Aus dem Institut für
Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Konstitutive Protein-Protein-Interaktionen regulieren die Aktivität
der Bruton-Tyrosin-Kinase in B-Zellen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Wiebke Schulze
aus
Lüneburg

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. Tomas Pieler
Promotor:	Prof. Dr. med. Martin Oppermann
Datum der mündlichen Prüfung:	23.05.2017

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Engels N, König LM, **Schulze W**, Radtke D, Vanshylla K, Lutz J, Winkler TH, Nitschke L, Wienands J (2014):

The immunoglobulin tail tyrosine motif upgrades memory-type BCRs by incorporating a Grb2-Btk signalling module. Nature communications [5:5456](#), 1-11

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "**Konstitutive Protein-Protein-Interaktionen regulieren die Aktivität der Bruton-Tyrosin-Kinase in B-Zellen**" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die B-Zelle und ihre Entwicklung.....	1
1.3 Der B-Zell-Antigen-Rezeptor	3
1.3.1 Aufbau des B-Zell-Antigen-Rezeptors	3
1.3.2 Die B-Zell-Antigen-Rezeptor-Signalleitung.....	4
1.4 Effektor- und Adapterproteine der BZR-Signalkaskade.....	7
1.4.1 Die Bruton-Tyrosin-Kinase und ihre Rolle in der BZR-Signalkaskade	7
1.4.1.1 X-gekoppelte Agammaglobulinämie.....	9
1.4.2 Das Adapterprotein <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>	10
1.4.3 Die Src-Homologie 3-Domänen von Btk und Grb2	12
1.4.4 Phospholipase C $\gamma 2$ und ihre Rolle im BZR- Ca^{2+} -Signalweg.....	13
1.5 Vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe	14
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Software, Datenbanken und Internetadressen	17
2.1.3 Materialien.....	18
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.5 Kits	20
2.1.6 Enzyme und Enzympuffer	20
2.1.7 Puffer, Lösungen und Medien.....	21
2.1.8 Antikörper	23
2.1.9 Oligonukleotide.....	24
2.1.10 Vektoren und Konstrukte	26
2.1.11 Peptide.....	27
2.1.12 Zelllinien und Bakterienstämme	27

2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1.1 Gewinnung von genomischer DNA aus DG75-Zellen.....	29
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	30
2.2.1.3 Gezielte Mutagenese mittels Mutagenese-PCR.....	30
2.2.1.4 Thymin-Adenin (TA)-Klonierung.....	31
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.1.6 DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel.....	32
2.2.1.7 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.2.1.8 Hitzeschock-Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.2.1.9 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.2.1.10 Herstellung der Plasmid-DNA.....	34
2.2.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
2.2.1.12 Sequenzierung von DNA.....	34
2.2.1.13 Restriktionsenzymspaltung.....	34
2.2.1.14 Ligation.....	35
2.2.2 Biochemische Methoden.....	36
2.2.2.1 Stimulation von B-Zellen über deren BZR.....	36
2.2.2.2 Herstellung von Zelllysaten.....	36
2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-PAGE).....	37
2.2.2.4 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen.....	37
2.2.2.5 Western Blot.....	38
2.2.2.6 Immunfärbung von Western Blots.....	38
2.2.2.7 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	39
2.2.2.8 GST-Fusionsprotein-Chromatographie.....	40
2.2.2.9 Affinitätschromatographie mittels biotinylierter Peptide.....	41
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	42
2.2.3.1 Kulturbedingungen für nicht-adhärente Zelllinien.....	42
2.2.3.2 Kulturbedingungen für adhärente Zelllinien.....	42
2.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	42
2.2.3.4 Transfektion mittels Amaxa® <i>Nucleofector</i> ® Technologie.....	43
2.2.3.5 Transfektion mittels Elektroporation.....	43
2.2.3.6 Retrovirale Transduktion.....	44
2.2.3.7 Durchflusszytometrie.....	45
2.2.3.8 Analyse der BZR-abhängigen Mobilisierung von Ca ²⁺ -Ionen.....	46
2.2.3.9 Herstellung eines Btk-defizienten DG75-Zellklons.....	47
2.2.3.10 Inhibition von Btk mittels Ibrutinib.....	48

2.2.4	Massenspektrometrische Methoden.....	49
2.2.4.1	Massenspektrometrische Analyse von Proteingemischen	49
2.2.4.2	<i>Stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC)</i>	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Grb2 interagiert mit Btk im BZR-Signalweg	53
3.1.1	Grb2 bindet über seine N-terminale SH3-Domäne an ein Polyprolin-Motiv von Btk	53
3.2	Herstellung eines humanen Zellmodells zur Untersuchung von Btk.....	57
3.2.1	Herstellung von Btk-defizienten DG75-Zellen.....	57
3.2.2	Entfernung der Puromycin-Resistenz-Kassette aus der DNA des Btk-defizienten Zellklons mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems.....	59
3.2.3	Das verminderte Ca^{2+} -Signal der DG75 Btk ^{-/-} -Zellen ist durch Rekonstitution mit Citrine-Btk reversibel.....	60
3.3	Die Rolle der Prolin-reichen Region und Src-Homologie 3-Domäne von Btk im BZR-Signalweg.....	62
3.3.1	Das N-terminale Btk-Polyprolin-Motiv ist essenziell für die Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation	62
3.3.2	Der ITT-abhängige Signalweg benötigt Btk für ein gesteigertes BZR- Ca^{2+} -Signal.....	64
3.3.3	Interaktionen über die SH3-Domäne von Btk sind essenziell für die Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation	67
3.3.4	Identifizierung von Interaktionspartnern der Btk-SH3-Domäne.....	68
3.4	Massenspektrometrische Analysen von Btk und PLCy2	70
3.4.1	Expression von Strep-Btk und Strep-PLCy2.....	70
3.4.2	Zusammenfassung der massenspektrometrisch detektierten Phosphorylierungsstellen in Btk und PLCy2.....	72
3.4.3	Zusammenfassung der Interaktomanalysen von Btk und PLCy2	77
4	Diskussion	79
4.1	Btk - ein Hauptakteur im BZR-Ca^{2+}-Signalweg	80
4.2	Das Polyprolin-Motiv ist entscheidend für die Funktionalität von Btk	81
4.3	Mechanismus und Funktion der Interaktion von Btk und Grb2.....	83
4.4	Die ITT-abhängige Signalverstärkung von mlgG-BZRs ist abhängig von Btk.....	84
4.5	Die Btk-SH3-Domäne ist essenziell für die BZR-induzierte Ca^{2+}-Mobilisierung.....	85
4.6	Massenspektrometrische Identifizierung neuer Phosphorylierungsstellen in Btk und PLCy2	87
4.6.1	BZR-induzierte Phosphorylierungsstellen in humanem Btk.....	87

4.6.2	BZR-induzierte Phosphorylierungsstellen in PLCy2.....	88
4.6.3	Interaktionspartner von Btk und PLCy2 aus BZR-stimulierten B-Zellen.....	89
5	Zusammenfassung und Fazit.....	91
6	Literaturverzeichnis.....	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der ITAM-abhängigen BZR-Signalkaskade.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteindomänenabfolge von Btk.....	8
Abbildung 3: Das Interaktom von Grb2 in B-Zellen.	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Proteindomänenabfolge von PLCy2.....	14
Abbildung 5: Die N-terminale SH3-Domäne von Grb2, nicht jedoch von Grap, bindet Btk....	53
Abbildung 6: Die Btk-Polyprolin-Peptide sind für eine Aufreinigung von Bindepartnern nicht ausreichend.	54
Abbildung 7: Fusionsproteine der Btk-PRR binden Grb2 und andere Proteine, dabei ist vor allem ein intaktes N-terminales Polyprolin-Motiv entscheidend.	56
Abbildung 8: Aufreinigung von Btk mit Hilfe eines Fusionsproteins aus dem Btk-Motiv und der Prolin-reichen Region von Btk.	57
Abbildung 9: Herstellung eines Btk-defizienten DG75-Zellklons.	58
Abbildung 10: Analyse der Btk-Expression..	59
Abbildung 11: Btk-defiziente DG75-Zellen zeigen eine reduzierte Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation.....	61
Abbildung 12: Die Effekte von Ibrutinib und Btk-Defizienz sind identisch.	61
Abbildung 13: Das N-terminale Polyprolin-Motiv von Btk spielt eine entscheidende Rolle für die Funktion von Btk im BZR- Ca^{2+} -Signalweg.....	63
Abbildung 14: Für ein gesteigertes Signal über den ITT-Grb2-Signalweg wird Btk benötigt. .	65
Abbildung 15: Ein intaktes Polyprolin-Motiv ist entscheidend für die Funktion von Btk im ITT-Grb2-Signalweg.....	66
Abbildung 16: Schematische Darstellung der initialen mIgG-BZR-Signalkaskade.....	66
Abbildung 17: Die SH3-Domäne von Btk spielt eine entscheidende Rolle im BZR- Ca^{2+} -Signalweg.....	67
Abbildung 18: Protein-Interaktionen über die Btk-SH3-Domäne werden durch Mutation in dieser Domäne verhindert.....	69
Abbildung 19: Expression von Strep-Btk.....	71
Abbildung 20: Strep-Btk stellt den BZR-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom in Btk-defizienten DT40- und DG75-Zellen wieder her.	72
Abbildung 21: Strep-PLCy2 und Strep-Btk können effektiv aus den Lysaten transfizierter Zellen aufgereinigt werden.	72

Abbildung 22: Schematische Darstellung der Proteindomänen und Phosphorylierungsstellen von Btk.	73
Abbildung 23: Schematische Darstellung des <i>Time-Course</i> -Experiments.....	74
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Proteindomänen und Phosphorylierungsstellen von PLCy2.....	75
Abbildung 25: Zusammenfassung der Interaktomanalyse für Btk.....	77
Abbildung 26: Zusammenfassung der Interaktomanalyse für PLCy2..	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Hersteller.....	16
Tabelle 2: Software, Datenbanken, Internetadressen sowie deren Verwendungszweck.....	17
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und Hersteller	18
Tabelle 4 :Chemikalien/Reagenzien und Hersteller	19
Tabelle 5: Enzyme und Hersteller	20
Tabelle 6: Antikörper und Hersteller	23
Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen.....	25
Tabelle 8: Vektoren und Konstrukte	26
Tabelle 9: Biotinylierte Peptide.....	27
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der detektierten PLCy2-Phosphorylierungsstellen aus Abbildung 24.	76

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BAA	Bisacrylamid
BASH	<i>B cell adapter containing SH2-domain</i>
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
BM	Btk-Motiv
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
Btk	Bruton-Tyrosin-Kinase
BZR	B-Zell-Antigen-Rezeptor
C2	C2-Domäne
Cbl	<i>Casitas B cell lineage lymphoma</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
Cit	Citrine
Cre	<i>causes recombination</i>
CS	Hühner-Serum (<i>chicken serum</i>)
C-SH3	C-terminale Src-Homologie 3-Domäne
C-terminal	carboxyl-terminal
Cy5	Cyanin-5
D10-Medium	DMEM mit 10% FCS
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbeccos minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
Dok3	<i>downstream of kinase 3</i>
1D-PAGE	eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
D-Segment	<i>diversity</i> - Segment
DTA	Diphtherie-Toxin-A
DTT	Dithiothreitol
EB	EcoBlast (<i>ecotropic receptor</i> , Blastocidinresistenz)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	EF-Hand
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>

EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
F(ab) ₂	bivalente Antigen-bindendene Fragmente eines Immunglobulins
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting/scanning</i>
Fc	kristallisierbares Fragment eines Immunglobulins
FcγRIIb	Immunoglobulin γ-Fc-Region-Receptor IIb
FCS	fötales Kälber-Serum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fwd	<i>forward</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
Grap	<i>Grb2-related adapter protein</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfon-Säure
HF	<i>high fidelity</i>
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
Igα	Ig-assoziiertes Transmembranprotein α
Igβ	Ig-assoziiertes Transmembranprotein β
IgL	leichte Immunglobulin-Kette
IgH	schwere Immunglobulin-Kette
Indo-1 AM	<i>4-(6-carboxy-2-indolyl)-4'-methyl-2,2'-(ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl) ester</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
Itk	<i>IL2-inducible T-cell kinase</i>
ITT	<i>immunoglobulin tail tyrosine</i>
J-Segment	<i>joining</i> -Segment
Kan	Kanamycin
kB	Kilobase
LB	<i>lysogeny broth</i>
loxP	<i>locus of X-over P1</i>
LPPV	Leucin (L) zu Prolin (P) und Prolin (P) zu Valin (V)
Lyn	<i>Lck/Yes-related novel kinase</i>
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mIg	membrangebundenes Immunglobulin
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Massenspektrometrie
Mut.	Mutanten
neg	negativ
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NP40	Nonylphenoethoxylat

N-SH3	N-terminale Src-Homologie 3-Domäne
N-terminal	amino-terminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Protein-Kinase C
PKCβ	Protein-Kinase C β
PlatE	PlatinumE
PLC	Phospholipase C
PLCy2	Phospholipase C γ2
pos	positiv
PRR	Prolin-reiche Region
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
pTyr	Phosphotyrosin
Puro	Puromycin
R10-Medium	RPMI-Medium mit 10% FCS
R11-Medium	RPMI-Medium mit 10% FCS und 1% CS
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH2	Src-Homologie 2-Domäne
SH3	Src-Homologie 3-Domäne
SHC	<i>Src homology 2 domain containing protein</i>
SHIP	<i>Src homology 2 domain containing 5'-inositol phosphatase</i>
SHP-1	<i>Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling of aminoacids in cell culture</i>
SLP65	<i>Src homology 2 domain containing leukocyte protein of 65 kDa</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
Strep-	<i>One-STrEP-tag™</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tbl.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TH	Tec-Homologie-Domäne
TiO ₂	Titanium-Dioxid
TK	Tyrosinkinase-Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-deca(ethylenglycol)ether)
UV	ultraviolett
V-Segment	<i>variable</i> -Segment
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>

v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
X	X-Domäne
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
Xid	X-gekoppelte Immundefizienz
XLA	X-gekoppelte Agammaglobulinämie (<i>X-linked agammaglobulinemia</i>)
Y	Y-Domäne
2YT	<i>2 x yeast/tryptone</i>
z.B.	zum Beispiel

Ländercodes

AL-USA	Alabama, USA
CA-USA	Californien, USA
MA-USA	Massachusetts, USA
MO-USA	Missouri, USA
NJ-USA	New Jersey, USA
NY-USA	New York, USA
OR-USA	Oregon, USA
PA-USA	Pennsylvania, USA
TX-USA	Texas, USA
UK	United Kingdom
WA-USA	Washington, USA
WI-USA	Wisconsin, USA

Namen von Firmen, Organisationen und Einrichtungen

BD Biosciences	Becton Dickinson Biosciences
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GE Healthcare	General Electric Healthcare
MAC	Macintosh
MPI	Max-Planck-Institut
NEB	New England Biolabs
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WTW	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H

Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
beliebige Aminosäure		x
positiv-geladene Aminosäure		+

Nukleosid	Abkürzung
Desoxyadenosin	A, a
Desoxycytidin	C, c
Desoxyguanosin	G, g
Desoxythymidin	T, t

Einheiten und Präfixe						
k	kilo	h	Stunde	g	Gramm	A Ampere
m	milli	min	Minute	M	molar	V Volt
μ	micro	sec	Sekunde	U	<i>Unit</i> /Einheit	F Farad
n	nano	m	Meter	Da	Dalton	x g Erdbeschleunigung
p	piko	l	Liter	°C	Grad Celsius	rpm <i>rounds per minute</i>

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem bildet die Abwehr des Körpers gegen Pathogene. Dabei unterscheidet man angeborene von erworbenen spezifischen Abwehrmechanismen.

Das angeborene Immunsystem übernimmt die initiale Abwehr von Pathogenen, welche die Haut- und Schleimhautbarrieren des Körpers überwunden haben. Zu diesem Teil des Immunsystems gehören Plasmaproteine wie das Komplementsystem, zelluläre Rezeptoren, die Pathogen-assoziierte Strukturen erkennen, sowie Zellen der Phagozytose (Janeway und Medzhitov 2002). Des Weiteren sind die Zellen des angeborenen Immunsystems entscheidend an der Aktivierung des erworbenen Immunsystems beteiligt (Fearon und Locksley 1996; Batista und Harwood 2009).

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem richtet sich das erworbene Immunsystem spezifisch gegen einzelne Antigene der Pathogene. Auch dieses System besitzt eine zelluläre Komponente, welche sich gegen intrazelluläre Erreger richtet und durch T-Lymphozyten vermittelt wird. Der humorale Anteil des erworbenen Immunsystems wird durch spezifische Antikörper gebildet. Sie binden Antigene auf extrazellulären Pathogenen. Diese humorale Immunität wird durch die B-Lymphozyten mit ihrem antigenspezifischen Rezeptor, dem B-Zell-Antigen-Rezeptor (BZR), vermittelt (Murphy 2012).

Der großen Diversität der antigenspezifischen Rezeptoren und Antikörper des erworbenen Immunsystems liegen genetische Rekombinationsmechanismen zugrunde (Brack et al. 1978; Tonegawa 1983), die schlussendlich dazu führen, dass die Antigen-Rezeptoren jedes einzelnen Lymphozyten spezifisch gegen ein Antigen-Epitop gerichtet sind (Davies und Cohen 1996).

1.2 Die B-Zelle und ihre Entwicklung

Die B-Zelle erhielt ihren Namen durch die Entdeckung ihres Entstehungsortes bei Vögeln, der Bursa Fabricii (Glick et al. 1956). In Säugern und damit auch im Menschen beginnt die Entwicklung der B-Zellen jedoch im Knochenmark (Mitchell und Miller 1968). Wie jede Körperzelle enthält das Genom der hämatopoetischen Progenitorzelle die verschiedenen Gen-Loci zur Expression von Immunglobulinen (Igs), einem Bestandteil des BZR (Hood et al. 1975). Jedes Ig wird aus zwei identischen schweren Ig-Ketten (IgH) und zwei leichten Ig-Ketten (IgL)

gebildet, jede dieser Ketten besitzt eine variable Region für die Antigenbindung sowie eine konstante Region. Die Gen-Loci der Ig-Ketten beinhalten verschiedene Gen-Segmente: Die V (*variable*)-, D (*diversity*)- und J (*joining*)-Segmente, welche die variable Region des Igs kodieren, sowie C (*constant*)-Segmente für die konstante Region des Igs (Early et al. 1980; Murphy 2012). Die V-, D- und J-Segmente werden durch somatische Rekombination in den frühen Entwicklungsstadien der B-Zelle zufällig kombiniert. Dadurch entsteht ein enormes Repertoire an Antigenspezifität, wobei jede B-Zelle nur einen spezifischen Rezeptor exprimiert. Dies wird durch Allel-Exklusion erreicht, das heißt nur eines von zwei Allelen wird exprimiert (Vettermann und Schlissel 2010; Levin-Klein und Bergman 2014). Somit wird verhindert, dass Zellen entstehen, die für mehr als ein Antigen spezifisch sind. Je nach Status der somatischen Rekombination sowie durch Expression weiterer intrazellulärer und membranständiger Signalmoleküle können verschiedene Entwicklungsstadien wie das pro- und prä-B-Zell-Stadium im Knochenmark unterschieden werden (Ghia et al. 1998; Pieper et al. 2013).

Bei den oben beschriebenen Mechanismen kommt es auch zur Entstehung von Zellen, deren BZR gegen ein körpereigenes Antigen gerichtet ist. Um die Anzahl dieser autoreaktiven B-Zellen zu minimieren, wird der BZR auf Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen getestet (Ferry et al. 2006; Murphy 2012). B-Zellen, deren BZR ein körpereigenes Antigen erkennt, gehen entweder direkt in Apoptose, durchlaufen eine erneute V(D)J-Rekombination oder werden anerg gegenüber einer späteren Aktivierung (Ferry et al. 2006). Dies wird als zentrale Toleranz bezeichnet. Die überlebenden Zellen verlassen das Knochenmark und migrieren in die Milz, wo sie sich weiter zu reifen naiven B-Zellen entwickeln. Diese exprimieren durch alternatives Spleißen des Ig-Primärtranskripts zwei unterschiedliche Ig-Isotypen: IgM und IgD (zur Übersicht siehe: Pieper et al. 2013).

Naive B-Zellen zirkulieren zunächst im Blut und in lymphatischen Organen, bis sie mit ihrem BZR auf ihr passendes Antigen stoßen. Nach Bindung des Antigens an den BZR wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst. In den meisten Fällen ist diese Signalleitungskaskade nicht ausreichend für eine vollständige Aktivierung der B-Zellen, so dass sie ein zusätzliches Aktivierungssignal von T-Helferzellen benötigen (Murphy 2012). Hierfür wird das gebundene Antigen samt BZR von der B-Zelle internalisiert und nach Prozessierung über Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) an der Zelloberfläche der B-Zelle der passenden T-Helferzelle präsentiert (Cheng et al. 1999b; Lankar 2002).

Nach vollständiger Aktivierung differenzieren B-Zellen entweder zu extrafollikulären Plasmablasten, die sofort Antikörper mit geringer Affinität produzieren, oder sie migrieren in die Lymphfollikel, was zur Entstehung von Keimzentren führt (McHeyzer-Williams et al. 2011; Kurosaki et al. 2015). In einem Keimzentrum expandieren die aktivierten Zellklone. Dabei können sie eine durch somatische Hypermutation gekennzeichnete Affinitätsreifung sowie einen Ig-Klassenwechsel durch Rekombination durchlaufen (zur Übersicht siehe: McHeyzer-Williams et al. 2011). Während der Expansion und Affinitätsreifung erhalten die Zellen immer wieder Signale über ihren BZR sowie zusätzliche Signale von antigenspezifischen follikulären T-Helferzellen (Cyster 2010; Nutt und Tarlinton 2011; Victora und Nussenzweig 2012). Je stärker die Affinität des BZRs zum Antigen ist, desto mehr Überlebenssignale erhält die B-Zelle und desto stärker expandiert sie, was zur Selektion der B-Zellen führt, die einen hochaffinen BZR exprimieren (McHeyzer-Williams et al. 2011; Victora und Nussenzweig 2012). Welchen Ig-Isotyp die Zelle nach dem Klassenwechsel exprimiert, wird von den Zytokinen bestimmt, die von den follikulären T-Zellen ausgeschüttet werden (McHeyzer-Williams et al. 2011). Mit dem Ig-Klassenwechsel ändert sich nicht nur der Isotyp des BZRs sondern auch der Isotyp der produzierten Antikörper und damit deren Effektorfunktion.

Nach einer Keimzentruumsreaktion wandern die B-Zellen aus dem Keimzentrum aus und differenzieren entweder zu langlebigen Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen (Victora und Nussenzweig 2012). Die Plasmazellen siedeln sich in einer Knochenmarknische an und produzieren für lange Zeit spezifische Antikörper (Ahmed und Gray 1996). Die Gedächtnis-B-Zellen können bei erneutem Antigenkontakt sofort in Plasmazellen differenzieren und hochaffine Antikörper produzieren (Ahmed und Gray 1996). Diese Eigenschaft ist charakteristisch für die sekundäre Immunantwort.

1.3 Der B-Zell-Antigen-Rezeptor

1.3.1 Aufbau des B-Zell-Antigen-Rezeptors

Jede reife B-Zelle exprimiert einen BZR mit definierter Antigen-Spezifität auf ihrer Oberfläche. Dabei handelt es sich um ein membrangebundenes Immunglobulin (mIg) zur Antigenerkennung, welches mit einem Heterodimer aus den Ig-assoziierten Transmembranproteinen α (Ig α) und β (Ig β) mittels nicht-kovalenter Wechselwirkungen assoziiert ist (Venkitaraman et al. 1991; Reth 1992). Sowohl Ig α als auch Ig β besitzen in ihren intrazellulären Domänen ein konserviertes Peptidmotiv, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)

genannt, mit der Konsensussequenz D/Ex₇D/Ex₂Yx₂I/Lx₇Yx₂I/L (Reth 1989), welches für die Signaltransduktion des BZR unerlässlich ist (Sanchez et al. 1993; Flaswinkel und Reth 1994). Wie zuvor beschrieben, besteht jedes Ig aus jeweils zwei identischen IgHs und IGLs, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es gibt fünf verschiedene Ig-Isoformen (IgM, IgD, IgG, IgE und IgA), wobei IgG und IgA sich noch in Subklassen unterteilen lassen (Reth 1992; Mestecky 1972). Diese Ig-Isoformen werden über IgH (μ , δ , γ , ϵ und α) definiert (Reth 1992). Alle Ig-Klassen außer IgM und IgD werden von B-Zellen nur dann exprimiert, wenn sie eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben, während der die Ig-Klassenwechsel-Rekombination erfolgen kann (zur Übersicht siehe: Pieper et al. 2013). Hierbei werden die C-Segmente der μ - und δ -IgH irreversibel aus dem Gen-Lokus entfernt (Honjo und Kataoka 1978; Honjo et al. 2002).

Im Vergleich zu mIgM und mIgD, die nur einen sehr kurzen zytoplasmatischen Abschnitt besitzen, der lediglich drei Aminosäuren umfasst, verfügen die restlichen mIg-Klassen über einen wesentlich längeren zytoplasmatischen Bereich (Reth 1992). Experimente mit gentechnisch veränderten Mäusen haben gezeigt, dass die evolutionär konservierten zytoplasmatischen Domänen von mIgG und mIgE eine entscheidende Rolle für die Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen spielen (Kaisho et al. 1997; Achatz und Lamers 1997).

In der zytoplasmatischen Domäne von mIgG wurden zwei Peptid-Motive identifiziert, die auf unterschiedlichen Wegen zu einer Signalverstärkung des BZR führen: Ein phosphorylierungs-unabhängiges Motiv, über welches das Adapterprotein Synapsen-assoziiertes Protein 97 (SAP97) rekrutiert wird (Liu et al. 2010; Liu et al. 2012), sowie ein Tyrosinphosphorylierungsmotiv, das Adapter- und Effektorproteine über deren Src-Homologie 2 (SH2)-Domänen rekrutiert (Engels et al. 2009). Dieses *immunoglobulin tail tyrosine* (ITT) genannte Motiv ist evolutionär konserviert und auch im zytoplasmatischen Abschnitt von mIgE zu finden (Engels et al. 2009).

Über diese beiden Motive können zusätzliche Signalmoleküle in die Umgebung des aktivierten BZR rekrutiert werden, was zu einer Verstärkung der BZR-Signalleitung führt (Engels et al. 2009; Liu et al. 2010; Liu et al. 2012). Welche Signalmoleküle dabei eine Rolle spielen und wie die Signalwege miteinander interagieren, ist noch nicht abschließend geklärt.

1.3.2 Die B-Zell-Antigen-Rezeptor-Signalleitung

Die Aktivierung einer B-Zelle über ihren BZR kann man in verschiedene Schritte einteilen. Durch Antigenbindung werden mehrere BZR-Monomere quervernetzt und in cholesterinrei-

chen Membranregionen, so genannten *lipid rafts*, zusammengeführt (Cheng et al. 1999; Pierce 2002). In diesen Membranbereichen befinden sich vermehrt Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) der Src-Familie wie beispielsweise die *Lck/Yes-related novel kinase* (Lyn) (Casey 1995), die im nächsten Schritt die ITAMs von Ig α und Ig β phosphorylieren (Yamanashi et al. 1991; Campbell und Sefton 1992; Yamamoto et al. 1993). Durch die Phosphorylierung bieten die ITAMs nun Bindestellen für die SH2-Domänen der *spleen tyrosine kinase* (Syk) (Kurosaki et al. 1995; Wienands et al. 1995; Fütterer et al. 1998). Durch Bindung an phosphorylierte ITAMs durchläuft Syk eine Konformationsänderung und wird selber phosphoryliert; dies führt zur Aktivierung der Kinase (Kurosaki et al. 1994; Tsang et al. 2008). Aktiviertes Syk phosphoryliert unter anderem das *Src homology 2 domain containing leukocyte adapter protein of 65kD* (SLP65, auch BLNK oder BASH genannt) (Fu et al. 1998; Goitsuka et al. 1998; Wienands et al. 1998), welches über ein phosphoryliertes Tyrosin außerhalb des ITAMs in Ig α an den BZR bindet (Engels et al. 2001).

Als Adapterprotein ist SLP65 unter anderem an der Ausbildung des sogenannten Ca²⁺-Initiationskomplexes beteiligt, zu dem außerdem die Bruton-Tyrosin-Kinase (Btk) sowie Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) gehören (Engelke et al. 2007; Scharenberg et al. 2007). PLC γ 2 und Btk binden über ihre SH2-Domänen an phosphoryliertes SLP65. Im nächsten Schritt phosphoryliert und aktiviert Btk PLC γ 2 (Watanabe et al. 2001; Rodriguez et al. 2001; Humphries et al. 2004), welches dann plasmamembranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) hydrolysiert, wodurch die sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) generiert werden (Kurosaki et al. 2000).

Das freigesetzte IP₃ wird von IP₃-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden. Diese Rezeptoren sind ligandengesteuerte Kanäle für Ca²⁺-Ionen und werden durch IP₃-Bindung geöffnet (Sugawara et al. 1997; Kurosaki et al. 2000). Hierüber fließen Ca²⁺-Ionen entlang eines Konzentrationsgradienten aus dem ER in das Zytosol. Dies wiederum führt zur Öffnung von Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran, wodurch ein zusätzlicher Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum erzeugt wird (Kurosaki et al. 2010). Über die beiden beschriebenen Mechanismen steigt die Ca²⁺-Konzentration in der Zelle innerhalb von kürzester Zeit auf ein Tausendfaches an. Dieser Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration führt zur Aktivierung der Protein-Kinase C β (PKC β) und des nachgeschalteten *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B)-Signalwegs (Takai et al. 1979; Schulze-Luehrmann und Ghosh 2006). Des Weiteren transloziert der Transkriptionsfaktor

nuclear factor of activated T cells (NFAT) Ca^{2+} -abhängig in den Nukleus und aktiviert dort die Expression diverser Gene (Crabtree und Olson 2002).

DAG hingegen verbleibt in der Plasmamembran und initiiert die Aktivierung des NF κ B- (Saijo et al. 2002) und des *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Signalwegs (Oh-hora et al. 2003). Diese beiden Signalwege regulieren wiederum die Transkription bestimmter Gene für Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Zelle.

Diese Signalkaskade ist noch einmal schematisch in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (siehe Abb. 1):

Abbildung 1: Schematische Darstellung der ITAM-abhängigen BZR-Signalkaskade. Nach Quervernetzung des BZR (grau) durch Antigenbindung (Ag, rot) transloziert der Komplex in die Bereiche der *lipid rafts* (gelb), wo das Ig α /Ig β -ITAM durch Src-PTKs, wie Lyn, phosphoryliert (orange) wird. Nach Rekrutierung von Syk formiert sich der Ca^{2+} -Initiationskomplex aus SLP65, Btk und PLC γ 2 und die sekundären Botenstoffe DAG und IP $_3$ werden freigesetzt. Durch die Rekrutierung weiterer Signalkomponenten sowie durch Freisetzung der sekundären Botenstoffe erfolgt die Aktivierung weiterer Signalwege der B-Zelle. Farbkodierung: Kinasen grün, Adapterproteine violett, Lipasen rosa, Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren braun.

Die antigenvermittelte Kreuzvernetzung des BZR führt ferner zur Aktivierung weiterer regulierender Signalwege, die für die Feinabstimmung der Zellaktivierung verantwortlich sind. Ein Beispiel für aktivierende Regulation ist die Rekrutierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) an die Zellmembran über den Korezeptor *cluster of differentiation* (CD) 19 durch Aktivierung der BZR-Signalkaskade (Engelke et al. 2007). PI3K phosphoryliert membranständiges PIP $_2$ an

der 3'-Position. Das dadurch entstehende Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) dient als Bindestelle für Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domänen-enhaltende Proteine, wie Btk und PLC γ 2, wodurch die Bildung des Ca²⁺-Initiationskomplexes unterstützt wird (Salim et al. 1996; Falasca et al. 1998).

Eine Inhibition der Zellaktivierung findet unter anderem über die Rekrutierung von Phosphatasen an die *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) inhibitorischer Korezeptoren statt. Die *Src homology 2 domain containing 5'-inositol phosphatase* (SHIP) beispielsweise dephosphoryliert PIP₃, wodurch die Rekrutierung von Effektor- und Adapterproteinen über PH-Domänen reduziert wird (Deane und Fruman 2004). Eine andere Phosphatase, *SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1* (SHP-1), dephosphoryliert SLP65 und die ITAMs in Ig α /Ig β (Nitschke und Tsubata 2004).

Diese Feinabstimmung des BZR-Signals und die Integration von Korezeptor-Signalwegen sind wichtig für eine angemessene Immunantwort der B-Zellen.

1.4 Effektor- und Adapterproteine der BZR-Signalkaskade

1.4.1 Die Bruton-Tyrosin-Kinase und ihre Rolle in der BZR-Signalkaskade

Bei Btk handelt es sich um eine zytoplasmatische PTK der Tec-Familie. Zu dieser Kinasefamilie gehören neben Btk noch Tec, Itk (*IL2-inducible T-cell kinase*), Txk und Bmx (Smith et al. 2001). Btk wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und dort in allen Zelllinien außer der T-Zelllinie (Smith et al. 1994; Robinson et al. 1998; Schmidt et al. 2004a; Schmidt et al. 2004b; MacGlashan et al. 2011). Eine Zellart exprimiert meist mehrere Mitglieder der Familie, B-Zellen beispielsweise Btk und Tec (Kitanaka et al. 1998). Die Expression von Btk ist besonders hoch in den unreifen Vorstufen, verringert in den ruhenden reifen B-Zellen und fehlt in Plasmazellen (Smith et al. 1994; Nisitani et al. 2000). Btk ist wichtig für das BZR-Signal und damit für die Differenzierung und Entwicklung der B-Lymphozyten (Vetrie et al. 1993; Tsukada et al. 1993; Thomas et al. 1993). Btk-defiziente B-Zellen können sich nicht zu reifen B-Zellen entwickeln, da die Entwicklung von der pro- zur prä-B-Zelle blockiert ist und die Zellen in diesem frühen Entwicklungsstadium zugrunde gehen (Mohamed et al. 2009). Ein Defekt im *BTK*-Gen äußert sich beim Menschen als X-gekoppelte Agammaglobulinämie (XLA), auch Morbus Bruton genannt (siehe 1.4.1.1).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteindomänenabfolge von Btk. N-terminal (N) liegt die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), es folgt die Tec-Homologie-Domäne, bestehend aus dem Btk-Motiv (BM) und der Prolin-reichen Region (PRR). Weiter C-terminal (C) liegen die Src-Homologie 3 (SH3)- und -2 (SH2) -Domäne. Den C-Terminus bildet die Tyrosinkinase-Domäne (TK).

Btk besteht aus verschiedenen Proteindomänen (siehe Abb. 2), die alle für ihre Funktion in der Zelle wichtig sind. Am amino (N)-terminalen Proteinende befindet sich eine PH-Domäne, gefolgt von einer Tec-Homologie (TH)-Domäne, bestehend aus dem Btk-Motiv (BM), ein Zinkfingermotiv, und der Prolin-reichen Region (PRR). Hier schließen sich eine Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne und eine SH2-Domäne an. Das carboxyl (C)-terminale Ende bildet die Tyrosinkinase (TK)-Domäne (Mohamed et al. 2009). In XLA-Patienten sind für alle diese Bereiche Funktionsverlustmutationen beschrieben (Vihinen et al. 1994a; Vihinen et al. 1994b; Vihinen et al. 1997a; Vihinen et al. 1997b; Lindvall et al. 2005; Väliäho et al. 2006).

Btk ist hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, transloziert jedoch nach Aktivierung des BZR-Signalwegs an die Membran, wo es mit seiner PH-Domäne PIP_3 bindet (Nore et al. 2000; Varnai et al. 1999). Dies ist ein essenzieller Schritt für die Aktivierung von Btk, der von der PI3K-Aktivität abhängt, da diese durch Phosphorylierung von PIP_2 den Bindepartner für die PH-Domäne von Btk, PIP_3 , generiert (Salim et al. 1996).

An der Plasmamembran wird Btk durch die Src-Familien-Kinase Lyn am Tyrosin an Position 551 (Y551) phosphoryliert und die Btk-TK-Domäne dadurch aktiviert (Mahajan et al. 1995; Rawlings et al. 1996). Durch Autophosphorylierung wird im nächsten Schritt ein Tyrosin innerhalb der SH3-Domäne von Btk an Position 223 (Y223) phosphoryliert, wodurch die Protein-Protein-Interaktionen der SH3-Domäne moduliert werden (Park et al. 1996). Mit Hilfe des Adapterproteins SLP65 bildet sich der sogenannte Ca^{2+} -Initiationskomplex mit Btk und PLC γ 2 (Engelke et al. 2007; Scharenberg et al. 2007). In diesem Komplex wird PLC γ 2 durch Btk am Tyrosin an Position 759 (Y759) phosphoryliert und dadurch aktiviert (Watanabe et al. 2001; Rodriguez et al. 2001; Humphries et al. 2004).

Die Mechanismen, über die die Aktivität von Btk reguliert wird, sind noch nicht abschließend geklärt. Btk scheint hauptsächlich über Protein-Protein-Interaktionen reguliert zu werden, wobei die meisten identifizierten Interaktionspartner inhibierende Regulatoren sind (Mohamed et al. 2009). Ein wichtiger und ausführlich beschriebener Regulator von Btk ist die Protein-Kinase C (PKC) (Yao et al. 1994; Johannes et al. 1999; Crosby und Poole 2002). Die

Interaktion mit den PKC-Isoformen findet über die Btk-PH-Domäne statt. Es wurde gezeigt, dass die PKC β -Isoform Btk am Serin an Position 180 (S180) im Übergang der PH- zur TH-Domäne phosphoryliert und somit die Gesamtphosphorylierung von Btk sowie die Membranrekrutierung inhibierend reguliert (Kang et al. 2001).

Wie oben bereits erwähnt, besitzt Btk eine Prolin-reiche Region mit zwei Polyprolin-Motiven der Klasse I. Diese Motive sind durch die Konsensussequenz +xxPxxP mit einer N-terminal gelegenen positiv-geladenen Aminosäure (+) gekennzeichnet und stellen Bindemotive für SH3-Domänen dar (Mayer 2001). Bekannte Bindepartner dieser Motive sind die Src-Kinasen Lyn, Fyn und Hck, wobei vor allem das N-terminale Polyprolin-Motiv für diese Bindungen wichtig scheint (Cheng et al. 1994). Dieses Motiv spielt auch für die intermolekulare Interaktion der Btk-SH3-Domäne mit der TH-Domäne von Btk eine entscheidende Rolle (Hansson et al. 2001b).

1.4.1.1 X-gekoppelte Agammaglobulinämie

Dr. Ogden Bruton verfasste 1952 die erste Beschreibung einer angeborenen Immundefizienz in einem Fallbericht über einen pädiatrischen Patienten mit einer vollständigen Agammaglobulinämie bei normalen Serumeiweißkonzentrationen (Bruton 1952). Das dazugehörige Gen wurde erstmals 1993 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben (Tsukada et al. 1993; Vetrie et al. 1993). Später wurde dieses Krankheitsbild X-gekoppelte Agammaglobulinämie (XLA) oder in Reminiszenz an den Erstbeschreiber als Morbus Bruton bezeichnet.

XLA ist eine seltene, X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die zirka 1/200000 Neugeborene betrifft und durch einen Defekt im *BTK*-Gen (Xq21.33-q22) gekennzeichnet ist (Kwan et al. 1986; Ott et al. 1986; Kwan et al. 1990; Väliäho et al. 2006). Durch die Blockade der B-Lymphozyten-Entwicklung von der pro- zur prä-B-Zelle kommt es zu einem fast vollständigen Fehlen reifer B-Zellen, was die Ursache der Agammaglobulinämie darstellt (Ochs und Smith 1996; Mohamed et al. 2009). Ein Defekt im *Btk*-Gen bei der Maus führt zu einem ähnlichen Phänotyp, X-gekoppelte Immundefizienz (Xid) genannt, die jedoch wesentlich milder verläuft als die XLA beim Menschen (Thomas et al. 1993).

Das klinische Bild der XLA ist durch im Säuglingsalter beginnende rezidivierende Infekte gekennzeichnet (Ochs und Smith 1996). Dabei spielen vor allem respiratorische, gastrointestinale sowie kutane Infekte durch bekapselte Bakterien wie Pneumokokken-, Staphylokokken- und Haemophilus-Spezies sowie Enteroviren eine Rolle, sobald der Nestschutz nachlässt

(Ochs und Smith 1996). Die Agammaglobulinämie hat zur Folge, dass die Erreger nicht opsoniert werden und ihre Lyse durch das aktivierte Komplementsystem sowie die Phagozytose ausbleibt. Neben der Erregerabwehr ist auch die Ausbildung einer Immunität nach einer Impfung eingeschränkt (Ochs und Smith 1996). Die Therapie der XLA hat sich seit der Erstbeschreibung durch Dr. Bruton nicht sonderlich geändert. Auch heute werden die Patienten durch regelmäßige intravenöse Immunglobulingaben behandelt (Ochs und Smith 1996; Bestas et al. 2014).

1.4.2 Das Adapterprotein *growth factor receptor-bound protein 2*

Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) ist ein vielseitiges Adapterprotein, das evolutionär stark konserviert ist und ubiquitär exprimiert wird (Neumann et al. 2009). Grb2 besteht aus einer N- und einer C-terminalen SH3-Domäne, zwischen denen sich eine SH2-Domäne befindet (siehe Abb. 3) (Lowenstein et al. 1992). Letztere bindet Aminosäure-Sequenzmotive mit einem phosphorylierten Tyrosin und der Konsensussequenz pYxN (Songyang et al. 1994; Kessels et al. 2002), diese Interaktionen sind induzierbar und reversibel. Die beiden SH3-Domänen binden Polyprolin-Motive (Feng et al. 1994; Sparks et al. 1996; Lewitzky et al. 2001), diese Interaktionen sind konstitutiv. Neben Grb2 gibt es noch Grb2-ähnliche Proteine, wie *Grb2-related adapter protein* (Grap) und *Grb2-related adapter downstream of Shc* (Gads), die in der Grb2-Familie zusammengefasst werden. Während Grb2 ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression der anderen Familienmitglieder auf hämatopoetische Zellen beschränkt (Feng et al. 1996; Liu und McGlade 1998; Neumann et al. 2009).

Grb2 wurde erstmals als Bindepartner der Tyrosin-phosphorylierten Formen des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) isoliert (Lowenstein et al. 1992). Grb2 bindet das autophosphorylierte pYxN-Motiv dieser Rezeptoren über seine SH2-Domäne und aktiviert den *rat sarcoma* (Ras)-Signalweg über die Rekrutierung von *son of sevenless* (Sos), einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (Olivier et al. 1993; Li et al. 1993; Gale et al. 1993; Rozakis-Adcock et al. 1993).

Grb2 ist trotz seiner sehr einfachen Architektur ein sehr vielseitiges Adapterprotein, dessen Funktion in der Feinjustierung von Signalen liegt (Jang et al. 2009). Für den BZR-Ca²⁺-Signalweg scheint eine inhibitorisch-regulierende Funktion zu überwiegen, denn in der Hühner-B-Zelllinie DT40 sowie in primären Maus-B-Zellen führt Grb2-Defizienz zu einem vermehrten Einstrom von Ca²⁺-Ionen nach BZR-Stimulation der Zellen (Stork et al. 2004; Ackermann et al. 2011). Eine mögliche Erklärung für den inhibitorischen Effekt von Grb2 auf

den BZR- Ca^{2+} -Signalweg ist die SH2-Domänen-abhängige Interaktion von Grb2 mit dem Adapterprotein *downstream of kinase 3* (Dok3) an der Plasmamembran. Über diese Interaktion wird die Btk-abhängige Phosphorylierung von PLC γ 2 und damit das Ca^{2+} -Signal reduziert (Stork et al. 2007).

Eine weitere Funktion von Grb2 ist die Integration von Korezeptor-Signalen in die BZR-Signalkaskade. Inhibitorische Korezeptoren in B-Zellen sind z.B. der Immunoglobulin γ -Fc-Region-Receptor IIb (Fc γ RIIb), CD22 und CD72 (Neumann et al. 2009). Alle drei Rezeptoren besitzen ein ITIM, durch dessen Phosphorylierung ein Bindemotiv für SH2-Domänen-enthaltende Phosphatasen entsteht (Neumann et al. 2009). Im Fc γ RIIb wird über dieses Motiv sowie ein weiteres Phosphotyrosin-Motiv ein Komplex aus Grb2, SHIP und *Src homology 2 domain containing protein* (SHC) rekrutiert und aktiviert (Ono et al. 1996; Harmer und DeFranco 1999; Isnardi et al. 2004). Im Fall von CD22 und CD72 findet eine Grb2-abhängige Rekrutierung von SHP-1 statt (Nitschke und Tsubata 2004). Die Aktivität beider Phosphatasen hat einen inhibitorischen Einfluss auf die BZR-Signalkaskade. Neben den oben beschriebenen Interaktionen haben massenspektrometrische Interaktom-Analysen von Grb2 noch weitere mögliche Bindepartner identifiziert, in deren Funktionsbereichen Grb2 als Adapter wirken könnte (siehe Abb. 3) (Neumann et al. 2009).

Abbildung 3: Das Interaktom von Grb2 in B-Zellen. Die SH2- (blau) und SH3-Domänen (rot) von Grb2 interagieren mit aktivierenden (grün) und inhibitorischen (orange) Signalregulatoren aus verschiedenen Signalwegen. Abbildung aus Neumann et al. 2009, mit freundlicher Genehmigung durch den Verlag *John Wiley and Sons*.

Des Weiteren zeigten *in vivo*-Analysen in gentechnisch veränderten Mäusen mit einer B-Zell spezifischen Grb2-Defizienz auf der einen Seite eine Hyperaktivität reifer B-Zellen und eine vermehrte IgM-Produktion (Ackermann et al. 2011; Jang et al. 2011), auf der anderen Seite eine gestörte B-Zell-Entwicklung und verminderte Bildung von Keimzentren (Jang et al. 2011) sowie eine verminderte sekundäre Immunantwort (Ackermann et al. 2011). Hierzu passend wurde Grb2 als ein entscheidendes Adapterprotein für den ITT-abhängigen Signalweg des mIgG-BZRs identifiziert (Engels et al. 2009).

1.4.3 Die Src-Homologie 3-Domänen von Btk und Grb2

SH3-Domänen sind relativ kompakte Protein-Interaktions-Domänen (zirka 60 Aminosäuren), die in vielen Signalproteinen vorhanden sind. Ihre dreidimensionale Struktur besteht aus fünf gestapelten β -Faltblättern, die über drei Bögen und eine kurze sogenannte 3_{10} -Helix verbunden sind (Yu et al. 1992; Koyama et al. 1993). Sie binden Prolin-reiche Aminosäure-Sequenzmotive, deren Kernmotiv PxxP von einer positiv-geladenen Aminosäure flankiert ist (Sparks et al. 1994; Simon und Schreiber 1995). Solche Polyprolin-Motive werden von der Bindetasche einer SH3-Domäne, welche zwei Prolin-Bindestellen (Ren et al. 1993; Yu et al. 1994) sowie eine negativ-geladene Bindestelle für die positiv-geladene Aminosäure besitzt (Feng et al. 1994; Lim et al. 1994), gebunden. Über die Anordnung der einzelnen Bindetstellen lassen sich Klasse I- und II-SH3-Domänen von atypischen SH3-Domänen unterscheiden. Klasse I-SH3-Domänen binden Motive, bei denen die positiv-geladene Aminosäure (+) N-terminal der Proline lokalisiert ist und deren Konsensussequenz +xxPxxP ist, während Klasse II-Domänen Motive mit C-terminaler positiver Ladung und der Konsensussequenz PxxPx+ in umgekehrter Orientierung binden (Mayer 2001; Zarrinpar et al. 2003). Für die Bindemotive der atypischen SH3-Domänen lässt sich keine Konsensussequenz identifizieren, weshalb sie auch als *non-consensus*-Motive bezeichnet werden (Saksela und Permi 2012).

Das Adapterprotein Grb2 besitzt zwei SH3-Domänen. Die meisten bekannten Bindepartner der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 enthalten ein Bindemotiv der Klasse II (PxxPx+), wie z.B. Sos und das Casitas-B-Zell-Lymphom-Protoonkogen (cCbl) (Feng et al. 1994; Sparks et al. 1996). Jedoch bindet diese Domäne auch Peptide der Klasse I-Konsensussequenz +xLPxxP, wobei das Leucin (L) und die beiden Proline (P) als Kontaktpunkte für die SH3-Domäne identifiziert wurden (Sparks et al. 1996). Die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 bindet Proteine mit einem atypischen Polyprolin-Motiv, das die Konsensussequenz PxxxRxxKP besitzt (Lewitzky et al. 2001), wie beispielsweise SLP65 (Grabbe und Wienands 2006). Diese unter-

schiedlichen Bindepräferenzen der beiden SH3-Domänen von Grb2 spiegeln die vielseitige Funktion des Adapterproteins wider.

Die SH3-Domäne von Btk ist ebenfalls für viele Interaktionen sowie die volle Funktionalität der Kinase unabdingbar. Aus einer Fallbeschreibung geht hervor, dass eine Deletion in diesem Bereich zum Krankheitsbild der XLA bei einem Patienten führte (Zhu et al. 1994). Als erster Ligand der Btk-SH3-Domäne wurde das Protoonkogen cCbl beschrieben (Cory et al. 1995). Weitere Bindepartner, die nach Aktivierung von Btk phosphoryliert werden, sind Vav, *Src-associated substrate in mitosis of 68 kDa* (Sam68) und *ewing sarcoma RNA-binding protein 1* (EWS) (Guinamard et al. 1997). Viele der beschriebenen Interaktionen sind nach Aktivierung von Btk nicht mehr detektierbar (Guinamard et al. 1997). Dies könnte auf die Autophosphorylierung am Tyrosin 223 an der Oberfläche der SH3-Domäne nach Aktivierung von Btk zurückzuführen sein (Park et al. 1996).

Des Weiteren wird eine intermolekulare Interaktion am ehesten in Form einer Dimerbildung zwischen der SH3-Domäne und der Prolin-reichen Region in der TH-Domäne von Btk beschrieben (Patel et al. 1997; Hansson et al. 2001a; Hansson et al. 2001b). Wie weiter oben bereits erwähnt, enthält die Prolin-reiche Region von Btk zwei Polypolin-Motive der Klasse I. Nach Untersuchungen mittels Kernspinresonanzspektroskopie und Gel-Permeations-Chromatographie scheint vor allen Dingen das N-terminale Motiv wichtig für die beschriebene Interaktion zu sein. Um jedoch diese Interaktion vollständig zu eliminieren, müssen beide Motive inaktiviert sein (Hansson et al. 2001b). Welche Rolle diese intermolekulare Interaktion für die Aktivierung von Btk spielt, ist nicht abschließend geklärt.

1.4.4 Phospholipase C γ 2 und ihre Rolle im BZR-Ca²⁺-Signalweg

Die Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) gehört zur Phospholipase C-Familie, die in die Unterformen β , γ , δ , ϵ , ζ und η eingeteilt wird. Enzyme dieser Familie hydrolysieren nach ihrer Aktivierung Phospholipide, so dass DAG und ein wasserlösliches Derivat der Phospholipid-Kopf-Gruppe, beispielsweise IP₃, entstehen (Rhee 2000). Die meisten Mitglieder der Familie sind spezifisch für bestimmte Phosphoinositole, PLC γ 2 z.B. für PIP₂.

Die Aminosäuresequenz und Struktur der Phospholipasen sind bis auf die X- und Y-Domänen, die das katalytische Zentrum formen, nicht konserviert (Rhee 2000). Die Isoformen der PLC γ -Familie besitzen als einzige zwischen den katalytischen X- und Y-Domänen noch zwei SH2-Domänen und eine SH3-Domäne, über die Protein-Protein-Interaktionen erfolgen. Des Weiteren findet man in PLC γ 1 und PLC γ 2 N-terminal der X-Domäne eine PH-

Domäne für die Membranrekrutierung sowie eine Ca^{2+} -bindende EF-Hand (Rhee 2000). C-terminal der Y-Domäne befindet sich eine C2-Domäne, eine weitere Phosphotyrosin-bindende Domäne (Engelke et al. 2013).

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Proteindomänenabfolge von PLCγ2. N-terminal (N) liegt die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), es folgt eine Ca^{2+} -bindende EF-Hand (EF) und die X-Domäne (X). Zwischen der X- und der Y-Domäne (Y) des katalytischen Zentrums liegen zwei SH2- (N-SH2, C-SH2) und eine SH3-Domäne (SH3). Den C-Terminus (C) bildet die C2-Domäne (C2).

Die Aktivierung von PLCγ1 und PLCγ2 erfolgt durch PTKs, während beispielsweise PLCβ durch G-Proteine aktiviert wird (Rhee 2000). PLCγ2 ist die Haupt-PLC-Isoform in B-Zellen (Guo et al. 2000) und ist ein Element des BZR- Ca^{2+} -Signalwegs. Nach Aktivierung durch PTKs im BZR-Signalweg hydrolysiert PLCγ2 PIP_2 in der Membran, dies führt zur Entstehung der sekundären Botenstoffe IP_3 und DAG (Kurosaki et al. 2000).

PLCγ2-defiziente Mäuse zeigen einen Xid-ähnlichen Phänotyp (Wang et al. 2000), was unterstreicht, dass PLCγ2 essenziell für die B-Zellentwicklung und -funktion ist und mit Btk in einem Signalweg liegt.

1.5 Vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe

Dr. N. Engels, Dr. L. König und weitere Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe haben in den letzten Jahren die molekularen Mechanismen der Signalverstärkung nach Stimulation von mIgG- oder mIgE-BZRs in Gedächtnis-B-Zellen untersucht. Verschiedene Ansätze haben gezeigt, dass der Signalunterschied zwischen dem mIgM- und einem mIgG-BZR auf ein konserviertes Tyrosin-Motiv, das ITT, im zytoplasmatischen Anteil von mIgG und mIgE zurückzuführen ist (Engels et al. 2009). Das ITT wird nach Stimulation der B-Zellen über den BZR phosphoryliert und bildet neben den ITAMs in $\text{Ig}\alpha/\text{Ig}\beta$ ein weiteres Signalmotiv im Bereich des Rezeptorkomplexes. Nach Inaktivierung des ITTs bleibt die Signalverstärkung aus und das verbleibende Signal ist vergleichbar mit dem des endogenen mIgM-BZRs (Engels et al. 2009). Ist das Motiv jedoch intakt und wird phosphoryliert, kommt es zur Rekrutierung des Adapterproteins Grb2 über dessen SH2-Domäne an den mIgG-BZR und nachfolgend zur Signalverstärkung (Engels et al. 2009).

Dr. L. König hat in seiner Dissertation über Experimente mit mIgG-Chimären die Rolle von Grb2 im ITT-Signalweg weiter eruiert (König 2012). Dabei zeigte sich, dass für die Fortsetzung des Signals vor allem die intakte N-terminale SH3-Domäne von Grb2, nicht aber die C-terminale SH3-Domäne, wichtig ist. Als potenzielles Effektorprotein, das die N-terminale SH3-Domäne, nicht aber die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 bindet, wurde Btk identifiziert.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Btk ist ein entscheidendes Signalmolekül im kanonischen Ca^{2+} -Signalweg des BZR. Ein Großteil der bisherigen Erkenntnisse über die Funktion von Btk stammt aus Untersuchungen in primären humanen B-Zellen von XLA-Patienten sowie in Maus- oder Hühnerzellsystemen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Btk-defizientes humanes Zelllinienmodell zu etablieren, um durch Rekonstitutionsexperimente mit mutierten Varianten der Kinase deren Funktionalität zu untersuchen.

Btk wurde auch als potenzielles Effektorprotein im ITT-Grb2-Signalweg identifiziert. Um die Funktion und Interaktionen von Btk weiter aufzuschlüsseln, habe ich in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Prolin-reiche Region von Btk und deren mögliche Interaktion mit dem Adapterprotein Grb2 gelegt.

Prolin-reiche Regionen werden von SH3-Domänen gebunden. Daher habe ich neben der Prolin-reichen Region auch die SH3-Domäne von Btk, eine weitere wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomäne, untersucht. Durch Inaktivierung verschiedener Bindemotive innerhalb dieser Domänen habe ich die Funktion bzw. Funktionalität der Domänen für den Ca^{2+} -Signalweg sowie für Protein-Protein-Interaktionen untersucht.

Neben der Untersuchung von Btks Funktion im kanonischen BZR-Signalweg war es auch Ziel dieser Arbeit, die vorangegangenen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Rolle von Btk im ITT-Signalweg zu erweitern.

Neben den funktionellen Analysen habe ich massenspektrometrische Analysen von Btk und ihrem Interaktionspartner PLC γ 2 durchgeführt, um weitere potenzielle Interaktionspartner und Phosphorylierungsstellen zu detektieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Autoklaven	Integra Bioscience, Ruhberg, Deutschland
Bakterien-Inkubator Kelvitron®	Heraeus, Hanau, Deutschland
Blotentwickler Chemi Lux Imager	Intas Systems, Göttingen, Deutschland
Blotapparatur Semiphor Transfer Unit	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Blotwippe Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Durchfluss-Zytometer FACS Calibur	BD, Franklin Lakes, NJ-USA
Durchfluss-Zytometer LSR II	BD, Franklin Lakes, NJ-USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Elektrophorese-Netzgerät EPS-301/-3501 XL	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Elektrophorese System Hoefer SE 600 Ruby	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Elektrophorese System DNA-Elektrophorese	Peglab, Erlangen, Deutschland
Elektroporator <i>Gene Pulser</i>	BioRad, München, Deutschland
Elektroporator <i>Nucleofector</i> ® II	Amixa/Lonza, Basel, Schweiz
Gefrierschrank HERAfreeze® (-80°C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gefrierschrank Platilab 340 (-80°C)	Angelantoni, Massa Martana, Italien
Gefriertruhe (-150 °C)	Panasonic Biomedical, Den Haag, Niederlande
Gel-Dokumentationssystem Gel-Imager	Intas Systems, Göttingen, Deutschland
Konfokales Laser-Mikroskop TCS SP2	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Sorvall RC 3B Plus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Mikrobiologische Werkbank Hera safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
PCR-Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter InoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, Deutschland

Photospektrometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe <i>Pipetboy</i>	Integra Bioscience, Zizers, Schweiz
Sonifier Sinopuls HD 2070	Bandelin, Berlin, Deutschland
Thermoblock <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D (RT)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY-USA
Waage BP61/H95	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasseraufreinigungssystem Milli-Q	Millipore, Billerica, MA-USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wippschüttler	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Inkubator Hera <i>Cell</i> 150	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Software, Datenbanken und Internetadressen

Tabelle 2: Software, Datenbanken, Internetadressen sowie deren Verwendungszweck

Beschreibung	Verwendungszweck
Adobe® Photoshop® CS5, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA-USA	Bildbearbeitung
BTKbase (http://structure.bmc.lu.se/idbase/)	Datenbank
CellQuest Pro, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ-USA	Durchflusszytometrie-Auswertung
Ensemble (http://ensemble.org)	Genomische Datenbank
FACS Diva, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ-USA	Durchflusszytometrie-Auswertung
Fiji Is Just ImageJ, J. Schindelin und andere, Madison, WI-USA	Bildbearbeitung
FlowJo alias 3.5.3, Tree Star, Ashland, OR-USA	Durchflusszytometrie-Auswertung
Gel-Dokumentationssoftware GDS, Intas, Göttingen, Deutschland	Agarose-Gel-Dokumentation
Intas Chemostar, Intas, Göttingen, Deutschland	Western Blot-Dokumentation
Mendeley, Mendeley Ltd./Elsevier, Amsterdam, Niederlande	Literaturverwaltungsprogramm
Microsoft Office 2011 MAC, Microsoft, Remond, WA-USA	Diagramme, Abbildungen, Text
Pubmed (http://ncbi.nlm.nih.gov)	Literaturdatenbank
UniProt (http://uniprot.org)	Proteindatenbank

2.1.3 Materialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Material	Hersteller
1,5 ml- und 2 ml-Zentrifugationsröhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Bakterienschalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bakterienkulturröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blotting-Papier Whatman™	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA-USA
Durchflusszytometrie-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Elektroporationsküvetten 4 mm	Peglab, Erlangen, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15; 50 ml)	Greiner, Kremsmünster, Oberösterreich
Filterpipettenspitzen	Greiner, Kremsmünster, Oberösterreich
Kammerdeckgläser Lab-Tek	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA-USA
Kryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster, Oberösterreich
Mikroskopierkammer Lab Tek (4-Näpfe)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA-USA
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik, Lancing, UK
Nitrozellulose (Hybond™ ECL™)	Amersham, München, Deutschland
PCR-Röhrchen (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA-USA
Photometerküvetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten (2,5; 5; 10; 25 ml)	Greiner, Kremsmünster, Oberösterreich
Pipettenspitzen (2,5; 20; 100; 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritze (10 ml)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ-USA
Sterilfilter (0,45; 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellkultur-Schalen (60, 100, 145 mm)	Greiner, Kremsmünster, Oberösterreich
Zellkultur-Napfplatten (96-, 24-, 12-, 6-Näpfe)	Greiner, Kremsmünster, Oberösterreich
Zentrifugalkonzentrator Vivaspin500	Sartorius, Göttingen, Deutschland

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Sigma Aldrich (München, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Alle Chemikalien und Reagenzien wurden nach Herstellerempfehlung gelagert.

Das Komplementsystem im fötalen Kälber-Serum (*fetal calf serum*, FCS) und Hühner-Serum (*chicken serum*, CS) wurde vor der Lagerung bei -20°C für 20 min bei 57°C hitzeinaktiviert.

Tabelle 4 :Chemikalien/Reagenzien und Hersteller

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
Ampicillin	Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
L-Arginin ·HCl	Sigma, München, Deutschland
L-Arginin ¹³ C (+6) ·HCl	Sigma, München, Deutschland
Bleomycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin)	PAA, Pasching, Österreich
CS	Sigma, München, Deutschland
dATPs	NEB, Ipswich, MA-USA
DMEM 4196 + Glutamax	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTPs	NEB, Ipswich, MA-USA
DNA Ladders GeneRuler TM 1kb	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ethanol	UMG Apotheke, Göttingen, Deutschland
FCS	Gibco, Darmstadt, Deutschland
FCS, dialysiert	PAA, Pasching, Österreich, Deutschland
<i>Gene-Pulser</i> -Puffer	BioRad, München, Deutschland
Glutathione-Sepharose	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Ibrutinib	Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
Immersionsöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Indo-1 AM	Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
IPTG (Isoprpyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Sigma, St. Louis, MO-USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamat	Gibco, Darmstadt, Deutschland
L-Lysin ·HCl	Sigma, St. Louis, MO-USA
L-Lysin 4,4,5,5-D4 (+4) ·HCl	Sigma, St. Louis, MO-USA
NuPAGE LDS <i>Sample Buffer</i> (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
NuPAGE <i>Reducing Agent</i> (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Pluronsäure	Molecular Probes (Life Technologies), Carlsbad, CA-USA
Polybrene (Hexadimethrin-bromid)	Sigma, St. Louis, MO-USA
<i>Prestained Protein Marker, Broard Range</i> (6,5 – 175 kDa)	NEB, Ipswich, MA-USA

Protease Inhibitor Cocktail (P2714)	Sigma, St. Louis, MO-USA
Protein A/G Plus-Agarose	Santa Cruz, Dalla, TX-USA
Puromycin	Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
Pyruvat (Natriumpyruvat)	Biochrome, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 + GlutaMAX™	Gibco, Darmstadt, Deutschland
SILAC-RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA-USA
Strep-Tactin-Matrix	IBA, Göttingen, Deutschland
Strep-tag Elutionspuffer	IBA, Göttingen, Deutschland
Streptavidin-Sepharose	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
TransIT®-293 <i>Transfection Reagent</i> (MIR 2700)	Mirus, Madison, WI-USA
Trypsin/EDTA (0,05%)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Kits

Invitrogen *TA Cloning® Kit* (Vektor: pCR®2.1) (K2020-20) – Invitrogen, Carlsbad, CA-USA

Human B Cell Nucleofector®Kit (VPA-1001) – Lonza, Basel, Schweiz

Promega *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (A2492) - Promega, Fitchburg, WI-USA

Promega *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (A1460) - Promega, Fitchburg, WI-USA

Promega *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (A2982) - Promega, Fitchburg, WI-USA

2.1.6 Enzyme und Enzympuffer

Die Enzyme wurden mit den jeweiligen Enzympuffern des Herstellers verwendet.

Tabelle 5: Enzyme und Hersteller

Enzym	Hersteller
<i>Calf Intestine Phosphatase</i> (CIP)	NEB, Ipswich, MA-USA
Pfu-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phusion-HF-Polymerase	Finnzymes (TFS), Espoo, Finnland
Proteinase-K	Promega, Fitchburg, WI-USA
Restriktionsenzyme	NEB, Ipswich, MA-USA
Taq-Polymerase	NEB, Ipswich, MA-USA
Taq-PCR-Master-Mix-Kit	Quiagen, Venlo, Niederlande
T4-DNA-Ligase	NEB, Ipswich, MA-USA

2.1.7 Puffer, Lösungen und Medien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Medien und Puffer bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer und Lösungen

Agarose-Gel	TAE-Puffer; 1% (w/v) Agarose; 0,01% (v/v) Ethidiumbromid; aufkochen lassen und bei 60°C lagern
Bakterien-Lysepuffer	ddH ₂ O; 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl ; 5 mM DTT; 2% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
Block-Puffer (Western Blot)	TBS-T; 5% BSA (w/v); 0,001% NaN ₃
Blot-Transfer-Puffer	ddH ₂ O; 39 mM Glycin; 48 mM Tris/HCl; 0,0375% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol
Coomassie-Lösung	45% ddH ₂ O; 0,1% Coomassie <i>Brilliant Blue</i> R250; 4% Mathanol; 10% Essigsäure
DNA-Laufpuffer (6-fach)	ddH ₂ O; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 50% (v/v) Glycerol
ECL-Lösung	4 ml Lösung A: 0,1M Tris/HCl, pH 8,6; 250 mg/l Luminol; 4°C 400 µl Lösung B: 1,1 g/l Parahydroxycoumarin in DMSO; RT 1,2 µl 30% H ₂ O ₂
Glutathion-Elutionspuffer	ddH ₂ O; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM Glutathion
Indo-1 AM	1 mM in DMSO
Krebs-Ringer-Lösung	ddH ₂ O; 140 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM D-Glukose; 10 mM HEPES pH 7,0; autoklaviert, 4°C; entweder 0,5 mM EGTA oder 1 mM CaCl ₂
Laemmli-Puffer (3x)	ddH ₂ O; 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 2 mM EDTA; 20% (v/v) Glycerol; 0,025% (w/v) Bromphenolblau; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
PBS	ddH ₂ O; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,6 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH auf 7,3 einstellen; 4°C oder RT
PBS-T	PBS; 0,1% (w/v) Tween-20
Natriumpervanadat (100x)	2,12 ml PBS; 100 µl 0,25 M Orthovanadat; 280 µl 30% H ₂ O ₂ ; 10 min bei RT inkubieren

Polybrene-Lösung	PBS; 3 mg/ml Polybrene; sterilfiltriert; bei 4°C nicht länger als 7 d verwenden
Proteinase K-Puffer	PCR-Puffer; 0,5% (v/v) Tween; 100 µg/ml Proteinase K; vor Gebrauch frisch herstellen
SDS-PAGE-Laufpuffer	ddH ₂ O; 25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin; 3,5 mM (0,1% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	ddH ₂ O; 1,5 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	ddH ₂ O; 500 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngel 10%	ddH ₂ O; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 10% (w/v) Acrylamid; 0,001% TEMED; 0,00065% APS
SDS-PAGE-Sammelgel 5%	ddH ₂ O; 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 5% (w/v) Acrylamid; 0,001% TEMED; 0,001% APS
TAE-Puffer	ddH ₂ O; 40 mM Tris/Essigsäure (HAc) pH 7,8; 10mM NaOAc; 1 mM EDTA pH 8,0
TBS-T	ddH ₂ O; 25 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 125 mM NaCl ; 0,1% (v/v) Tween-20; pH auf 7,3 einstellen
Zell-Lysepuffer	ddH ₂ O; 50 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 150 mM NaCl ; 5 mM NaF; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 0,5% NP40 ; 4°C; vor Gebrauch frisch dazu 2,5% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail

Medien

Kryo-Medium	90% hitzeinaktiviertes FCS ; 10% (v/v) DMSO ; 4°C
Kryo-Medium für PlatE	50% hitzeinaktiviertes FCS; 40% D10 ; 10% (v/v) DMSO ; 4°C
LB-Medium	ddH ₂ O; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l NaCl; pH 7,0; autoklaviert; 4°C
2xYT-Medium	ddH ₂ O; 16 g/l Trypton; 10 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l NaCl; pH 7,0; autoklaviert; 4°C
LB/2xYT-Amp-Medium	LB/2xYT-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 4°C
LB/2xYT-Kan-Medium	LB/2xYT-Medium; 50 µg/ml Kanamycin; 4°C
LB-Agar	LB-Medium; 15g/l Agar; autoklaviert; 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin (nach dem Autoklavieren und Abkühlen hinzufügen); 4°C

R10-Medium	RPMI 1640 + GlutaMAX™; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS; 0,5% (v/v) L-Glutamin (200mM); 1% (v/v) Pyruvat (100mM); 50 U/ml Penicillin ; 50 µg/ml Streptomycin; 50 µM β-Mercaptoethanol; 4°C
R11-Medium	R10-Medium; 1% (v/v) CS; 4°C
D10-Medium	DMEM 4196 + Glutamax; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS ; 0,5% (v/v) L-Glutamin (200mM); 1% (v/v) Pyruvat (100mM); 50 U/ml Penicillin ; 50 µg/ml Streptomycin
R10-SILAC-Medium „leicht“	SILAC-RPMI Medium ; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FCS ; 1% (v/v) Pyruvat (100mM); 50 µM β-Mercaptoethanol; 50 U/ml Penicillin ; 50 µg/ml Streptomycin ; 0,115 mM L-Arginine; 0,275 mM L-Lysine
R10-SILAC-Medium „schwer“	SILAC-RPMI Medium ; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FCS ; 1% (v/v) Pyruvat (100mM); 50 µM β-Mercaptoethanol; 50 U/ml Penicillin ; 50 µg/ml Streptomycin ; 0,115 mM L-Arginine ¹³ C ₆ (+6); 0,275 mM L-Lysine D4 (+4)

2.1.8 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper und Hersteller

Antigen	Ursprung	Kat.-Nr.	Hersteller
Primärantikörper für Western Blot			
Soweit nicht anders angegeben 1:1000 in TBS-T mit 3% BSA und 0,01 % NaN ₃ verdünnt			
anti-β-Aktin (1:2000)	Kaninchen	4970	Cell Signaling Technologie, Danvers, MA-USA
anti-Btk	Maus-IgG _{2a}	B80520	BD Transduction Laboratories™, Franklin Lakes, NJ-USA
anti-Btk	Kaninchen	Sc1696	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA-USA
anti-cCbl (1:5000)	Maus-IgG ₁	C40320	BD Transduction Laboratories™, Franklin Lakes, NJ-USA
anti-Dok3	Kaninchen	Sc33798	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA-USA
anti-Fyn	Kaninchen	-	unbekannt
anti-GFP	Maus-IgG ₁	-	Rosch, Risch, Schweiz
anti-Grp	Ziege	PAB6031	Abnova, Taipei City, Taiwan
anti-Grb2 (1:5000)	Maus-IgG ₁	05-372	Millipore, Billerica, MA-USA
anti-GST	Kaninchen	A-5800	Molecular Probes, Eugene, OR-USA

anti-Lyn	Kaninchen	Sc-15	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA-USA
anti-PLCy2	Kaninchen	Sc-407	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA-USA
anti-pTyr 100	Maus-IgG ₁	9411	Cell Signaling Technologie, Danvers, MA-USA
anti-pTyr 4G10 (1:500)	Maus-IgG _{2b}	05-321	Upstate/Merck Millipore, Billerica, MA-USA
anti-SHC	Kaninchen	06-203	Upstate/Merck Millipore, Billerica, MA-USA
anti-SLP65	Kaninchen	3587	Cell Signaling Technologie, Danvers, MA-USA
anti-Vav1	Kaninchen	2153	Cell Signaling Technologie, Danvers, MA-USA

Sekundärantikörper für Western Blot (1:10 000 in TBS-T verdünnt)

anti-Maus-IgG ₁ - HRPO	Ziege	1070-05	Southern Biotech, Birmingham, AL-USA
anti-Maus-IgG _{2a} - HRPO	Ziege	1080-05	Southern Biotech, Birmingham, AL-USA
anti-Maus-IgG _{2b} - HRPO	Ziege	1090-05	Southern Biotech, Birmingham, AL-USA
anti-Maus-IgG- HRPO	Ziege	1030-05	Southern Biotech, Birmingham, AL-USA
anti-Kaninchen-IgG- HRPO	Ziege	4030-05	Southern Biotech, Birmingham, AL-USA

Antikörper für Durchflusszytometrie

anti-Maus-IgG-Cy5	Ziege		Southern Biotech, Birmingham, AL-USA
anti-Human-IgM-APC	Maus		Southern Biotech, Birmingham, AL-USA
anti-Human-IgM-FITC	Ziege		Southern Biotech, Birmingham, AL-USA

Antikörper zur Stimulation des BZR

F(ab') ₂ -Fragment anti-Human-IgM	Ziege	109-006-129	Jackson Immuno Research , West Grove, PA-USA
F(ab') ₂ -Fragment anti-Maus-IgG	Ziege	115-006-071	Jackson Immuno Research , West Grove, PA-USA
Anti-Hühner-IgM (M4)	Maus-IgM _k	8300-01	Southern Biotech, Birmingham, AL-USA und unser Labor (I.Heine)

2.1.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen

Name	Sequenz (5' → 3')
Primer für den Btk-Targeting-Vektor	
Btk-LA fwd 1	tttctgaattctgttgctccataggg
Btk-LA rev 1	gatgaattcctactccagaatcactgcggccatagc
Btk-RA fwd 1	gatctcgagattacaggcgtgagccaccactgg
Btk-RA rev 1	gatctcgagctcacctgaaaggataagggaacc
Sequenzierprimer für den Btk-Targeting-Vektor	
Btk-RA fwd 13061	caagctatgtatgagagtgcc
Btk-LA fwd 8149	cctttcacaataagtaccac
Btk-LA fwd 8884	gtggtatgattacagggtc
Btk-LA fwd 9602	acggagtctcgctctgttg
Btk-tar DTA 1476	taccggtggatgtggaatgt
Btk-tar LA 4974	ggatgaggattaatgtcctgg
Btk-tar lp 7452	cagtaacagcttccacatc
Btk-Mutagenese-Primer	
hBtk-W251K fwd	gaaagcaacttaccaaagtggagagcacgagat
hBtk-W251K rev	atctcgtgctctccactttggtaagttgctttc
hBtk-LPPV1 fwd	ggaagacaaaaagcctcctgtccaacgcctgaggag
hBtk-LPPV1 rev	ctcctcaggcgttggacaggaggctttttgtcttc
hBtk-LPPV2 fwd	gatcttgaaaaagccaccagtgcctgagccagcagcag
hBtk-LPPV2 rev	ctgctgctggctcaggcactgggtggcttttcaagatc
PCR-Primer	
hBtk-Bam fwd	gaaggatccgccgagtgattctggagagc
hBtk-TH-Xho rev	gatctcgagtcactcacttgtggagactggtgc
hBtk-PHN-Xho rev	gatctcgagtcattggaggaggattttttcaggaac
hBtk-528-Bam fwd	gaaggatccaacagtgatctggttcagaaa
hBtk-639-Bam fwd	gaaggatccaatggaagcttaaaacctggg
hBtk-SH3 fwd-2	ccggaattcgagccagcagcagcaccagtc
hBtk-SH3 rev	gatcctcgagttaggagtcttctgcagtgc
hTec-Bam fwd	gaaggarccaattttaacactattttgag

hTec-Bam rev	gaaggatccttatcttccaaaagtttcttc
Allgemeine Sequenzierprimer	
M13-fwd	tgtaaaacgacggccagt
M13-rev	caggaaacagctatgacc
pEGFP-C1-fwd	gtcctgctggagttcgtg
pMSCV-rev	cagcggggctgctaaagcgcgatgc

2.1.10 Vektoren und Konstrukte

Tabelle 8: Vektoren und Konstrukte

Vektor	Insert	Herkunft
Vektoren für Klonierung		
pCR2.1	-	Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
	hBtk (WT und Mutanten)	In dieser Arbeit
	hTec	In dieser Arbeit
pCRII-TOPO	-	Invitrogen, Carlsbad, CA-USA
	Lox-puro	Dr. N. Engels
	DTA	Dr. N. Engels
pGEX-4T1	-	GEHealthcare, Chalfont St Giles, UK
pMSCVpuro	-	Clontech, Mountain View, CA-USA
pABEspuro-N-One-Strep	-	Dr. T. Oellerich/ Dr. K. Neumann
Expressionsvektoren		
pABEspuro-N-One-Strep	hBtk	In dieser Arbeit
	hTec	In dieser Arbeit
	rPLCy2-T7	Dr. E. Chebbok (ehemals Pavlova)
pMSCVpuro-Citrine-C1	-	Dr. V. Bremes
	hBtk (WT und Mutanten)	In dieser Arbeit
	hTec	In dieser Arbeit
pCre	-	Dr. J. Lutz
pHCMV-VSV-G	-	Dr. M. Jücker

Targeting-Vektor		
pCRII-TOPO-DTA-LA hBTK-lox puro-RA hBtk		In dieser Arbeit
Vektoren für GST-Fusionsproteine		
pGEX-4T1	Btk-PHTH (WT)	In dieser Arbeit
	Btk-BMPRR (WT, LPPV-Mut.)	In dieser Arbeit
	Btk-PRR (WT, LPPV-Mut.)	In dieser Arbeit
	Btk-SH3 (WT, W251K)	In dieser Arbeit
	Grap-C-SH3 (WT, W195K)	Dr. L. König
	Grap-N-SH3 (WT, W36K)	Dr. L. König
	Grb2-C-SH3 (WT, F165A)	Dr. L. König
	Grb2-N-SH3 (WT, W36K)	Dr. L. König

2.1.11 Peptide

Tabelle 9: Biotinylierte Peptide

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
Btk-Pro1-WT	Biotin-NH-KTKKLPPTPEED-COOH	Eurogentec, Seraing, Belgien
Btk-Pro1-LPPV	Biotin-NH-KTKKPPVPTPEED-COOH	Eurogentec, Seraing, Belgien
Btk-Pro2-WT	Biotin-NH-ILKKPLPPEAAAA-COOH	Eurogentec, Seraing, Belgien
Btk-Pro2-LPPV	Biotin-NH-ILKKPPVPEAAAA-COOH	Eurogentec, Seraing, Belgien

2.1.12 Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinien

Ramos (DMSZ-Nr.: ACC 603)

Ramos ist eine humane Epstein-Barr-Virus (EBV)-negative B-Lymphozyten-Zelllinie. Die Zellen wurden 1972 aus dem Aszites-Punktat eines 3-jährigen Patienten mit sporadischem Burkitt-Lymphom isoliert. Sie tragen die Translokation (8;14) IgH/MYC und p53-Mutationen. Ihr BZR besteht aus IgH vom Typ μ und IgL vom Typ λ (Klein et al. 1975).

DG75 (DMSZ-Nr.: ACC 83)

DG75 ist eine humane B-Lymphozyten-Zelllinie, die EBV-negativ ist. Sie wurde 1975 aus den Burkitt-Lymphom-Zellen eines 10-jährigen pädiatrischen Patienten etabliert. Die Zellen exprimieren Rezeptoren aus μ -schweren und κ -leichten Ketten (Ben-Bassat et al. 1977).

In dieser Arbeit wurden zusätzlich Btk-defiziente (DG75 Btk^{-/-}; diese Arbeit) verwendet.

DG75 EcoBlast (EB) und DG75 Btk^{-/-} EcoBlast (EB) (Dr. L. König/ Dr. N. Engels)

DG75-Zellen und DG75 Btk^{-/-}-Zellen, die durch stabile Transfektion mit der cDNA des murinen kationischen Aminosäuretransporter 1 (slc7a1) für eine Infektion durch den *moloney murine leukemia virus* (MMLV), welcher von PlatE-Zellen freigesetzt wird, empfänglich gemacht wurden. Durch diese Modifikation wird eine höhere Infektionsrate der Zellen erreicht.

DT40 (DMSZ-Nr.: ACC 636)

Die DT40-Zelllinie ist eine Hühner-B-Lymphozyten-Linie, die durch Infektion eines Hyline SC-Huhns mit dem Aviären Leukosevirus und anschließender Isolierung der Zellen aus einem Lymphom der Bursa entstanden ist (Baba und Humphries 1984). Sie besitzen einen mIgM-BZR auf der Oberfläche. DT40-Zellen eignen sich besonders für *Gen-Targeting*-Versuche, da sie eine hohe Rate für homologe Rekombination aufweisen (Winding und Berchtold 2001). In dieser Arbeit wurden außerdem Btk-defiziente DT40-Zellen (DT40 Btk^{-/-}, Takata und Kurosaki 1996) verwendet.

PlatinumE (PlatE)

Die Verpackungszelllinie PlatE basiert auf der *human embryonic kidney* (HEK) 293T-Zelllinie. PlatE-Zellen wurden mit einem Konstrukt aus den MMLV-Genen *gag*, *pol* und *env* unter einem EF1 α -Promotor versehen (Morita et al. 2000). In dieser Arbeit wurden die Zellen zur Produktion von Retroviren zur anschließenden retroviralen Infektion von Zelllinien genutzt.

Bakterienstämme***Escherichia coli* (*E. coli*) Top10F'** (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA)

Der *E. coli*-Stamm Top10F' ist ein chemokompetenter Stamm, der zum Amplifizieren von Plasmiden genutzt wurde.

Genotyp: F'[lacIq Tn10(tetR)] mcrA *(mrr-hsdRMS-mcrBC) +80lacZ*M15 *lacX74
deoR nupG recA1 araD139 *(ara- leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 , -

GeneHogs® *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA)

GeneHogs sind ein elektrokompetenter *E. coli*-Stamm, der sich besonders zum Amplifizieren größerer Plasmide (>12 kB) eignet. Die in dieser Arbeit verwendeten *GeneHogs* waren durch Modifikation zusätzlich chemokompetent und wurden mir von Dr. J. Lutz zur Verfügung gestellt.

Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2 (*confers phage T1 resistance*)

***E. coli* BL21 (DE3)** (Novagen, Darmstadt, Deutschland)

Der *E. coli* BL21-Stamm ist ein chemokompetenter Stamm, der für die Expression von GST-Fusionsproteinen genutzt wurde.

Genotyp: F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-), (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1sam7 nin5])

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Gewinnung von genomischer DNA aus DG75-Zellen

Die für die Amplifizierung der Sequenzarme des Targeting-Vektors benötigte genomische DNA wurde aus DG75-Zellen gewonnen. Dazu wurden 1×10^6 Zellen von der Suspensionszellkulturplatte abgenommen und einmalig mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in Proteinase-K-Puffer (200 µl auf 1×10^6 Zellen) resuspendiert und bei 56°C für 45 min inkubiert. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz bei 95°C für 10 min denaturiert. Für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden, anders als in dem unten beschriebenen Standardprotokoll der PCR (siehe 2.2.1.2), 2 µl des hergestellten Zellextrakts pro 50 µl PCR-Ansatz benötigt.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Zur *in vitro*-Amplifizierung bestimmter DNA-Fragmente aus genomischer oder Plasmid-DNA wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurde ein Reaktionsgemisch angesetzt, welches dann einem programmierten Amplifikationszyklus in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zugeführt wurde. Standardmäßig wurde die Phusion-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-*Primer* wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind unter 2.1.9 aufgeführt.

PCR-Reaktionsansatz (50 µl):

Volumen (µl)	Reagenz
1	Matrize (<i>template</i> ; 50-250 ng/µl)
10	5xPhusion-HF-Puffer
1	dNTP-Mix (je 25 mM)
1	Vorwärts- <i>Primer</i> (10 µM)
1	Rückwärts- <i>Primer</i> (10 µM)
35,5	ddH ₂ O
0,5	Phusion-Polymerase

Amplifikationsprogramm:

1. Initialisierung	1 min, 98°C	
2. Denaturierung	15 s, 98°C	
3. <i>Primer</i> -Anlagerung	30 s, 58-62°C	} 33x
4. Elongation	15-30 sek/1000 bp, 72°C	
5. Terminierung	5 min, 72°C	

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, die dem PCR-Produkt entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA mittels *Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Fitchburg, WI-USA) extrahiert.

2.2.1.3 Gezielte Mutagenese mittels Mutagenese-PCR

Mit Hilfe der PCR lässt sich eine gezielte Mutagenese durchführen. Das dazu benötigte *Primer*-Paar wurde so konstruiert, dass es die gewünschten Codon-Änderungen enthielt. Um ein möglichst fehlerfreies Anlagern der *Primer* zu gewähren, sollte das veränderte Codon durch jeweils zirka fünfzehn Basenpaare flankiert werden. Der zu mutierende DNA-Abschnitt

sollte Teil eines zirkulären Vektors sein. Die Amplifikation der Matrize erfolgte durch eine DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion, in der Regel durch die Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Dabei wurde immer der gesamte Vektor amplifiziert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Polymerase.

PCR-Reaktionsansatz (50 µl):	Volumen (µl)	Reagenz
	1	Matrize (<i>template</i> ; 50-250 ng/µl)
	5	10xPfu-Puffer
	1	dNTP-Mix (je 25 mM)
	1	Mutagenese-Vorwärts- <i>Primer</i> (12,5 µM)
	1	Mutagenese-Rückwärts- <i>Primer</i> (12,5 µM)
	40,5	ddH ₂ O
	0,5	Pfu-Polymerase

Amplifikationsprogramm:	1. Initialisierung	1 min, 95°C	} 20x
	2. Denaturierung	30 s, 95°C	
	3. <i>Primer</i> -Anlagerung	30 s, 55°C	
	4. Elongation	2 min/1000 bp, 68°C	
	5. Terminierung	5 min, 68°C	

Die durch die PCR entstandenen Kopien sollten die Mutation enthalten. Zur Kontrolle der PCR wurde die Hälfte des PCR-Ansatzes und der Negativkontrolle auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die andere Hälfte wurde jeweils zur Zerstörung der parentalen DNA mit 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (NEB, Ipswich, MA-USA) für 1 h bei 37°C inkubiert. *DpnI* schneidet innerhalb der DNA-Sequenz GATC allerdings nur, wenn Adenin (A) methyliert vorliegt. Die Methylierung kann nur in Bakterien erfolgen, dadurch bleibt die amplifizierte DNA intakt. Von diesem Spaltungsansatz wurden dann jeweils 2 µl in *E. coli* Top10F' transformiert. Eine DNA-Sequenzkontrolle (siehe 2.2.1.12) erfolgte nach Isolierung der Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur (siehe 2.2.1.10).

2.2.1.4 Thymin-Adenin (TA)-Klonierung

Alle PCR-Produkte, außer die der Mutagenese-PCR, wurden zur Sicherung mit dem Invitrogen *TA Cloning® Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA) in den pCR2.1-Vektor kloniert. Die offene

Insertionsstelle des Vektors ist an den 3'-Enden mit einem Thymin-Überhang versehen. Dadurch wird eine Religation verhindert und durch einen 3'-Adenin-Überhang an der einzufügenden DNA eine hohe Insertionseffizienz erreicht. Zum Anfügen des benötigten Adenin-Überhangs am 3'-Ende wurde das PCR-Produkt nach der Aufreinigung aus dem Agarose-Gel mit 1 U Taq-DNA-Polymerase (NEB, Ipswich, MA-USA), Taq-Puffer und dATPs (Zielkonzentration 0,2 mM) für 20 min bei 72°C inkubiert. Nachfolgend wurde die DNA mittels Promega *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Fitchburg, WI-USA) aus dem Ansatz isoliert und für die TA-Klonierung benutzt. Die TA-Klonierung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt und das Produkt anschließend in kompetente Bakterien transformiert (siehe 2.2.1.8).

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Basenpaarlänge benötigt. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden Agarosekonzentrationen von 0,7% - 2% (in der Regel 1%) für das Gel angesetzt. Hierzu wurde die Agarose mit Hilfe von Erhitzen in der Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst und 0,1% (v/v) Ethidiumbromid zur späteren Visualisierung der DNA dazugegeben. Nach ausreichendem Mischen wurde die warme Agaroselösung in die Trägerform gefüllt und mit einem Taschenkamm versehen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer (Peglab, Erlangen, Deutschland) gelegt und die Geltaschen wurden mit den Proben geladen. Zu den Proben wurde zuvor die entsprechende Menge eines 6-fach konzentrierten DNA-Lade-Puffers dazugegeben, um ein Aufsteigen aus den Geltaschen zu verhindern. Der Größenstandard (DNA *Ladders GeneRuler* von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde ebenfalls in eine freie Geltasche aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde dann bei 1,2 V/cm² durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Gel anschließend unter UV-Exposition (302 nm Wellenlänge) fotografiert.

2.2.1.6 DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel

Zur Extraktion der gewünschten DNA aus dem Agarose-Gel wurde die entsprechende Bande aus dem Gel mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und die DNA mittels Promega *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Fitchburg, WI-USA) extrahiert. Die Elution der DNA aus der Promega-Säule erfolgte mittels 20 µl ddH₂O.

2.2.1.7 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Bakterienstämme wurden von I. Heine und G. Sonntag aus unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe der CaCl_2 -Methode chemokompetent gemacht, wie in Inoue et al. (1990) beschrieben. Anschließend wurden die Bakterien in 50 μl -Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.8 Hitzeschock-Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Hitzeschock-Transformation wurde ein Aliquot (50 μl) der chemokompetenten *E. coli*-Top10F'-Zellen auf Eis langsam aufgetaut und 10-50 ng Plasmid-DNA wurden dazugegeben. Die Zellen wurden nun 20-30 min mit der DNA auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 45 sek dem 42°C -Hitzeschock ausgesetzt und danach sofort wieder für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Selektivagar ausplattiert. Sollte die Selektion mittels Kanamycin erfolgen, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren mindestens 30 min bei 37°C in 900 μl antibiotikafreiem LB-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 min bei 8000 rpm pelletiert, der Überstand abgenommen und die Zellen auf Kanamycinagar ausplattiert.

Vor dem Aufbringen von mit pCR2.1-Vektoren transformierten Bakterien wurde die Selektivagarplatte zusätzlich mit 40 μl X-Gal (40 mg/ml; Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 40 μl IPTG (100 mM; Sigma, München, Deutschland) beschichtet. Bei Ligation des Vektors unter Ausbleiben der Insertion eines DNA-Fragments wird unter IPTG-Stimulation das Enzym β -Galaktosidase exprimiert. Dieses hydrolysiert das X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, welches zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie führt. Findet jedoch eine Insertion statt, wird die β -Galaktosidase nicht exprimiert und die Kolonie bleibt weiß. So kann zwischen Kolonien, die den Vektor mit oder ohne DNA-Fragment enthalten, unterschieden werden.

2.2.1.9 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB- oder 2xYT-Medium, welches ein geeignetes Selektions-Antibiotikum enthielt. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Selektions-Antibiotikum ausgestrichen, über Nacht bei 37°C kultiviert und bei 4°C gelagert. Für die langfristige Lagerung wurden 500-800 μl *E. coli*-Kultur in ein autoklaviertes Mikrozentrifugationsröhrchen mit 500 μl Glycerol gegeben, gründlich gemischt und bei -80°C gelagert.

2.2.1.10 Herstellung der Plasmid-DNA

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurden einzelne transformierte Bakterienklone über Nacht bei 37°C in LB- oder 2xYT-Medium in Gegenwart eines Selektions-Antibiotikums kultiviert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte am nächsten Tag aus 2-4 ml der Kultur mit dem Promega *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Fitchburg, WI-USA) oder aus 50-100 ml Kultur mit dem Promega *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, Fitchburg, WI-USA) und zwar jeweils nach dem Hersteller-Protokoll. Um die DNA von der Promega-Säule zu eluieren, wurden je nach Protokoll 50 µl oder 600 µl ddH_2O verwendet.

2.2.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde mittels Photospektrometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in einer 1:100-Verdünnung der zu messenden Probe die Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzkontrolle der klonierten und mutierten DNA-Fragmente erfolgte eine Sequenzierung mittels Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977) durch die Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland).

2.2.1.13 Restriktionsenzymspaltung

Präparativer Verdau:

Zur Vorbereitung von Klonierungen wurden *Insert* und Zielplasmid mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten. Dazu wurden jeweils 2-3 µg Plasmid-DNA mit den benötigten Restriktionsenzymen und dem dazu passenden Puffer in 50 µl Gesamtvolumen für 2-3 h inkubiert. Für die genauen Inkubationsbedingungen und Pufferzusammensetzungen wurden die Empfehlungen des Herstellers NEB (Ipswich, MA-USA) herangezogen.

Wenn nach dem Restriktionsverdau die beiden Enden des Vektor-Rückgrats kompartibel zueinander waren, z.B. wenn nur ein Enzym zur Spaltung des 5'- und des 3'-Endes eingesetzt wurde, wurde zur Verringerung der Selbstligationstendenz eine Dephosphorylierung des 5'-Endes des Zielplasmids vorgenommen. Hierfür wurde der gesamte Vektor-Restriktionsansatz für 15-30 Minuten mit 10 U der alkalischen Phosphatase CIP (NEB, Ipswich, MA-USA) bei 37°C inkubiert. Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurde eine Gelelektrophorese nach 2.2.1.5 durchgeführt und die DNA extrahiert (siehe 2.2.1.6).

Kontrollverdau:

Zur Kontrolle von Plasmid-DNA wurden Restriktionsenzymsspaltungen durchgeführt. Standardmäßig wurden hierfür 3 µl Plasmid-DNA in einem 25 µl Gesamtvolumen (2,5 µl 10xNEB-Puffer, je 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (NEB, Ipswich, MA-USA) und ddH_2O) inkubiert. Die Kontrolle der Fragmente erfolgte über eine Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.5).

Linearisierung von Vektoren

Plasmid-DNA zur Elektroporation von eukaryotischen Zellen wurde zuvor durch eine Restriktionsspaltung linearisiert. Dazu wurden in 350-500 µl Restriktionsansatz 30-40 µg DNA mit dem Enzym *PvuI* (NEB, Ipswich, MA-USA), welches Ampicillin-Plasmide in der Ampicillin-Kassette spaltet, nach Herstellerangaben mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde über mehrere Säulen des Promega *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Fitchburg, WI-USA) (maximal 20 µg DNA/Säule) aus dem Restriktionsansatz isoliert und durch zweimaliges Inkubieren jeder Säule mit den gleichen 30 µl Elutionspuffer eluiert, um eine möglichst hohe DNA-Konzentration zu erreichen.

2.2.1.14 Ligation

Vor einer Ligation wurden *Insert* und Vektor mit denselben oder kompatiblen Restriktionsenzymen behandelt (siehe 2.2.1.13). Für eine Ligation wurden die geschnittene Vektor-DNA und die *Insert*-DNA im Verhältnis 1:3 zusammen mit T4-Ligase und T4-Ligase-Puffer (NEB, Ipswich, MA-USA) über Nacht bei 14°C oder für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligationsansatz (10 µl):	<u>Volumen (µl)</u>	<u>Reagenz</u>
	1	Vektor-DNA
	3	<i>Insert</i> -DNA
	1	T4-Ligase-Puffer (10x)
	4,5	ddH_2O
	0,5	T4-DNA-Ligase

Parallel dazu wurden zwei Kontrollen angesetzt: Zum einen eine Religationskontrolle ohne die Zugabe von *Insert*-DNA, zum anderen eine reine Vektorkontrolle ohne Zugabe von *Insert*-DNA und Ligase, um zu untersuchen, ob der Vektor vollständig linearisiert war. Alle drei Ansätze wurden nach der Inkubationszeit in *E. coli* Top10F' transformiert und auf Selektionsagar ausplattiert (siehe 2.2.1.8).

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Stimulation von B-Zellen über deren BZR

Die Zellen wurden von den Suspensionsplatten abgenommen, in 50 ml-Röhrchen gegeben und mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in vorgewärmtem RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen und 20 min bei 37°C inkubiert, um die stimulierenden Effekte des FCS zu minimieren. Danach wurden die Zellen mit frischem vorgewärmten Medium ohne Zusätze auf $3-5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt, auf 1,5 ml-Zentrifugationsröhrchen verteilt und erneut 10 min bei 37°C inkubiert. Um eine unspezifische Stimulation durch zu engen Zell-Zell-Kontakt zu vermeiden, wurden die Röhrchen mit den Zellen während der Inkubation mehrfach vorsichtig invertiert.

Die Stimulation erfolgte dann mit 10 µg/ml anti-Human-IgM F(ab')₂-Fragmenten (Jackson Immuno Research, West Grove, PA-USA) für 3-30 min (je nach Versuch) bei 37°C.

2.2.2.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen von den Suspensionsplatten geerntet, gezählt und nach einmaligem Waschen mit PBS in Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert, der Überstand vollständig abgenommen und die Zellen mit 20 µl Lysepuffer/ 10^6 Zellen für mindestens 10 min auf Eis lysiert.

Zur Herstellung von Lysaten aus stimulierten Zellen wurden die Zellen, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, vorbereitet und stimuliert. Zum Beenden der Stimulation wurden die Zellen 30 sek vor Ablauf der Zeit pelletiert, das Medium vollständig entfernt und die Zellen mit 20 µl Lysepuffer/ 10^6 Zellen, wie oben beschrieben, lysiert.

Nach Ablauf der Lysezeit wurden die Zelllysate in einer gekühlten Zentrifuge (4°C) bei 16.000 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das geklärte Zelllysate von den sedimentierten Zellresten abgenommen und für den weiteren Gebrauch in ein frisches Mikrozentrifugationsröhrchen auf Eis gegeben.

Zur Vorbereitung der Lysate für SDS-PAGE wurde von den geklärten Lysaten entweder ein Volumen von 30 µl abgenommen oder das gesamte Volumen 2:1 mit Laemmli-Puffer (3x) gemischt und bei 95°C für 5 min zur Denaturierung der Proteine gekocht.

2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*)

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach der molekularen Masse der einzelnen Proteine wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Gele hierfür wurden für jeden Versuch frisch hergestellt. Wegen der besseren Auftrennung der Proteine wurde für die meisten Versuche das vertikale SE 600 Ruby-System von Amersham Biosciences/GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK) mit einer Gelgröße von 18 x 16 cm benutzt. Das 10%ige Trenngel und das 5%ige Sammelgel wurden wie folgt angesetzt:

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
AA/BAA 17,5:1	8-12%	5%
Tris, pH 8,8	375 mM	-
Tris, pH 6,8	-	125 mM
SDS	0,1%	0,1%
APS	0,00065%	0,001%
TEMED	0,001%	0,001%
in ddH_2O		

APS und TEMED wurden jeweils kurz vor dem Gießen des Gels dazugegeben, um die Polymerisationsreaktion zu starten. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Gel in eine vorgesehene Halterung eingespannt und das System mit SDS-Laufpuffer befüllt. Nach dem Denaturieren der Proben in Laemmli-Puffer wurden diese in die Taschen des Gels überführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (NEB, Ipswich, MA-USA) mit aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde zunächst für 1 h bis zum Durchlaufen des Sammelgels bei 10–20 mA/Gel durchgeführt, anschließend wurde die Stromstärke für weitere 3–4 h auf 30–60 mA/Gel erhöht. Im Anschluss wurden die Gele entweder in Coomassie-Lösung (siehe 2.2.2.4) gefärbt oder für einen Western Blot (siehe 2.2.2.5) verwendet.

2.2.2.4 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Zur Bestimmung von Proteinmengen wurden SDS-PAGE-Gele nach der Elektrophorese mittels Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt. Dazu wurden die Gele in zirka 10 ml Coomassie-Lösung für 30 min inkubiert, dabei lagert sich das Coomassie an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an. Anschließend wurde überschüssiges Coomassie durch Waschen mit Wasser

aus dem Gel entfernt. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mittels Scanner und Photoshop.

2.2.2.5 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine nach einer SDS-PAGE durch eine Elektrophorese aus dem SDS-Gel heraus auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert und so weiteren Analysen durch Immunfärbung zugänglich gemacht. In dieser Arbeit wurde dafür die *semi-dry* Methode benutzt. Dazu wurden in Transferpuffer getränktes Whatman-Filterpapier, eine Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und eine weitere Schicht getränktes Filterpapier auf der Anode der Blot-Kammer (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) in dieser Reihenfolge geschichtet. Durch vorsichtiges Ausstreichen wurden Luftblasen zwischen den Schichten entfernt. Anschließend wurde die Blot-Kammer durch das Auflegen der Kathode verschlossen. Zum Blotten wurde für 60 min eine Stromstärke von 1 mA/cm^2 bei 16 V angelegt.

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur mit Block-Puffer inkubiert. Durch das BSA im Block-Puffer werden unspezifische Bindungsstellen für Proteine (z.B. Antikörper) blockiert. Anschließend wurden die Membranen ausgiebig mit TBS-T gewaschen und bis zur Immunfärbung in TBS-T bei 4°C gelagert.

2.2.2.6 Immunfärbung von Western Blots

Die Immunfärbung wird in zwei Schritten durchgeführt und ermöglicht eine spezifische Markierung von Proteinen auf dem Western Blot. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran zunächst entweder für 1-3 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit einem in TBS-T verdünnten Primärantikörper (für Verdünnungen siehe 2.1.8) auf einer Wippe inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils mindestens 10 min wurde ein Peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper in einer 1:10000-Verdünnung in TBS-T auf die Membran gegeben und für 1 h auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch die Fc-Region des Primärantikörpers. Überschüssiger Antikörper wurde im Anschluss durch ausgiebiges Waschen (mindestens 5 x 10 min) mit TBS-T von der Membran entfernt.

Zur Detektion wurden 4 ml frische ECL-Lösung angesetzt und kurz vor dem Entwickeln auf die Membran gegeben. Durch die Peroxidase am Sekundärantikörper kommt es zu einer lichtemittierenden Reaktion, die durch das ChemiLux *Imager* System (Intas, Göttingen) detektiert wurde. Die Dokumentation und Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Program-

men Chemostar (Intas, Göttingen, Deutschland) und Fiji (J. Schindelin und andere, Madison, WI-USA).

Durch Inkubation der Membran mit 0,01%igem Natriumazid (NaN_3) in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur wurde die Peroxidase inaktiviert, und es konnte die Immunfärbung eines weiteren Proteins angeschlossen werden.

2.2.2.7 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Expression und Ermittlung der optimalen Expressionsdauer

Zur Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen wurde zunächst die cDNA der gewünschten Proteinuntereinheit mittels PCR amplifiziert und in den pGEX-Expressionsvektor (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) kloniert. Die Expression des GST-Fusionsproteins steht in diesem Vektor unter Kontrolle eines tac-Promotors, sodass die Expression durch Zugabe des Laktose-Analogons IPTG (Sigma, München, Deutschland) induziert werden konnte. Nach der Klonierung wurde der *E. coli*-Expressionsstamm BL21 mit diesen fertigen Plasmiden, wie unter 2.2.1.8 beschrieben, transfiziert. Aus einzelnen Klonen wurden am nächsten Tag jeweils eine 3 ml-Übernachtskultur angesetzt. 1,5 ml dieser Kultur wurden dann in 50 ml 2xYT-Medium mit Ampicillin gegeben und bis zu einer bestimmten photometrischen Kulturdichte, gemessen als OD_{600} von zirka 0,6, bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Kulturdichte wurden die Bakterien mittels Zugabe von 0,1 mM IPTG zur Expression der Fusionsproteine stimuliert und weiter bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Um die optimale Expressionsdauer zu bestimmen, wurden zunächst stündlich, im Verlauf dann halbstündlich je 1 ml der Kultur entnommen, die OD_{600} bestimmt und die Probe anschließend auf Eis gestellt. Je nach gemessener photometrischer Dichte wurde die Expression nach 3-3,5 h beendet, indem die Kulturen in 15 ml-Röhrchen überführt, in einer gekühlten Zentrifuge bei 3000 rpm pelletiert und die Bakterienpellets bei -80°C eingefroren wurden.

50 µl der zuvor entnommenen Proben wurden pelletiert und das Pellet anschließend mit 20 µl Laemmli-Puffer (3x) versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und für eine SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) mit anschließender Coomassie-Färbung genutzt (siehe 2.2.2.4). Der Rest der Probe wurde für 5 min bei 4800 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Bakterienlysepuffer resuspendiert. Nach 30 sek Ultraschall-Lyse wurde Triton-X 100 (1% v/v) zur weiteren Lyse dazugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei

16000 x g und 4°C zentrifugiert, das geklärte Lysat abgenommen und auf Eis gelagert. Zeigte sich im Probegel (siehe oben) eine erfolgreiche Expression, wurden die geklärten Lysate für eine Probeaufreinigung der GST-Fusionsproteine mit 30 µl Gluthation-Sepharose (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) genutzt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 4°C wurde die Gluthation-Sepharose zwei Mal mit Bakterienlysepuffer mit Triton-X 100 (1% v/v) gewaschen und 3 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 30 µl Laemmli-Puffer (3x) aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wurde, wie unter 2.2.2.3 und 2.2.2.4 beschrieben, durchgeführt und somit die Menge des aufgereinigten Fusionsproteins verglichen. Die optimale Expressionsdauer lag in der Regel bei 3-3,5 h, so dass die am Versuchsende hergestellten Bakterienpellets (siehe oben) für die tatsächliche Aufreinigung genutzt werden konnten.

Einige GST-Fusionsproteine wurden bei 37°C nur schlecht durch die Bakterien exprimiert. In diesen Fällen konnte die Expression durch Verringerung der Inkubationstemperatur nach der Induktion auf 30°C verbessert werden.

Aufreinigung der GST-Fusionsproteine für eine Affinitätschromatographie

Das am Ende der Expressionsinduktion entstandene bzw. eingefrorene Bakterienpellet wurde in 2 ml Bakterienlysepuffer resuspendiert, die Suspension drei Mal für 30 sek mittels Ultraschall lysiert und mit Triton-X 100 (1% v/v) für 10 min auf Eis inkubiert. Das Bakterienlysat wurde auf Zentrifugationsröhrchen verteilt und 45 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Das geklärte Lysat wurde mit insgesamt 200-250 µl Glutathion-Sepharose (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) über Nacht bei 4°C inkubiert und die Sepharose anschließend drei Mal mit Bakterienlysepuffer gewaschen. Zu dem Glutathion-Sepharose-Pellet wurde das gleichen Volumen Lysepuffer mit Natriumazid (NaN_3 , 0,01% v/v) dazugegeben.

Die Konzentration der isolierten GST-Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung geschätzt (siehe 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Dazu wurden jeweils 5 und 10 µl der Glutathion-Sepharose-Suspension mit Laemmli-Puffer (3x) bei 95°C für 5 min erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zum Konzentrationsvergleich wurden 2, 5 und 10 µg BSA in Lösung ebenfalls mit Laemmli-Puffer (3x) versetzt, erhitzt und aufgetragen.

2.2.2.8 GST-Fusionsprotein-Chromatographie

Für die GST-Fusionsprotein-Chromatographie wurden aus je $2-2,5 \times 10^7$ Zellen Lysate, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, hergestellt. Die Zelllysate wurden dann mit 20 µg des an Gluta-

thion-Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteins (aus 2.2.2.7) für mindestens 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Lysepuffer und Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 500 x g wurde das Pellet mit 20 µl Laemmli-Puffer (3x) versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden über SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) mit anschließendem Western Blot (siehe 2.2.2.5) und Immunfärbung (siehe 2.2.2.6) auf Bindepartner des verwendeten GST-Fusionsproteins analysiert.

2.2.2.9 Affinitätschromatographie mittels biotinylierter Peptide

Die biotinylierten Peptide der Polyprolin-Motive von Btk wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen. Zunächst wurden die Peptide in PBS gelöst, es wurde eine 4 mM Lösung hergestellt. Um ein häufiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, wurden die gelösten Peptide weiter verdünnt, 1 mM-Aliquots hergestellt und bei -80°C eingefroren.

DG75-Zellen wurden, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, geerntet und für 3 min über den BZR stimuliert. 30 sek vor Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen pelletiert, das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, lysiert. Pro Ansatz wurden 5×10^7 Zellen verwendet.

Die geklärten Zelllysate wurden vereint und nachfolgend auf vier Zentrifugationsröhrchen (1 Ansatz pro Peptid) aufgeteilt. Um später einer unspezifischen Aufreinigung über die Streptavidin-Matrix vorzubeugen, wurden zunächst 50 µl Streptavidin-Sepharose (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) zu den Lysaten gegeben und für 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde der Überstand von der Sepharose abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die vorbereiteten biotinylierten Peptide wurden nun in einer Konzentration vom 1 µM (bzw. 17 µM) den Lysaten zugefügt und dies für 30 min bei 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss erfolgten die Zugabe von 50 µl Streptavidin-Sepharose und eine erneute Inkubation bei 4°C für 1h. Das Biotin der Peptide bindet an die Streptavidin-Sepharose, wodurch die Peptide im nächsten Schritt isoliert werden können.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Streptavidin-Sepharose vorsichtig pelletiert und dreimalig mit Lysepuffer gewaschen. Zur Vorbereitung auf eine SDS-PAGE wurde die Sepharose mit 50 µl Laemmli-Puffer (3x) versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt. Der gesamte Ansatz wurde für die SDS-PAGE verwendet (siehe 2.2.2.3).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kulturbedingungen für nicht-adhärenente Zelllinien

Die verwendeten nicht-adhärenenten humanen Zelllinien wurden in R10-Medium bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration kultiviert. Für die Hühner-Zelllinie DT40 wurde R11-Medium verwendet. Je nach Wachstumspräferenz und Dichte der jeweiligen Zelllinie wurde die Kultur alle ein bis zwei Tage 1:2 bis 1:10 mit R10- bzw. R11-Medium verdünnt. Dafür wurde ein Teil der Zellen verworfen und das Volumen mit frischem Kulturmedium aufgefüllt.

2.2.3.2 Kulturbedingungen für adhärenente Zelllinien

Adhärenente Zelllinien wurden in D10-Medium bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration kultiviert. Zur Kultivierung der Zelllinie PlatE wurde dem Medium regelmäßig 2 µg/ml Puromycin und 10 µg/ml Blasticidin zur Selektion zugefügt.

Um die Zellen zu expandieren oder zu teilen, wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden einmalig vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, um sie von der Kulturschale zu lösen, mit Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, Darmstadt, Deutschland) 2 min inkubiert. Die Lösung wurde durch Schwenken gut über alle Zellen verteilt. Nach 2 min wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium das Trypsin verdünnt, wodurch der Ablösungsprozess beendet wird. Die Zellen wurden nun vorsichtig in dem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in frischem D10-Medium aufgenommen und verdünnt auf neue Kulturplatten aufgebracht. Überflüssige Zellen wurden verworfen.

2.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung und Sicherung der Zellen wurden jeweils zirka 5×10^6 aus der Zellkultur entnommen, pelletiert und in 1 ml kaltem Kryo-Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde sofort in ein Kryo-Röhrchen überführt, auf Eis gestellt und schnellstmöglich bei -80°C bzw. bei längerer Lagerung bei -150°C eingefroren. Zum Einfrieren von Isotopen-markierten Zellen für SILAC-Experimente wurde Kryo-Medium aus 90% dialysiertem FCS (PAA, Pasching, Österreich, Deutschland) und 10% DMSO verwendet.

Zum Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem Gefrierschrank in ein 37°C-Wasserbad überführt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie mit 10 ml Medium in einem 15 ml-Röhrchen verdünnt, abzentrifugiert und in frischem Zellkulturmedium auf eine Zellkulturschale gegeben.

2.2.3.4 Transfektion mittels Amaxa®*Nucleofector*®-Technologie

Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden die Zellen aus den Suspensionskulturschalen geerntet und gezählt. Pro Transfektionsansatz wurden 2×10^6 Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei Raumtemperatur mit $90 \times g$ für 10 min pelletiert. Die *Nucleofector*® *Solution V* (Lonza, Basel, Schweiz) wurde frisch vorbereitet, indem 18 µl *Supplement-Lösung* und 82 µl *Nucleofector*® *Solution* miteinander gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert wurden. 2 ml R10-Zellkulturmedium wurden in einer kleinen Suspensionskulturschale bei 37°C vorgewärmt. Anschließend wurden 2 µg Plasmid-DNA zur *Nucleofector*® *Solution V* dazugegeben und gut gemischt. Das Zellpellet wurde vom Überstand befreit, die Zellen in der vorbereiteten Transfektionslösung (*Nucleofector*® *Solution V* + DNA) resuspendiert und vollständig, ohne Blasen, in die vorgesehene Küvette überführt. Nachdem die Küvette im Lonza®-Gerät (Basel, Schweiz) positioniert worden war, erfolgte die Wahl des Transfektions-Programms (T15 für DG75-Zellen). Nach Durchlauf des Programms wurde die Küvette entnommen und die Zellen wurden vorsichtig aus der Küvette in das vorgewärmte Zellkulturmedium überführt (für das ausführliche Protokoll siehe Amaxa® *Cell Line Nucleofector*® *Kit V - Optimized Protocol for Ramos Cell Line*).

Anschließend wurden die Zellen zunächst über Nacht bei 37°C kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen in insgesamt 10 ml vorgewärmtem R10-Medium aufgenommen und mit je 1 ml auf 10 Näpfe einer 24er-Napfplatte verteilt. Zur Selektion wurde zunächst R10-Medium mit 2 µg/ml Puromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA) angesetzt, hiervon wurde je 1 ml zu den mit Zellsuspension gefüllten Näpfen dazugegeben (Endkonzentration des Puromycins 1 µg/ml).

Die Zellen wurden bei 37°C in Selektionsmedium kultiviert, bis am Boden der Näpfe einzelne Zellklone wuchsen. Diese wurden vorsichtig mit Hilfe einer 100 µl-Pipette aufgenommen und jeweils in einen Napf einer 96er-Napfplatte überführt. Zunächst wurden die vereinzelter Zellklone weiter unter Selektionsmedium kultiviert und expandiert. Später wurde der Transfektionserfolg getestet.

2.2.3.5 Transfektion mittels Elektroporation

Zur Vorbereitung der Elektroporation von DT40-, DG75- und Ramos-Zellen wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen vorsichtig abzentrifugiert ($90 \times g$, 10 min) und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 700 µl *Gene Pulser* Elektroporations-Puffer (BioRad, München, Deutschland) resuspendiert und 20–50 µg des zuvor linearisierten Transfektionsplasmids

(siehe 2.2.1.13) dazugegeben. Die Zellen wurden nun in einer 4 mm-Elektroporationsküvette für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation mittels des Elektroporationssystems *Gene Pulser* von BioRad (München, Deutschland) mit 250 V Spannung bei 960 μ F. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 24 ml vorgewärmtem R10- oder R11-Medium aufgenommen, auf eine 24er-Napfplatte verteilt und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach zirka 48 h erfolgte die Zugabe von 1 ml Puromycin-Selektionsmedium in jeden Napf (Endkonzentration des Puromycins 0,5-1 μ g/ml). Je nach Zustand des Mediums wurde alle 48 h 1 ml Medium pro Napf abgenommen und mit frischem Selektionsmedium aufgefüllt. Die einzelnen Zellklone am Boden der Napfplatte wurden mittels einer 100 μ l-Pipette einzeln auf eine 96er-Napfplatte überführt und unter Selektion weiter expandiert. Die einzelnen Zellklone wurden später mittels Western Blot auf Proteinexpression untersucht.

2.2.3.6 Retrovirale Transduktion

Gegenüber der Elektroporation hat die retrovirale Transduktion den Vorteil, dass gleichzeitig eine Vielzahl von Zellen transduziert und somit klonale Effekte vermieden werden. Die Retroviren für die Infektion von DG75-Zellen wurden mit Hilfe der Verpackungszelllinie PlatE produziert. Bei einzelnen Versuchen wurde mit pseudotypisierten Retroviren gearbeitet, dabei wurden alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte mit den Viren nach S2-Sicherheits- und Arbeitsvorschriften durchgeführt.

Transfektion der PlatE-Zellen mittels TransIT®

Standardmäßig wurde die Transfektion der PlatE-Zellen auf 6 cm-Zellkulturschalen durchgeführt. Dazu wurden am Tag vor der geplanten Transfektion jeweils zirka $1-2 \times 10^6$ PlatE-Zellen auf den Zellkulturschalen verteilt. Zuvor wurden die Zellen in frischem vorgewärmten D10-Medium gleichmäßig suspendiert und vereinzelt. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen eine gleichmäßige Wuchsdichte von 60-70% haben. Eine zu hohe Zelldichte reduziert den Transfektionserfolg und die spätere Virusproduktion.

Zur Transfektion wurde das TransIT®-293-Transfektionsreagenz von Mirus (Madison, WI-USA) benutzt. Bei Raumtemperatur wurden 8 μ l TransIT®-Reagenz und 250 μ l FCS-freies DMEM-Medium gemischt und 15 min inkubiert. Dann wurden 3-4 μ g Plasmid-DNA dazugegeben, gut gemischt und weitere 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Infektion von Zellen, die weder murinem Ursprungs sind noch den murinen kationischen Aminosäu-

retransporter 1 (siehe 2.1.12) exprimieren, wurde zusätzlich 0,7 µg pHCMV-VSV-G-Plasmid-DNA dazugegeben. Durch die zusätzliche Transfektion dieses Plasmids kommt es zur Pseudotypisierung der Viruspartikel, wodurch die Infektion nicht-muriner Zellen bzw. Zellen ohne Expression des murinen kationischen Aminosäuretransporters durch die Viren ermöglicht wird.

Während der Inkubationszeit wurde das verbrauchte Medium durch vorsichtige Aspiration von den PlatE-Zellen entfernt und durch 2,5 ml frisches, vorgewärmtes D10-Medium ersetzt. Das Transfektionsreagenz wurde anschließend tropfenweise gleichmäßig über die gesamte Zellkulturplatte verteilt und die Zellen für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden vorsichtig 2 ml frisches D10-Medium dazugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen produzieren in dieser Zeit die Retroviren und geben diese in den Überstand ab. Zur Erhöhung des Virus-Titers im Überstand wurden die Zellen 6-12 h vor Abnahme des Überstandes nur noch bei 32°C inkubiert. So wurde die Halbwertszeit der Retroviren verlängert.

Nach Ablauf der 48 h Inkubationszeit wurde der virustragende Überstand vorsichtig steril abgenommen und durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert, um eventuell abgelöste Zellen und Zellfragmente zu entfernen.

Infektion von Zelllinien durch Retroviren

Für die Infektion wurden $1-2 \times 10^6$ der zu infizierenden Zellen in 1 ml frischem R10- bzw. R11-Medium aufgenommen und zusammen mit 4 ml des filtrierten Virusüberstandes in eine 6 cm-Zellkulturschale gegeben. Unter Zugabe von 3 µg/ml Polybren wurden die Zellen 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium komplett erneuert und abhängig vom Wachstum der Zellen wurde nach 48-72 h das passende Selektionsreagenz (in der Regel 1 µg/ml Puromycin) dem Medium zugefügt. Ein Teil der Zellen wurde zuvor separiert und ohne Selektion als Sicherung weiter kultiviert.

2.2.3.7 Durchflusszytometrie

Analyse der Expression von Citrine-markierten Fusionsproteinen

Zur Untersuchung der Expression von Citrine-gekoppelten Fusionsproteinen wurden 300 µl Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen gegeben und die Fluoreszenz mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD, Franklin Lakes, NJ-USA) bestimmt. Das fluoreszierende Protein Citrine wurde dabei durch einen Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt und die Emission

bei 500-560 nm detektiert. Als Kontrolle wurden untransduzierte Zellen der gleichen Zelllinie gemessen.

Analyse der Oberflächenexpression von mlgM und mlgG

Die Oberflächenexpression von mlgM und mlgG wurde über Fluorophor-gekoppelte Antikörper in der Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und einmalig mit kaltem PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt. Durch Rückfluss verblieben zirka 200 µl Zellsuspension im Röhrchen. Es wurden 0,5 µl des passenden Fluorophor-gekoppelten Antikörpers dazugegeben und gemixt. Die Zellen wurden für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend zweimalig mit kaltem PBS gewaschen. Für die Messung am Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD, Franklin Lakes, NJ-USA) wurden die Zellen in 200-500 µl PBS resuspendiert und bis zur Messung abgedunkelt und auf Eis aufbewahrt.

2.2.3.8 Analyse der BZR-abhängigen Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen

Die Stimulation des BZR hat eine Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER sowie dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma zur Folge. Diese Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Ionenkonzentration kann durch Verwendung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Indo-1 AM (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA-USA), bei dem sich durch Ca^{2+} -Bindung die Emissionswellenlänge verändert, in der Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Zur Vorbereitung der Messung wurden je Probe $1-2 \times 10^6$ Zellen geerntet und in 700 µl RPMI-Medium mit 5% FCS, 1 µM Indo-1 AM und 0,015% Pluronsäure (Molecular Probes, Carlsbad, CA-USA) für 25 min bei 30°C und 500 rpm im Schüttelinkubator Thermomix lichtgeschützt inkubiert. Die Zellen nehmen in dieser Zeit den Farbstoff auf, die Pluronsäure verbessert dabei die Aufnahme. Nach Zugabe von 700 µl R10-Medium wurden die Zellen weitere 10 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert, anschließend mit 1 ml Krebs-Ringer Lösung gewaschen und in 600 µl Krebs-Ringer-Lösung mit 1 mM CaCl_2 resuspendiert. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 30°C aufbewahrt und dabei mehrfach invertiert, um ihr komplettes Absinken zu verhindern.

Die Messung der Ca^{2+} -Mobilisierung wurde am Durchflusszytometer LSR II (BD, Franklin Lakes, NJ-USA) durchgeführt. Für die Messung wurde ein Teil der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen gegeben, dabei wurde das Volumen so angepasst, dass während der gesamten Zeit mindestens 300 Zellen/sek gemessen werden konnten. Nach Anregung des Farbstoffes

durch einen Laser mit der Wellenlänge von 350 nm wurde das Fluoreszenzemissions-Verhältnis von Ca^{2+} -gebundenem Indo-1 AM (405 nm, violett) zu Ca^{2+} -freiem Indo-1 AM (530 nm, blau) vor und nach Stimulation der Zellen bestimmt. Alle Zellproben wurden zum gleichen Zeitpunkt nach Beginn der Messung stimuliert (in der Regel nach 30 sek). Die Stimulation des BZR erfolgte entweder über Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-Maus-IgG F(ab')_2 -Fragmenten, 20 $\mu\text{g/ml}$ anti-Human-IgM F(ab')_2 -Fragmenten (jeweils Jackson Immuno Research, West Grove, PA-USA) oder 2 $\mu\text{g/ml}$ M4-Antikörper (Southern Biotech, Birmingham, AL-USA und I. Heine aus unserem Institut) bei DT40-Zellen. Die Messdaten wurden mit dem Programmen FlowJo (FlowJo alias 3.5.3, Tree Star, Ashland, OR-USA) und Exel (Microsoft Office 2011 MAC, Microsoft, Remond, WA-USA) ausgewertet und graphisch als Indo-1-Fluoreszenzratio über die Zeit dargestellt.

2.2.3.9 Herstellung eines Btk-defizienten DG75-Zellklons

Auswahl der Primer-Sequenzen und Synthese der Homologie-Arme des Targeting-Vektors

Im Exon 2 des *BTK*-Gens wird das Startcodon für die Translation von Btk kodiert. Um die Expression von Btk zu unterbinden, habe ich den *Targeting*-Vektor so konstruiert, dass der 5'-Homologie-Arm die Sequenz des Exons 2 abdeckte und wenige Basen nach dem Startcodon ein Stopcodon enthielt. Die 3'-Homologie-Sequenz wurde homolog zu Teilen von Exon 3 und 4 sowie des Introns dazwischen gewählt. Durch die gewählten Sequenzen konnten die Primer zur Amplifikation der Ziel-Sequenzen so designt werden, dass sich drei von vier in Bereichen der Exon-Sequenzen anlagerten, was eine höhere Spezifität der Primer ermöglichte.

Als Matrize zur Amplifizierung der Homologie-Arme habe ich genomische DNA aus DG75-Zellen isoliert (siehe 2.2.1.1) und eine PCR mit der DNA-Polymerase Pfu (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und den oben beschriebenen Primern durchgeführt. Nach vollständiger Sequenzkontrolle (siehe 2.2.1.12) wurden beide Homologie-Arme durch eine Restriktionsenzym-Spaltung (5'-Homologie-Arm: EcoRI, 3'-Homologie-Arm: XhoI, jeweils NEB, Ipswich, MA-USA) für die Ligation in den *Targeting*-Vektor vorbereitet.

Konstruktion des Targeting-Vektors und Transfektion der Zellen

Der Ausgangsvektor pCRII-TOPO-loxPuro wurde mir freundlicherweise von Dr. N. Engels zur Verfügung gestellt. Er enthielt bereits eine von loxP-Sequenzen flankierte Puromycin-

Resistenz-Kassette. Nacheinander wurden die DNA für den 5'- und 3'-Homologie-Arm sowie eine Diphtherie-Toxin-A (DTA)-Kassette in diesen Vektor eingefügt. Der finale *Targeting*-Vektor enthielt die von loxP-Sequenzen flankierte Puromycin-Kassette, die ihrerseits von den Homologie-Armen flankiert wurde. Die DTA-Kassette hingegen lag außerhalb der Homologie-Arme (siehe Abb. 9 A).

Zur Amplifikation und Isolierung der *Targeting*-Vektor-DNA habe ich chemokompetente *E. coli*-GeneHog-Zellen mit dem fertigen Plasmid (13,2 kb) transformiert. Nach Aufreinigung der *Targeting*-Vektor-DNA aus einer Über-Nacht-Kultur eines zuvor getesteten *E. coli*-Klons wurde diese mit Hilfe des Restriktionsenzym *PvuI* (NEB, Ipswich, MA-USA) linearisiert.

Die Transfektion der DG75-Zellen mit dem linearisierten *Targeting*-Vektor erfolgte mit Hilfe der Amaxa®*Nucleofector*® Technologie von Lonza (Basel, Schweiz, siehe 2.2.3.4). Nach der Transfektion folgten die Positivselektion mit Puromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA) und die Kultivierung der einzelnen Zellklone. Die Zellklone wurden anschließend mittels Westen-Blot auf die Expression von Btk untersucht.

Entfernung der Puromycin-Resistenz-Kassette mittels Cre/loxP-System

Im nächsten Schritt wurde die Puromycin-Resistenz-Kassette aus der genomischen DNA des Btk-defizienten DG75-Zellklons entfernt. Dazu wurde in die Zellen mittels der Amaxa®*Nucleofector*® Technologie ein Expressionsvektor für die Cre (*causes recombination*)-Rekombinase (pCre, freundlicherweise von Dr. J. Lutz zur Verfügung gestellt) transient eingebracht (siehe 2.2.3.4).

Von den nach der Elektroporation gewachsenen Zellklonen wurde jeweils ein Sicherungsduplikat auf einer 96-Napfplatte kultiviert, um dann durch eine Selektion der Zellklone mit Puromycin-haltigem Kulturmedium den Erfolg der Transfektion und Rekombination zu testen. Unter der Selektion sind diejenigen Subklone gestorben, in denen die loxP-flankierte Puromycin-Kassette zuvor erfolgreich durch die Cre-Rekombinase aus der DNA entfernt worden war. Die Duplikate dieser Subklone wurden weiter kultiviert, die übrigen Zellklone wurden verworfen.

2.2.3.10 Inhibition von Btk mittels Ibrutinib

Für durchflusszytometrische Messungen der Ca²⁺-Mobilisierung wurde Btk in verschiedenen DG75-Zellen vorher durch Zugabe des selektiven Btk-Inhibitors Ibrutinib inhibiert. Zunächst

wurde mittels Titration in Anlehnung an Honigberg et al. (2010) die optimale Ibrutinib-Konzentration von 0,08 mM für diesen Versuch ermittelt.

Es wurden die unter 2.2.3.8 beschriebenen Schritte jeweils mit Medium bzw. Krebs-Ringer-Lösung durchgeführt, welche Ibrutinib in der gewünschten Konzentration enthielten. Insgesamt wurden die Zellen somit für mindestens 45 min mit Ibrutinib inkubiert und anschließend auch in Ibrutinib-haltiger Krebs-Ringer-Lösung durchflusszytometrisch gemessen.

Bei den mit Ibrutinib inkubierten Zellen zeigte sich keine Veränderung der Grundfluoreszenz in der durchflusszytometrischen Messung in Vergleich zu unbehandelten Zellen.

2.2.4 Massenspektrometrische Methoden

2.2.4.1 Massenspektrometrische Analyse von Proteingemischen

Mittels massenspektrometrischer (MS) Analysen können nicht nur Proteine und Proteininteraktionen bestimmt werden, sondern auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, da diese zu einer Massenänderung eines Proteins bzw. von Peptiden aus Proteinen führen. Eine Möglichkeit für quantitativ vergleichende Analysen von Proteininteraktionen sowie posttranslationale Modifikationen bietet die *stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC)*-Methode.

Die massenspektrometrischen Analysen in dieser Arbeit wurden in Kooperation mit der „Bioanalytical Mass Spectrometry“-Gruppe am Max-Planck-Institut (MPI) für Biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland) unter der Leitung von Prof. Dr. H. Urlaub durchgeführt.

Herstellung von B-Zelllinien, die Strep-tag-markiertes Btk und PLCy2 exprimieren

Für die massenspektrometrischen Analysen von Btk und PLCy2 aus BZR-stimulierten B-Lymphozyten wurden die cDNAs beider Proteine jeweils in den Expressionsvektor pAB-ESpuro-N-One-STrEP ligiert, der mir freundlicherweise von Dr. K. Neumann und Dr. T. Oellerich zur Verfügung gestellt wurde. Durch Expression mit diesem Vektor werden die Proteine N-terminal an einen *One-STrEP-tag*[™] (Strep-) (IBA, Göttingen, Deutschland) gekoppelt. Die Strep-PLCy2-exprimierenden Ramos-Zellen wurden im Zuge einer vorangegangenen Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. E. Chebbok (ehemals Pavlova) hergestellt. Zur Klonierung wurde ein bereits vorliegendes Konstrukt aus Ratten-PLCy2 mit einem C-terminalen T7-tag genutzt (Pavlova 2010). Strep-Btk wurde sowohl in Btk-defizienten DT40-

Zellen als auch in Btk-defizienten DG75-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mittels Elektroporation (siehe 2.2.3.5) transfiziert.

Affinitätschromatographie von Proteinen mittels Strep-Tactin-Matrix

Zur Affinitätsreinigung von Strep-Btk und -PLC γ 2 wurden 5×10^8 DT40-Zellen bzw. 5×10^7 bis 10^8 DG75- oder Ramos-Zellen pro Probe aus der Zellkultur in Zentrifugationsröhrchen überführt, zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen je nach Zellzahl in 10-20 ml RPMI-Medium ohne Zusätze resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit frischem RPMI-Medium ohne Zusätze auf $2,5\text{--}5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt, auf 1,5 ml-Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 37°C im Thermomix inkubiert. Die Stimulation und Lyse der Zellen erfolgte, wie unter 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben. Nach der Zentrifugation wurden alle geklärten Zelllysate einer Probe in einem 15 ml-Röhrchen gesammelt und mit 200 μ l Strep-Tactin-Matrix (IBA, Göttingen, Deutschland) für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Matrix durch sanfte Zentrifugation bei 4°C pelletiert und in ein 1,5 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach fünfmaligem Waschen mit 1 ml kaltem Lysepuffer wurde die Matrix mit 500 μ l Strep-tag-Elutionspuffer (IBA, Göttingen, Deutschland) für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Matrix durch vorsichtige Zentrifugation pelletiert, 400 μ l Eluat wurden abgenommen und in ein Vivaspin-Zentrifugalkonzentrator (Sartorius, Göttingen, Deutschland) gegeben. Die Matrix wurde ein zweites Mal mit 400 μ l frischem Elutionspuffer inkubiert und der Vorgang wiederholt. Mittels des Zentrifugalkonzentrators wurde das Eluat bei 10000 x g und 15°C auf ein Zielvolumen von 45-50 μ l konzentriert. Zur Denaturierung wurde das Eluat mit 18 μ l NuPAGE LDS-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA) und 7 μ l NuPAGE Redox-Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA) bei 72°C für 10 min erhitzt.

Weitere Verarbeitung und Analyse der Proben

Die weitere Vorbereitung und Analyse der Proben erfolgte durch die „Bioanalytical Mass Spectrometry“-Gruppe am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Dabei erfolgten zusammengefasst folgende Schritte:

- Extraktion und Fraktionierung der aufgereinigten Proteine mittels eindimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE) und In-Gel-Trypsin-Spaltung

- Für Phosphorylierungs-Analysen: Anreicherung der phosphorylierten Peptide mittels TiO_2 -Chromatographie
- Separation und Ionisierung der Peptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Elektrospray-Ionisierung
- Massenspektrometrische Analyse mittels *linear trap quadropole* (LTQ)-Orbitrap-Massenspektrometer sowie weitere Peptidfragmentierung für Tandem-Massenspektrometrie-Analysen
- Datenanalyse mittels MASCOT, MaxQuant und MsQuant

2.2.4.2 *Stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC)*

Für vergleichende massenspektrometrische Analysen, z. B. für den Vergleich stimulierter zu unstimulierter Zellen, gibt es Methoden, die Zellen unterschiedlich zu markieren und anschließend quantitativ zu analysieren. Eine Möglichkeit ist die SILAC-Methode (Ong et al. 2002). Hierfür werden die Zellen in Medium kultiviert, das die essenziellen Aminosäuren Lysin und Arginin in unterschiedlichen Varianten enthält. Dabei unterscheiden sich die beiden Aminosäuren durch den Einbau nicht-radioaktiver schwerer Isotope von Kohlen-, Wasser- und Stickstoff in ihrer Masse von unmarkierten Varianten. Die Zellen bauen die Isotopen-markierten Aminosäuren in ihre Proteine ein, wodurch sich auch die Masse der Proteine ändert.

Die zu vergleichenden Zellen wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert: Eine Probe wurde in Medium mit unmarkierten Aminosäuren kultiviert („leichtes“ SILAC-Medium), die andere in dem Medium mit den Isotopen-markierten Aminosäuren („schweres“ SILAC-Medium). Da es sich bei dem SILAC-Medium um ein Mangelmedium handelt, wurden die Zellen nach dem Auftauen zunächst in normalem R10-Medium kultiviert. Sobald sich die Zellen erholt hatten, wurden der Kultur zirka 1×10^6 Zellen entnommen, 4 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und in 4 ml SILAC-Medium auf eine neue Zellkulturschale überführt. Die Zellen wurden im SILAC-Medium regelmäßig verdünnt, damit sie nicht zu dicht wachsen. Nach 6-7-maliger Teilung und Verdünnung der Zellsuspension sollten die Proteine zu 98% isotopen-markiert sein.

Für Interaktom- und Phosphorylierungsanalysen wurden die Isotopen-markierten Zellen je nach Versuch über den BZR stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Aus den geklärten Lysate erfolgte eine Affinitätschromatographie, wie unter 2.2.4.1 beschrieben. Die Eluate aus „leicht“ und „schwer“ markierten Zellen wurden im

Anschluss im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Proben wurden anschließend, wie oben beschrieben, für die Analyse vorbereitet (siehe 2.2.4.1).

Durch die proteolytische Spaltung des Proteingemisches mittels Trypsin, welches die Aminosäurekette jeweils C-terminal der Aminosäuren Lysin und Arginin schneidet, enthält jedes Peptid der „schwer“ markierten Zellen eine markierte Aminosäure am C-Terminus, die in der späteren Messung den Massenunterschied der Peptide ausmacht. Mit Hilfe dieses Massenunterschieds der Peptide werden während der Auswertung der Messung korrespondierende Peptidpaare gebildet und quantitativ verglichen. Unterscheiden sich die beiden Peptide deutlich in ihrer Intensität, besteht ein Unterschied zwischen den untersuchten Proben. Bei ähnlicher Intensität der Peptide ist die Peptidmenge der Proben gleich.

3 Ergebnisse

3.1 Grb2 interagiert mit Btk im BZR-Signalweg

3.1.1 Grb2 bindet über seine N-terminale SH3-Domäne an ein Polyprolin-Motiv von Btk

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass das ITT-Motiv in mIgG und mIgE-BZRs das Adapterprotein Grb2 rekrutieren kann und dass diese Interaktion essenziell für das gesteigerte Ca^{2+} -Signal mIgG-exprimierender B-Zellen ist. Ferner konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass die N-terminale SH3-Domäne (N-SH3) von Grb2 entscheidend an diesem Prozess beteiligt ist und dass diese Domäne das ITT funktionell ersetzen kann (König 2012). Auf der Suche nach Ca^{2+} -Signal regulierenden Bindepartnern der N-SH3-Domäne von Grb2 habe ich mit GST-gekoppelten N- und C-terminalen SH3-Domänen von Grb2 und Grap Interaktionspartner dieser Domänen aus Lysaten von DG75-Zellen isoliert (siehe Abb. 5). Dabei habe ich neben den wildtypischen (WT) Domänen auch die inaktivierte Form der jeweiligen Domäne als Kontrollen eingesetzt. Zur Inaktivierung wurden entweder Tryptophan zu Lysin (W36K, W195K) oder Phenylalanin zu Alanin (F165A) mutiert (siehe König 2012).

Abbildung 5: Die N-terminale SH3-Domäne von Grb2, nicht jedoch von Grap, bindet Btk. GST-gekoppelte N- und C-terminale SH3-Domänen von Grb2 und Grap wurden mit Lysaten aus DG75-Zellen inkubiert. Inaktivierte Varianten (W36K, F165A, W195K) sowie GST wurden als Kontrollen verwendet. Die aufgereinigten Bindepartner wurden mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen Btk und SLP65 analysiert. Zur Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen GST verwendet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Es zeigte sich eine deutliche Bindung von Btk an die N-terminale SH3-Domäne von Grb2, eine wesentlich geringere Bindung an die N-terminale SH3-Domäne von Grap und keine Bindung an die C-terminalen SH3-Domänen der beiden Proteine sowie an die inaktivierten Formen (siehe Abb. 5, anti-Btk). Im Gegensatz zu den Daten von Grabbe und Wienands (2006) konnte ich für SLP65 sowohl eine Bindung an die N- als auch an die C-terminale SH3-Domäne von

Grb2 zeigen (siehe Abb. 5, anti-SLP65). Die Bindung an die Domänen von Grap war wesentlich schwächer (siehe Abb. 5, anti-SLP65). Da ich Btk als spezifischen Interaktionspartner der Grb2-N-SH3 identifizieren konnte und die Rolle von Btk für das BZR-induzierte Ca^{2+} -Signal in der Literatur belegt ist, habe ich diese Protein-Protein-Interaktion im Detail untersucht.

SH3-Domänen binden ihre Interaktionspartner über Polyprolin-Motive. Die meisten Interaktionspartner der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 besitzen ein typisches Polyprolin-Motiv mit der Konsensussequenz PxxPx+ (Feng et al. 1994; Sparks et al. 1996). Es wurde jedoch gezeigt, dass diese Domäne auch Peptide mit der Konsensussequenz +xLPxxP bindet (Feng et al. 1994; Sparks et al. 1996). In der Prolin-reichen Region (PRR) von Btk befinden sich zwei nahezu identische Polyprolin-Motive, die dieser zweiten Konsensussequenz entsprechen (siehe Abb. 6 A, rot und blau) und damit als mögliche Bindestellen für die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 in Frage kommen.

A

	172		+xLPxxP		+xLPxxP	210
Btk-PRR	NGSLKPGSSHRKTK KPLPPT PEEDQILK KPLPPE PAAAP					
Btk-Pro1-WT	Biotin-NH-KTK KPLPPT PEED-COOH					
Btk-Pro1-LPPV	Biotin-NH-KTK KPPVPT PEED-COOH					
Btk-Pro2-WT	Biotin-NH-ILK KPLPPE PAAA-COOH					
Btk-Pro2-LPPV	Biotin-NH-ILK KPPVPE PAAA-COOH					

B

Abbildung 6: Die Btk-Polyprolin-Peptide sind für eine Aufreinigung von Bindepartnern nicht ausreichend. (A) Aminosäuresequenz der verwendeten biotinylierten Peptide der Btk-Polyprolin-Motive (Btk-Pro1 und -Pro2) sowie der veränderten Motive (LPPV). (B) Die in (A) dargestellten Polyprolin-Peptide (in einer Konzentration von 1 μM bzw. 17 μM) wurden mit Lysaten aus BZR-stimulierten DG75-Zellen inkubiert und anschließend aufgereinigt. Die Proben wurden zusammen mit Lysat der Zellen für einen Western Blot verwendet. Dargestellt ist ein Phosphotyrosin-Immunoblot der Aufreinigung (anti-pTyr). Anschließend wurde der Western Blot mit einem Antikörper gegen Grb2 inkubiert. Am linken Rand ist die relative molekulare Masse eines Molekulargewicht-Standards in kDa angegeben. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Um die Interaktion der Polyprolin-Motive einzeln zu überprüfen, habe ich durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) biotinylierte Peptide der beiden Btk-Polyprolin-Motive (siehe Abb. 6 A) synthetisieren lassen. Neben den Peptiden mit den intakten Polyprolin-Motiven wurden jeweils auch Peptide synthetisiert, in denen das typische Prolin-Motiv +xLPxxP durch

den Austausch des Lysins zu Prolin (L188P bzw. L202P) und des nachfolgenden Prolins zu Valin (P189V bzw. P203V) verändert wurde (siehe Abb. 6 A). Die Varianten werden nachfolgend als LPPV-Varianten bezeichnet.

Für Affinitätsaufreinigungen wurden die Peptide in einer Konzentration von 1 μM zu Lysaten von BZR-stimulierten DG75-Zellen hinzugegeben und mittels einer Streptavidin-Matrix isoliert. Im anschließenden Phosphotyrosin-Immunoblot konnten keine Phosphoproteine detektiert werden (siehe Abb. 6 B, anti-pTyr). Auch der Immunoblot mit einem Antikörper gegen Grb2 zeigte kein Signal (siehe Abb. 6 B, anti-Grb2, 1 μM). Selbst eine deutlich höhere Konzentration der eingesetzten Peptide (17 μM) ergab kein Grb2-Signal im Immunoblot (siehe Abb 6 B, anti-Grb2, 17 μM).

Da sich keine eindeutige Bindung zwischen den kurzen Polyprolin-Motiv-Peptiden und Grb2 nachweisen ließ, habe ich im nächsten Schritt Grb2-basierte Fusionsproteine hergestellt, die zum einen die gesamte Tec-Homologie-Domäne, bestehend aus Btk-Motiv (BM) und PRR (im Folgenden als Btk-BMPRR bezeichnet), zum anderen nur die PRR von Btk (im Folgenden als Btk-PRR bezeichnet) enthielten (siehe Abb. 7 A). Neben der jeweiligen wildtypischen (WT) Variante wurden durch gezielte Mutagenesen auch die oben beschriebenen LPPV-Varianten (für das N-terminale Polyprolin-Motiv als LPPV1 und für das C-terminale Polyprolin-Motiv als LPPV2 bezeichnet) hergestellt. Die Variante, in der beide Polyprolin-Motive inaktiviert wurden, wird als LPPV1/2 bezeichnet. Gleiche Mengen der Fusionsproteine wurden anschließend für Affinitätsaufreinigungen aus Lysaten BZR-stimulierter DG75-Zellen verwendet.

Die Analyse der aufgereinigten Proteine mittels Phosphotyrosin-Immunoblot zeigte eine Anreicherung verschiedener Phosphoproteine (siehe Abb. 7 B, anti-pTyr). Dabei unterschieden sich die mit Btk-BMPRR und Btk-PRR aufgereinigten Protein-Banden im Wesentlichen nur in der Intensität, nicht aber in Molekulargewicht und Anzahl. Die Inaktivierung des N-terminalen Polyprolin-Motivs (LPPV1 und LPPV1/2) führte zu einer Reduktion der Phosphobanden, vor allem unterhalb des 58 kDa-Markers (siehe Abb. 7 B, anti-pTyr, Spuren 3, 5, 7, 9). Die selektive Inaktivierung des C-terminalen Polyprolin-Motivs (LPPV2) hatte keinen Einfluß auf das Bandenmuster (siehe Abb. 7 B, anti-pTyr, Spuren 4, 8).

Anschließend wurde die Membran mit einem Antikörper zur Detektion von Grb2 inkubiert. Im Gegensatz zum Phosphotyrosin-Immunoblot war hier kein Unterschied in der Bandenintensität zwischen den Proben der Btk-BMPRR- und Btk-PRR-Fusionsproteine zu erkennen (siehe Abb 7 B, anti-Grb2). Aber auch hier zeigte sich eine deutlich verminderte Bandenin-

tensität für Grb2 in den Spuren der LPPV1- und LPPV1/2-Varianten, kein Unterschied jedoch in den Spuren der LPPV2-Variante im Vergleich zu den wildtypischen Fusionsproteinen. Daraus lässt sich schließen, dass nur das N-terminale Polyprolin-Motiv Grb2 bindet und die Proteine der Phosphotyrosin-Banden eventuell indirekt über Grb2 aufgereinigt wurden.

A

Abbildung 7: Fusionsproteine der Btk-PRR binden Grb2 und andere Proteine, dabei ist vor allem ein intaktes N-terminales Polyprolin-Motiv entscheidend. (A) Schematische Darstellung der verwendeten GST-Fusionsproteine (links) und die dazu gehörige Aminosäuresequenz (rechts). (B) Die in (A) dargestellten GST-Fusionsproteine sowie die jeweiligen Polyprolin-Motiv-Varianten (LPPV1, LPPV2 und LPPV1/2) wurden mit Lysaten aus BZR-stimulierten DG75-Zellen inkubiert. GST diente als Negativkontrolle. Aus den aufgereinigten Proteinen wurde ein Western Blot angefertigt, der zunächst mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (anti-pTyr) und anschließend mit einem Antikörper gegen Grb2 entwickelt wurde. Als Kontrolle wurden Lysate der Zellen aufgetragen. Am linken Rand ist die relative molekulare Masse eines Molekulargewicht-Standards in kDa angegeben. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

B

In Folgeexperimenten zur Differenzierung einiger Phosphobanden konnten bekannte Bindepartner von Grb2 wie SHC und Dok3 stimulationsabhängig mit Hilfe der Btk-Fusionsproteine (Btk-BMPRR und Btk-PRR) isoliert werden (Daten nicht gezeigt). In diesen Versuchen zeigte sich auch eine Aufreinigung von Btk durch die Btk-BMPRR-Domäne, nicht aber durch die isolierte Prolin-reiche Region von Btk (Btk-PRR) (siehe Abb 8, anti-Btk). Die daraus resultierenden Experimente werden unter 3.3.4 beschrieben.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass Btk ein spezifischer Bindepartner der N-SH3-Domäne von Grb2 ist und somit als Effektorprotein des ITT-Signalmotivs in Frage kommt. Das Bindemotiv für die Grb2-N-SH3-Domäne liegt in der Prolin-reichen Region von Btk mit ihren zwei fast identischen Polyprolin-Motiven. Dabei scheint vor allem das N-terminale

Polyprolin-Motiv entscheidend für die Bindung von Grb2 und anderen Proteinen zu sein. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die isolierten Polyprolin-Motive in der hier verwendeten Form als biotinylierte Peptide nicht ausreichen, um eine Bindung an andere Proteine zu ermöglichen. Möglicherweise spielen noch weitere Aminosäuren außerhalb der von mir verwendeten Peptidsequenzen oder die sterische Anordnung des Motivs bzw. bei der Motive für die Bindung an Interaktionspartner eine Rolle.

Abbildung 8: Aufreinigung von Btk mit Hilfe eines Fusionsproteins aus dem Btk-Motiv und der Prolin-reichen Region von Btk. Fusionsproteine der isolierten Prolin-reichen Region (Btk-PRR) sowie dem Btk-Motiv und der Prolin-reichen Region (Btk-BMPRR) von Btk wurden mit Lysaten aus unstimulierten (0') und BZR-stimulierten (3') DG75-Zellen inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt, der mit einem Antikörper zur Detektion von Btk (anti-Btk) inkubiert wurde. Zur Kontrolle der Funktionalität der eingesetzten GST-Fusionsproteine wurde die Aufreinigung von Grb2 getestet (anti-Grb2). Das Ergebnis wurde nicht reproduziert, sondern weiterführende Experimente wurden direkt begonnen.

3.2 Herstellung eines humanen Zellmodells zur Untersuchung von Btk

3.2.1 Herstellung von Btk-defizienten DG75-Zellen

Wie zuvor beschrieben, ist die X-gekoppelte Agammaglobulinämie eine Erkrankung, bei der genetische Aberrationen auf dem X-Chromosom im *BTK*-Lokus vorliegen. Diese Gendefekte beeinträchtigen entweder die Menge der Btk-Expression oder die Funktion des Enzyms.

Das einzige bisher zur Verfügung stehende Zellsystem zur Untersuchung von Btk ist eine Btk-defiziente Variante der Hühner-B-Zelllinie DT40. Da diese Zellen sich jedoch in mehreren Aspekten von humanen B-Zellen unterscheiden und daher für bestimmte Untersuchungen ungeeignet sind, habe ich eine Btk-defiziente Variante der humanen Burkitt-Lymphom-B-Zelllinie DG75 hergestellt. DG75-Zellen sind zur Untersuchung der BZR-Signalkaskade in unserem Labor etabliert und zeigen eine gute Effizienz in *Gen-Targeting*-Experimenten (Feederle et al. 2004). DG75-Zellen haben einen männlichen Karyotyp mit 46, XY (Ben-Bassat et al. 1977). Da das *BTK*-Gen auf dem X-Chromosom (Xq21.33-q22) liegt (Kwan et al. 1986; Ott et al. 1986; Kwan et al. 1990; Väliäho et al. 2006), ist somit die Inaktivierung eines Allels ausreichend, um eine Btk-*knock-out*-Linie zu generieren.

Abbildung 9: Herstellung eines Btk-defizienten DG75-Zellklons. DG75 ist eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie, die aus der Aszitesflüssigkeit eines Jungen mit primär abdominellem Lymphom isoliert wurde. Beim Menschen ist das *BTK*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert, DG75-Zellen besitzen daher nur eine Kopie des Gens. (A) Rekombinationsstrategie für das *BTK*-Gen. Die Position der Exons 1-5 (E 1-5) ist im wildtypischen *BTK*-Allel angegeben. Der *Targeting*-Vektor enthält eine von loxP-Motiven und den Homologie-Armen flankierte Puromycin-Resistenz-Kassette (puro), die nach der Rekombination Teile von Exon 2 und das gesamte Exon 3 des *BTK*-Gens ersetzt (B). Zusätzlich wurde das achte Codon des *Open-Reading-Frames* in Exon 2 durch ein STOP-Codon (E2*) ersetzt. Nach erfolgreicher Rekombination wurden die Zellen zur Entfernung der Resistenz-Kassette mit einem Expressionsvektor für Cre-Rekombinase transient transfiziert. Der modifizierte *BTK*-Genlokus beinhaltet nun ein verkürztes und mutiertes Exon 2 (E2*) sowie ein Rest-loxP-Motiv (C). Modifiziert nach Engels et al. (*Supplement*, 2014), mit freundlicher Genehmigung durch die Autoren.

Das humane *BTK*-Gen umfasst 19 Exons, die sich über 37,5 Kilobasen verteilen (Sideras et al. 1994). Im Exon 2 befindet sich das Startcodon. Um die Expression von Btk zu unterbinden, habe ich den *Targeting*-Vektor so konstruiert, dass der 5'-Homologie-Arm die Sequenz des Exons 2 abdeckt und dass wenige Basen nach dem Startcodon ein Stopcodon eingefügt wird (siehe Abb. 9 A). Dies führt dazu, dass die durch Transkription und Spleißen entstandene mRNA nur bis zu dem neu eingefügten Stopcodon translatiert wird. So wird nur ein kurzes Peptid von Btk exprimiert. Außerdem wird durch die gewählte 3'-Homologie-Sequenz bei erfolgreicher Rekombination Exon 3 deletiert (siehe Abb. 9 A/B).

Der finale *Targeting*-Vektor enthielt eine von loxP-Sequenzen flankierte Puromycin-Resistenz-Kassette, die ihrerseits von den Homologie-Armen flankiert wurde (siehe Abb. 9

A). Bei der homologen Rekombination wird diese Resistenz-Kassette in die chromosomale DNA integriert, so ist später eine Positivselektion durch Zugabe eines Puromycin-haltigen Zellkulturmediums möglich.

Zusätzlich habe ich eine Diphtherie-Toxin-A-Kassette (DTA-Kassette) zur negativen Selektion in den *Targeting*-Vektor außerhalb der Homologie-Arme eingefügt (siehe Abb. 9 A). Integriert der *Targeting*-Vektor Orts-unspezifisch in die chromosomale DNA, so wird auch die DTA-Kassette mit integriert und exprimiert. Das entstehende DTA blockiert dann in der Zelle den Elongationsfaktor EF-2, so dass keine Translation mehr möglich ist und die Zelle stirbt. Bei der homologen Rekombination hingegen wird die DTA-Kassette nicht mit in die chromosomale DNA integriert (siehe Abb. 9 B) und in Folge abgebaut.

Zur Testung einzelner Zellklone auf erfolgreiche Integration des *Targeting*-Vektors und einem daraus resultierendem Verlust der Btk-Expression wurden Zelllysate vereinzelter Klone hergestellt und per Western Blot auf Expression von Btk getestet. Ich habe drei Transfektionsversuche durchgeführt und insgesamt 55 Zellklone getestet, bei einem Klon zeigte sich ein Fehlen des Btk-Signals (siehe Abb. 10, anti-Btk).

Abbildung 10: Analyse der Btk-Expression. DG75-Zellen nach Transfektion mit dem *BTK-Targeting*-Vektor. Nach Selektion und Etablierung einzelner Zellklone wurden diese mittels Immunoblot auf die Expression von Btk untersucht. Es ist ein Ausschnitt (I-V) der untersuchten Klone dargestellt. Zellklon III zeigt kein Btk-Signal. Als Ladekontrolle wurde der Western Blot mit einem Antikörper gegen β -Aktin inkubiert (anti- β -Aktin). Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.2.2 Entfernung der Puromycin-Resistenz-Kassette aus der DNA des Btk-defizienten Zellklons mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems

Wie in Abbildung 9 gezeigt, enthielt der für die homologe Rekombination verwendete *Targeting*-Vektor für die Positivselektion eine von loxP-Sequenzen flankierte Puromycin-Resistenz-Kassette. Nach Identifikation eines Btk-defizienten Zellklons wurde diese Resistenz-Kassette nicht weiter benötigt. Um bei anschließenden Transfektionen weiterhin Puromycin als Selektionsmarker verwenden zu können, musste die Puromycin-Resistenz-Kassette zuvor aus der genomischen DNA des Zellklons entfernt werden. Dazu habe ich den Btk-defizienten Zellklon mit einem Expressionsvektor für die Cre-Rekombinase transient transfiziert, wodurch die

Puromycin-Resistenz-Kassette aus der genomischen DNA entfernt wurde (siehe Abb. 9 C). Nach Exzision der Puromycin-Resistenz-Kassette wurden die zuvor Puromycin-resistenten Zellen wieder permissiv für Puromycin (Daten nicht gezeigt).

Anschließend habe ich die Puromycin-permissiven Klone im Vergleich mit wildtypischen DG75-Zellen und dem ursprünglichen Btk-defizienten Klon auf ihre BZR-Expression und die Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation untersucht und mich für einen repräsentativen Klon entschieden, der im Weiteren als DG75 Btk^{-/-} bezeichnet wird.

3.2.3 Das verminderte Ca^{2+} -Signal der DG75 Btk^{-/-}-Zellen ist durch Rekonstitution mit Citrine-Btk reversibel

Die in 3.2.2 beschriebenen DG75 Btk^{-/-}-Zellen zeigen in der durchflusszytometrischen Messung eine deutlich verminderte Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation im Vergleich zu wildtypischen DG75-Zellen (siehe Abb. 11, rote und graue Kurve).

Um für spätere Rekonstitutionsexperimente mit Btk-Varianten die Möglichkeit zu haben, die Btk-Expressionsstärke durchflusszytometrisch zu vergleichen, habe ich ein Btk-Fusionsprotein mit einem Citrine-Fluorophor-tag hergestellt. Dazu habe ich die cDNA für humanes Btk in den retroviralen Expressionsvektor pMSCVpuro-Citrine-C1 (freundlicherweise von Dr. V. Bremes zur Verfügung gestellt) kloniert, so dass eine N-terminal Citrine-markierte Variante von Btk entsteht. Dieses Konstrukt habe ich mittels retroviraler Transduktion in die DG75 Btk^{-/-}-Zellen eingebracht. Zur Kontrolle habe ich parallel dazu den leeren pMSCVpuro-Citrine-C1-Vektor (Zellen werden im Folgenden als Citrine-only bezeichnet) transduziert.

Nach Selektion der transduzierten Zellen mittels Puromycin habe ich die Citrine-Fluoreszenzstärke in der Durchflusszytometrie verglichen (Daten nicht gezeigt). Die Citrine-only-transduzierten Zellen zeigten eine schwächere Fluoreszenz als Citrine-Btk-transduzierte Zellen. Eine mögliche Ursache für die geringere Expression von Citrine-only wäre das Fehlen eines Stopcodons am Ende der Citrine-cDNA im pMSCVpuro-Citrine-C1-Vektor, ein Stopcodon liegt erst mit dem Einbringen der gewünschten Insert-cDNA vor. Da, wie im Folgenden gezeigt, die Expression von Citrine-only keinen Einfluss auf das Ca^{2+} -Signal nach BZR-Stimulation hat (siehe Abb. 11, gelbe Kurve), habe ich den Vektor nicht weiter verändert.

Die durchflusszytometrische Messung des Ca^{2+} -Einstroms in die Zellen nach Stimulation des BZR zeigte, dass mittels Expression von Citrine-Btk der Phänotyp des verminderten Ca^{2+} -Signals der DG75 Btk^{-/-}-Zellen wieder rückgängig gemacht werden konnte und die Zellen

wieder einen mit wildtypischen DG75-Zellen vergleichbaren Ca^{2+} -Einstrom zeigten (siehe Abb. 11, rote und blaue Kurve). Dieses Ergebnis zeigt, dass die verminderte Ca^{2+} -Mobilisierung der Btk-defizienten Zellen tatsächlich auf das Fehlen von Btk und nicht auf klonale Artefakte zurückzuführen ist.

Abbildung 11: Btk-defiziente DG75-Zellen zeigen eine reduzierte Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation. Dieser Phänotyp ist durch Expression von Citrine-Btk reversibel. DG75 Btk^{-/-}-Zellen wurden mit Konstrukten für Citrine-Btk (blau) und Citrine-only (gelb) transduziert und mittels Durchflusszytometrie mit wildtypischen DG75-Zellen (rot) und untransduzierten DG75 Btk^{-/-}-Zellen (grau) verglichen. Die mit Indo-1 AM beladenen Zellen wurden nach 30 sek Basismessung mittels polyklonalem anti-Human-IgM F(ab')₂-Fragmenten stimuliert (Pfeil). Für die Auswertung wurden Citrine-Btk und Citrine-only exprimierende Zellen auf Citrine-positive Zellen eingegrenzt. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für mindestens fünf unabhängige Messungen.

Um zu überprüfen, ob eine spezifische Inhibition von Btk durch den Btk-Inhibitor Ibrutinib den gleichen Phänotyp wie die Btk-Defizienz erzeugt, habe ich die mit Citrine-Btk rekonstituierten DG75-Zellen mit Ibrutinib inkubiert und anschließend das Ca^{2+} -Signal der Zellen nach Stimulation über den BZR gemessen (siehe Abb. 12). Die mit Ibrutinib behandelten Zellen zeigten dabei ein vergleichbares Signal zu den Btk-defizienten DG75-Zellen (siehe Abb. 12, graue und rote Kurve). Außerdem zeigte sich bei Vorversuchen zur Bestimmung der benötigten Ibrutinib-Konzentration, dass auch die Btk-defizienten DG75-Zellen nach Inkubation mit höheren Ibrutinib-Konzentrationen eine Verringerung des Ca^{2+} -Signals zeigten (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 12: Die Effekte von Ibrutinib und Btk-Defizienz sind identisch. Die mit Citrine-Btk rekonstituierten DG75-Btk^{-/-}-Zellen wurden vor der Ca^{2+} -Signal-Messung mit Ibrutinib behandelt (rot). Zum Vergleich wurden unbehandelte mit Btk rekonstituierte Zellen (blau) sowie Btk defiziente DG75-Zellen (grau) gemessen. Die mit Indo-1 AM beladenen Zellen wurden nach 30 sek Basismessung mittels polyklonalem anti-Human-IgM F(ab')₂-Fragmenten stimuliert (Pfeil). Für die Auswertung wurde bei Citrine-Btk exprimierenden Zellen auf Citrine-positive Zellen eingegrenzt. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Btk essenziell für die Ca^{2+} -Mobilisierung in DG75-Zellen ist und dass sowohl durch Inhibition als auch durch Defizienz von Btk der gleiche Ca^{2+} -Phänotyp hervorgerufen werden kann. Gleichzeitig scheinen die in dieser Arbeit entstandenen DG75 Btk^{-/-}-Zellen ein geeignetes Zellmodell zur Untersuchung der Funktionalität von Btk-Mutanten zu sein, da durch Expression von Citrine-Btk in diesen Zellen der Phänotyp vollständig reversibel ist. Auch scheint der N-terminale Citrine-Fluorophor-*tag* die Funktionalität von Btk nicht zu beeinträchtigen.

3.3 Die Rolle der Prolin-reichen Region und Src-Homologie 3-Domäne von Btk im BZR-Signalweg

3.3.1 Das N-terminale Btk-Polyprolin-Motiv ist essenziell für die Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation

Wie zuvor beschrieben (siehe 1.4.1), besitzt Btk eine Prolin-reiche Region mit zwei fast identischen Polyprolin-Motiven der Klasse I. Um die Rolle der Polyprolin-Motive für die Funktionalität von Btk im Ca^{2+} -Signalweg des BZR zu untersuchen, habe ich durch gezielte Mutagenese die zuvor beschriebenen LPPV-Varianten (siehe 3.1.1) von Btk hergestellt, in denen das jeweilige Polyprolin-Motiv inaktiviert ist. Die Btk-Varianten wurden mit einem N-terminalen Citrine-Fluorophor-*tag* versehen. Diese Konstrukte sowie das Konstrukt für Citrine-markierte wildtypische Btk wurden anschließend mittels retroviraler Transduktion in DG75 Btk^{-/-}-Zellen exprimiert. Mit Hilfe des Citrine-*tags* konnte ich in den durchflusszytometrischen Ca^{2+} -Messungen auf eine identische Expressionsstärke der einzelnen Varianten eingrenzen (siehe Abb. 13 A), so dass Signalunterschiede, die auf unterschiedlicher Expressionsstärke beruhen, ausgeschlossen werden konnten.

Die Stimulation der Zellen erfolgte wie zuvor mit anti-Human-IgM-F(ab)₂-Fragmenten nach Messung des basalen Ca^{2+} -Niveaus. Zum Vergleich wurden untransduzierte DG75 Btk^{-/-}-Zellen gemessen. Das Ca^{2+} -Signal der Zellen, die die LPPV2-Variante von Btk exprimierten, war vergleichbar mit dem von Zellen, die wildtypisches (WT) Btk exprimierten (siehe Abb. 13 B). Im Gegensatz dazu zeigten die mit der LPPV1- oder LPPV1/2-Variante transduzierten Zellen ein vergleichbares Signal zu den Btk-defizienten Zellen (siehe Abb. 13 C).

Als Kontrolle habe ich die Ca^{2+} -Mobilisierung der Zellen, die mit der LPPV1/2-Variante von Btk transduziert wurden, mit Zellen verglichen, die Varianten von Btk exprimierten, bei

denen durch Punktmutation die Kinase-Domäne inaktiviert wurde (nach den jeweiligen Aminosäuresubstitutionen als Btk K430R bzw. R525Q bezeichnet, die Zellen wurden mir freundlicherweise von K. Gronke zur Verfügung gestellt. Diese Varianten von Btk zeigten in vorherigen Versuchen im Vergleich zu wildtypischen Btk ein stark verringertes Ca^{2+} -Signal. Der direkte Vergleich des Ca^{2+} -Signals der LPPV1/2-Variante mit den Kinase-inaktiven-Varianten von Btk zeigte ein ähnlich stark verringertes Signal bei allen drei Varianten (siehe Abb 13 D). In allen Auswertungen wurden Zellen mit ähnlicher Citrine-Fluoreszenzstärke ausgewählt, so dass von einer ähnlichen Btk-Expressionsstärke ausgegangen werden konnte (siehe Abb. 13 A).

Abbildung 13: Das N-terminale Polyprolin-Motiv von Btk spielt eine entscheidende Rolle für die Funktion von Btk im BZR- Ca^{2+} -Signalweg. Btk-defiziente DG75-Zellen wurden mit Citrine-gekoppelten Polyprolin-Motiv-Varianten (LPPV1, LPPV2, LPPV1/2) von Btk transduziert und das Ca^{2+} -Signal der Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die mit Indo-1 AM beladenen Zellen wurden nach 30 sek Basismessung mit anti-Human-IgM-F(ab')₂-Fragmenten stimuliert (Pfeil). Für die Auswertung wurde die Citrine-Btk-Expressionsstärke über die Fluoreszenzstärke auf ähnliche Werte eingegrenzt. (A) zeigt den ausgewählten Fluoreszenzbereich (G) im Histogramm der Citrine-Fluoreszenzstärke, in der nebenstehenden Tabelle werden die Werte der mittleren Fluoreszenzstärke (MFI) für den markierten Bereich angegeben. Zur besseren Übersicht wurde die Auswertung der verschiedenen Zellen getrennt dargestellt. (B) zeigt das Ca^{2+} -Signal der mit der LPPV2-Variante transduzierten Zellen (gelb) im Vergleich zu wildtypischem Btk (rot). In (C) werden mit der LPPV1- (grün) und LPPV1/2- (blau) Variante transduzierte Zellen mit untransduzierten Zellen (grau) verglichen. Zur Darstellung des Unterschieds wird auch die Kurve für wildtypischen Btk (rot) gezeigt. (D) Mit der LPPV1/2-Variante transduzierte Zellen (blau) wurden außerdem mit Kinase-inaktivierten Varianten von Btk (Btk K430R in rosa und Btk R525Q in rot) im Ca^{2+} -Signal verglichen. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Messungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem das N-terminale Polyprolin-Motiv von Btk für die Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation eine Rolle spielt und dass bei Inaktivierung dieses Motivs das C-terminale Motiv trotz gleicher Konsensussequenz (+xLPxxP) die Funktion des N-terminalen Motivs nicht ersetzen kann. Des Weiteren zeigt sich, dass eine Inaktivierung der Polyprolin-Motive einen vergleichbaren Ca^{2+} -Phänotyp wie eine Kinase-Inaktivierung zur Folge hat.

3.3.2 Der ITT-abhängige Signalweg benötigt Btk für ein gesteigertes BZR- Ca^{2+} -Signal

B-Zellen, die über einen mIgG- oder mIgE-BZR stimuliert werden, zeigen eine gesteigerte Ca^{2+} -Mobilisierung im Vergleich zu einer Stimulation über den mIgM-BZR. Vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass diese Ca^{2+} -Signal-Verstärkung von einem Tyrosin im intrazellulären Abschnitt des mIgGs, dem ITT, abhängt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Grb2 das ITT über die SH2-Domäne bindet. Dr. L. König aus unserer Arbeitsgruppe zeigte des Weiteren in seiner Dissertation, dass auch Btk eine entscheidende Rolle im gesteigerten Ca^{2+} -Signal des ITT-Grb2-Signalwegs spielt (König 2012). Er transfizierte die im Zuge dieser Arbeit entstandenen Btk-defizienten DG75-Zellen mit Konstrukten für mIgG2a der Maus, dessen ITT durch eine Mutation des Tyrosins zu Phenylalanin (mIgG2a-YF) inaktiviert wurde und an dessen zytoplasmatische Domäne entweder die N- oder C-terminale SH3-Domäne von Grb2 gekoppelt wurde (siehe Abb. 14 A, die Konstrukte mIgG2a-YF-Grb2-N-SH3 oder mIgG2a-YF-Grb2-C-SH3 werden im Folgenden als N-SH3- bzw. C-SH3-Chimäre bezeichnet). In wildtypischen B-Zellen konnte die N-terminale Grb2-SH3-Domäne das ITT funktionell ersetzen, nicht jedoch in Btk-defizienten Zellen (König 2012).

Um zu überprüfen, ob sich das Ca^{2+} -Signal durch Rekonstitution von Btk wieder steigern lässt, habe ich die Btk-defizienten DG75-Zellen, die die Chimären exprimierten (König 2012) zusätzlich mit einem Konstrukt für Citrine-Btk retroviral transduziert, jedoch im Anschluss nicht selektioniert. Durch diese experimentelle Strategie erhielt ich zwei Populationen an Zellen: Citrine-negative (d.h. Btk-negative) und Citrine-positive (d.h. Btk-positive), welche in der durchflusszytometrischen Messung voneinander abgegrenzt und daher anschließend miteinander verglichen werden konnten (siehe Abb. 14 B, Cit-pos und Cit-neg).

Durch Expression von Citrine-Btk zeigten die Zellen nach Stimulation über die N-SH3-Chimäre wieder einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom, verglichen mit Btk-negativen Zellen (siehe Abb. 14 C/D). Dabei führte die Expression von Citrine-Btk in Kombination mit der N-SH3-Chimäre zu einem deutlich gesteigerten Signal nach Stimulation der Zellen über die Chimäre

im Vergleich zur C-SH3-Chimäre (siehe Abb. 14 C, Cit-pos). Im Gegensatz dazu fehlt dieser Unterschied in Btk-negativen Zellen fast vollständig (siehe Abb. 14 C, Cit-neg). Nach Stimulation der Zellen über ihren endogenen mIgM-BZR waren die Ca^{2+} -Signale der beiden Btk-positiven Zellpopulationen sehr ähnlich (siehe Abb. 14 D, Cit-pos). Vergleicht man die beiden Btk-negativen Populationen miteinander, zeigt sich ebenfalls ein ähnliches Ca^{2+} -Signal jedoch deutlich geringer als das Signal der Btk-positiven Zellen (siehe Abb. 14 D, Cit-neg).

Abbildung 14: Für ein gesteigertes Signal über den ITT-Grb2-Signalweg wird Btk benötigt. (A) Schematische Darstellung der Rezeptor-Chimären aus der mIgG2a-YF-Variante und einer der Grb2-SH3-Domänen (N-SH3, C-SH3). Diese chimären Konstrukte wurden retroviral in Btk-defizienten DG75-Zellen exprimiert. Anschließend wurde Btk in diesen Zellen mittels des Konstrukts für Citrine-Btk ebenfalls retroviral transduziert. Dabei entstanden jeweils zwei durchflusszytometrisch abgrenzbare Populationen an Zellen (B), Btk-negative (Cit-neg) und Btk-positive (Cit-pos). (C)(D) Analyse des Ca^{2+} -Signals in allen Populationen nach Stimulation des BZR mittels polyklonalen F(ab')_2 -Fragmenten gegen (C) Maus-IgG oder (D) Human-IgM. Der Pfeil indiziert den Zeitpunkt des Stimulationsbeginns. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen. Abbildungen modifiziert nach Engels et al. (2014), mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

Nachdem gezeigt wurde, dass die N-SH3-Domäne von Grb2 Btk bindet (siehe Abb. 5), wurde nun durch Rekonstitution von Btk die Grb2-abhängige Ca^{2+} -Signalsteigerung über das ITT wieder hergestellt, somit ist Btk ein möglicher Interaktionspartner von Grb2 im ITT-Signalweg.

Um nun die Auswirkungen einer Inaktivierung des Polyprolin-Motivs auf die Funktion von Btk im ITT-Signalweg zu untersuchen, habe ich das Btk LPPV1/2-Konstrukt sowie das Kon-

strukt für wildtypisches (WT) Btk in den mit der N-SH3-Chimäre (siehe Abb. 14) transduzierten DG75 Btk^{-/-}-Zellen exprimiert. Auch hier konnte ich Citrine-positive und Citrine-negative Zellen unterscheiden und letztere als interne Kontrolle auswerten.

Abbildung 15: Ein intaktes Polyprolin-Motiv ist entscheidend für die Funktion von Btk im ITT-Grb2-Signalweg. DG75 Btk^{-/-}-Zellen, die die mlgG2a-Grb2-N-SH3-Rezeptor-Chimäre exprimierten, wurden mit Konstrukten für Citrine-gekoppeltes wildtypisches (WT) Btk und Btk-LPPV1/2 retroviral transduziert. Dabei entstanden zwei in der Durchflusszytometrie voneinander abgrenzbare Populationen an Zellen, Btk-positive (Cit-pos) und Btk-negative (Cit-neg) Zellen. Die mit Indo-1 AM beladenen Zellen wurden mittels polyklonalen anti-Maus IgG-F(ab')₂-Fragmenten stimuliert (Pfeil). Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

Nach Stimulation der Zellen über den chimären mlgG-BZR zeigten die mit Btk LPPV1/2 transduzierten Zellen ein leicht vermehrtes Ca²⁺-Signal im Vergleich den Citrine-negativen Zellen (siehe Abb. 15, dunkelrot und hellrot), aber eine Verstärkung des Signals wie bei Expression von wildtypischen (WT) Btk blieb aus (siehe Abb. 15, dunkelblau).

Abbildung 16: Schematische Darstellung der initialen mlgG-BZR-Signalkaskade. Nach Antigenbindung (Ag, rot) und Quervernetzung des BZR (grau) kommt es, wie bereits in Abb. 1 dargestellt, zur Aktivierung eines Igα/Igβ-ITAM-abhängigen Signalwegs. Durch die Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosinkinase Syk (hellgrün) am phosphorylierten ITAM (orange), kommt es über weitere Schritte (→) zur Ca²⁺-Mobilisierung. Gleichzeitig wird das Tyrosin (grün) im ITT durch Syk phosphoryliert und Grb2 (violett) bindet es über seine SH2-Domäne. Über die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 wird Btk (hellgrün) über seine Prolin-reiche Region gebunden. Dies führt über weitere Schritte (→) zur Verstärkung der Ca²⁺-Mobilisierung. Durch Inaktivierung des N-terminalen Polyprolin-Motivs von Btk (Blitz) bleibt die Bindung an Grb2 und die nachfolgende Signalverstärkung aus. Das Schema fasst Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zusammen (Engels et al. 2009; Engels et al. 2014, diese Arbeit)

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Polyprolin-Region von Btk und vor allem das N-terminale Prolin-Motiv dieser Region essenziell für die Funktionalität von Btk im Ca²⁺-Signalweg nach Stimulation des BZR ist. Der Funktionsverlust von Btk nach Inaktivierung der Prolin-reichen Region ist vergleichbar mit dem Funktionsverlust von Varianten mit inaktivier-

ter Kinase-Domäne. Des Weiteren scheint Btk über seine Prolin-reiche Region an die N-SH3-Domäne von Grb2 zu binden und somit die Ca^{2+} -Mobilisierung nach Stimulation des ITT-Signalwegs zu verstärken. Wird diese Bindung unterbrochen, beispielsweise durch Inaktivierung des Polyprolin-Motivs von Btk, bleibt das verstärkte Signal aus (siehe Abb 16).

3.3.3 Interaktionen über die SH3-Domäne von Btk sind essenziell für die Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation

In Abbildung 8 habe ich gezeigt, dass Btk mittels seiner Prolin-reichen Region sowohl aus Lysaten unstimulierter als auch stimulierter Zellen aufgereinigt werden konnte. Eine solche inter- oder intramolekulare Interaktion von Btk über die Prolin-reiche Region und die SH3-Domäne wurde bereits von Hansson et al. (2001a/b) beschrieben. In meinen Versuchen war die isolierte Prolin-reiche Region nicht ausreichend für diese Interaktion (siehe Abb. 8).

Um die Funktion der Btk-SH3-Domäne im Kontext der BZR-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung zu untersuchen, habe ich durch gezielte Mutagenese eine Variante von Btk generiert, in der durch Austausch von Tryptophan 251 durch Lysin die SH3-Domäne inaktiviert wurde (im Folgenden als Btk W251K bezeichnet). Zusätzlich habe ich eine Doppelmutante von Btk hergestellt, die sowohl die LPPV1-Mutation in der Prolin-reichen Region als auch die W251K-Mutation aufweist. Diese Btk-Varianten habe ich in DG75 Btk^{-/-}-Zellen exprimiert und die Ca^{2+} -Mobilisierung der Zellen nach Stimulation des endogenen mIgM-BZRs untersucht (siehe Abb. 17 A/B).

Abbildung 17: Die SH3-Domäne von Btk spielt eine entscheidende Rolle im BZR- Ca^{2+} -Signalweg. DG75 Btk^{-/-}-Zellen wurden mit Konstrukten für verschiedene Citrine-Btk-Varianten retroviral transduziert. Nach 30 sek Basismessung wurden die Zellen mit anti-Human-IgM-F(ab')₂-Fragmenten stimuliert (Pfeil). (A) Analyse des Ca^{2+} -Signals der Zellen, die Btk mit inaktivierter SH3-Domäne (W251K) exprimieren. Zum Vergleich wurden untransduzierte DG75 Btk^{-/-}-Zellen (Btk^{-/-}) und mit wildtypischen (WT) Btk transduzierte Zellen gemessen. (B) Vergleichende Analyse des Ca^{2+} -Signals der Zellen, die die Btk-W251K-Variante exprimieren, mit Zellen, die die Polyprolin-Motiv-Variante (LPPV1) oder eine Btk-Variante mit beiden Mutationen (LPPV1/W251K) exprimieren. Die abgebildeten Daten beider Analysen sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

Die mit der W251K-Variante von Btk transduzierten Zellen zeigten ein vergleichbares Signal zu DG75 Btk^{-/-}-Zellen (siehe Abb. 17 A). Der direkte Vergleich der Zellen mit der LPPV1-, W251K- oder Doppelmutante von Btk zeigte keinen Unterschied im Ca²⁺-Signal (siehe Abb. 17 B). Wie zuvor habe ich bei allen Analysen auf eine vergleichbare Citrine-Expression in den transduzierten Zellen eingegrenzt (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die SH3-Domäne von Btk eine entscheidende Rolle für die Funktion von Btk im Ca²⁺-Signalweg spielt. Der Funktionsverlust von Btk durch Inaktivierung dieser Domäne ist vergleichbar mit dem Funktionsverlust nach Inaktivierung des Polyprolin-Motivs.

3.3.4 Identifizierung von Interaktionspartnern der Btk-SH3-Domäne

Im nächsten Schritt habe ich ein GST-gekoppeltes Konstrukt der SH3-Domäne von Btk kloniert (siehe Abb. 18 A), um zu untersuchen, ob ich damit potenzielle Bindepartner wie Btk aus Zelllysaten isolieren kann. Neben dem Konstrukt für die wildtypische SH3-Domäne habe ich auch die zuvor beschriebene W251K-Variante der SH3-Domäne kloniert (im Folgenden als Btk-SH3 W251K bezeichnet).

Mit den beschriebenen Fusionsproteinen habe ich nachfolgend eine Affinitätsaufreinigung aus stimulierten und unstimulierten DG75 Btk^{-/-}-Zellen, die verschiedene Citrine-markierte Btk-Varianten exprimierten, durchgeführt. Im anschließenden Phosphotyrosin-Immunoblot konnte ich eine Vielzahl von Phosphoproteinen in allen Proben der wildtypischen (WT) Btk-SH3-Domäne nachweisen. Im Gegensatz dazu waren in den Proben der Btk-SH3-W251K-Variante nur wenige dezente Banden zu detektieren (siehe Abb. 18 B). Einige der Proteine, die durch den Phosphotyrosin-Antikörper detektiert wurden, konnte ich durch anschließende Inkubation der Membran mit Protein-spezifischen Antikörpern identifizieren. Dabei konnte ich in allen Aufreinigungen der wildtypischen Btk-SH3-Domäne, mit Ausnahme der Aufreinigung aus untransfizierten DG75 Btk^{-/-}-Zellen, deutliche Banden für Btk nachweisen (siehe Abb. 18 C, anti-Btk). Die Bandenintensität für Btk war in allen Aufreinigungen vergleichbar mit der Intensität aus Zellen mit der wildtypischen Btk-Variante, es zeigten sich keine Unterschiede zu den LPPV-Varianten (siehe Abb. 18 C, anti-Btk). Daraus lässt sich möglicherweise schließen, dass die intermolekulare Interaktion der SH3-Domäne und der Prolin-reichen Region von Btk nicht über die beiden hier untersuchten Polyprolin-Motive der Klasse I erfolgt.

A

B

C

Abbildung 18: Protein-Interaktionen über die Btk-SH3-Domäne werden durch Mutation in dieser Domäne verhindert. (A) Schematische Darstellung des Btk-SH3-Fusionsproteins sowie dessen Aminosäuresequenz. Das Tryptophan 251 ist rot gekennzeichnet. (B)(C) GST-Fusionsproteine der wildtypischen Btk-SH3-Domäne (GST-Btk-SH3 WT) sowie der inaktivierten Variante (GST-Btk-SH3 W251K) wurden mit Lysaten aus unstimulierten (0') und BZR-stimulierten (3') DG75 Btk^{-/-}-Zellen, die verschiedene Btk-Varianten (WT, LPPV1, LPPV2) exprimierten, inkubiert. Aus den Präzipitaten wurde ein Western Blot angefertigt, der zunächst (B) mit einem Antikörper zur Detektion von Phosphotyrosin (anti-pTyr) entwickelt wurde. (C) Anschließend wurden zur Identifizierung der Phosphoproteine aus (B) spezifische Antikörper gegen PLCy2, Btk, cCbl, Vav1, SLP65, Fyn und Lyn verwendet. Zur Ladekontrolle wurde GST detektiert. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für (B) zwei und (C) je drei bis fünf unabhängige Experimente.

Des Weiteren konnten PLC γ 2, cCbl, Vav1, SLP65, Fyn und Lyn in allen Aufreinigungen mit der wildtypischen SH3-Domäne von Btk detektiert werden. In den Aufreinigungen mit der SH3-W251K-Variante konnten diese Proteine gar nicht oder nur sehr schwach detektiert werden (siehe Abb. 18 C).

Die SH3-Domäne von Btk scheint eine Vielzahl von Bindepartnern zu haben, dazu zählt möglicherweise auch Btk selbst. Des Weiteren scheint der Austausch von Tryptophan 251 durch Lysin die Bindetasche der SH3-Domäne von Btk vollständig zu inaktivieren. Zusammen mit den Ergebnissen aus der durchflusszytometrischen Messung der Ca²⁺-Mobilisierung lässt sich schließen, dass durch Inaktivierung der SH3-Domäne von Btk eine Vielzahl von Interaktionspartnern nicht mehr rekrutiert und dadurch möglicherweise nicht aktiviert werden können, was eine verminderte Ca²⁺-Mobilisierung zur Folge hat.

3.4 Massenspektrometrische Analysen von Btk und PLC γ 2

Ein weiterer Ansatz, um die Funktion und Regulation von Btk und auch PLC γ 2 im Signalweg des BZR zu untersuchen, waren massenspektrometrische Analysen dieser Proteine und ihrer Bindepartner.

3.4.1 Expression von Strep-Btk und Strep-PLC γ 2

Um die Proteine für die massenspektrometrischen Analysen effizient aufzureinigen zu können, wurden Btk und PLC γ 2 N-terminal mit einem OneSTrEP™-tag (IBA, Göttingen) versehen. Diese Varianten werden im Folgenden als Strep-Btk und Strep-PLC γ 2 bezeichnet. Dieser Strep-tag ist mit nur acht Aminosäuren (AS-Sequenz des Strep-tag: WSHPQFEL) sehr kompakt, so dass eine sterische Beeinflussung der Enzyme unwahrscheinlich ist. Außerdem zeigte sich bereits in vorherigen Projekten unserer Arbeitsgruppe eine gute Aufreinigungseffizienz Strep-tag-markierter Proteine (Oellerich et al. 2009; Oellerich 2011; Bohnenberger et al. 2011).

Im Fall von humanem Btk wurde das Konstrukt (siehe Abb. 19 A) im Zuge dieser Arbeit kloniert und in Btk-defizienten DT40- sowie DG75-Zellen exprimiert. Das Konstrukt für PLC γ 2 wurde von Dr. E. Chebbok (ehemals Pavlova) in unserer Arbeitsgruppe angefertigt und in wildtypischen Ramos-Zellen exprimiert (Pavlova 2010).

Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Strep-Btk konnte in den Btk-defizienten DT40- und DG75-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 19

B/C). Bei den erfolgreich transfizierten Zellklonen wurde die BZR-Expression und das Ca^{2+} -Signal nach BZR-Stimulation untersucht und ein repräsentativer Klon ausgewählt (Daten nicht gezeigt). Der ausgewählte Zellklon der transfizierten DT40-Zellen zeigt eine starke Btk-Expression (siehe Abb. 19 B, *), in den DG75-Zellen ist Strep-Btk im Vergleich zu endogenem Btk in DG75-Zellen etwas stärker exprimiert (siehe Abb. 19 C, *).

Abbildung 19: Expression von Strep-Btk. (A) Schematische Darstellung des Konstrukts im pABESpuro-Vektor zur Transfektion Btk-defizienter DT40- und DG75-Zellen. Dieses Konstrukt kodiert für humanes Btk mit N-terminalem Strep-tag. (B) Western Blot mit Lysaten der mit dem Konstrukt aus (A) transfizierten DT40 Btk^{-/-}-Zellen (Strep-Btk). Zur Kontrolle wurden untransfizierte Zellen (Btk^{-/-}) aufgetragen. Mittels anti-Btk-Immunoblot wurde die Strep-Btk-Expression untersucht, zur Ladekontrolle wurde der Western Blot mit einem Antikörper gegen β-Aktin inkubiert. Klon I zeigt eine schwache, Klon II eine starke Strep-Btk-Expression. (C) Anti-Btk-Immunoblot der Zelllysate untransfizierter DG75-Zellen (WT) und DG75 Btk^{-/-}-Zellen (Btk^{-/-}) sowie mit dem Konstrukt aus (A) transfizierter DG75 Btk^{-/-}-Zellen (Strep-Btk) zum Vergleich der Btk-Expression. Zur Ladekontrolle wurde der Western Blot mit einem Antikörper gegen PLCγ2 inkubiert. (B und C) Die mit * gekennzeichnete Klone wurde im Verlauf für weitere Experimente ausgewählt.

Um die Funktionalität der exprimierten Strep-tag-Proteine zu testen, habe ich nach Auswahl der Zellklone mittels Durchflusszytometrie die Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation verglichen. Durch die Expression von Strep-Btk in Btk-defizienten DT40-Zellen konnte der Ca^{2+} -Einstrom normalisiert und somit der Phänotyp revertiert werden (siehe Abb. 20 A). Die Strep-Btk exprimierenden DG75 Btk^{-/-}-Zellen hingegen zeigten eine wesentlich stärkere Ca^{2+} -Mobilisierung als wildtypische DG75-Zellen (siehe Abb. 20 B).

Dr. E. Chebbok (ehemals Pavlova) zeigte in ihrer Arbeit, dass die zusätzliche Expression von Strep-PLCγ2 in wildtypischen Ramos-Zellen zu einem verstärkten Ca^{2+} -Signal führt (Pavlova 2010). Das heißt, beide Strep-tag-Enzyme sind aktiv.

Abbildung 20: Strep-Btk stellt den BZR-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom in Btk-defizienten DT40- und DG75-Zellen wieder her. (A) (B) Die in Abb. 19 B/C beschriebenen Strep-Btk exprimierenden Zell-Klone (blau) sowie jeweils wildtypische (WT) DT40- und DG75-Zellen (rot) und untransfizierte DT40 $\text{Btk}^{-/-}$ - und DG75 $\text{Btk}^{-/-}$ -Zellen (grau) wurden mit Indo-1 AM beladen und die Ca^{2+} -Mobilisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurden die Zellen nach 30 sek Basismessung (Pfeil) mittels (A) eines Antikörpers gegen avinäres IgM oder (B) polyklonalen anti-Human-IgM-F(ab')₂-Fragmenten stimuliert. Die abgebildeten Daten sind jeweils repräsentativ für zwei unabhängige Messungen.

Zur Aufreinigung von Strep-Btk und Strep-PLC γ 2 aus den transfizierten Zellen habe ich die jeweiligen Zelllysate mit Strep-Tactin-Matrix inkubiert. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung detektiert. Es zeigte sich, dass sowohl Strep-PLC γ 2 als auch Strep-Btk spezifisch und effektiv aufgereinigt werden konnten (siehe Abb. 21).

Abbildung 21: Strep-PLC γ 2 und Strep-Btk können effektiv aus den Lysaten transfizierter Zellen aufgereinigt werden. Geklärte Zelllysate der beschriebenen Transfektanten für Strep-PLC γ 2 (links) und Strep-Btk (rechts) wurden mit Strep-Tactin-Matrix inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Matrix wurden Strep-PLC γ 2 und Strep-Btk mittels Desthiobiotin-Puffer eluiert. Mit den Eluatzen wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels durchgeführt. Die Pfeile indizieren die Bande des jeweiligen Strep-Proteins. Am linken Rand ist die relative molekulare Masse des Proteinmarkers in kDa angegeben.

3.4.2 Zusammenfassung der massenspektrometrisch detektierten Phosphorylierungsstellen in Btk und PLC γ 2

Massenspektrometrische Messungen ermöglichen die Analyse von posttranslationalen Modifikationen an Proteinen. Vor der massenspektrometrischen Messung werden Proteine in der Regel in Peptide aufgespalten. Durch Modifikation einer Aminosäure, beispielsweise

durch eine Phosphorylierung an einem Tyrosin, nimmt das Molekulargewicht des Peptids in definierter Weise zu. Dies kann massenspektrometrisch detektiert werden. Für die Aktivierung und Modulierung von intrazellulären Signalkaskaden sind vor allen Dingen Phosphorylierungen an Tyrosinen, Serinen und Threoninen wichtig. Sowohl für PLC γ 2 als auch für Btk sind bereits einige aktivierende und inhibierende Phosphorylierungsstellen bekannt (siehe Abb. 22 und 24, schwarz und blau markierte Phosphorylierungsstellen). Ein Ziel der massenspektrometrischen Analysen dieser Arbeit war es, noch nicht beschriebene Phosphorylierungsstellen in Btk und PLC γ 2 in B-Zellen zu identifizieren.

Zunächst wurden hierfür die Strep-Btk bzw. -PLC γ 2 exprimierenden Zellen (DT40 Strep-Btk, Ramos Strep-PLC γ 2) für 3 min über ihren BZR stimuliert und anschließend lysiert. Für die ersten Messungen wurde jeweils eine Probe gleicher Zellzahl zur Inhibition der zytoplasmatischen Phosphatasen mit Natriumpervanadat inkubiert und anschließend lysiert. Durch die Inhibition der Phosphatasen wird eine maximale Phosphorylierung der Proteine erreicht. Die auf diese Weise detektierten Phosphorylierungsstellen sind jedoch nicht unbedingt physiologisch.

Aus den geklärten Lysaten wurde mittels Strep-Tactin-Matrix Strep-Btk bzw. Strep-PLC γ 2 aufgereinigt und für die massenspektrometrische Analyse aufbereitet. Aus den angefertigten 1D-PAGE-Gelen wurde jeweils die deutlich erkennbare Proteinbande von Strep-Btk bzw. Strep-PLC γ 2 ausgeschnitten und weiter bearbeitet. Diese Arbeiten erfolgten in Kooperation mit dem MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen, insbesondere Dr. M. Nikolov und J. Lehne.

Abbildung 22: Schematische Darstellung der Proteindomänen und Phosphorylierungsstellen von Btk. Strep-Btk wurde aus Lysaten von DT40-Zellen, die für 3 Minuten über ihren BZR stimuliert wurden, mittels Strep-Tactin-Matrix aufgereinigt und massenspektrometrisch untersucht. Es konnten insgesamt acht Btk-Phosphopeptide unterschiedlicher Sequenz detektiert werden, sechs dieser Phosphorylierungsstellen (blau) sind bereits in der Literatur beschrieben. Zusätzlich wurden zwei Peptide (untenhalb des Btk-Schemas dargestellt) bestimmt, die mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen (rot) besitzen. In schwarz sind die Phosphorylierungsstellen dargestellt, die bereits in der Literatur beschrieben jedoch hier nicht detektiert wurden. Zwei Positionen sind in Klammern gesetzt, da sie in der Literatur lediglich aufgrund von Sequenzähnlichkeit mit anderen Proteinen humanem Btk zugeordnet wurden.

Nach BZR-Stimulation konnten acht Btk-Phosphopeptide unterschiedlicher Sequenz detektiert und in sechs von diesen die phosphorylierte Aminosäure bestimmt werden. Sechs der acht detektierten Phosphorylierungsstellen wurden bereits in der Literatur beschrieben (siehe Abb.22, blau markierte Phosphorylierungsstellen), lediglich zwei neue Phosphopeptide konnten detektiert werden (siehe Abb. 22, unterhalb des Btk-Schemas). Aus der Probe der Natriumpervanadat-behandelten Zellen ergaben sich insgesamt 23 verschiedene Phosphorylierungsstellen, darunter 16, die bisher nicht beschrieben wurden (Daten nicht gezeigt). Sechs der publizierten Phosphorylierungsstellen konnten weder nach BZR-Stimulation noch nach Natriumpervanadat-Behandlung detektiert werden. Das insgesamt am häufigsten detektierte Phosphopeptid enthält das Tyrosin an Position 223 in der SH3-Domäne. Die hier gewonnenen Daten können als Basis für zukünftige Untersuchungen dienen, bisher wurden jedoch keine weiteren Versuche vorgenommen.

Abbildung 23: Schematische Darstellung des Time-Course-Experiments. Strep-PLCy2 exprimierende Ramos-Zellen wurden entweder in „leichtem“ oder „schwerem“ SILAC-Medium kultiviert. Die in „leichtem“ Medium kultivierte Zellen (rot) wurden unstimuliert belassen, die in „schwerem“ Medium kultivierten Zellen (blau) wurden entweder für 3, 10 oder 20 min mittels polyklonalen anti-Human-IgM-F(ab)₂-Fragmenten stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, Strep-PLCy2 mittels Strap-Tactin-Matrix aufgereinigt und eluiert. Die Eluate aus unstimulierten und stimulierten Zellen wurden im Verhältnis 1:1 vermengt und denaturiert. Nach Auftrennung der Eluate mittels Gelelektrophorese wurden die PLCy2-Banden ausgeschnitten und für die Phosphorylierungsanalyse weiterverarbeitet. Die Reste der Gelspuren wurden mittels Schablone zerschnitten und die Gelfragmente wurden für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

Aus den Ergebnissen der oben beschriebenen Versuche kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Phosphorylierung der Btk-Peptide nach BZR-Stimulation erfolgt ist oder bereits in unstimulierten Zellen vorlag. Um dies für PLCy2 zu untersuchen, habe ich die Strep-PLCy2 exprimierenden Ramos-Zellen im Vorfeld mittels SILAC-Methode markiert. Die

gleiche Zellzahl „leicht“ und „schwer“ markierter Zellen wurde verwendet. Die „leicht“ markierten Zellen wurden unstimuliert belassen, die „schwer“ markierten wurden über den BZR jeweils für 3, 10 oder 20 min stimuliert (siehe Abb. 23). Anschließend wurden alle Zellen lysiert und Strep-PLC γ 2 mittels Strep-Tactin-Matrix aus den geklärten Lysaten aufgereinigt. Die Eluate stimulierter und unstimulierter Zellen wurden 1:1 gegemischt. Die Proben wurden über eine 1D-Elektrophorese aufgetrennt und die Protein-Bande für Strep-PLC γ 2 jeweils nach der Färbung ausgeschnitten. Die restliche Gelspur wurde für eine Interaktomanalyse verwendet (siehe Abb. 23). Bei dieser quantitativen Analyse kann durch die vorherige Markierung der Proteine ein Verhältnis zwischen der Phosphorylierung vor und nach der BZR-Stimulation erstellt werden.

Abbildung 24: Schematische Darstellung der Proteindomänen und Phosphorylierungsstellen von PLC γ 2. Strep-PLC γ 2 wurde aus Lysaten von Ramos-Zellen, die über ihren BZR (3, 10, 20 min) stimuliert wurden, mittels Strep-Tactin-Matrix aufgereinigt und massenspektrometrisch untersucht. Nach Stimulation der Zellen wurden insgesamt 13 PLC γ 2-Phosphopeptide detektiert, drei dieser Phosphorylierungsstellen (blau) sind bereits in der Literatur für humane PLC γ 2 beschrieben. Zusätzlich wurden zehn neue Phosphopeptide detektiert (rot), in acht von ihnen (unterhalb des PLC γ 2-Schemas dargestellt) gibt es mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen (rot). In zwei Peptiden wurde sowohl eine Tyrosinphosphorylierung als auch eine Serin-/Threoninphosphorylierung detektiert (EGTDSYAITFR und MYVDPSEINPSMPQR). In schwarz sind die Phosphorylierungsstellen dargestellt, die bereits in der Literatur beschrieben sind, jedoch hier nicht detektiert wurden. Es sind jeweils die Aminosäurepositionen für das humane Protein angegeben. Die Ergebnisse sind eine Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch diese massenspektrometrischen Analysen sowie durch die nicht-quantitativen Analysen im Vorfeld wurden in Strep-PLC γ 2 nach BZR-Stimulation 13 Phosphopeptide massenspektrometrisch bestimmt. In zwei dieser Peptide wurde sowohl eine Tyrosinphosphorylierung als auch eine Serin-/Threoninphosphorylierung detektiert (EGTDSYAITFR und MYVDPSEINPSMPQR). Dabei konnte die Tyrosinphosphorylierungsstelle im Gegensatz zu der Serin-/Threoninphosphorylierungsstelle jeweils einer eindeutigen Position (Y680 und Y759) zugeordnet werden. Drei detektierte Phosphorylierungsstellen sind bereits in der Literatur bekannt (siehe Abb. 24, blau markierte Phosphorylierungsstellen). Zwei neue Phosphorylierungsstellen, Tyrosin 680 und Serin 847, konnten exakt zugeordnet werden (siehe Abb. 24,

rot markierte Phosphorylierungsstellen). Acht Peptide enthalten mehrere potenzielle Serin- oder Threoninphosphorylierungsstellen (siehe Abb. 24, unterhalb des PLC γ 2-Schemas), die alle noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. In der Natriumpervanadat-behandelten Probe wurden fünf weitere noch nicht beschriebene Phosphorylierungsstellen detektiert (Daten nicht gezeigt). Zwei der bereits beschriebenen Phosphotyrosine (Y1197, Y1245) konnten in keiner der Proben detektiert werden (siehe Abb. 24 schwarz markierte Phosphorylierungsstellen). Die am häufigsten detektierten Peptide enthielten die bekannten Tyrosinphosphorylierungsstellen an Position 753 und 1217 in humanem PLC γ 2, wobei letztgenannte nur in den nicht-quantitativen (SILAC-freien) Analysen nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch im Zuge der *Time-Course*-Experimente (siehe Abb. 23 und Tbl. 10).

In dem in Abb. 23 beschriebenen *Time-Course*-Experiment war auffällig, dass die meisten der Phosphopeptide bereits nach 3 min Stimulation detektiert wurden, ein Phosphorylierungsverlauf über die Dauer der Stimulation konnte nicht gesehen werden (siehe Tbl. 10).

Sequenz	Phosphorylierung		SILAC		
		3 min	3 min	10 min	20 min
RNSISLR	S160/162	+	+	+	+
LSFSDDIEQTVEEDPVQDTPPELHFG EK	S504/506 T512/521/524	+			
TSAEKLLQEYCAETGAK	T541/554 S542	+	+	+	+
EGTDSYAITFR	Y680		+	+	+
EGTDSYAITFR	T677/683 S679	+	+	+	+
DINSLYDVSR	Y753	+	+	+	+
MYVDPSEINPSMPQR	Y759	+			+
MYVDPSEINPSMPQR	S763/768	+			
SDELTFCR	S785		+		
QIIEDNPLGSLCR	S847		+		+
SFVETKADSIVR	S957/965 T961	+	+	+	+
QEELNNQLFLYDTHQNLIR	Y1217	+			
VSNSR	S1259/1261			+	+

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der detektierten PLC γ 2-Phosphorylierungsstellen aus Abbildung 24. Der Versuchsablauf ist wie unter Abbildung 23 beschrieben. Die erste Spalte zeigt die Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) des detektierten Phosphopeptids, die potenziellen Phosphorylierungsstellen sind hervorgehoben. In der zweiten Spalte ist die Position der (potenziellen) Phosphorylierungsstellen angegeben (S=Serin, T=Threonin, Y=Tyrosin). Die letzten vier Spalten geben an, in welcher Probe das Phosphopeptid detektiert wurde (+). Dabei zeigt die erste der vier Spalten die Daten der nicht-quantitativen Analysen, nachdem die Zellen für 3 min über den BZR stimuliert wurden. Die letzten drei Spalten zeigen die Daten der quantitativen SILAC-Analyse nach 3, 10 oder 20 min BZR-Stimulation.

Die Daten der massenspektrometrischen Analysen von Btk und PLCy2 haben eine Vielzahl potenzieller neuer Phosphorylierungsstellen hervorgebracht. Um eine Aussage über Funktion und Kinetik dieser neuen Phosphorylierungsstellen treffen zu können, sind noch weitere funktionelle und massenspektrometrische Analysen notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden konnten.

3.4.3 Zusammenfassung der Interaktomanalysen von Btk und PLCy2

Zur Bestimmung der Interaktome von Btk und PLCy2 wurden ebenfalls massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Dazu habe ich Strep-Btk und Strep-PLCy2 aus BZR-stimulierten Zellen aufgereinigt und untransfizierte Zellen als Kontrollen verwendet. Die Zellen wurden zuvor in SILAC-Medium entweder mit „leichten“ oder „schweren“ Aminosäuren markiert, so dass eine Unterscheidung der Peptide in der Analyse möglich war. Nach Stimulation und Lyse der Zellen wurde Strep-Btk bzw. Strep-PLCy2 über eine Strep-Tactin-Matrix isoliert. Die Eluate der zu vergleichenden Proben (je Ansatz eine „leicht“ und eine „schwer“ markierte Probe) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und nach 1D-PAGE und Trypsin-Spaltung massenspektrometrisch analysiert.

Abbildung 25: Zusammenfassung der Interaktomanalyse für Btk. Strep-Btk exprimierende sowie wildtypische DT40- und DG75-Zellen wurden mittels SILAC-Medium mit „leichten“ oder „schweren“ Aminosäuren markiert und über ihren BZR stimuliert (3 min). Aus den Lysaten wurde mittels Strep-Tactin-Matrix Strep-Btk isoliert, die Eluate im Verhältnis 1:1 gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt die Proteine, deren Peptide in der „schwer“ markierten Probe mindestens fünffach im Vergleich zur „leichten“ Probe angereichert waren. Diese Abbildung fasst die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Analysen zusammen.

Bei der Analyse werden Peptidpaare gebildet, bei denen sich die Masse des jeweiligen Peptids genau um die Summe der Massenunterschiede der modifizierten Aminosäuren unter-

scheidet. Unterscheidet sich die Intensität der korrespondierenden Peptide mindestens um den Faktor fünf, ist von einer spezifischen Aufreinigung auszugehen. Gleichzeitig durchgeführte Kontrollen zeigten eine mindestens 98%ige SILAC-Markierung der Zellen.

Aus diesen Analysen konnte ich bisher keine neuen in Frage kommenden Interaktionspartner der beiden Signalproteine herausfiltern. Die in den einzelnen Analysen spezifisch aufgereinigten Proteine sind in Abbildung 25 und 26 zusammenfassend dargestellt. Als Positivkontrolle für Stimulation und Aufreinigung konnte in den Analysen von Strep-Btk PLC γ 2 als bekannter Interaktionspartner detektiert werden. In den Experimenten mit Strep-PLC γ 2 konnten SLP65 oder Btk detektiert werden, jedoch nie beide im selben Experiment.

Abbildung 26: Zusammenfassung der Interaktomanalyse für PLC γ 2. Strep-PLC γ 2 exprimierende sowie wildtypische Ramos-Zellen wurden mittels SILAC-Medium mit „leichten“ oder „schweren“ Aminosäuren markiert und über ihren BZR stimuliert (3, 10, 20 min). Aus den Lysaten wurde mittels Strep-Tactin-Matrix Strep-PLC γ 2 isoliert, die Eluate im Verhältnis 1:1 gemischt und massenspektrometrisch analysiert (Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in Abb. 23). Die Abbildung zeigt die Proteine, deren Peptide in der „schwer“ markierten Probe mindestens fünffach im Vergleich zur „leichten“ Probe angereichert waren. Diese Abbildung fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Analysen zusammen.

4 Diskussion

Die Charakterisierung von Signalwegen und Proteinfunktionen, vor allem, wenn diese im Bezug zu einer Erkrankung oder einer möglichen Therapie stehen, ist ein zentraler Aspekt der molekularen Immunologie. Je weiter sich die methodischen Möglichkeiten entwickeln, z.B. durch massenspektrometrische Analysen, desto detaillierter können die einzelnen molekularen Abläufe aufgeschlüsselt werden. Der BZR-Signalweg und seine kostimulatorischen Signale sind Beispiele für biochemische Kaskaden, über die schon vieles bekannt ist, jedoch viele Fragen noch offen sind. Eines der Effektorproteine dieser B-Zell-Signal-Kaskaden ist die Protein-Tyrosin-Kinase Btk. Seit der Erstbeschreibung der Btk-assoziierten Erkrankung X-gekoppelte Agammaglobulinämie (XLA) im Jahre 1952 (Bruton 1952) wurde viel über die Krankheit und ihre Ursache berichtet (Tsukada et al. 1993; Vetrie et al. 1993; Väliäho et al. 2006). Die Funktion von Btk ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Zum einen unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die bereits bekannte Stellung von Btk im BZR- Ca^{2+} -Signalweg, zum anderen entwickeln sich daraus neue Erkenntnisse hinsichtlich der Interaktionsmotive von Btk und deren möglicher Funktion:

1. Btk ist ein Hauptakteur im BZR- Ca^{2+} -Signalweg der humanen B-Zelllinie DG75, dieses zeigt die verminderte Ca^{2+} -Mobilisierung der Btk-defizienten DG75-Zellen.
2. Die Prolin-reiche Region von Btk mit ihren zwei Polyprolin-Motiven spielt eine entscheidende Rolle für die Funktionalität von Btk.
3. Btk interagiert über seine Prolin-reiche Region mit Grb2 über dessen N-terminale SH3-Domäne und kommt dadurch als Effektorprotein im ITT-Signalweg in Frage.
4. Btk ist entscheidend für die ITT-abhängige Signalverstärkung von mIgG-BZRs, da in Btk-defizienten Zellen das gesteigerte Ca^{2+} -Signal entfällt.
5. Die SH3-Domäne von Btk bindet zahlreiche Interaktionspartner und ihre Funktionalität ist für die Ca^{2+} -Mobilisierung in B-Zellen entscheidend.
6. Massenspektrometrische Analysen von Btk und PLC γ 2 haben neue Phosphorylierungsstellen in diesen Proteinen aufgedeckt, die als Basis für zukünftige Untersuchungen dienen können.

4.1 Btk - ein Hauptakteur im BZR-Ca²⁺-Signalweg

Mutationen des *BTK*-Gens, die die Funktion oder Expression der Kinase beeinträchtigen, führen beim Menschen zur XLA (Väliäho et al. 2006). Es kommt durch die fehlende Reifung von B-Lymphozyten zu einem Mangel an Immunglobulinen und damit zu einer Infektneigung (Ochs und Smith 1996; Mohamed et al. 2009). In Mäusen heißt das durch eine Btk-Mutation verursachte Krankheitsbild Xid (*X-linked Immunodeficiency*) und verläuft wesentlich milder als XLA beim Menschen (Thomas et al. 1993).

Auch wenn der Genlocus sowie der Phänotyp der XLA bekannt sind, gab es bisher noch kein humanes Zelllinien-Modell zur Btk-Defizienz. Das einzig verfügbare Zelllinien-Modell war eine Btk-defiziente Variante der Hühner-B-Zelllinie DT40. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, weisen Btk-defiziente DT40-Zellen nur noch ein sehr geringes Ca²⁺-Signal nach Stimulation über den BZR auf. Leider gibt es einige Nachteile bei der Arbeit mit Hühner-Zellen, wie beispielsweise einen Mangel an spezifischen Antikörpern für Hühner-Proteine zur biochemischen Analyse von Signalprozessen. Die im Zuge dieser Arbeit generierten Btk-defizienten DG75-Zellen weisen diese Problematik nicht auf, da sie humanen Ursprungs sind. Jedoch zeigte sich bei der Analyse der Ca²⁺-Mobilisierung zwar ein deutlicher Unterschied in der Intensität des Signals zwischen Btk-defizienten und wildtypischen Zellen, dennoch weisen die Btk-defizienten DG75 Zellen im Vergleich zu den Btk-defizienten DT40-Zellen noch ein deutlich stärkeres Ca²⁺-Signal auf (siehe Abb. 20). Durch Rekonstitution der Btk-defizienten DG75-Zellen mit Citrine-Btk konnte der Phänotyp des verringerten Ca²⁺-Signals revertiert werden. Die Btk-defizienten DG75-Zellen aus dieser Arbeit sind demzufolge als Modell zur Expression verschiedener Btk-Varianten und zur Untersuchung ihrer Eigenschaften geeignet.

Ursächlich für den in DG75- gegenüber DT40-Zellen geringer ausgeprägten Ca²⁺-Defekt könnte die Expression von Tec, einem weiteren Mitglied der Tec-Tyrosin-Kinasen-Familie, zu der auch Btk gehört, in humanen B-Zellen sein. Tec konnte in verschiedenen Stadien der B-Zell-Reifung im Menschen nachgewiesen werden (Kitanaka et al. 1998). In immortalisierten B-Zellen aus XLA-Patienten, in denen die Btk-Expression fehlte, war die Expression von Tec sogar besonders hoch (Kitanaka et al. 1998). In Hühner-B-Lymphozyten wurde bisher kein Tec-Protein nachgewiesen. Der Nachweis einer Tec-Expression in den Btk-defizienten DG75-Zellen dieser Arbeit mittels Western Blot-Analyse war leider nicht möglich, da die verwendeten Primärantikörper kein eindeutiges Signal ergaben. Selbst die Expression von Citrine-markiertem Tec, welche zu einer Wiederherstellung des Ca²⁺-Signals in Btk-defizienten

DG75-Zellen führte, ergab keinen suffizienten Nachweis im Immunoblot mittels der verwendeten Tec-Antikörper (Daten nicht gezeigt).

Auch vorausgegangene Publikationen haben gezeigt, dass Mitglieder der Tec-Familie die Funktion von Btk in der BZR-Kaskade ersetzen können (Fluckiger et al. 1998; Tomlinson et al. 1999; Ellmeier et al. 2000). Trotz Expression von Tec in humanen B-Lymphozyten führt ein Fehlen von Btk zur XLA (Kitanaka et al. 1998). So scheint die Funktion dieser beiden Kinasen nicht vollständig redundant zu sein.

Untermalt wird die Annahme, dass die noch vorhandene Ca^{2+} -Mobilisierung in Btk-defizienten DG75-Zellen durch eine Aktivierung von Tec hervorgerufen wird, durch eine Beobachtung im Zuge dieser Arbeit: Werden Btk-defiziente DG75-Zellen mit höheren Dosen von Ibrutinib, einem spezifischen Btk-Inhibitor, inkubiert, verringert sich das Ca^{2+} -Signal im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Ibrutinib bindet spezifisch an ein Cystein an Position 481 in humanem Btk, welches auch in Tec und Itk konserviert ist. Eine Inhibition von Itk in T-Lymphozyten durch Ibrutinib ist bereits publiziert (Dubovsky et al. 2013).

4.2 Das Polyprolin-Motiv ist entscheidend für die Funktionalität von Btk

Die beiden Klasse I-Polyprolin-Motive zwischen dem Btk-Motiv und der SH3-Domäne von Btk wurden bisher nur wenig untersucht. In der BTKbase-Datenbank finden sich für beide dieser Motive Mutationen, die bei Patienten zum klinischen Bild der XLA geführt haben. Jedoch handelt es sich dabei hauptsächlich um *Frameshift*- oder *Nonsense*-Mutationen, die zu einem verfrühten Stopcodon und damit zur Expression eines verkürzten, unfunktionalen Proteins führen. Lediglich zwei *Missense*-Mutationen in diesem Bereich sind in XLA-Patienten beschrieben, von denen keine die Polyprolin-Motive direkt betrifft (Väliäho et al. 2006).

Die Prolin-reiche Region ist innerhalb der Tec-Kinase-Familie nicht konserviert. Tec beispielsweise besitzt zwei Polyprolin-Motive, wobei das C-terminale Polyprolin-Motiv zwar einer Typ I-Konsensussequenz entspricht, sich jedoch deutlich von dem Motiv in Btk unterscheidet. Itk besitzt hingegen nur ein Polyprolin-Motiv, das dem N-terminalen Motiv von Btk entspricht, dessen Abstand zur SH3-Domäne jedoch dem des C-terminalen Motivs in Btk gleicht (Hansson et al. 2001b).

Polyprolin-Motive werden von SH3-Domänen gebunden (Sparks et al. 1994; Simon und Schreiber 1995). Bekannte Interaktionen der Prolin-reichen Region in Btk sind die mit Lyn,

Fyn und Hck (Cheng et al. 1994) sowie die Interaktion mit der Grb2-N-SH3-Domäne (König 2012, diese Arbeit).

Untersucht man die Polyprolin-Motive von Btk getrennt voneinander bezüglich der BZR-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisierung, zeigt sich, dass eine Inaktivierung des C-terminalen Polyprolin-Motivs keinen Einfluss auf die Signalstärke hat. Hingegen zeigen Zellen, die die LPPV1-Variante von Btk oder die Doppelmutante (LPPV1/2) exprimieren, ein deutlich geringeres Ca^{2+} -Signal nach Stimulation über den mIgM-BZR, vergleichbar mit Kinase-inaktivierten Varianten. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint, anders als bei Fluckiger et al. (1998) beschrieben, die Polyprolin-Region von Btk eine entscheidende Rolle für die Signalstärke des BZRs zu spielen.

Obwohl sich die beiden Prolin-Motive sehr ähnlich sind und beide der Konsensussequenz Typ I entsprechen, scheinen sie also unterschiedliche Funktionen zu haben. Das N-terminale Motiv scheint für die BZR- Ca^{2+} -Signalkaskade sowie für die Bindung an Grb2 entscheidend zu sein. Hierfür spricht, dass dieses Motiv in Itk, der Haupt-Tec-Kinase in T-Lymphozyten (Tomlinson et al. 2004; Berg et al. 2005), konserviert ist (Hansson et al. 2001b) und die Aktivität in Itk reguliert (Hao und August 2002). Die Funktion des C-terminalen Motivs in Btk ist unklar. Dass es bei Inaktivierung des N-terminalen Motivs dieses nicht ersetzen kann, könnte an einer fehlenden räumlichen Zugänglichkeit für SH3-Domänen liegen (Mayer 2001).

Neben der Bindung von Grb2 wurde auch eine Bindung von Btk an die Prolin-reiche Region von Btk detektiert. Durch eine Interaktion der Btk-SH3-Domäne mit der Prolin-reichen Region eines anderen Btk-Moleküls könnte sich ein Dimer in trans-Formation bilden (Hansson et al. 2001a). Diese Bindung kann durch Austausch der Proline innerhalb der Polyprolin-Motive unterbunden werden (Hansson et al. 2001b). Dabei scheinen beide Polyprolin-Motive wichtig für diese Interaktion zu sein. Veränderungen im N-terminalen Motiv haben jedoch größere Auswirkungen auf das Bindungsverhalten (Hansson et al. 2001b). Neben den Prolinen der Klasse I-Motivs (Prolin 189 bzw. Prolin 192 sowie Prolin 203 bzw. Prolin 206) sind hierbei auch die Proline an Position -2 und 1 (Prolin 187 bzw. Prolin 190 sowie Prolin 201 bzw. Prolin 204) entscheidend (Hansson et al. 2001b). Dies wird mit einer gewissen Bindungsflexibilität der SH3-Domäne von Btk begründet (Hansson et al. 2001b). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Klasse I-Prolin-Motiv-unabhängige Bindung von Btk an das Fusionsprotein der Btk-SH3-Domäne beobachtet werden.

Diese Ergebnisse stammen alle aus *in vitro*-Studien mit Fragmenten von Btk. Ob eine intra- oder intermolekulare Interaktion von Btk *in vivo* stattfindet und welche Relevanz diese hätte, ist noch weiter zu klären.

4.3 Mechanismus und Funktion der Interaktion von Btk und Grb2

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Adapterprotein Grb2 über seine SH2-Domäne an das phosphorylierte ITT-Motiv des mIgG-BZRs rekrutiert wird und dass diese Interaktion essenziell für die erhöhte Antigensensitivität mIgG-exprimierender B-Zellen ist (Engels et al. 2009). Dabei konnte mittels biochemischer und genetischer Experimente gezeigt werden, dass die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 das ITT funktionell ersetzen kann, die C-terminale SH3-Domäne hingegen nicht (König 2012).

Grb2 selbst hat keine enzymatische Funktion, so dass es einen weiteren Effektor geben muss, der durch Grb2 an das ITT rekrutiert wird und damit für das gesteigerte Ca^{2+} -Signal von mIgG-BZRs sorgt. Die bisher bekannten Interaktionspartner von Grb2 kommen von ihrer bekannten Funktion her nicht in Frage (Neumann et al. 2009).

In dieser Arbeit konnte Btk in biochemischen Interaktionsstudien als spezifischer Bindepartner für die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 und somit als Kandidat für die ITT-abhängige Signalverstärkung identifiziert werden. Für Btk als mögliches Effektorprotein in dieser Kaskade spricht, dass sich in dieser Arbeit eine wesentlich geringere bis kaum nachweisbare Bindung von Btk an die SH3-Domänen von Grap und die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 zeigen ließ. Dies passt zu den Ergebnissen, dass das ITT funktionell durch die N-terminale SH3-Domäne von Grb2, nicht jedoch durch die C-terminale oder die SH3-Domänen von Grap ersetzt werden kann (König 2012; Engels et al. 2014).

Neben Btk kann auch SLP65 an die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 binden. SLP65 kommt jedoch als gesuchter spezifischer Interaktionspartner für die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 im ITT-Signalweg eher nicht in Frage, da SLP65 auch an die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 bindet. Die Bindung von SLP65 erklärt also nicht den spezifischen positiven Effekt der Grb2-N-SH3-Domäne im ITT-Signalweg. Auch wenn es in der Aminosäuresequenz von SLP65 potentielle Bindemotive für die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 gibt, ist es nicht auszuschließen, dass es sich um eine indirekte Interaktion über Btk handelt (Hashimoto et al. 1999).

Wie bereits beschrieben, besitzt Btk eine Prolin-reiche Region mit zwei fast identischen Polyprolin-Motiven, die der Typ I-Konsensussequenz und somit einem typischen Bindemotiv

der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 entsprechen (Sparks et al. 1996). Ich konnte zeigen, dass die Prolin-reiche Region von Btk *in vitro* Grb2 bindet. Verändert man das N-terminal Polyprolin-Motiv dieser Region durch Mutagenese so, dass es nicht mehr der Konsensussequenz-Typ I entspricht (als LPPV1 bezeichnet), geht die Bindung von Grb2 verloren. Wenn andererseits das C-terminale Polyprolin-Motiv auf gleiche Weise verändert wird (als LPPV2 bezeichnet), bleibt die Bindung von Grb2 bestehen. Das entscheidende Btk-Polyprolin-Motiv für die Bindung an Grb2 ist daher das N-terminale der beiden fast identischen Motive.

Die Bindung des Grb2-verwandten Adapterproteins Grap an die Prolin-reiche Region von Btk ist hingegen äußerst schwach. Dr. L. König zeigte in seiner Dissertation, dass weder die N- noch die C-terminale SH3-Domäne von Grap das ITT funktional ersetzen können (König 2012). Die Aminosäuresequenzhomologie zwischen Grb2 und Grap beträgt 59%. Vergleicht man die einzelnen Domänen miteinander, besteht die größte Homologie zwischen den N-SH3-Domänen der beiden Adapterproteine (Feng et al. 1996). Welche Aminosäuren in der SH3-Domäne nun entscheidend für die Bindung an Btk sind, ist noch zu klären.

4.4 Die ITT-abhängige Signalverstärkung von mIgG-BZRs ist abhängig von Btk

Patienten mit XLA haben verminderte Serumspiegel aller Immunglobulinisoformenten (Ochs und Smith 1996). *In vivo*-Experimente in Mäusen mit eingeschränkter Btk-Funktion zeigten ebenfalls eine verminderte sekundäre humorale Immunreaktion (Khan et al. 1995; Ellmeier et al. 2000). Dr. L. König aus unserer Arbeitsgruppe zeigte in seiner Dissertation zudem, dass Btk als Element des ITT-Signalwegs in Frage kommt, da in Abwesenheit von Btk auch die ITT-abhängige Steigerung des Ca^{2+} -Signals ausbleibt (König 2012). Erst nach Rekonstitution von Btk in den Zellen ließ sich im Zuge dieser Arbeit die vermehrte Ca^{2+} -Mobilisierung wieder herstellen. Dies ist teilweise durch die Anwesenheit von Btk in der bekannten BZR-Ig α /Ig β -ITAM-Kaskade zu erklären. Das deutlich gesteigerte Ca^{2+} -Signal lässt jedoch darauf schließen, dass Btk auch eine Rolle in der ITT-abhängigen Signalverstärkung spielt.

In der Zelle wird das exogene mIgG als Komplexe zusammen mit Ig α und Ig β exprimiert, dies gilt auch für die endogenen mIgG/mIgE der B-Zellen, die einen Klassenwechsel durchlaufen haben. Es besteht somit eine räumliche Nähe zwischen den Ig α /Ig β -ITAMs und den ITTs. Werden die Zellen über ihren BZR stimuliert, wird das Signal zum einen ITAM-abhängig über die bekannte Signalkaskade weitergeleitet und es kommt zur Rekrutierung der bekannten Effektorproteine, zu anderen kommt es hierdurch zur Phosphorylierung des ITTs und die

entstandene SH2-Domänen-Bindestelle wird von Grb2 gebunden (Engels et al. 2009; Engels et al. 2014) (siehe Abb. 16). Über die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 erfolgt eine Rekrutierung von Btk, zusätzlich kann über die C-terminale SH3-Domäne eine Bindung an SLP65 erfolgen (Grabbe und Wienands 2006; König 2012; diese Arbeit), welches wiederum PLC γ 2 rekrutieren kann. Somit würde es ITT-abhängig zu einer vermehrten Rekrutierung und Aktivierung von Signalmolekülen kommen. Eine ITT-abhängige vermehrte Phosphorylierung von SLP65 und PLC γ 2 wurde bereits gezeigt (Engels et al. 2009). Unterstützt wird diese vermehrte Aktivierung stimulierender Regulatoren durch die Sequestrierung von Grb2 – mit Hilfe der Bindung an das ITT - aus negativen Regulationsmechanismen (Stork et al. 2004; Stork et al. 2007).

Eine Inaktivierung des N-terminalen Polyprolin-Motivs von Btk führt wiederum zu einer verringerten Ca²⁺-Mobilisierung nach Stimulation über die mIgG-Chimäre vergleichbar mit Btk-defizienten Zellen. Dies lässt sich zum einen über den bereits unter 4.2. beschriebenen Funktionsverlust von Btk nach Inaktivierung des N-terminalen Polyprolin-Motivs als auch durch die ausbleibende Bindung an der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 im ITT-Signalweg erklären.

4.5 Die Btk-SH3-Domäne ist essenziell für die BZR-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung

SH3-Domänen sind kurze Protein-Protein-Interaktions-Elemente in vielen Signal-leitenden Proteinen. Die Besonderheiten der SH3-Domänen der Tec-Kinase-Familie sind eine Autophosphorylierungsstelle in diesem Bereich (Park et al. 1996) sowie intra- und intermolekulare Interaktionen mit der vorgeschalteten Prolin-reichen Region (Hansson et al. 2001b; Andreotti et al. 1997). Beides soll die Aktivität der Kinase regulieren.

In dieser Arbeit konnte ich mittels affinitätschromatographischer Experimente die Interaktionsvielfalt der Btk-SH3-Domäne demonstrieren. Als potenzielle neue Bindepartner der SH3-Domäne von Btk konnten die Src-PTK Fyn, das Adapterprotein SLP65 und PLC γ 2 isoliert werden. Besonders die Interaktion mit den beiden letztgenannten Proteine könnte zur Assemblierung des Ca²⁺-Initiationskomplexes beitragen. Sowohl PLC γ 2 als auch SLP65 besitzen in ihrer Aminosäuresequenz passende Prolin-Motive für die Interaktion mit der Btk-SH3-Domäne. Eine indirekte Interaktion, vor allem bezüglich PLC γ 2 über SLP65 (Ishiai et al. 1999; Engelke et al. 2013), ist jedoch nicht auszuschließen.

Missense-Punktmutationen im Bereich der SH3-Domäne von Btk, die im Menschen zum klinischen Bild der XLA führen, sind nicht bekannt (Väliäho et al. 2006). Zur Inaktivierung der SH3-Domäne wurde in dieser Arbeit ein Tryptophanrest der Bindetasche an Position 251 (W251), äquivalent zur Inaktivierung der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 (König 2012; diese Arbeit), ausgewählt und durch Lysin ersetzt (W251K). Durch diese Mutation wurden die Interaktionen der SH3-Domäne fast vollständig unterbunden. Auch die Bindung an Btk selbst war deutlich geringer, so scheint ein intaktes Bindemotiv innerhalb der SH3-Domäne entscheidend für die Dimerisierung von Btk über die Prolin-reiche Region zu sein.

Der Verlust der Bindekapazität der W251K-Variante von Btk verringert die BZR-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung auf das Niveau Btk-defizienter Zellen. Dieses verminderte Signal passt zu dem Ergebniss, dass eine Bindung der bekannten Signalosomproteine SLP65 und PLCy2 an die inaktivierte SH3-Domäne von Btk ebenfalls reduziert ist. Ein Ca^{2+} -Signal, vergleichbar mit dem Btk-defizienter Zellen, lässt sich allein hierdurch jedoch nicht erklären, da die bereits vielseitig untersuchte Interaktion zwischen Btk, SLP65 und PLCy2 über eine Stimulations-abhängige Bindung von SH2-Domänen an Phosphotyrosin-Motive erfolgt (Su et al. 1999; Chiu et al. 2002; Shoji Hashimoto et al. 1999). Möglich wäre jedoch eine Stimulations-unabhängige Vorrekrutierung des Ca^{2+} -Initiationskomplexes über eine SH3-abhängige Bindung, die eine anschließende Phosphotyrosin-abhängige Bindung über SH2-Domänen durch bereits vorhandene räumliche Nähe vereinfacht.

Ob die Inaktivierung der SH3-Domäne von Btk neben einem verminderten Ca^{2+} -Signal auch eine verminderte Phosphorylierung von PLCy2 zur Folge hat, ließ sich in dem verwendeten Zellmodell nicht klären, da PLCy2 bereits in unstimulierten DG75-Zellen deutlich phosphoryliert ist (Daten nicht gezeigt).

Für einige bekannte Interaktionspartner der Btk-SH3-Domäne wurde bereits gezeigt, dass sie nach BZR-Stimulation der Zellen und nachfolgender Autophosphorylierung von Btk am Tyrosin 223 innerhalb der SH3-Domäne nicht mehr binden (Guinamard et al. 1997). Welche Rolle die Autophosphorylierung für die mögliche Interaktion mit PLCy2 oder SLP65 spielt, ist noch zu klären.

4.6 Massenspektrometrische Identifizierung neuer Phosphorylierungsstellen in Btk und PLC γ 2

Massenspektrometrische Analysen von Signalkaskaden und Signalproteinen erlauben die Generierung großer Datensätze aus einem einzigen Experiment. Sie ermöglichen die unvoreingenommene Untersuchung von Interaktionen und posttranslationalen Modifizierungen.

4.6.1 BZR-induzierte Phosphorylierungsstellen in humanem Btk

In dieser Arbeit konnte ich mittels massenspektrometrischer Analysen sechs der dreizehn publizierten Phosphorylierungsstellen in Btk verifizieren. Die am häufigsten detektierte Phosphorylierungsstelle ist das bekannte Tyrosin an Position 223 von humanem Btk. Dieses Tyrosin ist in allen Kinasen der Tec-Familie konserviert und wird mit Ausnahme von Tec durch Autophosphorylierung modifiziert (Nore et al. 2003). Diese Phosphorylierungsstelle liegt innerhalb der SH3-Domänen-Bindungstasche und ihr wird eine regulatorische Funktion zugesprochen (Park et al. 1996). Weitere detektierte Phosphorylierungsstellen waren das Tyrosin an Position 551, welches im BZR-Ca²⁺-Signalweg Lyn-abhängig phosphoryliert wird (Mahajan et al. 1995; Rawlings et al. 1996), das PKC β -abhängig phosphorylierte Serin an Position 180 (Kang et al. 2001) sowie Threonin 191 und Serin 659, die erstmals 2009 in einer Proteomanalyse gefunden wurden und deren Funktion noch nicht geklärt ist (Oppermann et al. 2009). Bei dem Phosphoserin 21 handelt es sich um eine Bindestelle für die Peptidyl-propyl-Isomerase Pin1, die als negativer Regulator von Btk beschrieben ist (Yu et al. 2006). Die zweite bekannte Pin1-Bindestelle, ein Phosphoserin an Position 115, konnte in den Analysen dieser Arbeit nicht detektiert werden.

Zusätzlich zu den bekannten Phosphorylierungsstellen wurden zwei weitere Phosphopeptide nach Aktivierung der Zellen über den BZR sowie nach Natriumpervanadatbehandlung detektiert: Eines der Peptide stammt aus dem Übergang der Prolin-reichen Region zur SH3-Domäne und enthält eine Serin- oder Threonin-Phosphorylierungsstelle. Eine Phosphorylierung in diesem Bereich könnte die Interaktionen der beiden angrenzenden Bindedomänen, der Prolin-reichen Region und der SH3-Domäne, regulieren. Ein weiteres Peptid stammt aus der SH2-Domäne und besitzt zwei potenzielle Serin- oder Threonin-Phosphorylierungsstellen, von denen aber nur eine phosphoryliert war. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle könnte die Bindung an phosphoryliertem SLP65 über die SH2-Domäne regulieren. Welche der jeweiligen Aminosäuren (Serin oder Threonin) in den detektierten

Peptiden phosphoryliert ist und welche Effekte die Phosphorylierungen auf die Funktion von Btk haben, bedarf weiterer Untersuchungen.

Von den in dieser Arbeit nicht detektierten, aber zuvor beschriebenen Phosphorylierungsstellen sind Tyrosin 40 und 344 nur durch Proteomanalysen aus Maus-Mastzellen (Cao et al. 2007) und Serin 55 und Tyrosin 361 aus massenspektrometrischen Analysen des humanen Kinoms bekannt (Oppermann et al. 2009). Eine mögliche Erklärung, warum diese Phosphorylierungsstellen in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurden, ist, dass sie möglicherweise nicht über die Aktivierung des BZR-Signalwegs erfolgen. Die Phosphorylierung von Tyrosin 344 in humanem Btk konnte jedoch nach Inkubation der Zellen mit Natriumpervanadat in dieser Arbeit detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Der fehlende Nachweis für phosphoryliertes Tyrosin 617 und Serin 623 nach Aktivierung der Zellen liegt möglicherweise daran, dass diese Phosphorylierungsstellen in unstimulierten und artifiziellen Zellsystemen nachgewiesen wurden (Guo et al. 2004).

Es ist auch ausdrücklich zu erwähnen, dass diese Daten lediglich aus zwei Analysen in DT40-Zellen generiert wurden und durch weitere Untersuchungen vor allem in einem humanen Zellsystem (z.B. DG75) validiert werden sollten. Auch wenn die Zellen zuvor über ihren BZR stimuliert wurden, ist nicht auszuschließen, dass einige Phosphorylierungen BZR-unabhängig erfolgen.

4.6.2 BZR-induzierte Phosphorylierungsstellen in PLC γ 2

Auch wenn in dieser Arbeit PLC γ 2 der Ratte untersucht wurde, werde ich die erhaltenen Daten mit den bekannten Ergebnissen zu humaner PLC γ 2 vergleichen, da eine 95-prozentige Aminosäuresequenzhomologie besteht und ein Zellsystem humanen Ursprungs verwendet wurde. Für humanes PLC γ 2 sind wesentlich weniger Phosphorylierungsstellen in der Literatur beschrieben als für Btk. Von den fünf bekannten Phosphorylierungen wurden drei in dieser Arbeit nach Stimulation der Zellen über den BZR detektiert. Die Tyrosine an Position 753 und 759 werden durch Btk phosphoryliert und führen zur Aktivierung der Phospholipase (Watanabe et al. 2001; Rodriguez et al. 2001; Ozdener et al. 2002). Die Phosphorylierung von Tyrosin 1217 erfolgt *in vitro* bei Ratten-PLC γ 2 ebenfalls durch Btk (Watanabe et al. 2001), scheint jedoch nicht vollständig Btk-abhängig zu sein (Humphries et al. 2004). Zusätzlich wurden diese drei Phosphorylierungsstellen in einer Phosphoproteomanalyse des T-Zell-Signalwegs beschrieben (Mayya et al. 2009)

Eine der nicht-detektierten Phosphorylierungsstellen, Tyrosin 1245, wurde ebenfalls in einer Proteomanalyse aus aktivierten T-Zellen beschrieben (Brill et al. 2004). Ein anderes Tyrosin an Position 1197 hingegen ist eine weitere Btk-Phosphorylierungsstelle im BZR-Signalweg (Watanabe et al. 2001).

Zusätzlich zu den bekannten Phosphorylierungsstellen wurden nach Stimulation über den BZR (nach 3, 10 oder 20 min) noch zehn weitere Phosphopeptide massenspektrometrisch detektiert. Im Gegensatz zu den bekannten Tyrosin-Phosphorylierungsstellen sind dies zum größten Teil Serin- und Threoninphosphorylierungen, die sich über das gesamte Molekül verteilen. Keine der detektierten Phosphorylierungsstellen korrespondiert mit bekannten Phosphorylierungsstellen aus anderen Spezies oder PLC γ 1.

Die am häufigsten detektierten Phosphopeptide befinden sich in der PLC-Y-Box und in den beiden SH2-Domänen, wobei das Peptid in der C-terminalen SH2-Domäne sowohl eine Tyrosinphosphorylierung an Position 680 als auch eine Phosphorylierung an einem der Threonine oder am Serin aufweist. Über eine Phosphorylierung in diesen Domänen könnte eine Regulation von PLC γ 2 erfolgen, indem die Bindung zu SLP65 über die SH2-Domäne (Fu et al. 1998; Ishiai et al. 1999) sowie die enzymatische Funktion beeinflusst werden. Die Relevanz dieser neuen Phosphorylierungsstellen sowie die ausführenden Kinasen müssen noch weiter untersucht werden.

Auffällig ist, dass sowohl bei PLC γ 2 als auch PLC γ 1 die meisten bzw. alle bekannten Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Proteinanteil liegen (UniProt-Datenbank). Ursächlich hierfür könnte eine bestimmte Konformation der Phospholipasen sein, die den über die PH-Domäne an die Membran rekrutierten N-terminalen Teil für Kinasen unzugänglich macht.

4.6.3 Interaktionspartner von Btk und PLC γ 2 aus BZR-stimulierten B-Zellen

Es konnten in den durchgeführten massenspektrometrischen Interaktomanalysen keine neuen Interaktionspartner der beiden BZR-Signal-Komponenten Btk und PLC γ 2 detektiert werden. Es ist davon auszugehen, dass die Aufreinigung der Peptide und die massenspektrometrische Analyse funktioniert haben, da Peptide bekannter Interaktionspartner wie PLC γ 2 im Falle von Btk sowie Btk und SLP65 im Falle von PLC γ 2 detektiert wurden. Auch zeigen die graphischen Auswertungen der einzelnen Analysen im Dotblot eine gute Aufreinigungsqualität (Daten nicht gezeigt).

Generell wurden in den einzelnen Analysen jedoch sehr wenig spezifisch angereicherte Peptide detektiert. Ursächlich hierfür könnten zu harsche Zelllysebedingungen nach Ablauf der Stimulation sein. Es wurde der Standardlysepuffer unserer Arbeitsgruppe verwendet, der eine mittlere Ionenkonzentration an Detergenzien enthält (siehe 2.1.7).

Besonders für Btk ist jedoch im Zuge dieser Arbeit aufgefallen, dass Aufreinigungsexperimente mit dem kompletten Protein nur wenige Banden im Western Blot zeigen, im Vergleich zur Aufreinigung anderer Proteine unter gleichen Konditionen. Meine Aufreinigungsexperimente mit den einzelnen Proteindomänen von Btk hingegen legen deutlich mehr Interaktionspartner nahe. Möglicherweise ist die Konformation von Btk sehr instabil bzw. flexibel. Hinweise hierfür geben Untersuchungen mit Kinaseinhibitoren (Kuglstatter et al. 2011).

Zusammenfassend kann ich sagen, dass es mir gelungen ist, in dieser Arbeit ein humanes B-Zell-System zur massenspektrometrischen Analyse des Interaktoms und Phosphotoms von Btk zu entwickeln. Zelllyse -und Aufreinigungskonditionen müssen jedoch weiter optimiert werden.

5 Zusammenfassung und Fazit

Btk ist ein entscheidendes Signalmolekül im kanonischen BZR- Ca^{2+} -Signalweg. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion dieses Enzyms und dessen Interaktionen besser zu verstehen. Um die Funktion von Btk in einem humanen Zelllinienmodell untersuchen zu können, habe ich in der humanen B-Zelllinie DG75 einen Btk-defizienten Zellklon hergestellt und etabliert. Diese Btk-defizienten DG75-Zellen zeigen ein eindeutig vermindertes Ca^{2+} -Signal nach Stimulation über den BZR, welches durch Rekonstitution der Btk-Expression wieder hergestellt werden kann. Mit Hilfe dieser Zellen kann die Funktion sowie das Fehlen von Btk untersucht werden. Es bietet die Möglichkeit, in einem stabilen humanen System durch Rekonstitutionsexperimente mit Varianten von Btk die Funktion einzelner Domänen und Motive der Kinase zu untersuchen.

Durch diese Rekonstitutionsexperimente konnte ich zeigen, dass die zuvor wenig untersuchte Prolin-reiche Region von Btk mit ihren zwei Polyprolin-Motiven eine entscheidende Rolle für die Funktionalität der Proteinkinase spielt. Nach Inaktivierung des N-terminalen Polyprolin-Motivs zeigte sich ein deutlich vermindertes Ca^{2+} -Signal nach BZR-Stimulation. Außerdem konnte ich zeigen, dass Btk über dieses Polyprolin-Motiv spezifisch mit der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 interagiert und somit als nachgeschalteter Interaktionspartner von Grb2 im ITT-Signalweg in Frage kommt. Mit dem Fehlen von Btk bleibt die ITT-abhängige Signalverstärkung nach Stimulation der Zellen über einen mIgG-BZR aus. Gleiches konnte nach Inaktivierung des Polyprolin-Motivs von Btk gezeigt werden. Mit Btk als Interaktionspartner der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 im ITT-Signalweg wäre eine Verbindung zwischen ITAM-abhängigem kanonischem BZR-Signalweg und ITT-abhängiger Signalverstärkung hergestellt.

Neben der Polyprolin-Region agiert auch die SH3-Domäne von Btk als Bindedomäne für viele unterschiedliche Interaktionspartner und ist somit ebenfalls für das Ca^{2+} -Signal in B-Lymphozyten entscheidend.

Neben der funktionellen Integrität der einzelnen Proteindomänen sind auch Phosphorylierungen zur Regulation der Enzymaktivität wichtig. In massenspektrometrischen Analysen konnten mehrere neue Phosphopeptide in Btk und PLC γ 2 detektiert werden. Die funktionelle Relevanz dieser potenziellen Phosphorylierungsstellen muss jedoch in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Achatz G, Lamers MC (1997): In vivo analysis of the cytoplasmic domain of mIgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 113, 142–145
- Ackermann JA, Radtke D, Maurberger A, Winkler TH, Nitschke L (2011): Grb2 regulates B-cell maturation, B-cell memory responses and inhibits B-cell Ca²⁺ signalling. *EMBO J* 30, 1621–1633
- Ahmed R, Gray D (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54–60
- Andreotti AH, Bunnell SC, Feng S, Berg LJ, Schreiber SL (1997): Regulatory intramolecular association in a tyrosine kinase of the Tec family. *Nature* 385, 93–97
- Baba TW, Humphries EH (1984): Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines. *Virology* 135, 181–188
- Batista FD, Harwood NE (2009): The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9, 15–27
- Ben-Bassat H, Goldblum N, Mitrani S, Goldblum T, Yoffey JM, Cohen MM, Bentwich Z, Ramot B, Klein E, Klein G (1977): Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a “Burkitt like” malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer* 19, 27–33
- Berg LJ, Finkelstein LD, Lucas JA, Schwartzberg PL (2005): Tec family kinases in T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 23, 549–600
- Bestas B, Moreno PMD, Blomberg KEM, Mohammad DK, Saleh AF, Sutlu T, Nordin JZ, Guterstam P, Gustafsson MO, Kharazi S (2014): Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J Clin Invest* 124, 4067–4081
- Bohnenberger H, Oellerich T, Engelke M, Hsiao H-H, Urlaub H, Wienands J (2011): Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells. *Eur J Immunol* 41, 1550–1562
- Brack C, Hirama M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S (1978): A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1–14
- Brill LM, Salomon AR, Ficarro SB, Mukherji M, Stettler-Gill M, Peters EC (2004): Robust phosphoproteomic profiling of tyrosine phosphorylation sites from human T cells using immobilized metal affinity chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 76, 2763–2772
- Bruton OC (1952): Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 9, 722–728
- Campbell MA, Sefton BM (1992): Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the Src family of protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 12, 2315–2321
- Cao L, Yu K, Banh C, Nguyen V, Ritz A, Raphael BJ, Kawakami Y, Kawakami T, Salomon AR (2007):

- Quantitative time-resolved phosphoproteomic analysis of mast cell signaling. *J Immunol* 179, 5864–5876
- Casey PJ (1995): Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268, 221–215
- Cheng G, Ye ZS, Baltimore D (1994): Binding of Bruton's tyrosine kinase to Fyn, Lyn, or Hck through a Src homology 3 domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8152–8155
- Cheng PC, Dykstra ML, Mitchell RN, Pierce SK (1999a): A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* 190, 1549–1560
- Cheng PC, Steele CR, Gu L, Song W, Pierce SK (1999b): MHC class II antigen processing in B cells: accelerated intracellular targeting of antigens. *J Immunol* 162, 7171–7180
- Chiu CW, Dalton M, Ishiai M, Kurosaki T, Chan AC (2002): BLNK: molecular scaffolding through "cis"-mediated organization of signaling proteins. *EMBO J* 21, 6461–6472
- Cory GO, Lovering RC, Hinshelwood S, MacCarthy-Morrogh L, Levinsky RJ, Kinnon C (1995): The protein product of the c-cbl protooncogene is phosphorylated after B cell receptor stimulation and binds the SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase. *J Exp Med* 182, 611–615
- Crabtree GR, Olson EN (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109, 67–79
- Crosby D, Poole AW (2002): Interaction of Bruton's tyrosine kinase and protein kinase C θ in platelets. Cross-talk between tyrosine and serine/threonine kinases. *J Biol Chem* 277, 9958–9965
- Cyster JG (2010): Shining a light on germinal center B cells. *Cell* 143, 503–505
- Davies DR, Cohen GH (1996): Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 7–12
- Deane JA, Fruman DA (2004): Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 22, 563–598
- Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G, Woyach JA, Jaglowski S, Zhong Y, Hessler JD, Liu T-M, Chang BY, Larkin KM (2013): Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood* 122, 2539–2549
- Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L (1980): An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981–992
- Ellmeier W, Jung S, Sunshine MJ, Hatam F, Xu Y, Baltimore D, Mano H, Littman DR (2000): Severe B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members Tec and Btk. *J Exp Med* 192, 1611–1624
- Engelke M, Engels N, Dittmann K, Stork B, Wienands J (2007): Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* 218, 235–246
- Engelke M, Oellerich T, Dittmann K, Hsiao H-H, Urlaub H, Serve H, Griesinger C, Wienands J (2013):

- Cutting edge: feed-forward activation of phospholipase $\text{C}\gamma 2$ via C2 domain-mediated binding to SLP65. *J Immunol* 191, 5354–5358
- Engels N, Wollscheid B, Wienands J (2001): Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. *Eur J Immunol* 31, 2126–2134
- Engels N, König LM, Heemann C, Lutz J, Tsubata T, Griep S, Schrader V, Wienands J (2009): Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat Immunol* 10, 1018–1025
- Engels N, König LM, Schulze W, Radtke D, Vanshylla K, Lutz J, Winkler TH, Nitschke L, Wienands J (2014): The immunoglobulin tail tyrosine motif upgrades memory-type BCRs by incorporating a Grb2-Btk signalling module. *Nat Commun* 5:5456, 1–11
- Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J (1998): Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17, 414–422
- Fearon DT, Locksley RM (1996): The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50–53
- Feederle R, Delecluse H-J, Rouault J-P, Schepers A, Hammerschmidt W (2004): Efficient somatic gene targeting in the lymphoid human cell line DG75. *Gene* 343, 91–97
- Feng GS, Ouyang Y Bin, Hu DP, Shi ZQ, Gentz R & Ni J (1996): Grap is a novel SH3-SH2-SH3 adaptor protein that couples tyrosine kinases to the Ras pathway. *J Biol Chem* 271, 12129–12132
- Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL (1994): Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266, 1241–1247
- Feng S, Kapoor TM, Shirai F, Combs AP, Schreiber SL (1996): Molecular basis for the binding of SH3 ligands with non-peptide elements identified by combinatorial synthesis. *Chem Biol* 3, 661–670
- Ferry H, Leung JCH, Lewis G, Nijnik A, Silver K, Lambe T, Cornall RJ (2006): B-cell tolerance. *Transplantation* 81, 308–315
- Flaswinkel H, Reth M (1994): Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J* 13, 83–89
- Fluckiger AC, Li Z, Kato RM, Wahl MI, Ochs HD, Longnecker R, Kinet JP, Witte ON, Scharenberg AM, Rawlings DJ (1998): Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca^{2+} following B-cell receptor activation. *EMBO J* 17, 1973–1985
- Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC (1998): BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9, 93–103
- Fütterer K, Wong J, Grucza RA, Chan AC, Waksman G (1998): Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2

- domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol* 281, 523–537
- Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D (1993): Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363, 88–92
- Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, Melchers F (1998): B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today* 19, 480–485
- Glick B, Chang TS, Jaap RG (1956): The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poult Sci* 35, 224–225
- Goitsuka R, Fujimura Y, Mamada H, Umeda A, Morimura T, Uetsuka K, Doi K, Tsuji S, Kitamura D (1998): BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* 161, 5804–5808
- Grabbe A, Wienands J (2006): Human SLP-65 isoforms contribute differently to activation and apoptosis of B lymphocytes. *Blood* 108, 3761–3768
- Guinamard R, Fougereau M, Seckinger P (1997): The SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase interacts with Vav, Sam68 and EWS. *Scand J Immunol* 45, 587–595
- Guo B, Kato RM, Garcia-Lloret M, Wahl MI, Rawlings DJ (2000): Engagement of the Human Pre-B Cell Receptor Generates a Lipid Raft-Dependent Calcium Signaling Complex. *Immunity* 13, 243–253
- Guo S, Ferl GZ, Deora R, Riedinger M, Yin S, Kerwin JL, Loo JA, Witte ON (2004): A phosphorylation site in Bruton's tyrosine kinase selectively regulates B cell calcium signaling efficiency by altering phospholipase C-gamma activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 14180–14185
- Hansson H, Okoh MP, Smith CI, Vihinen M, Härd T (2001a): Intermolecular interactions between the SH3 domain and the proline-rich TH region of Bruton's tyrosine kinase. *FEBS Lett* 489, 67–70
- Hansson H, Smith CI, Härd T (2001b): Both proline-rich sequences in the TH region of Bruton's tyrosine kinase stabilize intermolecular interactions with the SH3 domain. *FEBS Lett* 508, 11–15
- Hao S, August A (2002): The proline rich region of the Tec homology domain of ITK regulates its activity. *FEBS Lett* 525, 53–58
- Harmer SL, DeFranco AL (1999): The Src Homology Domain 2-Containing Inositol Phosphatase SHIP Forms a Ternary Complex with Shc and Grb2 in Antigen Receptor-stimulated B Lymphocytes. *J Biol Chem* 274, 12183–12191
- Hashimoto S, Iwamatsu A, Ishiai M, Okawa K, Yamadori T, Matsushita M, Baba Y, Kishimoto T, Kurosaki T, Tsukada S (1999): Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood* 94, 2357–2364
- Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, Li S, Pan Z, Thamm DH, Miller RA, Buggy JJ (2010): The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107,

13075–13080

- Honjo T, Kataoka T (1978): Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 2140–2144
- Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M (2002): Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 20, 165–196
- Hood L, Campbell JH, Elgin SC (1975): The organization, expression, and evolution of antibody genes and other multigene families. *Annu Rev Genet* 9, 305–353
- Humphries LA, Dangelmaier C, Sommer K, Kipp K, Kato RM, Griffith N, Bakman I, Turk CW, Daniel JL, Rawlings DJ (2004): Tec Kinases Mediate Sustained Calcium Influx via Site-specific Tyrosine Phosphorylation of the Phospholipase C Src Homology 2-Src Homology 3 Linker. *J Biol Chem* 279, 37651–37661
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28
- Ishiai M, Sugawara H, Kurosaki M, Kurosaki T (1999): Cutting edge: association of phospholipase C-gamma 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. *J Immunol* 163, 1746–1749
- Isnardi I, Lesourne R, Bruhns P, Fridman WH, Cambier JC, Daëron M (2004): Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor FcγRIIB to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap. *J Biol Chem* 279, 51931–51938
- Janeway CA, Medzhitov R (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197–216
- Jang IK, Zhang J, Gu H (2009): Grb2, a simple adapter with complex roles in lymphocyte development, function, and signaling. *Immunol Rev* 232, 150–159
- Jang IK, Cronshaw DG, Xie L, Fang G, Zhang J, Oh H, Fu Y-X, Gu H, Zou Y (2011): Growth-factor receptor-bound protein-2 (Grb2) signaling in B cells controls lymphoid follicle organization and germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 7926–7931
- Johannes FJ, Hausser A, Storz P, Truckenmüller L, Link G, Kawakami T, Pfizenmaier K (1999): Bruton's tyrosine kinase (Btk) associates with protein kinase C mu. *FEBS Lett* 461, 68–72
- Kaisho T, Schwenk F, Rajewsky K (1997): The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* 276, 412–415
- Kang SW, Wahl MI, Chu J, Kitaura J, Kawakami Y, Kato RM, Tabuchi R, Tarakhovsky A, Kawakami T, Turck CW (2001): PKCβ modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization. *EMBO J* 20, 5692–5702
- Kessels HWHG, Ward AC, Schumacher TNM (2002): Specificity and affinity motifs for Grb2 SH2-ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8524–8529
- Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, Malynn BA, Larsson I, Rathbun G, Davidson L, Müller S, Kantor AB,

- Herzenberg LA (1995): Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 3, 283–299
- Kitanaka A, Mano H, Conley ME, Campana D (1998): Expression and activation of the nonreceptor tyrosine kinase Tec in human B cells. *Blood* 91, 940–948
- Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* 5, 319–334
- König L: B Cell antigen receptor-intrinsic costimulation of IgG and IgE isotypes. Mol. Med. Diss. Göttingen 2012
- Koyama S, Yu H, Dalgarno DC, Shin TB, Zydowsky LD, Schreiber SL (1993): Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family. *Cell* 72, 945–952
- Kuglstatter A, Wong A, Tsing S, Lee SW, Lou Y, Villaseñor AG, Bradshaw JM, Shaw D, Barnett JW, Browner MF (2011): Insights into the conformational flexibility of Bruton's tyrosine kinase from multiple ligand complex structures. *Protein Sci* 20, 428–436
- Kurosaki T, Takata M, Yamanashi Y, Inazu T, Taniguchi T, Yamamoto T, Yamamura H (1994): Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med* 179, 1725–1729
- Kurosaki T, Johnson SA, Pao L, Sada K, Yamamura H, Cambier JC (1995): Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* 182, 1815–1823
- Kurosaki T, Maeda A, Ishiai M, Hashimoto A, Inabe K, Takata M (2000): Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells. *Immunol Rev* 176, 19–29
- Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y (2010): B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* 28, 21–55
- Kurosaki T, Kometani K, Ise W (2015): Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 15, 149–159
- Kwan SP, Kunkel L, Bruns G, Wedgwood RJ, Latt S, Rosen FS (1986): Mapping of the X-linked agammaglobulinemia locus by use of restriction fragment-length polymorphism. *J Clin Invest* 77, 649–652
- Kwan SP, Terwilliger J, Parmley R, Raghu G, Sandkuyl LA, Ott J, Ochs H, Wedgwood R, Rosen F (1990): Identification of a closely linked DNA marker, DXS178, to further refine the X-linked agammaglobulinemia locus. *Genomics* 6, 238–242
- Lankar D (2002): Dynamics of Major Histocompatibility Complex Class II Compartments during B Cell Receptor-mediated Cell Activation. *J Exp Med* 195, 461–472
- Levin-Klein R, Bergman Y (2014): Epigenetic regulation of monoallelic rearrangement (allelic exclusion) of antigen receptor genes. *Front Immunol* 5, 1–6

- Lewitzky M, Kardinal C, Gehring NH, Schmidt EK, Konkol B, Eulitz M, Birchmeier W, Schaeper U, Feller SM (2001): The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene* 20, 1052–1062
- Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J (1993): Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363, 85–88
- Lim WA, Richards FM, Fox RO (1994): Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* 372, 375–379
- Lindvall JM, Blomberg KEM, Vargas L, Nore BF, Vihinen M, Smith CIE, Berglo A (2005): Bruton 's tyrosine kinase : cell biology , sequence conservation , mutation spectrum , siRNA modifications , and expression profiling. *Immunol Rev* 203, 200–215
- Liu SK, McGlade CJ (1998): Gads is a novel SH2 and SH3 domain-containing adaptor protein that binds to tyrosine-phosphorylated Shc. *Oncogene* 17, 3073–3082
- Liu W, Meckel T, Tolar P, Sohn HW, Pierce SK (2010): Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling. *Immunity* 32, 778–789
- Liu W, Chen E, Zhao XW, Wan ZP, Gao YR, Davey A, Huang E, Zhang L, Crocetti J, Sandoval G (2012): The scaffolding protein synapse-associated protein 97 is required for enhanced signaling through isotype-switched IgG memory B cell receptors. *Sci Signal* 5, ra54
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J (1992): The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431–442
- MacGlashan D, Honigberg LA, Smith A, Buggy J, Schroeder JT (2011): Inhibition of IgE-mediated secretion from human basophils with a highly selective Bruton's tyrosine kinase, Btk, inhibitor. *Int Immunopharmacol* 11, 475–479
- Mahajan S, Fagnoli J, Burkhardt AL, Kut SA, Saouaf SJ, Bolen JB (1995): Src family protein tyrosine kinases induce autoactivation of Bruton's tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 15, 5304–5311
- Mayer BJ (2001): SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 114, 1253–1263
- Mayya V, Lundgren DH, Hwang S-I, Rezaul K, Wu L, Eng JK, Rodionov V, Han DK (2009): Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* 2, ra46
- McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L (2011): Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* 12, 24–34
- Mestecky J (1972): Structure of antibodies. *J Oral Pathol* 1, 288–300

- Mitchell GF, Miller JF (1968): Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 128, 821–837
- Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö C-M, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglöf A, Vihinen M, Nore BF (2009): Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev* 228, 58–73
- Morita S, Kojima T, Kitamura T (2000): Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063–1066
- Murphy K: Janeway's Immunobiology. 8. Auflage; Garland Science, New York 2012
- Neumann K, Oellerich T, Urlaub H, Wienands J (2009): The B-lymphoid Grb2 interaction code. *Immunol Rev* 232, 135–149
- Nisitani S, Satterthwaite AB, Akashi K, Weissman IL, Witte ON, Wahl MI (2000): Posttranscriptional regulation of Bruton's tyrosine kinase expression in antigen receptor-stimulated splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2737–2742
- Nitschke L, Tsubata T (2004): Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends Immunol* 25, 543–550
- Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ, Brandén LJ, Bäckesjö CM, Islam TC, Mattsson PT, Hulténby K, Christensson B, Smith CI (2000): Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol* 30, 145–154
- Nore BF, Mattsson PT, Antonsson P, Bäckesjö C-M, Westlund A, Lennartsson J, Hansson H, Löw P, Rönstrand L, Smith CIE (2003): Identification of phosphorylation sites within the SH3 domains of Tec family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1645, 123–132
- Nutt SL, Tarlinton DM (2011): Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 12, 472–477
- Ochs HD, Smith CI (1996): X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine (Baltimore)* 75, 287–299
- Oellerich T: Die Organisation von Signalnetzwerken in B-Lymphozyten. Med. Diss. Göttingen 2011
- Oellerich T, Grønborg M, Neumann K, Hsiao H-H, Urlaub H, Wienands J (2009): SLP-65 phosphorylation dynamics reveals a functional basis for signal integration by receptor-proximal adaptor proteins. *Mol Cell Proteomics* 8, 1738–1750
- Oh-hora M, Johmura S, Hashimoto A, Hikida M, Kurosaki T (2003): Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med* 198, 1841–1851
- Olivier JP, Raabe T, Henkemeyer M, Dickson B, Mbamalu G, Margolis B, Schlessinger J, Hafen E, Pawson T (1993): A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless

- tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, *Sos*. *Cell* 73, 179–191
- Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376–386
- Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch J V (1996): Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 383, 263–266
- Oppermann FS, Gnad F, Olsen J V, Hornberger R, Greff Z, Kéri G, Mann M, Daub H (2009): Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol Cell Proteomics* 8, 1751–1764
- Ott J, Mensink EJ, Thompson A, Schot JD, Schuurman RK (1986): Heterogeneity in the map distance between X-linked agammaglobulinemia and a map of nine RFLP loci. *Hum Genet* 74, 280–283
- Ozdener F, Dangelmaier C, Ashby B, Kunapuli SP, Daniel JL (2002): Activation of phospholipase Cgamma2 by tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol* 62, 672–679
- Park H, Wahl MI, Afar DE, Turck CW, Rawlings DJ, Tam C, Scharenberg AM, Kinet JP, Witte ON (1996): Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* 4, 515–525
- Patel H V, Tzeng SR, Liao CY, Chen SH, Cheng JW (1997): SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase can bind to proline-rich peptides of TH domain of the kinase and p120cbl. *Proteins* 29, 545–552
- Pavlova E: Analyse der Aktivierungsdynamik der Phospholipase C-γ2 in Antigen-stimulierten B-Lymphozyten. Biol. Dipl. Göttingen 2010
- Pieper K, Grimbacher B, Eibel H (2013): B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131, 959–971
- Pierce SK (2002): Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2, 96–105
- Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H, Wahl MI, Lin S, Kato RM, Fluckiger AC, Witte ON, Kinet JP (1996): Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science* 271, 822–825
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D (1993): Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157–1161
- Reth M (1989): Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383–384
- Reth M (1992): Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97–121
- Rhee SG (2000): Regulation of the phospholipase C-γ2 pathway in B cells. *Immunol Rev* 176, 19–29
- Robinson D, Chen HC, Li D, Yustein JT, He F, Lin WC, Hayman MJ, Kung HJ (1998): Tyrosine kinase expression profiles of chicken erythro-progenitor cells and oncogene-transformed erythroblasts. *J Biomed Sci* 5, 93–100
- Rodriguez R, Matsuda M, Perisic O, Bravo J, Paul A, Jones NP, Light Y, Swann K, Williams RL, Katan M (2001): Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-

- cell signaling. *J Biol Chem* 276, 47982–47992
- Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D (1993): The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83–85
- Saijo K, Mecklenbräuer I, Santana A, Leitger M, Schmedt C, Tarakhovsky A (2002): Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J Exp Med* 195, 1647–1652
- Saksela K, Permi P (2012): SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett* 586, 2609–2614
- Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R, Margolis RL, Gigg R, Smith CI, Driscoll PC (1996): Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* 15, 6241–6250
- Sanchez M, Misulovin Z, Burkhardt AL, Mahajan S, Costa T, Franke R, Bolen JB, Nussenzweig M (1993): Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *J Exp Med* 178, 1049–1055
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467
- Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ (2007): Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* 7, 778–789
- Schmidt U, Boucheron N, Unger B, Ellmeier W (2004a): The role of Tec family kinases in myeloid cells. *Int Arch Allergy Immunol* 134, 65–78
- Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, Litos G, de Bruijn M, Gutiérrez L, Hendriks RW, Ellmeier W, Löwenberg B, Beug H (2004b): Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med* 199, 785–795
- Schulze-Luehrmann J, Ghosh S (2006): Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 25, 701–715
- Sideras P, Müller S, Shiels H, Jin H, Khan WN, Nilsson L, Parkinson E, Thomas JD, Brandén L, Larsson I (1994): Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J Immunol* 153, 5607–5617
- Simon JA, Schreiber SL (1995): Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chem Biol* 2, 53–60
- Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, Kjellén P, Lambris JD, Christensson B, Hammarström L (1994): Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol* 152, 557–565

- Smith CI, Islam TC, Mattsson PT, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M (2001): The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays* 23, 436–446
- Songyang Z, Shoelson SE, McGlade J, Olivier P, Pawson T, Bustelo XR, Barbacid M, Sabe H, Hanafusa H, Yi T (1994): Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* 14, 2777–2785
- Sparks AB, Quilliam LA, Thorn JM, Der CJ, Kay BK (1994): Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J Biol Chem* 269, 23853–23856
- Sparks AB, Rider JE, Hoffman NG, Fowlkes DM, Quilliam LA, Kay BK (1996): Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1540–1544
- Stork B, Engelke M, Frey J, Horejsí V, Hamm-Baarke A, Schraven B, Kurosaki T, Wienands J (2004): Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a Ca(2+)-regulating signal circuit in B lymphocytes. *Immunity* 21, 681–691
- Stork B, Neumann K, Goldbeck I, Alers S, Kähne T, Naumann M, Engelke M, Wienands J (2007): Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca²⁺ signaling in B cells. *EMBO J* 26, 1140–1149
- Su YW, Zhang Y, Schweikert J, Koretzky GA, Reth M, Wienands J (1999): Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur J Immunol* 29, 3702–3711
- Sugawara H, Kurosaki M, Takata M, Kurosaki T (1997): Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* 16, 3078–3088
- Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y (1979): Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 91, 1218–1224
- Takata M, Kurosaki T (1996): A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med* 184, 31–40
- Thomas JD, Sideras P, Smith CI, Vorechovský I, Chapman V, Paul WE (1993): Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 261, 355–358
- Tomlinson MG, Kurosaki T, Berson AE, Fujii GH, Johnston JA, Bolen JB (1999): Reconstitution of Btk Signaling by the Atypical Tec Family Tyrosine Kinases Bmx and Txk. *J Biol Chem* 274, 13577–13585
- Tomlinson MG, Kane LP, Su J, Kadlecsek TA, Mollenauer MN, Weiss A (2004): Expression and function of Tec, Itk, and Btk in lymphocytes: evidence for a unique role for Tec. *Mol Cell Biol* 24, 2455–2466

- Tonegawa S (1983): Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581
- Tsang E, Giannetti AM, Shaw D, Dinh M, Tse JKY, Gandhi S, Ho H, Wang S, Papp E, Bradshaw JM (2008): Molecular mechanism of the Syk activation switch. *J Biol Chem* 283, 32650–32659
- Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, Sparkes RS, Kubagawa H, Mohandas T, Quan S (1993): Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72, 279–290
- Väliäho J, Smith CIE, Vihinen M (2006): BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 27, 1209–1217
- Varnai P, Rother KI, Balla T (1999): Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Membrane Association of the Bruton's Tyrosine Kinase Pleckstrin Homology Domain Visualized in Single Living Cells. *J Biol Chem* 274, 10983–10989
- Venkitaraman AR, Williams GT, Dariavach P, Neuberger MS (1991): The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* 352, 777–781
- Vetrie D, Voiechovskyli I, Siderasi P (1993): The Gene Involved in X-linked Agammaglobulinaemia Is a Member of the Src Family of. *Nature* 361, 226–233
- Vettermann C, Schlissel MS (2010): Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol Rev* 237, 22–42
- Victoria GD, Nussenzweig MC (2012): Germinal Centers. *Annu Rev Immunol* 30, 429–457
- Vihinen M, Nilsson L, Smith CI (1994a): Structural basis of SH2 domain mutations in X-linked agammaglobulinemia. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1270–1277
- Vihinen M, Vetrie D, Maniar HS, Ochs HD, Zhu Q, Vorechovský I, Webster AD, Notarangelo LD, Nilsson L, Sowadski JM (1994b): Structural basis for chromosome X-linked agammaglobulinemia: a tyrosine kinase disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12803–12807
- Vihinen M, Belohradsky BH, Haire RN, Holinski-Feder E, Kwan SP, Lappalainen I, Lehtväslaiho H, Lester T, Meindl A, Ochs HD (1997a): BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic Acids Res* 25, 166–171
- Vihinen M, Nore BF, Mattsson PT, Bäckesjö CM, Nars M, Koutaniemi S, Watanabe C, Lester T, Jones A, Ochs HD (1997b): Missense mutations affecting a conserved cysteine pair in the TH domain of Btk. *FEBS Lett* 413, 205–210
- Wang D, Feng J, Wen R, Marine J-C, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson CW, Cleveland JL, Murray PJ (2000): Phospholipase C γ 2 Is Essential in the Functions of B Cell and Several Fc Receptors. *Immunity* 13, 25–35
- Watanabe D, Hashimoto S, Ishiai M, Matsushita M, Baba Y, Kishimoto T, Kurosaki T, Tsukada S (2001): Four Tyrosine Residues in Phospholipase C-2, Identified as Btk-dependent Phosphorylation Sites, Are Required for B Cell Antigen Receptor-coupled Calcium Signaling. *J Biol Chem* 276,

38595–38601

- Wienands J, Freuler F, Baumann G (1995): Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk. *Int Immunol* 7, 1701–1708
- Wienands J, Schweikert J, Wollscheid B (1998): SLP-65 : A New Signaling Component in B Lymphocytes which Requires Expression of the Antigen Receptor for Phosphorylation. *J Exp Med* 188, 791–795
- Winding P, Berchtold MW (2001): The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J Immunol Methods* 249, 1–16
- Yamamoto T, Yamanashi Y, Toyoshima K (1993): Association of Src-Family Kinase Lyn with B-Cell Antigen Receptor. *Immunol Rev* 132, 187–206
- Yamanashi Y, Kakiuchi T, Mizuguchi J, Yamamoto T, Toyoshima K (1991): Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* 251, 192–194
- Yao L, Kawakami Y, Kawakami T (1994): The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9175–9179
- Yu H, Rosen MK, Shin TB, Seidel-Dugan C, Brugge JS, Schreiber SL (1992): Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science* 258, 1665–1668
- Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL (1994): Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76, 933–945
- Yu L, Mohamed AJ, Vargas L, Berglöf A, Finn G, Lu KP, Smith CIE (2006): Regulation of Bruton tyrosine kinase by the peptidylprolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem* 281, 18201–18207
- Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA (2003): The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* 2003, 1–10
- Zhu Q, Zhang M, Rawlings DJ, Vihinen M, Hagemann T, Saffran DC, Kwan SP, Nilsson L, Smith CI, Witte ON (1994): Deletion within the Src homology domain 3 of Bruton's tyrosine kinase resulting in X-linked agammaglobulinemia (XLA). *J Exp Med* 180, 461–470

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Wienands bedanken für die Möglichkeit, unter seiner Supervision diese Dissertation anzufertigen, und für die stets motivierenden Gespräche.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinem Betreuer Dr. Niklas Engels für seine Unterstützung und ausgezeichnete wissenschaftliche Begleitung. Durch ein Praktikum in seiner Arbeitsgruppe wurde mein Interesse für die Immunologie erst geweckt und durch seine großartige Betreuung hat er maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt auch dem gesamten Team des Instituts für Zelluläre und Molekulare Immunologie für die tolle Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und die kritischen Diskussionen. Besonders danken möchte ich Ines Heine und Gabriele Sonntag für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag.

Ein Teil dieser Arbeit ist in Kooperation mit der „Bioanalytical Mass Spectrometry Group“ am MPI für biophysikalische Chemie entstanden. Für die Zusammenarbeit und Ermöglichung der massenspektrometrischen Analysen möchte ich mich bei Prof. Dr. Henning Urlaub und seinem Team, besonders bei Dr. Miroslav Nikolov, Dr. He-Hsuan Hsiao und Johanna Lehne, bedanken.

Diese Arbeit wurde im Zuge des „Jacob-Henle-Programms“ für experimentelle Medizin begonnen. Ich danke den Organisatoren für die Möglichkeit, an diesem Programm teilzunehmen sowie für die Unterstützung durch das Stipendium.