionen und SH3-Domänen ein K_d -Bereich von $5-75 \mu\text{M}$ beschrieben (Yu et al., 1994; Rickles et al., 1994). Demnach liegen schon die Interaktionen von SLP-65/Grb2[C-SH3] und SLP-76/Grb2[C-SH3] an der unteren Grenze, d.h. im stark assoziierten Bereich. Die SLP-76/Gads[C-SH3]-Bindung ist dennoch um das 50-fache

affiner. Daher muss bei gleichen Konzentrationsverhältnissen der wichtigere *in vivo* Bindungspartner für SLP-76 Gads sein. Das bestätigen auch die Daten von Myung et al. und Singer et al.. Diese zeigen, dass die Bindung von SLP-76 an LAT über Gads vermittelt und dadurch der TCR-induzierte Ca^{2+} -Einstrom ermöglicht wird (Myung et al., 2001; Singer et al., 2004). Dies ist auch ein Hinweis darauf, in welcher Form durch unterschiedliche Bindungspartner Spezifität vermittelt werden kann. In SLP-65-defizienten pre-B-Zellen kann die Interaktion zwischen LAT und SLP-76 zum Teil die Defekte, d.h. Blockade der Differenzierung im pre-B-Zell-Stadium, kompensieren (Su und Jumaa, 2003). In pre-B-Zellen wird Gads aber nicht exprimiert, d.h. SLP-76 muss über Grb2 an LAT rekrutiert werden. Wäre diese Bindung genauso affin, sollte die Differenzierungsblockade nicht nur für eine geringe Anzahl der B-Zellen aufgehoben werden, sondern für den Großteil. Das wäre aber nicht von Vorteil, da SLP-76 und LAT in weiter differenzierten B-Zellen nicht mehr exprimiert werden und daher nicht mehr einen Teil der Defekte, die durch den Verlust von SLP-65 entstehen, kompensieren können (Su und Jumaa, 2003).

Um im Detail zu untersuchen, worauf diese starke Affinität zwischen SLP-76 und Gads im Gegensatz zu der Interaktion zwischen SLP-65 und Grb2 zurückzuführen ist, sollte der Komplex aus Grb2[C-SH3] und dem entsprechenden SLP-65-Peptid kristallisiert werden. Diese Komplexstruktur sollte dann systematisch mit der publizierten Struktur des SLP-76/Gads-Komplexes verglichen werden (Harkiolaki et al., 2003). Die Kristallisation verlief erfolgreich, aber das SLP-65-Peptid konnte nicht in der Struktur lokalisiert werden (Abb. 6.10). Das könnte entweder anhand der schwächeren Affinität erklärt werden, die möglicherweise dazu führt, dass das Peptid nicht kokristallisiert oder durch die Dimerisierung der Grb2[C-SH3], die das Peptid aus der Struktur verdrängt. Auch in der Struktur der Gads[C-SH3]-Domäne im Komplex mit dem SLP-76-Peptid wurde eine Dimerisierung der SH3-Domäne beobachtet. Diese wurde in Lösung untersucht und trat in Gegenwart von Zn^{2+} - aber nicht von Ca^{2+} -Ionen auf (Harkiolaki et al., 2003). Die physiologische Bedeutung möglicher Zn^{2+} -abhängiger Dimerisierungen von SH3-Domänen ist noch unklar, könnte aber ein weiteres Regulationsprinzip darstellen.

Um die Struktur der SLP-Adapter näher untersuchen zu können und dadurch Hinweise auf gleiche oder unterschiedliche Funktionen zu erhalten, wurde außerdem versucht, SLP-65 und SLP-76 zu kristallisieren. Dafür wurden die in Kapitel 6.1.1 und 6.1.2 beschriebenen, rekombinant hergestellten Proteine eingesetzt. Eine Kristallisation von SLP-Adaptoren war, auch in Gegenwart des Interaktionspartners Grb2, nicht erfolgreich. Da sich die Kristallisation der SLP-Proteine als sehr schwierig erwiesen hat, kann man

davon ausgehen, dass sie wahrscheinlich keine geordnete Struktur annehmen, sondern diese von ihren Interaktionspartnern auferlegt bekommen. Dabei könnte es sich um eine weitere, spezifische Eigenschaft von Adapterproteinen handeln.

Im ersten Teil dieser Studie wurden die Bindungseigenschaften zwischen SLP-65 und Grb2 im Detail charakterisiert. SLP-65 interagiert stimulationsunabhängig nur mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 und nach BCR-Quervernetzung auch über die SH2-Domäne (Abb. 6.11). Die konstitutive Interaktion konnte auf ein atypisches SH3-Bindemotiv von SLP-65 zurückgeführt werden. Diese Daten lieferten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der atypischen SH3-Bindestelle von SLP-65.

7.2. Die funktionelle Bedeutung der atypischen SH3-Bindestelle von SLP-65

Die Identifizierung der atypischen SH3-Bindestelle von SLP-65 im ersten Teil dieser Studie ermöglichte die anschließende Untersuchung der funktionellen Bedeutung dieses Motivs. Dazu wurden Aminosäuren im PxxxRxxKP Motiv von Hühner SLP-65 ausgetauscht und die entsprechenden Proteine in SLP-65-defizienten DT40 B-Zellen exprimiert. Der AS-Austausch R256A wurde gewählt, da bei der Charakterisierung des gleichen Motivs in der SLP-76-Sequenz über *in vitro*-Interaktionsexperimente der Austausch der Aminosäuren R oder K ausreichte, um die Interaktion mit der C-SH3-Domäne von Gads zu unterbinden (Harkiolaki et al., 2003). Für die SLP-65-Mutante R256A sowie die Doppel-Mutante R256A/K268A konnte immer noch eine Bindung an Grb2[C-SH3] nachgewiesen werden (Abb. 6.14). Diese Daten belegen, dass *in vitro*-Interaktionsexperimente mit Peptiden nicht immer auf Zellsysteme übertragen werden können, sondern häufig nur Anhaltspunkte liefern. Daher wurde anschließend das komplette Motiv deletiert (Δ 261-269). Auch dieses Protein zeigte immer noch eine schwache Wechselwirkung mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 (Abb. 6.16), was aber nicht auf eine unspezifische Bindung an GST zurückzuführen ist. Außerdem wurde die Interaktion eines weiteren SLP-65-Motivs an Grb2[C-SH3] zuvor ausgeschlossen (Abb. 6.6).

7.2.1. Einfluss auf das BCR-initiierte Ca²⁺-Signal

Um den Einfluss der fehlenden SH3-Bindestelle von SLP-65 auf die Signalleitung zu untersuchen, wurden Ca²⁺-Messungen durchgeführt. Sollte das atypische SH3-Bindemotiv von SLP-65 ähnlich wichtig wie das von SLP-76 für die Membranrekrutierung des Calcium-Initiationskomplexes sein, würde man eine Verminderung des BCR-initiierten Ca²⁺-Signals erwarten. Aber die Deletionsmutante zeigte keinen signifikanten Einfluss im Vergleich zu wildtypischen SLP-65 auf die Mobilisierung von intra- und extrazellulärem Ca²⁺ (Abb. 6.18 und 6.19). Damit kommt SLP-65 nicht als Inhibitor für den Einstrom extrazellulären Ca²⁺, der mit NTAL um die Bindung zu Grb2 konkurriert, in Frage (Stork et al., 2004). Hier zeigt sich ein deutlicher funktioneller Unterschied zwischen SLP-65 und SLP-76. Die Bindung von SLP-76 an Gads wurde als notwendig für die Membranrekrutierung von SLP-76 beschrieben (Myung et al., 2001). Daher führt auch die Deletion dieses Motivs in der SLP-76-Sequenz zu einer 50 %-igen Reduktion der Amplitude des Ca²⁺-Signals nach Stimulation über den TCR (Singer et al., 2004). Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das atypische SH3-Bindemotiv von SLP-65 offensichtlich nicht für die Membranrekrutierung oder Formierung des Calcium-Initiationskomplexes notwendig ist, weil die chSLP-65-Deletionsmutante keine Verminderung des Ca²⁺-Signals auslöst. Das bedeutet auch, dass die Formierung des Calcium-Initiationskomplexes in B-Zellen anders funktionieren muss als in T-Zellen. Dafür sprechen auch die Daten hinsichtlich der Membranrekrutierung von SLP-65 durch einen N-terminalen Leuzin-Zipper (Köhler et al., 2005). Dieses Motiv ist nur in SLP-65 vorhanden. Es ist aber unwahrscheinlich, dass dieses Motiv allein für die Membranlokalisation sorgt, da die Rekonstitution von SLP-76-defizienten J14-Zellen nicht die Defekte in der Ca²⁺-Mobilisierung kompensiert. Erst die Coexpression von Syk in diesem Zellhintergrund löst wieder ein TCR-induziertes Ca²⁺-Signal aus (unveröffentlichte Daten, Dr. Ablis Abdulla). Demnach kann es kein B-Zell-spezifisches LAT-ähnliches Molekül geben.

7.2.2. Regulation der MAPK-Signalwege

SLP-65-defiziente Zellen zeigen Defekte in der BCR-vermittelten Aktivierung der MAPK Erk, JNK und p38. Um den Einfluss des SH3-bindenden PxxxRxxKP-Motivs von SLP-65 auf diese MAPKs zu untersuchen, wurden deren stimulationsabhängige Phosphorylierungsmuster in SLP-65-defizienten Zellen, die mit wildtypischen SLP-65 oder mit der Deletionsmutanten rekonstituiert wurden, analysiert. Es wurde eindeutig eine verstärkte Aktivierung von JNK und p38 durch die Deletionsmutante nachgewiesen, während die Erk-Aktivierung wie in wildtypischen Zellen verlief (Abb. 6.20-22). Demnach

übt das SH3-bindende Motiv von SLP-65 eine inhibitorische Funktion auf die Aktivierung der MAPK JNK und p38 aus, weil die Deletion des Motivs in einer verstärkten Aktivierung resultiert.

7.2.3. Regulation von Transkriptionsfaktoren

Ein Substrat von JNK ist der Transkriptionsfaktor Jun, der zusammen mit c-Fos den transkriptionsaktivierenden Komplex AP-1 bildet. p38 aktiviert den Transkriptionsfaktor Elk-1, der wiederum die Transkription von c-Fos induziert (Roux und Blenis, 2004). Daher wurde die Expression von c-Fos in den $\Delta 261-269$ - im Vergleich zu wildtypischen chSLP-65-exprimierenden *s/p-65^{-/-}* DT40 Zellen untersucht (Abb. 6.23). Diese Analyse ergab, dass die mit $\Delta 261-269$ -rekonstituierten Zellen einen stärkeren stimulationsabhängigen Anstieg in der c-Fos-Expression zeigen. Damit konnte die Aktivierung von c-Fos durch p38 nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass beide Komponenten des AP-1 Transkriptionsaktivators verstärkt aktiviert werden: Jun als Substrat von JNK und c-Fos als Substrat von Elk-1, das wiederum von p38 aktiviert wird. Daher wurde im Anschluss die Aktivierung des NFAT/AP-1-Komplexes nach BCR-Quervernetzung über einen Reporterassay analysiert. SLP-65-defiziente Zellen sind aufgrund der Defekte in der Ca^{2+} -Freisetzung nicht in der Lage stimulationsabhängig NFAT/AP-1 zu aktivieren (Chiu et al., 2002). In diesem Zellhintergrund zeigte die Expression von chSLP-65wt wieder eine induzierbare NFAT/AP-1-Aktivierung, während die Deletionsmutante im Vergleich dazu eine dreifache Verstärkung der Luciferase-Aktivität vermittelte (Abb. 6.25). Die Aktivierung von NFAT ist vom Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Es wurden aber keine signifikanten Unterschiede in der Ca^{2+} -Mobilisierung, vermittelt durch die Deletionsmutante, im Vergleich zu wildtypischen Zellen gemessen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die AP-1-Komponente des NFAT/AP-1-Komplexes verstärkt aktiviert wird. Diese Aktivierung wird über die MAPK JNK und p38 vermittelt, die Jun bzw. c-Fos, die Komponenten des AP-1-Komplexes, aktivieren.

Auf Grundlage dieser Daten stellt sich die Frage, ob die regulatorische Funktion des SH3-bindenden Motivs von SLP-65 über die Bindung an Grb2 vermittelt wird. Eine Antwort liefert die Messung der NFAT/AP-1-Aktivierung vermittelt durch eine Grb2-Mutante mit inaktiver C-SH3-Domäne im Vergleich zu wildtypischen Grb2. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes wird durch mutiertes Grb2 nicht signifikant stärker oder schwächer als durch wildtypisches Grb2 beeinflusst (Abb. 6.26). Folglich kommt Grb2 nicht als Vermittler der regulatorischen Funktion von SLP-65 auf die NFAT/AP-1-

Aktivierung in Frage. Demnach muss es noch mindestens ein weiteres Protein geben, dass die regulatorische Funktion von SLP-65 auf die NFAT/AP-1-Aktivierung vermittelt.

7.2.4. Wie reguliert die SH3-bindende Domäne die Aktivierung der MAPK bzw. die Genexpression?

Eine Verbindung zwischen dem Adapter SLP-65, das selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, und der Aktivierung der MAPK-Kaskade ist der GEF Vav. JNK wird von GTPasen der Rho-Familie aktiviert, die ihrerseits von GEFs wie Vav reguliert werden. Damit Vav diese Funktion ausüben kann, muss es von Syk und Lyn phosphoryliert werden und durch Rekrutierung an die Plasmamembran in die Nähe der GTPasen gelangen (Bustelo, 2000; Turner und Billadeau, 2002). Johmura et al. haben gezeigt, dass die Lokalisation von Vav3 in die *lipid rafts* durch SLP-65 und Grb2 reguliert wird (Johmura et al., 2003). Obwohl SLP-65 und Grb2 unabhängig voneinander in die *lipid rafts* translocieren können, resultiert nur die Kooperation dieser beiden Moleküle in einer optimalen Vav-Aktivierung. Es wird angenommen, dass Grb2 die *raft*-Lokalisation von Vav nach BCR-Quervernetzung initiiert und SLP-65 zur Stabilisierung in den *rafts* wichtig ist (Johmura et al., 2003). Die Interaktion von Grb2 und Vav wird auf die Bindung der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne an ein prolinreiches Motiv in der N-terminalen SH3-Domäne von Vav zurückgeführt (Nishida et al., 2001; Ramos-Morales et al., 1995; Ye und Baltimore, 1994). Außerdem ist bekannt, dass SLP-65 über das Motiv YENP stimulationsabhängig mit Vav assoziiert (Chiu et al., 2002). Die Hypothese von Johmura et al. wird durch die Daten der vorliegenden Arbeit nicht nur bestätigt, sondern kann im Hinblick auf die zugrunde liegenden molekularen Prozesse konkretisiert werden. In dem hier erweiterten Modell wird die initiale *raft*-Rekrutierung von Vav durch die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 vermittelt. Vav bindet über die SH2-Domäne an phosphoryliertes SLP-65 und die Guaninnucleotid-Austausch-Funktion wird durch das SH3-bindende Motiv reguliert. Daher unterliegt Vav bei einer Deletion dieser SH3-Bindedomäne keiner Regulation mehr und Rho-GTPasen werden verstärkt aktiviert. Das führt zu einer erhöhten JNK, p38 und NFAT/AP-1-Aktivierung. Die Tatsache, dass Grb2 mit inaktiver C-SH3-Domäne nicht die gleichen Effekte auf die NFAT/AP-1-Aktivierung ausübt, könnte bedeuten, dass in diesem Fall die Membranrekrutierung von Vav in die Nähe von SLP-65 gestört ist und SLP-65 daher nicht die anschließende regulatorische Funktion effizient ausüben kann. Demnach wird Vav von Grb2 nicht korrekt in den *rafts* lokalisiert. Dadurch ist SLP-65 nicht in der Lage, die Guaninnucleotid-Austausch-Funktion zu regulieren. Folglich heben sich beide

Effekte gegenseitig auf und es ist kein Unterschied in der NFAT/AP-1-Aktivierung zu verzeichnen.

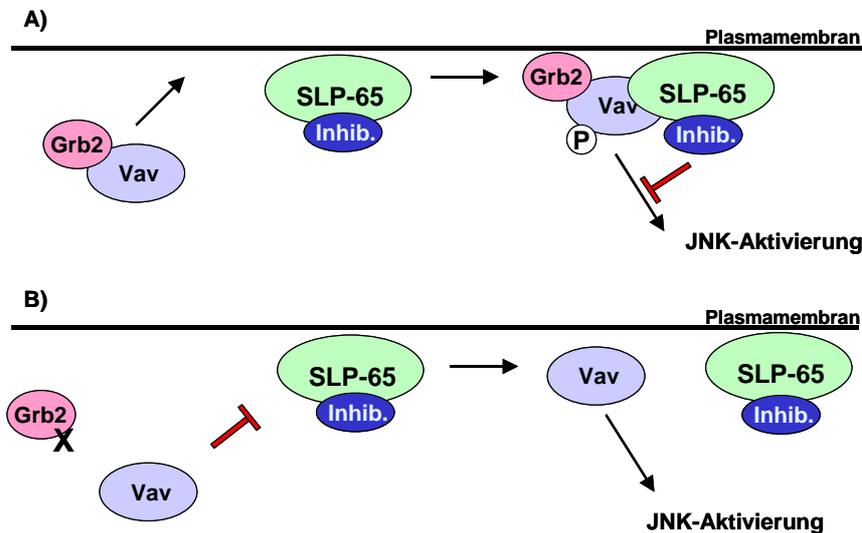


Abb. 7.01 Modell zur Erklärung der regulatorischen Funktion des SH3-Bindemotivs von SLP-65

Grb2 initiiert die Membranlokalisation von Vav. SLP-65 stabilisiert Vav an der Membran. An das atypische SH3-Bindemotiv ist ein noch unbekannter Inhibitor gebunden, der möglicherweise über die Phosphorylierung des inhibitorischen Tyr-Restes von Vav die GEF-Aktivität reguliert (A). Ist die C-terminale SH3-Domäne inaktiv kann Vav nicht mehr effizient an die Membran rekrutiert werden. Durch die fehlende räumliche Nähe zu SLP-65 kann die regulatorische Funktion auch nicht mehr ausgeübt werden (B).

Im Hinblick auf die Frage, wie die inhibitorische Funktion von SLP-65 auf die NFAT/AP-1-Aktivierung vermittelt werden kann, liefern kürzlich veröffentlichte Daten zur Aktivierung von Vav3 in Jurkat T-Zellen wichtige Anhaltspunkte. Diese weisen eine SLP-76-vermittelte Vav-Aktivierung nach und untermauern das hier aufgestellte Modell. Es wurde gezeigt, dass die SH2-Domäne sowie die beiden SH3-Domänen von Vav3 notwendig für die Membranrekrutierung bzw. Aktivierung sind. Die SH2-Domäne bindet bei diesem Prozess an phosphoryliertes SLP-76 und eine Inaktivierung dieser Domäne bewirkt eine wesentliche Reduktion der NFAT-Aktivierung. Außerdem wurde pY173 von Vav3 in Jurkat T-Zellen eine inhibitorische, regulatorische Funktion nachgewiesen, da der Austausch gegen Phenylalanin zu einer verstärkten NFAT-Aktivierung führte (Charvet et al., 2005). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem unbekanntem Inhibitor um eine Kinase handelt, die das regulatorische Tyrosin von Vav3 phosphoryliert und damit die NFAT-Aktivierung hemmt. Diesen Daten korrelieren vollständig mit dem Modell, dass in dieser Studie für die Regulation der Membranrekrutierung sowie Funktion von Vav3 durch

SLP-65 und Grb2 aufgestellt wurde. Demnach kann auch Gads als potenzieller Effektor, der an das SH3-bindende Motiv von SLP-65 binden könnte, ausgeschlossen werden. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Gads in B-Zellen vom unreifen Stadium bis zur Aktivierung durch entsprechende Antigene exprimiert wird (Yankee et al., 2005). Möglicherweise handelt es sich bei Gads um einen höher affinen Bindungspartner für SLP-65, der in unreifen B-Zellen für die Weiterleitung bestimmter Signale verantwortlich ist, die Grb2 nicht vermitteln kann. Aber es kann nach den in dieser Arbeit erhobenen Daten ausgeschlossen werden, dass Gads in B-Zellen die gleiche Funktion übernimmt wie in T-Zellen, da gezeigt wurde, dass SLP-65 im Gegensatz zu SLP-76 nicht über die Bindung an Gads an LAT rekrutiert wird und so das Ca^{2+} -Signal weiterleitet (Abb. 6.18).

Weiterführende Studien sollten untersuchen, welche Kinase für die Phosphorylierung dieses regulatorischen Tyrosinrestes von Vav3 verantwortlich ist. Dadurch könnte man einen Hinweis auf den unbekannt Inhibitor, der an das atypische SH3-Bindemotiv von SLP-65 gebunden ist, erhalten. Dazu würde sich anbieten, entweder einen *in vitro* Kinase-Assay zu etablieren, mit Vav als Substrat, oder die Phosphorylierung von Vav in den bereits vorhandenen Kinase-defizienten DT40 B-Zellen zu analysieren. Außerdem muss die Bedeutung der SLP-65/Vav-Interaktion experimentell bestätigt werden. Dazu stehen beide *knock-out* Zelllinien zur Verfügung (Ishiai et al., 1999; Inabe et al., 2002). Die Rekonstitution dieser Zellen mit verschiedenen Mutanten, z.B. einer Y→F Mutation im Vav-bindenden YENP-Motiv von SLP-65 oder Vav mit inaktiver SH2-Domäne, sollte über die Messungen der NFAT/AP-1-Aktivierung Aufschluss darüber geben, ob die SLP-65/Vav-Interaktion für diesen Signalweg von Bedeutung ist.

Die hier durchgeführte Untersuchung zur Klärung der funktionellen Bedeutung des atypischen SH3-Bindemotivs von SLP-65 führte zu dem zentralen Ergebnis: der Identifizierung der regulatorischen Funktion von SLP-65 auf die NFAT/AP-1-Aktivierung über die MAPKs JNK und p38. Bisher wurden nur den Phosphotyrosinmotiven von SLP-65 über die Modulation des Ca^{2+} -Einstroms eine aktivierende Funktion auf die NFAT-abhängige Transkription nachgewiesen (Chiu et al., 2002). Die in dieser Studie präsentierten Daten belegen, dass auch die SH3-bindende Region einen Einfluss auf die Regulation der BCR-initiierten Transkription ausübt. In diesem Fall aber über den Transkriptionsfaktor AP-1, da dieser regulatorische Einfluss vollkommen unabhängig vom Ca^{2+} -Signal ist. Zudem wurde gezeigt, dass die regulatorische Bedeutung von SLP-65 eine zweite Funktion des atypischen SH3-bindenden Motivs ist, da die Bindung an Grb2

dafür nicht verantwortlich ist. AP-1 reguliert hauptsächlich über die Komponente Jun das Überleben und Sterben von Zellen durch die Transkription von Zell-Zyklus-Regulatoren und Tumorsuppressor-Proteinen (Shaulian und Karin, 2001). Diese neue Funktion von SLP-65 steht im exakten Gegensatz zu der Aufgabe dieses Motivs von SLP-76. Die Deletion führt bei SLP-65 zu einer verstärkten NFAT/AP-1-Aktivierung, während diese bei SLP-76 in einer verminderten NFAT-Aktivierung resultiert.

7.2.5. Welche biologische Relevanz könnte die atypische SH3-Bindestelle haben?

Eine weitere wichtige Frage, die sich anhand der Daten über das inhibitorisch-wirkende SH3-Bindemotiv von SLP-65 stellt, ist die nach der biologischen Relevanz dieser Bindestelle. Interessant sind in diesem Zusammenhang die zwei SLP-65 Isoformen, die nur in humanen Zellen exprimiert werden. Der Spleißvariante fehlen 23 AS, wovon 9 das atypische SH3-Bindemotiv bilden (Fu et al., 1998). Das bedeutet, in humanen Zellen wird endogen eine SLP-65-Deletionsmutante exprimiert, die eine Erhöhung der NFAT/AP-1-Aktivierung bewirken sollte. Welche Bedeutung könnte diese zweite Isoform für die B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung haben? Auffällig sind die unterschiedlichen Phänotypen SLP-65-defizienter Mäuse und Menschen. Bei Mäusen wurde nur eine unvollständige Blockade in der B-Zell-Entwicklung nachgewiesen und noch eine geringe Anzahl von B-Zellen gelangt in die Peripherie (Pappu et al., 1999). Bei XLA-Patienten, die ein funktionsfähiges *btk*-Gen besitzen, aber Mutationen im *slp-65*-Gen aufweisen, besteht eine absolute Blockade im pre-B-Zell-Stadium, weshalb keine peripheren B-Zellen und ergo auch keine Immunglobuline im Serum vorhanden sind (Minegishi et al., 1999). Diese Unterschiede des humanen und murinen Phänotyps gelten genauso für Defekte im *btk*- und $\lambda 5$ -Gen (Conley et al., 2000). Zusammengefasst bedeutet das, dass die Signalleitung vom humanen pre-BCR einer strikteren Kontrolle unterliegt als die vom murinen pre-BCR (Conley et al., 2000). Außerdem könnte die Expression der zweiten, verkürzten Isoform von SLP-65 im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Phänotypen stehen. Um die Auswirkung der zusätzlichen Isoform auf die Signalleitung vom BCR in humanen Zellen zu untersuchen, wäre ein Zellsystem erforderlich, das die Expression der beiden Isoformen einzeln und in Kombination ermöglicht. Dazu bieten sich die in dieser Arbeit etablierten rekonstituierten *slp-65*^{-/-} DT40 B-Zellen an. Die Zellen, die entweder chSLP-65wt oder chSLP-65 Δ 261-269 exprimieren, stellen das Zellsystem zur Untersuchung der größeren bzw. kleineren Isoform von hSLP-65 dar. Es fehlt nur noch die Zelllinie, die beide Proteine exprimiert. Diese könnte durch Transfektion von DT40wt Zellen mit dem Expressionsplasmid für Δ 261-269 generiert werden oder durch die

Transfektion der rekonstituierten Zellen mit dem jeweils anderen Konstrukt. Die Untersuchung der NFAT/AP-1-Aktivierung sollte dann zeigen, ob ein dominant-negativer oder -positiver Effekt einer SLP-65 Isoform besteht oder ob sich die beschriebenen Auswirkungen gegenseitig aufheben. Aufschlussreich wäre auch die Rekonstitution von SLP-65-defizienten Mäusen mit der Deletionsmutante. Anhand dieses Maus-Modells könnte der Einfluss der SH3-Bindestelle von SLP-65 auf die B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung adressiert werden. Die Expression der Deletionsmutante unter der Kontrolle eines B-Zell-spezifischen Promotors in wildtypischen Mäusen würde die Untersuchung beider Isoformen ermöglichen. Die Kreuzung dieser Mäuse mit *xid*-Mäusen könnte die Frage beantworten, ob die Expression von zwei SLP-65-Isoformen die striktere Kontrolle der Signalleitung vom humanen pre-BCRs im Gegensatz zum murinen pre-BCR bedingt.

Im Rahmen dieser Studie konnte ein Modellsystem für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der atypischen SH3-Binderegion von SLP-65 etabliert werden. Darüber hinaus kann dieses System in Zukunft einfach erweitert werden, um die biologische Relevanz der Expression von zwei SLP-65 Isoformen, wie sie in humanen Zellen auftritt, im Detail zu untersuchen.

7.3. Die funktionelle Bedeutung der SH2-Domäne von SLP-65 für die Signalleitung vom BCR

Eine weitere Domäne von SLP-65, über deren Funktion noch keine Daten vorhanden sind, ist die SH2-Domäne am C-Terminus des Proteins. Die Bedeutung von Protein-Interaktionsdomänen für die Signalleitung wird am Phänotyp der *xid*-Maus deutlich (Rawlings et al., 1993). Eine defekte Btk-SH2-Domäne führt zum Verlust der BCR-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung (Takata et al., 1996). Da der Phänotyp der SLP-65-defizienten Maus dem der *xid*-Maus ähnelt, könnte eine defekte SLP-65-SH2-Domäne ähnliche Effekte auf das Immunsystem ausüben. Um die Bedeutung dieser Phosphotyrosin-bindenden Domäne für die Signaltransduktion nach BCR-Quervernetzung zu untersuchen, wurde diese in einem Konstrukt mutiert und in einem anderen deletiert. Ein potenzieller Einfluss dieser Mutanten im Vergleich zu wildtypischen SLP-65 könnte sich auf die Phosphorylierungskaskade sowie das Ca^{2+} -Signal auswirken. Daher wurden diese Mutanten in SLP-65-defizienten Zellen exprimiert und die Ca^{2+} -Mobilisierung nach Stimulation über den BCR untersucht (Abb. 6.31) Die Messungen ergaben, dass die SH2-

Domäne von essenzieller Bedeutung für den BCR-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom ist, da die Mutanten im Vergleich zu wildtypischem SLP-65 kein Ca^{2+} mehr mobilisieren können. Dieser Effekt kann nicht auf die fehlende Phosphorylierung zurückgeführt werden, da beide Mutanten sowie wildtypisches SLP-65 nach BCR-Quervernetzung phosphoryliert werden (Abb. 6.30). Demnach ist ein wichtiger Punkt, dass die Phosphorylierung von SLP-65 nicht von der SH2-Domäne abhängig ist. Daher muss die Funktion der SH2-Domäne, Ca^{2+} freizusetzen, der Phosphorylierung von SLP-65 nachgeschaltet sein. Eine Möglichkeit ist, dass die SH2-Domäne eine bedeutende Rolle bei der Formierung des Calcium-Initiationskomplexes spielt. Welche Bindungspartner der SH2-Domäne könnten die Regulation des Ca^{2+} -Signals vermitteln? Ein potenzieller Mechanismus wäre die Rekrutierung an Ig- α , die notwendig sein könnte, um SLP-65 und eventuelle Bindungspartner an die Membran oder in die Nähe des BCR zu bringen (Engels et al., 2001). Da keine Ig- α -defiziente Zelllinie verfügbar ist, haben Kabak et al. die Funktion von Y204 im cytoplasmatischen Teil von Ig- α , das für die Rekrutierung von SLP-65 verantwortlich ist, in Form eines chimären Rezeptors zwischen PDGFR β und der cytoplasmatischen Region von Ig- α untersucht (Kabak et al., 2002). Die Ca^{2+} -Mobilisierung nach Quervernetzung des chimären Rezeptors verlief in Zellen, die eine Y204F Mutante exprimierten, sehr ähnlich wie in wildtypischen Zellen. In diesem Fall konnte kein Einfluss auf das BCR-vermittelte Ca^{2+} -Signal, aber eine regulatorische Funktion bei der Rekrutierung des BCR/Antigen-Komplexes in das MIIC-Kompartiment festgestellt werden (Siemasko et al., 2002). Nach diesen Daten hat die Bindung zwischen Ig- α und SLP-65 wahrscheinlich keine Auswirkung auf das Ca^{2+} -Signal.

Der zweite bekannte Bindungspartner der SH2-Domäne ist HPK-1. Da diese Serin/Threonin-Kinase die MAPK-Signalwege beeinflusst, ist es unwahrscheinlich, dass sie als möglicher Membrananker für SLP-65 fungiert (Boomer und Tan, 2005).

Ein weiterer möglicher Kandidat wäre Syk. Diese B-Zell-Kinase besitzt am C-Terminus einen Tyrosinrest, der in ZAP-70 nicht enthalten ist. Dass die Expression von SLP-65 in SLP-76-defizienten Jurkat T-Zellen erst zur Rekonstitution des Ca^{2+} -Signals führt, wenn Syk coexprimiert wird, könnte dadurch erklärt werden, dass die SLP-65-SH2-Domäne nicht an ZAP-70 binden und der Calcium-Initiationskomplex sich nicht formieren kann. Für diese Hypothese spricht auch, dass in diesem Zellhintergrund die Kinase- und die Tandem-SH2-Domänen nicht wichtig für die Ca^{2+} -Mobilisierung sind. Demnach muss Syk eine Art Adapterfunktion bei der SLP-65-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisierung übernehmen. Diese kann wahrscheinlich auf den C-Terminus zurückgeführt werden, in dem Syk über

einen Tyrosinrest verfügt, der in ZAP-70 nicht enthalten ist (unveröffentlichte Daten von Dr. Ablis Abdulla und Stephan Ewers). Des Weiteren wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass die SH2-Domäne nicht für die Phosphorylierung von SLP-65 notwendig ist. Daher muss die Interaktion von SLP-65 und Syk insbesondere wichtig für die Formation des Calcium-Initiationskomplexes sein. Möglich ist, dass SLP-65 über die SH2-Domäne an den phosphorylierten C-Terminus von Syk bindet und dadurch eine Konformationsänderung von SLP-65 induziert wird, wie sie auch schon für viele andere signalleitende Proteine, wie z.B. Syk oder Src-Kinasen beschrieben wurde (zur Übersicht: Roskoski et al., 2004). Durch diese induzierte Konformationsänderung von SLP-65 wird die Bindung der anderen Komponenten des Calcium-Initiationskomplexes ermöglicht und Ca^{2+} freigesetzt. Demzufolge übt Syk eine strukturinduzierende Funktion auf SLP-65 aus. Diese Hypothese erklärt auch, weshalb die Deletionsmutante (chSLP-65 Δ SH2) phosphoryliert wird, aber kein Ca^{2+} -Signal zu detektieren ist. Um dieses Modell zu bestätigen, werden bereits Experimente durchgeführt, die die Interaktion zwischen der SLP-65-SH2-Domäne und dem C-Terminus von Syk belegen sollen.

Die Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, belegen eindeutig, dass die SH2-Domäne von SLP-65 – ähnlich wie die von Btk - von wesentlicher Bedeutung für die Ca^{2+} -Mobilisierung nach Ligation des BCRs ist. Im Gegensatz dazu ist diese Domäne nicht für die Phosphorylierung von SLP-65 notwendig. Erstmals wurde gezeigt, dass nicht nur die Phosphotyrosinmotive von SLP-65 eine regulatorische Funktion auf den Ca^{2+} -Einstrom durch die stimulationsabhängige Rekrutierung von Effektormolekülen ausüben, sondern die SH2-Domäne maßgeblich an der Formation dieser Signalmoleküle beteiligt ist. Damit konnte ein entscheidender Beitrag zur Aufschlüsselung der zentralen Rolle von SLP-65 bei der Organisation und Regulation Ca^{2+} -vermittelnder Signalwege geleistet werden.

7.4. Selektive Signalleitung über die Phosphotyrosinmotive von SLP-65 in EBV-infizierten B-Zellen

Das EBV-Protein LMP2A benutzt die Signalwege, die über SLP-65 verlaufen, um die Signalleitung vom BCR zu entkoppeln bzw. die Zellen mit einem Überlebenssignal zu versorgen. Die Phosphorylierung von SLP-65 tritt in EBV-infizierten Zellen konstitutiv auf. Diese ist aber im Vergleich zu stimulierten, ruhenden Zellen schwächer. Außerdem ist bekannt, dass auch Syk konstitutiv aktiv ist, wohingegen aber PLC- γ 2 nicht aktiviert

werden kann (Engels et al., 2001). Dieser Signalweg wird über das Virus selektiv ausgeschaltet, um der Eliminierung durch das Immunsystems zu entgehen. Weiterhin zeigen die Daten von Chiu et al., dass SLP-65 an bestimmten Tyrosinresten phosphoryliert sein muss, um Btk und PLC- γ 2 zu rekrutieren und dadurch das BCR-initiierte Ca²⁺-Signal auszulösen (Chiu et al., 2002). Daher wurde in dieser Studie überprüft, ob diese speziellen Tyrosinreste von SLP-65 in EBV-infizierten Zellen noch phosphoryliert werden oder ob das Virus genau an diesem Punkt der Signalleitung eingreift, um der Immunantwort zu entgehen.

Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein konditionales LCL-System verwendet, das ursprünglich für die Untersuchung der Transformation von ruhenden zu infizierten Zellen auf der Transkriptionsebene etabliert wurde (Kempkes et al., 1996). Dieses System wurde durch die Durchführung entsprechender Kontrollen auch auf die vergleichende Untersuchung der Signaltransduktion zwischen ruhenden und infizierten Zellen erweitert. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein verlässliches, konditionales LCL-System bereitgestellt werden, das die Untersuchung verschiedener LCL-Linien überflüssig macht, die sich in ihrem Phänotyp oft sehr stark unterscheiden .

Um im Detail untersuchen zu können, welche SLP-65-regulierten Signalwege von dem Virus selektiv aktiviert oder inhibiert werden, wurden zum einen die Phosphorylierung der Tyrosinreste von SLP-65 einzeln untersucht und zum anderen die Kapazität von SLP-65 seine SH2-beinhaltenen Interaktionspartner zu rekrutieren, analysiert.

Obwohl die PLC- γ 2-bindenden Tyrosinreste von hSLP-65 (Y84 und Y178) in EBV-infizierten im Vergleich zu ruhenden Zellen kaum phosphoryliert werden (Abb. 6.37), kann PLC- γ 2 in infizierten Zellen schwach stimulationsunabhängig an SLP-65 binden (6.35 Spur 13-16). Folglich kann PLC- γ 2 in virusinfizierten Zellen wahrscheinlich noch rekrutiert werden, aber weitere Daten zeigen eindeutig, dass das Enzym anschließend nicht mehr aktiviert wird (Engels et al., 2001 und Abb. 6.34). Vermutlich ist also die Rekrutierung von PLC- γ 2 an SLP-65 nicht der Schlüssel für das ausbleibende Ca²⁺-Signal in EBV-infizierten Zellen. Folglich stellt sich dann die Frage, ob Btk an SLP-65 rekrutiert und anschließend aktiviert wird. Daten von Baba et al. haben gezeigt, dass die Btk-Aktivierung durch Syk von SLP-65 vermittelt wird (Baba et al., 2001). Die induzierbare Phosphorylierung des Btk-bindenden Tyr-Rests (Y96) erfolgt in EBV-infizierten im Vergleich zu ruhenden Zellen sehr viel schwächer. Die Daten der Präzipitation von SLP-65 über die Btk-SH2-Domäne aus ruhenden und infizierten Zellen vor und nach Stimulation ermöglichen eine eindeutigere Auswertung (Abb. 6.38, Spur 1-4). SLP-65 wird in ruhenden Zellen stimulationsabhängig von der Btk-SH2-Domäne gebunden. Aber im Gegensatz dazu

kann diese Interaktion in EBV-infizierten Zellen nicht mehr detektiert werden. Die Analyse des Aktivierungszustands von Btk zeigt weiterhin, dass die Kinase in EBV-infizierten Zellen weder konstitutiv aktiv ist, noch stimulationsabhängig phosphoryliert wird (Abb. 6.36). Demnach konnte in dieser Studie eindeutig nachgewiesen werden, dass Btk in EBV-infizierten Zellen nicht aktiviert werden kann, was auf die dafür erforderliche Rekrutierung an SLP-65 zurückzuführen ist. Der entsprechende Tyrosinrest von SLP-65 wird in infizierten Zellen kaum phosphoryliert, was die Bindung und die darauffolgende Aktivierung von Btk inhibiert. Das wiederum resultiert in einem Defekt der PLC- γ 2-Aktivierung und des Ca^{2+} -Signals. Eine Inhibierung der Btk-Bindung an SLP-65 reicht aus, um eine Aktivierung von PLC- γ 2 zu unterbinden, da das einer inaktiven Btk-SH2-Domäne entsprechen würde, was zur Minimierung des Ca^{2+} -Signals führt (Takata et al., 1996).

Folglich bestätigen die Ergebnisse dieser Studie zum einen die Daten von Baba et al., dass Btk über die SH2-Domäne an SLP-65 rekrutiert werden muss, um anschließend aktiviert zu werden (Baba et al., 2001). Außerdem ermöglichen sie es den Mechanismus aufzuschlüsseln, wie das Virus es schafft, die BCR-initiierte Ca^{2+} -Signalleitung zu entkoppeln.

In dieser Arbeit wurde erstmals ein konditionales LCL-System für die vergleichende Analyse der Signaltransduktion in ruhenden und infizierten Zellen eingesetzt. Anhand dieses Systems wurde der molekulare Mechanismus identifiziert, wie EBV die Signalleitung über SLP-65 moduliert, um die Formation des Calcium-Initiationskomplexes zu inhibieren. Dadurch entgeht das Virus der Eliminierung durch das Immunsystem und kann in infizierten Zellen persistieren.

In dieser Studie wurde die Bedeutung der SH2-Domäne und der SH3-bindenden Region von SLP-65 charakterisiert sowie ein entscheidender Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen der EBV-Infektion geleistet. Im Rahmen einer Kooperation ist es kürzlich gelungen zwei kleine inhibitorisch-wirkende RNA-Moleküle, so genannte Aptamere, herzustellen, die hochspezifisch zum einen die SH2-Domäne und zum anderen das atypische SH3-Bindemotiv binden. Bei diesen Molekülen handelt es sich um extrem spezifische Verbindungen, die von großer pharmakologischer Bedeutung sein können. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit sollte es möglich sein, durch den Einsatz des einen Aptamers die Immunantwort zu aktivieren und durch den anderen Aptamer zu supprimieren.

8 Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T., and Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* **4**, 301-308.
- Aman, M. J., and Ravichandran, K. S. (2000). A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux. *Curr Biol* **10**, 393-396.
- Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T., and Sugamura, K. (1999). Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. *J Exp Med* **189**, 1383-1390.
- Baba, Y., Hashimoto, S., Matsushita, M., Watanabe, D., Kishimoto, T., Kurosaki, T., and Tsukada, S. (2001). BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2582-2586.
- Ballard, D. W. (2001). Molecular mechanisms in lymphocyte activation and growth. *Immunol Res* **23**, 157-166.
- Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* **200**, 315-319.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- Boomer, J. S., and Tan, T. H. (2005). Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins. *J Cell Biochem* **95**, 34-44.
- Brdicka, T., Imrich, M., Angelisova, P., Brdickova, N., Horvath, O., Spicka, J., Hilgert, I., Luskova, P., Draber, P., Novak, P., Engels, N., Wienands, J., Simeoni, L., Osterreicher, J., Aguado, E., Malissen, M., Schraven, B., and Horejsi, V. (2002). Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med* **196**, 1617-1626.
- Buday, L. (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 187-204.
- Buday, L. (1996). Interactions of Cbl with two adapter proteins, Grb2 and Crk, upon T cell activation. *J Biol Chem* **271**, 6159-6163.

- Burnet, F. M. (1959). Biological approach to carcinogenesis. *Acta Unio Int Contra Cancrum* **15**, 31-34.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Cao, M. Y., Davidson, D., Yu, J., Latour, S., and Veillette, A. (1999). Clnk, a novel SLP-76-related adaptor molecule expressed in cytokine-stimulated hemopoietic cells. *J Exp Med* **190**, 1527-1534.
- Cesareni, G., Panni, S., Nardelli, G., and Castagnoli, L. (2002). Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Lett* **513**, 38-44.
- Charvet, C., Canonigo, A. J., Billadeau, D. D., and Altman, A. (2005). Membrane Localization and Function of Vav3 in T Cells Depend on Its Association with the Adapter SLP-76. *J Biol Chem* **280**, 15289-15299.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chem Rev* **101**, 2449-2476.
- Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., and Pierce, S. K. (1999). A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* **190**, 1549-1560.
- Chiu, C. W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (2002). BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *Embo J* **21**, 6461-6472.
- Conley, M. E., Rohrer, J., Rapalus, L., Boylin, E. C., and Minegishi, Y. (2000). Defects in early B-cell development: comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse. *Immunol Rev* **178**, 75-90.
- Dittmann, K. (2002). Funktionsanalyse der Protein-Interaktionsdomänen des intrazellulären Adapterproteins SLP-65. Diplomarbeit. Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, Biochemie I.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., and Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858.

- Durand, D. B., Shaw, J. P., Bush, M. R., Replogle, R. E., Belagaje, R., and Crabtree, G. R. (1988). Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol* **8**, 1715-1724.
- Dykstra, M. L., Longnecker, R., and Pierce, S. K. (2001). Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* **14**, 57-67.
- Edman, P., and Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem* **1**, 80-91.
- Ehrlich, P. (1900). On immunity, with special reference to cell-life. *Collected papers of Paul Ehrlich* **2**, 178-195.
- Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schafer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jungling, E., Rocks, O., Luckhoff, A., and Frey, J. (2002). Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett* **523**, 193-199.
- Engels, N., Merchant, M., Pappu, R., Chan, A. C., Longnecker, R., and Wienands, J. (2001). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *J Exp Med* **194**, 255-264.
- Engels, N., Wollscheid, B., and Wienands, J. (2001). Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. *Eur J Immunol* **31**, 2126-2134.
- Fiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Mattila, P. S., Crabtree, G. R., and Herzenberg, L. A. (1990). Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev* **4**, 1823-1834.
- Fischer, K. D., Kong, Y. Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L. E., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M. P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A., and Penninger, J. M. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* **8**, 554-562.
- Flemming, A., Brummer, T., Reth, M., and Jumaa, H. (2003). The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion. *Nat Immunol* **4**, 38-43.
- Fu, C., and Chan, A. C. (1997). Identification of two tyrosine phosphoproteins, pp70 and pp68, which interact with phospholipase Cgamma, Grb2, and Vav after B cell antigen receptor activation. *J Biol Chem* **272**, 27362-27368.

- Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**, 93-103.
- Ganju, R. K., Brubaker, S. A., Chernock, R. D., Avraham, S., and Groopman, J. E. (2000). Beta-chemokine receptor CCR5 signals through SHP1, SHP2, and Syk. *J Biol Chem* **275**, 17263-17268.
- Goitsuka, R., Fujimura, Y., Mamada, H., Umeda, A., Morimura, T., Uetsuka, K., Doi, K., Tsuji, S., and Kitamura, D. (1998). BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* **161**, 5804-5808.
- Goitsuka, R., Kanazashi, H., Sasanuma, H., Fujimura, Y., Hidaka, Y., Tatsuno, A., Ra, C., Hayashi, K., and Kitamura, D. (2000). A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clnk involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation. *Int Immunol* **12**, 573-580.
- Goitsuka, R., Tatsuno, A., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Kitamura, D. (2001). MIST functions through distinct domains in immunoreceptor signaling in the presence and absence of LAT. *J Biol Chem* **276**, 36043-36050.
- Gomez del Arco, P., Martinez-Martinez, S., Maldonado, J. L., Ortega-Perez, I., and Redondo, J. M. (2000). A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem* **275**, 13872-13878.
- Goodnow, C. C., Cyster, J. G., Hartley, S. B., Bell, S. E., Cooke, M. P., Healy, J. I., Akkaraju, S., Rathmell, J. C., Pogue, S. L., and Shokat, K. P. (1995). Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol* **59**, 279-368.
- Gowans, J. L., Gesner, B. L., and McGregor, D. D. (1961). Biological Activity of the Leukocyte. *Wostenholme GEW, O'Connor M. eds. CIBA Foundation Study Group No. 10*, 32-43.
- Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I., and Rawlings, D. J. (2000). Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* **13**, 243-253.
- Guruprasad, L., Dhanaraj, V., Timm, D., Blundell, T. L., Gout, I., and Waterfield, M. D. (1995). The crystal structure of the N-terminal SH3 domain of Grb2. *J Mol Biol* **248**, 856-866.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

- Harkioliaki, M., Lewitzky, M., Gilbert, R. J., Jones, E. Y., Bourette, R. P., Mouchiroud, G., Sondermann, H., Moarefi, I., and Feller, S. M. (2003). Structural basis for SH3 domain-mediated high-affinity binding between Mona/Gads and SLP-76. *Embo J* **22**, 2571-2582.
- Hayashi, K., Nittono, R., Okamoto, N., Tsuji, S., Hara, Y., Goitsuka, R., and Kitamura, D. (2000). The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2755-2760.
- Horsley, V., and Pavlath, G. K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* **156**, 771-774.
- Ikeda, M., Ikeda, A., and Longnecker, R. (2001). PY motifs of Epstein-Barr virus LMP2A regulate protein stability and phosphorylation of LMP2A-associated proteins. *J Virol* **75**, 5711-5718.
- Inabe, K., Ishiai, M., Scharenberg, A. M., Freshney, N., Downward, J., and Kurosaki, T. (2002). Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp Med* **195**, 189-200.
- Ishiai, M., Kurosaki, M., Pappu, R., Okawa, K., Ronko, I., Fu, C., Shibata, M., Iwamatsu, A., Chan, A. C., and Kurosaki, T. (1999). BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and Rac1-JNK in B cells. *Immunity* **10**, 117-125.
- Ishiai, M., Sugawara, H., Kurosaki, M., and Kurosaki, T. (1999). Cutting edge: association of phospholipase C-gamma 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. *J Immunol* **163**, 1746-1749.
- Jackman, J. K., Motto, D. G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C. W., Peltz, G. A., Koretzky, G. A., and Findell, P. R. (1995). Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* **270**, 7029-7032.
- Janssen, E., and Zhang, W. (2003). Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **15**, 269-276.
- Johnson, S. A., Pleiman, C. M., Pao, L., Schneringer, J., Hippen, K., and Cambier, J. C. (1995). Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* **155**, 4596-4603.
- Jordan, M. S., Singer, A. L., and Koretzky, G. A. (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* **4**, 110-116.

- Jumaa, H., Bossaller, L., Portugal, K., Storch, B., Lotz, M., Flemming, A., Schrappe, M., Postila, V., Riikonen, P., Pelkonen, J., Niemeyer, C. M., and Reth, M. (2003). Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **423**, 452-456.
- Jumaa, H., Wollscheid, B., Mitterer, M., Wienands, J., Reth, M., and Nielsen, P. J. (1999). Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65. *Immunity* **11**, 547-554.
- Kabak, S., Skaggs, B. J., Gold, M. R., Affolter, M., West, K. L., Foster, M. S., Siemasko, K., Chan, A. C., Aebersold, R., and Clark, M. R. (2002). The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol Cell Biol* **22**, 2524-2535.
- Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Pawlita, M., Falk, M., Hammerschmidt, W., and Bornkamm, G. W. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol* **77 (Pt 2)**, 227-237.
- Kerseboom, R., Middendorp, S., Dingjan, G. M., Dahlenborg, K., Reth, M., Jumaa, H., and Hendriks, R. W. (2003). Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *J Exp Med* **198**, 91-98.
- Khan, W. N., Alt, F. W., Gerstein, R. M., Malynn, B. A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A. B., Herzenberg, L. A., and et al. (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* **3**, 283-299.
- Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E., and Siraganian, R. P. (1996). Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. *Mol Cell Biol* **16**, 1471-1478.
- Kohler, F., Storch, B., Kulathu, Y., Herzog, S., Kuppig, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2005). A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65. *Nat Immunol* **6**, 204-210.
- Kraus, M., Pao, L. I., Reichlin, A., Hu, Y., Canono, B., Cambier, J. C., Nussenzweig, M. C., and Rajewsky, K. (2001). Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates

- or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail. *J Exp Med* **194**, 455-469.
- Kumar, L., Pivniouk, V., de la Fuente, M. A., Laouini, D., and Geha, R. S. (2002). Differential role of SLP-76 domains in T cell development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 884-889.
- Kurosaki, T. (2002). Regulation of B cell fates by BCR signaling components. *Curr Opin Immunol* **14**, 341-347.
- Kurosaki, T., Johnson, S. A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H., and Cambier, J. C. (1995). Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* **182**, 1815-1823.
- Kurosaki, T., and Tsukada, S. (2000). BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* **12**, 1-5.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-869.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, K. P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073-1083.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., and et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739-746.
- Leo, A., Wienands, J., Baier, G., Horejsi, V., and Schraven, B. (2002). Adapters in lymphocyte signaling. *J Clin Invest* **109**, 301-309.
- Lewitzky, M., Kardinal, C., Gehring, N. H., Schmidt, E. K., Konkol, B., Eulitz, M., Birchmeier, W., Schaeper, U., and Feller, S. M. (2001). The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene* **20**, 1052-1062.

- Lindqvist, C., Karp, M., Akerman, K., and Oker-Blom, C. (1994). Flow cytometric analysis of bioluminescence emitted by recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cytometry* **15**, 207-212.
- Liou, J., Kiefer, F., Dang, A., Hashimoto, A., Cobb, M. H., Kurosaki, T., and Weiss, A. (2000). HPK1 is activated by lymphocyte antigen receptors and negatively regulates AP-1. *Immunity* **12**, 399-408.
- Loffert, D., Schaal, S., Ehlich, A., Hardy, R. R., Zou, Y. R., Muller, W., and Rajewsky, K. (1994). Early B-cell development in the mouse: insights from mutations introduced by gene targeting. *Immunol Rev* **137**, 135-153.
- Longnecker, R. (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* **79**, 175-200.
- Longnecker, R., Merchant, M., Brown, M. E., Fruehling, S., Bickford, J. O., Ikeda, M., and Harty, R. N. (2000). WW- and SH3-domain interactions with Epstein-Barr virus LMP2A. *Exp Cell Res* **257**, 332-340.
- Longnecker, R., and Miller, C. L. (1996). Regulation of Epstein-Barr virus latency by latent membrane protein 2. *Trends Microbiol* **4**, 38-42.
- Lupher, M. L., Jr., Songyang, Z., Shoelson, S. E., Cantley, L. C., and Band, H. (1997). The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem* **272**, 33140-33144.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489.
- Matskova, L., Ernberg, I., Pawson, T., and Winberg, G. (2001). C-terminal domain of the Epstein-Barr virus LMP2A membrane protein contains a clustering signal. *J Virol* **75**, 10941-10949.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* **189**, 1-23.
- Merchant, M., Caldwell, R. G., and Longnecker, R. (2000). The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol* **74**, 9115-9124.
- Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E., Burkhardt, A. L., Bolen, J. B., and Longnecker, R. (1994). Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively

- regulating tyrosine kinases involved in slg-mediated signal transduction. *Infect Agents Dis* **3**, 128-136.
- Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E., and Longnecker, R. (1994). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 772-776.
- Miller, C. L., Longnecker, R., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J Virol* **67**, 3087-3094.
- Minegishi, Y., Rohrer, J., Coustan-Smith, E., Lederman, H. M., Pappu, R., Campana, D., Chan, A. C., and Conley, M. E. (1999). An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* **286**, 1954-1957.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**, 1063-1066.
- Motto, D. G., Ross, S. E., Wu, J., Hendricks-Taylor, L. R., and Koretzky, G. A. (1996). Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in T cell receptor-mediated interleukin 2 production. *J Exp Med* **183**, 1937-1943.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Musci, M. A., Motto, D. G., Ross, S. E., Fang, N., and Koretzky, G. A. (1997). Three domains of SLP-76 are required for its optimal function in a T cell line. *J Immunol* **159**, 1639-1647.
- Myung, P. S., Derimanov, G. S., Jordan, M. S., Punt, J. A., Liu, Q. H., Judd, B. A., Meyers, E. E., Sigmund, C. D., Freedman, B. D., and Koretzky, G. A. (2001). Differential requirement for SLP-76 domains in T cell development and function. *Immunity* **15**, 1011-1026.
- Nishida, M., Nagata, K., Hachimori, Y., Horiuchi, M., Ogura, K., Mandiyan, V., Schlessinger, J., and Inagaki, F. (2001). Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *Embo J* **20**, 2995-3007.
- Oehrl, W., Kardinal, C., Ruf, S., Adermann, K., Groffen, J., Feng, G. S., Blenis, J., Tan, T. H., and Feller, S. M. (1998). The germinal center kinase (GCK)-related protein kinases HPK1 and KHS are candidates for highly selective signal transducers of Crk family adapter proteins. *Oncogene* **17**, 1893-1901.

- Oh-hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2003). Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med* **198**, 1841-1851.
- Paolini, R., Molfetta, R., Beitz, L. O., Zhang, J., Scharenberg, A. M., Piccoli, M., Frati, L., Siraganian, R., and Santoni, A. (2002). Activation of Syk tyrosine kinase is required for c-Cbl-mediated ubiquitination of Fcepsilon RI and Syk in RBL cells. *J Biol Chem* **277**, 36940-36947.
- Pappu, R., Cheng, A. M., Li, B., Gong, Q., Chiu, C., Griffin, N., White, M., Sleckman, B. P., and Chan, A. C. (1999). Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science* **286**, 1949-1954.
- Pawson, T., Raina, M., and Nash, P. (2002). Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett* **513**, 2-10.
- Peterson, E. J., Woods, M. L., Dmowski, S. A., Derimanov, G., Jordan, M. S., Wu, J. N., Myung, P. S., Liu, Q. H., Pribila, J. T., Freedman, B. D., Shimizu, Y., and Koretzky, G. A. (2001). Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* **293**, 2263-2265.
- Pierce, M. M., Raman, C. S., and Nall, B. T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**, 213-221.
- Pivniouk, V., Tsitsikov, E., Swinton, P., Rathbun, G., Alt, F. W., and Geha, R. S. (1998). Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* **94**, 229-238.
- Platanias, L. C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **101**, 4667-4679.
- Porter, C. M., Havens, M. A., and Clipstone, N. A. (2000). Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J Biol Chem* **275**, 3543-3551.
- Ramos-Morales, F., Romero, F., Schweighoffer, F., Bismuth, G., Camonis, J., Tortolero, M., and Fischer, S. (1995). The proline-rich region of Vav binds to Grb2 and Grb3-3. *Oncogene* **11**, 1665-1669.
- Rawlings, D. J., Saffran, D. C., Tsukada, S., Largaespada, D. A., Grimaldi, J. C., Cohen, L., Mohr, R. N., Bazan, J. F., Howard, M., Copeland, N. G., and et al. (1993).

- Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* **261**, 358-361.
- Reichlin, A., Hu, Y., Meffre, E., Nagaoka, H., Gong, S., Kraus, M., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. (2001). B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta. *J Exp Med* **193**, 13-23.
- Reth, M., and Wienands, J. (1999). The maintenance and the activation signal of the B-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 323-328.
- Rickles, R. J., Botfield, M. C., Weng, Z., Taylor, J. A., Green, O. M., Brugge, J. S., and Zoller, M. J. (1994). Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *Embo J* **13**, 5598-5604.
- Robinson, M. J., and Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-186.
- Roskoski, R., Jr. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 1155-1164.
- Roux, P. P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-344.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sauer, K., Liou, J., Singh, S. B., Yablonski, D., Weiss, A., and Perlmutter, R. M. (2001). Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J Biol Chem* **276**, 45207-45216.
- Saxton, T. M., Cheng, A. M., Ong, S. H., Lu, Y., Sakai, R., Cross, J. C., and Pawson, T. (2001). Gene dosage-dependent functions for phosphotyrosine-Grb2 signaling during mammalian tissue morphogenesis. *Curr Biol* **11**, 662-670.
- Sayegh, C. E., Demaries, S. L., Pike, K. A., Friedman, J. E., and Ratcliffe, M. J. (2000). The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunol Rev* **175**, 187-200.

- Schamel, W. W., and Reth, M. (2000). Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5-14.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., and Schlissel, M. S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* **10**, 359-383.
- Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* **7**, 202-210.
- Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Avots, A., Chuvpilo, S., Klein-Hessling, S., Jha, M. K., Kondo, E., Pagel, P., Schulze-Luehrmann, J., and Palmetshofer, A. (2004). NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1166-1170.
- Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Chuvpilo, S., Jankevics, E., Klein-Hessling, S., Twardzik, T., and Avots, A. (2000). The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1498**, 1-18.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-2400.
- Sideras, P., Muller, S., Shiels, H., Jin, H., Khan, W. N., Nilsson, L., Parkinson, E., Thomas, J. D., Branden, L., Larsson, I., and et al. (1994). Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J Immunol* **153**, 5607-5617.
- Siemasko, K., Skaggs, B. J., Kabak, S., Williamson, E., Brown, B. K., Song, W., and Clark, M. R. (2002). Receptor-facilitated antigen presentation requires the recruitment of B cell linker protein to Igalpha. *J Immunol* **168**, 2127-2138.
- Simon, J. A., and Schreiber, S. L. (1995). Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chem Biol* **2**, 53-60.
- Singer, A. L., Bunnell, S. C., Obstfeld, A. E., Jordan, M. S., Wu, J. N., Myung, P. S., Samelson, L. E., and Koretzky, G. A. (2004). Roles of the proline-rich domain in SLP-76 subcellular localization and T cell function. *J Biol Chem* **279**, 15481-15490.
- Snapper, S. B., Rosen, F. S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C. H., Hagemann, T. L., Kwan, S. P., Ferrini, R., Davidson, L., Bhan, A. K., and Alt, F. W. (1998). Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* **9**, 81-91.

- Sparks, A. B., Rider, J. E., Hoffman, N. G., Fowlkes, D. M., Quillam, L. A., and Kay, B. K. (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1540-1544.
- Su, Y. W., and Jumaa, H. (2003). LAT links the pre-BCR to calcium signaling. *Immunity* **19**, 295-305.
- Su, Y. W., Zhang, Y., Schweikert, J., Koretzky, G. A., Reth, M., and Wienands, J. (1999). Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur J Immunol* **29**, 3702-3711.
- Suen, K. L., Bustelo, X. R., Pawson, T., and Barbacid, M. (1993). Molecular cloning of the mouse *grb2* gene: differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol Cell Biol* **13**, 5500-5512.
- Takata, M., and Kurosaki, T. (1996). A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med* **184**, 31-40.
- Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J* **13**, 1341-1349.
- Tan, J. E., Wong, S. C., Gan, S. K., Xu, S., and Lam, K. P. (2001). The adaptor protein BLNK is required for B cell antigen receptor-induced activation of nuclear factor-kappa B and cell cycle entry and survival of B lymphocytes. *J Biol Chem* **276**, 20055-20063.
- Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S., and Yamamura, H. (1991). Molecular cloning of a porcine gene *syk* that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* **266**, 15790-15796.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tsuji, S., Okamoto, M., Yamada, K., Okamoto, N., Goitsuka, R., Arnold, R., Kiefer, F., and Kitamura, D. (2001). B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Exp Med* **194**, 529-539.

- Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L., and Tybulewicz, V. L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* **378**, 298-302.
- Utting, O., Sedgmen, B. J., Watts, T. H., Shi, X., Rottapel, R., Iulianella, A., Lohnes, D., and Veillette, A. (2004). Immune functions in mice lacking Clnk, an SLP-76-related adaptor expressed in a subset of immune cells. *Mol Cell Biol* **24**, 6067-6075.
- Veillette, A., Latour, S., and Davidson, D. (2002). Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu Rev Immunol* **20**, 669-707.
- von Behring, E., and Kitasato, S. (1890). Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Deutsche Medicinische Wochenschrift* **49**.
- Wagner, S. D., and Neuberger, M. S. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* **14**, 441-457.
- Wardenburg, J. B., Fu, C., Jackman, J. K., Flotow, H., Wilkinson, S. E., Williams, D. H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A. C., and Findell, P. R. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem* **271**, 19641-19644.
- Wienands, J. (2000). The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**, 53-76.
- Wienands, J. (2000). Signal transduction elements of the B cell antigen receptor and their role in immunodeficiencies. *Immunobiology* **202**, 120-133.
- Wienands, J., Larbolette, O., and Reth, M. (1996). Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7865-7870.
- Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., and Reth, M. (1998). SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* **188**, 791-795.
- Winberg, G., Matskova, L., Chen, F., Plant, P., Rotin, D., Gish, G., Ingham, R., Ernberg, I., and Pawson, T. (2000). Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **20**, 8526-8535.

- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* **179**, 131-137.
- Wong, J., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (2000). Functional complementation of BLNK by SLP-76 and LAT linker proteins. *J Biol Chem* **275**, 33116-33122.
- Woodside, D. G., Oberfell, A., Leng, L., Wilsbacher, J. L., Miranti, C. K., Brugge, J. S., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2001). Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* **11**, 1799-1804.
- Woodside, D. G., Oberfell, A., Talapatra, A., Calderwood, D. A., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2002). The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem* **277**, 39401-39408.
- Wossning, T., and Reth, M. (2004). B cell antigen receptor assembly and Syk activation in the S2 cell reconstitution system. *Immunol Lett* **92**, 67-73.
- Wu, C. C., Hsu, S. C., Shih, H. M., and Lai, M. Z. (2003). Nuclear factor of activated T cells c is a target of p38 mitogen-activated protein kinase in T cells. *Mol Cell Biol* **23**, 6442-6454.
- Wu, J. N., and Koretzky, G. A. (2004). The SLP-76 family of adapter proteins. *Semin Immunol* **16**, 379-393.
- Wunderlich, L., Farago, A., Downward, J., and Buday, L. (1999). Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* **29**, 1068-1075.
- Yablonski, D., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (2001). Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol Cell Biol* **21**, 4208-4218.
- Yang, T. T., Xiong, Q., Enslin, H., Davis, R. J., and Chow, C. W. (2002). Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* **22**, 3892-3904.
- Yankee, T. M., Draves, K. E., and Clark, E. A. (2005). Expression and function of the adaptor protein Gads in murine B cells. *Eur J Immunol* **35**, 1184-1192.
- Yasuda, T., Maeda, A., Kurosaki, M., Tezuka, T., Hironaka, K., Yamamoto, T., and Kurosaki, T. (2000). Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase C

- (PLC)-gamma2 activation by regulating B cell linker protein-PLC-gamma2 binding. *J Exp Med* **191**, 641-650.
- Ye, Z. S., and Baltimore, D. (1994). Binding of Vav to Grb2 through dimerization of Src homology 3 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12629-12633.
- Yigit, G. (2004). Etablierung eines neuen Modellsystems zur Untersuchung des viralen LMP2A ITAMs in seiner physiologischen Orientierung. Diplomarbeit. Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, Biochemie I.
- Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W., and Schreiber, S. L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-945.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83-92.
- Zhu, Q., Zhang, M., Rawlings, D. J., Vihinen, M., Hagemann, T., Saffran, D. C., Kwan, S. P., Nilsson, L., Smith, C. I., Witte, O. N., and et al. (1994). Deletion within the Src homology domain 3 of Bruton's tyrosine kinase resulting in X-linked agammaglobulinemia (XLA). *J Exp Med* **180**, 461-470.

9 Anhang

9.1. Aminosäuresequenz von mSLP-65

1 MDKLNKITVPASQKLRQLQKMVHDIKNNEGGIMDKIKKLKVKGPPSVPRR

51 DYALDSPADEEEQWSDDFDSDYENPDEHSDSEMYVMPAEETGDDSYEPPP

101 AEQQTRVVHPALPFTRGEYVDNRSSQRHSPPFSKTLPSKPSWPSAKARLA

151 STLPAPNSLQKPQVPPKPKDLLEDEADYVVPVEDNDENYIHPRESSPPPA

201 EKAPMVNRSTKPNSSSKHMSPPGTVAGRNSGVWDSKSSLPAAPSPLPRAG

251 KKPATPLKTTTPVPLPNASNVCEEKPVPAERHRGSSHRQDTVQSPVFPPT

301 QKPVHQKPVPLPRFPEAGSPAADGPFHSFPFNSTFADQEAELLGKWPYAG

351 ACDRKSAAEEALHRSNKDGSFLIRKSSGHDSKQPYTLVAFFNKRVIYNIIPVR

401 FIEATKQYALGKKKNGEYFGSVVEIVNSHQHNPLVLIDSQNNTKDSTRL

451 KYAVKVS

Abb. 9.01 Aminosäuresequenz von mSLP-65

Die postulierten Domänen sind farbig hervorgehoben. Am N-Terminus befindet sich das 45 AS-umfassende Leuzin-Zipper-Motiv (grau). Die fünf Phosphotyrosinmotive sind in türkis und die C-terminale SH2-Domäne in gelb hinterlegt. Das atypische SH3-Bindemotiv PxxxRxxKP ist in blau hervorgehoben.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.01	Signalwege, die nach BCR-Quervernetzung aktiviert werden	4
Abb. 1.02	Domänenstruktur und Bindungspartner der SLP-Proteine	8
Abb. 5.01	Mechanismus der durch die Luciferase katalysierten Reaktion	46
Abb. 5.02	Kristallisationsparameter	50
Abb. 6.01	Expression und Reinigung von mSLP-65 (10 %-iges PAA-Gel; Coomassie gefärbt)	53
Abb. 6.02	Gereinigtes (His) ₆ -mSLP-65 Δ SH2 (10 %-iges PAA-Gel; Coomassie gefärbt)	54
Abb. 6.03	mSLP-76 nach Expression und Reinigung (10%-iges PAA-Gel, Coomassie gefärbt)	55
Abb. 6.04	Gereinigte GST-Fusionsproteine der einzelnen mGrb2-Domänen (10 %-iges PAA-Gel, Coomassie gefärbt)	56
Abb. 6.05	Reinigung verschiedener GST-SH2-Fusionsproteine (10 %-iges PAA-Gel, Coomassie-Färbung)	57
Abb. 6.06	ITC-Messungen von mSLP-65 und den mGrb2-Varianten	60
Abb. 6.07	Präzipitation von chGrb2wt und chGrb2W193K über das Peptid 65-Pro (n=2)	62
Abb. 6.08	ITC-Messung der Bindung 65-Pro und Grb2[C-SH3]	63
Abb. 6.09	Kristalle der Ansätze mGrb2[C-SH3]/65-Pro in Lösungen von Hampton Research	65
Abb. 6.10	Struktur der mGrb2[C-SH3]-Dimere in der Ribbon- und das fehlende SLP-65-Peptid 65-Pro in der Stick-Darstellung (Pymol)	66
Abb. 6.11	Identifizierung der SLP-65-bindenden Domäne(n) von Grb2 (n=5)	68
Abb. 6.12	Ausschnitt des AS-Sequenzvergleichs der beiden humanen SLP-65-Isoformen und die Sequenz des Peptids 65-Pro	68
Abb. 6.13	Rekonstitution von <i>slp-65</i> ^{-/-} DT40 Zellen mit verschiedenen chSLP-65-Mutanten	70
Abb. 6.14	Präzipitation der chSLP-65 Punktmutanten über mGrb2[C-SH3]	71
Abb. 6.15	Rekonstitution der <i>slp-65</i> ^{-/-} DT40 Zellen mit chSLP-65wt bzw. Δ 261-269	72
Abb. 6.16	Präzipitation von chSLP-65 über mGrb2[C-SH3]	73
Abb. 6.17	Tyrosin-Phosphorylierungsmuster der rekonstituierten <i>slp-65</i> ^{-/-} DT40 Zellen mit chSLP-65wt bzw. Δ 261-269	74
Abb. 6.18	Ca ²⁺ -Einstrom aus intrazellulären Speichern vermittelt durch chSLP-65wt bzw. Δ 261-269	75

Abb. 6.19	Add back-Messung rekonstituierter <i>slp-65^{-/-}</i> DT40 Zellen	76
Abb. 6.20	Einfluss der SLP-65-Deletionsmutante auf die Erk-Aktivierung	78
Abb. 6.21	Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die JNK-Aktivierung	79
Abb. 6.22	Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die p38-Aktivierung	80
Abb. 6.23	Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die BCR-vermittelte Expression von c-Fos	81
Abb. 6.24	Luciferase-basiertes Reporterkonstrukt pNFAT-luc	82
Abb. 6.25	Einfluss der chSLP-65-Deletionsmutante auf die NFAT/AP-1-Aktivierung	83
Abb. 6.26	Einfluss der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne auf die NFAT/AP-1-Aktivierung	84
Abb. 6.27	Expression von chSLP-65wt, GAL und ΔSH2 in <i>slp-65^{-/-}</i> DT40 Zellen	86
Abb. 6.28	Überprüfung der Inaktivierung der chSLP-65-SH2-Domäne	86
Abb. 6.29	Kontrolle der Grb2-Interaktionsfähigkeit der chSLP-65-Proteine wt, GAL und ΔSH2	87
Abb. 6.30	Überprüfung der Phosphorylierung von chSLP-65wt, GAL und ΔSH2 nach BCR-Stimulation	88
Abb. 6.31	Einfluss von chSLP-65wt, GAL und ΔSH2 auf das Ca^{2+}-Signal	89
Abb. 6.32	Ca^{2+}-Signal der EREB2.5-Zellen vor und nach Östrogen-Entzug	91
Abb. 6.33	Phosphorylierungsmuster von Syk vor und nach BCR-Stimulation in EREB2.5-Zellen	92
Abb. 6.34	Phosphorylierungsmuster von PLC-γ2 vor und nach BCR-Quervernetzung in EREB2.5-Zellen	93
Abb. 6.35	Phosphorylierungsmuster von SLP-65 vor und nach BCR-Stimulation in EREB2.5-Zellen	94
Abb. 6.36	Phosphorylierungsmuster von Btk vor und nach Stimulation über den BCR in EREB2.5-Zellen	94
Abb. 6.37	Analyse der SLP-65-Phosphorylierung in EREB2.5-Zellen mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper	95
Abb. 6.38	Interaktion von SLP-65 und seinen stimulationsabhängigen Bindungspartnern in EREB2.5-Zellen (n=3)	97
Abb. 7.01	Modell zur Erklärung der regulatorischen Funktion des SH3-Bindemotivs von SLP-65	108

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1	Primärantikörper	25
Tab. 4.2	Sekundärantikörper	25
Tab. 4.3	Bakterienstämme	27
Tab. 4.4	Vektoren	27
Tab. 4.5	Oligonucleotide	30
Tab. 4.6	Oligonucleotide für Sequenzierungen	30
Tab. 4.7	Verwendete Konstrukte	31
Tab. 4.8	Peptide	31
Tab. 5.1	Standard RT-PCR Ansatz	33
Tab. 5.2	Standard PCR-Ansatz	34
Tab. 5.3	Standard PCR-Programm	34
Tab. 5.4	Expressionsbedingungen für die verschiedenen GST-Fusionsproteine	41
Tab. 5.5	Expressionsbedingungen für die His-Tag Proteine	42
Tab. 5.6	Puffer für Aufreinigungen über Superdex-Säulen	43
Tab. 5.7	Einstellungen am Luminometer	47
Tab. 5.8	Puffersysteme für ITC-Messungen	50
Tab. 6.1	Verwendung der rekombinant hergestellten Proteine	58
Tab. 6.2	Dissoziationskonstanten der ITC-Messungen von mSLP-65 und mGrb2	61
Tab. 6.3	Kristallparameter	65
Tab. 6.4	Verwendete DT40 <i>slp-65^{-/-}</i> chSLP-65wt bzw. Δ 261-269 Klone	72

Lebenslauf

Annika Grabbe

Geburtsdatum	17. Juni 1976
Geburtsort	Peine
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982-1986	Grundschule Vöhrum
1986-1995	Wittekind-Gymnasium Lübbecke
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1995-2000	Studiengang Dipl. Biochemie an der Univ. Bielefeld Diplomarbeit in der AG Biochemie I, Prof. Dr. Harald Tschesche, Univ. Bielefeld Diplomarbeit: „Klonierung und Expression verschiedener Domänen der MT6-MMP“
19.12.2000	Abschluss: Diplom

Promotion

06/2001-02/2005	AG Biochemie I, Prof. Dr. Jürgen Wienands, Univ. Bielefeld
seit 03/2005	Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie, Prof. Dr. Jürgen Wienands, Georg-August-Universität Göttingen

Praktika

07/1999-09/1999	Forschungspraktikum am MPI für Biochemie in Martinsried in der AG von Dr. Utz Fischer
-----------------	--

Tätigkeiten

SS 1997, SS 1998, SS 1999	wissenschaftliche Hilfskraft, Praktikum Chemie für Biologen, Fakultät für Chemie, Univ. Bielefeld
WS 1999/2000	wissenschaftliche Hilfskraft, Praktikum Anorganische und Physikalische Chemie AC0/PC0, Fakultät für Chemie, Univ. Bielefeld
03/2001-06/2001	wissenschaftliche Angestellte in der AG Biochemie I, Prof. Dr. Harald Tschesche, Univ. Bielefeld
06/2001-06/2005	wissenschaftliche Angestellte bei Prof. Dr. Jürgen Wienands in der AG Biochemie I, Univ. Bielefeld bzw. am Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen

Göttingen, den 31.3.05

gedruckt auf alterungsbeständigem Papier ISO 9706