

SLY1-Charakterisierung der Funktion und Rolle im Immunsystem

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bernhard Reis

aus München

November 2007

aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Klaus Pfeffer
Koreferent: Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die Entwicklung von T Zellen im Thymus	2
1.2.1 Das DN Stadium der Thymozyten Entwicklung	3
1.2.2 Die Reifung der CD4 ⁺ CD8 ⁺ doppelt positiven Thymozyten	5
1.3 Rolle der Notch Rezeptoren im Immunsystem	6
1.3.1 Notch Proteine und deren Liganden	6
1.3.2 Notch und die T Zellentwicklung	8
1.3.3 Die Integration der präTZR und Notch Signale in Thymozyten	10
1.4 Die SLY Proteinfamilie	12
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Bezugsquellennachweis	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Radiochemikalien	19
2.1.3 Enzyme	19
2.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	20
2.1.5 Geräte	20
2.2 Medien und Puffer	22
2.2.1 Stammlösungen und Puffer	22
2.2.2 Medien für die Bakterienkultur	25
2.2.3 Medien für die Zellkultur	25
2.3 Antibiotika und andere Hemmstoffe	26
2.4 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere	27
2.4.1 Bakterienstämme	27
2.4.2 Zellen und Zelllinien	27
2.4.3 Versuchstiere	28

2.5 Primer	28
2.6 Antikörper und Protein Standards	30
2.7 Plasmidvektoren	31
2.7.1 Ausgangsvektoren	31
2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren	31
2.8 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	32
2.8.1 Isolierung von Plasmid DNS	32
Alkalische Lyse	32
Qiagen Kits	33
2.8.2 Isolierung von chromosomaler DNS	33
2.8.3 Agarosegelelektrophorese	34
Analytische Agarosegelelektrophorese	34
Präparative Agarosegelelektrophorese	34
Bestimmung von Fragmentgrößen	35
2.8.4 Enzymatische Behandlung von DNS	35
Restriktionsbehandlung von DNS	35
Dephosphorylierung von DNS	36
Ligation von DNS-Molekülen	36
2.8.5 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien	36
2.8.6 Southern Blot Analyse	37
Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen	37
Radioaktive Markierung der Sonde	38
DNS/DNS Hybridisierung	38
2.8.7 Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR	39
2.8.8 Sequenzanalyse	40
2.8.9 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)	40
Radioaktive Markierung der Oligos	40
Bindereaktion	41
Elektrophoretische Auftrennung	41
2.9 Proteinanalytische Methoden	42
2.9.1 Aufbereitung der Proben	42
2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.9.3 Western Blot (Immunoblot)	43
2.10 Zellkultur	43

2.10.1 Allgemeine Zellkultur	43
Suspensions-Zelllinien	43
Adhärente Zellen	43
Bestimmung der Zellzahl	44
Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	44
2.10.2 Lentivirale Transduktion von Zellen	44
Virusproduktion mithilfe von 293 FT Zellen	45
Lentivirale Transduktion von Jurkat Zellen	45
2.10.3 Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten	46
Zellkultur von ES/EF Zellen	46
Elektroporation von ES Zellen	46
Selektion rekombinanter ES Zellklone.....	46
Einfrieren von ES Zellen	47
2.10.4 Kultivierung von Splenozyten oder Thymozyten.....	48
2.11 Tierversuche	48
2.11.1 Superovulation.....	48
2.11.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten	48
2.11.3 Generierung chimärer Mäuse	49
2.11.4 Organentnahme.....	49
2.12 Immunbiologische Methoden	49
2.12.1 Proliferationsassays	49
[³ H]-Thymidineinbau	50
CFSE Assay	50
Allogene "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR).....	51
2.12.2 Durchflußzytometrie (FACS Analyse).....	51
FACS Analyse von Oberflächenantigenen.....	52
Intrazelluläre FACS Färbung	52
Bestimmung der Apoptoserate	52
Bestimmung der Zellzyklusverteilung	52
2.12.3 <i>In vitro</i> Differenzierung von Thymozyten.....	53
Aussäen der OP9 Zellen	53
Aufreinigung der DN Thymozyten	53
Aussäen der DN Thymozyten und Bestimmung der Expansionsrate	53
Phospho-S6 Assay	53

3 Ergebnisse.....	55
3.1 Analyse der Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion in SLY1 ^{Δ/Δ} T Zellen...	56
3.2 Subzelluläre Lokalisation	59
3.2.1 Veränderte subzelluläre Lokalisation von SLY1Δ	59
3.2.2 Regulation der Lokalisation	61
3.3 Ansätze zur Identifizierung molekularer Interaktionspartner.....	65
3.3.1 Metabolische Markierung und Immunpräzipitation	65
3.3.2 Massenspektrometrische Sequenzierung.....	66
3.4 Generierung einer SLY1 defizienten Mauslinie.....	67
3.4.1 Klonierung des SLY1 Rekombinationsvektors	67
Klonierungsstrategie.....	67
Neomycin Resistenzkassette	68
Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV TK) Kassette	68
3.4.2 Generierung von SLY1 defizienten embryonalen Stammzellen	69
Erzeugung von SLY1 ^{+/-} ES Zellen durch homologe Rekombination.....	69
Identifizierung korrekt rekombinierter ES Zellklone	69
Southern Blot Analyse der homolog rekombinierten ES Zellen	69
3.4.3 Generierung einer SLY1 defizienten Mauslinie aus rekombinierten ES Zellen	72
3.4.4 Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des <i>sly1</i> Gens	73
3.5 Phänotypanalyse der SLY1 defizienten Mauslinie.....	74
3.5.1 Lymphatische Organe und Lymphozyten Subklassen	74
3.5.2 Allogene „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR).....	77
3.5.3 Proliferationsassay peripherer B und T Lymphozyten.....	78
3.5.4 SLY1 in der Thymozyten Entwicklung.....	81
<i>In vitro</i> Proliferation CD4 ⁺ CD8 ⁻ DN Thymozyten	83
<i>In vitro</i> Differenzierung von CD4 ⁺ CD8 ⁻ DN Thymozyten.....	86
Bestimmung der Apoptoserate <i>in vitro</i> kultivierter CD4 ⁺ CD8 ⁻ DN Thymozyten	88
Bestimmung der Zellzyklusverteilung <i>in vitro</i> kultivierter DN Thymozyten	89
Bestimmung der Aktivierung der S6-Kinase <i>in vitro</i> kultivierter DN Thymozyten	90
4 Diskussion	93
4.1 SLY1 - ein Adapterprotein?	93
4.2 Regulation der subzellulären Lokalisation	95
4.3 SLY1 in der Lymphozyten Entwicklung.....	97
4.4 SLY1 in der Lymphozyten Aktivierung.....	101

4.5 Molekulare Funktion	103
4.6 Phänotypvergleich der SLY1 ^{ΔΔ} und SLY1 ^{-/-} Mauslinien	107
4.7 Fazit und Ausblick.....	109
5 Zusammenfassung	111
6 Literaturverzeichnis	113
7 Danksagung	120
8 Anhang	121
8.1 Karte des SLY1 Rekombinationsvektors	121
8.2 DNS Sequenz des SLY1 Rekombinationsvektors.....	122

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1: Stadien der T Zelldifferenzierung</i>	3
<i>Abb. 1.2: Notch Expression und Aktivierung</i>	6
<i>Abb. 1.3: Die Aktivierung der S6-Kinase</i>	11
<i>Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der drei SLY Proteine</i>	14
<i>Abb. 1.5: Sequenzvergleich der SLY Proteine</i>	15
<i>Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Proteindomänen von SLY1 und SLY1Δ</i>	55
<i>Abb. 3.2: Vergleich der globalen Tyrosinphosphorylierung primärer T Zellen</i>	57
<i>Abb. 3.3: Aktivierung wichtiger Signalmediatoren nach TZR Stimulation</i>	58
<i>Abb. 3.4: Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFκB und NFAT</i>	59
<i>Abb. 3.5: Lokalisation des Wildtyp- und trunkierten SLY1Δ Proteins in Primärzellen</i>	60
<i>Abb. 3.6: Vergleich der subzellulären Lokalisation nach Antigenrezeptorstimulus</i>	61
<i>Abb. 3.7: Kinetik der Translokation von SLY1 nach Antigenrezeptor Stimulus</i>	61
<i>Abb. 3.8: Regulation der Translokation durch Phosphorylierung an Serin27</i>	62
<i>Abb. 3.9: Analyse der subzellulären Lokalisation mithilfe von GFP Fusionsproteinen</i>	63
<i>Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Bindung von 14-3-3 Proteinen an Phospho-SLY1</i>	64
<i>Abb. 3.11: SLY1 Immunpräzipitation nach metabolischer Markierung</i>	66
<i>Abb. 3.12: Darstellung der Strategie zur homologen Rekombination im SLY1 Locus</i>	68
<i>Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen im SLY1 Locus</i>	70
<i>Abb. 3.14: Southern Blot der erfolgreich rekombinierten ES Zellklone</i>	71
<i>Abb. 3.15: Neo Southern Blot der erfolgreich rekombinierten ES Zellklone</i>	72
<i>Abb. 3.16: PCR Typisierung und Southern Blot</i>	73
<i>Abb. 3.17: Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des sly1 Gens in SLY1^{-/-} Mäusen</i>	74
<i>Abb. 3.18: FACS Analyse lymphoider und myeloider Zellsubpopulationen in der Milz</i>	75
<i>Abb. 3.19: Zellularität peripherer lymphatischer Organe und Anzahl an Peyer's Patches</i>	76
<i>Abb. 3.20: FACS Analyse der Marginalzonen B Zellen</i>	76
<i>Abb. 3.21: „Mixed Lymphocyte Reaction“ von Splenozyten</i>	78
<i>Abb. 3.22: Milz T Zell Proliferationsassay</i>	79
<i>Abb. 3.23: Zellteilung CFSE markierter T Zellen</i>	80
<i>Abb. 3.24: Milz B Zell Proliferationsassay</i>	80
<i>Abb. 3.25: Analyse der Thymozyten Subpopulationen</i>	82
<i>Abb. 3.26: FACS Analyse der CD4⁺CD8⁺ Thymozyten Subpopulationen</i>	83
<i>Abb. 3.27: In vitro Thymozytenexpansion in Abhängigkeit eines Notch Signals</i>	84
<i>Abb. 3.28: Thymozytenexpansion auf OP9 DL-1 Zellen an Tag 3 und Tag 6</i>	85
<i>Abb. 3.29: Thymozytenexpansion auf OP9 DL-1 Zellen unter Zugabe von IL-7</i>	86
<i>Abb. 3.30: FACS Analyse der Differenzierung OP9 DL-1-kultivierter DN Thymozyten</i>	87
<i>Abb. 3.31: Quantifizierung der Differenzierung OP9 DL-1-kultivierter DN Thymozyten</i>	88
<i>Abb. 3.32: Bestimmung der Apoptoserate von OP9 DL-1-kultivierten Thymozyten</i>	89

<i>Abb. 3.33: Bestimmung der Zellzyklusverteilung von OP9 DL-1-kultivierten Thymozyten.....</i>	<i>89</i>
<i>Abb. 3.34: S6-Kinase Aktivierung und Zellgröße in DN Thymozyten</i>	<i>92</i>
<i>Abb. 4.1: Notch- und präTZR Signale in DN Thymozyten.....</i>	<i>104</i>
<i>Abb. 4.2: Signal Netzwerk von TORC1 und TORC2</i>	<i>105</i>
<i>Abb. 4.3: Bekannte Substrate der S6-Kinase.....</i>	<i>107</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2.1: Bakterienkulturmedium</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 2.2: Medien und Zusätze.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika und andere Hemmstoffe</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2.4: Verwendete Bakterienstämme</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2.5: Verwendete Zellen und Zelllinien.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2.6: Typisierungsprimer</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 2.7: Primer zur Klonierung des Rekombinationsvektors.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 2.8: Sonstige Primer zur Klonierung und Mutagenese.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 2.9: Weitere verwendete Antikörper.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 2.10: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 2.11: Hergestellte Plasmide und Sonden.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 2.12: Restriktionsansatz.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 2.13: Standard PCR Reaktionsansatz.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 2.14: Standard PCR Bedingungen.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 3.1: SLY1 Serin27 Phosphorylierung kreiert eine potentielle 14-3-3-Bindestelle.....</i>	<i>64</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Professionelle Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BZR	B Zell Rezeptor
cDNS	DNS Kopie der mRNA (komplementäre DNS)
CDX	Cluster of Differentiation X
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt negative Thymozyten (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DP	Doppelt positive Thymozyten (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“ (Durchflußzytometrie)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Grün Fluoreszierendes Protein
EMSA	“Electrophoretic Mobility Shift Assay”
ERK	“Extracellular Signal Regulated Kinase”
ES Zelle	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflußzytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glyzerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
hCG	humanes Choriongonadotropin
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes oder Millipore Wasser
HSV-TK	Thymidinkinase aus <i>Herpes simplex</i> Virus

IDL	intermediate density lipoprotein
IFN	Interferon
I κ B α	Inhibitor of NF κ B α
JNK	Jun N-Terminal Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
MACS	Magnetic Cell Sorting
mEF	murine embryonale Fibroblasten
MHC	„major histocompatibility complex“
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNS	Boten RNS
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
n	Anzahl der getesteten Proben/ Messpunkte je Bedingung
neo	Neomycin Phosphotransferase
NF κ B α	Nuclear Factor kappa B
nM	Nanomolar
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDBu	Phorbol 12,13-Dibutyrat
PE	Phycoerythrin
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
präTZR	präT Zell Rezeptor
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SP	Einzel positive Thymozyten (CD4 ⁺ CD8 ⁻ oder CD4 ⁻ CD8 ⁺)
SAM	„Sterile alpha motive“-Domäne

SH3	„Src homology 3“-Domäne
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SLY1	„SH3 Protein expressed in lymphocytes“
SLY1Δ	Trunkiertes SLY1 Protein
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
TEC	Thymus Epithelzellen
TZR	T Zell Rezeptor
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
Wt	Wildtyp
Z	Zelle

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere ist ein hochentwickeltes und komplexes System, das sowohl zur Abwehr von Pathogenen (Bakterien, Viren, Parasiten, Pilze) als auch zur Eliminierung transformierter Zellen beiträgt. Während der Evolution haben sich zwei wesentliche Prinzipien der Immunabwehr entwickelt: die angeborene und die adaptive (erworbene) oder spezifische Immunität.

Eine spezifische Immunantwort wie beispielsweise die Produktion von Antikörpern gegen ein bestimmtes Pathogen wird als adaptive Immunantwort bezeichnet, weil diese individuell als Antwort auf die Bedrohung durch ein spezielles Pathogen generiert wird. Diese Immunantwort bringt meist einen lebenslangen Schutz gegen jenes Pathogen mit sich, ist aber nicht sofort nach Erstinfektion verfügbar, weil sie zunächst aufgebaut werden muss. Dies kann mehrere Tage dauern. Das unterscheidet solche Antworten von der angeborenen Immunität, die bei Infektion sofort verfügbar ist und die auch nach Reinfektion mit demselben Pathogen vergleichbar abläuft und kein immunologisches Gedächtnis aufbaut. Die angeborene Immunität stellt also zunächst eine erste Barriere für angreifende schädliche Organismen dar. In den meisten Fällen reicht diese als Schutz aus. Pathogene, die diese Barriere dennoch überwinden, werden von dem angeborenen Immunsystem bis zum Aufbau einer adaptiven Antwort in Schach gehalten.

Das angeborene Immunsystem besteht aus drei Hauptkomponenten: Epithelien, dem Komplementsystem und zellulären Bestandteilen. Die Epithelien dienen vor allem als mechanische Barriere, sie produzieren aber auch zusätzlich Oberflächenproteine, die antimikrobielle Effektormechanismen besitzen. Weiterhin spielt das Komplementsystem mit seinen löslichen und Zelloberflächenproteinen sowohl zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen zum Pathogen (Chemoattraktion), als auch zur direkten Lyse von Bakterien und Pilzen eine wichtige Rolle. Die zentrale Komponente des angeborenen Immunsystems stellen jedoch die zellulären Bestandteile wie Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK Zellen) dar. Diese können bereits vor Aufbau einer adaptiven Immunabwehr potente antimikrobielle und antivirale Effektormechanismen bereitstellen. Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt über Bindung von konservierten Epitopen („pathogen-associated molecular patterns“ = PAMPs) der Krankheitserreger an ebenfalls konservierte Erkennungsrezeptoren („pathogen recognition

receptors“ = PRRs) auf den Zellen (Janeway, Jr. et al., 2005). Diese Erkennung ist jedoch nicht erregerspezifisch und es wird keine Gedächtnisantwort zum verbesserten Schutz bei einer erneuten Infektion aufgebaut. Phagozyten dienen außerdem auch als wichtige Effektorzellen zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems und sind somit die Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität.

Adaptive Immunantworten werden durch Lymphozyten aufgebaut, die als Effektorzellen Krankheitserreger eliminieren und lebenslange Immunität gegen diese vermitteln können (Janeway, Jr. et al., 2005). Die adaptive Immunität beruht auf der Antigenerkennung durch B und T Zellrezeptoren, die erst durch ungerichtete Umordnungen der Rezeptorgene (somatische Rekombination) sowie nach Kontakt mit dem Pathogen zur klonalen Expansion der pathogen-spezifischen B und T Lymphozyten führt. B Lymphozyten sind für die Bildung von Antikörpern zuständig und damit für die Entstehung der humoralen adaptiven Immunität. T Lymphozyten differenzieren zu verschiedenen Subtypen, zu denen zytotoxische T Lymphozyten zählen und T Helferzellen. Erstere sorgen für die Eliminierung Virus-infizierter und entarteter Zellen, letztere sorgen für die Aktivierung von anderen Immunzellen wie beispielsweise B Zellen und Makrophagen. Die Bildung von naiven Lymphozyten, das heißt Lymphozyten, die noch nicht auf ein Antigen getroffen und zu Effektorzellen ausdifferenziert sind, ist ein komplexer Vorgang, der genau reguliert werden muss. Im Folgenden soll nun auf die Entstehung von T Lymphozyten näher eingegangen werden.

1.2 Die Entwicklung von T Zellen im Thymus

Das Immunsystem ist aus knochenmarksresidenten hämatopoetischen Stammzellen abgeleitet, die Ausgangspunkt sind für ein vielfach gegliedertes System an Vorläuferzellen, die im Lauf ihrer terminalen Differenzierung zunehmend an Entwicklungspotential verlieren. Schlussendlich werden aus ihnen alle Zellen des blutbildenden Systems entstehen. Bei Adulten findet die Hämatopoese überwiegend im Knochenmark statt - Ausnahme ist die T Zellentwicklung: diese vollzieht sich im Thymus. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern in den Thymus ein und durchlaufen dort eine strenge Selektion, die sie befähigt, ‚fremd‘ zu erkennen und von ‚selbst‘ zu trennen, ehe sie als reife naive T Zellen in die Peripherie entlassen werden. Das Potential der Thymozyten zur Erneuerung ist begrenzt - aus diesem Grund muss stets der Nachschub neuer Vorläufer aus dem Knochenmark gewährleistet sein (Donskoy und Goldschneider, 1992).

Im Thymus entstehen zwei verschiedene Typen von T Zellen, die sich anhand der Expression ihres T Zell Rezeptors (TZR) unterscheiden: $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T Zellen (Hayday und Pennington, 2007). Die Entstehung eines funktionellen T Zell Rezeptors ist ein hochkomplexer Prozess, bei dem es zu einem Gen Rearrangement der ‚variable‘ (V), ‚diversity‘ (D) und ‚joining‘ (J) Segmente kommen muss. Die Vielzahl der verfügbaren V-, D- und J-Segmente, sowie Mechanismen der gezielten somatischen Mutagenese in diesen Segmenten während der Rekombination gewährleisten eine hohe Diversität an verfügbarem TZR Repertoire innerhalb eines jeden Individuums.

1.2.1 Das DN Stadium der Thymozyten Entwicklung

Um eine Bildung nicht-funktioneller TZR zu verhindern, existiert eine Reihe von Prüfsteinen in der Entwicklung einer T Zelle. Zellen, die sich innerhalb dieser diskret unterscheidbaren Phasen befinden, lassen sich phänotypisch anhand distinkter Oberflächenmarker unterscheiden. Zu diesen gehören vor allem CD4 und CD8. Diejenigen Thymozyten, die sich in der frühesten Entwicklungsstufe befinden, exprimieren weder CD4 noch CD8. Aus diesem Grund werden sie auch doppelt negative Thymozyten genannt (DN). In dieser Phase beginnt die Bildung eines funktionellen TZR und die Entscheidung für die $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -Linie (Abb. 1.1).

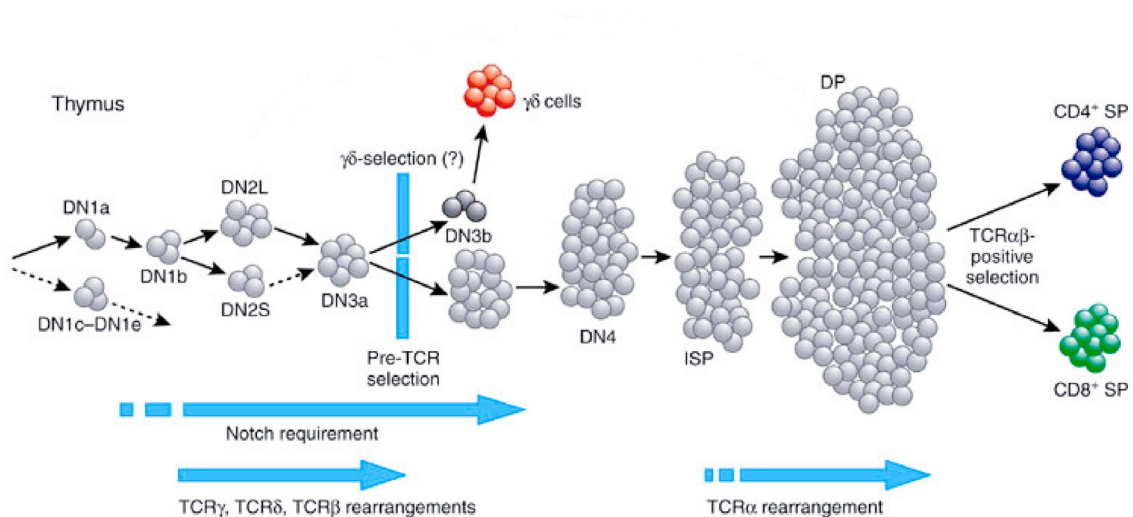


Abb. 1.1: Stadien der T Zelldifferenzierung

Links: DN1, DN2 und DN3 Subpopulationen mit nachgewiesenen (schwarze Pfeile) bzw. vermuteten Transitionen (gestrichelt). DN: doppelt negativ; DP: doppelt positiv; ISP: intermediär ‚single‘-positiv; SP: ‚single‘-positiv (modifiziert nach Hayday und Pennington, 2007).

DN Thymozyten durchlaufen in ihrer Entwicklung nacheinander die Stadien DN1 bis DN4. Diese können anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CD44 voneinander unterschieden werden (Godfrey et al., 1993). Die primitivsten DN Thymozyten befinden sich innerhalb der CD25⁻CD44⁺-Fraktion (DN1). Es handelt sich hierbei allerdings keineswegs um eine homogene Zellpopulation. Basierend auf der Expression von c-Kit, Flt3, CD24 und CCR9 wird dieses Stadium weiter in DN1a bis DN1e unterteilt (Bhandoola et al., 2007). DN2 Thymozyten (CD25⁺CD44⁺) sind durch aktive Proliferation charakterisiert, wodurch die zunächst seltene T Zell Progenitor Population vergrößert wird. In diesem Stadium beginnt die Umlagerung der TZR β bzw. γ und δ Gene.

Erst nach Erreichen des DN3 Stadiums (CD25⁺CD44⁻) verlieren die Vorläuferzellen das Potential, in eine andere Entwicklungslinie wie B Zellen, Natürliche Killerzellen (NK) oder Dendritische Zellen (DC) zu differenzieren. Interessant ist die Beobachtung, dass vor Erreichen des DN3 Stadiums eine Differenzierung zu B, NK oder Dendritischen Zellen nur unter Wegnahme der Notch Signale möglich ist (Bhandoola et al., 2007). Die essentielle Rolle der von Thymus-residenten Stromazellen gelieferten Notch Signale in der T Zellentwicklung ist in Kapitel 1.3 näher ausgeführt. Die Umlagerung der TZR β bzw. γ und δ Gene muss in DN3 Thymozyten ihren erfolgreichen Abschluss finden. Nur Thymozyten, die einen funktionellen TZR bilden, entgehen der ansonsten einsetzenden Apoptose. Dieser Kontrollpunkt wird auch β -Selektion genannt. Zu diesem Zeitpunkt trennen sich die Entwicklungslinien der Thymozyten in $\alpha\beta$ T Zellvorläufer und $\gamma\delta$ T Zellvorläufer.

In $\alpha\beta$ T Vorläuferzellen, deren TZR β Kette sich erfolgreich mit der präT α Kette paart und einen präTZR Komplex bildet, wird durch letzteren die Apoptose gestoppt und ein starkes proliferatives Signal ausgelöst. Zugleich wird ein weiteres Rearrangement des TZR β Locus verhindert (allelische Exklusion). Die elementare Bedeutung der β -Selektion wird anhand verschiedener Studien an Knockout Mäusen deutlich, in denen die für die TZR Genrearrangements notwendigen Gene *rag-1* oder *rag-2*, bzw. andere für die Signalübertragung durch den präTZR Komplex notwendigen Elemente deletiert wurden: Thymozyten dieser Mäuse kommen nicht über das DN3 Stadium hinaus (von Boehmer et al., 2003).

Ob die Entscheidung für die $\gamma\delta$ bzw. $\alpha\beta$ -Linie allein von der Bildung des jeweiligen funktionellen TZR abhängt (instruktives Modell), ist Gegenstand aktueller Forschung. Fest steht in jedem Fall, dass auch $\gamma\delta$ T Zellvorläufer eine der β -Selektion analoge Selektion durchlaufen. Weiterhin gilt als gesichert, dass die Stärke des Signals des neu entstandenen

TZR Einfluss auf die Entwicklung nimmt - ein starkes Signal favorisiert die Entwicklung von $\gamma\delta$ T Zellen, ein schwaches Signal in zusätzlicher Abhängigkeit von Notch die Entwicklung von $\alpha\beta$ T Zellen (Ciofani et al., 2006).

Thymozyten, welche die β -Selektion überstehen, gehen in das DN4 Stadium über. Dieses ist durch das Fehlen von CD25 und CD44 auf der Zelloberfläche identifizierbar. Es folgt eine kurze Übergangsphase, in der zunächst CD8 exprimiert wird und die deswegen als intermediär einfach positiv (ISP) bezeichnet wird, bevor das $CD4^+CD8^+$ doppelt positive (DP) Stadium erreicht wird.

1.2.2 Die Reifung der $CD4^+CD8^+$ doppelt positiven Thymozyten

Die $\alpha\beta$ T Zellen schreiten nun zum doppelt positiven (DP) Stadium voran, das durch die Koexpression von CD4 und CD8 charakterisiert ist. DP Thymozyten bilden nun eine funktionelle TZR α Kette, die zusammen mit der TZR β Kette das Substrat für die Bindung durch „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) Liganden und anschließender positiver sowie negativer Selektion ist. Diese beiden Selektionsschritte sind - wie auch die übrigen Schritte in der T Zellreifung - sowohl räumlich als auch zeitlich voneinander getrennt (Boehm und Bleul, 2006; Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2006).

Zunächst findet die Positiv Selektion im Cortex statt, vermittelt durch die corticalen Thymus Epithelzellen (TEC). Sie gewährleistet, dass nur T Zellen mit einem funktionellen TZR, der auch in der Lage ist, den TZR Liganden MHC auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen zu erkennen, überleben. Dabei erfolgt die Determinierung zu CD4-positiven T Helfer Zellen bzw. regulatorischen T Zellen oder zu zytotoxischen CD8-positiven T Zellen.

Aus diesen T Zellvorläufern entwickeln sich einzel-positive (SP) Thymozyten, die in die Medulla wandern und dort auf die medullären TEC treffen. In Interaktion mit diesen gewährleistet die nun einsetzende Negativselektion, dass nur Thymozyten mit einer intermediären TZR MHC Affinität den Reifeprozess überstehen. Eine zu starke TZR MHC Interaktion birgt die Gefahr der Entstehung von Autoimmunität. Aus diesem Grund werden diese potentiell autoreaktiven T Zellen eliminiert. Die aus dieser Selektion hervorgehenden reifen, naiven T Zellen verlassen den Thymus anschließend durch Blutgefäße in der Medulla und formen so die wesentliche Basis der zellulären adaptiven Immunität.

1.3 Rolle der Notch Rezeptoren im Immunsystem

1.3.1 Notch Proteine und deren Liganden

Notch Proteine sind hoch konservierte Transmembranrezeptoren, die eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung in Invertebraten und Vertebraten spielen. In Säugetieren existieren 4 verschiedene Notch Rezeptoren (Notch 1-4), und es wurden fünf verschiedene Liganden identifiziert (Jagged-1 und -2, Delta-Like-1, -3 und -4). Diese werden unter anderem in lymphatischem Gewebe wie Knochenmark und Thymus exprimiert (Felli et al., 1999). Notch und die Mehrzahl seiner Liganden sind Transmembranproteine, d.h. Signale werden überwiegend unter benachbarten Zellen ausgetauscht.

Notch Rezeptoren werden als nichtkovalent assoziierte Heterodimere durch intramolekulare Spaltung aus einer einzigen Polypeptidkette gebildet (Abb. 1.2) (Bellavia et al., 2000; Osborne und Minter, 2007).

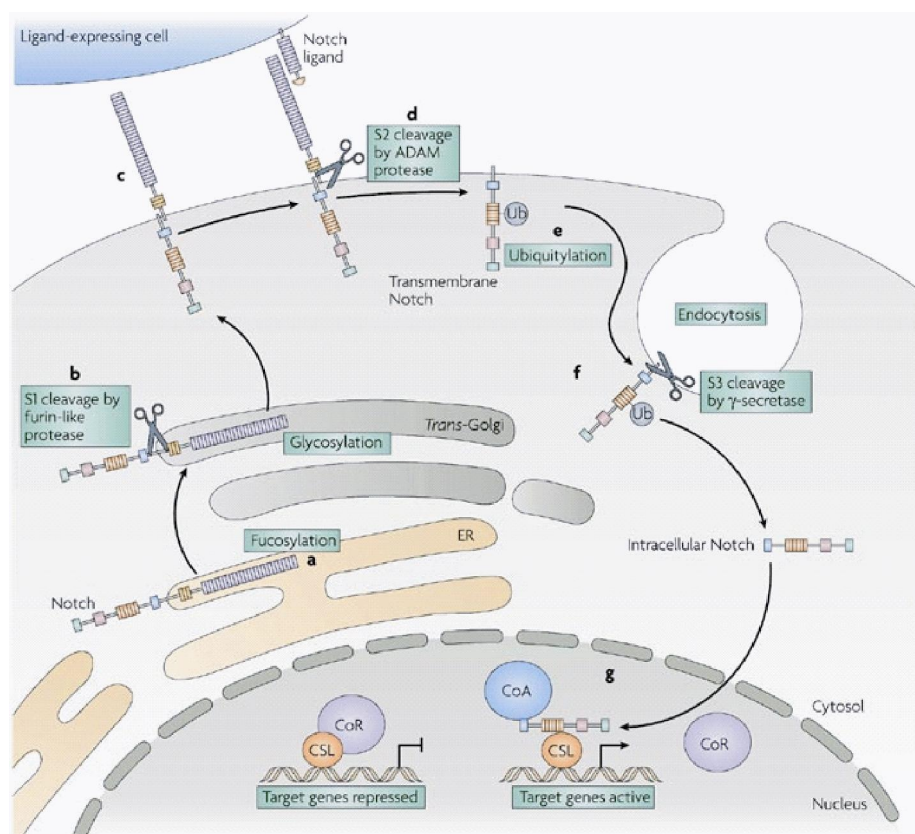


Abb. 1.2: Notch Expression und Aktivierung

Schematische Darstellung der Notch posttranslationalen Modifikation aus einer einzelnen Polypeptidkette und der anschließenden Expression als Heterodimer auf der Zelloberfläche (a-b). Nach Bindung eines Liganden an den extrazellulären Notch Rezeptor erfolgt die Freisetzung des intrazellulären Teils Notch-IC und Aktivierung der Transkription von Notch Zielgenen (d-g). CoA, Koaktivator; CoR, Korepressor (nach Osborne und Minter, 2007).

Man unterscheidet den extrazellulären Teil, der an den transmembranösen und zugleich intrazellulären Teil gebunden ist. Der extrazelluläre Teil wird bei Bindung eines Liganden durch eine ADAM Protease proteolytisch gespalten. Das führt letztendlich zu einer Freisetzung des Notch intrazellulären Fragments (Notch-IC) durch den Presenilin- γ -Sekretase-Komplex. Voraussetzung dafür ist jedoch zunächst eine Ubiquitilierung und Endozytose des durch die ADAM Protease trunkierten Notch Rezeptors. Das nun freigesetzte Notch-IC Fragment wandert in den Kern und wirkt dort zusammen mit dem DNA-bindenden Protein CSL (auch CBF-1 bzw. RBP-J in Mäusen) und anderen Kofaktoren als Aktivator der Transkription der Notch Zielgene (Tanigaki und Honjo, 2007). SHARP/ MINT konkurriert dabei mit Notch-IC um die Bindung an CSL und wirkt als Transkriptionsrepressor der CSL-vermittelten Transkription durch die Rekrutierung des Korepressor Komplexes „C-terminal binding protein“ (CtBP) (Tanigaki und Honjo, 2007).

Zu den bekanntesten Notch Zielgenen zählen Gene der HES Familie, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit einem positiv geladenen Helix-Loop-Helix-Motiv, und der nah verwandten HEY Familie (Osborne und Miele, 1999; Osborne und Minter, 2007). Diese beeinflussen Differenzierung, Proliferation und Apoptose in vielfältiger Weise. Spezifische Auswirkungen sind jedoch generell Zellkontext-abhängig. Es wird davon ausgegangen, dass eine gewebsspezifische Expression von Genen durch die transkriptionelle Koregulation von Notch-IC und weiteren aufgrund ihrer Differenzierung bereits in der Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren erreicht wird (Cave et al., 2005).

Ein interessanter Aspekt im Zusammenhang mit der Rolle von Notch in der Zelldifferenzierung ist das „lateral signaling“ - ein Signalaustausch benachbarter Zellen untereinander. Stochastisch oder durch andere Faktoren beeinflusste geringe Unterschiede in der Anzahl der exprimierten Notch Rezeptoren und Liganden zwischen ansonsten gleichartigen benachbarten Zellen führen durch Aktivierung eines gegenregulatorischen Prozesses letztendlich zur Entstehung einer Zelle mit einer hohen Dichte an Notch Rezeptoren und einer benachbarten Zelle mit hoher Notch Liganden Dichte auf der Zelloberfläche (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Tanigaki und Honjo, 2007).

Die unterschiedliche Expressionshöhe benachbarter Zellen wird dabei dadurch erreicht, dass ein starkes Notch Signal die Expression von Notch Liganden unterdrückt und umgekehrt. Dies führt letztendlich zu Zellen mit völlig unterschiedlichem Differenzierungsschicksal und scheint ein konservierter Mechanismus in der Entwicklung und insbesondere der Ausbildung von Asymmetrie in Geweben zu sein (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Ehebauer et al., 2006).

Die elementare Bedeutung der Notch Proteine und deren Liganden für die Entwicklung und Zelldifferenzierung konnte mithilfe von gezielter Inaktivierung gezeigt werden. Mäuse, in denen Notch-1, Notch-2 bzw. die Notch Liganden Jagged-1 oder Jagged-2 gezielt inaktiviert wurden, sind aufgrund schwerer Entwicklungsdefekte embryonal lethal (Hamada et al., 1999; Jiang et al., 1998; Swiatek et al., 1994; Xue et al., 1999).

1.3.2 Notch und die T Zellentwicklung

Notch Signale spielen als Effektoren von Differenzierung, Proliferation und Apoptose eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Dies wurde unter anderem durch gezielte Überexpression von Notch oder deren Liganden untermauert. Die Expression des intrazellulären Teils von Notch-1 ahmt eine konstitutive Aktivierung des Notch Signalwegs nach. Als Folge der Überexpression dieses Fragments wurde ein Ausbleiben der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Myoblasten und Granulozyten in Zellkultur beobachtet (Kopan et al., 1994; Milner et al., 1996). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Liganden-induzierte Aktivierung von Notch-1 die Differenzierung von CD34⁺ Vorläuferzellen verhindert (Li et al., 1998). Einen ersten Hinweis auf eine besondere Rolle von Notch Signalen in der T Zellentwicklung lieferte eine Expressionsanalyse des Thymus, welche das Vorhandensein mehrerer Notch Rezeptoren und Liganden in Thymozyten und Stroma nachwies (Felli et al., 1999).

Die in verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführte transgene Überexpression von Notch-1-IC in Mäusen lieferte allerdings kontroverse Daten. So wurde in einer Studie eine starke Verschiebung der Thymozyten Populationen von CD4-positiven zu CD8-positiven Zellen beobachtet, in einer anderen eine generell erhöhte Überlebensfähigkeit von Thymozyten (Deftos und Bevan, 2000; Robey et al., 1996). Ob es sich hier um ein Transgen Artefakt handelt, ist nicht geklärt. Ein Hinweis für die essentielle Bedeutung der kontrollierten Expression und Regulation von Notch Proteinen in der T Zellentwicklung ist jedoch die in allen Studien beobachtete Entstehung von Lymphomen oder T Zelleukämien nach transgener Überexpression von konstitutiv aktivem Notch-1-IC oder auch Notch-3-IC in unreifen Thymozyten (Bellavia et al., 2000; Lin et al., 2006; Osborne und Minter, 2007).

Die Verwendung gewebsspezifischer Promotoren hat deutlich gezeigt, dass das Stadium der T Zellentwicklung, in dem künstlich eingegriffen wird, entscheidend ist über den Ausgang einer Deletion oder exogenen Überexpression von Notch Proteinen. So wurde durch eine

konditionale Inaktivierung von Notch-1 im Knochenmark eine selektive Blockade der T Zellentwicklung bei gleichzeitiger normaler Entwicklung aller anderen hämatopoetischen Linien beobachtet (Radtko et al., 1999). Besonders eindrucksvoll war dabei die Tatsache, dass die B Zellentwicklung zusätzlich im Thymus stattfand. Diese Ergebnisse wurden sehr gut vervollständigt durch Experimente, in denen Knochenmarkchimären aus viral transduzierten und damit Notch-1-IC überexprimierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen generiert wurden: In diesen Mäusen findet eine T Zellentwicklung zusätzlich im Knochenmark statt, und die B Zellentwicklung bleibt unterbunden (Pui et al., 1999).

Findet eine Inaktivierung von Notch-1 im DN1 Stadium von Thymozyten statt, so sind $\alpha\beta$ T Zellen stark betroffen, nicht jedoch $\gamma\delta$ T Zellen. Erfolgt diese dagegen zu dem deutlich späteren DN3 Stadium, so unterbleiben negative Auswirkungen auf die T Zell Entwicklung (Wolfer et al., 2001; Wolfer et al., 2002a).

Diese Beobachtungen haben insgesamt zu der Vorstellung geführt, dass in frühen lymphoiden Vorläuferzellen im Thymus ein starkes Notch Signal zur Entstehung einer T Zelle anleitet. Fehlt dieses Signal jedoch, so wird ein automatisch einsetzendes Differenzierungsprogramm durchlaufen, das hauptsächlich zur Bildung von B Zellen im Knochenmark führt (Benz und Bleul, 2005; Bhandoola et al., 2007; Sambandam et al., 2005). Im Zuge der weiteren Differenzierung verlieren die T Zell Vorläufer dann zunehmend ihre Abhängigkeit von einem Notch Signal, wobei $\alpha\beta$ T Zellen länger darauf angewiesen sind als $\gamma\delta$ T Zellen.

Die Ereignisse, welche auf molekularer Ebene für eine T versus B Zellentwicklung sorgen, sind nicht genau charakterisiert. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei das gewebsspezifische Zusammenwirken von Transkriptionsfaktoren, die für die Induktion T Zell-spezifischer Gene wie CD25 und präT α sorgen (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2006). Zugleich werden durch den Notch-induzierten Transkriptionsfaktor Hes-1 B Zell-spezifische Gene in Thymozyten reprimiert (Tanigaki und Honjo, 2007). Ferner für die Entwicklung von T Zellen essentiell ist die durch Notch Signale vermittelte Prädisposition, welche Zellen in die Lage versetzt, auf trophische Differenzierungssignale durch Proliferation anzusprechen. Beispiel hierfür ist die allein durch Notch vermittelte Aufrechterhaltung einer hohen Glykolyserate in Thymozyten (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005). Besonders gut untersucht sind dabei die Ereignisse, wie sie während der β -Selektion im DN3 Stadium der Thymozyten stattfinden.

1.3.3 Die Integration der präTZR und Notch Signale in Thymozyten

In den letzten Jahren sind einige der Vorgänge, die während der β -Selektion auftreten, bis ins molekulare Detail aufgeklärt worden. Als wesentlich hat sich die Integration von präTZR und Notch Signalen während der β -Selektion herausgestellt. Einen großen Beitrag hierzu hat die Entwicklung eines Differenzierungssystems geleistet, mit dessen Hilfe eine Kultivierung von DN Thymozyten *in vitro* möglich ist. Dies geschieht mithilfe einer aus Knochenmark gewonnenen Stromazelllinie der Bezeichnung OP9, die den Notch Liganden Delta-Like 1 exprimiert, und die auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002).

Die Kombination dieses *in vitro* Differenzierungssystems mit dem Einsatz TZR-defizienter Thymozyten erlaubte zu beweisen, dass nur Thymozyten, die gleichzeitig die Signale eines exogen eingebrachten TZRs und eines Notch Signals erhielten, befähigt waren sich zu teilen und zu differenzieren (Ciofani et al., 2004). In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass ein Schlüsselereignis einer erfolgreichen β -Selektion von Thymozyten die Aktivierung des Zellmetabolismus ist (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005; Hinton et al., 2006). Nur so werden Thymozyten befähigt, sich innerhalb kurzer Zeit 6- bis 8-mal zu teilen, ehe in einer erneuten Ruhephase die TZR α Kette gebildet wird und die surrogate präT α Kette ersetzt (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2006).

Auf zellulärer Ebene bedeutet diese hohe Teilungsaktivität unter anderem die Notwendigkeit einer induzierten Expression von membranresidenten Transportern, die den gestiegenen Nährstoffbedarf sicherstellen. Dazu gehören Aminosäure- und Glucosetransporter sowie der Transferrinrezeptor. Ebenso erfolgt eine Umstellung auf die Glykolyse als primärer Energiequelle, außerdem wird die Proteinsynthese beschleunigt.

Teilweise konnten die dabei beteiligten intrazellulären Signalwege aufgeklärt werden. Eine zentrale Rolle kommt dabei der Kinase PDK-1 zu, die durch die PI3-Kinase vermittelte Generierung von Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP₃) aktiviert wird. Wichtige Substrate von PDK-1 sind sowohl Akt als auch die S6-Kinase (Ruvinsky und Meyuhas, 2006). Die effiziente Aktivierung von PDK-1, Akt und S6-Kinase in DN Thymozyten ist abhängig von einem gleichzeitigen Signal von Notch und dem präTZR. Wie diese beiden sehr unterschiedlichen Signalwege integriert werden, ist jedoch vollkommen unbekannt. Akt reguliert wiederum über mTOR die Proteinsynthese beispielsweise von Nährstofftransportern, während die S6-Kinase in nicht verstandener Weise Zellkontext-abhängig die Proteinsynthese, Glucose-Homöostase sowie den Zellzyklus und damit insgesamt die

Zellgröße reguliert (Abb. 1.3). Eine tiefere Regulationsebene ist durch die duale Rolle von PDK-1 bei der Aktivierung der S6-Kinase gegeben. Die S6-Kinase kann nur dann durch PDK-1 phosphoryliert werden, wenn der durch PDK-1 aktivierte mTOR-Komplex zuvor die S6-Kinase als Substrat für PDK-1 verfügbar gemacht hat (Collins et al., 2003; Kelly et al., 2007).

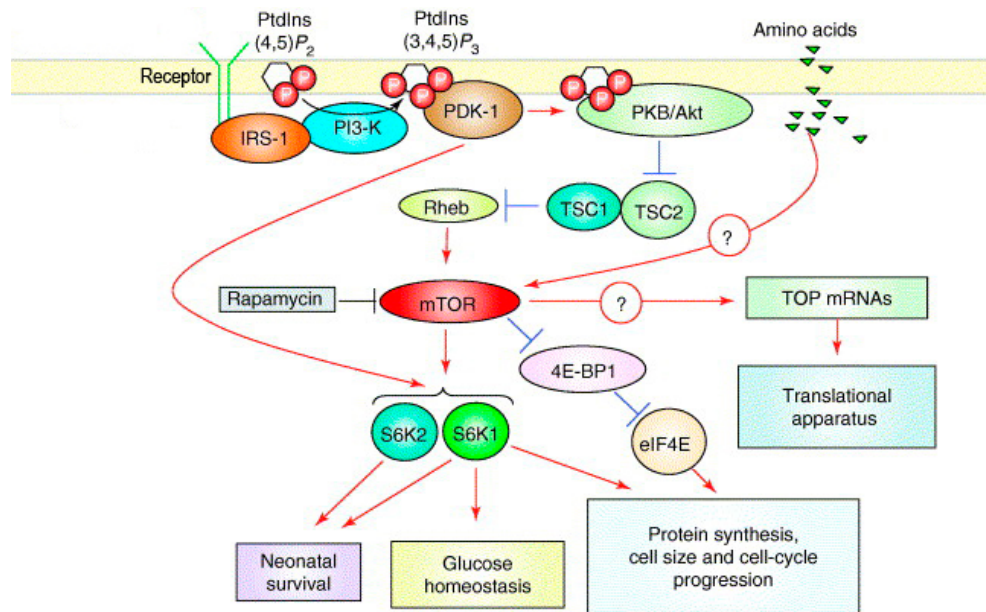


Abb. 1.3: Die Aktivierung der S6-Kinase

Schematische Darstellung der Aktivierung von mTOR und S6-Kinase als zentrale Effektoren von mitogenen Signalen und Wachstumssignalen. Die Bindung von Liganden an den Wachstumsfaktor oder Insulinrezeptor induziert die Bildung von PIP₃ durch PI3-Kinase. Das führt zur Aktivierung der Kinase PDK-1, die sowohl Akt als auch mTOR-abhängig die S6-Kinase aktiviert. Akt inhibiert wiederum TSC. Dadurch wird die GTPase Rheb nicht mehr inhibiert, die nun mTOR aktivieren kann. mTOR phosphoryliert die S6-Kinase und ermöglicht dadurch erst eine Bindung und Phosphorylierung der S6-Kinase durch PDK-1. mTOR und S6-Kinase regulieren eine Vielfalt an Signalwegen, die in der Regulation von Proteinsynthese, Zellwachstum und Zellzyklus involviert sind (modifiziert nach Ruvinsky und Meyuhas, 2006).

Die Bedeutung dieses mTOR als zentralen Proteinkomplex enthaltenden Signalweges bei der Thymozyten Entwicklung wird unterstrichen durch mehrere experimentelle Befunde: Zum einen gelangen Thymozyten, in denen eine Cre-vermittelte T Zell-spezifische Deletion von PDK-1 stattgefunden hat, nicht über das DN4 Stadium hinaus (Hinton et al., 2004). Zum anderen konnte durch Einbringen einer konstitutiv aktiven Akt Mutante in Rag2^{-/-} Thymozyten die Blockade in DN3 zu einem beträchtlichen Anteil überwunden werden (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005).

In einer eleganten Studie wurde eine Knock-In-Maus einer Mutante von PDK-1 generiert, die selektiv Akt, nicht jedoch andere Substrate wie PKC oder S6-Kinase phosphorylieren und damit aktivieren kann (Kelly et al., 2007). So konnte gezeigt werden, dass Akt die induzierte

Expression von Nährstoff Rezeptoren vermittelt und ebenso die Differenzierung zu DP Thymozyten. Dennoch erreichten die Thymozyten nicht eine vergleichbare Expansionsrate wie Thymozyten mit nicht-mutierter PDK-1, was beweist, dass durch PDK-1 auch weitere Akt-unabhängige trophische Signalwege aktiviert werden müssen.

Die unbedingte Integration der präTZR und Notch Signale in einem zeitlich limitierten Rahmen soll sicherstellen, dass eine maximale Anzahl an Thymozyten mit funktionellem TZR die nächste Stufe der Entwicklung erreicht. Dass dieses Entwicklungsstadium auch Ausgangspunkt für bösartige Veränderungen sein kann, beweist das Vorhandensein aktivierender Mutationen in Notch-1 bei 50% der untersuchten T Zell akuten lymphatischen Leukämien im Menschen (Weng et al., 2004).

Eine Zelle muss in der Lage sein zu erkennen, dass ein neu formierter präTZR entstanden ist. Hierzu muss dieser - ähnlich dem späteren TZR - zunächst einen Komplex mit weiteren Proteinen wie den CD3-Molekülen, Rezeptortyrosin Kinasen und einer Reihe von Adapterproteinen bilden. Letztere zeichnen sich durch den Besitz charakteristischer Domänen aus, die für eine Protein-Protein-Interaktion sorgen. Diese vermitteln die Weiterleitung des präTZR Signals bis in den Zellkern und tragen somit zu einer Reaktion der Zelle auf Entwicklungssignale bei. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Protein SLY1 handelt es sich um ein Molekül mit zwei solchen charakteristischen Domänen, einer SH3 und einer SAM Domäne.

1.4 Die SLY Proteinfamilie

SLY1 ist ein putatives Adapterprotein mit einer SH3 und SAM Domäne und stellt das zuerst beschriebene Mitglied einer hoch homologen und aus insgesamt drei Mitgliedern bestehenden Proteinfamilie dar. Das *sly1*-Gen ist X-chromosomal lokalisiert und besitzt 8 Exons. Das Protein besteht aus 380 Aminosäuren, ist 55 kDa groß und wird ausschließlich in lymphoiden Zellen exprimiert. Aufgrund seiner SH3 Domäne und seiner gewebsspezifischen Verteilung in lymphoiden Organen wurde es als SLY1 (SH3 Lymphozytenprotein) bezeichnet (Beer et al., 2001). Entdeckt wurde es in einem Adhäsionsscreen, bei dem Gene aus einer T Lymphom cDNS-Bank in 293T Zellen transfiziert wurden. Eine Rolle in der Vermittlung von Adhäsion konnte allerdings später nicht verifiziert werden. Unabhängig davon wurde SLY1 von einer anderen Arbeitsgruppe entdeckt, die nach neuen Substraten von Serin-Kinasen suchte (Astoul et al., 2003). Dabei kam ein Antikörper zum Einsatz, der spezifisch Serin Phosphorylierungsmotive der Serin-Kinase Akt erkennen sollte. In jener Arbeit wurde

gezeigt, dass SLY1 nach Antigenrezeptor oder Phorbol Ester Stimulus an Serin27 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung konnte sowohl durch Gabe des PKC-Inhibitors RO-318425 als auch durch Zusatz des PI3K-Inhibitors Ly-294002 unterbunden werden. Eine direkte Beteiligung der Kinase Akt konnte jedoch nicht bestätigt werden und es stellte sich heraus, dass der verwendete Antikörper zwar Phospho-Serin-spezifisch, nicht jedoch sequenz-spezifisch für die umgebenden Aminosäuren ist und somit nicht ausschließlich Substrate der Akt Kinase erkennt. Diese Ergebnisse legten jedoch eine Beteiligung von SLY1 in der Antigenrezeptor Signaltransduktion nahe. Weiter erhärtet werden konnte dieser Befund in einer neueren Publikation, zu der in dieser Arbeit wesentlich beigetragen worden ist (Beer et al., 2005). Lymphozyten, die ein trunkiertes SLY1 Protein mit gestörter subzellulärer Lokalisation exprimieren (SLY1Δ), zeigen eine deutlich reduzierte Antigenrezeptor-vermittelte Proliferation *in vitro* und eine reduzierte Immunglobulin Sekretion sowie eine verminderte semi-allogene Transplantatabstoßung *in vivo*.

Weitere zu SLY1 hoch homologe Proteine mit einer SH3 und SAM Domäne wurden beschrieben: SLY2 (auch als SAMSN1 oder Nash1/HACS1 bezeichnet) und SASH1 (auch SLY3) (Claudio et al., 2001; Uchida et al., 2001; Zeller et al., 2003). SLY2 ist in der Maus auf Chromosom 16 lokalisiert und besitzt 11 Exons. Das SLY2 Protein besteht aus 372 Aminosäuren und ist 42 kDa groß. Es wird in allen hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen sowie in myeloiden Leukämien und Myelomen exprimiert. SLY2 hat eine zu SLY1 homologe potentielle Phosphorylierungsstelle an Serin23. SLY2 wurde in Zusammenhang mit der Differenzierung von B Zellen gebracht (Zhu et al., 2004). Es wurde beschrieben, dass eine SLY2 Überexpression in B Zellen einen Plasmazell-ähnlichen Phänotyp induziert. Außerdem wurde in dieser Arbeit eine Assoziation *in vitro* mit dem B Zell inhibitorischen Rezeptor PirB beschrieben, eine mechanistische Erklärung für diese Befunde blieb jedoch aus.

SASH1 oder auch SLY3 ist auf Chromosom 10 lokalisiert und besitzt 20 Exons. Es sind zwei Transkripte beschrieben. Das Protein ist 110 kDa groß, in allen Geweben exprimiert und als Tumor Suppressor Gen beschrieben (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003). Diese Assoziation beruht jedoch einzig und allein auf einer verminderten Expression in Tumoren. Eine zelluläre oder molekulare Funktion ist nicht bekannt.

Alle drei Proteine zeigen eine ähnliche Organisation modularer Einheiten auf Basis von Datenbank Analyseprogrammen wie SMART mit einer zweigeteilten Kern Lokalisations Sequenz (NLS) am N-Terminus und zweier kurz aufeinander folgender SH3 und SAM Domänen. SASH1, als größtes der drei Proteine, weist noch einen verlängerten N- und C-

terminalen Bereich auf, mit einer „coiled-coil“ Domäne am N-Terminus sowie einer zusätzlichen SAM Domäne am C-Terminus (Abb. 1.4).

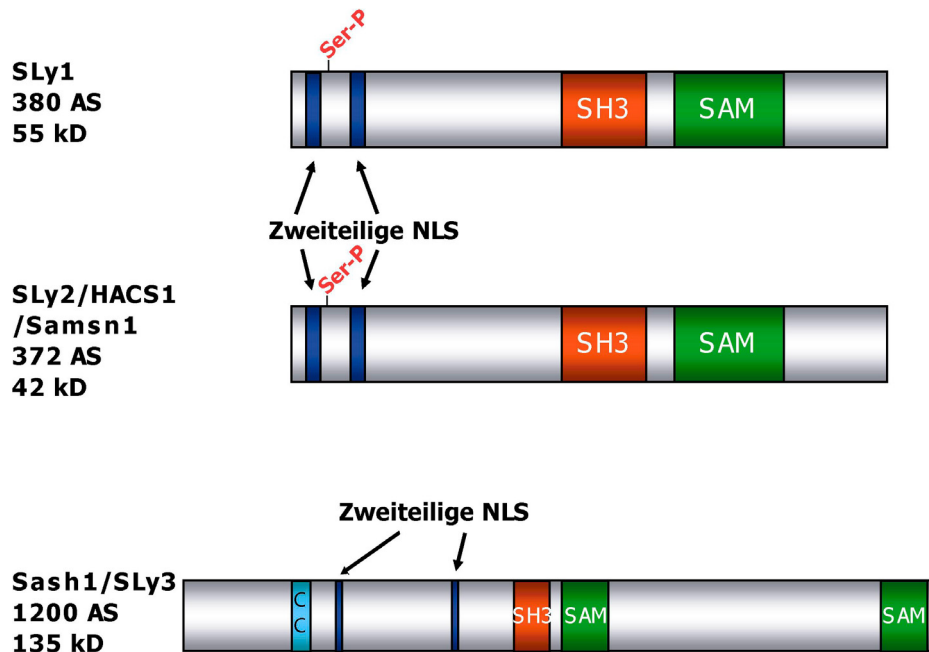


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der drei SLY Proteine

mit zweigeteilter NLS, SH3 und SAM Domäne. Die bekannte Phosphorylierungsstelle an Serin27 in SLY1 und die potentielle homologe Phosphorylierungsstelle an Serin23 in SLY2 sind gekennzeichnet (Ser-P). SASH1 enthält zwei SAM Domänen und eine zusätzliche „coiled-coil“ Domäne (C-C).

Ein direkter Sequenzvergleich der drei Proteine verdeutlicht vor allem die sehr hohe Homologie in den SH3 und SAM Domänen dieser Proteine (Abb. 1.5). Bei einem Datenbank Vergleich mit der SH3 Domäne von SLY1 wiesen SLY2 (70%) und SASH1 (80%) größere Homologien auf als zu den SH3 Domänen anderer Proteine. Die Homologie zu den SH3 Domänen anderer Proteine betrug dagegen maximal 44%. Dies lässt auf eine neue Familie von Adapterproteinen schließen.

mse SASH1	MEEDAGAASPAPEPEPEVDPAELEPEAGVSEISRLWTDVMGILDGSLGNIDDLAQYADYYNTCFSDVCERMEEELRKR	80
mse SASH1	RVSQDLDEVEKPDASPTSLQLRSQIEESLGFCSAVSTPEVERKYPLHKSNSSEDCVVGKGDWKKKNKYFWQNFRKNQKGIMR	160
mse SASH1	QTSKGEDVGYVASEITMSDEERIQLMMVMVEKMITIEALARLKEYEAQHRQSSTLDPADWPDGSYPTLDGSSSTCNSREQ	240
NLS1		
mse SASH1	SDDETEDSVKFKRLHLKLVNSTRVRVKLIIRVEEMKKPSAEGGEEHVFENSFPQDERSALYSGVHKKPFFYDGSPEKPPED	320
NLS1		
mse SLY1	MDRRKPSNASDKETQKKKLSLORSSSFK	29
mse SLY2	MLKRPKPSNASDKETKHQKPK---NSSSF-	24
mse SASH1	DADSLTPSPSSSSSLDTWGAGRKLVKTFSGESRGLIKPPKKMGTFFSYPREEKAQKVSRLTEGEMKKGSLSHGRTCS	400
NLS2		
mse SLY1	DFAKSKPSSPVVSEKEFNLDNIPEDDSGVLTPEDSGKSGKKLGKKWRAVISRTMNRKMGKMMVKALSEE-MGDTLEEGS	108
mse SLY2	-GNFDRFRNNSVSKSDDSIKVHDLRELNGSEEQSKTSSSGSLGKKVRA-ISWTMKKVGKPKYIKALSEEKEEESGEEAL	102
mse SASH1	FGGFDDLNRSLHVGSNNSDPAGKEGDFVYKEVIKSPAPRISLGKKVRSV-KETMRKRMSPKYSSPVEQ---DSGLDGM	476
mse SLY1	ASPTSPDCSLDSPGPEKMALAFTEQEEREPPSLSRQTSSTGSE-L--CSPGPGS-GSELEES---PAPQYTGPFGRARVH	181
mse SLY2	PYR-NSD-PMIGTHTEKISLKASDSMDSLYS---GQSSSSG--ITS-CSDGTSNRDSEFLDD----DSPYSGPFGGKRAKVH	171
mse SASH1	PSSPASG-KPDSEHVDKPKLKAGGSVESLSSSLSGQSSMSGQTVSTTDSSTSNRESVKSEDDGDDEEPPYRGPFGRARVH	555
SH3		
mse SLY1	TDFTSPYDHDLSKLQKGDVIQIVEKPPVGTWLGLLNGKLGSKFKFIYVDVLPPEEAVGPFVRESRRQSKKRPKPKTLHEL	261
mse SLY2	TDFTSPYDTSCLKIKKGDIIIDICTPMGMWTCMLNNKVGNFKFIYVDVILEEAAAPKKIKVPSRRRENH-QTIQEF	250
mse SASH1	TDFTSPYDTSCLKLKGDIIIDISKPPMGTMGLNNKVGTFKFIYVDVLEEEKPKRPTRRRKGRPSQPKSVEDLL	635
SAM		
mse SLY1	ERIGLEHTSTLLNGYQTFLEDFKELRETHINELNIMDPOHRAKLLTAAELLLDYDTGSEAEEGAESSQEPVAHTVSEP	341
mse SLY2	ERIHLOEYTTSTLLNGYETLDDLKDIKESHLIELNIADPEDRARLLSAAESLLDEETVEHEKESVPLSSNPDLISASQL	330
mse SASH1	DRINKHEHMPTEFLNGYEDLDTFKLLEEDLDELNIRDPEHRAVLLTAVELLQEYDSDNSDQSGSQEKLVDNQGLSG---	712
mse SLY1	KVDIPRDSGCFEGSESGRDEAELAGTEEQQLGSLSGAP*	381
mse SLY2	-EDCPRDSGCISSSENSDNKEDLESENLSDMVQKIAITESSD*	372
mse SASH1	--RSPRDSGCIYESSENLENKATHKPSVLSTKSSTESNLKSFTRSQPNYPTLPLMKSGEVRKQGEGRGLRGLAPDTAKS	790
mse SASH1	CDVPSVTDLSKNRRSLPVSICRSCETLEGPEPVESWPRSHSLDDLQGDADVGKNVPTTEMPETCSQNVPEVPQRTSACTSK	870
mse SASH1	ALPRGRDPTADVMLLTQSKRFSDPKPTMAKKLDGSSVVASNLGIAPPQCI PRDFEAQPPVKPGLTRTSLEGLRKGDHHP	950
mse SASH1	GTKEGVDEQSAPESTRTQSRHPSQPPVPAPKSRERLANGHLVPSPEAPILPLKKASPASPVSFSDCPSPREPRSSGT	1030
mse SASH1	EPGSPACTRPPFWLAELPESTSLQEHGVKLGVPVLSRVKSVRGVDLEMLTENKLAEGIDLTEEPYSDKHGRCGIPEALV	1110
mse SASH1	QRYAEDLEQPERDVATNMDQIRVKLLRKQHRMAIPSGGLTEICRKPLSPGCVASMSDWLISIGLPMYTSTLSDAGFSTLS	1190
SAM		
mse SASH1	QVPSLSHSCLOEAGITEERHIRKLITAAARLFKLHPSPEAM*	1230

Abb. 1.5: Sequenzvergleich der SLY Proteine

Die Aminosäuresequenz von SLY1 wurde mit SLY2 und SASH1 verglichen. Die blau eingerahmten Boxen markieren die zweigeteilte NLS, die SH3 und SAM Domänen. Orange hinterlegte Aminosäuren sind identisch.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Aktivierung von Lymphozyten ist ein essentieller Schritt in adaptiven Immunantworten. Sie muss exakt reguliert werden, um die Eliminierung von Pathogenen zu gewährleisten und gleichzeitig die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu unterbinden. Von größter Bedeutung in diesem Prozess ist die Signalübertragung von der Zelloberfläche in den Zellkern. Die dazu notwendigen räumlich und zeitlich abgestimmten Protein-Protein-Wechselwirkungen von Molekülen in Signalwegen sind trotz langjähriger Forschung aufgrund ihrer Komplexität und der Vielzahl der daran beteiligten Mediatoren erst zum Teil charakterisiert. Bekannt ist, dass hier Adapterproteine durch die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen eine wesentliche Rolle spielen. SLY1 ist aufgrund der intramolekularen charakteristischen SH3 und SAM Domänen ein solches putatives Adapterprotein. Dafür spricht außerdem die spezifische Phosphorylierung nach Antigenrezeptor Stimulation (Astoul et al., 2003; Beer et al., 2001). Eine vor Beginn dieser Arbeit erzeugte SLY1 Δ Mauslinie erhärtete diese Hypothese (Beer et al., 2005).

Die zellulären und molekularen Funktionen von SLY1 waren jedoch weitgehend unbekannt. Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit sollte daher die Aufklärung der intrazellulären Signalwege sein, an denen SLY1 beteiligt ist. Dazu sollte die TZR-vermittelte Aktivierung SLY1 Δ exprimierender T Lymphozyten eingehend untersucht werden. Des Weiteren sollte die biologische Funktion von SLY1 beginnend mit der membranproximalen Aktivierung von Rezeptor Tyrosinkinasen bis hin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren umfassend charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte eine Analyse der subzellulären Lokalisation von SLY1 und SLY1-Mutanten sowie eine Ermittlung der Regulation der Phosphorylierung am Serin27 durchgeführt werden.

Ein wesentlicher Befund der SLY1 Δ Phänotypanalyse war die reduzierte Zellzahl in lymphatischen Organen. Dies lieferte erste Hinweise auf eine Funktion von SLY1 in der *in vivo* Entwicklung von Lymphozyten. Diese Rolle sollte anhand einer Untersuchung der Thymozyten Differenzierung *ex vivo* näher charakterisiert werden. Ferner sollte der zugrunde liegende Mechanismus unter Zuhilfenahme eines *in vitro* Differenzierungssystems von T Zellvorläufern untersucht werden.

Die Expression des trunkierten Proteins in SLY1 Δ Mäusen kann aberrante Effekte haben und daher nicht unbedingt die physiologische Funktion von SLY1 widerspiegeln. Aus diesem Grund sollte weitergehend eine komplette Inaktivierung von SLY1 durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erfolgen und so eine SLY1 defiziente Mauslinie generiert werden. Diese sollte phänotypisch charakterisiert und mit dem Phänotyp der SLY1 Δ Mauslinie verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
Antikörper	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Calcium Ionophor	Sigma, Taufkirchen
CFSE	Molecular Probes, USA
DAPI	Molecular Probes, USA
Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
N,N'-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DNS Größenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL	GE Healthcare, München
EDTA	Riedel-de Haen, Seelze
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Hamburg

Ganciclovir (Cymeven)	Syntex, Aachen
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES Puffer, 1M	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
hCG (humanes Choriongonadotropin)	Intervet, Unterschleißheim
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Laurylmaltosid	Sigma, Taufkirchen
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
LPS	Sigma, Taufkirchen
mIFN γ	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
mIL-2	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
mIL-4	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
mIL-7	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
mIL-12	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Milchpulver	Oxoid, Hampshire, England
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma, Taufkirchen
NP-40	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PDBu (Phorbol 12,13-Dibutyrt)	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma, Taufkirchen
PMSG („pregnant Mare Serum Gonadotropin“)	Intervet, Unterschleißheim
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
PolydIdC	Sigma, Taufkirchen

Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
Rapamycin	Sigma, Taufkirchen
RPMI Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Schuchart, Hohenbrunn
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Sigma, Taufkirchen
Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.2 Radiochemikalien

5'-[γ - 32 P]-ATP, spezifische Aktivität $\sim 4500\text{Ci}/\text{mmol}$

5'-[α - 32 P]-dCTP redivue, spezifische Aktivität $\sim 3000\text{Ci}/\text{mmol}$

[Methyl- ^3H]-Thymidin, spezifische Aktivität $5.0\text{ Ci}/\text{mmol}$

[^{35}S]-Methionin spezifische Aktivität $\sim 1000\text{Ci}/\text{mmol}$

Die Reagenzien wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und vor dem Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	BioLabs, New England
DNS T4 Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNS Taq-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Polynukleotidkinase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pronase E	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Frankfurt
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Fortsetzung Restriktionsenzyme
RNase A

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien	Bezugsquelle
CD4 ⁺ / CD8 ⁺ / CD90 ⁺ Isolierungskit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
ExpressHyb Hybridization Solution	Clontech-Takara, Frankreich
Filme Hyperfilm TM -ECL	GE Healthcare, München
Filterpapier Whatman 3MM	VWR, Darmstadt
Microspin S-50/ S-200 HR Säulen	GE Healthcare, München
Nylonmembran, Gene Screen Plus	NEN [®] Research Products, USA
Nylonmembran, Protran BA 85 Cellulosenitrate	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Parafilm M	American National Can TM , Chicago, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	Falcon, New Jersey, USA
	Corning, New York, USA
QIAGEN Plasmid Isolierungskits	QIAGEN, Hilden
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Takara Ladderman Labeling Kit	Takara, Frankreich
Zellsieb (50 µm, 70 µm, 100 µm)	Falcon, USA

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
βCounter LKB Wallac	Perkin Elmer, USA
Brutschrank	BBD 6220, Heraeus, Hanau
Crosslinker	BIO-LINK BLX, Biometra, Göttingen
Drehinkubatoren	OV3, Biometra, Göttingen

Elektrophorese von DNS und RNS	Hoefer, Amstetten
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad, München
ELISA Reader Sunrise	Tecan, Crailsheim
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSCanto	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Geldokumentationssystem	BioDoc Analyze, BiometramGöttingen
Konfokalmikroskop	Zeiss LSM510
Kühlzentrifugen	Sorvall® RC 26 PLUS, Heraeus, Hanau
	Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau
	Rotor 2250 mit Mikrotiterschaukeln
	Omnifuge 2,0 RS, Heraeus, Hanau
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
PCR Maschinen	T3 Thermoblock, Biometra, Göttingen
	T1 Thermoblock, Biometra, Göttingen
	TGradient, Biometra, Göttingen
Photometer	Gene Quant, Pharmacia Biotech
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau
Thermoblöcke	Termomixer Compact, Eppendorf,
	Wesseling-Berzdorf
	DRI Block, Techne, Jahnsdorf
Tischzentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau
Ultraschall Anlage	Branson-Sonifier 450, G.Heinemann,
	Schwäbisch Gmünd
Wasserbad	WNB22, Memert, Schwabach
	1092, GFL, Burgwedel
	E100, Lauda, Lauda-Königshofen
Zellkulturschüttler	3015, GFL, Burgwedel

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Auftragspuffer für DNS	0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylen Cyanol FF 15% Ficoll Typ 400	
Laufpuffer (Western Blot)	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris Base
	0,1% (w/v)	SDS
	1 mM	EDTA
	pH 7,7	
MACS-Puffer	PBS	
	0,5% BSA	
	2,5 mM EDTA	
	entgast, sterilfiltriert bei 4°C aufbewahrt	
Transferpuffer (20 x) (Western Blot)	25 mM	Bicine
	25 mM	Bis Tris
	1 mM	EDTA
TBS-T (20 x)	200 mM	Tris/HCL pH 7,4
	3 M	NaCl
	2%	Tween
Lysepuffer (Western Blot)	1%	NP – 40
	1%	Laurylmaltosid
	10 mM	NaFl
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	PMSF
	10 mM	EDTA

	170 mM	NaCl
	50 mM	Tris pH 7,5
	1 mM	PMSF
1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette pro 10 ml auflösen.		
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4	
Lösung I (Alkalische Lyse)	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris
	10 mM	EDTA
Lösung II (Alkalische Lyse)	0,2 N	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Lösung III (Alkalische Lyse)	60,0%	Kaliumacetat
	11,5%	Eisessig
	28,5%	H ₂ O _{bidest}
TE-Puffer	10 mM	Tris, pH = 8,0
	1 mM	EDTA, pH = 8,0
TNE	10 mM	Tris, pH = 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA, pH = 8,0
Proteinase K	10 mg/ml	in H ₂ O _{bidest} gelöst
Pronase E	10 mg/ml	Pronase E (10mg/ml)
	10 mM	Tris, pH = 8,0

	10 mM	NaCl
	Selbstverdau 1h bei 37°C	
Schwanzverdaulösung	500 µl	TNE
	50 µl	SDS 10%
	7,5 µl	Proteinase K
	25 µl	Pronase E
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM	Tris, pH = 8,0
	20 mM	Eisessig
	2 mM	EDTA
6 x DNS-Auftragspuffer	15%	Ficoll Typ 400
	0,05%	Bromphenolblau
	0,05%	Xylencyanol
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
Waschlösung I (Southern Blot)	2x	SSC
	0,05%	SDS
Waschlösung II (Southern Blot)	1x	SSC
	0,1%	SDS
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
10x PCR-Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl, pH = 8,3
	15-25 mM	MgCl ₂
	0,1%	Gelatine

2.2.2 Medien für die Bakterienkultur

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde nur mit Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiertes Luria-Bertani (LB) Vollmedium verwendet.

Tabelle 2.1: Bakterienkulturmedium

Medium	Zusammensetzung	Menge
LB	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
	pH = 7,2	

Um Festmedium zu erhalten wurde Medium mit zusätzlich 15 g Agar pro Liter verwendet. Bakterien in Flüssigkulturen wurden bei 37°C im Schüttelkolben und Bakterien auf Agarplatten bei 37°C im Brutraum inkubiert.

Bakterien auf Agarplatten wurden im Kühlschrank bei 4°C mit Parafilm verschlossen und maximal 4 Wochen aufbewahrt. Für eine Langzeitlagerung wurden Bakterien Flüssigkulturen mit 50% sterilem Glycerin vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3 Medien für die Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, bezogen.

Tabelle 2.2: Medien und Zusätze

	ES	EF	EL-4	Jurkat	293 FT	Primäre Lymphozyten	Primäre Thymozyten	OP9
Grundmedium	DMEM	DMEM	RPMI	RPMI	DMEM	RPMI	MEM α	MEM α
Zusätze								
FKS	15%	10%	10%	10%	10%	10%	20%	20%
Penicillin (U/ml)	100	100	100	100	100	100	100	100
Streptomycin (μ g/ml)	100	100	100	100	100	100	100	100
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
β -ME (mM)	0,05	0,05	0,05			0,05	0,05	0,05
LIF*	1%							
Behandlung								
Mitomycin C		10 μ g/ml für 2,5 Stunden						

* LIF wurde als Kulturüberstand des LIF produzierenden Klons CHO-LIF-D zugesetzt.

2.3 Antibiotika und andere Hemmstoffe

Für eine positive Selektion Plasmid tragender Bakterien wurde den Kulturmedien Ampicillin, Kanamycin oder Erythromycin beigelegt. Für die Selektion von ES Zellen mit homologen Rekombinationsereignissen innerhalb des SLY1 Locus wurde dem Medium Neomycin und Ganciclovir zugesetzt.

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika und andere Hemmstoffe

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	100 μ g/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	100 μ g/ml
Erythromycin	5 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	5 μ g/ml
Neomycin	Stocklösung 100 mg/ml aktiver Substanz in Medium.	200 μ g/ml
Ganciclovir	Stocklösung 2 mg/ml in sterilem H ₂ O _{bidest} , 128 μ l in 500 ml Medium	2 μ M

2.4 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.4.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2.4 sind die im Labor verwendeten Bakterienstämme für Klonierungszwecke unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue	endA1, hsdR17, thi-1, supE44, recA1, relA1, gyrA96, Δ (lac), (F'proAB), lacIqZ Δ M15, Tn10 (TetR)	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5 α	supE44, Δ lacU169, (Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	(Hanahan, 1983)d}

2.4.2 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5: Verwendete Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
Jurkat	humane T-Lymphom-Zelllinie	Tumorbank, DKFZ
Jurkat SLY-HA	Lentiviral mit pWPI-SLY1-HA transduzierte Jurkat Zellen	in dieser Arbeit generiert
Jurkat SLYS27A-HA	Lentiviral mit pWPI-SLY1S27A-HA transduzierte Jurkat Zellen	in dieser Arbeit generiert
Jurkat SLY Δ -HA	Lentiviral mit pWPI-SLY1 Δ -HA transduzierte Jurkat Zellen	in dieser Arbeit generiert
293FT	Aus 293F Zellen abgeleitete Zelllinie zur Maximierung der Virusproduktion	(Naldini et al., 1996)
EL-4	Maus, C57BL/6, Thymom-Zelllinie	ATCC Nummer TIB-39
EL-4 SLY-GFP	Stabil SLY1-GFP exprimierende Linie abgeleitet von EL-4 Zellen	Sandra Beer, Düsseldorf
EL-4 SLYS27A-GFP	Stabil SLY1S27A-GFP exprimierende Linie abgeleitet von EL-4 Zellen	Sandra Beer, Düsseldorf
EL-4 SLY Δ -GFP	Stabil SLY1 Δ -GFP exprimierende EL-4 Linie	Sandra Beer, Düsseldorf

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
ES Zellen E14.1	Embryonale Stammzellen, die aus dem Mausstamm 129/SvJ Ola gewonnen wurden	(Kuhn et al., 1991)
EF Zellen	Embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 <i>post coitum</i> aus CD1 Embryonen	frisch hergestellt
OP9 GFP und OP9 DL-1	Stroma-Zelllinie zur <i>in vitro</i> Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu T Zellvorläufern	(Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002)
Thymozyten/ Splenozyten	Primärzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und evtl. Erythrozytenlyse/ magnetischer Aufreinigung	frisch präpariert

2.4.3 Versuchstiere

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet. Als Blastozysten Spender dienten C57BL/6 Mäuse, als Ammenmütter CD1 Tiere. Die SLY1 Inaktivierung wurde auf den C57BL/6 Stamm mindestens 3-fach rückgekreuzt ausgehend von (C57BL/6 x 129/Ola) F1 SLY1^{+/-} Tieren. Resultierende heterozygote Mäuse wurden untereinander verpaart, um C57BL/6 SLY1^{-/-} des MHC Haplotyps H-2b zu erhalten. Die verwendeten SLY1^{ΔΔ} Mäuse (Beer et al., 2005) waren mindestens 6-fach auf den C57BL/6 kongenen Hintergrund rückgekreuzt, wo sie nach 12-facher Rückkreuzung als homozygot defiziente Zucht vermehrt wurden.

2.5 Primer

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. In Tabelle 2.6 sind die Primer aufgelistet, die in der sogenannten "Screening PCR" zum Nachweis der homologen Rekombination des SLY1 Rekombinationsvektors in ES Zellen und zur Maustypisierung von SLY1^{-/-} und SLY1^{ΔΔ} Mäusen eingesetzt wurden. Das Primerpaar ‚Screening Primer‘ 3 und 4 ist spezifisch für das KO Allel und ergibt ein PCR Produkt der Größe 705 bp, das für das Wildtyp (Wt) Allel spezifische Primerpaar ‚Screening Primer‘ 3 und 6 ergibt ein PCR Produkt der Größe 1206 bp.

Das Primerpaar Neo_for/ SLY_rev_Δ ist spezifisch für das SYL1Δ Allel und ergibt ein PCR Produkt von 740 bp; das Primerpaar Wt_for_Δ/ SLY_rev_Δ ist spezifisch für das Wt Allel und ergibt ein PCR Produkt von 646 bp.

Tabelle 2.6: Typisierungsprimer

Primername	Sequenz	Verwendung
Screening Primer 3	TGA CGG CAG TAG GGA TGG TAG	5' Primer Typisierung SLY1 Wt und KO
Screening Primer 4	CGC CTT CTT GAC GAG TTC TTC T	3' Neo Primer Typisierung SLY1 Ko
Screening Primer 6	AGT GGC CTG GGG GAG ATG T	3' Primer Typisierung SLY1 Wt
Wt_for_Δ	GGA GGA TTC TGG GAA GAG TGG	5' Primer Typisierung SLY1 Wt und SLY1Δ
Neo_for	TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG	5' Primer Typisierung SLY1Δ
SLY_rev_Δ	AGT CAT AGC TCT CCA TCA GC	3' Primer Typisierung SLY1 Wt und SLY1Δ

Weitere Primer wurden für die Amplifikation der zur Klonierung des SLY1 Rekombinationsvektors benötigten Fragmente und zur Kontrollsequenzierung des Vektors herangezogen (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Primer zur Klonierung des Rekombinationsvektors

Primername	Sequenz	Verwendung
KA_for_Not	AAT AAT ATG CGG CCG CGA TGA TGG CCA CAG GAG TGA CAG	5' Primer zur Klonierung des kurzen Arms
KA_rev-Xho	TTA TTA TAC TCG AGG TCA CTG GCG TTG GAG GGT TTG C	3' Primer zur Klonierung des kurzen Arms
SLY_LAI_5'_Xho	TTA TTC TCG AGT GAC AAA GAG CCC ACT CAG AAG	5' Primer zur Klonierung des langen Arms
SLY_LAI_3'_Apa	TAT TCC CGG GCC ATG TTC TGA ACC TAC TGT AGC	3' Primer zur Klonierung des langen Arms
SLY_LAII_5'_ApaI	TAT TGG GCC CTA CTG TGG TTC ATA AGG ATG C	5' Primer zur Verlängerung des langen Arms
SLY_LAII_3'_KpnI	ATT ATT GGT ACC TGG AAC TCA CTT TGT AGA CC	3' Primer zur Verlängerung des langen Arms

Die verwendeten Primer zur Klonierung von Expressionsvektoren sowie zur Sonden Herstellung für die Southern Blot Analyse sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

Tabelle 2.8: Sonstige Primer zur Klonierung und Mutagenese

Primername	Sequenz	Verwendung
5' Mut_Ser-Val-SLY1	CGC TCC AGC GCC TTC AAG GAT TTT GCC	5' Primer zur Mutagenese des Serin an Position 27 zu Alanin
3' Mut_Ser-Val-SLY1	GGC AAA ATC CTT GAA GGC GCT GGA GCG	3' Primer zur Mutagenese des Serin an Position 27 zu Alanin
SLY-SwaI-for	AAA ATT TAA ATG CCA CCA TGT TGC GTC GCA AAC CCT CC	5'-Primer zur Klonierung von SLY1-Varianten mit einem HA-Tag
SLY-HA-PacI-rev	AGC TTA ATT AAT CAC GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAA GGT GCC CCA	3'-Primer zur Klonierung von SLY1-Varianten mit einem HA-Tag
KO_Sonde_1_for	ACA CAG TAA GGC CTT GAG CAG	5' Primer zur Herstellung der flankierenden Southern-Sonde
KO_Sonde_1_rev	AGC CAT TAC TAC AAC CGT GAC TAC	3' Primer zur Herstellung der flankierenden Southern-Sonde

2.6 Antikörper und Protein Standards

Antikörper zur FACS Analyse stammten, wenn nicht anders angegeben, von Becton Dickinson, Heidelberg. Primärantikörper, die für Western Blot Analysen eingesetzt wurden, stammten, wenn nicht anders angegeben von Cell Signaling, USA. Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse stammten von Dianova, Hamburg. Ein polyklonaler Pan-SLY1-Antikörper sowie ein anti-Phospho-Serin27-SLY1-Antikörper wurden von Eurogentec, Belgien im Auftrag hergestellt und aufgereinigt und vor der Verwendung in dieser Arbeit ausgiebig auf Spezifität getestet. Zur Immunisierung wurde für die Generierung des Pan-SLY1-Antikörpers das Oligopeptid LRRKPSNASDKPTQC verwendet. Zur Generierung des Phospho-SLY1-Antikörpers wurde mit dem Oligopeptid LQRSSpSFKDFAKC immunisiert. Proteinstandards wurden von GE Healthcare, München, bezogen.

Tabelle 2.9: Weitere verwendete Antikörper.

Antikörper	Markierung/ Spezies	Verwendung	Quelle
Anti-Fos	Maus	EMSA	Santa Cruz, USA
Anti-GAPDH	Maus	Western Blot	Hyttest, Finnland
Anti-Jun	Maus	EMSA	Santa Cruz, USA
Anti-NFAT	Maus	EMSA	Alexis, Schweiz
Anti-Phospho-S6	Alexa-488	FACS	Cell Signaling, USA

2.7 Plasmidvektoren

2.7.1 Ausgangsvektoren

Für die Klonierung und Expression von DNS Sequenzen wurden verschiedene, z.T. kommerziell erhältliche Ausgangsvektoren verwendet.

Tabelle 2.10: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pBluescript II KS +	AmpR, KanR, fl ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ-Fragment, rop-	Stratagene, USA
pCR II-TOPO	Vektoren zur direkten Klonierung von PCR Produkten AmpR, KanR, fl ori, Col E1 ori, lac-Promoter, lacZ-Fragment	Invitrogen, Karlsruhe
pBS neo	pGK Neo poly A in pBluescript Vektor	K. Pfeffer, Düsseldorf
pGEM7 TK	enthält die Thymidinkinase aus Herplex Simplex Virus	K. Pfeffer, Düsseldorf
pWPI	Lentiviraler bicistronischer Expressionsvektor mit einer GFP-Kassette unter Kontrolle einer IRES-Sequenz	(Zufferey et al., 1998) und http://tronolab.epfl.ch

2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren

Vektoren, die basierend auf in Tabelle 2.10 gelistete Ausgangsvektoren im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, sind in Tabelle 2.11 gelistet.

Tabelle 2.11: Hergestellte Plasmide und Sonden

Bezeichnung	Vektor	Insert	Eigenschaften
Targetvektor	pBluescript II KS +	SLY1 langer und kurzer Arm, <i>neo</i> und HSV-Thymidin-Kinase	Vektor für die homologe Rekombination
5'Sonde Southern	pCR II-TOPO	1000 bp großes Fragment	5'-flankierende Sonde für Targetvektor
pWPI-SLY-HA	pWPI	SLY1-cDNS 3' fusioniert mit einem HA-Tag	Lentiviraler SLY1 Expressionsvektor
pWPI-SLYS27A-HA	pWPI	Serin27 zu Alanin mutagenisierte SLY1-cDNS 3' fusioniert mit einem HA-Tag	Lentiviraler SLY1 Expressionsvektor
pWPI-SLYΔ-HA	pWPI	SLY1Δ-cDNS 3' fusioniert mit einem HA-Tag	Lentiviraler SLY1 Expressionsvektor

2.8 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.8.1 Isolierung von Plasmid DNS

Alkalische Lyse

Die Alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) wurde dazu benutzt, um viele Klone durch geeignete Restriktionsanalysen gleichzeitig genetisch zu überprüfen. Die Bakterien werden unter denaturierenden Bedingungen für RNS, DNS und Proteine durch SDS in Gegenwart von NaOH in der Kälte lysiert. Die anschließende Neutralisation führt zur Kopräzipitation von SDS, chromosomaler DNS und Proteinen. Die Plasmid DNS renaturiert und verbleibt in Lösung, aus der sie durch Ethanol Fällung gewonnen werden kann. Alle Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 aufgeführt.

Durchführung:

- Zu untersuchende Klone wurden in 2 ml LB unter Selektionsdruck ÜN kultiviert
- 1,5 ml wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß (ERG) 1 min pelletiert (6000 rpm)
- Zellen wurden in 250 µl Lösung I vollständig resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert
- 250 µl Lösung II wurde zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert

-
- Durch Zugabe von 250 µl Lösung III wurde neutralisiert, wiederum vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert
 - Die Lösung wurde anschließend 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert
 - Der Überstand (ÜS) wurde mit 1 Volumen Isopropanol gefällt
 - Die DNS wurde pelletiert (14000 rpm für 10 min)
 - Das DNS-Pellet wurde mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und 5 min getrocknet
 - Das Pellet wurde in 20 µl TE gelöst

Qiagen Kits

Die Plasmid DNS Isolierung erfolgte mithilfe von Qiagen Kits, um besonders reine DNS für Klonierungszwecke und für Sequenzierreaktionen zu erhalten. Je nach benötigter DNS Menge wurden Mini, Midi oder Maxi Säulchen verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.8.2 Isolierung von chromosomaler DNS

Aus Proteinase-verdauten Mausschwanz-Biopsien oder ES Zellen wurde die genomische DNS nach Abtrennung von Proteinen und Festbestandteilen durch Fällung gewonnen.

Durchführung:

- Die Schwanzprobe (ca. 0,4 cm) oder ES Zellen wurden in ein ERG geben und in 500µl der Verdauungslösung ÜN (siehe Kapitel 2.2.1) bei 56°C inkubiert, um Proteine zu verdauen
- Durch Zentrifugieren (14000 rpm/2 min) wurden alle festen Bestandteile abgetrennt und der Überstand in ein neues ERG überführt
- Ein Volumen Isopropanol wurde zugegeben und gemischt
- Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 70% EtOH gewaschen
- Das Pellet wurde getrocknet und in 50-200 µl TE-Puffer gelöst
- Gelöste chromosomale DNS wurde bei 4°C gelagert

2.8.3 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode, die zur Auftrennung von DNS Fragmenten verwendet wird. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Hierbei erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit dem Logarithmus des Molekulargewichtes invers proportional ist. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid in der Gelmischung fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV Licht. Das Muster kann dadurch auch photographisch festgehalten und analysiert werden.

Durchführung:

- 0,8 - 4% (w/v) Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht bis eine klare homogene Lösung entstand
- Nach Abkühlen auf Handwärme wurde Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugegeben, die Lösung in eine Gelwanne mit den gewünschten Kämme gegossen und abgewartet, bis die Lösung sich zu Gel verfestigt hatte
- Die Gelwanne mit dem erstarrten Gel wurde in eine Elektrophorese Apparatur eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet
- DNS-Proben wurden mit Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert
- Die Elektrophorese wurde je nach Gelgröße bei 80-150 Volt durchgeführt

Das in die doppelsträngige DNS eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert bei UV-Bestrahlung und das Bandenmuster kann somit photographisch dokumentiert werden.

Präparative Agarosegelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurden mehrere Taschen der Kämme abgeklebt, um größere DNS-Mengen auftragen zu können. Anschließend wurde die Gelelektrophorese (s. o.) durchgeführt. Die gewünschten Banden im Gel wurden unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten. Aus dem isolierten Gelstück wurde die DNS mittels eines „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) gewonnen. Die Vorgehensweise entsprach der dem Kit beiliegenden Anleitung des Herstellers.

Bestimmung von Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 1 kb-Leiter der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

2.8.4 Enzymatische Behandlung von DNS

Restriktionsbehandlung von DNS

Die sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge, wobei DNS-Moleküle mit definierten Enden entstehen, die sich zum Klonieren von Vektoren eignen. Die durch Restriktionsbehandlung erstellten Fragmente chromosomaler DNS wurden auch als Sonden verwendet, um spezifische Sequenzen durch Hybridisierung zu identifizieren. Zur Überprüfung der einzelnen Plasmide wurden Restriktionsenzyme ausgesucht, die ein spezifisches Bandenmuster erzeugen. Für eine vollständige enzymatische Reaktion wurden 2-5 Einheiten Restriktionsenzym pro μg Plasmid-DNS und bis zu 10 Einheiten Enzym pro μg genomischer DNS eingesetzt. Der allgemeine Ansatz einer Restriktionsreaktion ist in Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Restriktionsansatz

Zusammensetzung	ohne BSA-Zugabe	mit BSA-Zugabe
DNS (alle Angaben gelten für 2 μg DNS)	2 μg	2 μg
Puffer (10x)	2 μl	2 μl
BSA (20x)	----	1 μl
Enzym	1 μl	1 μl
H ₂ O _{bidest}	ad to 20 μl	ad to 20 μl

Der Anteil an Enzym sollte 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Reaktion durch hohe Glycerinkonzentration des Enzymkonservierungsmittels beeinflusst werden kann.

Dephosphorylierung von DNS

Um eine Selbstligation des Vektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden und eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNS-Fragment zu begünstigen, wurden die 5'-Enden des Vektors mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach der Restriktionsbehandlung, bzw. der Linearisierung des Vektors, wurde dem Ansatz eine Einheit Alkalische Phosphatase zugegeben und dieser weiterhin bei 37°C mindestens eine Stunde inkubiert. Um bei der anschließenden Ligation störende Enzymaktivität zu vermeiden, wurde das Enzym für 10 min bei 65°C inaktiviert.

Ligation von DNS-Molekülen

T4 Bakteriophagen DNS Ligase katalysiert die Bindung von Phosphodiestergruppen eines 5'-Phosphats und eines 3'-Hydroxylendes linearer DNS-Moleküle. Dabei spielt es keine Rolle ob die Enden glatt sind oder ob 3' bzw. 5' Überhänge vorliegen.

Durchführung:

Für eine effiziente Ligation von doppelsträngiger DNS ist ein passendes, molares Verhältnis der zu ligierenden DNS Fragmente nötig. Es sollte bei Vektor zu DNS-Fragment in etwa 1 : 3 sein. Zu diesem DNS Ansatz wurden 2 µl 10x Puffer und 1-2 Einheiten T4 DNS Ligase gegeben, der Ansatz wurde auf 20 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb 60 min oder über Nacht bei 16°C.

Alternativ verwendet wurden in dieser Arbeit zwei Kits. Zum einen der „TA-Cloning Kit“ von Invitrogen und zum anderen ein „fast ligation Kit“ von Takara. Für beide Kits erfolgte die Ligation entsprechend den Herstellerangaben.

2.8.5 Transformation von *E. coli* Bakterien

Für die Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli* Bakterienstämme DH5α und XL1 Blue verwendet. CaCl₂ behandelte Zellen können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden (Cohen et al., 1972).

2.8.6 Southern Blot Analyse

Diese Methode wird zum Nachweis spezifischer DNS-Sequenzen in genomischer DNS verwendet (Southern, 1975). Durch DNS/DNS Hybridisierung mit einer komplementären, markierten Sonde können die gesuchten DNS-Sequenzen detektiert werden.

Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen

Nach der Inkubation der genomischen DNS mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen werden die DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch aufeinander folgende Säure- und Alkalibehandlung werden die Fragmente in kleinere Stücke zerlegt und denaturiert. Mittels eines Kapillarblots werden sie auf eine Nylonmembran transferiert.

Durchführung:

20 µg der chromosomalen DNS wurden in einem Restriktionsansatz mit hoch konzentrierten Enzymen (50 U/µl) über Nacht geschnitten und am nächsten Tag mittels DNS-Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid bei 30 V über Nacht aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde ein Längenstandard verwendet (z.B. Fotografie mit Lineal). Das fotografierte Agarosegel wurde zur partiellen Depurinierung in 0,25N HCl für etwa 15 min geschwenkt. Ein anschließendes Bad in 0,4N NaOH für weitere 30 min führt zur Denaturierung und Spaltung der DNS an den depurinierten Stellen. In der Zwischenzeit wurde die Nylonmembran auf die Größe des Agarosegels zurechtgeschnitten, mit H₂O_{bidest} befeuchtet und in 0,4N NaOH etwa 15 min äquilibriert.

Aufbau des Kapillarblots:

Zuerst wurden ca. 10 cm Zellstoffpapier an den Rand einer mit 0,4N NaOH Blotlösung gefüllten Wanne gestellt und darauf in der angegebenen Reihenfolge luftblasenfrei folgende Schichten platziert:

- 3 Lagen befeuchtetes 3 mm Whatmanpapier
- Nylonmembran
- Gel
- 2 Lagen befeuchtetes 3 mm Whatmanpapier
- mit Blotlösung befeuchtetes 3 mm Whatmanpapier, dessen Enden in die Wanne mit Blotlösung eintauchen

- Glasplatte

Der Kapillarblot wurde mit etwa 0,2 bis 0,5 kg beschwert und über Nacht bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wird die Blotlösung nach unten gesaugt, und die DNS-Fragmente werden auf die Nylonmembran transferiert. Die geblottete Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen um letzte Gelreste zu entfernen. Nach Markierung der Membranvorderseite wurde die DNS durch UV-Bestrahlung kreuzvernetzt und somit fixiert.

Radioaktive Markierung der Sonde

Zur Herstellung und Markierung der Sonde wird das Klenow-Fragment benutzt, welches an einer einzelsträngigen DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten dCTP zu unmarkierten Nukleotiden wird die neu synthetisierte DNS radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). In dieser Arbeit wurde der Ladderman Labeling Kit (Takara, Japan), mit dem bis zu 1 µg DNS unter Verwendung von 50 µCi ^{32}P -dCTP markiert werden können. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit Microspin S-200 HR Säulen (GE Healthcare, München) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNS/DNS Hybridisierung

Die DNS/DNS Hybridisierung zwischen der markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu passenden, nachzuweisenden chromosomalen DNS-Sequenz führt zur Bildung des stabilen, doppelsträngigen DNS/DNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybridmoleküle können durch anschließende Detektion der Markierung sowohl mit radioaktiver Belichtung eines Filmes als auch bei Benutzung eines Phosphoimagers sichtbar gemacht werden. Die benötigten Lösungen sind in Kapitel 2.1.4 und 2.2.1 aufgeführt.

Durchführung:

Die Membran wurde über Nacht bei 60°C in 20 ml frischer Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech-Takara, Frankreich) prähybridisiert und am nächsten Tag die markierte, hitzedenaturierte Sonde zugegeben. Die Membran wurde über Nacht bei 60°C hybridisiert.

Durch zweimaliges Waschen mit Lösung I für 30-40 min bei RT und ein- bis dreimaligem stringentem Waschen mit Lösung II für 10 min bei 50°C wurde unspezifisch gebundene Sonde abgewaschen. Die spezifisch gebundene Radioaktivität wurde autoradiographisch detektiert.

2.8.7 Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNS Polymerasen, einzelsträngige DNS als Vorlage für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um auf diesem Weg viele Kopien einer spezifischen DNS Sequenz zu erstellen (Mullis et al., 1986). Nach Hitzedenaturierung hybridisieren spezifische Primer, die jeweils an die einzelsträngigen 3' Enden der zu amplifizierenden Sequenz binden. Die Verlängerung der DNS erfolgt durch eine thermostabile DNS Polymerase. Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine wiederkehrende Schleife von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und DNS Verlängerung über 30-35 Zyklen zur exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNS Fragments.

Tabelle 2.13: Standard PCR Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen
DNS	ca. 100 ng
Primer 1 (20 - 100 µM)	1 µl
Primer 2 (20 - 100 µM)	1 µl
10x Puffer (Kapitel 2.2.1)	5 µl
dNTP (Kapitel 2.2.1)	10 µl
Taq-Polymerase (5 Einheiten/ µl)	1-2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Die Sequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Primer sind in Kapitel 2.5 angegeben.

Durchführung:

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gemischt, kurz mit einem Vortex-Gerät gemischt und abzentrifugiert. Die Durchführung des Reaktionszyklus ist unter den in Tabelle 2.14 angegebenen Bedingungen nachzulesen. Die Temperatur der Primerhybridisierung ist sequenzabhängig, die Extensionsdauer hängt von der Größe des PCR-Produkts ab- als Faustregel gilt 1 min pro 1000 bp.

Tabelle 2.14: Standard PCR Bedingungen

Funktion	Dauer	Temperatur	Zyklus- wiederholung	Anzahl Zyklen
DNS Denaturierung	3 min	95°C		
DNS Denaturierung	15 s	95°C		x 25-55
Primerhybridisierung	30 s	56-68°C		
Extension	variabel	72°C		
Pause	unbegrenzt	4°C		

2.8.8 Sequenzanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurden alle DNS Sequenzierungen von der Firma GATC-Biotech, Konstanz, durchgeführt.

2.8.9 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

Mithilfe des EMSA kann die DNS Bindeaktivität von Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (; Schreiber et al., 1989). Das kann ausgenutzt werden, um beispielsweise die Aktivierung von T Zellen nach TZR-Stimulation zu überprüfen. Vorgehensweise: Die für den zu testenden Transkriptionsfaktor spezifischen Oligonukleotide (Santa Cruz, USA) wurden mithilfe der Polynukleotidkinase terminal radioaktiv markiert. Kernextrakte (siehe Kapitel 2.9.1) der Zellen wurden mit den markierten Oligonukleotiden inkubiert. Die Probe wurde anschließend mithilfe einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das fertige Gel wurde getrocknet und die Signale autoradiographisch detektiert.

Radioaktive Markierung der Oligos

4 µl Oligonukleotid der Konzentration 20 µg/ml (Santa Cruz)

5 µl γATP (4500 Ci/mmol MP Biomedicals #35001x01)

1,5 µl Polynucleotid-Kinase (PNTK)

2 µl 10x PNTK Puffer

8 µl H₂O

20 µl

60 min 37 °C, danach + 30 µl H₂O, Reinigung über G-50 Säulchen von GE Healthcare, München.

Die Aktivität wurde gemessen und 50000-100000 cpm je Probe eingesetzt (-20 °C Lagerung)

Bindereaktion

5x Binde-Puffer:

62,5 mM HEPES-Puffer

50% Glyzerin

0,5 mM EDTA

5 mM DTT (kurz vor Gebrauch zugeben)

10 µl Probe (2-10 µg nukleäres Lysat, aufgefüllt mit Puffer II), vorinkubiert mit 3 µl PolydIdC (1 µg/µl)

10 min 0°C

1 µl BSA (2 µg/µl)

4 µl 5x Binding Buffer

x µl Oligo

ad 20 µl

20 min RT

Bei Durchführung eines Supershift wurde danach 1 µl Antikörper (0,2-1µg/µl) zugeben und 30 min bei 0°C inkubiert

Elektrophoretische Auftrennung

Ein großes natives Gel mit 6% PAA Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 wurde vorbereitet und bei 80 V 3h ohne Proben äquilibriert (Laufpuffer 0,5xTBE). Als Kontrolle wurde immer Probe ohne Proteinlysat aufgetragen (inklusive 3 µl Orange G)

Der Gellauf mit Proben fand bei 120 V statt.

2.9 Proteinanalytische Methoden

2.9.1 Aufbereitung der Proben

Zur Western Blot Analyse wurden pro Spur $1\text{-}5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst in 50 μl Zelllysepuffer bei 4°C 15 min lysiert. Dann wurden die Zellmembranen, Zytoskelettbestandteile und Nuklei bei 14.000 rpm für 10 min abzentrifugiert, wobei die Proteine in Lösung verblieben. Der Überstand wurde mit 15 μl 5x SDS Probenpuffer/ β -Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 95°C aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren.

Für die detaillierte Analyse der nukleären und zytoplasmatischen Proteine wurden diese über eine Nukleus-Zytoplasma-Aufreinigung getrennt. Dazu wurden 1×10^7 Primärzellen oder $2\text{-}5 \times 10^6$ Zellkulturzellen in 500 μl Puffer I (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA) 10-20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 30 μl 10% NP40 zugeben (0,6% NP40 Endkonzentration), 10 s auf dem Vortex-Gerät vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation mit 2.000 rpm für 5 min bei 4°C wurde der Überstand als zytoplasmatische Fraktion abgenommen. Das Kernpellet wurde einmal mit 500 μl Puffer I ohne NP40 gewaschen und dann in 10 μl Puffer II (20 mM HEPES, pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA) aufgenommen, 30 min bei 4°C sehr stark geschüttelt und anschließend für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in EtOH + Trockeneis eingefroren und als Nukleusfraktion sowohl für EMSA als auch für Western Blot Analysen eingesetzt. Zu Puffer I und Puffer II wurde kurz vor Versuchsbeginn je 1mM DTT, Na_3Ov_4 , NaF und PMSF sowie Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim) gegeben.

2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Es wurden 4-12% Bis-Tris-Gradientengele der Firma Invitrogen verwendet. Die denaturierten Proben wurden in die Taschen des Gels aufgetragen und bei 160 Volt aufgetrennt. Zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden wurde parallel ein Molekulargewichtsmarker (GE Healthcare, Braunschweig) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

2.9.3 Western Blot (Immunoblot)

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen mithilfe spezifischer Antikörper. Im Anschluss an eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zunächst ein Elektro-Transfer (Blot) mit einer „Wet-Blotapparatur“ (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt, um die Proteine auf eine Protranmembran (Schleicher & Schuell, Dassel) zu überführen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für die Western Blot Analyse wurde die Nitrocellulosemembran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver in TBST blockiert. Danach wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in 3% Magermilchpulver in TBST über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte von jeweils 5 min mit TBST. Der zweite Antikörper, an Peroxidase gekoppelt, wurde ebenfalls in 3% Magermilchpulver in TBST unter leichtem Schütteln für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde nochmals dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mithilfe des ECL-Systems (GE Healthcare, Braunschweig). Die Membran wurde für eine min in den zu gleichen Teilen gemischten Detektionslösungen eins und zwei inkubiert und anschließend zwischen eine Plastikfolie gelegt. Die spezifischen Signale wurden mittels Röntgenfilm detektiert.

2.10 Zellkultur

2.10.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken durchgeführt. Dabei wurde grundsätzlich mit Laborhandschuhen gearbeitet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5-10% CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre.

Suspensions-Zelllinien

Suspensionszellen wurden in einer Dichte bis ca. 5×10^5 Z/ml kultiviert.

Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Die Zellablösung adhärenent wachsender Zellen erfolgte durch Inkubation der mit PBS gewaschenen Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 10

min wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt, und die Zellen neu ausgesät.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen mit 0,16% Trypanblau und 0,9% NaCl in PBS in einer Neubauer Zählkammer.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfriermedium setzte sich aus 90% FKS und 10% DMSO zusammen, wenn nicht anders angegeben. Jeweils 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und für 24 h bei -70°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37°C . Die Zellen wurden einmal in Medium gewaschen und anschließend in Kulturmedium ausgesät.

2.10.2 Lentivirale Transduktion von Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten lentiviralen Vektoren sind nicht replikationsfähig und durchlaufen den lentiviralen Replikationszyklus nur bis zur Integration in der Zielzelle. Zur Herstellung der Vektoren werden drei verschiedene Plasmide transient in 293FT Zellen transfiziert.

Das erste Plasmid codiert für das Gen, das in die Zielzelle transferiert werden soll. Das verwendete pWPI Ausgangsvektorkonstrukt (Klages et al., 2000) enthält das zu exprimierende Gen unter der Transkriptions-Kontrolle eines EF1- α Promoters, sowie einen offenen Leserahmen für Grün fluoreszierendes Protein (eGFP) unter der Kontrolle einer IRES Sequenz. Es handelt sich somit um einen bicistronischen Vektor. Beide Gene werden gemeinsam flankiert von langen terminalen Sequenzen (LTR), die für die Verpackung und Integration essentiell sind. Die grüne Fluoreszenz erlaubt somit eine einfache Überprüfung der Transduktionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflußzytometrie. Alle weiteren für Transkription, Verpackung, reverse Transkription und Integration notwendigen cis-aktiven lentiviralen Sequenzen sind ebenfalls enthalten. Das Vektorkonstrukt weist Deletionen im Bereich der U3-Region des 3'-LTRs auf, die bei der reversen Transkription als Matrize für die U3-Region des 5'-LTRs dient. Die ins Genom der Zielzelle integrierte provirale DNA weist folglich Deletionen im lentiviralen Promotor auf und kann durch diesen

nicht transkribiert werden. Der Vektor wird daher als sich selbst inaktivierender Vektor bezeichnet.

Das zweite Plasmid codiert für die Verpackung des Virus nötigen Gene *gag*, *pol* und *rev*. Bei dem verwendeten Vektor pCMV-dR8.74psPAX2 der zweiten Generation sind zusätzliche Gene des Virus, wie *vpr*, *vif*, *vpu* oder *nef* deletiert (Zufferey et al., 1998).

Das dritte Plasmid enthält die Informationen für das G Protein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G), das als Hüllprotein zur Pseudotypisierung des Virus dient.

Virusproduktion mithilfe von 293 FT Zellen

Am Vortag wurden $2-3 \times 10^6$ 293FT Zellen auf einer 10cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Morgen erfolgte die Transfektion mittels Calciumchlorid. Dazu wurden 20 µg des pWPXL Vektors, 15 µg des Verpackungsvektors und 5 µg des Hüllproteinvektors gemischt und auf 250 µl mit 125 mM HEPES aufgefüllt. Nach Zugabe von 250 µl CaCl_2 wurde die Lösung unter Benutzung eines Vortex-Geräts zu 500 µl zweifach HEBS pipettiert und 32 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Medium von den 293FT Zellen entfernt und 9 ml FKS-freies Medium auf die Platten gegeben. Nach 35 min ist die Ausbildung des Präzipitates ausreichend, und der gesamte Ansatz wurde tropfenweise mit dem Zellmedium vermischt. Nach 6-stündiger Inkubationszeit wurde das Medium mitsamt dem Präzipitat entfernt und 6ml FKS-haltiges Medium zu den Zellen gegeben. 48 Stunden später wurden die Viren geerntet. Dazu wurde das Medium von den Platten abgenommen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde die Virenhaltige Lösung durch einen 0,45 µm Filter filtriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C .

Lentivirale Transduktion von Jurkat Zellen

Der Virusüberstand wurde im 37°C Wasserbad aufgetaut und mit 8 µg/ml Polybrene versetzt. Die zu transduzierenden Zellen wurden auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 20-100 µl der Zellsuspension wurden zusammen mit einem ml des Virusüberstands in eine 24-Loch-Platte gegeben und für 30 min im Brutschrank äquilibriert. Anschließend wurde die Platte mit Parafilm umwickelt und bei 32°C und 1200 rpm für 120 min zentrifugiert. Danach wurde der Parafilm entfernt und die Zellen für zwei bis fünf Stunden weiter in dem Virusüberstand inkubiert, ehe ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die Transduktionseffizienz wurde durch durchflusszytometrische Bestimmung der GFP-Expression nach 7-14 Tagen ermittelt.

Jurkat Zellen, die auf diese Weise behandelt wurden, blieben zu mindestens 95% über den Zeitraum der Analyse dauerhaft GFP-positiv.

2.10.3 Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten

Zellkultur von ES/EF Zellen

Embryonale Stammzellen wurden grundsätzlich auf mit Mitomycin C vorbehandelten EF Zellen (2,5 h, 37°C) kokultiviert, um die notwendigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich wurde den ES Zellkulturen LIF-Überstand (1000 U/ml Endkonzentration) zugegeben, um das Ausdifferenzieren zu verhindern. Undifferenzierte ES Zellen erscheinen im Lichtmikroskop als spindelförmige Kolonien mit einem glatten, hell scheinenden Rand. Die ausdifferenzierten Kolonien dagegen erscheinen grau granuliert, werden matt und bilden Pseudopodien aus.

Elektroporation von ES Zellen

Die embryonalen Stammzellen wurden durch Elektroporation mit dem SLY1 Rekombinationsvektor transfiziert.

Durchführung:

- ES Zellen wurden auf drei 15 cm-Zellkulturplatten expandiert (ca. 5×10^7 Zellen)
- Für die Elektroporation wurden diese in 7 ml ES-Medium aufgenommen und mit 200 µg linearisiertem Rekombinationsvektor in 1 ml PBS gemischt
- Je 800 µl wurden in Elektroporationsküvetten überführt
- Die Elektroporation wurde bei 340 V/250 µF durchgeführt
- Elektroporierte Zellen wurden anschliessend 10 min auf Eis inkubiert
- Jeder Elektroporationsansatz wurde auf eine vorbereitete 10 cm EF-Kulturschalen verteilt

Selektion rekombinanter ES Zellklone

Nach der Transfektion wurden die ES Zellen einem zweifachen Selektionsdruck mit G418 und Ganciclovir unterworfen, um homolog rekombinierte ES Zellklone anzureichern.

Durchführung:

- Nach der Transfektion wurden die Zellen zwei Tage ohne Selektionsdruck kultiviert
- An Tag 2 erfolgte Selektion durch Zugabe von Geneticin (G418) im Medium (200 µg/ml)
- An Tag 4 erfolgte eine zusätzliche Selektion mit 2 mg/ml Ganciclovir im Medium
- Mediumwechsel wurde anschließend alle zwei Tage durchgeführt
- Überlebende ES Zellklone (Tag 11) wurden mit PBS gewaschen. Dazu wurden die ES Zell Platte mit 10 ml PBS überschichtet, die Einzelkolonien mit einer sterilen Pipette in 20 µl PBS aufgenommen und in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte überführt
- Die Kolonien wurden durch Trypsin/EDTA Behandlung vereinzelt und die EF Zellen dazugegeben
- Nach zwei Tagen wurden zwei Drittel der Zellen auf 48-Lochplatten verteilt und die übrigen Zellen auf der 96-Loch-Platte belassen. Diese wurden auf zwei 96-Lochplatten verteilen, sobald möglich
- Die Zellen der duplizierten 96-Lochplatten wurden so dicht wie möglich kultiviert und dann das mit PBS gewaschene Zellpellet bei –20°C weggefroren. Zur Screening-PCR wurde das Pellet in H₂O bidest. aufgenommen
- Die Zellen auf den 48-Lochplatten wurden in Einfriermedium bei –80°C gelagert, sobald diese gut bewachsen waren

Einfrieren von ES Zellen**Durchführung:**

- Die Zellen wurden vor dem Einfrieren mit Trypsin/EDTA vereinzelt und die Reaktion mit Medium abgestoppt
- Die Zellsuspension wurde 1:1 mit dem Einfriermedium (80% FKS, 20% DMSO) vermischt, 30 min bei –20°C inkubiert und dann bei –80°C gelagert
- Klone auf 5 cm Kulturschalen wurden nach Trypsinisierung abzentrifugiert, (5 min, 1200 rpm), in Einfriermedium aufgenommen (80% Medium, 10% FKS, 10% DMSO) und in Kryoröhrchen überführt
- Die Zellen wurden 30 min bei –20°C inkubiert, dann ÜN bei –80°C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren

2.10.4 Kultivierung von Splenozyten oder Thymozyten

Zur Kultivierung von Splenozyten wurde eine Milz nach Entnahme in Medium über ein 70 µm Zellsieb homogenisiert. Um die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien, wurde nach Zentrifugation (1400 rpm für 5 min) das Zellpellet in 3 ml Erythrozyten Lysepuffer (siehe 2.2.1) aufgenommen und 3 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PBS gestoppt, die verbleibenden Leukozyten durch Zentrifugation und nochmaliges Sieben von Zellresten abgetrennt und in Medium aufgenommen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Präparation von Thymozyten erfolgte in analoger Weise, allerdings ohne die Durchführung einer Erythrozyten-Lyse.

2.11 Tierversuche

2.11.1 Superovulation

Um eine größere Zahl an Blastozysten zu erhalten wurden weibliche Mäuse superovuliert. Dazu wurde den Mäusen 10 U Follikelreifungs-Hormon („Pregnant Mare Serum Gonadotropin“, PMSG) und 44-48 h später 10 U humanes Choriongonadotropin (hCG) intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Mäuse mit männlichen Mäusen verpaart. Die Ovulation erfolgt etwa 12 Stunden nach hCG Gabe. Nach weiteren 12 Stunden erfolgte die Untersuchung auf einen Vaginalpfropf, der auf eine erfolgte Begattung hinweist. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf entdeckt wird, wird als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung bezeichnet. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 p. c. entnommen.

2.11.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten für die Kultivierung von ES Zellen wurden aus superovulierten CD1 Mäusen am Tag 14 *post coitum* gewonnen. Den Spendertieren wurde der Uterus steril entnommen und in einer Petrischale mit Medium gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend aus dem Uterus präpariert, in frisches Medium überführt und der Kopf und die fötale Leber entfernt. Das restliche embryonale Gewebe wurde durch ein Sieb (100 µm Porengröße, Falcon, New Jersey, USA) gedrückt und in EF Medium kultiviert. Die vereinzelter EF-Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen mit etwa 5×10^6 Zellen ausgesät. Anschließend wurde alle zwei Tage frisches Medium auf die Zellen gegeben. Bei

konfluentem Wachstum wurden die EF-Zellen expandiert und nach weiteren 3-4 Tagen als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.11.3 Generierung chimärer Mäuse

Um chimäre Mäuse aus den homolog rekombinierten ES Zellen zu erhalten, wurden diese in Blastozysten (Tag 3,5) von superovulierten C57BL/6 Spendertieren injiziert. Jeweils 10-20 der manipulierten Blastozysten wurden anschließend in eine scheinschwangere CD1 Ammenmutter in den Uterus transferiert. Nach 19 Tagen Tragzeit wurden die Nachkommen geboren. Nach weiteren sieben Tagen konnte anhand der Fellfarbe eine chimäre Maus von einer nicht manipulierten C57BL/6 Maus unterschieden werden.

2.11.4 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH semisteril entnommen.

2.12 Immunbiologische Methoden

2.12.1 Proliferationsassays

Ruhende Zellen können durch eine Reihe von polyklonalen Aktivatoren zur Proliferation angeregt werden, die viele oder alle TZR-Komplexe antigenunspezifisch binden, indem sie die Antigen-MHC-induzierten Veränderungen am TZR-Komplex nachahmen. Lektine (pflanzliche Polymer-Proteine, wie z.B. Concavalin A) binden spezifisch bestimmte Zuckerreste von Zelloberflächen-Glykoproteinen wie die der TZR oder anderer kostimulatorischer Moleküle und stimulieren so die T Zelle. Auch AK spezifisch für invariante Rahmen-Epitope des TZR oder des CD3-Korezeptors agieren als polyklonale T Zell Aktivatoren. Diese AK müssen kreuzvernetzt werden, um optimale Aktivierungen zu induzieren. Dies kann beispielsweise mittels Sekundär-AK oder über Fc-Rezeptoren der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) geschehen. Die proliferative Antwort ist messbar anhand des [³H]-Thymidineinbaus oder einer CFSE-Färbung.

[³H]-Thymidineinbau

Durch die Zugabe von [³H]-Thymidin zum Kulturmedium erfolgt die Aufnahme der Markierung in die DNS im Verlauf wiederholter Zellteilungen. Die aufgenommene Menge an Radioaktivität kann mithilfe eines β -Counters gemessen werden und ist proportional zur erfolgten DNS Synthese in diesem Zeitraum. Zur Untersuchung der Antigenrezeptor-vermittelten Zell Aktivierung wurden Splenozyten in der Konzentration 1×10^5 Zellen pro Vertiefung mit den jeweils angegebenen Stimuli in 96-Loch Rundboden-Platten für 72 h stimuliert. Zugabe von 1 μ Ci [³H]-Thymidin pro Vertiefung erfolgte für die letzten 12 bis 16h der Kultur und die Proliferation wurde mittels eines β -Counters vermessen.

CFSE Assay

Der Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFSE) diffundiert passiv in die Zelle und bleibt farblos und nicht-fluoreszierend, bis die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten werden, wodurch ein stark leuchtendes und aminreaktives Fluorophor entsteht. Durch Reaktion mit Lysin Seitengruppen oder anderen Aminresten von intrazellulären aber auch Zelloberflächen Proteinen bildet diese Markierung irreversible Protein Addukte. Teilen sich die Zellen, wird die CFSE Markierung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, die somit nur noch mit halber Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Parentalzellen markiert sind. Der CFSE Fluoreszenzfarbstoff besitzt ein Exzitations- und Emissionsmaximum von ~ 495 und 525 nm und kann damit mittels Durchflußzytometrie (Kapitel 2.12.5) bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm vermessen werden. Für die Analyse der Zellteilungsaktivität wurden Splenozyten mit 5μ M CFSE in serumfreiem RPMI Medium 10 min bei 37°C markiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines identischen Volumens an FKS gestoppt und überschüssiges, an FKS Proteine gekoppeltes CFSE durch 2-maliges Waschen entfernt. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an löslichem oder an die Zellkulturplatte adhäriertem anti-CD3 AK bei einer Zellkonzentration von $0,5-1 \times 10^6$ Splenozyten/ml in 24-Loch-Zellkulturplatten. Die Zellteilung wurde nach 0 bis 4 Tagen mittels Durchflußzytometrie gemessen. Dabei wurden identische Zahlen an lebenden bzw. lebenden CD4^+ oder CD8^+ Zellen in die Analyse mit einbezogen.

Allogene "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR)

Als "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR) wird die Proliferation von T Lymphozyten in Kultur als Antwort auf Zellen bezeichnet, die allogene MHC Moleküle exprimieren. Die Splenozyten eines Donors, unter denen sich auch APCs befinden, wurden radioaktiv bestrahlt (30 Gy) und dienten als Stimulatorzellen, die nicht mehr über DNA Synthese oder Zellteilung auf die Stimulation durch die zweite Population antworten können. Die nicht-bestrahlte Zellpopulation proliferiert und differenziert zu Effektorzellen aus. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Kulturen auf Proliferation und Zytokinproduktion untersucht. Im vorliegenden Fall wurden Splenozyten des Haplotyps H-2d als Stimulatorzellen und Splenozyten des allophenen Haplotyps H-2b als Effektorzellen verwendet. Beide Populationen wurden im Verhältnis 10:1 in 96- oder 24-Lochplatten in einer Zellkonzentration von 1×10^7 bzw. 1×10^6 Zellen/ml kokultiviert.

2.12.2 Durchflußzytometrie (FACS Analyse)

Ein Durchflußzytometer ist ein sehr effizientes Instrument zur qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen. Da es in den meisten Fällen mit einem zusätzlichen Zellseparator ausgestattet ist, wird das Durchflußzytometer im allgemeinen Sprachgebrauch auch kurz FACS („Fluorescence-activated cell sorter“) genannt. Zellen, die zuvor mit einem Fluoreszenz-konjugierten AK oder sonstigem spezifischen Reagenz markiert wurden, werden hierbei in einem Überschuss an Salzlösung durch eine Düse gepresst, die einen feinen Flüssigkeitsstrahl generiert, in dem die Zellen einzeln und durch Intervalle getrennt vorliegen. Die Zellen passieren einen Laserstrahl und streuen hierbei das Laserlicht. Dabei werden die an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge. Sensible so genannte Photomultiplier detektieren sowohl die Lichtstreuung, die Aufschluss über Größe und Granularität der Zelle gibt, als auch die Fluoreszenz Emissionen, die auf an die Zelle gebundene AK und damit auf Expression entsprechender Oberflächenmarker hinweisen. Permeabilisiert man die Zellmembran mithilfe von Detergenzien oder Alkohol, so ist auch die intrazelluläre Färbung z.B. von Zytokinen möglich. Die Kombination von geeigneten Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Antigene auf einer Zelle. Voraussetzung sind Farbstoffe, die sich in ihren Emissionsspektren unterscheiden und deshalb getrennt voneinander gemessen werden können. Die Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte am FACSCalibur oder FACSCanto Durchflußzytometer mit CellQuest oder FlowJo Software.

FACS Analyse von Oberflächenantigenen

Zum Nachweis der Expression von Zelloberflächenantigenen wurden die zu testenden Zellen in FACS Färbepuffer aufgenommen. Anschließend wurden sie nach 5 min Vorinkubation mit Fc-Block 20 min mit Primär AK bei 0°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen erfolgte gegebenenfalls die Inkubation mit einem Sekundärreagenz für 20 min bei 0°C. Nach wiederum einmaligem Waschen wurden die Zellen in FACS Färbepuffer resuspendiert.

Intrazelluläre FACS Färbung

Für die Intrazellulärfärbung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit 0,5% Formaldehyd in PBS fixiert (30 min, 37°C) und mit 90% eiskaltem Methanol (10% PBS, 10-15 min) bei -20°C permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen nach einmaligem Waschen in PBS in FACS Puffer gewaschen, und 10 min bei RT inkubiert, bevor sie wie üblich mit Antikörpern gegen Oberflächen- oder Intrazellulärantigene inkubiert wurden.

Bestimmung der Apoptoserate

Zellen wurden in Annexin Binde Puffer (ABB) –DMEM mit 2,5mM CaCl₂ gewaschen und mit den jeweils gewünschten fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 20 min bei 0°C gefärbt. Nach Waschen mit ABB wurden die Zellen mit Annexin V-PE 1:25 bei 0°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden zu 120 µl Zellsuspension 300 µl ABB mit DAPI gegeben und die Zellen innerhalb einer Stunde gemessen.

Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Die Zellen wurden nach Waschen in PBS für 5 min in 90% eiskaltem Methanol permeabilisiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Nach einmaligem Waschen wurden 100 µl Zellsuspension mit 200 µl PBS mit DAPI versetzt und gemessen. Anhand des DNS Gehalts wurde eine Einteilung in G₀/ G₁ bzw. S und G₂ vorgenommen.

2.12.3 *In vitro* Differenzierung von Thymozyten

Aussäen der OP9 Zellen

OP9 Zellen wurden am Vortag der Isolierung doppelt negativer Thymozyten trypsinisiert und auf 2×10^4 Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde anschließend zu 1 ml pro Vertiefung in 24-Lochplatten oder 3 ml pro Vertiefung in 12-Lochplatten gegeben.

Aufreinigung der DN Thymozyten

An Tag 0 wurden DN Thymozyten mithilfe des AutoMACS unter Kombination eines Kits zur Isolierung CD4-positiver Zellen mit einem Kit zur Isolierung CD8-positiver Zellen nach Angaben des Herstellers (Miltenyi, Bergisch Gladbach) isoliert. Die Aufreinigung wurde durchgeführt durch eine sequentielle Depletion mit den Programmen „Deplete“ und „DepleteS“. Die Reinheit betrug dabei mindestens 97%.

Aussäen der DN Thymozyten und Bestimmung der Expansionsrate

Die DN Thymozyten wurden in OP9 Medium aufgenommen und auf 4×10^4 Zellen/ml für Analyse an Tag 3 bzw. 4×10^3 Zellen/ml für Analyse an Tag 6 eingestellt. Das Medium der OP9-bewachsenen Platten wurde abgesaugt und mit 0,5 ml Medium (24-Loch) bzw. 1 ml Medium (12-Loch) pro Vertiefung vorgelegt (mit oder ohne 2 ng/ml IL-7). Im Anschluss daran wurde ein identisches Volumen an Thymozyten Zellsuspension auf die OP9 Zellen gegeben und bei 37°C für den jeweiligen Zeitraum inkubiert.

Am Tag der Analyse wurden die Zellen durch kräftiges Spülen geerntet und über ein 50µm Zellsieb filtriert, um den Großteil der OP9 Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in einer Neubauer Kammer gezählt und die Expansionsrate durch Vergleich mit der ursprünglich eingesetzten Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden per FACS Analyse Differenzierungsstatus, Apoptose und Zellzyklusverteilung gemessen.

Phospho-S6 Assay

Für die intrazelluläre Bestimmung der Phosphorylierung von ribosomalem Protein S6 wurden DN Thymozyten wie beschrieben aufgereinigt und $1,2 \times 10^5$ - 3×10^5 Zellen pro 12-Loch-Vertiefung über Nacht auf OP9 DL-1 Zellen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde 20 nM Rapamycin (Sigma, Taufkirchen) über Nacht zugegeben. Als weitere Negativkontrolle

wurden DN Thymozyten auf GFP-exprimierende OP9 Zellen (OP9 GFP) ausgesät. Zur Positivkontrolle wurde 25 min vor Ernte der Zellen am nächsten Tag 20 ng/ml PDBu zugegeben. Die Intrazellulärfärbung von TZR β und Phospho-S6 wurde wie oben beschrieben durchgeführt und mit einer Oberflächenfärbung von CD25 und CD90 kombiniert.

3 Ergebnisse

SLY1 wurde in einem Adhäsionsscreen aus einer T Lymphom cDNS Bank isoliert und nachgehend als spezifisch in Lymphozyten exprimiert charakterisiert (Beer et al., 2001). Durch eine weitere Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass SLY1 spezifisch nach Antigenrezeptor Stimulation an Serin27 phosphoryliert wird (Astoul et al., 2003). Dies und der für Adapterproteine charakteristische Besitz von Protein-Protein-Interaktionsdomänen legten eine Rolle in der Signalübertragung der Antigenrezeptor Stimulation nahe. Der folgende Ansatz, die *in vivo* Funktion durch Generierung einer SLY1 defizienten Mauslinie näher aufzuklären war nur teilweise erfolgreich (Beer et al., 2005). Wie in dieser Arbeit aufgeklärt werden konnte, entstand eine Mauslinie, die eine trunkierte Variante von SLY1 exprimiert (nachfolgend SLY1 Δ genannt). Dem verkürzten Protein SLY1 Δ fehlen die Aminosäuren 20 bis 100 von insgesamt 380 Aminosäuren im N-terminalen Bereich (Abb. 3.1). Dadurch sind in SLY1 Δ 50% der zwei-teiligen nukleären Lokalisationssequenz (NLS) sowie die bekannte Phosphorylierungsstelle an Serin27 deletiert. Dies führt zu einer Größenreduktion um etwa 10 kD von 55 kD auf 45 kD (Abb. 3.5).

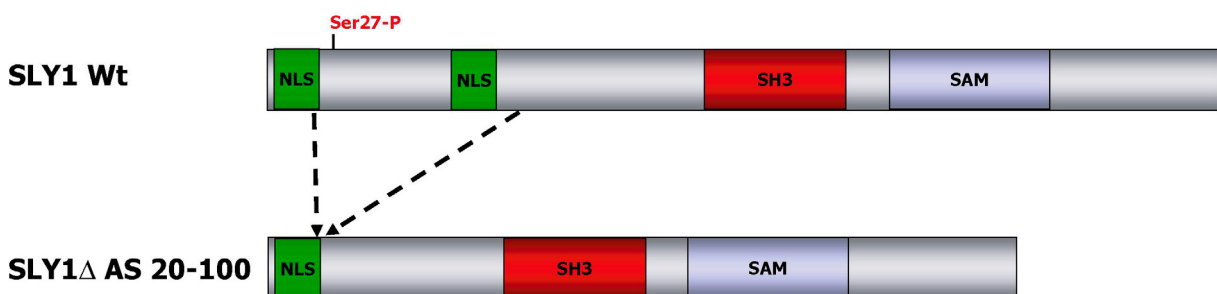


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Proteindomänen von SLY1 und SLY1 Δ

Oben dargestellt ist das SLY1 Protein, wie es in Wildtyp Mäusen (Wt) exprimiert wird. Die bekannte Phosphorylierungsstelle an Serin27 ist markiert. Durch die Deletion der AS 20-100 in SLY1 Δ kommt es zum Verlust der Phosphorylierungsstelle und eines Teils der zwei-teiligen nukleären Lokalisationssequenz (NLS). SH3: „Src homology 3“-Domäne; SAM: „Sterile alpha motif“.

Durch die phänotypische Charakterisierung der SLY1 Δ Mauslinie, die zum Teil Aufgabe dieser Arbeit war, konnte eine wichtige Rolle von SLY1 in der Lymphozyten Aktivierung bestätigt werden (Beer et al., 2005). Die Proliferation und Effektorfunktion von T und B Lymphozyten war nach Antigenrezeptorstimulation *in vitro* deutlich vermindert. Darüber hinaus war die Lymphozyten Entwicklung beeinträchtigt, was sich in einer Reduktion der Zellularität peripherer lymphatischer Organe manifestierte. *In vivo* wurde in Kooperation mit Bernhard Holzmann, TU München, eine verminderte Transplantat Abstoßung semi-allogener

Herzen festgestellt. Die anfangs beobachtete deutliche Reduktion in der Sekretion von Zytokinen aktivierter $SLY1^{\Delta\Delta}$ T Zellen verlangte nach einer molekularen Erklärung. Wesentlich bei der gut charakterisierten Induktion der IL-2 Zytokinproduktion ist die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NFkB und AP-1 (Hentsch et al., 1992; Simeoni et al., 2005). Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren sowie vorgeschalteter Signalwege wurde aus diesem Grund zunächst näher beleuchtet.

3.1 Analyse der Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion in $SLY1^{\Delta\Delta}$ T Zellen

Die beobachteten Defekte $SLY1^{\Delta}$ exprimierender Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* lassen eine Beteiligung des Proteins an der Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion vermuten. *In vitro* können T Zell Rezeptor (TZR) Signale unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern entweder gegen die beiden TZR Ketten oder die assoziierten „Cluster of Differentiation 3“ (CD3) Untereinheiten induziert werden. Dieser initiale Stimulus setzt eine Kaskade von intrazellulären Ereignissen in Gang, die letztendlich zur Aktivierung der Zelle im Sinne der Induktion von Proliferation, Zytokin Freisetzung oder zytotoxischer Effektorfunktionen führen. Diese Kaskade kann in unterschiedliche Phasen eingeteilt werden. Zunächst kommt es membranproximal zur Aktivierung von Tyrosinkinasen und zu einem Kalziumeinstrom. Dieses Stadium ist durch starke Phosphorylierung an Tyrosinresten vieler Proteine charakterisiert. Der diesbezügliche Aktivierungszustand von Zellen lässt sich mithilfe eines Anti-Phosphotyrosin Western Blots abbilden. Hierzu wurden aufgereinigte T Zellen mit monoklonalen anti-CD3 Antikörpern stimuliert, Lysate hergestellt und mittels einer nichtnativen Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert (Western Blot). Zu den stark Tyrosin-phosphorylierten Proteinen zählen die CD3 Untereinheiten des TZR, die Tyrosinkinase ZAP-70 und die Adaptoren SLP-76 und LAT. Dieser Versuch wurde mehrmals unabhängig voneinander durchgeführt (nicht gezeigt), wobei große Varianzen zwischen den Experimenten auftraten. Es konnten jedoch keine durch die verkürzte $SLY1$ Proteinmutante ausgelösten reproduzierbaren Defekte nachgewiesen werden (Abb. 3.2).

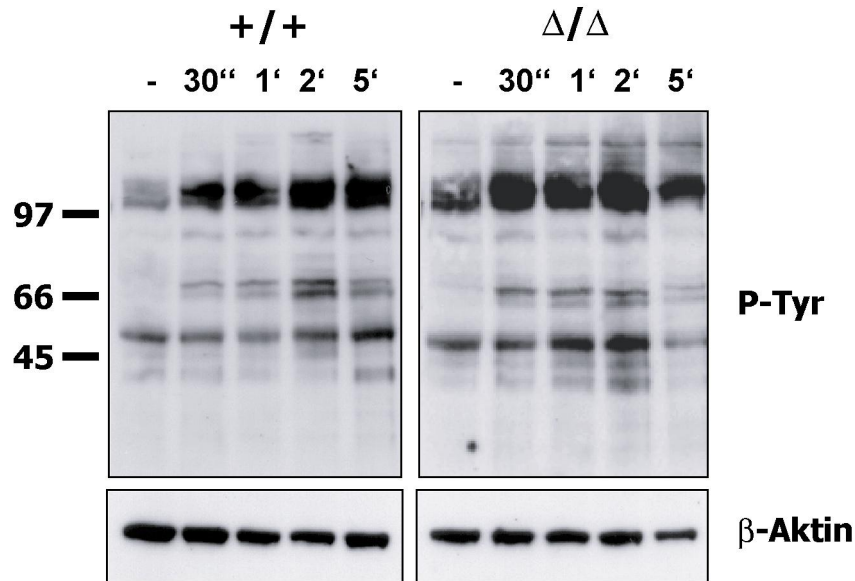


Abb. 3.2: Vergleich der globalen Tyrosinphosphorylierung primärer T Zellen

Western Blot aufgereinigter T Zellen aus Milz und Lymphknoten, welche für die angegebene Zeit mit anti-CD3 Biotin und Streptavidin aktiviert wurden. Phospho-Tyrosin-Reste wurden mit dem Pan-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

In Kooperation mit Bernhard Holzmann (TU München) wurde der Kalzium Einstrom nach TZR Aktivierung gemessen. Die Anwesenheit von SLY1 Δ hatte auch hierauf keinen negativen Einfluss (Beer et al., 2005).

Nach der membranproximalen Aktivierung verschiedener Tyrosin-Kinasen erfolgt eine Signalweiterleitung über die Serin-/ Threonin-Phosphorylierung einer Reihe wichtiger Signalmediatoren. Hierzu zählen Proteine der MAP-Kinase Familie wie p38, ERK und JNK, aber auch die Serinkinase Akt und der Inhibitor der NF κ B Aktivierung I κ B α (Simeoni et al., 2005). Diese spielen bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei Zellaktivierung, Proliferation, Zytokinproduktion und Überleben. Um einen Defekt auf dieser Ebene ausschließen zu können, wurden erneut primäre T Zellen aufgereinigt und mit anti-CD3 stimuliert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Lysate der Proben angefertigt und mittels eines Western Blots der Aktivierungszustand der jeweiligen Proteine mithilfe phosphospezifischer Antikörper dargestellt. Auch hier war kein Defekt der SLY1 Δ exprimierenden T Zellen ersichtlich (Abb. 3.3).

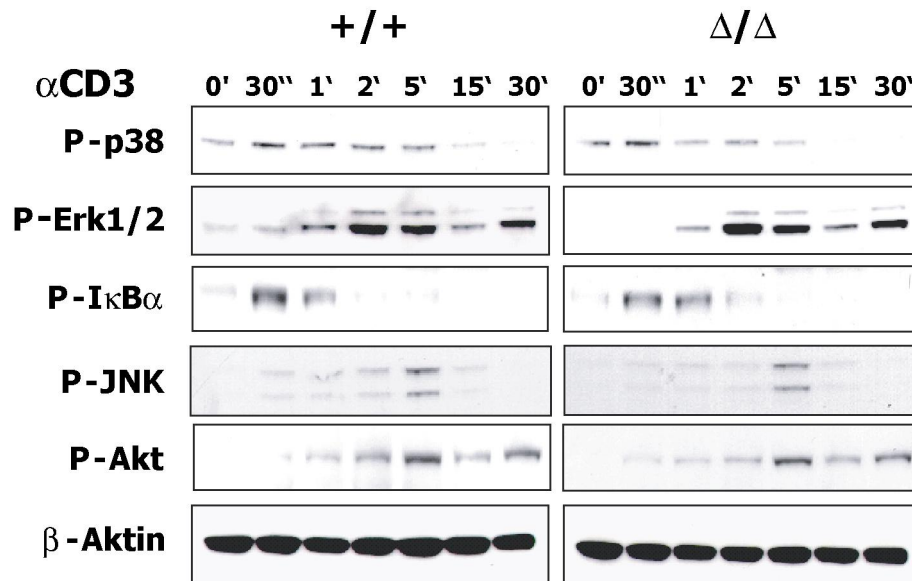


Abb. 3.3: Aktivierung wichtiger Signalmediatoren nach TZR Stimulation

CD90 „Magnetic Cell Sorting“ (MACS) aufgereinigte T Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden für die angegebene Zeit mit anti-CD3 Biotin und Streptavidin aktiviert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Phosphospezifische Antikörper der jeweiligen Proteine erkennen für eine Aktivierung des jeweiligen Proteins wichtige Threonin- bzw. Serin-Reste. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Schlussendlich kommt es bei erfolgreicher Aktivierung von T Zellen, die unter anderem in der vermehrten Produktion von Zytokinen mündet, zu einer Translokation vormals inaktiver Transkriptionsfaktoren aus dem Zytoplasma in den Kern. Dort erfolgt eine Bindung an spezifische DNS Erkennungssequenzen und Induktion der Transkription von Boten RNS (mRNS). Essentiell für die erhöhte Zytokintranskription, Zellteilung und Überleben sind die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF κ B und NFAT (Simeoni et al., 2005). Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren wurde mithilfe eines „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) an aufgereinigten Kernlysaten von murinen T Zellen verglichen. Die T Zellen waren zuvor für 12 Stunden in Medium inkubiert (unstimulierte Kontrolle) bzw. mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert worden. Die spezifische DNS Bindungskapazität der Lysate aus mutierten T Zellen war jedoch derjenigen aus Wt Zellen vergleichbar (Abb. 3.4). Zusammenfassend lässt sich somit an keinem Stadium der untersuchten kanonischen TZR Signaltransduktionskette ein molekularer Defekt von T Zellen aus der SLY1 Δ/Δ Mauslinie nachweisen.

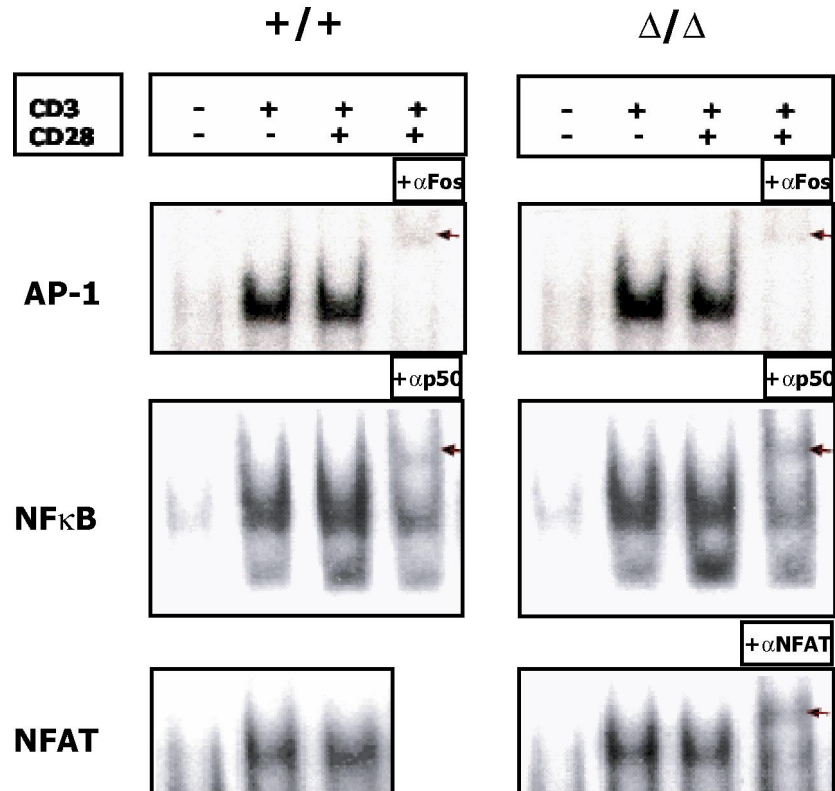


Abb. 3.4: Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFκB und NFAT

„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFκB und NFAT. Aufgereinigte primäre T Zellen wurden für 12 Stunden (h) mit oder ohne TZR Stimulus aktiviert. Anschließend wurden nukleäre Lysate gewonnen und mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die von dem respektiven Transkriptionsfaktor spezifisch gebunden werden, inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung über eine native Gel Elektrophorese und eine autoradiographische Detektion. Vor der Auftrennung zugegebene Antikörper (anti-Fos, anti-p50 und anti-NFAT) beweisen die Spezifität durch die Bildung eines sogenannten „Supershifts“.

3.2 Subzelluläre Lokalisation

3.2.1 Veränderte subzelluläre Lokalisation von SLY1Δ

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Doreen Cantrell (Dundee, GB) konnte eine Antigenrezeptor-spezifische Phosphorylierung von SLY1 an einem Serin an Position 27 (Serin27) nachgewiesen werden (Astoul et al., 2003). Dieses Serin27 ist im trunkierten SLY1Δ Protein nicht mehr enthalten (Abb. 3.1). Darüber hinaus fehlt wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben der zweite Teil der laut Datenbank vorhandenen zweigeteilten NLS. Zum damaligen Zeitpunkt fehlte jedoch ein experimenteller Nachweis, dass es sich tatsächlich um eine NLS handelte, insbesondere da deren Vorhandensein allgemein schwer vorhersagbar ist. Um nun die Funktionalität der NLS zu untersuchen, wurden T Zellen von Wildtyp ($^{+/+}$) und SLY1 $^{\Delta/\Delta}$ Mäusen präpariert und das Gesamtzelllysat (GZ), die nukleäre (N) und die zytoplasmatische (Z) Fraktion präpariert und im Western Blot analysiert (Abb. 3.5). Dabei

konnte in den Wt Zellen die mehrheitliche Fraktion von SLY1 im Nukleus und eine geringere Menge im Zytoplasma nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu befand sich das mutierte SLY1 Protein ausschließlich im Zytoplasma.

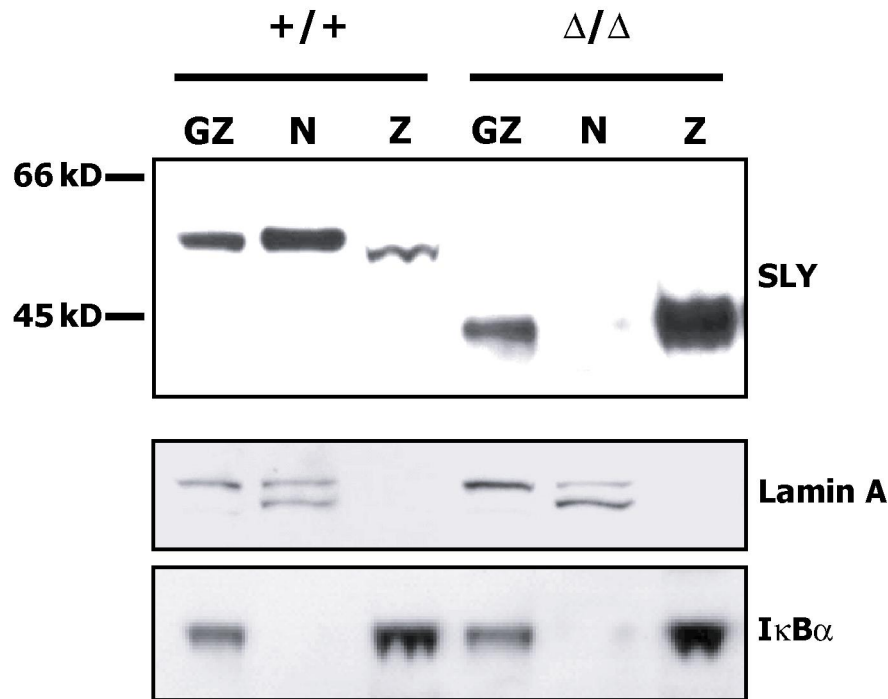


Abb. 3.5: Lokalisation des Wildtyp- und trunkierten *SLY1Δ* Proteins in Primärzellen

Aus primären Lymphozyten wurden subzelluläre Fraktionen präpariert, um die Lokalisation von SLY1 Wildtyp und mutiertem *SLY1Δ* zu vergleichen. Gesamtzelllysate (GZ), nukleäre (N) und zytoplasmatische (Z) Fraktionen von Wt und *SLY1^{Δ/Δ}* Zellen wurden im Western Blot analysiert. Dabei dienten IκBα und Lamin A als jeweilige Kontrolle der Reinheit der zytoplasmatischen bzw. nukleären Fraktion.

Um zu überprüfen, ob sich die Lokalisation von SLY1 und *SLY1Δ* in aktivierten Zellen verändert, wurden erneut primäre T Zellen aufgereinigt und diese vor der Präparation der Fraktionen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. In Wt Zellen konnte interessanterweise nach Stimulation eine Translokation vom Kern in das Zytoplasma hervorgerufen werden (Abb. 3.6), die Lokalisation von *SLY1Δ* veränderte sich hingegen nicht.

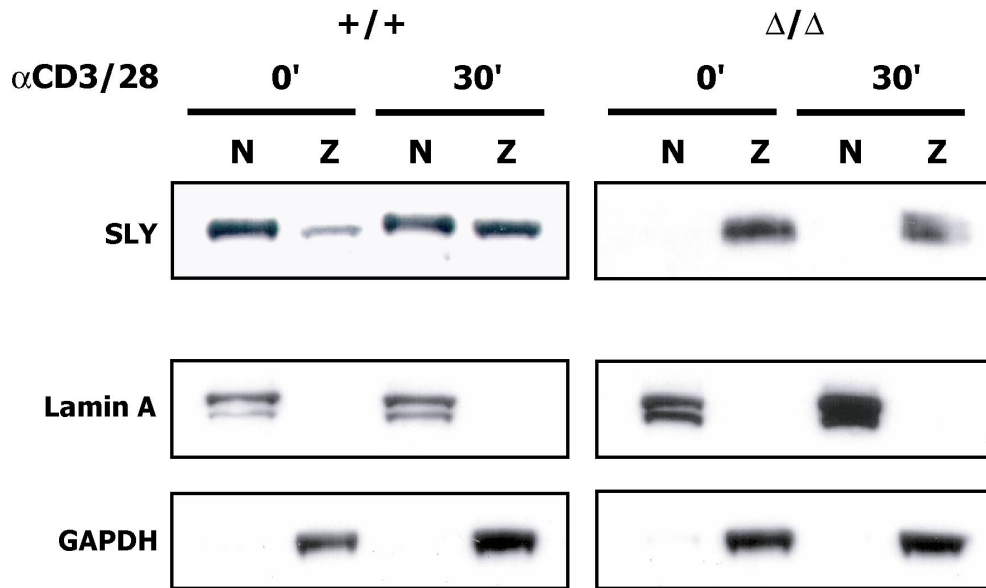


Abb. 3.6: Vergleich der subzellulären Lokalisation nach Antigenrezeptorstimulus

SLY1^{+/+} und SLY1^{Δ/Δ} T Zellen wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern 30 min stimuliert und anschließend wie in Abb. 3.5 aufgereinigt und im Western Blot analysiert. Lamin A wurde als nukleärer Marker und GAPDH als zytoplasmatischer Marker verwendet.

3.2.2 Regulation der Lokalisation

Anschließend wurde die Kinetik dieser Translokation analysiert (Abb. 3.7). Dabei konnte eine vollständige Translokation bereits nach 60 min aus dem Nukleus in das Zytoplasma beobachtet werden, die mindestens 2 Stunden anhielt.

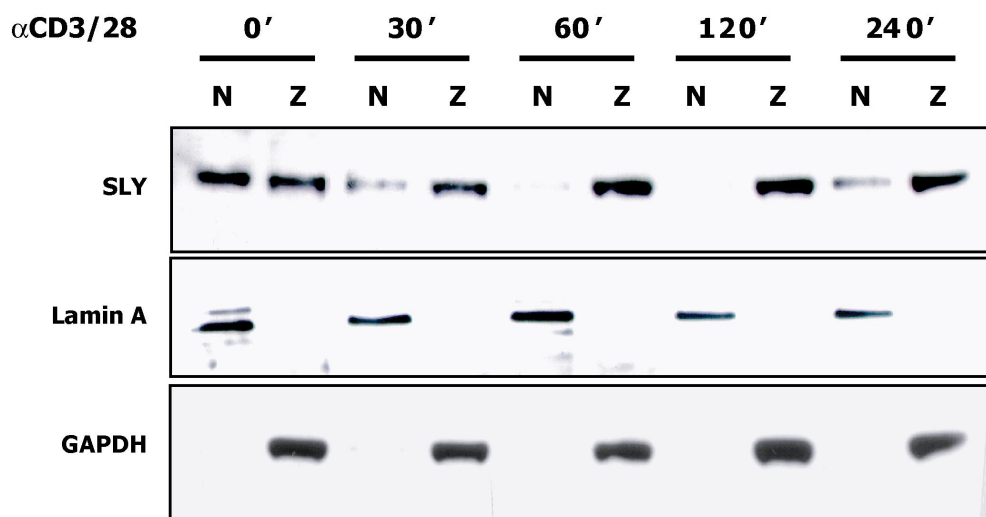


Abb. 3.7: Kinetik der Translokation von SLY1 nach Antigenrezeptor Stimulus

Detektion der subzellulären Lokalisation von Wt SLY1 nach biochemischer Auftrennung in nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen. Isolierte primäre T Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Eine maximale Akkumulation im Zytoplasma ist nach ein bis zwei Stunden sichtbar. Gezeigt ist ein Western Blot mit Lamin A als nukleärem Marker und GAPDH als zytoplasmatischem Marker.

Da aus Vorarbeiten (Astoul et al., 2003) bekannt war, dass SLY1 am Serin27 nach Antigenrezeptorstimulus phosphoryliert wird, wurde ein Antikörper (P-SLY1) generiert, der spezifisch das am Serin27 phosphorylierte SLY1 Protein erkennt. Wie in Abb. 3.8 gezeigt, detektiert dieser Antikörper das phosphorylierte SLY1 Protein nur in der zytoplasmatischen Fraktion stimulierter Zellen. Weiterhin wird ersichtlich, dass die Phosphorylierung und auch die Translokation in das Zytoplasma mit den PI3K- und PKC-Inhibitoren LY294002 bzw. RO-31-8425 gehemmt werden kann. Eine analoge Inhibierung der Phosphorylierung in Gesamtzelllysat ist bereits beschrieben worden (Astoul et al., 2003). Interessanterweise kann in Anwesenheit der Inhibitoren nach Stimulation keine Translokation von SLY1 mehr beobachtet werden (Abb. 3.8). Nach den bisher gezeigten Ergebnissen lässt sich also vermuten, dass eine TZR-abhängige Phosphorylierung von SLY1 in einer anschließenden Translokation in das Zytoplasma mündet.

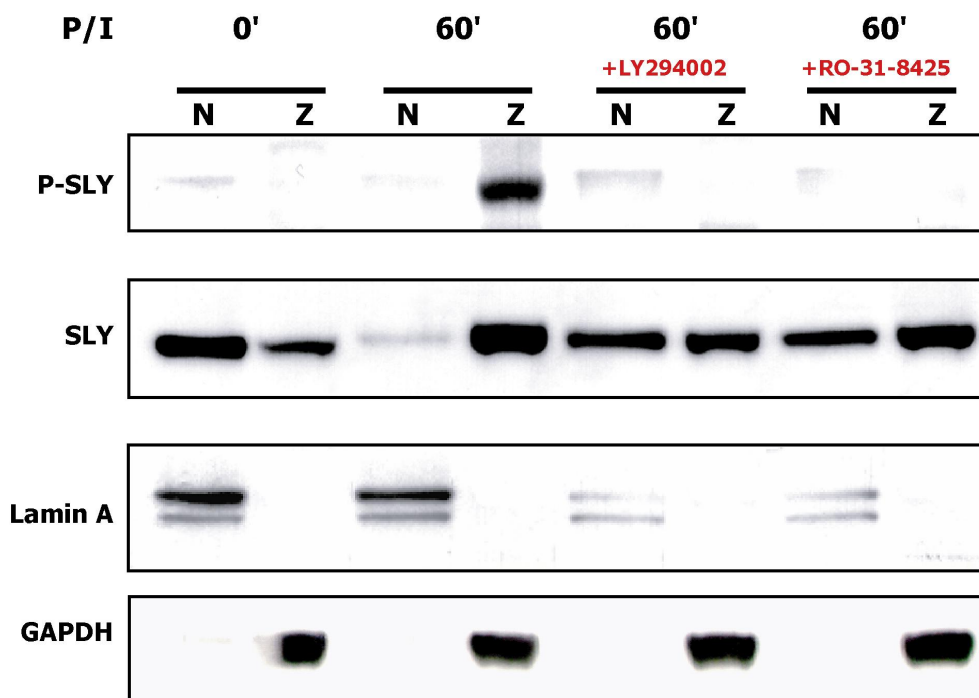


Abb. 3.8: Regulation der Translokation durch Phosphorylierung an Serin27

Detektion der subzellulären Lokalisation von SLY1 nach biochemischer Auftrennung in nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen im Western Blot. Primäre T Zellen wurden für die angegebene Zeit mit PMA und Ionomycin (P/I) für eine Stunde stimuliert. Außerdem wurden T Lymphozyten eine halbe Stunde mit Protein-Kinase C (PKC) -Inhibitor (RO-31-8425) bzw. Phosphatidyl Inositol 3-Phosphat-Kinase (PI3K) -Inhibitor (LY294002) vorbehandelt, bevor die Stimulation erfolgte. Lamin A wurde als nukleärer Marker und GAPDH als zytoplasmatischer Marker verwendet.

Aus oben beschriebenen Versuchsergebnissen wurde die Hypothese einer Regulation der subzellulären Lokalisation von SLY1 durch Phosphorylierung an Serin27 aufgestellt. Um diese Hypothese zu Überprüfen, wurde eine Punktmutation der Position 27 von einem Serin

zu einem Alanin durchgeführt. Im Folgenden wurde die subzelluläre Lokalisation von SLY1 mithilfe von GFP Fusionsproteinen im Konfokalmikroskop untersucht, um die vorher erhaltenen Ergebnisse der biochemischen Auftrennung subzellulärer Fraktionen methodisch unabhängig zu bestätigen.

Dazu wurden GFP Fusionsproteine mit SLY1 Wt (SLY1-GFP), einer Serin27 zu Alanin Mutante (SLY1S27A-GFP) und einer SLY1 Δ Mutante (SLY1 Δ -GFP) kloniert und in EL-4 Zellen stabil zur Expression gebracht. Diese Zellen wurden auf poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern im konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert (Abb. 3.9). Dabei konnte sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Lokalisation des Wt Proteins festgestellt werden. Das trunkierte SLY1 Δ zeigte eine ausschließlich zytoplasmatische Verteilung wie auch zuvor im Western Blot detektiert. Im Gegensatz dazu wurde das SLY1S27A-GFP-Fusionsprotein nur im Nukleus gefunden.

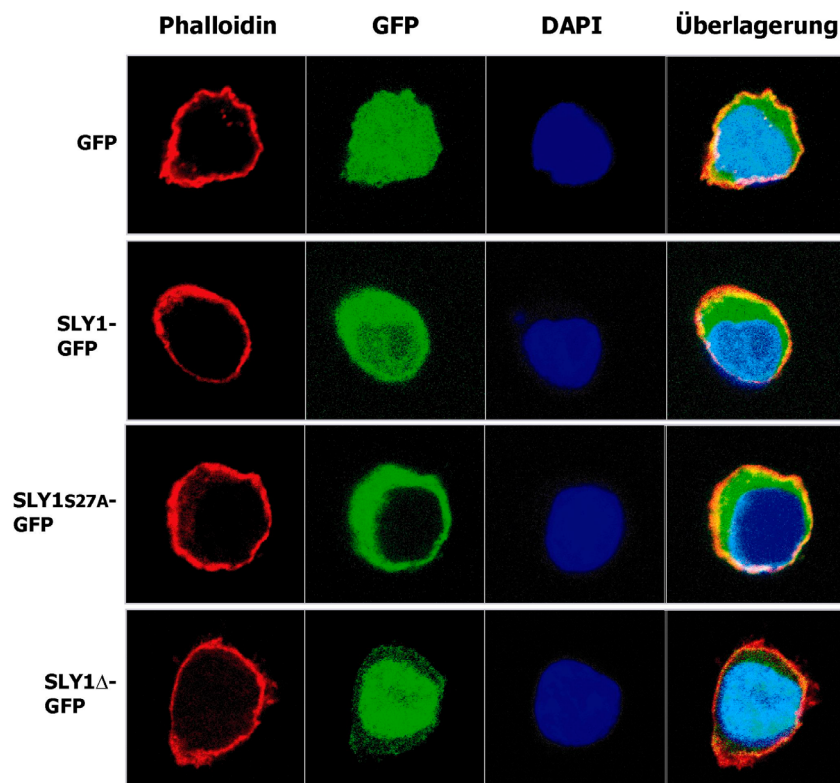


Abb. 3.9: Analyse der subzellulären Lokalisation mithilfe von GFP Fusionsproteinen

Stabil transduzierte EL-4 T Zellen wurden fixiert und mithilfe eines Zeiss LSM510 Konfokalmikroskops bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Die EL-4 Zellen exprimieren entweder GFP oder folgende N-terminal an GFP fusionierte Proteine: SLY1 Wildtyp Protein (SLY1-GFP), trunkiertes SLY1 Δ Protein (SLY1 Δ -GFP) bzw. SLY1 mit mutierter Serin27 Phosphorylierungsstelle (SLY1S27A-GFP). Filamentöses Aktin wurde mit Phalloidin angefärbt, DAPI wurde zur Kernfärbung verwendet.

Die Ergebnisse dieses Versuchs befinden sich also im Einklang mit zuvor erhaltenen Daten und legen nahe, dass eine Phosphorylierung an Serin27 zu einer Akkumulation im Zytoplasma führt, es sei denn, die zweiteilige NLS wurde teilweise deletiert und somit inaktiviert. Die im

Vergleich zu Primärzellen hohe zytoplasmatische Lokalisation von Wt Protein in unaktivierten EL-4 Zellen kann durch die erhöhte basale Phosphorylierung an Serin27 erklärt werden, die generell in Zellkultur beobachtet wurde (nicht gezeigt). Somit wird die nukleo-zytoplasmatische Lokalisation von SLY1 durch die Phosphorylierung direkt reguliert. Um den Mechanismus der Regulation der Translokation besser verstehen zu können, wurde eine nähere Analyse der flankierenden Sequenz der Phosphorylierungsstelle durchgeführt. Diese machte deutlich, dass durch die Phosphorylierung am Serin27 ein Sequenzmuster generiert wird, das bis auf eine Position einer Konsensus 14-3-3 Protein Bindestelle (Dougherty und Morrison, 2004) entspricht - siehe Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: SLY1 Serin27 Phosphorylierung kreiert eine potentielle 14-3-3-Bindestelle

Angegeben sind Aminosäuren (AS) unter Verwendung des Ein-Buchstaben-Codes. P: Phosphorylierung der folgenden AS. X: Jede beliebige AS. Konsensus-Sequenz nach (Dougherty und Morrison, 2004)

14-3-3 Konsensus (Mode 1)	RSXpS/T XP
SLY1 Sequenz AS 24-29	RSSpS FK
Identität	RSSpS F

Eine mehrfach beschriebene Funktion von 14-3-3 Proteinen ist, phosphorylierte Proteine zu binden und durch Verdecken der NLS im Zytoplasma zu halten (MacKintosh, 2004; Tzivion und Avruch, 2002; Yoshida et al., 2005). Eine schematische Darstellung einer solchen möglichen Interaktion von SLY1 und 14-3-3 Proteinen ist in Abb. 3.10 gezeigt. In Übereinstimmung zu der beschriebenen Funktion von 14-3-3 Proteinen befindet sich die NLS in der Nähe der potentiellen Bindestelle, und somit könnte dadurch die ausschließliche Lokalisation von phosphoryliertem SLY1 Protein im Zytoplasma erklärt werden.

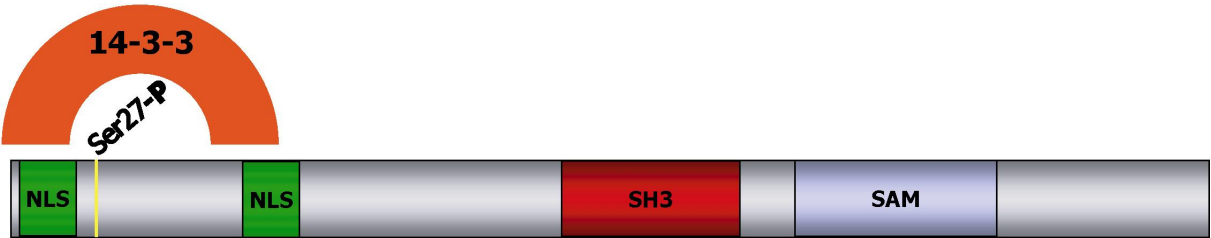


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Bindung von 14-3-3 Proteinen an Phospho-SLY1
Die Phosphorylierung an Serin27 schafft eine mögliche Bindestelle für 14-3-3 Proteine in der Nähe der N-terminal lokalisierten und zweigeteilten nukleären Lokalisationssequenz.

Eine Mutation der Phosphorylierungsstelle sollte ergänzend dazu also zu einem Ausbleiben der 14-3-3-Bindung und damit zu einer Akkumulation im Nukleus führen, da die NLS nicht

mehr maskiert wird. Dass eine Interaktion von SLY1 mit 14-3-3 Proteinen in der Tat stattfindet, konnte daraufhin mithilfe eines „Pull-Down-Assays“ von Zelllysaten und an GST gekoppelten 14-3-3 Proteinen bestätigt werden (Simone Klöter). Dabei konnte auch die Relevanz der Serin27 Phosphorylierung untermauert werden, da nach Mutagenese der Phosphorylierungsstelle zu Alanin die Bindung je nach untersuchter 14-3-3-Isoform stark vermindert war oder ganz unterblieb (Simone Klöter).

3.3 Ansätze zur Identifizierung molekularer Interaktionspartner

3.3.1 Metabolische Markierung und Immunpräzipitation

Molekulare Interaktionspartner können wichtige Hinweise liefern für die Aufklärung der Funktion von SLY1. Eine gängige Technik der Darstellung von molekularen Interaktionen stellt dabei die Koimmunpräzipitation dar. Eine Herangehensweise, um erste Aufschlüsse über unbekannte Interaktionspartner zu gewinnen, ist die Koimmunpräzipitation radioaktiv markierter Proteine. Um zu testen, ob sich unbekannte Interaktionspartner kopräzipitieren lassen, wurden Jurkat Zellen über Nacht mit [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium inkubiert, um einen unselektierten Einbau dieser Aminosäure in neu synthetisierte Proteine zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen für zwanzig min mit PMA und Ionomycin stimuliert (20'), beziehungsweise in Medium belassen (0'). Danach wurde eine Immunpräzipitation mithilfe eines anti-Hämagglutinin (HA) Antikörpers durchgeführt. Das Ergebnis nach SDS-PAGE und auto-radiographischer Detektion ist in Abb. 3.11 zu sehen. Untransduzierte Jurkat Zellen dienten als Kontrolle, weiterhin wurden Jurkat Zellen verwendet, die jeweils mit C-terminaler HA-Markierung versehenes SLY1 bzw. SLY1 mit einer Punktmutation der Serin27-Phosphorylierungsstelle oder SLY1Δ stabil exprimieren. Zu sehen ist bei einer Größe von etwa 55 kDa die erfolgreiche SLY1 Immunpräzipitation bzw. bei etwa 45 kDa die Immunpräzipitation von SLY1Δ. Außerdem sind Signale eventuell koimmunpräzipitierter Proteine mit einer ungefähren Größe von 40 kDa (A) und 35 kDa (B) sichtbar. Auffällig ist weiterhin, dass das Signal des unbekannten Proteins der Bezeichnung A nach Stimulation abnimmt, während es sich für B umgekehrt verhält. Zusätzlich anzumerken ist eine leichte Größenzunahme von immunpräzipitiertem SLY1 Protein nach Stimulation unabhängig von der jeweils exprimierten Variante.

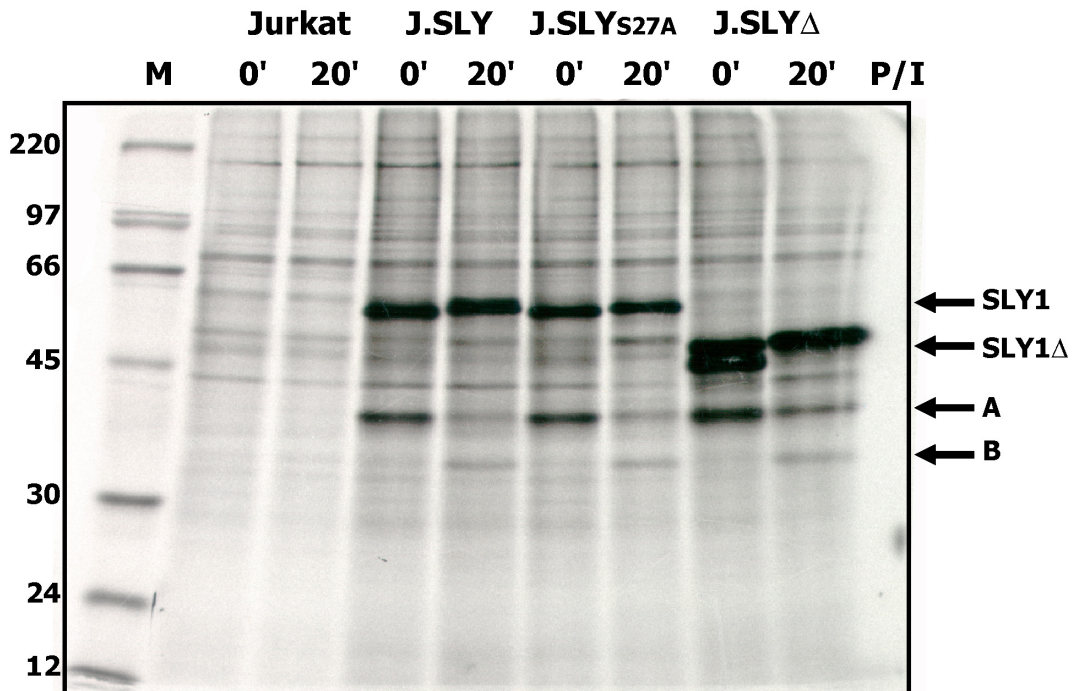


Abb. 3.11: SLY1 Immunpräzipitation nach metabolischer Markierung

Jurkat Zellen, welche stabil HA-markiertes SLY1 Protein bzw. davon abgeleitete Mutanten exprimieren, wurden über Nacht mit [^{35}S]-Methionin-haltigem Medium inkubiert und anschließend für 20 min mit 20 ng/ml PMA und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin (P/I) stimuliert (20') oder unstimuliert belassen (0'). Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mithilfe eines HA-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Signale der radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch detektiert. M: [^{14}C]-haltiger Proteinmarker, Größenangaben in kDa. A, B: Putative koimmunpräzipitierte Proteine.

3.3.2 Massenspektrometrische Sequenzierung

Zur Identifizierung von SLY1 Interaktionspartnern wurde der Versuchsansatz ähnlich wie unter 3.4.1 beschrieben unter Weglassung der metabolischen Markierung durchgeführt. Da die zu sequenzierenden Banden allerdings mit Coomassie gefärbt werden mussten, wurden entsprechend größere Mengen an Zelllysat eingesetzt. Die massenspektrometrische Sequenzierung einzeln ausgeschnittener Proben wurde am Analytischen Zentrallabor des BMFZ des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Proteine mit identischer Größe wie A und B in Abb. 3.11 wurden hauptsächlich als Abbauprodukte von SLY1 identifiziert. Geringere Sequenzidentitäten wurden mit verschiedenen Varianten der hnRNP Proteine korreliert. Zusätzlich wurde HSP-70 identifiziert. Allerdings konnten weder eine Interaktion mit hnRNP Proteinen noch mit HSP-70 in einer KoImmunpräzipitation mit SLY1 und anschließendem Western Blot nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei den Signalen in Abb. 3.11 mehrheitlich um Abbauprodukte des primär immunpräzipitierten SLY1 Proteins handelt und SLY1 Interaktionspartner nicht ohne weiteres zugänglich sind.

3.4 Generierung einer SLY1 defizienten Mauslinie

Die Deletion in SLY1 Δ nahe des N-Terminus lässt die SH3 und SAM Domänen intakt, also ist weiterhin eine potentielle Protein-Protein-Interaktion möglich. Eine eventuelle Bindung von SLY1 Δ an Proteinkomplexe könnte deren Funktion in einer Signalweiterleitung beeinträchtigen. Um die Funktion von SLY1 besser einordnen zu können, ist es wichtig ausschließen zu können, dass ein trunkiertes SLY1 Δ Protein nicht dominant negativ wirkt. Aus diesem Grund wurde eine SLY1 defiziente Mauslinie (SLY1 $^{-/-}$) in dieser Arbeit generiert. Diese sollte anschließend phänotypisch charakterisiert und mit dem Phänotyp von SLY1 Δ/Δ Mäusen verglichen werden.

3.4.1 Klonierung des SLY1 Rekombinationsvektors

Klonierungsstrategie

Bei einem vorherigen Versuch, SLY1 zu deletieren kam es zu einem ‚Umspleißen‘ der in Exon II und III eingefügten Resistenzkassette von Exon I auf Exon IV. Da alle Exone des SLY1 Locus durch drei teilbare Nukleotidlängen besitzen, kam es zur Expression eines funktionellen, jedoch trunkierten Proteins (Beer et al., 2005). Dieses Ereignis wird wahrscheinlich dadurch begünstigt, dass das homologe Rekombinationsereignis in ES Zellen eine Deletion für das Spleißen wichtiger regulatorischer Sequenzen in Exon II und Exon III zur Folge hatte.

Bei der Klonierung des neuen SLY1 Rekombinationsvektors in pBlueskript wurde deswegen darauf geachtet, keine endogenen Sequenzen durch das Rekombinationsereignis zu deletieren und keine Sequenzen zu verändern, die bis zu 50 bp vor oder nach Exon-Intron-Übergängen liegen, um die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Spleißereignisse zu minimieren. Die Neomycin Resistenzkassette wurde in inverser Orientierung direkt hinter das Start ATG in Exon I eingebaut (Abb. 3.12). Um eine korrekte Rekombination des Vektors zu ermöglichen, ist die Kassette von beiden Seiten von unterschiedlich langen homologen Bereichen des SLY1 Locus flankiert, die als „kurzer Arm“ und als „langer Arm“ bezeichnet werden. Der 0,5 kb umspannende kurze Arm liegt 5' der Neomycin Kassette. Der lange Arm hat eine Länge von 4,3 kb und ist 3' der Resistenzkassette positioniert. Das Gen für die *Herpes simplex* Virus Thymidinkinase (HSV-TK) wurde 3' des langen Arms in den Vektor eingesetzt. Die Linearisierung erfolgte an einer *NotI*-Schnittstelle 5' des kurzen Arms.

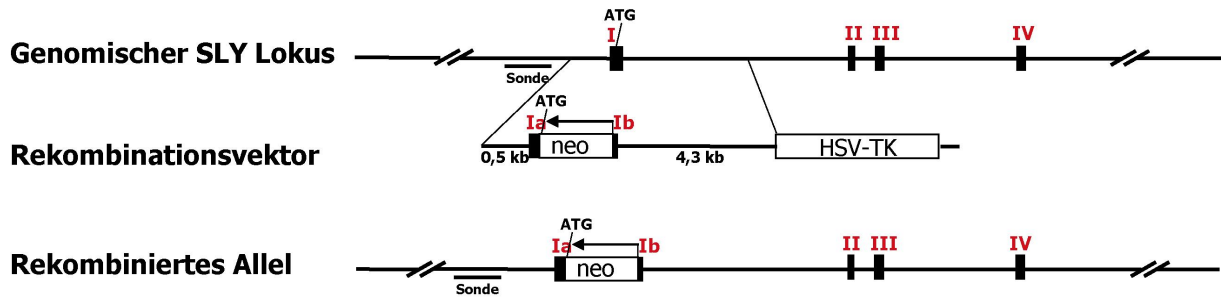


Abb. 3.12: Darstellung der Strategie zur homologen Rekombination im *SLY1* Locus

Schematische Darstellung des *SLY1* Locus von Exon I bis IV vor und nach erfolgreicher homologer Rekombination, sowie des entsprechenden Rekombinationsvektors. Durch Insertion des *neo* Gens wird Exon I zweigeteilt. „Sonde“ bezeichnet die Hybridisierungsstelle des radioaktiv markierten Oligonukleotids im Southern Blot. ATG: Translationsstart.

Neomycin Resistenzkassette

Der Rekombinationsvektor muss aus technischen Gründen einen Marker zur Positivselektion enthalten. Die in dieser Arbeit verwendete Neomycin Phosphotransferase erlaubt das Wachstum von rekombinierten ES Zellklonen in Gegenwart des Antibiotikums Geneticin (G418). Bei der Klonierung des *SLY1* Rekombinationsvektors wurde die Neomycin Kassette „in antisense“ Orientierung eingebaut, um eine eventuell stattfindende Transkription des *sly1* Gens zu unterbinden.

Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV TK) Kassette

Der Einbau der HSV TK Kassette in den Rekombinationsvektor erlaubt die Negativselektion aller ES Zellklone, bei denen der Rekombinationsvektor ungerichtet und nicht über homologe Rekombination in das Genom inseriert wurde. Bei ungerichteter Rekombination wird mit hoher Effizienz auch heterologe DNS, wie hier die HSV TK Kassette, mit ins Genom eingebaut. Solche Klone sind daher sensitiv für die Phosphorylierung und den nachfolgenden Einbau des Thymidinanalogs Ganciclovir in die DNS, was zur Blockade der DNS Replikation führt. Da bei homolog rekombinierten ES Zellklonen die HSV TK Kassette nicht in das Genom integriert wird und die endogene mammalische Thymidinkinase Ganciclovir nicht aktivieren kann, sind diese dagegen resistent (Kuhn et al., 1991).

3.4.2 Generierung von SLY1 defizienten embryonalen Stammzellen

Erzeugung von SLY1^{+/-} ES Zellen durch homologe Rekombination

Der linearisierte Rekombinationsvektor wurde in E14.1 embryonale Stammzellen (129/Ola) elektroporiert und die so transfizierten ES Zellen auf embryonalen Fibroblasten in Anwesenheit von G418 und Ganciclovir kultiviert. Am Tag 10 nach Beginn der Antibiotika Selektion konnten 80 resistente ES Zellklone in 96-Lochplatten gepickt und expandiert werden. Die eine Hälfte der Zellen wurde eingefroren, die zweite Hälfte zur Identifizierung korrekt rekombinierter Klone mittels „Screening PCR“ getestet.

Identifizierung korrekt rekombinierter ES Zellklone

Die zweifach resistenten Klone wurden mithilfe der „Screening-PCR“ auf korrekte homologe Rekombination untersucht. Kolonien aus einer vollbewachsenen 96-Loch-Platte wurden in eine 96-Thermowell PCR Platte überführt und dort lysiert. Mit diesem Lysat wurde eine PCR durchgeführt, wobei ein Primer im 5'-Bereich außerhalb des Konstrukts im SLY1 Lokus (screening primer 3, Tabelle 2.6), der andere innerhalb der Neomycin Resistenzkassette bindet (screening primer 4, Tabelle 2.6). Auf diese Weise erfolgt die Amplifikation des kurzen Arms des Rekombinationsvektors, allerdings nur bei korrekter homologer Rekombination. Um schwache oder nicht eindeutige Signale im Agarosegel zu überprüfen, wurden die Gele auf Nylonmembranen gebロットet und mit dem kurzen Arm als Sonde hybridisiert. Positive Klone wurden zum einen in flüssigem Stickstoff konserviert, zum anderen für die DNS Gewinnung zur Southern Blot Analyse expandiert.

Southern Blot Analyse der homolog rekombinierten ES Zellen

Die durch die „Screening-PCR“ identifizierten Klone wurden nun mittels Southern Blot überprüft. Um die Menge von Wildtyp DNS, die das Ergebnis verfälschen würde, möglichst gering zu halten, erfolgte die Anzucht der zu testenden ES Zellklone auf Zellkulturplatten ohne embryonale Fibroblasten. Die aufgereinigte genomische DNS wurde mit BamHI oder EcoRV inkubiert und nach einem Agarosegellauf auf Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung erfolgte mit der 5' flankierenden Sonde, die außerhalb des im Rekombinationsvektor vorhandenen genomischen Bereichs bindet (Abb. 3.12). Wie in Abb. 3.13 gezeigt, ergibt sich im Falle einer erfolgreichen homologen Rekombination bei Inkubation mit BamHI eine Größenreduktion des Wt Allels von 10 kb auf 1,8 kb, während bei

Inkubation mit EcoRV eine Größenzunahme von 2,7 kb auf 3,8 kb durch die Insertion des *neo* Gens erwartet wird.

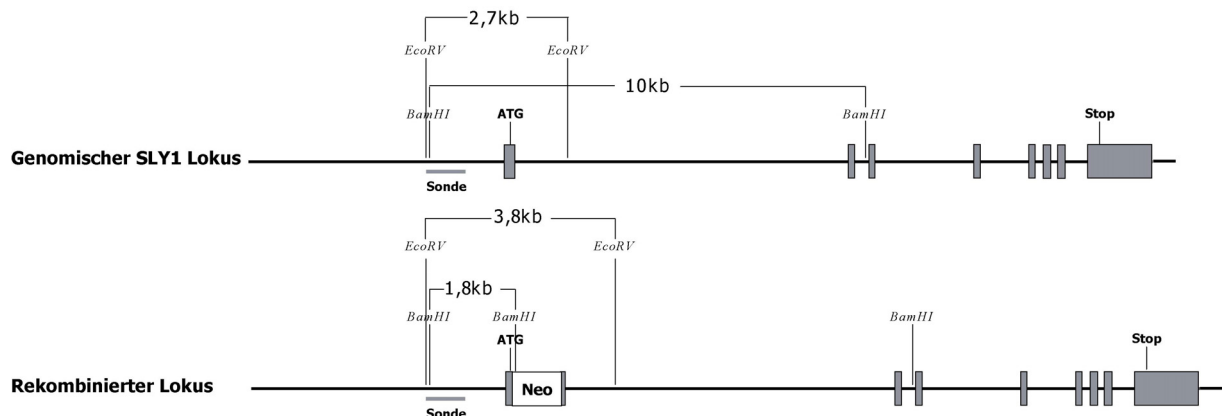


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen im SLY1 Locus

Gezeigt sind alle 8 Exone des *sly1* Gens inklusive Translations-Start (ATG) und Stop vor und nach erfolgreicher homologer Rekombination, sowie die jeweils erwarteten Fragmentgrößen bei Inkubation mit EcoRV bzw. BamHI und anschließendem Southern Blot. „Sonde“ bezeichnet die Hybridisierungsstelle des radioaktiv markierten Oligonukleotids, das als flankierende Probe im Southern Blot Verwendung fand.

Die in der „Screening PCR“ als positiv gewerteten Klone #3 und #12 konnten als korrekt rekombinierte Klone identifiziert werden (Abb. 3.14), Klon #1 und E14 ES Zell DNS dienten als Negativkontrolle.

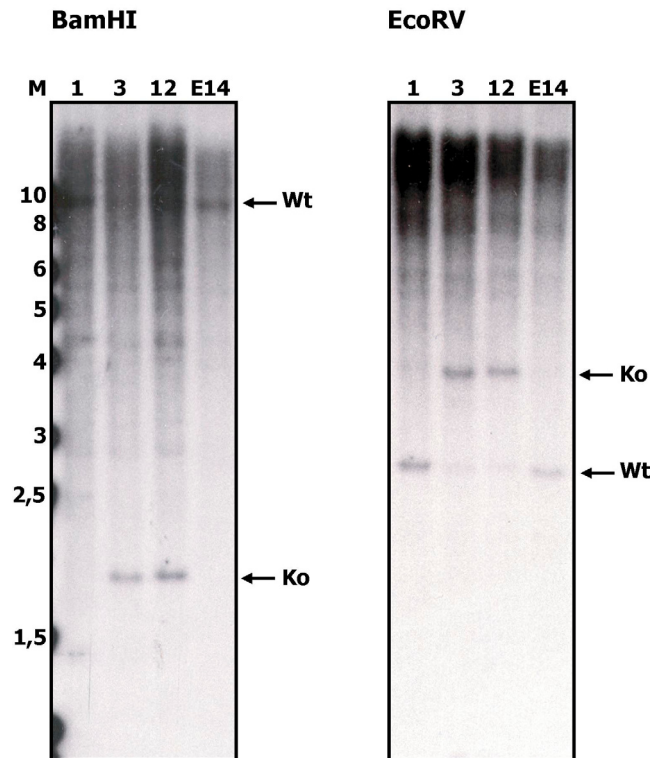


Abb. 3.14: Southern Blot der erfolgreich rekombinierten ES Zellklone.

Je 10 µg ES Zell DNS wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen inkubiert und ein Southern Blot angefertigt. Dieser wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde spezifisch für den 5' flankierenden Bereich des SLY1 Lokus hybridisiert. Übereinstimmend mit der PCR Typisierung sind die Klone #3 und #12 positiv. E14: Ausgangs ES Zell DNS. Wt: erwartete Fragmentgröße bei unrekombiniertem Lokus, Ko: erwartete Größe nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Die Hybridisierung mit der 5' flankierenden Sonde schließt allerdings nicht aus, dass zusätzlich zur homologen Rekombination weitere zufällige Integrationen ins Genom stattgefunden haben. Um dies auszuschließen, wurde die mit BamHI oder EcoRV inkubierte genomische DNS mit einer *neo*-spezifischen Sonde hybridisiert. Aus Abb. 3.15 ist ersichtlich, dass nur bei den Klonen #3 und #12 ein einziges Hybridisierungssignal in der korrekten Größe von 9,3 kb nach Inkubation mit BamHI bzw. 3,8 kb nach Inkubation mit EcoRV detektierbar war, nicht aber bei dem PCR- und Southern-negativen Klon #1 und der Kontroll ES Zell DNS.

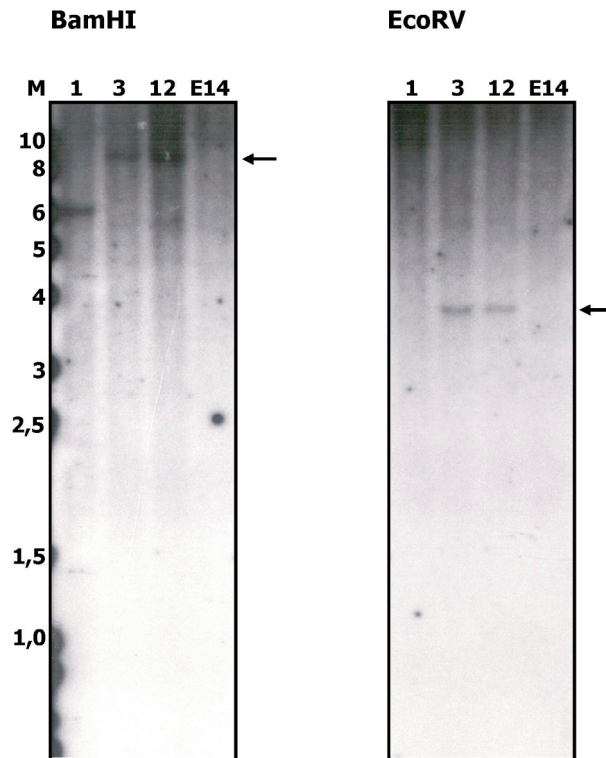


Abb. 3.15: Neo Southern Blot der erfolgreich rekombinierten ES Zellklone

Je 10 µg ES Zell DNS wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen inkubiert und ein Southern Blot angefertigt. Dieser wurde hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde spezifisch für das *neo* Gen. Die Klone #3 und #12 weisen ein korrektes Signal auf. E14: Ausgangs ES Zell DNS. Pfeile: erwartete Fragmentgrößen nach erfolgreicher homologer Rekombination.

3.4.3 Generierung einer SLY1 defizienten Mauslinie aus rekombinierten ES Zellen

Die beiden unabhängig voneinander erzeugten homolog rekombinierten ES Zellklone #3 und #12 wurden in Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert und anschließend in pseudoschwangere CD1 Weibchen transferiert. Der Grad des Chimärismus der Nachkommen kann bei dieser Kombination von ES Zell- bzw. Blastozysten Donorstamm anhand der agoutifarbenen Fellzeichnung abgeschätzt werden. Hochchimäre Nachkommen wurden anschließend mit C57BL/6 Mäusen verpaart, und auf Keimbahntransmission des mutierten SLY1 Allels getestet. Die Wahrscheinlichkeit, dass das mutierte Allel durch die Keimbahn transmittiert wird, liegt bei 50%. Von agoutifarbenen Nachkommen von Klon #12 der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6 Mäusen wurden Schwanzspitzen Biopsien genommen und mittels Typisierung PCR (Primer s. Tabelle 2.6) und Southern Blot Analyse auf Vorhandensein des mutierten SLY1 Allels getestet. Chimären, die von dem ES Zellklon abgeleitet waren, transmittierten das mutierte SLY1 Allel in der Keimbahn. Die so erhaltenen heterozygoten Tiere wurden untereinander verpaart und die Nachkommen mittels PCR und

Southern Blot genotypisiert (Abb. 3.16). Dabei konnten die erwarteten Banden detektiert werden.

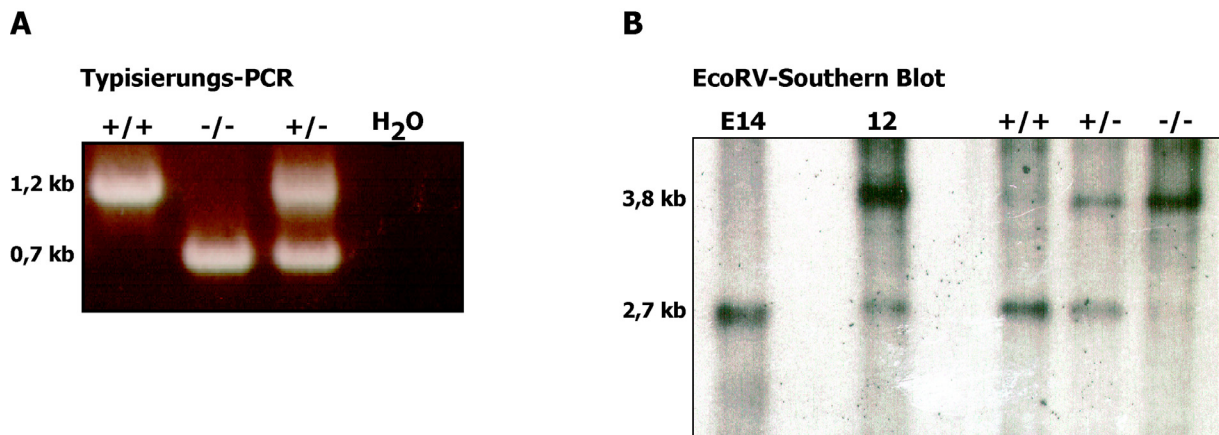


Abb. 3.16: PCR Typisierung und Southern Blot

A. Abbild einer Typisierungs PCR an Mausschwanz DNS, wie sie mit den in Tabelle 2.6 angegebenen Primern durchgeführt wurde. **B.** Southern Blot zum Nachweis der erfolgreichen homozygoten Züchtung von Mäusen, die das SLY1 Ko Allel tragen.

3.4.4 Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des *sly1* Gens

Von Milz, Thymus und Lymphknoten der so generierten Mäuse wurden Lysate hergestellt und ein Western Blot angefertigt, um mithilfe des SLY1-spezifischen Antikörpers nachzuweisen, dass die SLY1 Inaktivierung erfolgreich gewesen ist (Abb. 3.17; Thymus und Lymphknoten nicht gezeigt). Die Membran wurde nach Detektion des Signals gestrippt und mit dem Phospho-SLY1-spezifischen Antikörper hybridisiert. Dessen Epitop Erkennungsstelle liegt an einer anderen Position innerhalb des SLY1 Proteins und diente dazu auszuschließen, dass ein trunkiertes Protein exprimiert wird, in welchem die Erkennungsstelle des anti-SLY1 Antikörpers fehlt und das deswegen nicht erkannt wird. In Abb. 3.17 wird deutlich, dass die SLY1 Proteinmenge in heterozygoten Mäusen vergleichbar ist mit der in Wt Mäusen, während in SLY1^{-/-} Mäusen kein Signal sichtbar ist.

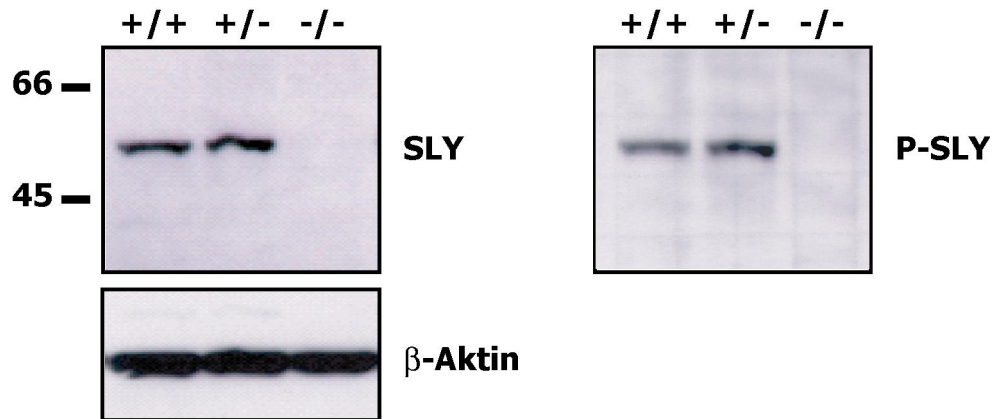


Abb. 3.17: Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des *sly1* Gens in *SLY1*^{-/-} Mäusen

Western Blot von Lysaten aus der Milz von Nachkommen der *SLY1* Ko Mauslinie. Die Typisierung erfolgte mittels PCR. β -Aktin diente als Ladekontrolle, die Membran wurde nach Detektion von pan-SLY1 wiederholt gestrippt, um nacheinander Phospho-SLY1 und β -Aktin zu detektieren.

3.5 Phänotypanalyse der *SLY1* defizienten Mauslinie

SLY1^{-/-} Mäuse wurden mit der erwarteten Mendelschen Frequenz geboren, erschienen gesund und waren fertil. Da es sich um ein X-chromosomales Gen handelt, wurden während der notwendigen Rückkreuzung auf C57BL/6 in der Regel Männchen für die Durchführung von Versuchen verwendet. Die *SLY1* Expression in Wt und heterozygoten Lymphozyten ist im Western Blot identisch (Abb. 3.17). Ein analoges Bild ergab sich bei *SLY1*^{+/ Δ} Mäusen. In Lysaten aus Lymphozyten solcher heterozygoten Mäuse war kein *SLY1* Δ Protein detektierbar (Beer et al., 2005). Dies ist ein Indiz für einen selektiven Vorteil von Lymphozyten *in vivo*, die nicht dasjenige X-Chromosom inaktiviert haben, auf dem das intakte *sly1* Allel codiert ist.

3.5.1 Lymphatische Organe und Lymphozyten Subklassen

SLY1 ^{Δ/Δ} Mäuse weisen eine Reduktion der Zellzahl primärer lymphatischer Organe auf und zugleich ist der Prozentsatz der jeweiligen Lymphozyten Subtypen unverändert bis auf eine leichte Verschiebung der CD4- und CD8-positiven T Zellsubtypen und eine Reduktion der Marginalzonen B Zellen (Beer et al., 2005). Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob eine vollständige *SLY1* Defizienz einen vergleichbaren Phänotyp zur Folge haben würde. In Abb. 3.18 ist der Prozentsatz von T Zellen, B Zellen, NK Zellen, Granulozyten sowie Makrophagen in der Milz dargestellt. Vergleichbar zu *SLY1* Δ exprimierenden Mäusen konnte in keiner der untersuchten Subpopulationen ein nennenswerter Unterschied zu Wt Mäusen festgestellt werden.

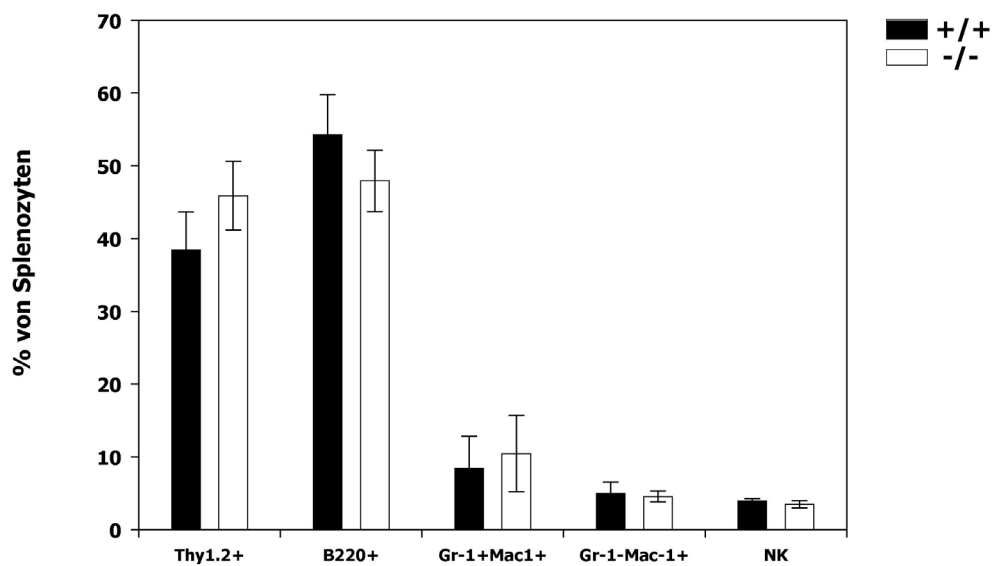


Abb. 3.18: FACS Analyse lymphoider und myeloider Zellsubpopulationen in der Milz

Der Prozentsatz von Zellsubtypen in der Milz wurde per FACS Analyse anhand definierter Oberflächenmoleküle analysiert. Thy1.2: T Zellen; B220: B Zellen; Gr1⁺Mac1⁺: Granulozyten; Gr-1⁻Mac1⁺ Makrophagen; NK: DX5-positive CD3-negative Natürliche Killerzellen. (n=9).

Eine Untersuchung der Zellzahl primärer lymphatischer Organe zeigte eine signifikante Reduktion der Zellzahl in Thymus, Milz und Lymphknoten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.19.A). Die durchschnittliche Abnahme betrug 46% im Thymus, 42% in der Milz und 51% in den Lymphknoten. Dies stimmt mit der Abnahme der Zellularität lymphatischer Organe in SLY1^{Δ/Δ} Mäusen überein. Wie in SLY1^{Δ/Δ} Mäusen beobachtet, so ist auch in SLY1^{-/-} Mäusen eine signifikante Abnahme der Anzahl an ‚Peyer’s Patches‘ von durchschnittlich 10,2 auf 7,75 auf der Dünndarmoberfläche gegenüber Mäusen der Kontrollgruppe zu sehen (Abb. 3.19.B).

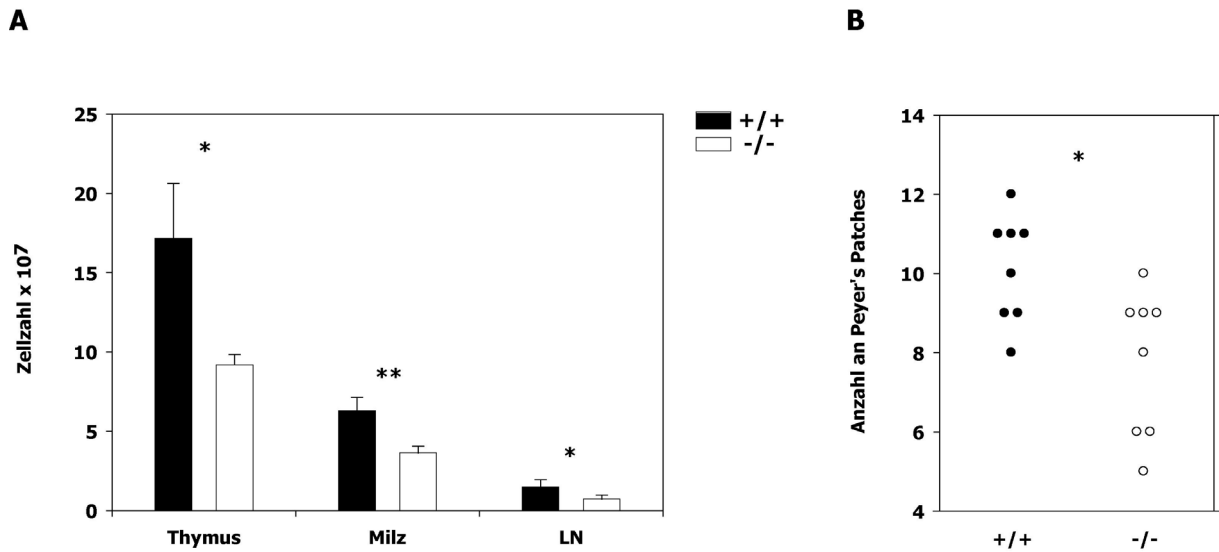


Abb. 3.19: Zellularität peripherer lymphatischer Organe und Anzahl an Peyer's Patches

A. Durchschnitt der Zellularität. Organe von Mäusen wurden mit einem Zellsieb zerkleinert und lebende Zellen mithilfe der Trypan Blau Färbung in einer Neubauer Zählkammer gezählt. LN: axiale und inguinale Lymphknoten wurden hier vereinigt gezählt. (n=4). **B.** Die Anzahl makroskopisch sichtbarer Peyer's Patches auf der Dünndarmoberfläche je untersuchter Maus wurde bestimmt. (n=8). *p≤0,01; **p≤0,001.

Der Prozentsatz der Marginalzonen B Zellen von B Zellen insgesamt ist in der Milz ähnlich wie in $SLY1^{\Delta/\Delta}$ (Beer et al., 2005) Mäusen von 8,5% ($\pm 2,1$) auf 2,7% ($\pm 1,2$) in $SLY1^{-/-}$ Mäusen erniedrigt (Abb. 3.20). Darüber hinaus ließ sich auch eine geringfügige Verschiebung von CD4-positiven zu CD8-positiven T Zellen beobachten (nicht gezeigt).

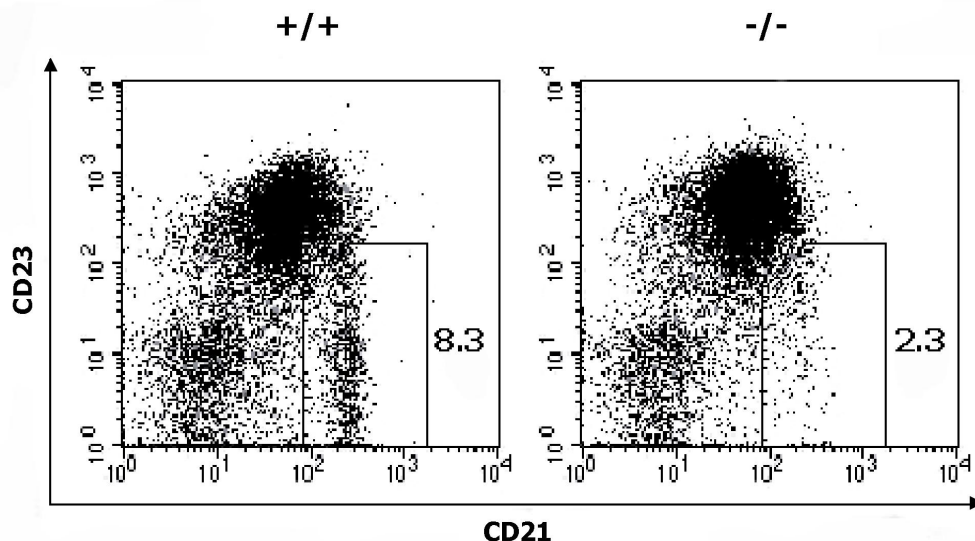


Abb. 3.20: FACS Analyse der Marginalzonen B Zellen

B220-positive Splenozyten wurden auf die Expression von CD21 und CD23 hin untersucht. Repräsentative Darstellung je einer Färbung der Marginalzonen B Zellen aus einer $SLY1^{+/+}$ und $SLY1^{-/-}$ Milz.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die vollständige Abwesenheit von SLY1 einen vergleichbaren Effekt auf die Entwicklung von Lymphozyten *in vivo* hat wie die Deletion von 81 AS im N-terminalen Bereich, wie sie in der trunkierten Variante vorliegt. Dieser Effekt wirkt sich insbesondere negativ auf die Zellzahl peripherer lymphatischer Organe und Thymus, sowie auf die Anwesenheit von Marginalzonen B Zellen aus.

3.5.2 Allogene „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR)

Um die TZR-vermittelte Aktivierbarkeit von T Lymphozyten aus SLY1^{-/-} und SLY1^{ΔΔ}-Mäusen *in vitro* zu testen, wurde zunächst eine „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR) mit präparierten Splenozyten durchgeführt. In diesem Versuchsansatz wird die Proliferation von T Zellen gemessen, die gegen allogene MHC Moleküle kreuzreaktiv sind. Dieser Versuchsaufbau ist im Vergleich zu dem später durchgeführten anti-CD3-vermittelten Proliferationsassay (Kapitel 3.6.3) weitaus physiologischer, da es sich nicht um ein polyklonal wirkendes Mitogen handelt und die MHC-TZR-Interaktionen ein schwächeres Signal vermitteln als ein anti-CD3 Stimulus.

Als Stimulatorzellen mit allogenem MHC dienten bestrahlte Milzzellen aus BALB/c Mäusen. Abb. 3.21 zeigt eine signifikante Reduktion der Antwort um durchschnittlich 64% der SLY1 defizienten Splenozyten und um durchschnittlich 41% der SLY1^Δ exprimierenden Splenozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Resultat dieses Versuches legt eine Beteiligung von SLY1 im TZR-vermittelten Signalübertragungsweg nahe, wie bereits anderweitig vorgeschlagen wurde (Astoul et al., 2003; Beer et al., 2005).

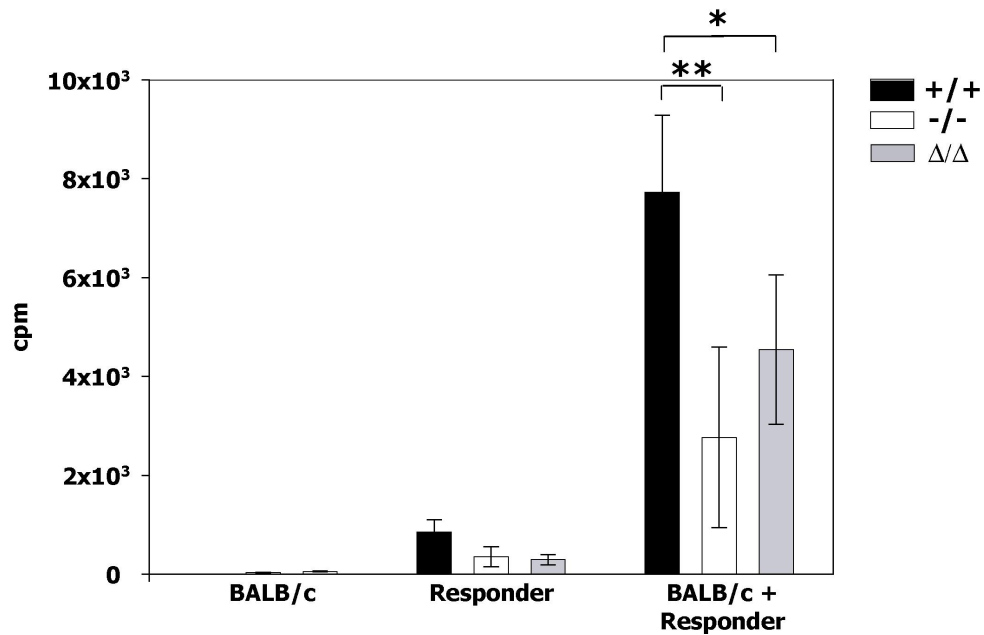


Abb. 3.21: „Mixed Lymphocyte Reaction“ von Splenozyten

Bestrahlte allogene Splenozyten aus BALB/c Mäusen wurden im Verhältnis 10:1 mit Milzzellen des jeweiligen Genotyps für 3 Tage in 96-Lochplatten inkubiert. Anschließend erfolgte für 16h eine Zugabe von radioaktiv markiertem [3 H]-Thymidin. Darstellung des Durchschnitts aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. * $p < 0,01$, ** $p < 0,002$. $n=5$.

3.5.3 Proliferationsassay peripherer B und T Lymphozyten

Im Vergleich zur MLR wurden im folgenden Proliferationsassay stärkere Stimuli eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob speziell die Antigenrezeptor-vermittelte Proliferation von B und T Zellen abhängig von der Anwesenheit von funktionellem SLY1 Protein ist. Es wurden verschiedene Konzentrationen an mitogenem anti-CD3 Antikörper verwendet, mit und ohne anti-CD28 bzw. IL-2 als Kostimulus, um die T Zell Proliferation zu testen (Abb. 3.22). PMA und Ionomycin dienten als Positivkontrolle. Diese werden zur Umgehung membranproximaler Antigenrezeptor-assoziiierter Elemente eingesetzt und setzen weiter abwärts in der Signalkaskade an. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die Aktivierung SLY1 defizienter oder SLY1 Δ exprimierender Milzzellen ist nicht beeinträchtigt. Es wurden weiter gehende Versuche durchgeführt, bei welchen die Konzentration des zugesetzten anti-CD3 Antikörpers bis auf 3 ng/ml titriert wurde, jedoch auch unter diesen Bedingungen war die gemessene Proliferation vergleichbar (nicht gezeigt).

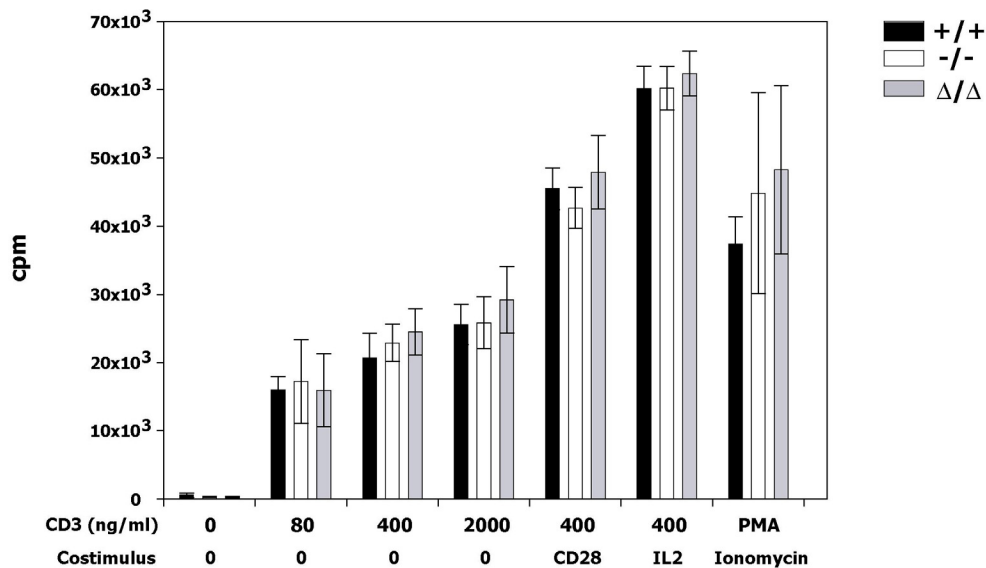


Abb. 3.22: Milz T Zell Proliferationsassay

1×10^5 Splenozyten pro Vertiefung in 96-Rundlochplatten wurden 64h mit anti-CD3 und teilweise unter Zusatz eines Kostimulus bzw. 20 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin inkubiert. Für die letzten 16h erfolgte [3 H]-Thymidinzugabe. CD28: 5 μ g/ml anti-CD28; IL-2: 10 ng/ml; Durchschnitt aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. n=5.

Darüber hinaus wurde die T Zell Aktivierbarkeit mittels CFSE Färbung und anschließender anti-CD3 Stimulation oder anti-CD3 und anti-CD28 Kostimulation verglichen (Abb. 3.23 und nicht gezeigt). Mit einer CFSE Markierung läßt sich per FACS Analyse die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen bestimmen, da pro Teilung je die Hälfte der Markierung an die beiden Tochterzellen weitergegeben wird. Weiterhin wurden die Versuchsbedingungen dahin gehend variiert, als dass sowohl lösliche als auch an die Oberfläche der Zellkulturschale adhärierte Antikörper zur Stimulation eingesetzt wurden (Abb. 3.23 und nicht gezeigt). Letzteres sollte die Qualität des Signals unabhängig von kostimulatorischen APC machen, die sich in der Präparation der Milz befinden. Allerdings konnte keine Versuchsbedingung ermittelt werden, in der die Abwesenheit eines vollständigen SLY1 Proteins zu Proliferationsdefekten im Vergleich zu der Kontrollgruppe führte.

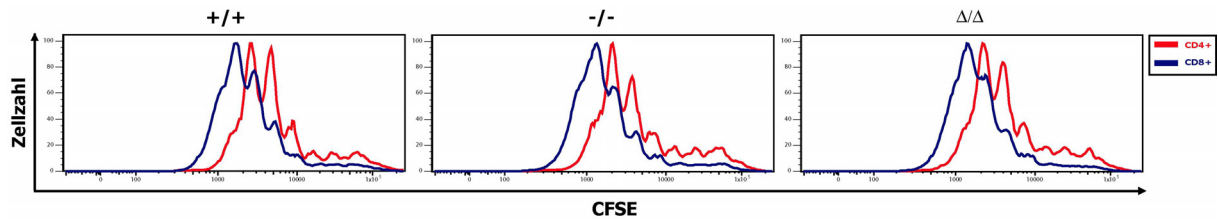


Abb. 3.23: Zellteilung CFSE markierter T Zellen

1×10^6 CFSE markierte Splenozyten wurden pro Vertiefung in 24-Lochplatten inkubiert. Diese waren zuvor über Nacht mit je 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern in PBS inkubiert worden, um eine unspezifische Adhäsion der Antikörper an die Plastikoberfläche zu erreichen. Vor Zugabe der T Zellen waren die Platten zweimal mit PBS gewaschen worden. Nach vier Tagen erfolgte eine FACS Analyse. Die Splenozyten waren am Tag der CFSE Markierung gleich intensiv gefärbt worden (nicht gezeigt). Repräsentative Abbildung aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

In analoger Weise zu dem T Zell Proliferationsassay wurde verfahren, um die B Zell Rezeptor (BZR)-abhängige Proliferation zu analysieren (Abb. 3.24). Hierzu wurden ein mitogener anti-IgM Antikörper als BZR Stimulans und je nach Bedingung teilweise auch anti-CD40 Antikörper oder IL-4 als Kostimulantien verwendet. Weiterhin wurde LPS als Stimulans des „Toll-Like-Rezeptor“-Signalübertragungswegs eingesetzt. Übereinstimmend mit den T Zell Proliferationsdaten war die Proliferation von B Zellen zwischen allen Gruppen vergleichbar.

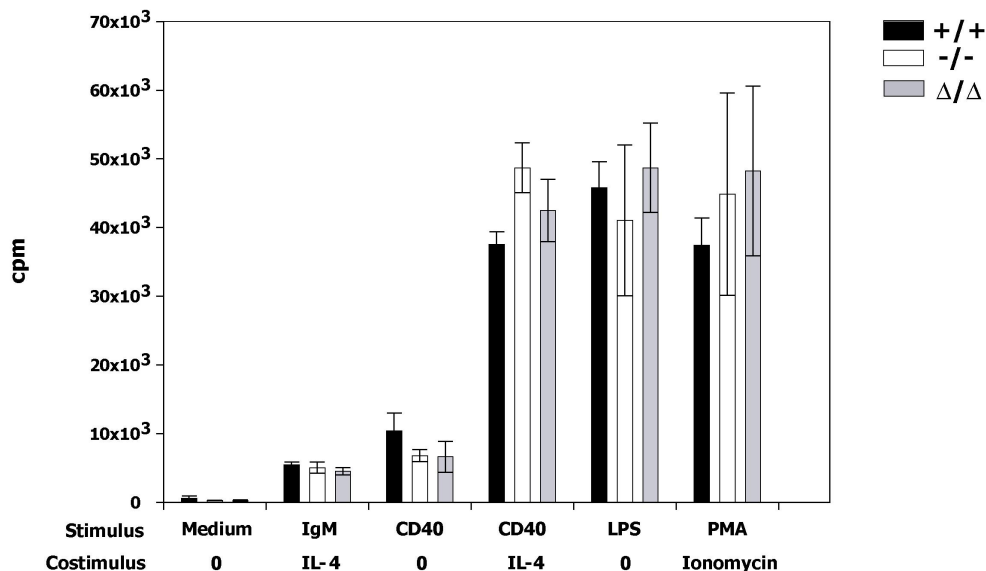


Abb. 3.24: Milz B Zell Proliferationsassay

1×10^5 Splenozyten pro Vertiefung in 96-Rundlochplatten wurden 64h mit den angegebenen mitogenen Stimuli inkubiert. IgM: 2 $\mu\text{g/ml}$; IL-4: 10 ng/ml; anti-CD40: 2 $\mu\text{g/ml}$; LPS: 5 $\mu\text{g/ml}$; PMA: 20 ng/ml; Ionomycin: 1 $\mu\text{g/ml}$. Für die letzten 16h erfolgte [^3H]-Thymidin-Zugabe. Durchschnitt aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. n=5.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im Gegensatz zu früheren Befunden (Beer et al., 2005) bei einer direkten Stimulation mittels mitogener Antikörper gegen den TZR oder BZR

eine vergleichbare Proliferation von SLY1 defizienten und SLY1 $\Delta\Delta$ Splenozyten relativ zu SLY1 $^{+/+}$ Zellen zu beobachten war. Im Unterschied dazu ist die Proliferation von T Lymphozyten aus SLY1 $^{-/-}$ oder SLY1 $\Delta\Delta$ Mäusen nach allogener Stimulation reduziert.

Der offensichtliche Gegensatz zwischen allogener Stimulation und Stimulation mithilfe mitogener Antikörper könnte durch die unterschiedliche Qualität der Signale erklärt werden. Die Stimulation des TZR durch einen allogenen MHC Liganden stellt eine weitgehend physiologische Reaktion dar. Dagegen handelt es sich bei den eingesetzten mitogenen anti-CD3 Antikörpern um polyklonal wirkende, TZR unabhängige und sehr stark wirkende Signale. Aus diesem Grund erscheint eine Rückkreuzung auf TZR transgene Mauslinien sinnvoll. Hier könnte mit gut charakterisierten Antigenen im physiologischen Kontext einer APC-vermittelten Stimulation die Rolle von SLY1 in der TZR Signaltransduktion peripherer T Zellen weiter aufgeklärt werden. Dies lag jedoch nicht im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit.

3.5.4 SLY1 in der Thymozyten Entwicklung

SLY1 defiziente und SLY1 mutierte Mäuse weisen verkleinerte Thymi auf (wie zuvor in Kapitel 3.6.1 und in (Beer et al., 2005) beschrieben). Eine nähere Untersuchung der Thymozyten Subpopulationen führte zu dem interessanten Befund, dass sich der hier vermutlich zugrunde liegende Defekt zeitlich auf die frühe Entwicklungsphase des Übergangs vom CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ doppelt negativen Stadium (DN) zum CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ doppelt positiven Stadium (DP) der Thymozyten festlegen lässt. Dies legt die Bestimmung der Zellzahlen in Abb. 3.25.A nahe, in der deutlich wird, dass sich die Differenz in der Zellularität erst ab dem doppelt positiven Stadium manifestiert. Weiter unterstrichen wird dieser Befund durch Abb. 3.25.B, aus der eine Verdopplung des Prozentsatzes der DN Thymozyten in SLY1 $^{-/-}$ und SLY1 $\Delta\Delta$ Thymi im Vergleich zu SLY1 $^{+/+}$ Thymi hervorgeht. Dies legt eine Blockade der Differenzierung und/ oder der Proliferation der DN Thymozyten nahe. Daher wurde, wie im Folgenden näher ausgeführt, eine detaillierte Analyse der DN Thymozyten vorgenommen.

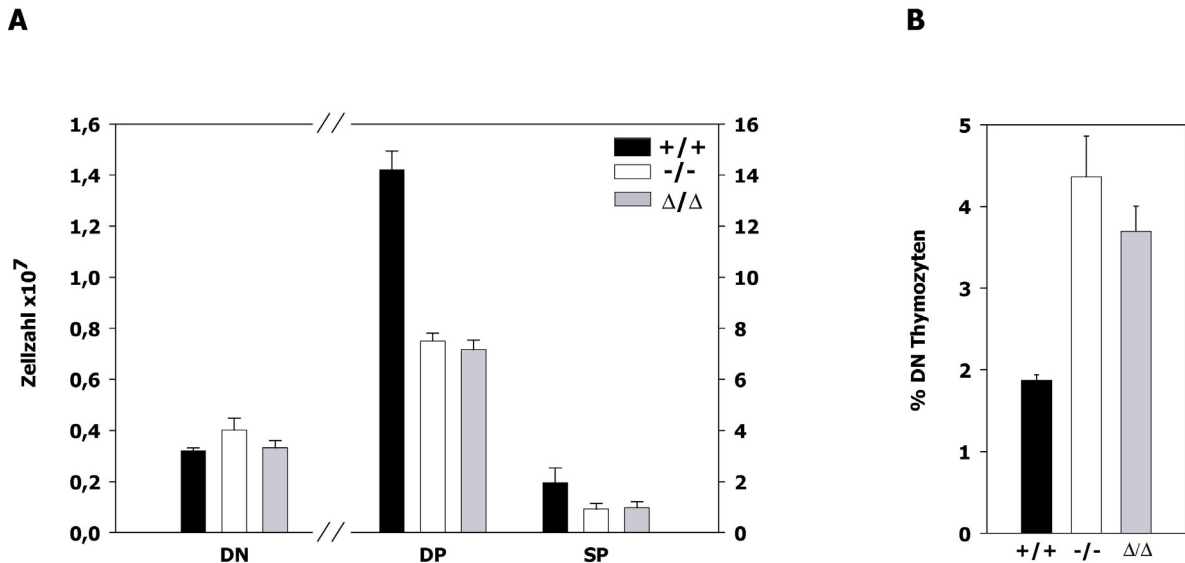


Abb. 3.25: Analyse der Thymozyten Subpopulationen

A. Gezeigt ist ein Vergleich der Anzahl der CD90-positiven Thymozyten je Thymus nach FACS Analyse der CD4- und CD8-Expression. DN: Doppelt negativ ($CD4^-CD8^-$); DP: Doppelt positiv ($CD4^+CD8^+$); SP: $CD4^-$ oder $CD8^-$ einzelpositiv. n= 4. B. Darstellung des Prozentsatzes an DN Thymozyten von Gesamthymozyten. n=3.

Das DN Stadium der Thymozyten lässt sich anhand der Verteilung der Oberflächenmarker CD25 und CD44 in vier Subpopulationen - DN1 bis DN4 - weiter unterteilen (Godfrey et al., 1993). Eine Blockade im DN Stadium ist unter anderem beschrieben worden im Zusammenhang mit einem Fehlen der RAG Proteine, die für das Rearrangement der TZR Gene verantwortlich sind (von Boehmer et al., 2003). In RAG defizienten Thymozyten kommt es zu keiner Bildung funktioneller TZR und folglich unterbleibt eine Weiterentwicklung über das DN3 Stadium hinaus, da hierzu von dem präTZR stammende Signale benötigt werden. In Thymi solcher Tiere ist eine stark erhöhte prozentuale Verteilung von Thymozyten im DN3 Stadium zu finden. Je nach Gendefekt sind auch Blockaden in anderen DN Substadien beschrieben. Eine Identifikation des betroffenen Stadiums erlaubt teilweise Rückschlüsse auf die Funktion des fehlenden Proteins zu ziehen und ist somit von hoher Relevanz bei der Untersuchung des Phänotyps der SLY1 defizienten Mäuse.

Eine nähere Analyse der DN Subpopulationen ergab einen mit 5-7% geringfügig aber signifikant erhöhten Anteil an Thymozyten im DN3 Stadium im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.26). Demzufolge kann dieser Befund einer leichten Entwicklungsblockade im DN3 Stadium SLY1 defizienter oder SLY1 mutierter Thymozyten ein Hinweis auf eine Beteiligung von SLY1 in der präTZR Signaltransduktion sein. Da es sich um einen sehr geringfügigen Anstieg handelt, ist jedoch keine eindeutige Aussage aus diesen Daten zu treffen und es muß von einem globalen Defekt ausgegangen werden, der alle DN Substadien betrifft.

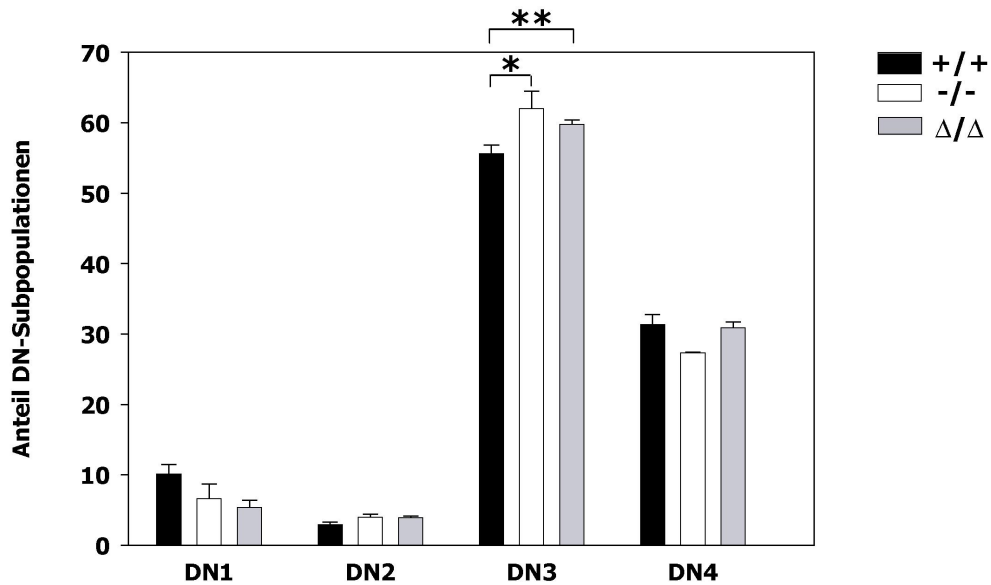


Abb. 3.26: FACS Analyse der $CD4^+CD8^-$ Thymozyten Subpopulationen

FACS Analyse zur Bestimmung der DN Thymozyten. CD90-positive sowie $CD4^-$, $CD8^-$ und TZR $\gamma\delta$ -negative Thymozyten (DN) wurden auf Expression von CD25 und CD44 untersucht. DN1: $CD25^+CD44^+$; DN2: $CD25^+CD44^+$; DN3: $CD25^+CD44^-$; DN4: $CD25^-CD44^-$. * $p \leq 0,02$; ** $p \leq 0,01$. n= 3.

Darüber hinaus wurde eine Expressionsanalyse doppelt positiver Thymozyten in Bezug auf den Aktivierungsmarker CD69 vorgenommen. CD69 gilt als Marker für in Abhängigkeit von einem TZR positiv selektierte Thymozyten (Yamashita et al., 1993). Es wurde in $SLY1^{+/+}$ Thymi ein signifikant erhöhter Anteil an DP CD69 hoch exprimierenden Thymozyten von 1,9% ($\pm 0,1$) im Vergleich zu 1,3% ($\pm 0,2$) bei $SLY1^{-/-}$ und 1,5% ($\pm 0,1$) bei $SLY1^{\Delta/\Delta}$ DP Thymozyten beobachtet (nicht gezeigt). Die vergleichbare prozentuale Expression von TZR β Ketten erlaubte es hingegen, Unterschiede aufgrund eines Defekts in der Generierung eines TZRs in $SLY1$ defizienten Thymozyten auszuschließen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend liefern also diese Daten Hinweise auf eine Rolle von $SLY1$ in der TZR-vermittelten Signaltransduktion in Thymozyten.

***In vitro* Proliferation $CD4^+CD8^-$ DN Thymozyten**

Um der Funktion von $SLY1$ in der Entwicklung von DN zu DP Thymozyten näher auf den Grund zu gehen, wurde im Folgenden ein *in vitro* Differenzierungssystem verwendet, das die frühe Interaktion von DN Thymozyten mit Stromazellen im Thymus nachahmt. Dazu wurde die Knochenmarks Stromazelllinie OP9 verwendet, welche den Notch Liganden Delta-Like-1 (DL-1) exprimiert (Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002). Die Aktivierung von Notch auf der

Thymozyten Oberfläche durch Delta-Like-1 führt zusammen mit einem präTZR Signal zu einer starken Proliferation und Differenzierung von *ex vivo* aufgereinigten DN Thymozyten innerhalb weniger Tage (Kapitel 1.3). In Abb. 3.27 wird deutlich, dass die Thymozyten Proliferation abhängig ist von einem Notch Signal. Eine Inkubation auf OP9 DL-1 Zellen führte zu einer etwa 14-fachen Expansion von $SLY1^{+/+}$ Thymozyten. Thymozyten, die als Kontrolle auf OP9 Zellen plattiert wurden, welche anstelle von Delta-Like-1 nur GFP exprimieren, proliferierten nicht. Darüber hinaus ist zu sehen, dass die Proliferation von DN $SLY1^{-/-}$ oder $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Thymozyten nach drei Tagen um etwa 50% reduziert ist im Vergleich zu Thymozyten aus Wt Mäusen.

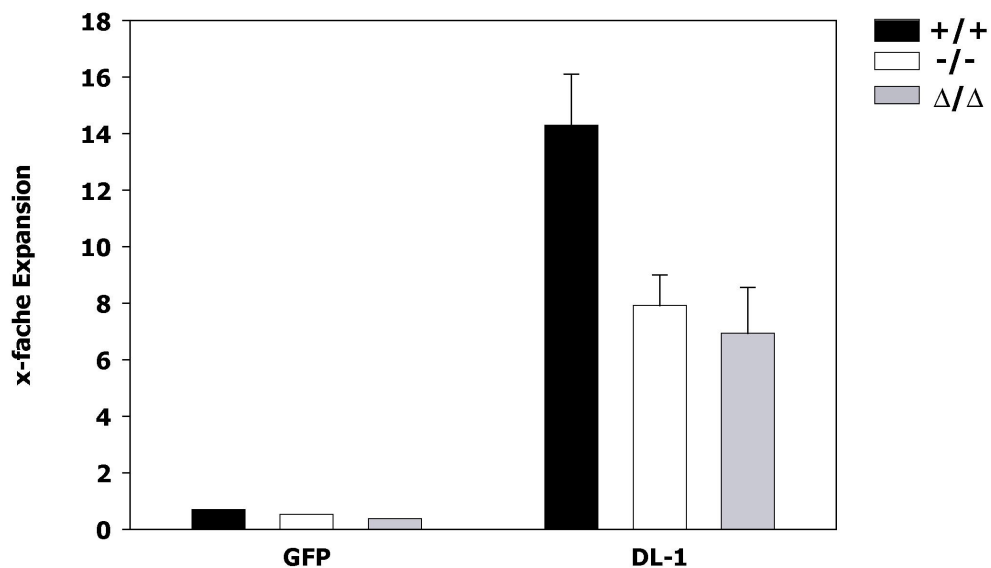


Abb. 3.27: *In vitro* Thymozytenexpansion in Abhängigkeit eines Notch Signals

Aufgereinigte DN Thymozyten wurden auf OP9 GFP Kontrollzellen bzw. OP9 DL-1 Zellen ausgesät. Nach drei Tagen Kultur wurde die Expansionsrate bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus einem Dreifachansatz.

In Abb. 3.28 wird sichtbar, dass die beobachtete Reduktion der Expansion der DN Thymozyten nicht nur nach drei Tagen, sondern auch nach längerer Inkubation am sechsten Tag um etwa 50% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert war.

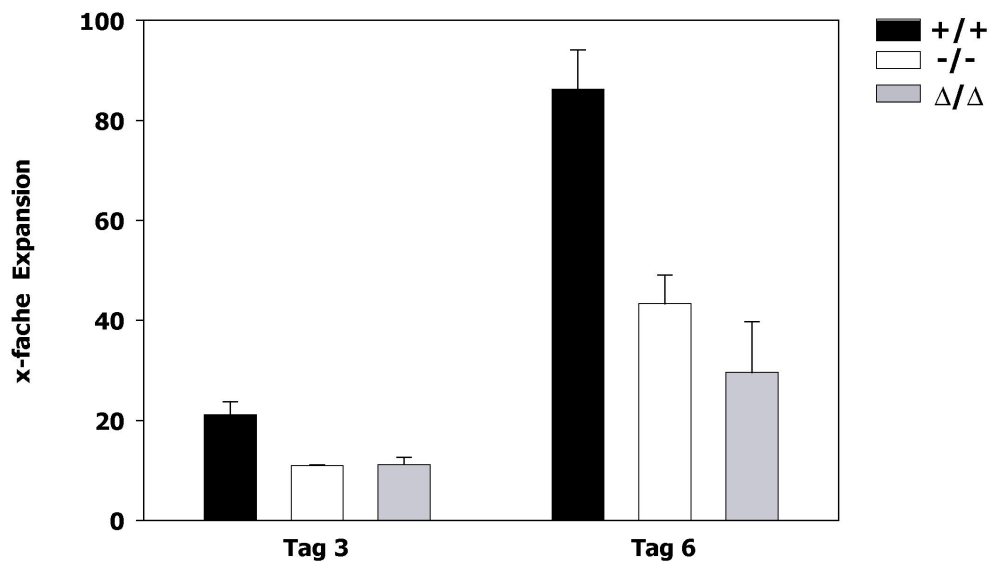


Abb. 3.28: Thymozytenexpansion auf OP9 DL-1 Zellen an Tag 3 und Tag 6

Aufgereinigte DN Thymozyten wurden auf OP9 DL-1 Zellen ausgesät. Nach drei und sechs Tagen Kultur wurde die Expansionsrate bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus Dreifachansätzen. Der Graph ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Wie in Abb. 3.29 dargestellt, ist dieser Effekt durch die Zugabe von IL-7 in das Medium größtenteils kompensierbar. Die Zugabe von IL-7 bewirkt eine deutlich höhere Expansion der Thymozyten insgesamt. Ursache dafür ist zum einen eine höhere Überlebensrate, zum anderen wird die Differenzierung verlangsamt (persönliche Kommunikation mit David Finlay, Dundee). Bei dem Prozess der *in vitro* Differenzierung auf OP9 Stromazellen ist zu beachten, dass eine Expansion der Thymozyten nur bis zum DN4 Stadium stattfindet. Sobald das DP Stadium erreicht ist, gehen die Zellen in eine Ruhephase über, da in dieser Phase benötigte Signale für die *in vivo* Positivselektion fehlen (Kapitel 1.2). Die Verlangsamung der Differenzierung durch IL-7 hat also eine verlängerte Zellteilungsaktivität und damit eine erhöhte Proliferationsrate zur Folge. Weiterhin haben DN3 Thymozyten eine höhere Zellteilungskapazität als DN4 Thymozyten, da sie mehr Zeit benötigen, um das DP Stadium zu erreichen. Interessant ist, dass SLY1^{+/+} Thymozyten trotz eines niedrigeren Anteils an DN Thymozyten im DN3 Stadium (wie in Abb. 3.26 gezeigt) zumindest ohne Zugabe von IL-7 eine höhere Expansionsrate aufweisen. Der um 5-7% höhere Anteil an DN3 Thymozyten in SLY1^{-/-} oder SLY1^{Δ/Δ} DN Thymozyten kann eventuell einen vorhandenen Proliferationsdefekt in IL-7-haltigem Medium maskieren. Für eine weitere Unterscheidung ist die Verwendung weiter aufgereinigter CD25-positiver DN3 oder CD25-negativer DN4 Thymozyten notwendig.

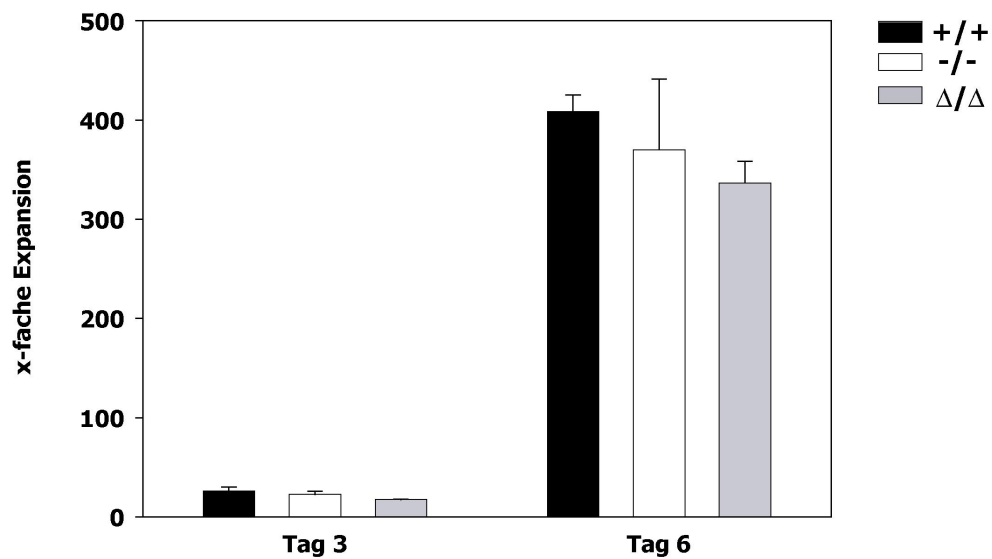


Abb. 3.29: Thymozytenexpansion auf OP9 DL-1 Zellen unter Zugabe von IL-7

Aufgereinigte DN Thymozyten wurden auf OP9 DL-1 Zellen ausgesät. Nach drei und sechs Tagen Kultur wurde die Expansionsrate bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus Dreifachansätzen. Graph ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Dem Medium ist zusätzlich zu den vorher gezeigten Versuchen 1 ng/ml IL-7 zugefügt worden.

***In vitro* Differenzierung von CD4⁺CD8⁻ DN Thymozyten**

Neben der Bestimmung der Expansionsrate wurde die Differenzierung der sortierten DN Thymozyten *in vitro* zu DP Thymozyten per FACS Analyse bestimmt. In Abb. 3.30 ist die Verteilung von CD4 und CD8 auf der Zelloberfläche der Ausgangspopulationen nach magnetischer Aufreinigung an Tag 0 sowie der *in vitro* differenzierten Thymozyten nach drei und sechs Tagen dargestellt.

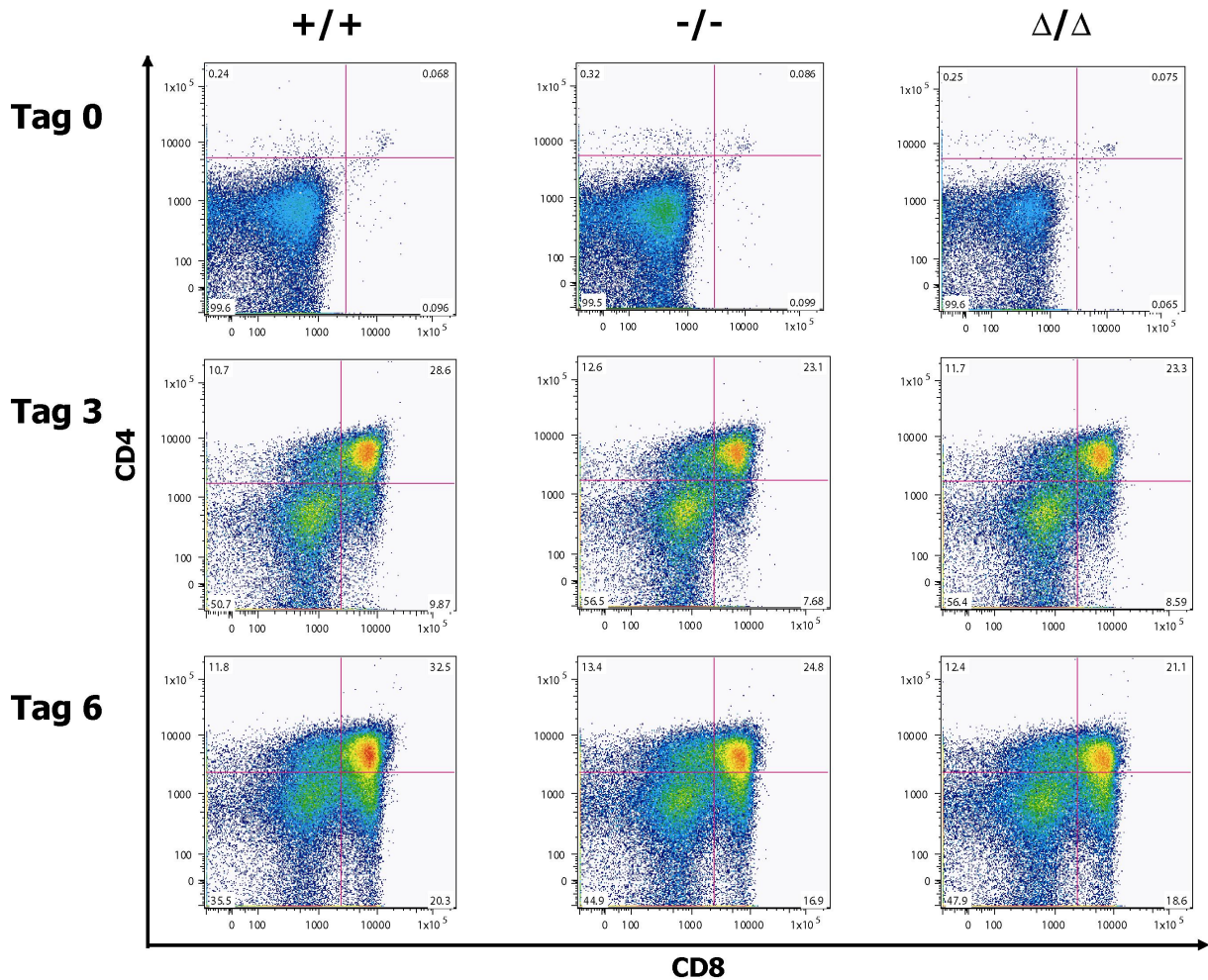


Abb. 3.30: FACS Analyse der Differenzierung OP9 DL-1-kultivierter DN Thymozyten

Aufgereinigte DN Thymozyten wurden auf OP9 DL-1 Zellen ausgesät (inklusive 1 ng/ml IL-7). Tag 0: Bestimmung der Reinheit der Isolierung DN Thymozyten. Nach drei und sechs Tagen Kultur wurden die Zellen geerntet und einer FACS Analyse unterzogen. Gezeigt ist ein jeweils repräsentativer Graph aus Dreifachansätzen. Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Das Maß der Differenzierung wird als Quotient aus der prozentualen Verteilung der DP Fraktion zu der DN Fraktion ausgedrückt und ist in Abb. 3.31 grafisch dargestellt. Es wird dabei deutlich, dass die Differenzierung bei SLY1^{+/+} Thymozyten relativ gesehen weiter fortgeschritten ist. Grund hierfür ist wahrscheinlich die oben bereits beschriebene geringfügige Akkumulation der SLY1^{-/-} bzw. SLY1^{Δ/Δ} DN Thymozyten im DN3 Stadium. Um allerdings einen intrinsischen Defekt der *in vitro* Differenzierung von DN zu DP SLY1 defizienten Thymozyten definitiv ausschließen zu können, ist der Einsatz weiter aufgereinigter DN3 oder DN4 Fraktionen notwendig.

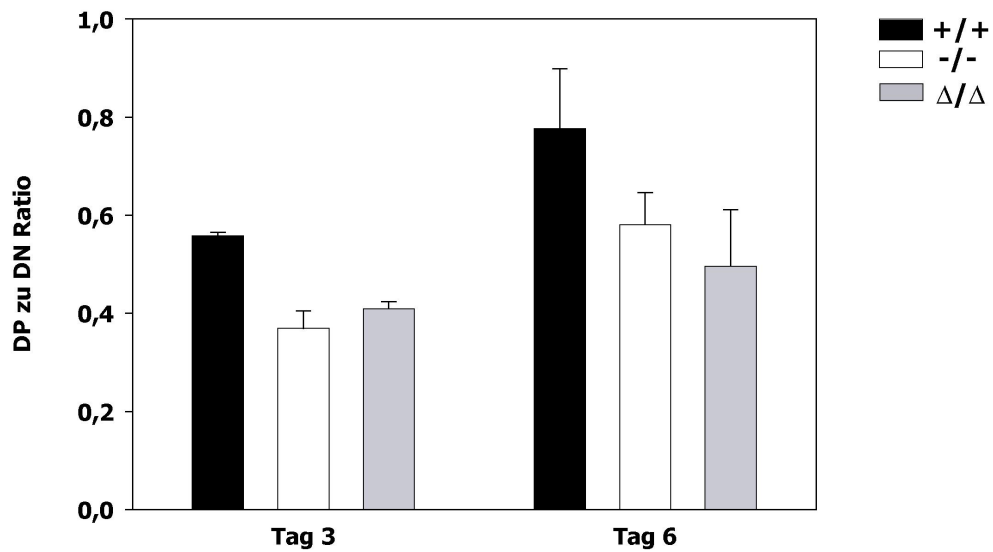


Abb. 3.31: Quantifizierung der Differenzierung OP9 DL-1-kultivierter DN Thymozyten

Quantifizierung der oben gezeigten FACS Analyse. Als Maß der Differenzierung wurde ein Quotient gebildet aus dem prozentualen Anteil an DP Thymozyten und dem prozentualen Anteil an DN Thymozyten. Gezeigt ist der Durchschnitt von Dreifachansätzen, der repräsentativ ist für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Bestimmung der Apoptoserate *in vitro* kultivierter CD4⁻CD8⁻ DN Thymozyten

Eine erniedrigte Proliferationsrate kann verschiedene Ursachen haben. So kann zum einen vermehrt Apoptose auftreten, zum anderen kann die Zellteilungsrate vermindert sein. Ein Vergleich der Apoptoserate von drei Tage auf OP9 DL-1 kultivierten DN Thymozyten ist in Abb. 3.32 dargestellt. Anhand einer kombinierten Färbung mit dem DNS Farbstoff DAPI, der in intakte Zellen nicht eindringen kann, und dem frühen Apoptosemarker Annexin V wurde eine Einteilung in frühe Apoptose (Annexin V⁺DAPI⁻) und späte Apoptose (Annexin V⁺DAPI⁺) vorgenommen. Die Abb. 3.32 belegt eine signifikant erhöhte Apoptoserate von SLY1^{-/-} und SLY1^{Δ/Δ} Thymozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

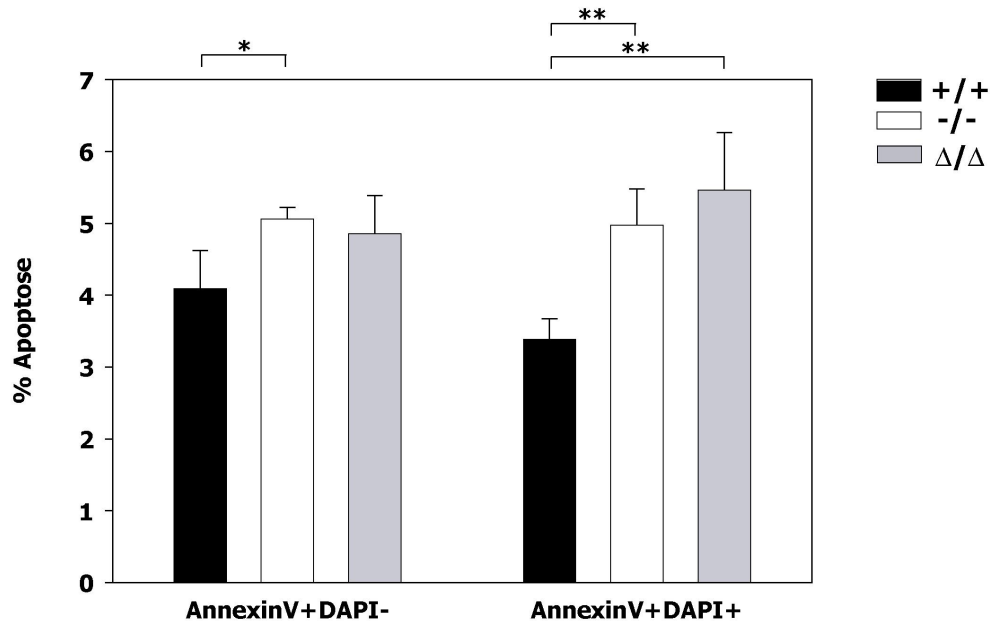


Abb. 3.32: Bestimmung der Apoptoserate von OP9 DL-1-kultivierten Thymozyten

Dargestellt ist die Apoptoserate von Thymozyten, die auf OP9 DL-1 Stromazellen für drei Tage kultiviert wurden. Die Bestimmung wurde per FACS Analyse durchgeführt, wobei sich DAPI-negative und Annexin V-positive Thymozyten in einer frühen Phase der Apoptose doppelt positiv in einer späten Phase befinden. Daten wurden aus Dreifachbestimmungen generiert, Graph ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,02$.

Bestimmung der Zellzyklusverteilung *in vitro* kultivierter DN Thymozyten

Darüber hinaus wurde der Zellzyklus durch Bestimmung des DNS Gehalts permeabilisierter Zellen unter Verwendung des DNS Farbstoffs DAPI bestimmt. Zellen, die erhöhte DNS Mengen aufweisen, befinden sich entweder in der S-Phase oder in der G₂-Phase. Der Prozentsatz der Zellen, die sich in einer dieser beiden Phasen befinden, war vergleichbar in allen drei Kontrollgruppen am dritten Tag (Abb. 3.33) und am sechsten Tag der Kultivierung auf OP9 DL-1 Zellen (nicht gezeigt).

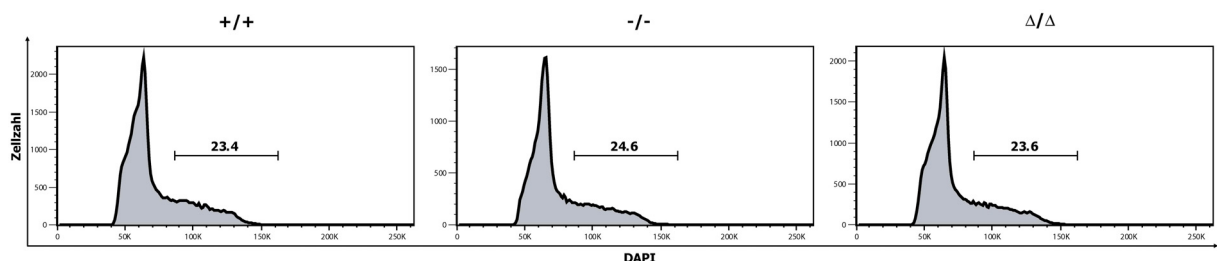


Abb. 3.33: Bestimmung der Zellzyklusverteilung von OP9 DL-1-kultivierten Thymozyten

Dargestellt sind repräsentative Histogramme einer FACS Analyse zur Zellzyklusbestimmung von Thymozyten, die auf OP9 DL-1 Stromazellen für drei Tage kultiviert wurden. Der Anteil der DAPI-markierten Thymozyten, welche sich in den teilungsaktiven Phasen S oder G₂ befanden, ist markiert. Graphen entsprechen den Ergebnissen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Somit deuten die vorliegenden Daten auf eine erhöhte Apoptoserate als Ursache für die verminderte Expansionsrate der SLY1 defizienten und SLY1 mutierten Thymozyten hin.

Bestimmung der Aktivierung der S6-Kinase *in vitro* kultivierter DN Thymozyten

DN Thymozyten, die erfolgreich die TZR Gene umgelagert und eine funktionelle TZR β Kette gebildet haben, erhalten durch die erfolgreiche Integration des präTZR und Notch Signals die Befähigung, sich innerhalb kürzester Zeit extrem stark zu vermehren (Kapitel 1.2 und 1.3). Hier ist eine effiziente und gesteuerte Aktivierung des Metabolismus essentiell, um die erforderlichen Energiemengen sowie Aminosäuren- und Kohlenstoffbausteine liefern zu können.

Eines der dabei intrazellulär stattfindenden Ereignisse ist die Aktivierung der S6-Kinase. Deren Induktion führt dann zur Phosphorylierung einer Vielzahl an Substraten mit dem Ziel, metabolische Prozesse wie die ribosomale Proteinsynthese und Glykolyse zu beschleunigen (Hinton et al., 2006). Ein anerkanntes Maß der Aktivierung der S6-Kinase ist die Messung des Phosphorylierungsstatus eines der namensgebenden Substrate dieser Kinase, des ribosomalen Proteins S6. Dieses wird an fünf unterschiedlichen Positionen in festgelegter Reihenfolge beginnend mit Serin236 phosphoryliert (Flotow und Thomas, 1992). Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper ist spezifisch für die Phosphorylierung an Serin235 und Serin236. Darüber hinaus wurde die Zunahme der Zellgröße anhand des Vorwärtstreulichtes des FACS Geräts bestimmt, welche ebenfalls als Maß einer erhöhten metabolischen Aktivität gilt.

Auf Seite 92 ist eine Analyse des Phosphorylierungsstatus von ribosomalem Protein S6 und der Zellgröße von DN Thymozyten dargestellt, die über Nacht auf OP9 Zellen mit oder ohne Notch Liganden inkubiert worden sind. In Abb. 3.34.A wurden die untersuchten Thymozyten zunächst nach Genotyp getrennt und differenziert nach vorhandener oder abwesender intrazellulärer Expression der TZR β Kette aufgetragen. Die Phosphorylierung von S6 Protein ist jeweils maximal in Thymozyten, die intrazellulär für eine bereits gebildete TZR β Kette positiv sind und zugleich dem Notch Liganden DL-1 auf OP9 Zellen ausgesetzt waren. Die Phosphorylierung korreliert dabei auch mit einem Anstieg der Zellgröße.

TZR β -negative Thymozyten, die auf OP9 DL-1 Stromazellen inkubiert bzw. TZR β -positive Thymozyten, die auf OP9 GFP Kontrollzellen inkubiert worden waren, sind jeweils Phospho-S6 negativ und weisen eine erniedrigte Zellgröße auf. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Notwendigkeit der Integration des Notch und präTZR Signals für eine

Aktivierung des mTOR Signalwegs und damit der S6-Kinase (Ciofani et al., 2004; Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005; Hinton et al., 2006).

Eine Überlagerung des S6 Phosphorylierungssignals von TZRb-positiven und auf OP9 DL-1 Zellen inkubierten Thymozyten der verschiedenen Genotypen (Abb. 3.34.B) macht deutlich, dass die Frequenz Phospho-S6-positiver Zellen geringfügig aber reproduzierbar höher ist in $SLY1^{+/+}$ Thymozyten. Dies ist auch der Fall für die Zellgröße.

Sogar in den als Positivkontrolle mit Phorbol ester stimulierten Proben ist der Anteil an Zellen mit intermediärem Phospho-S6 Signal in $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta/\Delta}$ DN Thymozyten sichtbar erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.34.C).

Um zu überprüfen, ob die Frequenz Phospho-S6-positiver DN Thymozyten in Abwesenheit von funktionellem SLY Protein auch *ex vivo* reduziert ist, wurden Thymi direkt nach der Präparation fixiert und per FACS Analyse untersucht. Abb. 3.34.D zeigt, dass in Übereinstimmung mit den vorigen *in vitro* Daten ein erniedrigter Anteil Phospho-S6-positiver Thymozyten in den untersuchten Thymi aus $SLY^{-/-}$ und $SLY^{\Delta/\Delta}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegt.

Zusammenfassen weisen diese Daten darauf hin, dass SLY1 an der Kopplung entweder des präTZR oder des Notch Signals mit der S6-Kinase beteiligt ist. Daraus folgernd lässt sich auf eine Beteiligung von SLY1 bei der Aktivierung des Metabolismus in DN Thymozyten während der β -Selektion in den durch PDK1- und Akt-vermittelten Signalwegen schließen, die in einer Aktivierung des mTOR Proteinkomplexes kumulieren.

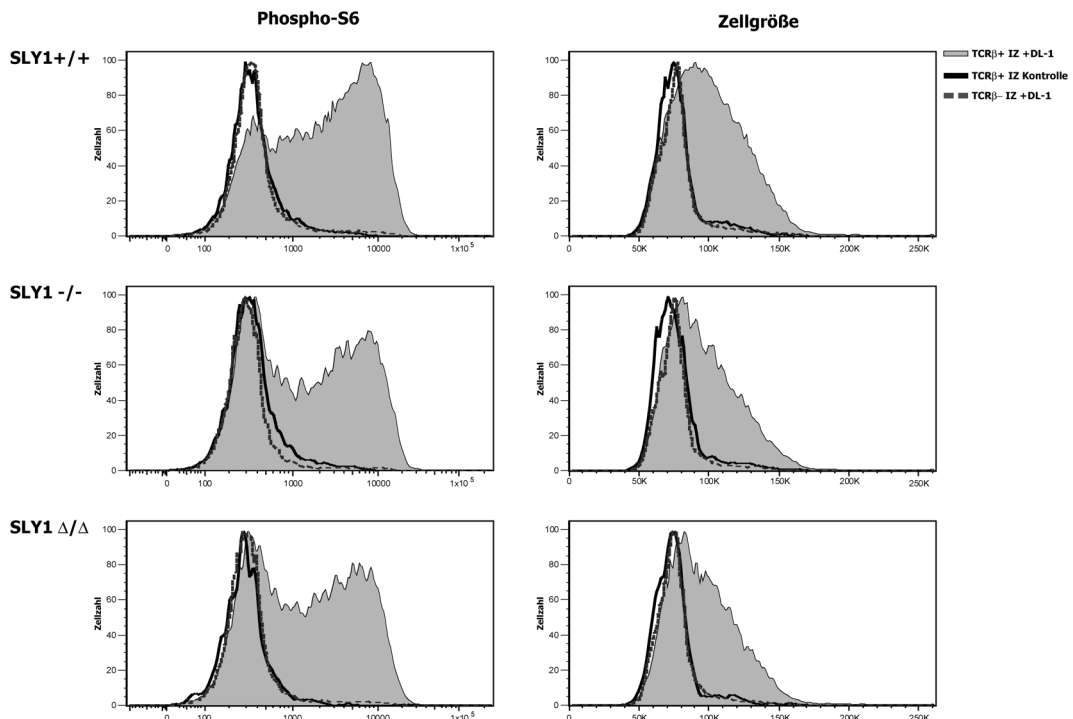
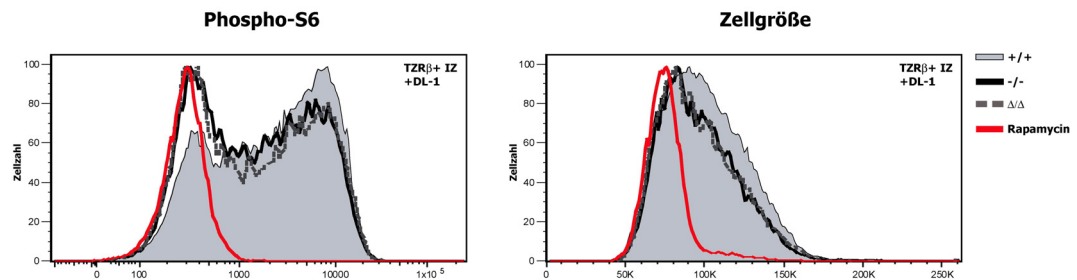
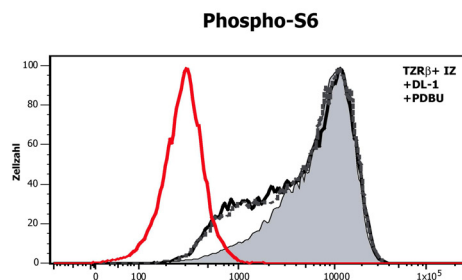
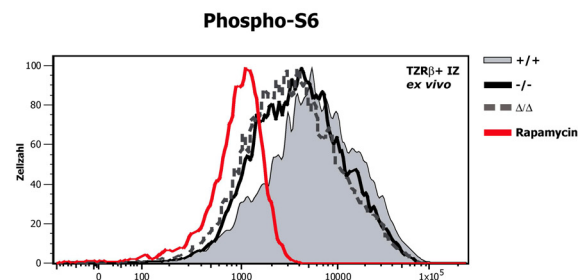
A**B****C****D**

Abb. 3.34: S6-Kinase Aktivierung und Zellgröße in DN Thymozyten

Dargestellt sind FACS Histogramme einer Intrazellulärfärbung zur Bestimmung des Anteils an phosphoryliertem ribosomalem Protein S6 und der Zellgröße als Maß für die Aktivierung des Metabolismus in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer TZR β Kette. Aufgereinigte DN Thymozyten wurden über Nacht entweder auf OP9 GFP (Kontrolle) oder auf OP9 DL-1 Stromazellen (+DL-1) kultiviert. **A.** Die nach Genotyp der Thymozyten getrennte Überlagerung zeigt die Abhängigkeit der Phosphorylierung und Größenzunahme von gleichzeitig vorhandenem Notch und präTZR Signal. **B.** Vergleich des Phospho-S6 Signals und der Zellgröße der Genotypen untereinander. Als Negativkontrolle der Phospho-S6 Färbung wurden Thymozyten über Nacht mit 20nM Rapamycin (rot) behandelt. **C.** Zur Positivkontrolle wurden Thymozyten 25 min vor Ernte mit 20 ng/ml PDBU behandelt. **D.** DN Thymozyten wurden *ex vivo* analysiert. Als Negativkontrolle dienten DN Thymozyten, die über Nacht mit 20 nM Rapamycin behandelt wurden (rot). Graphen sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

4 Diskussion

4.1 SLY1 - ein Adapterprotein?

Adapterproteine zeichnen sich durch den Besitz mehrerer Protein-Protein-Interaktionsdomänen bei gleichzeitigem Fehlen eigener enzymatischer Aktivität aus. Darüber hinaus sind sie durch ihren modulartigen Aufbau in der Lage, die Bildung von Signalübertragenden Komplexen zu vermitteln (Pawson und Scott, 1997; Peterson et al., 1998; Simeoni et al., 2004). SLY1 besitzt mit einer SH3 und einer SAM Domäne zwei potentielle Protein-Protein-Interaktionsdomänen (Abb. 1.4 und 3.1). Die spezifische Phosphorylierung an Serin27 nach Antigenrezeptor-vermittelter Aktivierung (Astoul et al., 2003) und die beeinträchtigte Proliferation von SLY1^{-/-} oder SLY1^{ΔΔ} T Zellen nach allogener Stimulation weisen auf eine Adapterfunktion in der Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion hin (Abb. 3.21 und (Beer et al., 2005).

SH3 Domänen sind Teil einer Vielzahl von Adapterproteinen und binden in der Regel an prolinreiche Bereiche anderer Proteine (Feng et al., 1994). Es ist jedoch in jüngerer Zeit auch eine nichtkanonische Bindung an Ubiquitin-enthaltende Sequenzbereiche beschrieben worden (He et al., 2007). Ein Vergleich der Einträge der NCBI Datenbank unter Verwendung des Blast Programms ergab überraschend geringe Homologien der SH3 Domäne in SLY1 zu SH3 Domänen in anderen Proteinen. Die höchste Homologie besteht zu 44% Identität und 57% Ähnlichkeit mit dem Protein CD2AP. Ausnahme bilden die nah verwandten Proteine SLY2 (70% Identität) und SASH1 (80% Identität). Dies und die allgemein hohe Sequenz Homologien dieser drei Proteine untereinander legen eine Einteilung als eigenständige Familie nahe (Abb. 1.4). Darüber hinaus wird jedoch die Frage aufgeworfen, ob es sich bei den in der SLY Familie enthaltenen SH3 Domänen tatsächlich um klassische SH3 Domänen handelt, die prolinreiche Sequenzen binden. Eine Identifikation von SLY1 Bindepartnern erwies sich im Rahmen dieser Arbeit als nicht durchführbar, und dabei zeigte sich, dass die SLY1 SH3-Domäne im Gegensatz zu anderen SH3-Domänen ein stark reduziertes Bindepotential zumindest unter den eingesetzten Versuchsbedingungen besitzt (s.u.). Solange kein gegenteiliger Beweis angeführt wird, kann also auch eine nichtkanonische Rolle dieser SH3 Domäne in Betracht gezogen werden. Dazu liegen jedoch momentan keine weiteren Daten vor.

Auch die zuerst in Hefen beschriebene SAM Domäne gilt als Protein-Interaktionsmodul. SAM Domänen enthaltende Proteine wurden in vielen Eukaryonten beschrieben und sind in

vielfältige biologische Prozesse involviert. Gut charakterisierte Funktionen von SAM Domänen sind die Bildung von Homo- oder Heterodimeren durch Interaktion mit anderen SAM Domänen enthaltenden Proteinen (Qiao und Bowie, 2005). Auch die durch SAM Domänen vermittelte Bildung von Oligomeren ist beschrieben. Ein Beispiel hierfür ist die Rezeptor Tyrosin-Kinase EphB2 (Thanos et al., 1999). Eine Subfamilie von SAM Domänen ermöglicht jedoch die Erkennung von RNS und hat somit völlig andere Bindeeigenschaften (Aviv et al., 2003; Johnson und Donaldson, 2006). Ein Sequenzvergleich mit der in SLY1 enthaltenen SAM Domäne ergab jedoch eine größere Ähnlichkeit mit der SAM Domäne des EphB2 Rezeptors als mit RNS-bindenden SAM Domänen (nicht gezeigt). Eine RNS Bindung von SLY1 über die SAM Domäne ist somit unwahrscheinlich.

Um eventuelle Interaktionspartner zu identifizieren, ist sowohl die SH3 Domäne als auch die SAM Domäne an Glutathion-S-Transferase kloniert worden, um mittels eines „pull-down“-Assays interagierende Proteine zu präzipitieren (nicht gezeigt). Im zeitlich limitierten Rahmen dieser Arbeit erwies sich dieser Ansatz jedoch nicht als erfolgreich. Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit Erfahrungen eines Kooperationspartners (Jürgen Göbel, Dundee, England). Es wurden zwar zahlreiche Proteine präzipitiert, die mit der SH3-Domäne des Adapters Grb-2 interagierten, es konnten jedoch keine Proteine präzipitiert werden, die mit der SLY1 SH3-Domäne interagierten. Gleiches gilt für die in Kapitel 3.4 vorgestellte Strategie, SLY1 Gesamtprotein zu überexprimieren und zu präzipitieren (Kapitel 3.4). Auch ein „Yeast-Two-Hybrid-Screen“ zur Identifikation SLY1-bindender Proteine lieferte bislang nur negative Ergebnisse (Simone Klöter). Zusammengefasst lässt sich also nach bisherigen Erfahrungen sagen, dass SLY1 oder dessen isolierte potentielle Interaktionsdomänen nur ein sehr eingeschränktes Bindepotential besitzen, oder die dazu notwendigen experimentellen Bedingungen noch etabliert werden müssen.

In Zusammenhang mit der erschwerten Identifikation von SLY1-interagierenden Proteinen mittels Präzipitation ist sicherlich die relative Unlöslichkeit des Proteins problematisch. In Primärzellen wurde beobachtet, dass SLY1 in unstimulierten Zellen unter Behandlung des Detergens NP-40 nur teilweise in Lösung ging (nicht gezeigt). Dies änderte sich jedoch nach Stimulation mit Phorbolestern oder anti-CD3 Antikörpern. Aus diesem Grund wurde für Proteinextraktionen, bei denen keine Koimmunpräzipitation erfolgen sollte, in der Regel das stärkere Detergens β -Lauryl-Maltosid zugesetzt. Der Einsatz stärkerer Detergentien bei Koimmunpräzipitationen kann jedoch zur Folge haben, dass relativ schwache Protein-Protein-Interaktionen aufgehoben werden. Somit ist der Aufschluss der Zellen eine Gratwanderung.

Entweder bleibt das primär zu präzipitierende Protein unlöslich, oder die Bindung von Interaktionspartnern wird zerstört.

NP-40 unlösliche Proteine sind unter anderem häufig als Zytoskelett-assoziiert beschrieben worden. In Konfokalbildanalysen mit einem SLY1 GFP Fusionsprotein konnte jedoch weder eine Assoziation mit filamentösem Aktin (Abb. 3.9 und nicht gezeigt) noch sonstigen Zytoskelett-artigen Strukturen nachgewiesen werden. Dennoch ist diese Möglichkeit aufgrund eines generell sehr schwach ausgebildeten Zytoskeletts in Lymphozyten nicht abschließend auszuschließen. Interessant in diesem Kontext sind neuere Befunde über das zu SLY1 hoch homologe Protein SASH1, das in Hela- und Hek- Zelllinien an der Aktinpolymerisation beteiligt zu sein scheint (persönliche Kommunikation mit Klaus-Peter Janssen, München). In Analogie dazu kann jedoch keineswegs eine gleichartige Funktion von SLY1 postuliert werden. Allein der Größenunterschied – SLY1 ist 55 kD groß, SASH1 dagegen 110 kD – macht deutlich, dass sich beide Proteine trotz ihrer Homologie immer noch stark unterscheiden. Auch die Expression ist nicht vergleichbar. SASH1 wird ubiquitär exprimiert, während SLY1 Lymphozyten-spezifisch ist. Betrachtet man die Entwicklung der SLY Familie unter evolutionären Gesichtspunkten, so scheint *sash1* das ursprünglichste Gen dieser Familie zu sein. Orthologe finden sich sowohl in Arthropoden wie *Drosophila melanogaster* als auch in Vertebraten (Ensembl Datenbank). Die homologen Gene *sly1* und *samsn1/sly2* sind dagegen nur in Knochenfischen und Landwirbeltieren zu finden. Aus den genannten Gründen ist also eine unterschiedliche Funktion von SLY1 und SASH1 sehr wahrscheinlich.

4.2 Regulation der subzellulären Lokalisation

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von SLY1 mit der Ensembl Datenbank lieferte einen ersten Hinweis auf die Existenz einer zweiteiligen nukleären Lokalisationssequenz nahe des N-Terminus und der Serin Phosphorylierungsstelle an Position 27 (Abb. 1.4). Diese NLS ist zum Teil in SLY1Δ deletiert, ebenso fehlt dort besagte Phosphorylierungsstelle (Abb. 3.1). Die anschließende Analyse der subzellulären Lokalisation von Wt und SLY1Δ Protein führte zu dem äußerst interessanten Befund, dass die Lokalisation des SLY1Δ Proteins im Vergleich zu Wt Protein gestört ist (Abb. 3.5, 3.6 und 3.9). Die trunkierte Proteinvariante SLY1Δ liegt im Gegensatz zu SLY1 ausschließlich im Zytoplasma vor. Weitere Analysen ergaben eine durch Antigenrezeptor Stimulation induzierte Translokation von Wt Protein aus dem Nukleus in das Zytoplasma (Abb. 3.6-3.8). Da bereits eine von der Antigenrezeptor Stimulation

abhängige Phosphorylierung bekannt war, lag es auf der Hand, eine Korrelation von Phosphorylierungsstatus und subzellulärer Lokalisation zu postulieren.

Bei einer genaueren Analyse der Phosphorylierungsstelle und umgebender Aminosäuren fiel eine hohe Sequenzhomologie mit Konsensusbindestellen von 14-3-3 Proteinen auf (Tab. 3.1). Es handelt sich hierbei um eine Klasse von Proteinen, die in der überwiegenden Zahl der Fälle nach einer Phosphorylierung eines Serins oder Threonins innerhalb einer definierten Sequenz bindet (Dougherty und Morrison, 2004). Häufig ist eine Bindung nahe einer NLS beschrieben, was eine Maskierung dieser NLS und eine sich daraus ergebende Retention des Proteins im Zytoplasma zur Folge hat (MacKintosh, 2004; Tzivion und Avruch, 2002; Yoshida et al., 2005). Eine von der Phosphorylierung an Serin27 abhängige Bindung von 14-3-3 Proteinen konnte daraufhin nachgewiesen werden (Simone Klöter und Abb. 3.10). Eine eindrucksvolle Bestätigung der These einer Regulation durch die Phosphorylierung an Serin27 lieferte das Studium der Lokalisation der SLY1 Serin27 zu Alanin Punktmutante, die in Übereinstimmung mit vorigen Ergebnissen im Nukleus akkumulierte (Abb. 3.9). Zusammen genommen lässt sich hieraus ableiten, dass die ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation von SLY1 Δ durch die teilweise Deletion der NLS und nicht durch das Fehlen der Phosphorylierungsstelle bedingt ist.

Die Aufklärung der Regulation der Phosphorylierung von SLY1 Serin27 könnte zu einem besseren Verständnis des Signalwegs insgesamt führen und so eventuell funktionelle Hinweise liefern. Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass die Phosphorylierung von SLY1 Protein sowohl durch PKC- als auch durch PI3-Kinase-Inhibitoren unterbunden werden kann (Astoul et al., 2003). In dieser Arbeit wurde dieser Befund insofern ausgeweitet, als dass gezeigt werden konnte, dass der Einsatz beider Inhibitoren nicht nur die Phosphorylierung, sondern auch die induzierte Translokation aus dem Nukleus in das Zytoplasma verhindern kann (Abb. 3.8). Weiterhin ergab eine Überprüfung der Wirkung verschiedener Inhibitoren in Primärzellkultur eine Hemmbarkeit der Phosphorylierung von SLY1 an Serin27 durch ein membranpermeables Oligopeptid, ein für PKC hoch spezifisches Pseudosubstrat (nicht gezeigt). Ein anschließender *in vitro* Kinase Assay bestätigte eine spezifische SLY1 Serin27 Phosphorylierung durch PKC α und PKC β (nicht gezeigt). Anhand PKC α und PKC β einfach- und doppel-defizienter Mäuse konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass diese Kinasen essentiell für eine Phosphorylierung *in vivo* sind (nicht gezeigt). Das Vorliegen einer großen Anzahl hoch homologer Kinasen und die sich daraus ergebende Redundanz erschwert in diesem Fall eine Analyse *in vivo*. Mit Protein Kinase D (PKD) 1, 2 und 3, Vertreter einer zur PKC Familie sehr nah verwandten Kinase Familie, sind kürzlich drei weitere Kinasen

identifiziert worden, die sowohl in *in vitro* Kinase Assays (nicht gezeigt) als auch nach Überexpression in Zellkultur SLY1 an Position 27 phosphorylieren (persönliche Kommunikation mit Doreen Cantrell, Dundee, England). Der finale Beweis einer physiologischen Relevanz - die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von SLY1 in PKD defizienten Mäusen - steht jedoch noch aus.

In dieser Hinsicht ist sicherlich die bereits beschriebene Funktion von PKD interessant, durch Phosphorylierung eine Änderung der Lokalisation des Substrates durch die induzierte Bindung von 14-3-3 Proteinen zu katalysieren, analog zu der in dieser Arbeit aufgeklärten Regulation der Lokalisation von SLY1. Dies ist beispielsweise für die Histondeacetylasen HDAC-5 und -7 beschrieben, deren Export aus dem Nukleus durch PKD nach Antigenrezeptor Stimulation eine anschließende veränderte Genregulation bewirkt (Matthews et al., 2006; Parra et al., 2005). Die Parallelen zwischen HDAC-5 und -7 zu SLY1 gehen allerdings wahrscheinlich nicht über die Regulation der Lokalisation hinaus, zumindest gibt es keine Hinweise für eine mögliche Histon- oder DNS-Bindung durch SLY1.

Die induzierte Translokation von SLY1 nach Stimulation wirft die Frage nach dessen funktioneller Relevanz auf. Mehrere Möglichkeiten können hierbei in Betracht gezogen werden. Zum einen ist eine noch genau zu charakterisierende ausschließliche Funktion in entweder dem Zytoplasma oder dem Nukleus denkbar. Eine Regulation der Lokalisation könnte somit eine einfache An- oder Abschaltung dieser Funktion bewirken. Auch eine Funktion als molekularer Transporter zwischen den zellulären Kompartimenten wäre denkbar. Mangels bekannter Interaktionspartner lassen sich diese Hypothesen jedoch schwerlich überprüfen.

4.3 SLY1 in der Lymphozyten Entwicklung

Die erniedrigte Zellzahl in lymphatischen Organen wie Milz und Thymus, die deutliche Abnahme der Marginalzonen B Zellen sowie die beeinträchtigte Entwicklung der Peyer's Patches in SLY1^{-/-} und SLY1^{Δ/Δ} Mäusen weist auf einen Entwicklungsdefekt von Lymphozyten in diesen Mäusen hin (Abb. 3.19 und 3.20). Die ausschließliche Expression von SLY1 in Lymphozyten lässt hierbei auf einen intrinsischen Defekt schließen. In Knochenmarkschimären wurde dieser Befund untermauert. Eine Reduktion der Zellularität lymphatischer Organe fand unabhängig vom Genotyp des Empfängers lediglich in den Mäusen statt, die mit SLY1^{Δ/Δ}, und nicht mit SLY1^{+/+} hämatopoetischen Stammzellen rekonstituiert worden waren (Beer et al., 2005).

Eine denkbare Erklärung für eine Reduktion der Zellularität lymphatischer Organe ist eine Störung in der Migration der Lymphozyten. Bei fehlerhafter Migration der seltenen Vorläuferzellen vom Knochenmark in das jeweilige Zielorgan können die Zellularität lymphatischer Organe und die Entwicklung von Lymphozyten beeinträchtigt sein. Es ist beispielweise gezeigt worden, dass eine Störung in der Chemokin-vermittelten Migration von Lymphozyten zu einem Entwicklungsdefekt von Marginalzonen B Zellen in der Milz führen kann (Guinamard et al., 2000; Uehara et al., 2002). Die Expression der für eine Entwicklung essentiellen Chemokinrezeptoren ist jedoch vergleichbar gewesen mit der Kontrollgruppe in $SLY1^{\Delta\Delta}$ Marginalzonen B Zellen (Tanja Scheikl, München). Dies kann also nicht der Grund sein für die erwiesene Abnahme dieser Zellpopulation in $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta\Delta}$ Splenozyten.

Auch eine verminderte Adhäsion mit folgender eingeschränkter Einwanderung der Vorläuferzellen in lymphatische Zielorgane kann ursächlich für eine Verminderung der Zellularität sein. Die Fragestellung, ob $SLY1$ die Adhäsion von Lymphozyten beeinflusst, ist anhand der Antigenrezeptor-induzierten Adhäsion an Fibronectin, ICAM-1 und ICAM-2 von $SLY1^{\Delta\Delta}$ T Lymphozyten untersucht worden (Tanja Scheikl, München). Diese ist zu $SLY1^{+/+}$ T Zellen vergleichbar gewesen.

Darüber hinaus kann bereits eine fehlerhafte Bildung von Vorläuferzellen im Knochenmark verantwortlich sein für die beobachtete Reduktion der Zellzahl in Thymi aus $SLY1^{-/-}$ oder $SLY1^{\Delta\Delta}$ Mäusen. Die Analyse der Zellularität und der Zusammensetzung des Knochenmarks von $SLY1^{\Delta\Delta}$ Mäusen ergab zunächst keine Hinweise auf einen Defekt in diesem frühen Stadium der Hämatopoese, dabei erfolgte allerdings keine eingehende Untersuchung der seltenen hämatopoetischen Vorläuferzellen (Beer et al., 2005). Ob hier tatsächlich bereits ein Defekt vorliegt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der *in vitro* Differenzierung von unreifen Thymozyten mithilfe des OP9 Systems weisen jedoch unabhängig von eventuell vorhandenen frühen Ereignissen im Knochenmark und Defekten in der Adhäsion oder Migration auf eine verminderte Proliferation der DN Thymozyten als wesentliche Ursache der reduzierten Zellularität des Thymus hin, wie im Folgenden näher ausgeführt werden wird.

Die deutliche Abnahme der Zellularität der Thymi aus $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta\Delta}$ Mäusen (Abb. 3.19) und Hinweise auf eine signifikante Abnahme der positiv selektierten DP Thymozyten basierend auf der Analyse der CD69 Expression (nicht gezeigt) machten eine nähere Untersuchung der DN Subpopulationen notwendig. Die gezielte Deletion von Genen, die essentiell sind zur Generierung oder Weiterleitung eines präTZR Signals, führt in vielen Fällen zu einer Blockade im DN3 Stadium bei Beginn der β -Selektion und ist im allgemeinen

von einer starken Reduktion der Thymozytenzahl insgesamt begleitet (von Boehmer et al., 2003). Die Verteilung der DN Subpopulationen nach CD25- und CD44-Expression ist in $SLY1^{-/-}$ oder $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Thymi jedoch nur marginal verändert, auch wenn ein signifikanter Anstieg der DN3 Subpopulation um 5-7% gemessen werden konnte (Abb. 3.26). Dies reicht jedoch nicht aus, um eine Abnahme der Thymozytenzahl um ca. 50% erklären zu können. Es besteht also basierend auf diesen Befunden keine Möglichkeit, in Analogie zu anderen Ko Mäusen nähere funktionelle Rückschlüsse auf eine Beteiligung des SLY1 Proteins im präTZR Signalweg zu ziehen. In diesem Fall wäre eine deutlichere Akkumulation von unreifen Thymozyten im DN3 Stadium zu erwarten gewesen. Dennoch ergab eine nähere Untersuchung der Thymozyten Subpopulationen eine bemerkenswerte Reduktion der DP und SP Thymozyten in $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.25A). Beachtenswert ist die vergleichbare Anzahl der DN Thymozyten in $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Thymi zur Kontrollgruppe. Diese ist prozentual gesehen aufgrund der geringeren Anzahl der weiter fortgeschrittenen DP Thymozyten allerdings doppelt so hoch wie in $SLY1^{+/+}$ Mäusen (3.25B). Daraus ist eine partielle Blockade der Entwicklung von DN zu DP Thymozyten zu folgern. Diese betrifft demzufolge die DN Thymozyten insgesamt und manifestiert sich aufgrund ihres globalen Charakters nur geringfügig in der Akkumulation einer einzelnen DN Subpopulation.

Um der Ursache dieses Befunds näher auf den Grund zu gehen, wurde ein *in vitro* Thymozyten Differenzierungssystem unter Verwendung der Stromazelllinie OP9 eingesetzt. Diese Zelllinie erlaubt durch die Expression des Notch Liganden Delta-Like 1 eine Differenzierung von DN zu DP Thymozyten unter Zellkulturbedingungen (Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002). Die *in vivo* Situation nachahmend tritt abhängig von der Expression eines funktionellen präTZR eine starke Proliferation und Differenzierung ein. Dabei lassen sich aufgrund der definierten Zellkulturbedingungen detailliert Zellzyklus, Apoptose und intrazelluläre Signaltransduktion analysieren und zu Proliferation und Differenzierung in Beziehung setzen.

Mithilfe dieses *in vitro* Differenzierungssystems konnte eine eingeschränkte Proliferation von DN Vorläuferzellen (Abb. 3.27 und 3.28) sowie eine erhöhte Apoptoserate (Abb. 3.32) als Ursache der verminderten Zellularität im Thymus von $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Mäusen identifiziert werden. Die Fragestellung, ob neben der Expansion von Vorläuferzellen ebenso die Differenzierung zu DP Thymozyten defekt ist, kann noch nicht abschließend geklärt werden (Abb. 3.30 und 3.31). Hierzu wäre der Einsatz eines Zellsortierers zur weiteren

Aufreinigung von Zellpopulationen notwendig. Eine Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion ergab eine Beeinträchtigung der Notch- und/ oder präTZR-vermittelten Aktivierung des metabolischen mTOR Signalwegs in den Vorläuferzellen als mögliche Ursache der verminderten Expansionsrate (Abb. 3.34 - näheres dazu in Kapitel 4.5).

Erwähnenswert in dem Kontext von SLY1 und der Lymphozyten Entwicklung ist sicherlich das Maß der Expression von SLY1 Δ in heterozygoten SLY1^{+/ Δ} Mäusen. Ohne Selektionsdruck würde eine gleichwertige Expression des Wt Proteins und SLY1 Δ erwartet. Tatsächlich wird jedoch nur Wt Protein exprimiert (Beer et al., 2005). Analog ist auch die Expressionstärke in lymphatischen Organen heterozygoter SLY1^{+/ Δ} -Mäuse nicht reduziert im Vergleich zu Wt Mäusen. Dies wurde in allen untersuchten Organen, nämlich Thymus, Milz und Lymphknoten, beobachtet (Abb. 3.17 und nicht gezeigt). Eine dazu relevante Besonderheit des *sly1* Gens ist die Lage des Gens auf dem X-Chromosom. Im weiblichen Organismus wird stochastisch eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert und kondensiert als sogenannter Barr Körper (Chadwick und Willard, 2003). Dieser Befund lässt auf einen selektiven Nachteil von Lymphozyten heterozygoter Mäuse schließen, in denen das X-Chromosom inaktiviert wurde, auf dem das intakte Allel liegt. Denkbar ist die gleichwertige Expression beider Allele in einem frühen Vorläuferstadium vor Einsetzen der Selektion. Es ist nicht genau bekannt, ab welchem Entwicklungsstadium SLY1 exprimiert wird. Das Ausmaß der Expression in frühen Vorläuferzellen im Knochenmark ist nicht untersucht. In Thymozyten konnte bereits die Anwesenheit spezifischer Transkripte nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Eine Identifikation des Stadiums, ab dem diese Selektion stattfindet, ist somit zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Eine verlockende Strategie zur genauen Eingrenzung des Entwicklungsstadiums, ab dem ein Selektionsdruck gegen SLY1 Δ exprimierende Vorläuferzellen einsetzt, könnte ein Vergleich der Expression von SLY1 und SLY1 Δ in verschiedenen Vorläuferstadien heterozygoter SLY1^{+/ Δ} Mäuse sein.

Nicht in dieser Arbeit näher untersucht wurde eine Auswirkung der SLY1 Defizienz oder SLY1 Δ Expression auf die Entwicklung von B Zellen. Die prozentuale Verteilung in peripheren lymphatischen Organen war ähnlich wie bei T Zellen unverändert (Abb. 3.18). Da die Zellzahl der Lymphozyten insgesamt in beiden Mauslinien reduziert ist und eine Abnahme der Serum Immunglobuline in SLY1 ^{Δ/Δ} Mäusen beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass auch diese in ähnlicher Weise wie T Lymphozyten betroffen sind (Abb. 3.19). Ebenso ist aufgrund der vorliegenden Daten eine vergleichbare Abnahme der Serum Immunglobuline in SLY1^{-/-} Mäusen zu erwarten.

4.4 SLY1 in der Lymphozyten Aktivierung

Die molekulare Funktion des in dieser Arbeit untersuchten Proteins ist bislang völlig unbekannt, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass bisher keine Identifikation von zellulären Interaktionspartnern möglich war. Die Annahme einer potentiellen Beteiligung von SLY1 bei der Antigenrezeptor-vermittelten Lymphozyten Aktivierung wird durch eine Reihe an Befunden unterstützt.

Zunächst wurde in T Zellen eine spezifische Phosphorylierung an Serin27 nach Antigenrezeptor Stimulation nachgewiesen, die bei Gabe anderer Stimuli unterblieb (Astoul et al., 2003). Weiterhin zeigten SLY1^{-/-} und SLY1^{ΔΔ} Lymphozyten nach allogener Stimulation *in vitro* in einer MLR eine geringere proliferative Antwort (Abb. 3.21; (Beer et al., 2005).

Ergänzend dazu wurde eine reduzierte Transplantatabstoßung semi-allogener Herzen in SLY1^{ΔΔ} Mäusen in einer Kooperation mit Bernhard Holzmann, München, nachgewiesen (Beer et al., 2005). Die Transplantatabstoßung allogener Herzen war jedoch unbeeinträchtigt. Diese Befunde untermauern zum einen die physiologische Relevanz der verminderten Proliferation nach allogener Stimulation *in vitro*. Zum anderen lassen sich Rückschlüsse auf die Funktionalität von T Lymphozyten und NK Zellen in SLY1^{ΔΔ} Mäusen ziehen. Es ist gezeigt worden, dass bei einer semi-allogenen Transplantatabstoßung primär T Zellen die Abstoßungsreaktion induzieren, während bei einer allogenen Transplantatabstoßung zusätzlich NK Zellen aktiviert werden, die kostimulatorisch auf die T Zellen wirken (Maier et al., 2001; Rocha et al., 2003). Daraus ist zu folgern, dass die Funktion von NK Zellen in SLY1^{ΔΔ} Mäusen nicht oder weniger stark beeinträchtigt ist im Vergleich zu T Zellen, und dass kostimulatorische Signale von NK Zellen die physiologische Abstoßung in SLY1^{ΔΔ} Mäusen wiederherstellen können.

Natürlich ist von höchstem Interesse, diese Experimentalsituation unter Einbeziehung von SLY1^{-/-} Mäusen zu wiederholen, um die Auswirkungen einer kompletten SLY1 Defizienz in Bezug auf die Abstoßung von Fremdgewebe zu überprüfen. Im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Arbeit war dies jedoch nicht mehr möglich.

Im Gegensatz zur MLR ließ sich ein *in vitro* Proliferationsdefekt von SLY1^{-/-} oder SLY1^{ΔΔ} Lymphozyten bei Stimulation mit mitogenen Antikörpern gegen die CD3-Untereinheit des TZR oder gegen den BZR in dieser Arbeit nicht nachweisen (Abb. 3.22-3.24). Unter allen untersuchten Versuchsbedingungen war die Proliferation vergleichbar - diese umfasste unter anderem eine Titration der Konzentration eingesetzter Stimulantien, die Durchführung einer Kinetik und einen Wechsel von der Messung radioaktiver Isotope als Maß der Proliferation

auf die Messung der Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen mithilfe der CFSE Markierung (Abb. 3.22-3.24 und nicht gezeigt).

Eine solche Divergenz zwischen allogener Proliferation einerseits und durch direkte Antigenrezeptor Stimulation induzierte Proliferation andererseits bedarf einer nachvollziehbaren Erklärung. Unter den Bedingungen einer allogenen Stimulation findet eine Erkennung fremder MHC Moleküle auf der Oberfläche der bestrahlten APCs durch einzelne kreuzreaktive T Lymphozyten statt. Das hat anschließend eine klonale Expansion der auf diese Weise aktivierten T Zellen zur Folge. Es handelt sich hierbei also um einen weitgehend physiologischen Reiz. Deshalb äußert sich dies auch in einer relativ niedrigen Einbaurrate von radioaktivem [^3H]-Thymidin. Mitogene Antikörper hingegen erkennen invariable Komponenten der Antigenrezeptoren und führen zu einer vergleichsweise starken, polyklonalen Aktivierung der Lymphozyten.

Eine mögliche Interpretation dieser Daten ist folglich, dass bei einem starken Reiz ein Schwellenwert überschritten wird, der unabhängig von der physiologischen Rolle von SLY1 zu einer Aktivierung und Proliferation führt. Bei Vorliegen eines schwachen Signals dagegen erfüllt SLY1 eine nicht-redundante Funktion, die letztendlich zu vermehrter Proliferation führt. Die unterschiedliche Auswirkung eines Fehlens von SLY1 Protein bzw. einer partiellen Deletion von SLY1 auf die allogene und durch Antigenrezeptor-spezifische Antikörper vermittelte Proliferation von Lymphozyten lässt sich also miteinander in Einklang bringen, wenn eine feinregulatorische Rolle für SLY1 angenommen wird. Dadurch könnte ebenso das Fehlen eines Defekts in der anti-CD3 Antikörper-induzierten Aktivierung von Tyrosin- und Serin-/ Threonin-Kinasen sowie der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NF κ B in peripheren T Zellen erklärt werden (Abb. 3.2-3.4).

Zur näheren Untersuchung der Funktion von SLY1 in peripheren T Zellen ist es also nötig, in einen physiologischeren Kontext zu wechseln, um nicht auf mitogene Antikörper zur Stimulation angewiesen zu sein. Transgene TZR eignen sich hervorragend, um anhand einer Antigen-spezifischen Reaktion von T Zellen mit APCs die Rolle von SLY1 in der Aktivierbarkeit peripherer T Zellen zu verfolgen. Dazu ist zunächst eine Rückkreuzung der SLY1^{-/-} und SLY1 ^{Δ/Δ} -Mäuse auf einen TZR-transgenen Hintergrund vonnöten. Da dies im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar war, musste zur näheren Aufklärung der molekularen Funktion von SLY1 ein alternativer Ansatz gewählt werden.

Einen wichtigen Hinweis für die Wahl eines geeigneten Systems zur Identifikation einer solchen feinregulatorischen Funktion auf Proteinebene lieferte die deutliche Reduktion der

Zellularität lymphatischer Organe, insbesondere des Thymus, und die erfolgte Eingrenzung eines Entwicklungsdefekts auf den Übergang von DN zu DP Thymozyten (Kapitel 4.3).

4.5 Molekulare Funktion

Im Thymus von Mäusen mit einem Defekt in der TZR Signaltransduktion wird selektiv die Entwicklung von Thymozyten begünstigt, in denen durch Aktivierung interner kompensatorischer Mechanismen der vorliegende Defekt zumindest teilweise ausgeglichen werden konnte (persönliche Kommunikation mit Doreen Cantrell, Dundee, England).

Daraus ist zu folgern, dass periphere $SLY1^{-/-}$ oder $SLY1^{\Delta\Delta}$ T Zellen weniger als Untersuchungsobjekte geeignet sind im Vergleich zu unreifen Thymozyten, die noch keiner Selektion im Thymus unterworfen waren. Also war es nötig, ein Kultursystem zu verwenden, das die Differenzierung von DN Thymozyten *in vitro* nachahmt. Hierzu wurde die Stromazelllinie OP9 eingesetzt. Diese ermöglicht durch Expression des Notch Liganden Delta-Like 1 auf der Zelloberfläche die *in vitro* Differenzierung von DN Thymozyten in Abhängigkeit eines gebildeten funktionellen TZR (Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002).

Innerhalb dieses Versuchsansatzes wurde in Übereinstimmung mit der erniedrigten Zellularität *ex vivo* untersuchter Thymi eine Abnahme der Proliferation von $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta\Delta}$ Thymozyten ersichtlich (Abb. 3.27 und 3.28). Als mögliche Ursache hierfür konnte eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Thymozyten der Kontrollgruppe identifiziert werden. Auf molekularer Ebene konnte eine erniedrigte Frequenz Phospho-S6 positiver Thymozyten OP9 kultivierter $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta\Delta}$ Thymozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.34). Daraus erschließt sich für SLY1 eine Rolle in der Kopplung von präTZR- und/ oder Notch Signalen an die S6-Kinase. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist eine Phosphorylierung von ribosomalem Protein S6 abhängig von einem gleichzeitig vorhandenen präTZR- und einem Notch Signal. Nur bei Vorliegen beider Signale kommt es zu einer Proliferation und Differenzierung der DN Thymozyten (Abb. 4.1).

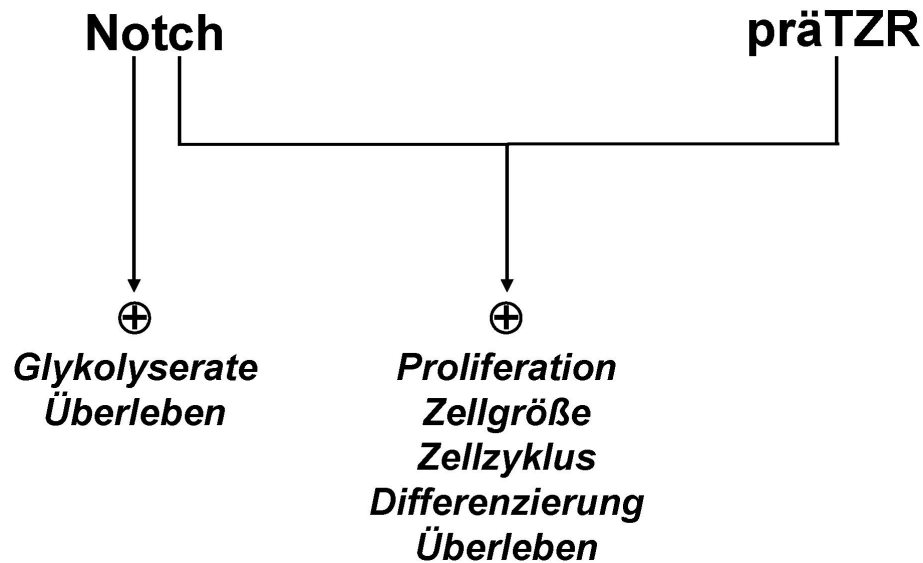


Abb. 4.1: Notch- und präTZR Signale in DN Thymozyten

Diese Abbildung fasst die Ergebnisse jüngerer Publikationen zusammen, die sich mit der Untersuchung des jeweiligen Einflusses eines Notch- und eines präTZR Signals auseinandergesetzt haben (nach Ciofani et al., 2004; Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005; Dose et al., 2006; Hinton et al., 2006; Kelly et al., 2007).

Um allerdings weiter differenzieren zu können, ob SLY1 nun an der Übermittlung von Notch- oder präTZR Signalen oder sogar an der erfolgreichen Integration beider Signale beteiligt ist, bedarf es zusätzlicher Versuche. Eine mögliche Strategie wäre, den Einfluss von SLY1 auf die Notch-vermittelte Glykolyse- und Überlebensrate zu untersuchen, da gezeigt worden ist, dass dieser Signalweg unabhängig von einem präTZR Signal durch Notch induziert wird (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005). Dazu ist jedoch zunächst eine Rückkreuzung der SLY1 defizienten und SLY1^{ΔΔ} Mäuse auf einen RAG-negativen Hintergrund notwendig, um so störende Auswirkungen durch die Anwesenheit eines präTZR ausschließen zu können. Diese experimentelle Vorgehensweise würde erlauben, SLY1 eine eindeutige Funktion entweder als Teil des Notch Signalwegs zuzuweisen oder eine Rolle in der präTZR-vermittelten Signalweiterleitung bzw. der Integration beider Signalwege postulieren zu können.

Der molekulare Mechanismus, wie die Integration eines Signals ausgehend von dem präTZR und dem als Transkriptionsfaktor in den Kern wandernden Notch-IC Fragment vonstatten geht, ist nicht bekannt. Als nachfolgendes Schlüsselereignis gilt jedoch die Aktivierung des mTOR Komplexes, der besonders gut anhand des Insulin- und Wachstumsfaktorsignalwegs aufgeklärt ist (Abb. 4.2).

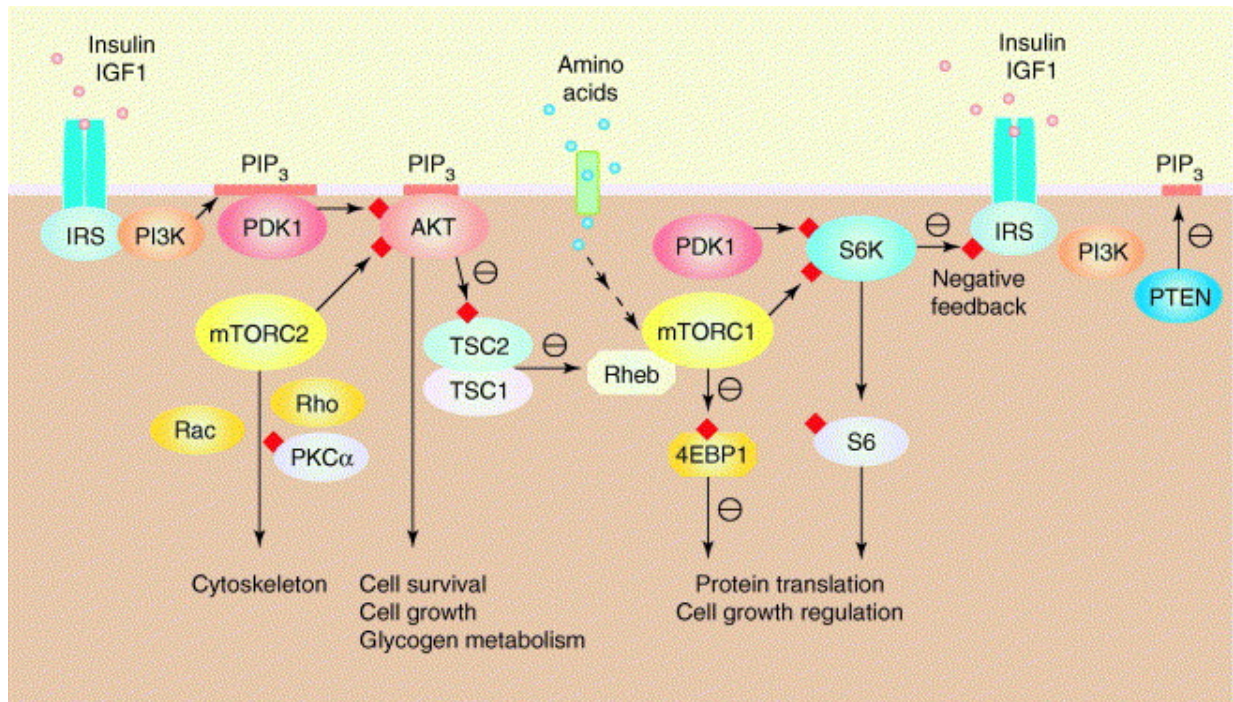


Abb. 4.2: Signal Netzwerk von TORC1 und TORC2

Dargestellt ist der mTOR Signalweg nach Aktivierung des Insulinrezeptors oder eines Wachstumsfaktorrezeptors. Der Rapamycin-abhängige mTOR Komplex mTORC1 phosphoryliert die S6-Kinase und 4EBP1 und reguliert dadurch Translation und Zellwachstum. Rheb stimuliert die mTORC1 Aktivität und wird selbst durch den TSC1/TSC2 Komplex inhibiert. Akt inaktiviert TSC2 und wird selbst durch PI3-Kinase über PDK1 aktiviert. PTEN reguliert die PIP₃-abhängige Aktivierung von PDK1 negativ. S6-Kinase sorgt für eine negative Signalk Rückkopplung durch Phosphorylierung von IRS-1. Der Rapamycin-unabhängige Proteinkomplex mTORC2 kann direkt Akt positiv beeinflussen und ebenso die Organisation des Zytoskeletts modulieren. Es ist unbekannt, wie mTORC2 aktiviert wird und wie sich mTORC1 und mTORC2 gegenseitig beeinflussen (nach Inoki und Guan, 2006).

Dass dieser Signalweg bei der Thymozyten Aktivierung ebenso eine wichtige Rolle spielt, ist anhand der essentiellen Bedeutung der Kinasen Akt und PDK-1 für die Thymozyten Entwicklung bestätigt worden (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005; Hinton et al., 2006; Kelly et al., 2007; Mao et al., 2007). In diesem Signalweg kommt der Kinase PDK-1 eine duale Rolle zu. Ein Schlüsselereignis ist zunächst die PDK-1-vermittelte Aktivierung der Kinase Akt, die den Rapamycin-sensitiven mTOR Komplex mTORC1 aktiviert. Dieser Proteinkomplex wiederum phosphoryliert die S6-Kinase, die dadurch wiederum zugänglich für eine Aktivierung durch PDK-1 wird.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung der S6-Kinase beeinträchtigt ist in SLY1^{-/-} und SLY1^{ΔΔ} Mäusen. Aufgrund der Komplexität des Signalwegs, die durch die Anwesenheit verschiedener negativer Rückkopplungsmechanismen zusätzlich gesteigert wird, und des nur geringfügigen Effekts einer SLY1 Defizienz auf die Frequenz Phospho-S6-positiver Thymozyten, bedarf es weiterer Versuche, um eine näher spezifizierte Einordnung in den Signalweg zu ermöglichen.

Kürzlich ist eine von der Aktivierung der S6-Kinase entkoppelte Funktion von Akt in der Entwicklung DN Thymozyten gezeigt worden (Kelly et al., 2007). In jener Arbeit wurde eine von der Anwesenheit eines gleichzeitigen Signals von Notch und des präTZR abhängige Induktion der Nährstoffrezeptoren CD71 und CD98 beschrieben. Es wurde nachgewiesen, dass die Expression beider Rezeptoren durch die Akt-vermittelte positive Regulation des Rapamycin-sensitiven mTOR Proteinkomplexes mTORC1 gesteuert wird. Interessant ist in diesem Fall, dass deren Induktion nicht von der zuvor beschriebenen dualen Rolle von PDK-1 abhängig ist (Kapitel 1.3.3). Zwar ist hier eine Aktivierung von Akt weiterhin durch PDK-1 notwendig, PDK-1 wird jedoch nicht erneut zusammen mit aktivem mTORC1 Komplex benötigt, um eine Induktion der CD71- und CD98-Expression zu erreichen.

Eine Klärung der Fragestellung nach der Auswirkung einer SLY1 Defizienz auf die CD71- und CD98-Expression sollte also Aufschluss darüber geben können, ob der Rapamycin-abhängige mTOR Komplex durch eine funktionelle SLY1 Inaktivierung generell betroffen ist. Ein diesbezüglich positiver Befund würde eine Positionierung des SLY1 Proteins in den oberhalb des mTOR Komplexes liegenden Signalweg (Abb. 4.2) erlauben.

Die in dieser Arbeit anhand der Untersuchung der Phosphorylierung von ribosomalem Protein S6 nachgewiesene Reduktion der Aktivierung der S6-Kinase wirft die Frage nach der Auswirkung auf weitere bekannte Substrate der S6-Kinase auf (Abb. 4.3). Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Substrate Bad und Skar, da durch ersteres die Apoptoserate und durch letzteres die Zellgröße mit beeinflusst werden soll (Ruvinsky und Meyuhas, 2006; Strasser, 2005). Demzufolge könnte sich eine Charakterisierung des Phosphorylierungsstatus dieser Proteine als wertvoll für eine funktionelle Erklärung der erhöhten Apoptoserate und erniedrigten Zellgröße von SLY1^{-/-} und SLY1^{Δ/Δ} Thymozyten erweisen.

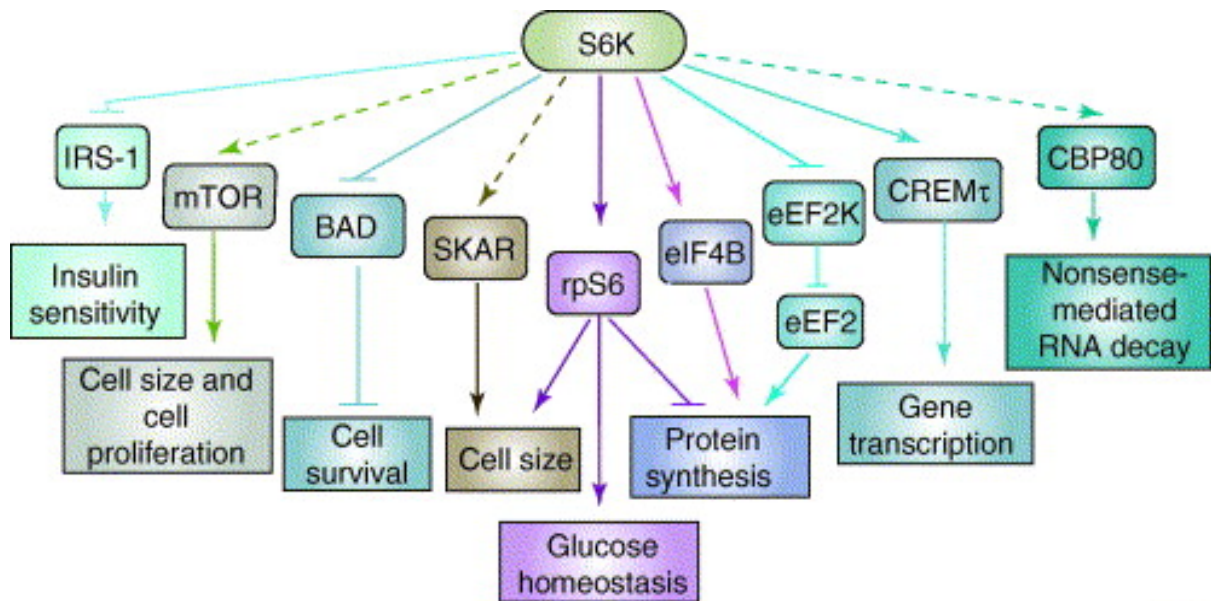


Abb. 4.3: Bekannte Substrate der S6-Kinase

Einfluss der S6-Kinase auf verschiedene bekannte Substrate. Pfeile mit durchgehender Linie: Aktivierung der Substrate rpS6, eIF4B und CREM τ . Linien mit horizontaler Endmarkierung: Hemmung der Aktivität der Substrate IRS-1, Bad und eEF2K. Gestrichelte Linien: Effekt der Phosphorylierung ist unbekannt: mTOR, Skar und CBP80 (nach Ruvinsky und Meyuhas, 2006).

4.6 Phänotypvergleich der SLY1 $\Delta\Delta$ und SLY1 $^{-/-}$ Mauslinien

Der Vergleich des Phänotyps der SLY1 $\Delta\Delta$ mit der SLY1 $^{-/-}$ Mauslinie führt nach bisher vorliegenden Daten zu der Schlussfolgerung, dass die Deletion in SLY1 Δ funktionell einer kompletten Defizienz des Proteins entspricht. Dies ist zunächst verwunderlich, da in SLY1 Δ weder die SH3 noch die SAM Domäne deletiert sind (Abb. 3.1). Demzufolge wäre eine durch diese beiden Domänen vermittelte Bindung von SLY1 an dessen Interaktionspartner weiterhin gegeben. Daraus ergäbe sich allerdings die Möglichkeit einer negativen Interferenz mit der Funktion der gebundenen Proteine oder Proteinkomplexe aufgrund der Deletion innerhalb des SLY1 Proteins. Ein solcher dominant negativer Effekt bleibt jedoch offensichtlich aus, da sich der Phänotyp beider Mäuse nicht unterscheidet. Eine Erklärung hierfür könnte die veränderte subzelluläre Lokalisation von SLY1 Δ sein. Angenommen, eine Bindung von SLY1 Δ an seine physiologischen Interaktionspartner ist nicht mehr möglich aufgrund der ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation oder einer veränderten Lokalisation im Zytoplasma, dann entspräche die Deletion in SLY1 Δ tatsächlich funktionell einer kompletten Inaktivierung. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass eventuelle zusätzliche Beeinträchtigungen durch eine SLY1 Δ Bindung an Proteine oder Proteinkomplexe durch redundante Proteine wie SLY2 kompensiert werden können.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse sind an einem Punkt nicht deckungsgleich mit bereits publizierten Daten. Dies betrifft die *in vitro* Proliferationsergebnisse von $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Splenozyten nach Stimulation mit mitogenen Antikörpern gegen BZR- und TZR-Epitope (Abb. 3.22-3.24). In zeitlich vor Beginn dieser Arbeit durchgeführten analogen Versuchen wurde eine Reduktion der Proliferation von $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Splenozyten im Vergleich zur Wt Kontrolle beobachtet (Beer et al., 2005). Zu einem späteren Zeitpunkt konnten diese Daten jedoch nicht erneut beobachtet werden, als der Phänotyp der später generierten $SLY1^{\Delta/\Delta}$ defizienten Mauslinie hierzu in Beziehung gesetzt werden sollte. Eine mögliche Erklärung für diese zeitlich differierenden Ergebnisse kann der erfolgte Tierstallwechsel der $SLY1^{\Delta/\Delta}$ Mauslinie sein. Obwohl in beiden Tierställen eine Aufzucht nach spezifisch pathogenfreien Bedingungen erfolgte, kann dennoch eine unterschiedliche Beeinflussung des Immunsystems der Versuchsobjekte durch die Besiedlung unterschiedlicher dort jeweils ansässiger Mikroorganismen oder einen generell variierenden Hygienestatus nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer vielfach unterschätzter Punkt ist die bei der Herstellung einer Ko Mauslinie und der anschließenden Rückkreuzung auftretende Koselektion flankierender Gene des rekombinierten Lokus (Ridgway et al., 2007). Dies ist ein inherenter Nachteil der Verwendung von ES Zelllinien, die sich genetisch von der Mauslinie unterscheiden, in die der erfolgreich rekombinierte Lokus zur späteren phänotypischen Analyse eingekreuzt werden soll.

In dieser Arbeit wurden die Nachkommen der ursprünglich von 129/ Ola abstammenden ES Zelllinie in den genetisch und immunologisch besser charakterisierten C57BL/6 Stamm eingekreuzt. Dies erfolgt durch wiederholte Rückkreuzung der Nachkommen mit C57BL/6-Mäusen über mindestens 12 Generationen. Technisch gesehen ist dieser Umstand schwer vermeidbar, da keine robusten ES Zelllinien aus C57BL/6-Hintergrund zur Verfügung stehen. Die Menge der so gekoppelt übertragenen DNS galt zunächst generell als vernachlässigbar. Bei einer repräsentativen Untersuchung der flankierenden Region des CD38 Lokus, der über 10 Generationen zurückgekreuzt wurde, stellte man jedoch fest, dass mindestens 20 Centimorgan von ES Zell-abgeleiteter DNS mit dem inaktivierten CD38 Allel assoziiert geblieben war (Flint et al., 2005). Dies ergibt bei einer Entsprechung von zwei Megabasen DNS pro Centimorgan unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Genfrequenz in Mäusen ca. 400 ES Zell-abgeleitete Genvarianten, die über 10 Generationen mit dem inaktivierten CD38 Allel erhalten geblieben sind.

Die Tatsache, dass einzelne Genvarianten innerhalb der flankierenden DNS entscheidenden Einfluss auf den untersuchten Phänotyp haben können, hat sich bereits in mehrfach beschriebener Weise gezeigt (Wolfer et al., 2002b). Es ist also zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht auszuschließen, dass in $SLY1^{\Delta\Delta}$ Zellen der beschriebene *in vitro* Proliferationsdefekt durch die Anwesenheit einer flankierenden unbekannten Genvariante aus 129/Ola ausgelöst wurde, die im Laufe der weiteren Rückkreuzung der $SLY1^{\Delta\Delta}$ Mauslinie ausgekreuzt wurde. Da homologe Rekombinationen stochastisch zufällig erfolgen, kann das besagte unbekannte Allel in $SLY1^{-/-}$ Mäusen zu einem vergleichsweise früheren Zeitpunkt in der Generationenfolge ausgekreuzt worden sein. In unmittelbarer Nachbarschaft des *sly1* Gens auf dem X-Chromosom befinden sich ergänzend dazu tatsächlich Gene, die für immunologisch relevante Proteine kodieren. Hierzu gehören CD40L, das bei dem Hyper-IgM-Syndrom defekt sein kann, oder SH2D1A, das bei X-chromosomaler Lymphoproliferativer Erkrankung betroffen ist.

4.7 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Funktion des $SLY1$ Proteins in Lymphozyten geliefert. Es konnten substantielle Informationen über die Regulation der subzellulären Lokalisation und die relativen Auswirkungen einer partiellen und einer kompletten Deletion auf die Signaltransduktion *in vitro* und Lymphozyten Entwicklung *in vivo* gewonnen werden. Ob durch die $SLY1$ Inaktivierung neben der Proliferations- und Apoptoserate auch die Differenzierung beeinträchtigt ist, wird durch Verwendung weiter aufgereinigter Vorläufersubpopulationen mithilfe eines Zellsortierers zu klären sein. Darüber hinaus wurden erste Erkenntnisse der Auswirkung einer $SLY1$ Defizienz auf die Aktivierung peripherer Lymphozyten generiert.

Die Untersuchung betroffener Signalwege in sich entwickelnden Thymozyten ergab eine Beeinträchtigung der Aktivierung der S6-Kinase und weist damit auf eine Rolle des $SLY1$ Proteins in der Kopplung von präTZR- und/ oder Notch Signalen mit dem mTOR Proteinkomplex hin. Zur näheren Differenzierung einer Beeinträchtigung des TZR- oder Notch Signalwegs wird eine Einkreuzung der $SLY1^{-/-}$ und $SLY1^{\Delta\Delta}$ Mauslinien in einen TZR defizienten Mausstamm nötig sein.

Eine Charakterisierung des Einflusses einer $SLY1$ Defizienz bzw. Überexpression auf weitere Komponenten des mTOR Signalwegs wird folgen. Ebenso wird dabei die präzise Rolle der einzelnen in $SLY1$ enthaltenen Domänen und insbesondere der Zusammenhang mit der

Regulation der subzellulären Lokalisation aufzuklären sein. Wesentlich für ein tieferes Erfassen der molekularen Funktion wird die Identifizierung molekularer Interaktionspartner sein. Das wird entweder durch direkte massenspektrometrische Sequenzierung kopräzipitierter Proteine oder durch einen immunbiologischen Nachweis einer Interaktion von SLY1 mit Interaktionskandidaten mittels spezifischer Antikörper zu vollziehen sein.

Eine detaillierte Charakterisierung der Antigenrezeptor-vermittelten Aktivierung insbesondere von T Lymphozyten wird mittels Einkreuzung der hier beschriebenen Mauslinien in TZR transgene Mäuse nötig sein, um in dem physiologischen Kontext einer Antigen-spezifischen APC-T-Zell-Interaktion arbeiten zu können. Nicht zuletzt wird eine umfassende Untersuchung der Auswirkung einer SLY1 Defizienz auf die Immunität gegenüber verschiedene Pathogenklassen *in vivo* wesentlich zu einem tieferen Verständnis der Rolle dieses Mitglieds dieser neuartigen und bisher kaum charakterisierten Proteinfamilie bei der Ausbildung der adaptiven Immunität beitragen.

Nicht vergessen werden sollte darüber hinaus die Tatsache, dass die zu SLY1 hoch homologen Proteine Samsn1/ SLY2 und Sash1 die Aufklärung der molekularen und zellulären Funktionen von SLY1 beeinträchtigen können. Ob diese teilweise kompensatorisch in SLY1^{-/-} und SLY1^{Δ/Δ} Mäusen wirken, ist anhand der Analyse des Phänotyps einer zu generierenden doppel- oder dreifach-defizienten Mauslinie aufzuklären.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des putativen Adapterproteins SLY1 in der Entwicklung und Aktivierung von Lymphozyten untersucht. SLY1 ist ein Mitglied einer neuartigen und bisher kaum untersuchten Proteinfamilie, die durch eine SH3 und SAM Domäne sowie eine nukleäre Lokalisationssequenz charakterisiert ist. SLY1 ist spezifisch in Lymphozyten exprimiert und wurde bereits mit einer Rolle in der Antigenrezeptor-vermittelten Aktivierung von T Lymphozyten in Verbindung gebracht. Die zellulären und molekularen Funktionen von SLY1 waren jedoch weitgehend unbekannt.

Zum Verständnis der physiologischen Rolle des SLY1 Proteins wurde eine SLY1 defiziente Mauslinie mithilfe einer Inaktivierung durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen generiert (SLY1^{-/-}). Ergänzend dazu fand eine eingehende Untersuchung des Phänotyps und der T Zell Aktivierung einer bereits vor Beginn dieser Arbeit existierenden Mauslinie statt, die ein trunkiertes SLY1 Protein exprimiert (SLY1Δ). Die Analyse beider Mauslinien läßt auf eine nicht-redundante Rolle von SLY1 bei der Lymphozyten Entwicklung und bei der Aktivierung von peripheren T Zellen durch allogene Stimulation *in vitro* und *in vivo* schließen. Aus dem vergleichbaren Phänotyp der untersuchten Mauslinien konnte ferner eine essentielle Rolle der in SLY1Δ deletierten Region nahe des N-Terminus, die eine Phosphorylierungsstelle und eine nukleäre Lokalisationssequenz beinhaltet, abgeleitet werden.

In den folgenden Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von SLY1 wurde eine Regulation der nukleo-zytoplasmatischen Verteilung von SLY1 und eine gestörte subzelluläre Lokalisation von SLY1Δ im Zytoplasma nachgewiesen. Auf molekularer Ebene konnte die Translokation von intaktem SLY1 Protein in das Zytoplasma auf eine Phosphorylierung an Serin27 zurückgeführt werden. Eine detaillierte Sequenzanalyse lieferte anschließend die Basis für den Nachweis einer durch die Phosphorylierung induzierten Bindung von 14-3-3 Proteinen an SLY1. Eine Bindung führt anschließend durch Maskierung der nukleären Lokalisationssequenz von SLY1 zu einer Retention des Proteins im Zytoplasma.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit die Abnahme der Zellularität des Thymus in SLY1^{-/-} und SLY1^{ΔΔ} Mäusen funktionell aufgeklärt. Eine reduzierte Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate in SLY1^{-/-} und SLY1^{ΔΔ} Thymozyten konnte als Ursache für den beobachteten T Zell Entwicklungsdefekt identifiziert werden. Auf molekularer Ebene wurde im Folgenden in der Abwesenheit von funktionalem SLY1 Protein eine Beeinträchtigung der Zellwachstum

und Zelldifferenzierung regulierenden S6-Kinase erkannt. Daraus folgernd kann auf eine Rolle von SLY1 bei der Kopplung des präT Zell Rezeptor- oder Notch Signalwegs an den mTOR Proteinkomplex geschlossen werden. Somit tragen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wesentlich zu einem tieferen Verständnis der bisher nicht charakterisierten Funktionen von SLY1 bei der Differenzierung von Zellen des adaptiven Immunsystems sowie bei der Ausbildung adaptiver Immunantworten bei.

6 Literaturverzeichnis

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* (1999): 770-776.

Astoul, E., Laurence, A. D., Totty, N., Beer, S., Alexander, D. R., and Cantrell, D. A. "Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways." *J.Biol.Chem.* (2003): 9267-9275.

Aviv, T., Lin, Z., Lau, S., Rendl, L. M., Sicheri, F., and Smibert, C. A. "The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators." *Nat.Struct.Biol.* (2003): 614-621.

Beer, S., Scheikl, T., Reis, B., Huser, N., Pfeffer, K., and Holzmann, B. "Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice." *Mol.Cell Biol.* (2005): 9646-9660.

Beer, S., Simins, A. B., Schuster, A., and Holzmann, B. "Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells." *Biochim.Biophys.Acta* (2001): 89-93.

Bellavia, D., Campese, A. F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M. P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M., Gaetano, C., Ruco, L., Hoffman, E. S., Hayday, A. C., Lendahl, U., Frati, L., Gulino, A., and Screpanti, I. "Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice." *EMBO J.* (2000): 3337-3348.

Benz, C. and Bleul, C. C. "A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision." *J.Exp.Med.* (2005): 21-31.

Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H. T., and Zuniga-Pflucker, J. C. "Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from." *Immunity.* (2007): 678-689.

Birnboim, H. C. and Doly, J. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res.* (1979): 1513-1523.

Boehm, T. and Bleul, C. C. "Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment." *Trends Immunol.* (2006): 477-484.

Cave, J. W., Loh, F., Surpris, J. W., Xia, L., and Caudy, M. A. "A DNA transcription code for cell-specific gene activation by notch signaling." *Curr.Biol.* (2005): 94-104.

Chadwick, B. P. and Willard, H. F. "Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome." *Hum.Mol.Genet.* (2003): 2167-2178.

Ciofani, M., Knowles, G. C., Wiest, D. L., von Boehmer, H., and Zuniga-Pflucker, J. C. "Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation." *Immunity*. (2006): 105-116.

Ciofani, M., Schmitt, T. M., Ciofani, A., Michie, A. M., Cuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J. L., and Zuniga-Pflucker, J. C. "Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation." *J.Immunol.* (2004): 5230-5239.

Ciofani, M. and Zuniga-Pflucker, J. C. "Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism." *Nat.Immunol.* (2005): 881-888.

Ciofani, M. and Zuniga-Pflucker, J. C. "The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis." *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* (2006):

Claudio, J. O., Zhu, Y. X., Benn, S. J., Shukla, A. H., McGlade, C. J., Falcioni, N., and Stewart, A. K. "HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells." *Oncogene* (2001): 5373-5377.

Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1972): 2110-2114.

Collins, B. J., Deak, M., Arthur, J. S., Armit, L. J., and Alessi, D. R. "In vivo role of the PIF-binding docking site of PDK1 defined by knock-in mutation." *EMBO J.* (2003): 4202-4211.

Deftos, M. L. and Bevan, M. J. "Notch signaling in T cell development." *Curr.Opin.Immunol.* (2000): 166-172.

Donskoy, E. and Goldschneider, I. "Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice." *J.Immunol.* (1992): 1604-1612.

Dose, M., Khan, I., Guo, Z., Kovalovsky, D., Krueger, A., von Boehmer, H., Khazaie, K., and Gounari, F. "c-Myc mediates pre-TCR-induced proliferation but not developmental progression." *Blood* (2006): 2669-2677.

Dougherty, M. K. and Morrison, D. K. "Unlocking the code of 14-3-3." *J.Cell Sci.* (2004): 1875-1884.

Ehebauer, M., Hayward, P., and Martinez-Arias, A. "Notch signaling pathway." *Sci.STKE.* (2006): cm7-

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal.Biochem.* (1983): 6-13.

Felli, M. P., Maroder, M., Mitsiadis, T. A., Campese, A. F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R. S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A., and Screpanti, I. "Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development." *Int.Immunol.* (1999): 1017-1025.

Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A., and Schreiber, S. L. "Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions." *Science* (1994): 1241-1247.

-
- Flint, J., Valdar, W., Shifman, S., and Mott, R. "Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents." *Nat.Rev.Genet.* (2005): 271-286.
- Flotow, H. and Thomas, G. "Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver." *J.Biol.Chem.* (1992): 3074-3078.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. "A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression." *J.Immunol.* (1993): 4244-4252.
- Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., and Ravetch, J. V. "Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response." *Nat.Immunol.* (2000): 31-36.
- Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J. R., and Tsujimoto, Y. "Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality." *Development* (1999): 3415-3424.
- Hanahan, D. "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J.Mol.Biol.* (1983): 557-580.
- Hayday, A. C. and Pennington, D. J. "Key factors in the organized chaos of early T cell development." *Nat.Immunol.* (2007): 137-144.
- He, Y., Hicke, L., and Radhakrishnan, I. "Structural Basis for Ubiquitin Recognition by SH3 Domains." *J.Mol.Biol.* (2007): 190-196.
- Hentsch, B., Mouzaki, A., Pfeuffer, I., Rungger, D., and Serfling, E. "The weak, fine-tuned binding of ubiquitous transcription factors to the Il-2 enhancer contributes to its T cell-restricted activity." *Nucleic Acids Res.* (1992): 2657-2665.
- Hinton, H. J., Alessi, D. R., and Cantrell, D. A. "The serine kinase phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) regulates T cell development." *Nat.Immunol.* (2004): 539-545.
- Hinton, H. J., Clarke, R. G., and Cantrell, D. A. "Antigen receptor regulation of phosphoinositide-dependent kinase 1 pathways during thymocyte development." *FEBS Lett.* (2006): 5845-5850.
- Inoki, K. and Guan, K. L. "Complexity of the TOR signaling network." *Trends Cell Biol.* (2006): 206-212.
- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. "Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th Edition." (2005):
- Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G., and Gridley, T. "Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice." *Genes Dev.* (1998): 1046-1057.
- Johnson, P. E. and Donaldson, L. W. "RNA recognition by the Vts1p SAM domain." *Nat.Struct.Mol.Biol.* (2006): 177-178.

-
- Kelly, A. P., Finlay, D. K., Hinton, H. J., Clarke, R. G., Fiorini, E., Radtke, F., and Cantrell, D. A. "Notch-induced T cell development requires phosphoinositide-dependent kinase 1." *EMBO J.* (2007): 3441-3450.
- Klages, N., Zufferey, R., and Trono, D. "A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors." *Mol. Ther.* (2000): 170-176.
- Kopan, R., Nye, J. S., and Weintraub, H. "The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD." *Development* (1994): 2385-2396.
- Kuhn, R., Rajewsky, K., and Muller, W. "Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice." *Science* (1991): 707-710.
- Li, L., Milner, L. A., Deng, Y., Iwata, M., Banta, A., Graf, L., Marcovina, S., Friedman, C., Trask, B. J., Hood, L., and Torok-Storb, B. "The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1." *Immunity.* (1998): 43-55.
- Lin, Y. W., Nichols, R. A., Letterio, J. J., and Aplan, P. D. "Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T leukemia/lymphoma." *Blood* (2006): 2540-2543.
- MacKintosh, C. "Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes." *Biochem.J.* (2004): 329-342.
- Maier, S., Tertilt, C., Chambron, N., Gerauer, K., Huser, N., Heidecke, C. D., and Pfeffer, K. "Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice." *Nat. Med.* (2001): 557-562.
- Mao, C., Tili, E. G., Dose, M., Haks, M. C., Bear, S. E., Maroulakou, I., Horie, K., Gaitanaris, G. A., Fidanza, V., Ludwig, T., Wiest, D. L., Gounari, F., and Tsichlis, P. N. "Unequal contribution of Akt isoforms in the double-negative to double-positive thymocyte transition." *J. Immunol.* (2007): 5443-5453.
- Matthews, S. A., Liu, P., Spitaler, M., Olson, E. N., McKinsey, T. A., Cantrell, D. A., and Scharenberg, A. M. "Essential role for protein kinase D family kinases in the regulation of class II histone deacetylases in B lymphocytes." *Mol. Cell Biol.* (2006): 1569-1577.
- Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D., and Martin, D. I. "Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (1996): 13014-13019.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (1986): 263-273.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., and Verma, I. M. "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (1996): 11382-11388.
- Osborne, B. and Miele, L. "Notch and the immune system." *Immunity.* (1999): 653-663.

Osborne, B. A. and Minter, L. M. "Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation." *Nat.Rev.Immunol.* (2007): 64-75.

Parra, M., Kasler, H., McKinsey, T. A., Olson, E. N., and Verdin, E. "Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation." *J.Biol.Chem.* (2005): 13762-13770.

Pawson, T. and Scott, J. D. "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." *Science* (1997): 2075-2080.

Peterson, E. J., Clements, J. L., Fang, N., and Koretzky, G. A. "Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling." *Curr.Opin.Immunol.* (1998): 337-344.

Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., and Pear, W. S. "Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination." *Immunity.* (1999): 299-308.

Qiao, F. and Bowie, J. U. "The many faces of SAM." *Sci.STKE.* (2005):

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1." *Immunity.* (1999): 547-558.

Ridgway, W. M., Healy, B., Smink, L. J., Rainbow, D., and Wicker, L. S. "New tools for defining the 'genetic background' of inbred mouse strains." *Nat.Immunol.* (2007): 669-673.

Rimkus, C., Martini, M., Friederichs, J., Rosenberg, R., Doll, D., Siewert, J. R., Holzmann, B., and Janssen, K. P. "Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer." *Br.J.Cancer* (2006): 1419-1423.

Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., and Salmon, P. "An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages." *Cell* (1996): 483-492.

Rocha, P. N., Plumb, T. J., Crowley, S. D., and Coffman, T. M. "Effector mechanisms in transplant rejection." *Immunol.Rev.* (2003): 51-64.

Ruvinsky, I. and Meyuhas, O. "Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size." *Trends Biochem.Sci.* (2006): 342-348.

Sambandam, A., Maillard, I., Zediak, V. P., Xu, L., Gerstein, R. M., Aster, J. C., Pear, W. S., and Bhandoola, A. "Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors." *Nat.Immunol.* (2005): 663-670.

Schmitt, T. M. and Zuniga-Pflucker, J. C. "Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro." *Immunity.* (2002): 749-756.

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. "Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells." *Nucleic Acids Res.* (1989): 6419-

Simeoni, L., Kliche, S., Lindquist, J., and Schraven, B. "Adaptors and linkers in T and B cells." *Curr.Opin.Immunol.* (2004): 304-313.

Simeoni, L., Smida, M., Posevitz, V., Schraven, B., and Lindquist, J. A. "Right time, right place: the organization of membrane proximal signaling." *Semin.Immunol.* (2005): 35-49.

Southern, E. M. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J.Mol.Biol.* (1975): 503-517.

Strasser, A. "The role of BH3-only proteins in the immune system." *Nat.Rev.Immunol.* (2005): 189-200.

Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G., and Gridley, T. "Notch1 is essential for postimplantation development in mice." *Genes Dev.* (1994): 707-719.

Tanigaki, K. and Honjo, T. "Regulation of lymphocyte development by Notch signaling." *Nat.Immunol.* (2007): 451-456.

Thanos, C. D., Goodwill, K. E., and Bowie, J. U. "Oligomeric structure of the human EphB2 receptor SAM domain." *Science* (1999): 833-836.

Tzivion, G. and Avruch, J. "14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation." *J.Biol.Chem.* (2002): 3061-3064.

Uchida, T., Nakao, A., Nakano, N., Kuramasu, A., Saito, H., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. "Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2001): 137-141.

Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J. M., and Love, P. E. "A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration." *J.Immunol.* (2002): 2811-2819.

von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F., and Klein, L. "Thymic selection revisited: how essential is it?" *Immunol.Rev.* (2003): 62-78.

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., and Aster, J. C. "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." *Science* (2004): 269-271.

Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D. R., Lee, P. P., Wilson, C. B., Held, W., MacDonald, H. R., and Radtke, F. "Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development." *Nat.Immunol.* (2001): 235-241.

Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H. R., and Radtke, F. "Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes." *Immunity.* (2002a): 869-879.

Wolfer, D. P., Crusio, W. E., and Lipp, H. P. "Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes." *Trends Neurosci.* (2002b): 336-340.

Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G., and Gridley, T. "Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1." *Hum.Mol.Genet.* (1999): 723-730.

Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T., and Nakayama, T. "CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection." *Int.Immunol.* (1993): 1139-1150.

Yoshida, K., Yamaguchi, T., Natsume, T., Kufe, D., and Miki, Y. "JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage." *Nat.Cell Biol.* (2005): 278-285.

Zeller, C., Hinzmann, B., Seitz, S., Prokoph, H., Burkhard-Goettges, E., Fischer, J., Jandrig, B., Schwarz, L. E., Rosenthal, A., and Scherneck, S. "SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer." *Oncogene* (2003): 2972-2983.

Zhu, Y. X., Benn, S., Li, Z. H., Wei, E., Masih-Khan, E., Trieu, Y., Bali, M., McGlade, C. J., Claudio, J. O., and Stewart, A. K. "The SH3-SAM adaptor HAC1 is up-regulated in B cell activation signaling cascades." *J.Exp.Med.* (2004): 737-747.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." *J.Virol.* (1998): 9873-9880.

7 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Mein besonderer Dank gilt Dr. Sandra Beer für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche Betreuung und vertrauensvolle Zusammenarbeit, die ein höchst eigenständiges wissenschaftliches Arbeiten ermöglichte.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Pfeffer bedanken für seine Unterstützung und die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf diese Arbeit anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff möchte ich danken für die kurzfristige Übernahme der Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Bei Nicole Krafzik möchte ich mich bedanken für die Betreuung meiner Mausstämme und die Durchführung der ES Zellinjektionen.

Mein Dank gilt ebenso Karin Buchholz für die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Prof. Dr. Doreen Cantrell danke ich für ihre anregenden experimentellen Ideen und für ihre Hilfe und Gastfreundschaft, um dies auch in die Tat umsetzen zu können. Dr. David Finlay danke ich ebenso für seinen essentiellen Beitrag dazu.

Allen Kollegen aus den Arbeitsgruppen Beer, Pfeffer und Scheu möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken. Besonders möchte ich mich hier bei Max von Holleben bedanken für seine Freundschaft und Hilfsbereitschaft, ohne die mir diese Arbeit weitaus schwerer gefallen wäre.

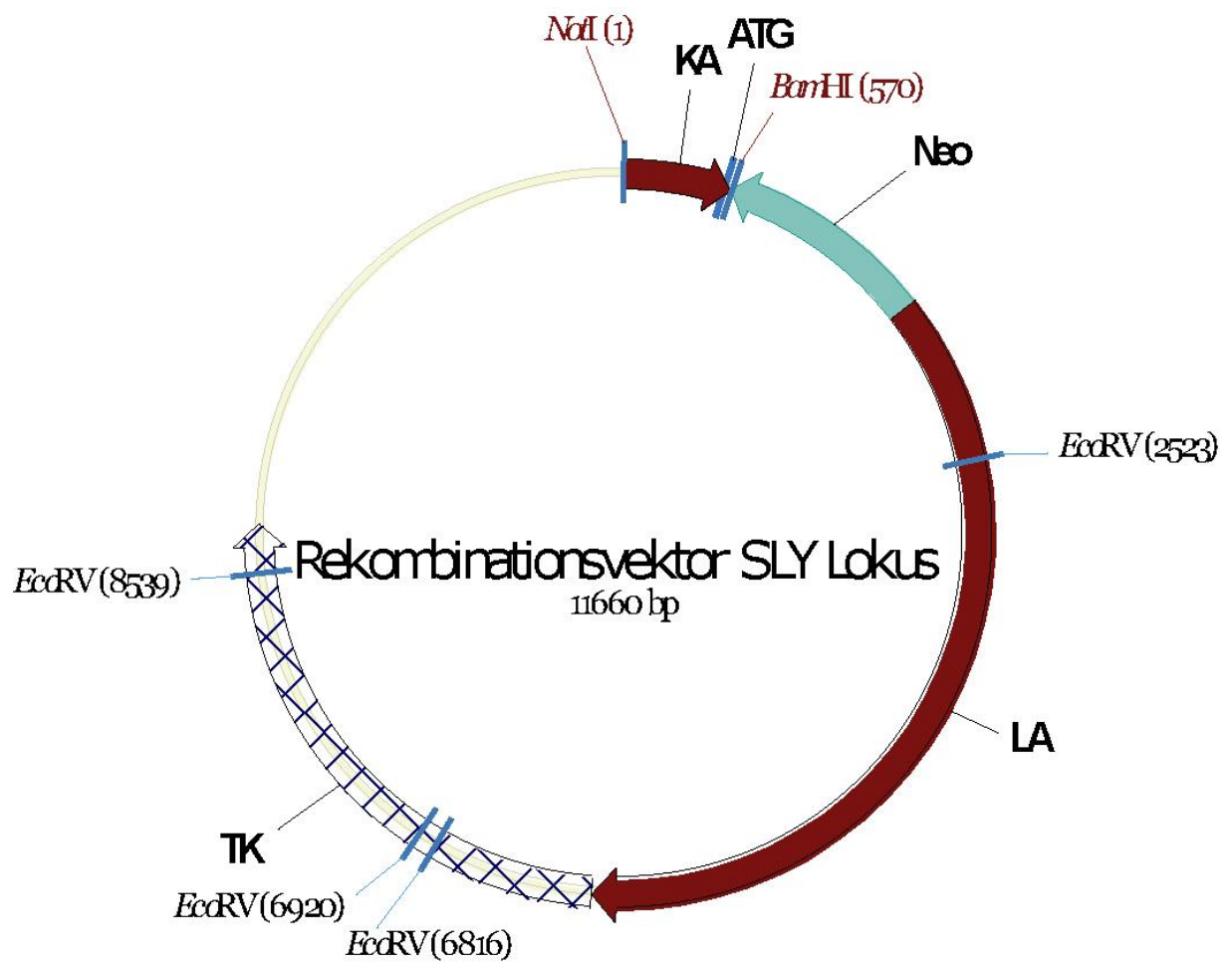
Ich danke Dr. Melanie Werner für die Betreuung meiner Diplomarbeit und ihre exzellente Einführung in wissenschaftliches Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Imke Meyer für ihre seelische Unterstützung und ihr Durchhaltevermögen bei allen Höhen und Tiefen während dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die neben genereller moralischer Unterstützung auch einen wichtigen finanziellen Beitrag leistete, der es mir erleichtert hat, diesen Weg zu wählen.

8 Anhang

8.1 Karte des SLY1 Rekombinationsvektors



8.2 DNS Sequenz des SLY1 Rekombinationsvektors

```

1  ggccgcgatg atggccacag gagtgacagt aatggtaatc gtgatcgag taatgacttg
61  gaagatgcaa atagactggg ggcatttact caacaggcag ggagattgtt caccttctga
121 tttcagaggt ttagtcagtg agtgtaaagc ccaaataagc cagaacatga aaggactgta
181 gtggatgacc ggagacaaca ggattggggc ttttctctga ctgttcaact caaggtctgt
241 ctgcatcaga atctctggag actgaagctg ggacttcctt cctccctaga ggccggcagg
301 ggccatgatt gctgtaagag caggtcacgt ggcaaggttt cctgtatgct gctgctgctg
361 ggtgtccatg gcccgcaccc ccaagctgcc actgcagcag taaagagtag cagccccagg
421 ctcagtctat gctgtgccaa ctggctgggt ctggggaggc ttaacaaga gatttttgca
481 tcttagctcc ttggagaaca gagcaggagt gccatttctg tagaggacca tgttgctcgc
541 caaacctcc aacgccagtg acctcgacgg atcccctcag aagaactcgt caagaaggcg
601 atagaaggcg atgcgctgcg aatcgggagc ggcgataccg taaagcacga ggaagcggtc
661 agcccattcg ccgccaagct cttcagcaat atcacgggta gccaacgcta tgtcctgata
721 gcggtccgcc acacccagcc ggccacagtc gatgaatcca gaaaagcggc cattttccac
781 catgatattc ggcaagcagg catcgccatg ggtcacgacg agatcctcgc cgtcgggcat
841 gcgcgccttg agcctggcga acagttcggc tggcgcgagc ccctgatgct cttcgtccag
901 atcatcctga tcgacaagac cggcttccat ccgagtacgt gctcgtcga tgcgatgttt
961 cgcttggtgg tcgaatgggc aggtagccgg atcaagcgta tgcagccgcc gcattgcac
1021 agccatgatg gatactttct cggcaggagc aaggtgagat gacaggagat cctgccccgg
1081 cacttcgccc aatagcagcc agtcccttcc cgcttcagtg acaacgtcga gcacagctgc
1141 gcaaggaacg ccgctcgtgg ccagccacga tagccgcgct gcctcgtcct gcagttcatt
1201 cagggcaccg gacaggtcgg tcttgacaaa aagaaccggg cgcccctgcg ctgacagccg
1261 gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt ctggttggcc cagtcatagc cgaatagcct
1321 ctccacccaa gcggccggag aacctgcgtg caatccatct tgttcaatgg ccgatcccat
1381 attggctgca ggtcgcctcg gtgttcgagg ccacacgcgt caccttaata tgcgaagtgg
1441 acctgggacc gcgccgcccc gactgcatct gcgtgttcga attcgccaat gacaagacgc
1501 tgggcggggt ttgctcgaca ttgggtggaa acattccagg cctgggtgga gaggtttttt
1561 gcttcctctt gcaaaaccac actgctcgac attgggtgga aacattccag gctgggtggg
1621 agaggtcttt tgcttctctt tgcaaaacca cactgctcga ctgacaaaga gccactcagc
1681 aagtaaaaaa taaggcgcat cttgagcgt acactccttc ctctctcct ctacactctc
1741 tacciaaggcc ttcattggact cttagagggt ggaagttgaa ccaaggctct atgttgagct
1801 tggacgtgag ggttcttcca gaaagcaagg ggatggggct caacgctcac ttgagtagta
1861 aaagtactga aggtactttc taaactctgg aatacagagc tatgagttgg gcctttggaa
1921 gtctagagtg atagactgaa gaacataaga gttaaatacca cagacatcag ttggagagtt
1981 acaaaatgtc gtgttcaaat tgaatccaaa gagcgtaatt aattttgtct ctctagctcg
2041 ggttctgtgt tgcttttgct cgagtgtgtc ctctggggac tacctcattc aaagggcctt
2101 actagcctac ccagccaagg ttgtcacaga ctccctaact ctttggcagg agccatagcc
2161 atttccact aggtcagat ctacaacatc tccccaggc cactggagat gaagcagtaa
2221 gttaaatttca gactcaggaa aagagccac ccaaatgccg taaagttcag gtggtggtgg
2281 tgggtgtgtg gtgtgtgtgg ggggggttga acaggttctt tctgggcaag tgaacttatg
2341 aagaatgaga aatggagctg atgacttgca tggtagtagg gtgtgagagc taagggggaa
2401 aagttcgttg ggggagggaa ggggatttca aagtccagga aggaaggtag ctgtcaaaaa
2461 tggtgaaatg gttcatcttc ctgagacagg agctagactg aatgattctt gaagactctg
2521 atatccaggt ttccctggct gtatgtatag agttcatttt atgtcaggac tctcccaggc
2581 aatcagcctg tccagtctgc atgtctaagt ggaccacagg aatggtccaa agcaggcctg
2641 actagatcca agcaccacaag ccttaatcag gggcctccag gactctcact gtgcctatc
2701 catttttcca tggaattcaa ctcaggtgca ctgtgggggg atgccccctt gtcagaacag
2761 tccccaggca gtgggcgaca actaagagac aggtgagag cattgggggtg tgcattcctgt
2821 cccacctctc aggatctggg ttggtgcccgc tttcggtgtg actctctcca cttcagctgc
2881 ttctgtaaga tcgcagtggc gggtaggtgg agaagggtaa gatttgtgaa tattcacaca
2941 gggccttgct accccacccc cccacccccg ccaaaactag gcccacaaag cttgtcattg
3001 gctgccactc ctcaagagca aagccacttc cccttgcctc caagctcatg agaaaaacag
3061 agactgctat atagaccctg gtaggcccca aaccacagca gaatcaagct ggaagaaaaa
3121 gtctgagaaa gagctgacac cagagtccgc agctacctca ggtagagggtg cccaaggcc
3181 tacagaataa gaaaccctt tctctctctc tggctccagt tactcagatc ctgcatctgg
3241 gaatccctcc aggtttcctc tagaaaagtc tgtggtccac atcctttagt ccacacaaac
3301 tgcacctcac ccctgccagg gcctctggca gcctccagga ggccagatga gtttgccttt
3361 acatattcaa gcccataact ataaaaatgc ccttaacaca accaaacctc cagaagatgt
3421 ggcacgtgcc caaggccag agacagtagc cagcttcac tttgattgcc agatgactga

```

3481	agtcaagtct	cttccctttg	gaaactgagg	tgatgtgata	gaaggggaata	tacagggaca
3541	aaggaagctc	ctccctcctg	ttcctgcctc	ttttcctcct	tcagccaatg	aaaatgtact
3601	ggagagaggg	caagaaaagt	gagttagaat	gctcccattc	tgccatagga	gcctggacag
3661	tacttcccc	gggcctcagt	ttcttcacct	ctgaaagaaa	aggtgatctc	tggaggtagg
3721	gctcactgga	ataatagctg	tgagagcacc	ctctccggtg	tgtgcttctg	cctacaagg
3781	ggtgctagct	ttggcatgag	cccagatgga	gcagacacac	agcaaagaat	aaaccaaggt
3841	cccagtcttg	aagtacagaa	agcagggcct	aacggtatgg	agagccacac	tgagggaagg
3901	cttgtcagcg	gccacgtgct	acactctgta	cctcagtcac	ggtttagctt	gcggagtttt
3961	cactgcaacc	tcagagtaga	gacaggtata	tactgatttc	acactggaca	ctccgactgg
4021	ggacatttgc	tggagctatc	acagagagtg	tgttgcagcg	ttccaagcca	gggtgcttaa
4081	tttcagaatc	ttctctcctt	ctctctgcat	acccttgtcc	cataactgat	ctcagaagca
4141	ctaagagaga	gtaacaagcc	caagattcag	ccctccagta	gaagaactct	gcaaggaaca
4201	ccaagaaagt	tgtggactga	gagatgagag	aagccaacag	aacagaggag	ggagtaggcc
4261	tttgctacag	taggttcaga	acatggaccg	gtcctactgt	ggttcataag	gatgcaggat
4321	gctctagagt	gggagggatt	ctcccttagc	tgctctgtgg	acacttgcac	catcttcaag
4381	tcccaactac	tttccttttg	ctcttacttc	catcaaaca	ccatgtccag	gtctaagaag
4441	tggagagggg	tttgggtctag	atttgtcttc	cctaaagaga	gcccttttcc	agtgagtctc
4501	tattttctag	cctcccgcca	gggcaaagtc	aaagaaccca	ggctcatggt	caagtgtcac
4561	attgttggtt	cctttcgggt	tctttcttat	ctctttccca	ataataacac	attgtccccc
4621	atgggtgtgt	gtgtgggggt	ctcatgtcac	aggtctagag	taacacccca	ccaacacatg
4681	ctctgtagtt	acactatagg	ttagcatcct	tattatgaaa	atatgaaatg	ctccaaactc
4741	tgaaggatct	tgaaaatcaa	catgatgcc	caagtagaaa	atttcacacc	tgacctccca
4801	tgaagggtca	cagtcaaaac	agacacacta	taagtgtctc	ataaaattac	cttcaagcta
4861	tgtatataag	gactatatga	aacatatacg	aaattcatgt	ttagatggca	cattacaaa
4921	atagctcatt	atatatatat	atatatgcat	gcaaataatt	gattttgttt	aaatctgaag
4981	gtctaacaat	gtagctcact	tagtaggatg	cttatctagt	attcatagag	ctctgagttc
5041	catacccgag	acaacataaa	ctgagtatag	cagccataga	cttghtaacta	atatgaatat
5101	tagtcaattt	ctgctacata	gcaaattaga	ggtcaacctg	gattgcttaa	ggcactgtct
5161	caaaaagcaa	aatctgaaat	gtggaagact	tttgattcta	cacattatag	gtaaataata
5221	ttcaactcat	gactgtccat	tattcacaag	agaatgccta	catcccttgg	cgtggctagc
5281	aaggaccttc	catgactgtt	tctgcttggc	ctcccagaag	agccatgggc	agatcctcta
5341	ttacatcacc	tcagactacc	cctagctctc	gctcattcaa	atgcttecta	gctccaagt
5401	gagggactat	cccctctcct	gcctggggcc	attccagtgt	tcttctctca	cagttgtccc
5461	tgctgttct	cctagaggct	ccaggcaaac	agtgcctgta	gtcagcgcta	taccagttt
5521	ctttctatct	tgtcttggga	ccaactgtga	gatggcaca	gcatgcta	cagtgccct
5581	tccagggttc	ccagacctgg	gtttaggagt	gccctgctct	tgtgtcacca	ctaccagcca
5641	tgggactctg	cctagaacac	ttaatttctc	tgcatctcca	tttctccac	ggagctggg
5701	ggatataata	tggagttgat	gatgctggaa	tagggtgcca	tcacatgtga	agaacttggc
5761	acactattgg	gcatatggct	agtagttaac	ctttctatga	tggtttccca	tacacacaga
5821	ggctaaggca	tggactaatg	aagtaactga	gagggcaatt	caggggatat	gtaggaaagg
5881	tgtgccacct	tgcgcactgg	ggaagccatg	aggggcatc	agagaggatc	tctgtaggga
5941	tgctgccttt	gaaaatggag	taggggtacc	ctcgaggga	tctaccgggt	aggggagggc
6001	cttttcccaa	ggcagtctgg	agcatgcgct	ttagcagccc	cgctgggcac	ttggcgctac
6061	acaagtggcc	tctggcctcg	cacacattcc	acatccaccg	gtaggcgcca	accggctccg
6121	ttctttgggtg	gccccctcgc	gccaccttct	actcctcccc	tagtcaggaa	gttccccccc
6181	gccccgcagc	tcgcgtcgtg	caggacgtga	caaagtgga	tagcacgtct	cactagtctc
6241	gtgcagatgg	acagcaccgc	tgagcaatgg	aagcgggtag	gcctttgggg	cagcggccaa
6301	tagcagcttt	gctccttcgc	tttctgggct	cagaggctgg	gaaggggtgg	gtccgggggc
6361	gggtcaggg	gcgggctcag	gggcggggcg	ggcgcccgaa	ggtcctccgg	aggcccggca
6421	ttctgcacgc	ttcaaaaagc	cacgtctgcc	gcgctgttct	cctcttctct	atctccgggc
6481	ctttcgacct	gcagcgaccc	gcttaacagc	gtcaacagcg	tgccgcagat	cttgggtggc
6541	tgaactccc	gcacctcttc	ggcaagcgcc	ttgtagaagc	gcgtatggct	tcgtaccct
6601	gccatcaaca	cgcgtctcgc	ttcgaccagg	ctgcgcgttc	tcgcggccat	agcaaccgac
6661	gtacggcggt	gcgcccctgc	cggcagcaag	aagccacgga	agtcgcctcg	gagcagaaaa
6721	tgcccacgct	actgcgggtt	tatatagacg	gtcctcacgg	gatggggaaa	accaccacca
6781	ygcaactgct	ggtggccctg	ggttcgcgcg	acgatatcgt	ctacgtacct	gagccgatga
6841	cttactggca	ggtgctgggg	gcttccgaga	caatcgcgaa	catctacacc	acacaacacc
6901	gsctcgacca	gggtgagata	tcggccgggg	acgcggcggt	ggtaatgaca	agcgcaccaga
6961	taacaatggg	catgccttat	gccgtgaccg	acgcggttct	ggctcctcat	atcggggggg
7021	aggctgggag	ctcacatgcc	ccgcccccg	ccctcaccct	catcttcgac	cgccatccca
7081	tcgcccgcct	cctgtgctac	ccggccgcgc	gataccttat	gggcagcatg	acccccagg
7141	ccgtgctggc	gttcgtggcc	ctcatcccg	cgaccttgcc	cggcacaac	atcgtgttgg

7201	gggcccttcc	ggaggacaga	cacatcgacc	gcctggccaa	acgccagcgc	cccggcgagc
7261	ggcttgacct	ggctatgctg	gccgcgattc	gccgcgttta	cgggctgctt	gcccatacgc
7321	gtgcggtatc	tgcagggcgg	cgggtcgtgg	cgggaggatt	ggggacagct	ttcggggacg
7381	gccgtgccgc	cccaggstgc	cgagccccag	agcaacgcgg	gcccacgacc	ccatatcggg
7441	gacacgttat	ttaccctggt	tcggggcccc	gagttgctgg	cccccaacgg	cgacctgtac
7501	aacgtgtttg	cctgggcctt	ggacgtcttg	gccaaacgcc	tcctgtcccat	gcacgtcttt
7561	atcctggatt	acgaccaatc	gccccgcggc	tgccgggacg	ccctgctgca	acttacctcc
7621	gggatgggtc	agaccacagt	caccaccccc	ggctccatac	cgacgatctg	cgacctggcg
7681	cgcacgtttg	cccgggagat	gggggaggct	aactgaaaca	cggaaggaga	caataccgga
7741	aggaacccgc	gctatgacgg	caataaaaaag	acagaataaaa	acgcacgggt	gttgggtcgt
7801	ttgttcataa	acgcgggggt	cggtcccagg	gctggcactc	tgctgatacc	ccaccgagac
7861	cccatggggg	ccaatacgcg	cgcttttctt	ccttttcccc	acccccaccc	ccaagttcgg
7921	gtgaaggccc	agggtcgcga	gccaacgtcg	gggcggaag	ccctgccata	gccacggggc
7981	ccgtgggtta	gggacggggg	cccccatggg	gaatggttta	tggttcgtgg	gggttattat
8041	tttgggcgtt	gcgtgggggt	aggtccacga	ctggactgag	cagacagacc	catggttttt
8101	ggatggcctg	ggcatggacc	gcatgtactg	gcgcgacacg	aacaccgggc	gtctgtggct
8161	gccaaacacc	cccgaacccc	aaaaaccacc	gcgcggattt	ctggcgccgc	cggacgaact
8221	aaacctgact	acggcatctc	tgccccctt	tcgctggtac	gaggagcgct	tttgttttgt
8281	attggtcacc	acggccgagt	ttccgcggga	cccgggccag	gacctgcaga	aattgtgat
8341	ctattaacaa	ataaagatgt	ccactaaaat	ggaagttttt	cctgtcatac	tttgttaaga
8401	agggtgagaa	cagagtacct	acatttttgaa	tggaaaggatt	ggagctacgg	gggtgggggt
8461	ggggtgggat	tagataaatg	cctgctcttt	actgaaggct	ctttactatt	gctttatgat
8521	aatgtttcat	agttggatat	cataatttaa	acaagcaaaa	ccaaattaag	ggccagctca
8581	ttcctcccac	tcgatgacta	tagatctata	gatctctcgt	gggatcattg	tttttctctt
8641	gattcccact	ttgtggttct	aagtactgtg	gtttccaaat	gtgtcagttt	catagcctga
8701	agaacgagat	cagcagcctc	tggtccacat	acacttcatt	ctcagtattg	ttttgccaag
8761	ttctaattcc	atcagaagcg	gtcgagggtg	cccagctttt	gttcccttta	gtgagggtta
8821	atttcgagct	tggcgtaatc	atggtcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc
8881	acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaagtgtg	aagcctgggg	tgcctaatag
8941	gtgagctaac	tcacattaat	tgctttgcgc	tcactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg
9001	tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggccaa	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg
9061	cgctcttccg	cttcctcgct	cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcgggt	gcggcgagcg
9121	gtatcagctc	actcaaaagg	ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga
9181	aagaacatgt	gagcaaaaag	ccagcaaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcggttgctg
9241	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag
9301	aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc
9361	gtgcgctctc	ctgtttccgac	cctgccgctt	accggatacc	tgctccgctt	tctcccttgc
9421	ggaagcggtg	cgcttttctc	tagctcacgc	tgtagggtatc	tcagttcggg	gtaggtcggt
9481	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaaccc	cccgttcagc	ccgaccgctg	cgccttatcc
9541	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccgcgta	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc
9601	actggtaaca	ggattagcag	agcgagggtat	gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg
9661	tggcctaact	acggctacac	tagaaggaca	gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca
9721	gttaccttgc	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc
9781	gggtggtttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat
9841	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	cagtggaaacg	aaaactcacg	ttaagggatt
9901	ttggtcatga	gattatcaaa	aaggatcttc	acctagatcc	ttttaaatga	aaaatgaagt
9961	tttaaatcaa	tctaaagtat	atatgagtaa	acttgggtctg	acagttacca	atgcttaatc
10021	agtgaggcac	ctatctcagc	gatctgtcta	tttcgttcat	ccatagttgc	ctgactcccc
10081	gtcgtgtaga	taactacgat	acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtcg	tgcaatgata
10141	ccgcgagacc	cacgctcacc	ggctccagat	ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg
10201	gccgagcgca	gaagtgggtc	tgcaacttta	tccgcctcca	tccagtctat	taattgttgc
10261	cgggaagcta	gagtaagtag	ttcgccagtt	aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct
10321	acaggcatcg	tggtgtcacg	ctcgtcggtt	ggtagggctt	cattcagctc	cggttcccaa
10381	cgatcaaggc	gagttacatg	atccccatg	ttgtgcacaaa	aagcggttag	ctccttcggt
10441	cctccgatcg	ttgtcagaag	taagttggcc	gcagtgttat	cactcatggt	tatggcagca
10501	ctgcataaatt	ctcttactgt	catgccatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	tggtagtac
10561	tcaaccaagt	cattctgaga	atagtgtatg	cggcgaccga	gttgctcttg	cccggcgctc
10621	atacgggata	ataccgcgcc	acatagcaga	actttaaaaag	tgctcatcat	tggaaaacgt
10681	tcttcggggc	gaaaactctc	aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaaccc
10741	actcgtgcac	ccaactgatc	ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca
10801	aaaacaggaa	ggcaaaaatgc	cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata
10861	ctcactactct	tcctttttca	atattattga	agcatttatc	agggttattg	tctcatgagc

10921	ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc
10981	cgaaaagtgc	cacctaaatt	gtaagcgtta	atattttgtt	aaaattcgcg	ttaaattttt
11041	gttaaatcag	ctcatttttt	aaccaatagg	ccgaaatcgg	caaatccct	tataaatcaa
11101	aagaatagac	cgagataggg	ttgagtgttg	ttccagtttg	gaacaagagt	ccactattaa
11161	agaacgtgga	ctccaacgtc	aaagggcgaa	aaaccgtcta	tcagggcgat	ggcccactac
11221	gtgaaccatc	accctaataca	agtttttttg	ggtcgaggtg	ccgtaaagca	ctaaatcgga
11281	accctaaagg	gagccccga	tttagagctt	gacggggaaa	gccggcgaac	gtggcgagaa
11341	aggaagggaa	gaaagcgaaa	ggagcgggcg	ctagggcgct	ggcaagtgtg	gcggtcacgc
11401	tgcgcgtaac	caccacaccc	gccgcgctta	atgcgccgct	acagggcgcg	tcccattcgc
11461	cattcaggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	gatcgggtgcg	ggcctcttcg	ctattacgcc
11521	agctggcgaa	agggggatgt	gctgcaaggc	gattaagttg	ggtaacgcca	gggttttccc
11581	agtcacgacg	ttgtaaaacg	acggccagtg	aattgtaata	cgactcacta	tagggcgaat
11641	tggagctcca	ccgcggtggc				