## Einfluss von CD83 auf die Entwicklung und Aktivierung muriner B- und T-Lymphozyten (*Mus musculus*; Linnaeus, 1758)

**Dissertation** Zur Erlangung des Doktorgrades

> vorgelegt von Katja Lüthje

beim Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Universität Hamburg

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. B. FLEISCHER Weiterer Gutachterin der Dissertation: Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS Tag der Disputation: 19. Februar 2008

Hamburg, den 25. Januar 2008



MA

Professor Dr. Jörg Ganzhorn Leiter des Departments Biologie

1.1.       Das adaptivs Immunsystem       1         1.2.       Das adaptivs Immunsystem       1         1.3.       Lymphozyten Entwicklung       2         1.3.1.       B-Zell-Entwicklung       3         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       5         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Entwicklung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Aktivierung       7         1.4.3.       T-Zell-Aktivierung       8         1.5.       CD83       9         1.5.       Lidentifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2.       Expression von CD83       11         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material für zlibiologische Arbeiten       16         2.1.4.       Material für zlibiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zlibiologische Arbeiten       19         2.1.4.       Material für zlibiologische Arbeiten <t< th=""><th>1 EINLEITUNG</th><th>1</th></t<>	1 EINLEITUNG	1
1.2       Das adaptive Immunvystem       1         1.3.1.       B-Zell-Entwicklung       2         1.3.1.       B-Zell-Entwicklung       3         1.3.2       T-Zell-Entwicklung       5         1.3.2       T-Zell-Entwicklung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       8         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2       Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lympbozyten       11         1.5.3       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lympbozyten       13         1.6       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Musterial Rir molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Musterial Rir molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Auterial Rir zellbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Musterial Rir zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7       Fürfer und Stammlösungen       21         2.1.8       Musterial Rir zellbiologische Arbeiten	1.1 Das Immunsystem	<u>1</u>
1.3.       Lymphozyten Entwicklung       2         1.3.1.       B-Zell-Entwicklung       3         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       5         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       5         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       5         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Christierung und Struktur von CD83       9         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2.       Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lympboryten       11         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lympboryten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Chemikalien       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.4.       Material für biochemische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für twichemissche Arbeiten       19	1.2 Das adaptive Immunsystem	1
1.3.1.       BI-Zell-Entwicklung       3         1.3.2.1.       BI-Zell-Entwicklung       5         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       5         1.4.       Ixmpbozyten Aktivierung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Entwicklung       8         1.5.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2.       Expression von CD83       9         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lympbozyten       11         1.5.4.       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lympbozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Mausstämme.       16         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für biochemische Arbeiten       18         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1.	1.3 Lymphozyten Entwicklung	2
1.3.1.1.       B1-Zell-Entwicklung       5         1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       5         1.4.       Lymphozyten Aktivierung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Aktivierung       8         1.5.       CD83       9         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2.       Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten       11         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Maustämme       16         2.1.3.       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7.       Für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       21         2.2.1.       Motekularbiologische Arbeiten       21         2.	1.3.1 B-Zell-Entwicklung	3
1.3.2.       T-Zell-Entwicklung       5         1.4.       Lymphozyten Aktivierung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Aktivierung       8         1.5.       CD83       9         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83.       9         1.5.2.       Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten       11         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Chemikalien       16         2.1.       Chemikalien       16         2.1.4.       Material       16         2.1.5.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.6.       Material für biochemische Arbeiten       18         2.1.7.       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1.       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.       Puffer und Stammlösungen       21         2.2.1.       Methoden       21         2.2.2.       Methoden       21 <td>1.3.1.1 B1-Zell-Entwicklung</td> <td>5</td>	1.3.1.1 B1-Zell-Entwicklung	5
1.4.       Lxmphozyten Aktivierung       7         1.4.1.       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2.       T-Zell-Aktivierung       8         1.5.       CD83       9         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2.       Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lympbozyten       11         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lympbozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.6.       Material für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.       Für zellbiologische Arbeiten       19 <td>1.3.2 T-Zell-Entwicklung</td> <td>5</td>	1.3.2 T-Zell-Entwicklung	5
1.4.1       B-Zell-Aktivierung       7         1.4.2       T-Zell-Aktivierung       8         1.5.       CD83       9         1.5.1       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2       Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lympbozyten       11         1.5.3       Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lympbozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material       16         2.1.1       Chemikalien       16         2.1.2       Maustämme       16         2.1.3       Antikörper, Detektionsreagenzien, und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7       Für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21 <td>1.4 Lymphozyten Aktivierung</td> <td>7</td>	1.4 Lymphozyten Aktivierung	7
1.4.2.       T-Zell-Aktivierung       8         1.5.       CD83       9         1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       11         1.5.2.       Expression von CD83 auf, die Entwicklung von Lympbozyten       11         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf, die Aktivierung von Lympbozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Chemikalien       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Mausstämme.       16         2.1.3.       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7.       Für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       21         2.1.       Für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       21         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       21         2.2.1.       Herstellung von cDNA durch re	1.4.1 B-Zell-Aktivierung	
1.5. CD83       9         1.5.1 Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2. Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten       11         1.5.3. Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten       11         1.5.4. Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten       13         1.6. Ziele der Arbeit       15         2. MATERIAL UND METHODEN       16         2.1. Chemikalien       16         2.1. Chemikalien       16         2.1. Material       16         2.1. Material für molekularbiologische Arbeiten       17         2.1.4. Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5. Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.6. Material für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1. für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2. für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1. für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2. für zellbiologische Arbeiten       21         2.2.1. Methoden       21         2.2.1. Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1. Herstellung von cDNA durch reverse Gelelektrophorese       21         2.2.2. Herstellung von Proteinen in Zellysaten       22         2.2.2. Deglykosylierung vo	1.4.2 T-Zell-Aktivierung	
1.5.1.       Identifizierung und Struktur von CD83       9         1.5.2.       Expression von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten       11         1.5.3.       Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Maustämme       16         2.1.3.       Antikorper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7.       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1.       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für biochemische Arbeiten       21         2.2.1.       Methoden       21         2.2.1.       Rubekularbiologische Arbeiten       21         2.2.1.       Rubekularbiologische Methoden       21         2.2.1.1.       Robekularbiologische Methoden<	1.5 CD83	9
1.5.2.       Expression von CD83.       11         1.5.3.       Einfluss von CD83. auf die Entwicklung von Lymphozyten       11         1.5.4.       Einfluss von CD83. auf die Aktivierung von Lymphozyten       13         1.6.       Ziele der Arbeit       15         2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Mausstämme       16         2.1.3.       Antikörper. Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.6.       Material für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für biochemische Arbeiten       11         2.2.1.1.       Molekularbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       21         2.2.1.1.       RNA-Präparation aus murinen Zelleu/Geweben       21         2.2.1.1.	1.5.1 Identifizierung und Struktur von CD83	9
1.5.3       Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten       11         1.5.4       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten       13         1.6       Ziele der Arbeit       15         2       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1       Material       16         2.1.2       Mausstämme       16         2.1.3       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       21         2.2.1.1       Molekularbiologische Arbeiten       21         2.2.1.2       Heitellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2       Heitellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.2.1       Biochemische Metboden       21	1.5.2 Expression von CD83	
1.5.4       Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten       13         1.6       Ziele der Arbeit       15         2       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1       Material       16         2.1.1       Chemikalien       16         2.1.2       Mausstämme       16         2.1.3       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Methoden       21         2.2.1.1       Molekularbiologische Methoden       21         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.2.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophoretische Analyse       21         2.2	1.5.3 Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten	
1.6       Ziele der Arbeit       15         2       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1       Material       16         2.1.1       Chemikalien       16         2.1.2       Mausstämme       16         2.1.3       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.6       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Methoden       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.2.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophoretse       21         2.2.2.1	1.5.4 Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten	<u>13</u>
2.       MATERIAL UND METHODEN       16         2.1.       Material       16         2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Mausstämme       16         2.1.3.       Antikörper. Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.6.       Material für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Arbeiten       11         2.2.1.       Molekularbiologische Methoden       21         2.2.1.1.       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.3.       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2.1.       Herstellung von zellysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.1.       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektro	1.6 Ziele der Arbeit	15
2.1.1.       Chemikalien       16         2.1.2.       Mausstämme       16         2.1.3.       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für biochemische Arbeiten       18         2.1.6.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7.       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1.       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Methoden       21         2.2.1.       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.1.       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.3.       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2.1.       Herstellung von zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.1.       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2.       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22	2.1 Material	
2.1.2.       Mausstämme       16         2.1.3.       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.6.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7.       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1.       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Methoden       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2.       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.3.       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2.1.       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.1.       Herstellung von Proteinen in Zelllysaten       22	2.1.1 Chemikalien	<u></u>
2.1.3       Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien       17         2.1.4       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.6       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Methoden       21         2.2.1       Molekularbiologische Methoden       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2.1       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22         2.2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot       22     <	2.1.2 Mausstämme	<u>16</u>
2.1.4.       Material für molekularbiologische Arbeiten       18         2.1.5.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.6.       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7.       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1.       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2.       für zellbiologische Methoden       21         2.2.1.1       Molekularbiologische Methoden       21         2.2.1.2.       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.3.       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2.       Biochemische Methoden       21         2.2.2.1.       Herstellung von Zelllysaten für die gelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2.       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22         2.2.2.3.       CD83 spezifischer Westernblot       22         2.2.2.4. <td>2.1.3 Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien</td> <td></td>	2.1.3 Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien	
2.1.5       Material für biochemische Arbeiten       18         2.1.6       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.1.7.2       Herstellung zon comparison       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2       Herstellung zon cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2.1       Herstellung zon Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.1       Herstellung zon Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22	2.1.4 Material für molekularbiologische Arbeiten	<u>18</u>
2.1.6       Material für zellbiologische Arbeiten       18         2.1.7       Puffer und Stammlösungen       19         2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Methoden       21         2.2.1       Methoden       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2       Biochemische Methoden       21         2.2.2.1       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.1       Herstellung von Proteinen in Zelllysaten       22         2.2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot       22         2.2.2.4       Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig       22         2.2.2.5       Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford       22	2.1.5 Material für biochemische Arbeiten	18
2.1.7Puffer und Stammlösungen192.1.7.1für biochemische Arbeiten192.1.7.2für zellbiologische Arbeiten192.1.7.2für zellbiologische Arbeiten192.2.1Methoden212.2.1.1RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben212.2.1.2Herstellung von cDNA durch reverse Transkription212.2.1.3Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese212.2.2Biochemische Methoden212.2.2.1Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse212.2.2.2Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten222.2.2.3CD83 spezifischer Westernblot222.2.2.4Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig222.2.2.5Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford22	2.1.6 Material für zellbiologische Arbeiten	
2.1.7.1       für biochemische Arbeiten       19         2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.2       Methoden       21         2.2.1       Molekularbiologische Methoden       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2       Biochemische Methoden       21         2.2.2.1       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22         2.2.2.4       Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig       22         2.2.2.4       Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford       22	2.1.7 Puffer und Stammlösungen	
2.1.7.2       für zellbiologische Arbeiten       19         2.2       Methoden       21         2.2.1       Molekularbiologische Methoden       21         2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben       21         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription       21         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2       Biochemische Methoden       21         2.2.2.1       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22         2.2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot       22         2.2.2.4       Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig       22         2.2.2.5       Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford       22	2.1.7.1 für biochemische Arbeiten	
2.2Methoden212.2.1Molekularbiologische Methoden212.2.1.1RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben212.2.1.2Herstellung von cDNA durch reverse Transkription212.2.1.3Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese212.2.2Biochemische Methoden212.2.2.1Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse212.2.2.2Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten222.2.3CD83 spezifischer Westernblot222.2.4Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig222.2.5Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford22	2.1.7.2 für zellbiologische Arbeiten	10
2.2.1Molekularbiologische Methoden212.2.1.1RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben212.2.1.2Herstellung von cDNA durch reverse Transkription212.2.1.3Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese212.2.2Biochemische Methoden212.2.2.1Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse212.2.2.2Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten222.2.3CD83 spezifischer Westernblot222.2.2.4Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig222.2.2.5Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford22	2.2 Methoden	
2.2.1.1RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben212.2.1.2Herstellung von cDNA durch reverse Transkription212.2.1.3Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese212.2.2Biochemische Methoden212.2.2.1Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse212.2.2.2Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten222.2.3CD83 spezifischer Westernblot222.2.4Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig222.2.5Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford22	2.2.1 Molekularbiologische Methoden	<u> </u>
2.2.1.2Herstellung von cDNA durch reverse Transkription212.2.1.3Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese212.2.2Biochemische Methoden212.2.2.1Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse212.2.2.2Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten222.2.2.3CD83 spezifischer Westernblot222.2.2.4Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig222.2.2.5Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford22		<u>    19</u> <u>    21</u> 21
2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese       21         2.2.2       Biochemische Methoden       21         2.2.2.1       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22         2.2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot       22         2.2.2.4       Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig       22         2.2.2.5       Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford       22	2.2.1.1 RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben	19 21 21
2.2.2Biochemische Methoden212.2.2.1Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse212.2.2.2Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten222.2.2.3CD83 spezifischer Westernblot222.2.2.4Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig222.2.2.5Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford22	2.2.1.1RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben2.2.1.2Herstellung von cDNA durch reverse Transkription	19 21 21 21 21 21
2.2.2.1       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse       21         2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten       22         2.2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot       22         2.2.2.4       Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig       22         2.2.2.5       Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford       22	2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese	19 21 21 21 21
2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelliysaten       22         2.2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot       22         2.2.2.4       Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig       22         2.2.2.5       Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford       22	2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese         2.2.2       Biochemische Methoden	19 21 21 21 21 21 21 21 21
2.2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot       22         2.2.2.4       Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig       22         2.2.2.5       Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford       22	<ul> <li>2.2.1.1 RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben</li> <li>2.2.1.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription</li> <li>2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese</li> <li>2.2.2 Biochemische Methoden</li> <li>2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse</li> </ul>	19 21 21 21 21 21 21 21 21 21
2.2.2.4 Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD831g 22	<ul> <li>2.2.1.1 RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben</li> <li>2.2.1.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription</li> <li>2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese</li> <li>2.2.2 Biochemische Methoden</li> <li>2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse</li> <li>2.2.2.2 Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten</li> </ul>	19 21 21 21 21 21 21 21 21 21 21 22
roteinkonzentrationspestimmung nach Bradtord	2.2.1.1       RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben         2.2.1.2       Herstellung von cDNA durch reverse Transkription         2.2.1.3       Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese         2.2.2       Biochemische Methoden         2.2.2.1       Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse         2.2.2.2       Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten         2.2.3       CD83 spezifischer Westernblot	19 21 21 21 21 21 21 21 21 21 22 22 22
$2.2.2.5 \qquad \text{intermediation} \qquad \qquad$	<ul> <li>2.2.1.1 RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben</li> <li>2.2.1.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription</li> <li>2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese</li> <li>2.2.2 Biochemische Methoden</li> <li>2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse</li> <li>2.2.2 Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten</li> <li>2.2.3 CD83 spezifischer Westernblot</li> <li>2.2.4 Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig</li> <li>2.2.5 Proteinkommentation en ethomatica proteinen</li> </ul>	19 21 21 21 21 21 22 22 22 22
2.2.2.0 IIIC1005 Spezifischer ELISA 23 2.2.3 Zellbiologische Methoden 23	<ul> <li>2.2.1.1 RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben</li> <li>2.2.1.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription</li> <li>2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese</li> <li>2.2.2 Biochemische Methoden</li> <li>2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse</li> <li>2.2.2.2 Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten</li> <li>2.2.2.3 CD83 spezifischer Westernblot</li> <li>2.2.2.4 Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig</li> <li>2.2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford</li> <li>2.2.2.6 mCD83 spezifischer FLISA</li> </ul>	19 21 21 21 21 21 22 22 22 22 22 22 22

<u>2.</u>	2.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur	23
<u>2.</u>	2.3.2 Präparation von murinen Milzzellen sowie T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen	
	aus der Milz	23
2.	2.3.3 Präparation von murinen CD4 einfach positiven Thymocyten	23
<u>2.</u>	2.3.4 Präparation von Knochenmarkszellen	23
<u>2.</u>	2.3.5 Präparation von Peritonealzellen/Lavage	24
2.	2.3.6 Durchflusszytometrischer Nachweis - FACS	24
<u>2.</u>	2.3.7 Durchflusszytometrische Zellsortierung-FACS Sortierung	24
<u>2.</u>	2.3.8 In vitro Stimulationsexperimente zur Stimulation von Milzzellen oder naiven T-Zellen	24
2.	2.3.9 Einbau von <sup>3</sup> H-Thymidin/Proliferationstest	25
<u>2.</u>	2.3.10 IgPan-Bestimmung im Zellkulturüberstand	25
2.	2.3.11 ELISPOT	26
2.2.4	Tierversuche	26
2.	2.4.1 Infektion von Mäusen mit Trypanosoma cruzi	26
2.	2.4.2 Infektion von Mäusen mit Leishmania major	27
2.	2.4.3 NO-Bestimmung aus Serum/Griess-Reaktion	27
2.	2.4.4 Bestimmung <i>T.cruzi</i> spezifischer Antikörper	27
2.	2.4.5 Generierung von Knochenmarkschimären	28
2.	2.4.6 Bestimmung der prozentualen Anteile peripherer Blut-Lymphozyten	28
2.2.5	Statistik	28
3.2	Teil I: Einfluss der Intensität der CD83 Expression auf die Reifung und Aktivierung von B-	
Lympho	DZytten	- 30
3.2.1	B-Zelivoriauter exprimieren kein CD83, unreite und reite naive B-Zelien zeigen eine schwache	
2 2 2 2	CD83 Expression und aktivierte B-Zellen eine starke CD83 Expression	
3.2.2	$\mathbf{A} = 1 = 1 = \mathbf{C} = \mathbf{D} 0 1 = 1 = \mathbf{C} = \mathbf{C}$	30
3.2.3	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus	30 32
	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Beifung von MZ B. Zellen	<u>30</u> <u>32</u>
· · · · · /	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD82 Expression führt zu einer vorminderten Anzahl Bla, und B2 Zellen im	<u>30</u> <u>32</u> <u>34</u>
3.2.4	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Paritonaum	<u>30</u> <u>32</u> <u>34</u> 36
3.2.4	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B. Zell Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83	30 32 34 36
<u>3.2.4</u> <u>3.2.5</u>	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämetopoetischen Zellen zurückzuführen	30 32 34 36
<u>3.2.4</u> <u>3.2.5</u> 3.2.6	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg R. Zellen in gemingehten Chimören	30 32 34 36 37 41
<u>3.2.4</u> <u>3.2.5</u> <u>3.2.6</u> <u>3.2.7</u>	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären Die Intensität der CD83 Expression auf B Zellen beeinflusst die Homöostase von B Zellen	30 32 34 36 37 41 42
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen	30 32 34 36 37 41 42 44
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen	30 32 34 36 37 41 42 44 46
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen	30 32 34 36 37 41 42 44 46
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9 <b>3.3</b>	<ul> <li>Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus</li> <li>Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression</li> <li>die Reifung von MZ B-Zellen</li> <li>Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im</li> <li>Peritoneum</li> <li>Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83</li> <li>Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen</li> <li>Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären</li> <li>Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen</li> <li>Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen</li> <li>Zusammenfassung Teil I</li> </ul>	30 32 34 36 37 41 42 44 46
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9 3.2.9 3.3 Entwicl	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen Zusammenfassung Teil I	30 32 34 36 37 41 42 44 46 47
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9 3.2.9 3.3 Entwicl 3.3.1	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen Zusammenfassung Teil I	30 32 34 36 37 41 42 44 46 46 47 47
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9 3.3 Entwicl 3.3.1 3.3.2	Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen Zusammenfassung Teil I <b>Teil II: Einfluss eines transgen exprimierten mCD83-Immunglobulin-Fusionsproteins auf die</b> dung und Aktivierung muriner T-Lymphozyten Expression von löslichem CD83-Immunglobulin-Fusionsprotein in CD83Ig transgener Maus CD4 positive T-Zellen in CD83Ig transgenen Mäusen entwickeln sich in normaler Anzahl aber	30 32 34 36 37 41 42 44 46 47
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9 3.3 Entwick 3.3.1 3.3.2	<ul> <li>Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus</li> <li>Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen</li> <li>Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum</li> <li>Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen</li> <li>Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären</li> <li>Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen</li> <li>Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen</li> <li>Zusammenfassung Teil I</li> </ul> Teil II: Einfluss eines transgen exprimierten mCD83-Immunglobulin-Fusionsproteins auf die die dung und Aktivierung muriner T-Lymphozyten Expression von löslichem CD83Ig transgenen Mäusen entwickeln sich in normaler Anzahl aber mit verändertem Phänotyp	30 32 34 36 37 41 42 44 46 47 47 47
3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9 3.3 Entwicl 3.3.1 3.3.2 3.3.3	<ul> <li>Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus</li> <li>Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen</li> <li>Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1a- und B2-Zellen im Peritoneum</li> <li>Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen</li> <li>Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären</li> <li>Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen</li> <li>Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen</li> <li>Zusammenfassung Teil I</li> </ul> Teil II: Einfluss eines transgen exprimierten mCD83-Immunglobulin-Fusionsproteins auf die dung und Aktivierung muriner. T-Lymphozyten Expression von löslichem CD83-Immunglobulin-Fusionsprotein in CD83tg transgener Maus CD4 positive T-Zellen in CD83tg transgenen Mäusen entwickeln sich in normaler Anzahl aber mit verändertem Phänotyp.	30 32 34 36 37 41 42 44 46 47 47 49

3.3.4 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Mäuse zeigen normale Proliferation und Zytokinfreisetzung	52
$\frac{1}{2}$	<u> </u>
3.3.6 CD83Ig transgene Mäuse zeigen erhöhte Suszentibilität gegenüber Infektionen mit Elegellaten	<u>55</u> 57
3.3.8 Mit rekombinantem CD831g rekonstituierte C57BL/6 Mäuse zeigen einen gemischten Phänotyn	51
in einer T erwri Infektion	60
2 2 0 Zusammanfassung Tail II	<u>62</u>
5.5.9 Zusammennassung Ten II	02
4 DISKUSSION	63
4.1 Die CD83 Expression reguliert die Entwicklung von B-1 ymphozyten	63
The CD05 Expression reguler are Entwicklung von D-Eynpholyten	05
4.2 Die Expression von löslichem CD83Ig interferiert mit der Reifung CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Thymus	<u>66</u>
4.3 CD83 reguliert die periphere Aktivierung von B-Lymphozyten	<u>69</u>
4.4 CD83 beeinflusst die Homöostase von B- und T-Lymphozyten	<u>70</u>
4.5 CD83 ist ein negativer Regulator von B-Zellen	73
4.6 Ausblick	75
5 ZUSAMMENFASSUNG	77
6 LITERATURVERZEICHNIS	79

Ag	Antigen	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-
AK	Antikörper		Piperazinsulfonat
APZ	Antigen-Präsentierende-	IFN	Interferon
	Zelle	Ig	Immunglobulin
AS	Aminosäure	IL	Interleukin
BZR	B-Zell-Rezeptor	KDa	Kilodalton
CD	Nomenklatur für	LPS	Lipopolysaccharid
	Oberflächenantigen	MHC	Haupthistokompatibilitäts-
	(cluster of differentiation)		komplex (major
CLP	commom lymphoid		histocompatibility
	progenitor		<i>complex</i> )
CTL	zytotoxischer T-	MZ B-Zelle	Marginal Zonen B-Zelle
	Lymphozyt	OD	optische Dichte
DMSO	Dimethylsulfoxid	OVA	Ovalbumin
DN	doppelt negativ	PBS	Phosphat-gepufferte
DP	doppelt positiv		Kochsalzlösung
DZ	dendritische Zelle	PCR	Polymerasekettenreaktion
ELISA	Enzyme-linked	PE	Phycoerythrin
	immunosorbent	PFA	Paraformaldehyd
	assay	pН	pH-Wert (negativer
ENU	N-ethylnitrosourea		dekadischer Logarithmus
	Mutagenese		der Konzentration an
FACS	Fluoreszenz-aktivierter		$H_3O^+$ )
	Zell-Sortierer	SDS	Natriumdodecylsulfat
Fc	Antikörperfragment, das	SP	einfach positiv
	aus dem Verdau	TdT	Terminale Deoxy-
	von IgG mit Papain		nucleotidyltransferase
	hervorgeht	TEZ	Thymus-Epithel-Zelle
	(fragment crystallisable)	TMB	Tetramethylbenzidin
FCS	fötales Kälberserum	TN1 B-Zelle	transitionelle1 B-Zelle
FDC	follikuläre dendritische	TZR	T-Zell-Rezeptor
	Zelle		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat		

FO B-Zelle follikuläre B-Zelle

Alanin	Α
Arginin	R
Asparagin	Ν
Asparaginsäure	D
Cystein	С
Glutamin	Q
Glutaminsäure	Е
Glycin	G
Histidin	Η
Isoleucin	Ι
Leucin	L
Lysin	Κ
Methionin	Μ
Phenylalanin	F
Prolin	Р
Serin	S
Threonin	Т
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

Ich danke Herrn Professor Bernhard Fleischer für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas, und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Bernhard-Nocht-Institut anfertigen zu können, sowie für die kompetente und freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Professor Iris Bruchhaus danke ich für die Bereitschaft, diese Dissertation als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Minka Breloer für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für die unermüdliche Bereitschaft und große Motivation auch schwierige Phasen zu begleiten.

Frau Dr. Anke Osterloh danke ich für die Einweisung in das Programm AdobePhotoshop.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die vielen praktischen Tipps und Anregungen, für ein hervorragendes Arbeitsklima und viele Kuchen.

## 1 Einleitung

#### 1.1 Das Immunsystem

Als Immunsystem wird das biologische Abwehrsystem eines Organismus bezeichnet, das Schutz vor Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten bietet. Das Immunsystem von Vertebraten ist ein komplexes System, das sich in das angeborene und adaptive Immunsystem gliedert. Das angeborene Immunsystem stellt den entwicklungsgeschichtlich älteren Teil der Pathogenabwehr dar. Zu den Zellen der angeborenen Immunität zählen phagozytierende Zellen wie Makrophagen (1) und neutrophile Granulozyten (2) sowie zytotoxische Zellen wie Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) (3). Neben den zellulären Bestandteilen der angeborenen Immunantwort vermitteln auch lösliche Faktoren wie die Komplementfaktoren (4), Akut-Phase-Proteine (5), Zytokine und aggressive Sauer- oder Stickstoff-verbindungen unspezifische Immunität.

Lymphatische Organe sind Gewebe, die eine große Anzahl Lymphozyten in einem "Gerüst" aus nicht-lymphatischen Zellen enthalten. Aufgrund ihrer Funktion werden zwei Typen, die primären und die sekundären lymphatischen Organe, unterschieden. Die primären lymphatischen Organe, das Knochenmark und der Thymus, dienen der Entstehung und Reifung von Leukozyten, wohingegen sekundäre lymphatische Organe, Lymphknoten, Milz und lymphatische Gewebe der Schleimhäute, vor allem zur Initiation von Immunantworten sowie zur Übermittlung von Überlebenssignalen dienen (6).

#### 1.2 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunität wird von T- und B-Lymphozyten vermittelt, die antigenspezifisch reagieren (6). Jede dieser Zellen exprimiert einen Rezeptor einzigartiger Spezifität, der die Erkennung definierter Strukturen, der sogenannten Antigene, erlaubt. Die Erkennung von Antigen über einen gegebenen Rezeptor führt zur klonalen Expansion hochspezifischer T- und B-Lymphozyten (7). Diese ermöglichen nun eine effektive Immunantwort. Im Rahmen dieser klonalen Expansion enstandene Gedächtniszellen vermitteln bei erneuter Infektion mit demselben Erreger das immunologische Gedächtnis (8).

Innerhalb des adaptiven Immunsystems lassen sich zwei Systeme, humorale und zellvermittelte Immunität, unterscheiden. B-Lymphozyten vermitteln durch die Produktion von Immunglobulinen humorale Immunität. Immunglobuline dienen der Markierung (Opsonierung) von Pathogenen und Fremdpartikeln für phagozytische Zellen, der Neutralisierung oder zur Aktivierung des Komplementsystem. T-Lymphozyten vermitteln dagegen, über regulatorische und zellvermittelte Effektor-Funktionen, zelluläre Immunität.

#### 1.3 Lymphozyten Entwicklung

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (PHSC) im Knochenmark können sich zu omnipotenten myeloiden Vorläuferzellen (CMP, *common myeloid progenitor*), aus denen Zellen der erythroiden Linie und der myeloiden Linie hervorgehen, oder sich zu omnipotenten lymphoiden Vorläuferzellen (CLP, *common lymphoid progenitor*) entwickeln (9, 10). Im Knochenmark differenzieren CLPs zu Vorläuferzellen der B-Zelllinie oder nach Auswanderung in den Thymus zu T-Zellvorläufern (Abb.1.1). Die Entwicklungen von B- und T-Lymphozyten haben viele Gemeinsamkeiten. Die Differenzierung und Entwicklung von Lymphozyten ist abhängig von Kontakten zu nicht lymphoiden Stromazellen des Knochenmarks bzw. des Thymus, die Signale und Wachstumsfaktoren übermitteln. Während der Reifung durchlaufen lymphoide Zellen mehrere Entwicklungsstadien.

Das Gen für jede Rezeptorkette des TZR und BZR wird durch somatische Rekombination von Gensegmenten gebildet, wobei sich die schwere Kette des BZR und die  $\beta$ TZR-Kette aus drei Gensegmenten, V (*Variabel*), D (*Divers*) und J (*Joining*), zusammensetzt. Die leichte Kette des BZR und  $\alpha$ TZR-Kette bildet sich aus V und J Segment. Die Entwicklungsstadien von B- und T-Zelle sind durch die schrittweise erfolgenden Umlagerungen dieser Gensegmente der Antigenrezeptoren, deren Oberflächenexpression sowie der Expression von weiteren Oberflächenmolekülen gekennzeichnet (11). Jede Phase der Lymphozytenentwicklung wird überwacht: sobald das jeweilige Gen für eine Rezeptors exprimiert. Die erfolgreiche Expression des jeweiligen Gens signalisiert der sich entwickelnden Zelle zum nächsten Entwicklungsschritt überzugehen. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten unterliegen während ihrer Entwicklung einer strengen Selektion, die auf die Bildung eines für jede Zelle einzigartigen funktionalen und nicht autoreaktiven Rezeptors ausgerichtet ist.



Abb.1.1: Die Entwicklung von B- und T-Lymphozyten geht auf eine gemeinsame Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP) im Knochenmark zurück. Sich selbsterneuernde pluripotente hämatopoetische Stammzellen entwickeln sich zu CLPs, aus denen sich im Knochenmark B-Zellen oder nach Auswanderung in den Thymus T-Zellen entwickeln.

Ein Hauptunterschied in der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten ist, dass B-Zellen ein lebenlang im Knochenmark neu gebildet werden, während die Entwicklung von T-Zellen postnatal abnimmt. Im adulten Organismus wird der periphere T-Zell-Pool im Gegensatz zum B-Zell-Pool durch die Teilung von T-Lymphozyten außerhalb der primären lymphatischen Organe aufrechterhalten.

#### 1.3.1 B-Zell-Entwicklung

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus CLPs über verschiedene pro- und pre- B-Zellstadien zu unreifen B-Zellen. An diese frühe Phase der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark schließt sich die späte Phase der B-Zell-Entwicklung in der Milz an.

CLPs differenzieren zunächst zu pre-pro-B-Zellen, derren Immunglobulingensegmente V, D und J sich noch in der Keimbahnkonfiguration befinden. Durch den temporär synthetisierten und für die weitere B-Zell-Entwicklung essentiellen Enzymkomplex RAG1/RAG2 (Recombination Activating Gen) erfolgt im frühen pro-B-Zell-Stadium eine Neuanordnung der D- und J-Segmente im Immunglobulin Lokus (Ig-Lokus) der schweren Kette (IgH) (12-14). Die Rekombination eines V<sub>H</sub> Segments an das rearangierte DJ<sub>H</sub> Segment markiert den Übergang von der frühen pro-B-Zelle zu der späten pro-B-Zelle. Während der Rekombination der V<sub>H</sub>, D und J<sub>H</sub> Segmente des Immunglobulin-Lokus fügt die Terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) zwischen den jeweiligen Elementen Nukleotide ein. Durch diesen Prozeß wird die Antikörpervielfalt erhöht. Es kann jedoch auch zu einer Verschiebung des Leserahmens oder zur Erzeugung eines Stop-Kodons kommen, wodurch das Protein trunkiert werden kann. Im Falle einer produktiven V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>-Umlagerung wird zur Überprüfung auf Funktionalität die entstandene schwere Kette (u-Kette) in Kombination mit der sogenannten leichten Ersatzkette, ein Heterodimer aus  $\lambda 5$ und VpräB, exprimiert (15, 16). Zusammen mit der Signaltransduktionseinheit Iga/Igß wird dieser Komlex als pre-B-Zell-Rezeptor bezeichnet. Die erfolgreiche Expression des pre-BZR markiert das Erreichen des großen pre-B-Zellstadiums. Nach einer kurzen klonalen Expansion von vier bis sechs Zellteilungen differenzieren die großen pre-B-Zellen zu kleinen ruhenden pre-B-Zellen. In diesem Reifestadium wird der zuvor herunterregulierte Rag1/Rag2 Komplex erneut exprimiert und die V<sub>L</sub> und J<sub>L</sub> Segmente des Igk-Lokus umgelagert. Kann die Zelle anschließend keine produktive leichte Kette bilden, kommt es zu einer Rekombination der Elemente des Igλ-Lokus. Ist die Zelle jedoch in der Lage einen reifen B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche zu präsentieren, werden weitere Rekombinationsprozesse gestoppt (17). Durch diesen als "allelic exclusion" bezeichneten Prozeß wird verhindert, dass die Zelle funktionelle Immunglobuline mit mehr als einer Spezifität bildet (18). Die danach als unreife B-Zellen bezeichneten Zellen werden auf die Spezifität des von ihnen exprimierten BZR hinsichtlich Autoreaktivität oder zu schwacher Affinität negativ selektioniert. Selbstreaktive unreife B-Zellen werden eliminiert, in den Zustand der Anergie versetzt oder können über die Editierung des BZRs (Recptor Editing) die Spezifität ihrer Antigenbindungsstelle verändern (19). Die B-lymphoiden Entwicklungsstadien lassen sich neben dem Status der Umlagerung der Ig-Loki auch durch eine Reihe verschiedener Oberflächenmarker differenzieren (Abb.1.2).



Abb.1.2: Schema zur frühen und späten Entwicklung muriner B-Zellen im Knochenmark und in der Milz. Im Knochenmark entwickeln sich aus CLPs unreife B-Zellen, die nach Einwanderung in die Milz zu reifen follikulären B-Zellen und Marginal Zonen B-Zellen reifen. Während die follikulären B-Zellen durch die Peripherie zirkulieren, residieren die Marginal Zonen B-Zellen in der Marginal Zone der Milz.

Die unreifen B-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern als sogenannte transitionelle1 (TN1) B-Zellen in die Milz ein. Dort entwickeln sie sich zu reifen follikulären B-Zellen (FO), den konventionellen B-Zellen, oder Marginal Zonen B-Zellen (MZ).

FO B-Zellen repräsentieren den mengenmäßig größten Anteil der reifen B-Zellen, die sich während des gesamten Lebens aus transitionellen B-Zellen entwickeln. Sie zirkulieren durch Blut- und Lymphgefäße in die Follikel der sekundären Immunorgane, wo sie an T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen Immunantworten beteiligt sind. MZ B-Zellen sind dagegen selbsterneuerende Zellen, die ausschließlich in der Marginal-Zone der Milz sitzen und in der Milz 10% der B-Zellen repräsentieren. Aufgrund ihrer Lokalisierung zwischen weißer und roter Pulpa fangen sie Pathogene aus dem Blut ab und sind stark an T-Zell-unabhängigen Immunantworten beteiligt (20, 21).

In welche Richtung sich eine transitionelle B-Zelle entwickelt hängt von der über den BZR vermittelten Signalstärke ab. Studien mit genetisch veränderten Mäusen, in denen die über den BZR vermittelte Signalstärke abgeschwächt oder gestärkt wurde, haben gezeigt, dass schwache Signale die Entwicklung von MZ B-Zellen fördern und relativ starke Signale die Entwicklung von FO B-Zellen (22-24). Andere Arbeiten weisen dagegen darauf hin, dass auch die Art des Antigens und die Epitopdichte die periphere B-Zell-Entwicklung steuern können (25, 26).

#### 1.3.1.1 B1-Zell-Entwicklung

B1-Zellen, die 5% des gesamten B-Zell-Pools in Mäusen ausmachen, findet man vorwiegend in Körperhöhlen wie dem Peritoneum und der Pleura aber auch zu geringem Anteil in der Milz (27). Sie werden überwiegend während der Embryogenese, und somit vor den B2-Zellen, generiert und sind selbsterneuernde, langlebige, nicht zirkulierende B-Zellen mit stark eingeschränktem Immunglobulin Repertoire. Sie dienen als Effektoren der angeborenen Immunantwort und antworten hauptsächlich auf T-Zell-unabhängige Antigene. B1-Zellen werden in zwei Subpopulationen unterteilt: B1a und B1b-Zellen, die beide durch eine starke IgM Expression sowie CD11b charakterisierbar sind. B1a Zellen unterscheiden sich phänotypisch von B1b-Zellen durch die Expression von CD5. CD5 ist ein glykosyliertes Transmembran-Protein, dass TZR und BZR vermittelte Signale negativ reguliert (28, 29). B1a Zellen, die dominante Lymphozyten-Population im Peritoneum, gelten als Hauptproduzent der sogenannten natürlichen Antikörper (30). Natürliche Antikörper sind von Immunglobulingenen, die ohne somatische Hypermutation rearrangiert sind und nur geringe Diversifität aufweisen, kodiert. Sie werden ohne Antigenkontakt sekretiert und stellen den Großteil des zirkulierenden IgMs im Serum von naiven Säugern.

Bezüglich der Entwicklung von B1-Zellen werden zwei Modelle kontrovers diskutiert (27, 31). Das Linienmodell besagt, dass B1- und B2-Zellen von unterschiedlichen Vorläuferzellen abstammen, wohingegen das Selektionsmodell besagt, dass B1- und B2- Zellen aus demselben Vorläufer entstehen und die BZR Spezifität und Signalstärke über die B1 versus B2 Entwicklung entscheiden.

#### 1.3.2 T-Zell-Entwicklung

Für die postnatale T-Zell-Entwicklung wandern CLPs aus dem Knochenmark über das Blut in die kortikale-medulläre Verbindung des Thymus ein. Die frühen Thymozyten exprimieren weder CD3 noch die für reife  $\alpha\beta$ T-Lymphozyten charakteristischen Oberflächenproteine CD4 und CD8, weshalb sie als doppelt negative (DN) Thymozyten bezeichnet werden. Aus den DN Thymozyten entwickeln sich  $\alpha\beta$ T-Lymphozyten und eine kleine Population von T-Zellen, die  $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, die 1-5% der T-Lymphozyten in lymphoiden Organen repräsentieren (32). Hier soll die Entwicklung von  $\alpha\beta$ T-Lymphozyten rekapituliert werden.

Das Stadium der DN Thymozyten lässt sich in vier Untergruppen DN1, DN2, DN3 und DN4, definiert durch die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD25, unterteilen (33). Zellen des DN1 Entwicklungsstadiums zeigen eine starke Expression von CD44 und fehlende Expression von CD25. Mit fortlaufender Reifung zum DN2 Stadium exprimieren die Zellen CD25 sowie die Proteine des Enzymkomplex RAG1/RAG2 und TdT (34), was zum Beginn der Umlagerung der  $\beta$ -Kette führt. Die CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen regulieren CD44 herab und erreichen das pre-T-Zell-Stadium oder DN3 Stadium. Als DN4 T-Zellen werden Thymozyten, die keine CD25 Expression mehr zeigen, bezeichnet. Während der

Differenzierung von der CLP zur DN4 durchläuft die Zelle die verschiedenen Mikroumgebungen des Thymus vom Eintrittsort der kortikalen-medullären Verbindung hin zum äußersten Bereich des Kortex, während der anschließenden Differenzierung zum doppelt positiven Thymozyten verläuft die Wanderung entgegen gesetzt (Abb.1.3).



Abb.1.3:Schema zur Entwicklung muriner T-Lymphozyten im Thymus. CLPs wandern aus dem Blut in die kortikale-medulläre Verbindung des Thymus ein, durchlaufen vier doppelt negative Stadien (DN1-DN4) und das dopplelt positive Stadium bevor sie nach positiver Selektion wieder das Blut als CD4 oder CD8 einfach positive T-Zelle betreten.

Die Reifung DN Thymozyten zu einfach CD4 oder CD8 positiven Thymozyten erfolgt in der Medulla des Thymus. Nach Bindung des rearangierten TZR an einen Peptid-MHC-Komplex (*major histocompatibility complex*) werden die Thymozyten positiv selektioniert, wobei T-Zellen, deren TZR nur schwach oder zu hoch hochaffin bindet, negativ selektioniert werden.

CD4 T-Zellen werden auch als  $T_{Helfer}$ - Zellen ( $T_H$ ) bezeichnet und CD8<sup>+</sup> T-Zellen als zytotoxische T-Zellen (CTL). Die Korezeptoren CD4 und CD8 binden an autologe MHC-Moleküle auf der Oberfläche der kontaktierten Zelle, wobei CD4 mit Molekülen der MHC-Klasse-II (35) und CD8 mit Molekülen der MHC-Klasse-I (36) interagieren.

#### 1.4 Lymphozyten Aktivierung

#### 1.4.1 B-Zell-Aktivierung

Humorale Immunantworten werden durch das Erkennen von Antigenen durch B-Zellen ausgelöst, wobei zwischen T-Zell-abhängigem und T-Zell-unabhängigem Antigen unterschieden wird. T-Zell-unabhängige Antigene, wie bakterielle Polysaccharide, quervernetzen mittels ihrer hohen Epitopdichte die B-Zell-Rezeptoren einer B-Zelle und können so ohne T-Zell-Hilfe die B-Zelle aktivieren (37). Im Fall der sogenannten T-Zellabhängigen Antigene, zumeist Proteine, wird dagegen zur vollständigen Aktivierung einer B-Zelle T-Zell-Hilfe benötigt.

Trifft eine naive B-Zelle auf ein T-Zell-abhängiges Antigen, welches eine ausreichende Affinität zu ihrem B-Zell-Rezeptor aufweist, endozytiert sie dieses, prozessiert es, d.h. spaltet es proteolytisch in Peptide, und präsentiert diese Peptidfragmente in Assoziation mit MHC-Klasse-II auf der Zelloberfläche. Durch die Bindung des BZR an das Antigen erhält die B-Zelle das erste Aktivierungsignal. Zur vollständigen Aktivierung benötigt die B-Zelle ein zweites Signal, welches durch Interaktion des CD40-Rezeptors (CD40) der B-Zelle mit dem CD40 Liganden (CD40L) auf aktivierter T-Zelle übermittelt wird (38).

Die T-Zell-abhängige Aktivierung naiver peripherer B-Zellen führt zum einen zur schnellen Entstehung von kurzlebigen Plasmazellen, die niederaffine Antikörper sezernieren. Diese kurzlebigen Plasmazellen wandern aus den B-Zellfollikeln in die rote Pulpa der Milz oder in die Markstränge von Lymphknoten. Mit einer Lebensspanne von drei bis fünf Tagen vermitteln sie die erste Welle der humoralen Immunantwort, die sogenannte extrafollikuläre Antikörper Antwort (39).

Für die Ausbildung der Keimzentrumsreaktion differenzieren aktivierte B-Zellen in den primären Lymphfollikeln zu Zentroblasten, proliferieren stark und bilden somit die dunkle Zone des nun sekundären B-Zellfollikels oder Keimzentrums aus (40). Das Einfügen von Punktmutationen in die variablen Regionen umgeordneter Gene für die schweren und leichten Ketten, die sogenannte somatische Hypermutation, führt zur Veränderung der BZR Spezifität. In der hellen Zone des Keimzentrums, in der die B-Zellen als Zentrozyten bezeichnet werden, findet die Selektion der B-Zellen, mit nun veränderter BZR Spezifität, statt. Hierfür präsentieren follikuläre dendritische Zellen (FDC), eine Zellpopulation nichtlymphoiden Ursprungs, Antigen-Antikörper-Komplexe, die an Komplementrezeptoren gebunden sind. T<sub>H</sub>-Zellen vermitteln zum einen Überlebenssignale an Zentrozyten zum anderen leiten sie den Klassenwechsel des BZR von IgM und IgD zu IgA, IgG und IgE ein (41).

Aus der Keimzentrumsreaktion gehen langlebige Plasmazellen und antigenspezifische Gedächtnis B-Zellen hervor. Plasmazellen wandern vornehmlich ins Knochenmark ein. Sie exprimieren keinen BZR und sezernieren ohne Antigen-Kontakt Antikörper. Gedächtnis B-Zellen, welche keine Überlebenssignale über den B-Zellrezeptor benötigen, zirkulieren zusammen mit den naiven B-Zellen durch lymphoide Organe und leiten nach erneutem Kontakt ihres BZR mit spezifischem Antigen eine schnelle Antikörperantwort ein.

Naive B-Zellen, wie auch Plasmazellen und Gedächtnis B-Zellen unterliegen homöostatischen Kontrollmechanismen. Für das Überleben von naiven B-Zellen sind über den B-Zellrezeptor vermittelte positive Überlebenssignale nötig, welche nach Eintritt in lymphoide Follikel übermittelt werden. Somit bestimmt die Fähigkeit einen Follikel zu betreten über das Weiterleben einer naiven B-Zelle. Auch für diesen Prozess nehmen die FDCs eine wichtige Rolle ein: Sie sezernieren das Chemokin BLC (*B-lymphocyte chemoattractant*), dessen Ligand CXCR5 auf naiven B-Zellen exprimiert wird. Außerdem werden B-Zellen, die zu starke oder zu schwache Signale über den BZR erhalten oder Autoantigen binden vom Eintritt in den Follikel ausgeschlossen (42, 43).

#### 1.4.2 T-Zell-Aktivierung

Nach der Reifung verlassen die naiven T-Zellen den Thymus und zirkulieren über das Blutsystem durch sekundäre Lymphorgane (44), bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Die Bindung des TZR und seiner Korezeptoren CD4 oder CD8 an den MHC/Peptidkomplex auf normalen Körperzellen induziert lediglich eine partielle Aktivierung, die durch eine verstärkte Expression von CD69, CD44 und der IL-2-Rezeptoruntereinheit  $\alpha$  (CD25) gekennzeichnet ist (45, 46). Sie führt schließlich zur lokalen Deletion der Lymphozyten durch Apoptose oder zu Anergie. Anergie bezeichnet einen Zustand, in dem sich die T-Zelle auch bei optimaler Stimulation durch ihr spezifisches Antigen nicht mehr aktivieren lässt (47). Auf diese Weise wird die periphere Toleranz gegen Selbst-Antigene erzeugt.

Professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APZ) übermittelten neben dem ersten Signal der Antigenerkennung ein zweites Signal über kostimulatorische Moleküle, was zur vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen führt (48). Die am gründlichsten untersuchten Kostimulatoren, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), gehören der B7-Proteinfamilie an. Sie werden von aktivierten APZ verstärkt exprimiert (49) und interagieren mit dem CD28-Molekül, das auf der Oberfläche der Mehrzahl naiver T-Zellen und auch T-Gedächtniszellen exprimiert wird (50). Die vollständie Aktivierung führt in der T-Zelle zur Expression des autokrinen, aber auch parakrin wirkenden, Zytokins und Wachstumsfaktors IL-2 und des funktionellen IL-2 Rezeptors. Die T-Zelle beginnt zu proliferieren (51), sowie anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-xL zu exprimieren (52). Aktivierte T-Zellen verlassen, bedingt durch Veränderungen in der Expression ihrer Oberflächenmoleküle, nach klonaler Expansion die lymphatischen Gewebe und wandern zum Inflammationsort.

Nach dem Abklingen einer Entzündungsreaktion wird der größte Teil der Effektor T-Zellen mittels Apoptose eliminiert, wohingegen ein kleiner Teil der aktivierten T-Zellen als Gedächtnis oder Memory T-Zellen persistiert. Gedächtniszellen unterliegen wie auch naive T-Zellen homeostatischen Kontrollmechanismen (53). Analog zur Homöostase von B-Lymphozyten wird die Aufrechterhaltung des peripheren T-Zellpools durch den begrenzten Eintritt in sekundäre Lymphorgane bestimmt. Beim Durchwandern der T-ZellZonen und gleichzeitigem Abtasten der Umgebung nach dendritischen Zellen, die Antigen gebunden haben, werden naiven T-Zellen durch niederaffine Interaktionen des TZR mit Selbst-Peptid-MHC-Komplexen (54) sowie durch verschiedene Cytokine wie IL-7 Überlebenssignale übermittelt (55).

#### 1.5 CD83

#### 1.5.1 Identifizierung und Struktur von CD83

CD83 wurde in den Jahren 1992/93 in zwei unabhängigen Arbeiten beschrieben: Zhou et al. klonierten CD83 aus einer humanen Tonsillen cDNA und Kozlow et al. aus einer humanen B Zell cDNA (56, 57). Das murine CD83 wurde sechs Jahre später aus einer aus murinem Hirngewebe hergestellten cDNA Bank und aus einer cDNA Bank aus aktivierten Knochenmarks-gereiften dendritischen Zellen (DZ) identifiziert (58, 59).

Die Gensequenz des murinen CD83 kodiert für 196 Aminosäuren (AS), von denen 21 AS für die Signalsequenz und 175 für das reife Protein stehen. Die 175 AS des reifen Proteins teilen sich in eine extrazelluläre Domäne von 114 AS, eine putative 21 AS lange Transmembrandomäne und eine 39 AS umfassende zytosolische Domäne auf. Der Vergleich der CD83 Aminosäuresequenz mit Aminosäuresequenzen bekannter Proteine in Protein-Datenbanken zeigte, dass die höchsten Sequenzhomologien mit Proteinen der Immunglobulin (Ig)- Superfamilie, die eine IgV-Domäne enthalten, besteht (57). Somit ist CD83 ein Mitglied der Ig-Superfamilie, das durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>16</sup> und Cys<sup>77</sup> eine zur variablen Domäne des Igs homologe Domäne ausbilden könnte.

Der Vergleich von murinem und humanem CD83, dessen extrazelluläre Domäne elf zusätzliche AS umfasst, zeigt 63% Homologie der Aminosäuresequenzen, wobei die Transmembran und zytosolische Domäne mit 82% und 77% Identität die höchste Konservierung zeigen. Die Identifizierung eines CD83 homologen Proteins im Huhn zeigte 39% und 40% AS-Sequenzidentität zum humanen bzw. murinem CD83 Molekül (60). Dass CD83 ein hochkonserviertes Molekül ist, zeigten die Entdeckungen von CD83 Homologen in Knochen- und Knorpelfisch mit 28-32% (61) AS-Identität.

CD83 ist ein Glykoprotein mit drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen, welches im Western-Blot als breite Bande zwischen 40 und 55 kDa (56) bzw. nach Entfernung Nverknüpfter Kohlenhydrate als scharfe Bande von 19-20 kDA erscheint (62). Die extrazelluläre Domäne von CD83 enthält fünf Cysteine. Die Erstbeschreibung von CD83 gab keinen Hinweis auf die Ausbildung von CD83 Oligomeren, da reduzierende und nichtreduzierende Bedingungen zum selben Bandenmuster im Western-Blot führten. Eine neuere Studie hat für rekombinante CD83-Konstrukte gezeigt, dass die rekombinante extrazelluläre Domäne von CD83 über das fünfte carboxyterminale Cystein homodimerisieren kann (63).

#### mCD83 Aminosäuresequenz



170 175 PSKHLGPVTLPKTETV

#### Abb.1.4: Aminosäuresequenz des murinen CD83

Das murine CD83 besteht aus 175 AS. Rote AS stellen das auf dem reifen Protein abgespaltene Signalpeptid dar. Violette AS kennzeichnen den hydrophoben Bereich des Proteins, der die theoretische Transmembrandomäne bildet. Grüne AS heben die sechs im Protein vorhandenen Cysteine hervor und gelbe AS markieren die drei hypothetischen N-verknüpften Glykosylierungsstellen. Nach AS<sup>45</sup> befinden sich im humanen CD83 elf zusätzliche AS.

Zytoplasmatische Domänen mehrerer Zelloberflächen-Immunrezeptoren enthalten Strukturmotive, die der Signaltransduktion dienen. Immunrezeptor-Tyrosinbasierende-aktivierende (ITAM)- und inhibitorische (ITIM) Motive sind spezielle AS-Sequenzen, die aus zwei Tyrosinen im Abstand von neun bis zwölf AS und aus einem Tyrosin zwei Positionen nach einer hydrophoben AS bestehen (64, 65). Nach Phosphorylierung der Tyrosine binden Proteintyrosinkinasen und –phosphatasen, die wiederum andere Moleküle binden und so Signale in die Zelle weiterleiten. Obwohl mehrer Studien zeigen, dass CD83 in der Regulation der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt ist, enthält die zytoplsamatische Domäne von CD83 keine Tyrosinreste und somit weder ITAM- noch ITIM-Motive (56-58).

#### 1.5.2 Expression von CD83

CD83 ist als spezifischer Marker für humane (66) und murine (59) aktivierte DZ beschrieben. Die Zelloberflächenexpression von CD83 ist auch für *in vitro* aktivierte Tund B-Lymphozyten (56, 67), eine Untergruppe regulatorischer NK-Zellen (68), aktivierte Neutrophile (69, 70), Thymus-Epithel-Zellen (TEZ) (71) und uncharakterisierte Zellpopulationen im Gehirn gezeigt (57, 58).

Die Beschreibungen von Zellpopulationen, die für den putativen Liganden von CD83 positiv sind, sind heterogen (71-75). Die Reifung von T-Zellen an CD83 defizientem Thymus-Epithel führt zu reduzierter Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen (71, 74). Dieses spricht für die Expression des CD83 Liganden (CD83L) auf den DP Thymozyten, der *in trans* an CD83 auf Thymus-Epithel-Zellen binden würde. Eine Studie mit einem CD83Ig Fusionsmolekül aus der extrazellulären Domäne des humanen CD83 und dem Fc-Teil humanen IgG1 hat CD83 als Siglec (*Sialic Acid-Binding Ig-like Lectin*) identifiziert (73). In dieser Studie wurde gezeigt, dass CD83 vorallem an Monozyten und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bindet. Nach Neuraminidase Behandlung, einem Enzym, das terminale Sialinsäurereste von Glycoproteinen abspaltet, reduzierte sich diese Bindung. Dieses bedeutet, dass CD83L Sialinsäurereste zu tragen scheint. Desweiteren ist die Bindung von CD83 an DZ (75) und an B-Zellen (72) beschrieben. Die eindeutige Identifizierung des CD83-Bindungspartners und der CD83L positiven Populationen steht daher noch aus.

#### 1.5.3 Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten

Als zentrale Funktion von CD83 hat sich die Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus herausgestellt. 2002 wurde eine CD83<sup>-/-</sup> Maus beschrieben, die eine stark reduzierte Anzahl an CD4<sup>+</sup> Thymozyten sowie an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie zeigt (71). Zwei Jahre später entstand im Rahmen einer Mutagenese-Untersuchungs-Reihe eine Maus, die eine Punktmutation im Stopcodon des CD83 Gens trägt. Der Austausch des Stopcodons gegen ein für Arginin kodierendes Kodon resultiert in einem Transkript, das für ein theoretisch um 55 AS verlängertes Protein kodiert. Auf Proteinebene zeigte sich eine stark reduzierte Expression von CD83 (74). Diese CD83 mutante (CD83mut) Maus zeigte dieselbe Reduzierung CD4<sup>+</sup> Thymozyten und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie wie die CD83<sup>-/-</sup> Maus. Die Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in beiden Mauslinien nicht verändert. Somit betrifft dieser Defekt in der T-Zell-Reifung exklusiv die Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Für die Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist die Expression von CD83 auf radioresistenten TEZ und nicht auf den Thymozyten selbst notwendig. Dieses wurde zum einen mit Hilfe von Knochenmarkschimären gezeigt: aus CD83 defizientem Knochenmark, das in Wildtyp-Umgebung reifte, entwickelten sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen in normaler Anzahl (71, 74). Der adoptive Transfer von Wildtyp-TEZ aber nicht von Wildtyp DZ aus Thymus oder Milz erhöhte die Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant, was darauf schließen lässt, dass exklusiv die CD83 Expression auf somatischen TEZ und nicht auf hämatopoetischen Zellen benötigt wird. Desweiteren wird der Befund dadurch gestärkt, dass CD83 defiziente

Thymozyten, die in Wildtyp-Thymi injiziert wurden, normale CD4<sup>+</sup> T-Zell-Entwicklung zeigen, Wildtyp-Thymozyten in CD83<sup>-/-</sup> Thymi jedoch reduzierte CD4<sup>+</sup> T-Zellanzahl zeigen (71).

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die sich in CD83mut Maus entwickelten, wiesen einen beeinträchtigten Phänotyp hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit auf. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus CD83mut Maus zeigten reduzierte Proliferation und verändertes Zytokinsekretionsmuster nach allogener Stimulation *in vitro* (74). Beide für CD83 defiziente Mauslinien zeigten *in vivo* reduzierte "verzögerte Hypersensitivitätsreaktion" (*delayed type hypersensitivity*, DTH) vom Typ IV, welcher im Gegensatz zu Typ I bis III durch die Reaktionen von T-Zellen vermittelt ist (71, 74).

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass CD83 auf TEZ Signale an DP Thymozyten vermittelt, die essentiell für die weitere Reifung zu funktionellen  $T_H$ -Zellen sind (Abb1.4).

Eine Beteiligung von CD83, welches ursprünglich aus einer humanen B-Zell-cDNA-Bank kloniert wurde (56), an der Entwicklung von B-Lymphozyten wurde bisher aber nicht untersucht und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.



#### Abb.1.4: CD83 defizientes Thymusepithel inhibiert die Reifung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

**A:** Reifung von Wildtyp-Thymozyten an Wildtyp-TEZ führt zur normalen Anzahl CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. **B:** Die Reifung von Wildtyp-Thymozyten an CD83 defizienten TEZ führt zur Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in reduzierter Anzahl und mit beeinträchtigter Funktion. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten entwickeln sich in normaler Anzahl mit unbekannter Funktion.

#### 1.5.4 Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von Lymphozyten

CD83 wird auf aktivierten DZ exprimiert (59, 66). Da DZ als die potentesten APZ (76) gelten, stellt sich die Frage, ob CD83 eine Funktion bei der peripheren Aktivierung von T-Zellen hat.

Da der putative Ligand von CD83 nicht bekannt ist, wurden mehrere Studien mit löslichen CD83 Konstrukten durchgeführt, die mit der natürlichen Interaktion von CD83 mit seinem Liganden interferieren sollten. Die meisten, der durchgeführten Untersuchungen, haben gezeigt, dass die Gabe der löslichen extrazellulären Domäne von CD83 oder CD83-Immunglobulin-Fusionsproteinen Immunantworten *in vivo* und *in vitro* supprimiert. Der größte immunsuppressive Effekt wurde mit in *E.coli* exprimiertem und somit unglykosyliertem CD83 erzielt: Es zeigte sich eine stark herabgesetzte Zellteilung in einer gemischten Lymphozyten Reaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) *in vitro* (75) sowie präventive als auch kurative Eigenschaften im murinen Modell für Multiple Sklerose, *Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), *in vivo* (77). Die Verwendung von humanem löslichem CD83 zeigte dieselben immunsupressiven Effekte in gemischten Lymphozyten Reaktionen *in vitro* und im EAE Model *in vivo* wie das murine CD83, was auf eine zwischen Mensch und Maus konservierte immunmodulatorische Funktion von CD83 hinweist.

Studien mit glykosylierten CD83-Immunglobulin-Fusionsproteinen haben heterogene Resultate ergeben. Einige Autoren beschreiben ebenfalls immunsuppressive Wirkungen *in vitro* und *in vivo* in Modellen der Tumorabwehr (78) und der Allotransplantation (79). Ein in unserer Arbeitsgruppe hergestelltes CD83-Ig-Fusionsprotein, bei dem an die extrazelluläre Domäne des murinen CD83 der Fc Teil des humanen IgG1 fusioniert ist, zeigte dagegen nur schwache immunsuppressive Wirkung auf die Proliferation und Zytokinsekretion von T-Zellen *in vitro* (72). Ein unabhängig generiertes, eukaryotisch exprimiertes und somit glykosyliertes hCD83Ig-Fusionsprotein zeigte keine Wirkung in einer MLR *in vitro* und im EAE Modell *in vivo* (80).

Lösliches CD83 ist wie auch CD80 und CD86 im Serum gesunder Menschen detektierbar, und wird in erhöhten Konzentrationen im Serum von Patienten mit verschiedenen schwerwiegenden Krankheiten (81) wie Rheumatoider Arthritis gefunden (82). Lösliches CD83 wurde desweiteren als immunsuppressives Agens im Kulturüberstand von humanem DZ, die mit dem Cytomegalivirus infiziert waren, identifiziert (83).

Mehrere Mechanismen zur Funktionsweise des löslichen CD83 sind denkbar. Die Präsenz von löslichem CD83 könnte mit der Interaktion der CD83<sup>+</sup> APZ mit der theoretisch für CD83L<sup>+</sup> T-Zelle interferieren oder ein Signal an die CD83L<sup>+</sup> Zelle vermitteln (Abb.1.5).



Abb.1.5: Mögliche Mechanismen zur Wirkung von löslichem CD83

**A:** Bindung von CD83 an den putativen CD83 Liganden vermittelt Signale an die CD83<sup>+</sup> und an die CD83L<sup>+</sup> Zelle. **B:** Lösliches CD83 bindet an den putativen CD83 Liganden, was zur Unterbindung der CD83-CD83L Interaktion führt. **C:** Lösliches CD83 vermittel ein Signal an eine CD83L<sup>+</sup> Zelle.

Neben den Experimenten mit löslichem CD83 wurde die Auswirkung veränderter CD83 Expressionsintensität auf Lymphozyten und APZ untersucht. Zwei Studien mit humanen Zellen haben gezeigt, dass die CD83 Expression auf APZ positiv mit der immunstimulatorischen Kapazität von APZ korreliert. Als APZ verwendete K562/HLA-A0201 Zellen waren in der Lage nach Koexpression von CD80 und CD83 antigenspezifische CTL *in vitro* zu aktivieren und zu expandieren (84). Transfektionen mit CD83 siRNA zeigten, dass CD83 defiziente APZ verminderte stimulatorische Kapazität besitzen und mit CD83 mRNA transfizierte APZ reziprok gesteigerte Kapazität aufweisen (85). Darüber hinaus führte in dieser Studie artfiziel vermehrte Expression von CD83 auf T-Zellen zur gesteigerten allogenen Immunantwort unabhängig von der Intensität der CD83 Expression auf APZ.

Zusammengefasst lassen diese Daten auf eine Funktion von CD83 als kostimulatorischen Rezeptor auf APZ für T-Zellen schließen. Im Falle der gesteigerten Immunantwort CD83 vermehrt exprimierender T-Zellen ließe sich dieses wie folgt interpretieren: Die eigentliche Interaktion von CD83 auf der APZ mit CD83L auf der T-Zelle wird durch die Bindung des transgen exprimierten CD83 durch CD83L auf der T-Zelle *in cis* ersetzt.

Hinweise für eine kostimulatorische Rolle von CD83 auf murinen Zellen erbrachte eine Studie, in welcher eine Melanomazelllinie mit CD83 transfiziert wurde. CD83<sup>+</sup> Melanomazellen zeigten eine gesteigerte T-Zell basierte Tumorabstoßung *in vivo* (86). Die Gabe von löslichem CD83Ig verhinderte dagegen diese geseteigerte Tumorabstoßung. Dieses lässt darauf schließen, dass die artifiziell vermehrte CD83 Expression die erhöhte T-Zell-Aktivierung vermittelt. Um die Funktion von CD83 als kostimulatorischen Rezeptor für T-Zellen auf APZ weitergehend zu untersuchen, wurde die stimulatorische Kapazität von APZ aus CD83mut, CD83tg Mäusen und Wildtyp-Mäusen miteinander verglichen. Im Gegensatz zu den humanen APZ zeigten murine DZ von CD83 defizienter oder transgener Maus im Vergleich zu Wildtyp-DZ keine Unterschiede in ihrer immunstimulatorischen Kapazität (71, 87).

Es ist beschrieben, dass aktivierte B-Zellen CD83 exprimieren (56), inwieweit ein Zusammenhang zwischen CD83 Expression und B-Zell-Funktion besteht, ist ungeklärt und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

#### 1.6 Ziele der Arbeit

Als zentrale Funktion von CD83 wurde die Selektion von DP Thymozyten zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben. Zwei unabhängige Studien mit CD83 defizienten Mäusen haben gezeigt, dass die Expression von CD83 auf TEZ für die Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus DP Thymozyten essentiell ist (71, 74). Die vollständige Unterbrechung der CD83 Signalübertragung von oder auf TEZ führt zur Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in stark reduzierter Anzahl und mit beeinträchtigter Funktion. In dieser Arbeit sollte zum einen der Einfluss von löslichem CD83 auf die Entwicklung von T-Zellen untersucht werden.

CD83 ist ein spezifischer Marker für aktivierte DZ. Darüberhinaus wurden weitere CD83exprimierende Leukozytenpopulationen identifiziert, z.B. aktivierte B-Lymphozyten. Bisher liegen jedoch keine Erkentnisse darüber vor, ob CD83 einen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion von B-Zellen hat.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, aufzuklären, ob CD83 die frühe Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark sowie die späte Differenzierung in der Milz beeinflusst. Hierfür sollte die B-Zell-Entwicklung in Mäusen mit aberranter CD83 Oberflächenexpression sowie unter Einfluss von löslichem CD83Ig untersucht werden. Neben einem möglichen Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von B-Zellen sollte untersucht werden, ob CD83 die Aktivierung und das peripheres Überleben von B-Zellen beeinflusst.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden -sofern nicht anders angegeben- von den Firmen *Fluka* (Neu Ulm), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) oder *Sigma* (Deisenhofen) bezogen.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
C57BL/6J	H-2 <sup>b</sup>	UKE,
		Hamburg
C57BL/6J-IgH <sup>a</sup> -CD90.1	H-2 <sup>b</sup> ; transgene Maus, die IgH <sup>a</sup> und Thy1 <sup>a</sup> Gen der Balb/c Maus	BNI,
	trägt (88, 89)	Hamburg
OT-I	H-2 <sup>b</sup> ; T-Zell-Rezeptor-transgene Maus, deren TCR einen	BNI,
	Komplex aus H2-K <sup>b</sup> und dem aus Hühner-Ovalbumin	Hamburg
	stammendem Peptid OVA <sub>257-264</sub> erkennt (90)	
OT-II	H-2 <sup>b</sup> ; T-Zell-Rezeptor-transgene Maus, deren TCR einen	BNI,
	Komplex aus I-A <sup>b</sup> und dem aus Hühner-Ovalbumin stammendem	Hamburg
	Peptid OVA <sub>323-339</sub> erkennt (91)	UKE,
		Hamburg
CD83Ig tg	H-2 <sup>b</sup> ; transgene Maus, die unter der Kontrolle des MHC-II	BNI,
	Promotors ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne	Hamburg
	von mCD83 und dem Fc-Teil humaner IgG1 exprimiert (92-95)	UKE,
		Hamburg
CD83Ig tg/OT-I	zweifach transgene Maus; siehe OT-I und CD83Ig tg	BNI,
		Hamburg
CD83Ig tg/OT-II	zweifach transgene Maus; siehe OT-II und CD83Ig tg	BNI,
		Hamburg
		UKE,
		Hamburg
CD83tg	H-2 <sup>b</sup> ; transgene Maus, die unter der Kontrolle des MHC-I	BNI,
	Promotors membranständiges mCD83 exprimiert (87, 96-98)	Hamburg
		UKE,
		Hamburg
CD83mut	H-2 <sup>b</sup> ; durch ENU Mutagenese entstandene CD83 Mutante;	BNI,
	Mutation innerhalb des CD83 Stopcodons, welche zu einer	Hamburg
	theoretischen Verlängerung des Proteins von 55AS führt (71)	

#### 2.1.2 Mausstämme

Tabelle 2.1: Verwendete Mauslinien

#### 2.1.3 Antikörper, Detektionsreagenzien und Stimulationsreagenzien

Für durchflusszytometrische Analysen (FACS) verwendete Antikörper:

Spezifität	Klon	Herkunft
Hamster anti-MausCD3-PE/FITC/	145-2C11	BD Pharmingen
APC		
Ratte anti-MausCD4-PE	CT-CD4	Caltag Laboratories
Ratte antiMausCD4-APC	RM4-5	Caltag Laboratories
Rattee anti-MausCD5-PE	53-7.3	BD Pharmingen
Ratte anti-MausCD8-PE/FITC	CT-CD8a	Caltag Laboratories
Ratte anti-MausCD11b-FITC	M1/70	BD Pharmingen
Ratte anti-MausCD19-PE	1D3	BD Pharmingen
Ratte anti-MausCD21/CD35-FITC	7G6	BD Pharmingen
Ratte anti-MausCD23-APC	B3B4	Caltag Laboratories
Ratte anti-MausCD25-PE	3C7	Caltag Laboratories
Ratte anti-MausCD43-FITC	S7	BD Pharmingen
Hamster anti-MausCD69-PE	H1.2F3	BD Pharmingen
Ratte-antiMausCD83-FITC	Michel17, Michel19	BNI
Ratte anti-MausCD86-FITC	RMMP-2	AbD Serotec
Maus anti-MausVβ5.1/5.2-FITC	MR9-4	BD Pharmingen
Hamster anti-MausαβTCR-PE	Н57-597	Caltag Laboratories
Ratte anti-MausB220-PE	RA3-6B2	BD Pharmingen
Maus anti-MausIgM <sup>a</sup> -FITC/bio	DS-1	BD Pharmingen
Maus anti-MausIgM <sup>b</sup> -bio	AF6-78	BD Pharmingen
Cy <sup>TM</sup> 5 <sup>-</sup> AffiniPure Goat anti-Maus IgM,		Dianova
μ chain specific		
Ratte anti-MausIgD-FITC	11-26c.2a	BD Pharmingen
Ratte anti-MausMHC-II-PE	M5/114.15.2	BD Pharmingen
Streptavidin-APC/PerCP		BD Pharmingen

Tabelle2.2: Für durchflusszytometrische Analysen verwendete Antikörper

#### ELISA/ELISPOT-Testsysteme:

Zur Quantifizierung der Zytokine IL-2, IFN-γ und IL-10 in Überständen von *in vitro* kultivierten Zellen wurden DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development Kits (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet.

Zur Quantifizierung der IFN-γ produziernden Zellen wurde das Maus IFN-γ-Antikörperset von BD, Pharmingen verwendet.

#### Western-Blot:

sierung, Prof. F. Haag,
), Dänemark

<u>T/B-Zellstimulation:</u> Anti-CD3 (1452C11) Lipopolysaccharid (LPS; E.coli 055: B5) Anti-κ (187.1) IL-4

Hybridomüberstand, BNI Sigma, Deisenhofen BD Pharmingen, Heidelberg Biomol, Hamburg

### 2.1.4 Material für molekularbiologische Arbeiten

#### Enzyme:

Taq-DNA-Polymerase, 5 U/µl Powerscript Reverse Transkriptase DNase I, RNase freie Dnase

Oligonukleotid-Primer: CD83Ig transgene sense: CD83Ig transgene antisense: β-actin sense: β-actin antisense:

## New England Biolabs, Bad Schwalbach BD Pharmingen, Heidelberg Roche, Mannheim

GCAGCTCTCCTATGCAGTGTC GAGTTTTGTCACAAGATTTGG GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG GCAATGCCTGGGTACATGGTG

### 2.1.5 Material für biochemische Arbeiten

Coomassie PlusTM Protein Assay Reagent	Perbio Science, Bonn
ECLTMWestern Blotting Detection	
Reagents	Amersham, Buckinghamshire, UK
ProGel-tris-Glycin-Gel 10-20%	Anamed, Darmstadt
PVDF-Membram (Immobilion-P,	
Porengröße 0,45 µm)	Millipore, Schwalbach

#### 2.1.6 Material für zellbiologische Arbeiten

antiCD8-Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
antiCD11c-Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich
HEPES	PAA, Linz, Österreich
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Pan T cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pan B cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
RPMI 1640	PAA, Linz, Österreich

#### 2.1.7 Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurden hitzeunempfindliche Lösungen autoklaviert (135°C, 2 bar, 20 min) und hitzeempfindliche Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,22  $\mu$ m). Fötales Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren dreißig Minuten bei 56 °C erhitzt und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

2.1.7.1	für biochemische Arbeiten	
PBS-T		1 x PBS mit 0,2% (v/v) Tween-2
SDS-Gel-La	aufpuffer (10x)	250 mM Tris
		2,5 M Glycin
		1% (w/v) SDS
Westernblot	t-Transferpuffer	
10xCAPS		100 mM CAPS, pH 11
1xCAPS		100 ml 10xCAPS
		100 ml Methanol
		800 ml H <sub>2</sub> O
2.1.7.2	für zellbiologische Arbeiter	1
ELISA- und	l ELISPOT-Bindungs-Puffer	Lösung1: 10 mM Na2CO3
	-	Lösung2: 20 mM NaHCO3
		Beide Lösungen werden bis Erreichen
		von pH9,6 gemischt.
ELISA- und	l ELISPOT-Blockpuffer	1 x PBS mit 1% (w/v) BSA
ELISA-Stop	blösung	$2 \text{ M} \text{H}_2 \text{SO}_4$
ELISA-Sub	stratpuffer	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH5,5
ELISA-Sub	stratlösung	200 µl ELISA-TMB-Lösung
		12 ml ELISA-Substratpuffer
		1,2 μl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ELISA-TM	B-Lösung	60 mg Tetramethylbenzidin (TMB)
		in 10 ml DMSO

ELISPOT-Substratlösung	<ul> <li>10 ml 100 mM Tris pH7,5</li> <li>200 μl DAB (40 mg/ml)</li> <li>50 μl NiCl<sub>2</sub> (80 mg/ml)</li> <li>Zugabe von 5 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach Sterilfiltration.</li> </ul>
Erythrozyten-Lysepuffer	10% (v/v) 0,1 M Tris/HCL pH7,5 90% (v/v) 0,16 M NH <sub>4</sub> Cl
FACS-Puffer	1xPBS, 1% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) NaN <sub>3</sub>
Griess1	0,1 % (w/v) Sulfanilamid 2,5 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Griess2	0,1% (w/v) Naphtylen-diamid- dihydrochlorid 2,5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
RPMI/ 10% FCS	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS 10 ml 1M Hepes 10 ml 200 mM L-Glutamin 2,5 ml 10 mg/ml Gentamycin

## 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 RNA-Präparation aus murinen Zellen/Geweben

Gesamt RNA aus murinem Gewebe wurde nach der Acid-Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform (AGPC)-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert. Es wurde die gebrauchsfertige AGPC-Lösung TRI Reagent<sup>®</sup> (Biotech Trade & Serv, St. Leon Roth) verwendet. Zur isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das Perfect RNA, Eukaryotic Mini Kit (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet.

#### 2.2.1.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Um genomische DNA Verunreinigungen zu entfernen, wurden isolierte RNA Proben für eine Stunde bei 37°C mit RNase freier DNase behandelt. Hierzu wurden zu 9  $\mu$ l ( $\approx 2 \mu g$ ) RNA 2  $\mu$ l DTT (0,1 M), 3 $\mu$ l 5 x Puffer (5 x First Strand Buffer, Invitrogen) und 1  $\mu$ l DNase pipetiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65°C für fünf Minuten hitzeinaktiviert. Die Proben wurden mit 4  $\mu$ l oligo(dT) Primer (Primo P (dT)<sub>15</sub>, 8  $\mu$ M, Roche) versetzt und zur Anlagerung der Primer für 10 min bei 70°C erwärmt. Nach kurzem Abkühlen wurde den Proben 2  $\mu$ l Puffer, 2  $\mu$ l dNTPs (10 mM) und 1  $\mu$ l PowerScriptTM reverse Transcriptase (Invitrogen) zugefügt. Die reverse Transkription erfolgte für 60 min bei 42°C. Zur abschließenden Enzyminaktivierung erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 70°C.

#### 2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden enzymatisch mittels PCR (Saiki et al., 1988) amplifiziert und in 1% bis 2% igen Agarosegelen aufgetrennt.

#### 2.2.2 Biochemische Methoden

#### 2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse

Zu lysierende Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, Protease-Inhibitor-Cocktailtablette (Complete EDTA-free; Roche, Mannheim), 1% (w/v) CHAPS) resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Zelltrümmer wurden bei 16.200 x g 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Zelllysat abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradfordbestimmung ermittelt.

#### 2.2.2.2 Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten

75 µg Protein einer Zelllysatprobe wurde auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt, mit 2 µl 10% (w/v) SDS versetzt und 10 min bei 70°C denaturiert. Die Probe wurde mit 10 µl 10% (v/v) NP40 versetzt. Die Deglykosylierung erfolgte mit 2 µl (=2 U) PNGaseF (N-Glycosidase F, Roche) über Nacht bei 37°C.

### 2.2.2.3 CD83 spezifischer Westernblot

Murines CD83 im Western Blot wurde mittels eines polyclonalem Kaninchen anti-Maus CD83 spezifischem Serums (siehe 2.1.3) detektiert:

5%(w/v) Milchpilver in PBS-T 2h RT		
polyklonales Kaninchen anti-Maus		
CD83 Serum 1:10.000 in PBS-T 4°C		
über Nacht		
3 mal 7 min mit PBS-T		
anti-Rabbit-HRP 1:2.000 in PBS-T		
45 min RT		
5 mal 7 min mit PBS-T		
ECL nach Herstellerangaben		

#### 2.2.2.4 Herstellung von Thymuslysaten zur Quantifizierung von CD83Ig

Thymi wurden präpariert und mittels eines Mini-Pürierstabs in hypotonem Lysispuffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl2, pH 7,5, Protease-Inhibitor-Cocktailtablette (Complete EDTA-free; Roche, Mannheim)) homogenisiert. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde als Gewebelysat abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradfordbestimmung ermittelt. Die Quantifizierung des Proteingehalts von CD83 mittels spezifischem ELISA erfolgte in einer Konzentration von 300 ng/ml Gesamtprotein.

#### 2.2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden mit Coomassie-Brilliantblau ermittelt. Für die Messung wurden unterschiedliche Verdünnungen der Probe in PBS in einem Volumen von 20  $\mu$ l eingesetzt und mit 200  $\mu$ l Bradford-Reagenz versetzt. Zur Kalibrierung wurde eine Standardkurve von BSA in PBS in Konzentrationen von 1 mg/ml bis 0,015 mg/ml eingesetzt. Die Proben wurden unmittelbar nach Vermischen mit dem Reagenz im ELISA-Reader bei 630 nm vermessen.

#### 2.2.2.6 mCD83 spezifischer ELISA

Dimeres mCD83 wurde mittels der Ratte anti-Maus CD83 spezifischen Antikörper Michel17 und Michel19 im Standard Sandwich ELISA quantifiziert. ELISA Platten wurden mit 4  $\mu$ g/ml Michel 17 in ELISA-Bindungspuffer über Nacht beschichtet. Die Detektion erfolgte mit 1  $\mu$ g/ml biotinyliertem Michel19. Rekombinantes mCD83Ig wurde als Standard in einer Verdünnungsreihe von 20 ng/ml bis 150 pg/ml verwendet.

#### 2.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte bei  $37^{\circ}$ C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Waschschritte fünf Minuten bei 300 x g und  $4^{\circ}$ C durchgeführt.

# 2.2.3.2 Präparation von murinen Milzzellen sowie T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen aus der Milz

Die steril präparierte Milz wurde in 10 ml Vollmedium mit dem Stempel einer 5ml-Einmalspritze zerrieben. Zur Abtrennung nicht zerriebenen Gewebes wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb (Cell strainer; BD Pharmingen) gegeben. Erythrozyten wurden mittels Erythrozytenlysepuffer eliminiert und die Zellen dreimal gewaschen.

Zur weiteren Aufreinigung von T-Zellen, B-Zellen oder dendritischen Zellen wurden Zellisolationskits den Hersteller Angaben entsprechend verwendet (Miltenyi, Biotec; Pan T cell isolation kit, Pan B cell isolation kit, CD11c<sup>+</sup> micro beads).

## 2.2.3.3 Präparation von murinen CD4 einfach positiven Thymocyten

Steril präparierte Thymi wurden in 10 ml Vollmedium mit dem Stempel einer 5ml-Einmalspritze zerrieben. Zur Abtrennung nicht zerriebenen Gewebes wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb (Cell strainer; BD Pharmingen) gegeben. CD4<sup>+</sup> Thymocyten wurden mittels Negativselektion von CD8<sup>+</sup> Zellen (Miltenyi, Biotec; CD8 micro beads) isoliert.

## 2.2.3.4 Präparation von Knochenmarkszellen

Ober- und Unterschenkel einer getöteten Maus wurden präpariert. Nach beidseitigem Öffnen des Knochenkanals wurde das Knochenmark mit kaltem RPMI Medium herausgespült. Für den Oberschenkel wurde eine 23G und für den Unterschenkel eine 27G Kanüle verwendet. Erythrozyten wurden mittels Erythrozytenlysepuffer eliminiert und die Zellen dreimal gewaschen.

#### 2.2.3.5 Präparation von Peritonealzellen/Lavage

Für die Präparation von Peritonealzellen wurde einer getöteten Maus das Fell des Bauches abgezogen ohne die darunter liegende Hautschicht zu beschädigen. 2 ml eiskaltes Zellkulturmedium wurde in das Peritoneum des getöteten Tieres injiziert und der Bauch durch vorsichtiges Drücken gespült. Anschließend wurde das Peritoneum zweimal mit 5 ml eiskaltem Zellkulturmedium ausgespült. Die dabei gewonnen Zellen wurden pelletiert.

#### 2.2.3.6 Durchflusszytometrischer Nachweis - FACS

Für die Färbung erfolgten alle Arbeitsschritte bei 4°C (Zentrifugation) oder auf Eis, um die Internalisierung von Oberflächenmolekülen zu inhibieren. Pro Färbung wurden  $2x10^5$  bis  $1x10^6$  Zellen nach erfolgter Erythrozytenlyse pelletiert und derren Fc-Rezeptoren für 10 Minuten mit 10% (v/v) Mausserum in FACS Puffer geblockt. Für den Nachweis von Zelloberflächenmolekülen wurden entsprechende spezifische Antikörper in FACS-Puffer verdünnt (Verdünnung siehe Tabelle 2.3) und für 20 bis 60 Minuten auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend mit FACS-Puffer gewaschen und mit 200 µl PBS/1% PFA fixiert oder im Falle nicht direkt konjugierter Antikörper mit dem entsprechendem Zweitantikörper inkubiert und anschließend fixiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Pharmingen) vermessen und mit Hilfe der Software CellQuestPro ausgewertet.

Verwendeter Antikörper	Verdünnung
alle nicht gesondert aufgelisteten FACS-Antikörper	1:100
Ratte anti-MausCD19-PE	1:400
Ratte anti-MausCD83-FITC	1:200
Streptavidin-APC	1:200

Tabelle 2.3: Verdünnungen von für durchflusszytometrische Analysen verwendete Antikörper

#### 2.2.3.7 Durchflusszytometrische Zellsortierung-FACS Sortierung

Für die Sortierung von CD83Igtg Milzzellen in TZR<sup>+</sup> und TZR<sup>-</sup> Population wurden 2,5 x  $10^7$  Milzzellen von CD83Ig trangener und C57BL/6 Maus mit  $\alpha\beta$ -TZR spezifischem Antikörper in einem Volumen von 2,5 ml gefärbt. Die Sortierung erfolgte am FACSAria (BD Pharmingen).

## 2.2.3.8 *In vitro* Stimulationsexperimente zur Stimulation von Milzzellen oder naiven T-Zellen

Alle *in vitro* Stimulationsexperimente wurden soweit nicht anders angegeben in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen in einem Volumen von 200 µl durchgeführt. Zytokine im Überstand wurden mittels DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development Kits den Hersteller Angaben entsprechend quantifiziert. Die Proliferation wurde mittels Einbau von <sup>3</sup>H-

Spenderorganismus	Zellart	Zellzahl	Stimulans
CD83Igtg/OT-II	Milzzellen	2x10 <sup>5</sup>	300ng/ml OVA323-339
CD83Igtg/OT-II	T-Zellen aus der Milz	1x10 <sup>5</sup>	300ng/ml OVA323-339
	B-Zellen oder CD11c <sup>+</sup>	5x10 <sup>4</sup>	
	Zellen aus der Milz		
CD83Igtg/OT-I	Milzzellen	2x10 <sup>5</sup>	300ng/ml OVA257-264
CD83Igtg	Milzzellen	2x10 <sup>5</sup>	1µg/ml OVA323-339
Knochenmarkschimären			
CD83Igtg/OT-II	CD8 depletierte Thmus-	8x10 <sup>5</sup>	1µg/ml OVA323-339
	Zell-Kulturen		
CD83Igtg/OT-II	CD8 depletierte Thmus-	6x10 <sup>5</sup>	Puls der C57BL/6
	Zellen		Milzzellen mit
	Bestrahlte C57BL/6	1x10 <sup>5</sup>	100µg/ml OVA323-339
	Milzzellen als APZ		
CD83tg	Milzzellen	2x10 <sup>5</sup>	10µg/ml LPS
Knochenmarkschimären			

Thymidin (2.2.3.9) bestimmt. Tabelle 2.4 zeigt in einer Übersicht alle in dieser Arbeit gezeigten *in vitro* Stimulationsexperimente zur Quantifizierung von sezernierten Zytokinen und der Proliferation.

 Tabelle
 2.4: In dieser Arbeit gezeigte in vitro Stimulationsteste.

Für die Analyse von Oberflächenmolekülen CD83Igtg T-Lymphozyten über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden  $2x10^6$  Milzzellen mit 500 ng/ml OVA<sub>323-339</sub> in 2 ml in 24-well-Platten inkubiert bzw.  $8x10^5$  CD8 depletierte Thymus-Zellen in 200 µl mit 1 µg/ml OVA<sub>323-339</sub> in 96-well-Platten.

## 2.2.3.9 Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin/Proliferationstest

Zur Proliferationsmessung wurde 48 Stunden nach *in vitro* Stimulation (2.2.3.8) 25  $\mu$ l <sup>3</sup>H-Thymidin Voll-Medium (10  $\mu$ Ci/ml) auf die Zellen gegeben. Nach 18 Stunden Inkubationszeit wurde der Einbau des radioaktivem Thymidins nach Zellernte (Micro Cell Harvester) mittels eines  $\beta$ -Szintillationszählers bestimmt.

## 2.2.3.10 IgPan-Bestimmung im Zellkulturüberstand

ELISA Platten wurden mit  $\alpha$ -Maus Immunglobulinen (rabbit  $\alpha$ -mouse Immunoglobulin; Dako, Dänemark) in ELISA-Bindungspuffer 1:2000 über Nacht beschichtet. Die Platten wurden dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl PBS 1% (w/v) BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Die Zellkulturüberstände wurden in seriellen Verdünnungen in PBS 0,1% (w/v) BSA von 1:100 bis 1:1600 aufgetragen. Die Detektion erfolgte am nächsten Tag mit HRP-konjugierten  $\alpha$ -Maus Immunglobulinen in einer Verdünnung von 1:2000 (rabbit  $\alpha$ -mouse Immunoglobulin-HRP, Dako, Dänemark).

#### 2.2.3.11 ELISPOT

Für den ELISPOT wurden die Milzzellen in speziellen Antikörper-beschichteten Kulturplatten (MultiScreen<sup>®</sup>HTS<sup>TM</sup>, HA; Millipore, Schwalbach) kultiviert. Für den IFNγspezifischen ELISPOT wurden die ELISPOT-Platten zunächst mit 200 µl PBS gespült und anschließend mit 50 µl anti-IFNy in ELISA/ELISPOT-Bindungspuffer (5 µg/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden mit 200 µl PBS dreimal gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit PBS/1% BSA für 2 Stunden bei RT blockiert. 1,25 x 10<sup>5</sup> nach 2.2.3.2 präparierte Milzzellen wurden für 18 Stunden in 200 µl/well inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit 200 µl PBS gewaschen und darauf 50 µl Biotin-gekoppelter anti-IFN-γ ((BD Pharmingen) 1 μg/ml in PBS/0,1% BSA) für 2 Stunden bei 37°C zugesetzt. Die Platten wurden erneut dreimal mit 200 µl PBS gewaschen und 50 µl Streptavidin-HRP (BD Pharmingen) 1:200 in PBS/0,1% BSA für eine Stunde bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden abschließend dreimal mit 200 ul PBS gewaschen und 100 µl ELISPOT-Substratlösung zugesetzt. Nach Erreichen einer sichtbaren Färbung wurden die Platten mit H<sub>2</sub>O gründlich gespült und somit die Reaktion gestoppt. Nach Trocknung der Platten wurden die Spots im ELISPOT-Reader (Lambda E, Biosys GmbH) ausgezählt.

#### 2.2.4 Tierversuche

#### 2.2.4.1 Infektion von Mäusen mit *Trypanosoma cruzi*

Der *Trypanosoma cruzi* Stamm Tulahuen (WHO referenz Stamm M/HOM/CH/00/Tulahuen C2) wurde durch serielle Passagen in Balb/c Mäusen gehalten. Die Infektion mit *T. cruzi* erfolgte durch intraperitonealle Injektion von  $2x10^4$  -aus dem Blut infizierter Balb/c Mäusen gewonnener -Trypomastigoten in acht Wochen alte männliche C57BL/6 oder CD83Ig transgene Mäuse. Zur Parasitämiebestimmung wurde den infizierten Mäusen 3µl Blut aus der Schwanzvene entnommen und darin enthaltene Eythrozyten mit 27µl NH<sub>4</sub>Cl (0,87% w/v) lysiert. Lebende Parasiten wurden in einer Neubauer–Zählkammer gezählt.

Zur Rekonstitution infizierter C57BL/6 Mäuse mit rekombinantem CD83Ig wurde den Tieren über den Zeitraum des gesamten Versuches jeder dritter Tag 100 µg CD83Ig-Fusionsprotein oder humanes IgG1 in 200µl PBS i.p. injiziert. Die erste Injektion erfolgte sechs Stunden vor Infektion. Zusammen mit der Parasitämiebestimmung wurde im Serum der CD83Ig Gehalt mittels CD83 spezifischem ELISA bestimmt.

#### 2.2.4.2 Infektion von Mäusen mit *Leishmania major*

Der *Leishmania major* Stamm MHOM/IL/81/FE/BNI wurde in Blutagarplatten (100ml (5,2% (w/v)) BrainHeartInfusions Agar, 25 ml 0,9% (w/v) NaCl, 3 ml Penicillin-Streptomycin, 25 ml defibriniertes Kaninchenblut; in 96-well Flachbodenplatte, 45° Schräglage, 50  $\mu$ l/well) bei 28°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei wöchentlich 1x10<sup>5</sup> *L.major* in 150  $\mu$ l/well RPMI-Vollmedium gehalten wurden. Zur Aufrechterhaltung der Virulenz wurden die Leishmanien alle 7 Wochen in Balb/c Mäusen passagiert und circa 4 Wochen nach Infektion reisoliert.

Zur Infektion wurden die Leishmanien mit PBS von den Kulturplatten abgespült und 3 x gewaschen (3000 x g, 10 min, 4°C). Die Infektion mit *L.major* erfolgte durch subkutane Injektion von  $3x10^6$  Promastigoten, in der stationären Phase, in 50 µl PBS in den Fuß von acht Wochen alten weiblichen C57BL/6 oder CD83Ig transgenen Mäusen. Zur Überwachung des Krankheitsverlaufs wurde wöchentlich die Dicke des infizierten Fusses gemessen. Die Zunahme der Schwellung wurde gegenüber der nicht-infizierten Pfote als Referenz angegeben.

#### 2.2.4.3 NO-Bestimmung aus Serum/Griess-Reaktion

Von aktivierten Phagozyten sekretierte Stickoxide werden im Serum zu Nitrat reduziert. Da mittels der Griess-Reaktion Nitrit-Konzentrationen bestimmt werden, muß das im Serum vorhandene Nitrat erst zu Nitrit reduziert werden. Hierzu wurden 30  $\mu$ l Serum mit 5  $\mu$ l Nitratreduktase (5 U/ml; Aspergillus Niger) und 15  $\mu$ l NADPH (1,25 mg/ml) für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im Serum mit 100  $\mu$ l 10% (w/v) TCA gefällt (16.200 x g, 5 min, 4°C).

Für die anschließende Nitrit-Bestimmung wurden 50  $\mu$ l Probe mit 25  $\mu$ l Gries1 und 25  $\mu$ l Griess2 versetzt. Als Standard wurde Natriumnitrit von 125  $\mu$ M bis 2  $\mu$ M titriert. Die Extinktion wurde unmittelbar bei 560 nm im Photometer vermessen.

#### 2.2.4.4 Bestimmung *T.cruzi* spezifischer Antikörper

*T.cruzi* spezifische Antikörper aus Serum *T.cruzi* infizierter Mäuse wurden mittels Standard Sandwich ELISA quantifiziert. ELISA Platten wurden mit *T.cruzi* spezifischem Zelllysat 1:2000 in ELISA-Bindungspuffer über Nacht beschichtet. Die Platten wurden dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl PBS 1% (w/v) BSA für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Die Serum-Proben wurden in 1:100 Verdünnungen in PBS 0,1% (w/v) BSA in Dreifachbestimmung aufgetragen. Die Detektion erfolgte am nächsten Tag mit HRP-konjugierten  $\alpha$ -Maus Immunglobulinen in einer Verdünnung von 1:2000 (rabbit  $\alpha$ -mouse Immunoglobulin-HRP, Dako, Dänemark).
## 2.2.4.5 Generierung von Knochenmarkschimären

Die rezipienten Mäuse erhielten 8 Gray  $\gamma$ -Bestrahlung durch eine Caesium Quelle (<sup>137</sup>Cs). Einen Tag später wurden zur Rekonstitution des eigenen blutbildenen Systems Knochenmarkzellen aus Ober- und Unterschenkel entsprechender Spendermäuse gewonnen. 2x10<sup>6</sup> bzw. bei gemischten Chimären 6x10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen wurden in 200 µl PBS i.v injiziert. Zur Vermeidung von Infektionen wurde den Mäusen im Zeitraum von einer Woche vor Bestrahlung bis vier Wochen nach Bestrahlung 0,5‰ (v/v) Baytril (Bayer) ins Trinkwasser gegeben.

## 2.2.4.6 Bestimmung der prozentualen Anteile peripherer Blut-Lymphozyten

Zur Bestimmung der prozentualen Anteile von B- und T-Lymphozyten im Blut von gemischten Knochenmarkschimären wurde den Chimären 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Erythrozyten wurden mit 10 ml Erythrozyten-Lysispuffer lysiert. Anschließend wurde die Zusammensetzung der Lymphozyten mittels FACS-Färbung (2.2.3.6) ausgewertet.

## 2.2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde der Student's t-test angewandt. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

## 3.1 Überblick

Mit den im Ergebnisteil beschriebenen Experimenten wurde die immunologische Funktion des CD83 Proteins bei Reifung und Aktivierung von murinen B- und T-Lymphozyten untersucht. Für diese Analysen standen verschiedene in der Expression von CD83 modulierte Mäuse zur Verfügung. Am Bernhard-Nocht-Institut wurden CD83 transgene Mäuse generiert, die CD83 konstitutiv unter der Kontrolle des MHC-Klasse-I Promotors und somit auf jeder kernhaltigen Zelle exprimieren. Es existieren zwei unabhängig voneinander generierte CD83tg Linien, Founder 1 und Founder 2 (87, 96). Eine CD83 Mutante und somit für CD83 defiziente Maus stellte Prof. Fred Ramsdell zur Verfügung (99). Als drittes wurde eine Maus, die lösliches CD83Ig exprimiert, untersucht. Diese transgene Maus exprimiert ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des murinen CD83 und dem Fc-Teil humanen IgG1 unter der Kontrolle des MHC-Klasse-II Promotors (92-95). Somit standen für die in dieser Doktorarbeit gezeigten Untersuchungen Mäuse zur Verfügung, die vermehrte oder fehlende CD83 Oberflächenexpression aufweisen oder lösliches CD83 sekretieren.

Mittels dieser in der Expression von CD83 modulierten Mäuse wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss der Intensität der CD83 Expression auf die Entwicklung und Aktivierung von B-Lymphozyten untersucht. Im zweiten Teil ist weitergehend der Einfluss des löslichen CD83 in der CD83Ig transgenen Maus auf die Entwicklung und Aktivierung muriner T-Lymphozyten beschrieben.

## 3.2 Teil I: Einfluss der Intensität der CD83 Expression auf die Reifung und Aktivierung von B-Lymphozyten

## 3.2.1 B-Zellvorläufer exprimieren kein CD83, unreife und reife naive B-Zellen zeigen eine schwache CD83 Expression und aktivierte B-Zellen eine starke CD83 Expression

CD83 wird nach Aktivierung vermehrt auf B-Lymphozyten exprimiert und beeinflusst deren Aktivierung (97, 98). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob CD83 auch einen Einfluss auf die Entwicklung muriner B-Lymphozyten hat. Für diese Untersuchungen wurden als erstes die B-Zellvorläufer- und B-Zellsubpopulationen in Knochenmark und Milz in Wildtyp-Mäusen und in Mäusen mit veränderter CD83 Expression analysiert.

Abbildung 3.1 zeigt die Strategie mit Hilfe derer B-Zellkompartimente im Knochenmark und in der Milz definiert wurden. Für diese Definition wurde die Oberflächenexpression von B220, die B-Zell spezifische Form des auf allen Leukozyten exprimierten CD45 Proteins -eine Tyrosinphosphatase-, des B-Zell-Rezeptors -IgM und IgD- sowie des Adhäsion vermittelnden Glykoproteins CD43 auf Knochenmarkszellen durchflusszytometrisch analysiert. In der Milz wurden B-Zellsubtypen nach ihrer Oberflächenexpression des positiven B-Zell-Korezeptors CD19 sowie des negativen B-Zell-Korezeptor CD21 und des Liganden des B-Zell-Korezeptorkomplexes CD23 -ein niederaffiner IgE-Rezeptor- oder der BZR Isotypen IgM und IgD eingeteilt. Somit wurde im Knochenmark (A) zwischen pro B-Zellen (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>-</sup>, CD43<sup>+</sup>), pre B-Zellen (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>-</sup>, CD43<sup>-</sup>), unreifen B-Zellen (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>) und rezirkulierenden reifen B-Zellen (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>) unterschieden. In der Milz (B) wurde zwischen unreifen transitionellen1 (TN1) B-Zellen (CD19<sup>+</sup>, CD21<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup>) und reifen follikulären (FO) (CD19<sup>+</sup>, CD21<sup>low</sup>, CD23<sup>high</sup>) sowie Marginalzonen (MZ) B-Zellen (CD19<sup>+</sup>, CD21<sup>high</sup>, CD23<sup>low</sup>) unterschieden. Eine zweite Möglichkeit zur Unterscheidung von unreifen und reifen B-Zellen in der Milz ist die Färbung von IgM und IgD, wobei unreife B-Zellen zusätzlich zu IgM nur eine schwache IgD Expression zeigen und reife B-Zellen IgD stark exprimieren (Abb.3.1B).



Abb.3.1: Analyse der B-Zell-Kompartimente in Knochenmark (A) und Milz (B) mittels FACS. A: 2x10<sup>5</sup> Knochenmarkszellen wurden dreifach mit B220, IgM und CD43 spezifischen Antikörpern oder mit B220, IgM und IgD spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Einstellung auf B220<sup>+</sup> Zellen wurden die prozentualen Anteile von pro B-Zellen (CD43<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup>), pre B-Zellen (CD43<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>), unreifen (IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>) oder reifen B-Zellen (IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>) ermittelt. B: 2x10<sup>5</sup> Milzzellen wurden dreifach mit CD19, CD21 und CD23 spezifischen Antikörpern oder mit CD19, IgM und IgD spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Einstellung auf CD19<sup>+</sup> Zellen wurden entweder die prozentualen Anteile von unreifen TN1 (CD21<sup>-</sup>/CD23<sup>-</sup>) und reifen FO (CD21<sup>+</sup>/CD23<sup>high</sup>) sowie MZ B–Zellen (CD21<sup>high</sup>/CD23<sup>low</sup>) oder von unreifen (IgM<sup>high</sup>/IgD<sup>low</sup>) und reifen (IgM<sup>low</sup>/IgD<sup>high</sup>) B-Zellen ermittelt.

Mittels der in Abbildung 3.1 gezeigten Strategie zur Unterscheidung der verschiedenen B-Zellpopulationen im Knochenmark und in der Milz wurde untersucht, ob CD83 während der B-Zell-Entwicklung exprimiert wird. Hierzu wurde eine vierfach Färbung durchgeführt, wobei drei Färbungen für die Definition der B-Zellsubpopulationen und die vierte für die CD83- oder Kontroll-Färbung verwendet wurden. Abbildung 3.2 zeigt, dass CD83 auf pro und pre B-Zellen nicht exprimiert wurde. Ab dem Stadium der unreifen B-Zelle erschien CD83 zu geringem Ausmaße auf der Oberfläche. Die Intensität der CD83 Expression zwischen unreifer und reifer B-Zelle, sowie zwischen FO und MZ B-Zelle unterschied sich nicht, wohingegen aktivierte B-Zellen CD83 stark exprimierten (Abb.3.2C). Somit wurde gezeigt, dass B-Zellen CD83 exprimieren, sobald der B-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche erscheint. Die in der Intensität einheitliche Expression von CD83 auf unreifer und reifer SOM MZ B-Zelle demonstriert weiterhin, dass CD83 kein Marker für eine bestimmte B-Zellpopulation ist. Nach diesen Ergebnissen sollte die B-Zell-Entwicklung in Mäusen mit abberanter CD83 Expression untersucht werden.



Abb.3.2: Oberflächenexpression von CD83 auf B-Zellvorläuferzellen während der Entwicklung im Knochenmark (A), auf B-Zellpopulationen in der Milz (B) und auf aktivierten B zellen (C)
A: 1x10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen wurden vierfach mit B220, IgM, CD43 und CD83 spezifischen Antikörpern oder mit B220, IgM, IgD und CD83 spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität von CD83 (schwarze Linie) gegen die Isotyp Kontrollfärbung (graue Fläche) nach Einstellung auf pro B-Zellen (B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup>), pre B-Zellen (B220<sup>+</sup>/CD43<sup>-</sup>/IgM<sup>+</sup>), unreifen B-Zellen (B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>).
B: 1x10<sup>6</sup> Milzzellen wurden vierfach mit CD19, CD21, CD23 und CD83 spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität von CD83 (schwarze Linie) gegen die Isotyp Kontrollfärbung (graue Fläche) analysiert. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität von CD83 spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität von CD83 (schwarze Linie) gegen die Isotyp Kontrollfärbung (graue Fläche) nach Einstellung auf FO

(CD19<sup>+</sup>/CD21<sup>low</sup>/CD23<sup>high</sup>), TN1 (CD19<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup>/CD23<sup>-</sup>) und MZ B-Zellen (CD19<sup>+</sup>/CD21<sup>high</sup>/CD23<sup>low</sup>). **C:** C57BL/6 Mäuse wurden mit 2x10<sup>6</sup> *L.major* s.c. infiziert. Am Tag sieben nach Infektion wurde der drainierende popliethale Lymphknoten entnommen. 2x10<sup>5</sup> Zellen wurden mit B220 und CD83 spezifischen Antikörpern (schwarze Linie) oder Isotypkontrolle (graue Fläche) gefärbt.

# 3.2.2 Analyse der CD83 Expression in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus

Um zu analysieren, ob CD83 einen Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung hat, wurde zunächst die Expression von CD83 in den CD83 transgenen Mäusen (87) sowie den CD83 mutanten Mäusen (99) analysiert. Abbildung 3.3A zeigt, dass CD83 auf naiven Wildtyp B-Zellen zu geringem Ausmaß detektiert wurde, wohingegen CD83mut B-Zellen kein CD83 exprimierten. B-Zellen der CD83 transgenen Mauslinien zeigten eine stark erhöhte CD83 Expression, wobei "Founder 2" doppelt soviel CD83 exprimierte wie "Founder 1" und heterozygote Founder 2 Mäuse eine mittlere CD83 Expression aufwiesen. Da es sich bei den CD83mut Mäusen nicht um "Knockout" Mäuse handelt, sondern um einen Mausstamm, der eine Mutation im Stopcodon des murinen CD83 Gens aufweist, so dass theoretisch ein um 55 Aminosäuren verlängertes Protein exprimiert werden könnte, wurde untersucht, ob intrazelluläres CD83 detektiert werden konnte. Abbildung 3.3B zeigt, dass kein CD83 im CD83 spezifischem Westernblot in Zelllysaten von CD83mut Milzzellen nachweisbar war. Auch nach Aktivierung war kein CD83 in CD83mut Milzzellen detektierbar, wohingegen C57BL/6 Wildtyp Milzzellen mit einem Maximum von drei Stunden nach Aktivierung CD83 vermehrt synthetisierten. Wie in den durchflusszytometrischen Analysen für die Oberflächenexpression gezeigt, exprimierte CD83tg Founder 2 mehr CD83 Gesamtprotein als CD83tg Founder 1.



#### Abb. 3.3: CD83 Expressionsintensität in CD83 transgener und CD83 mutanter Maus.

A: Vergleich der CD83 Oberflächenexpression auf ruhenden B-Zellen von C57BL/6 Wildtyp mit CD83 mutanter Maus und CD83 transgenen (Founder 1, heterozygoter Founder 2 und homozygoter Founder 2) Mäusen.  $2x10^5 ex vivo$  präparierte Milzzellen wurden mit CD19 und CD83 spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Einstellung auf CD19<sup>+</sup> Zellen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der CD83 Expression ermittelt. Jeder Punkt entspricht dem Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

**B:** Vergleich der CD83 Gesamtexpression in ruhenden sowie LPS aktivierten Milzzellen von C57BL/6 Wildtyp mit CD83 mutanter Maus und CD83 transgenen (Founder 1, heterozygoter Founder 2 und homozygoter Founder 2) Mäusen im Westernblot. Je 12µg unbehandeltes oder deglykosyliertes (PNGaseF) Zelllysat *ex vivo* präparierter Milzzellen oder 3h, 5h bzw. 48h mit 10 µg/ml LPS aktivierter Milzzellen wurde mittels Gelelektrophorese auf einem 10-20% igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf PVDF-Membran wurde CD83 mittels polyclonalem Kaninchen anti-CD83 Serum nachgewiesen.

# 3.2.3 Erhöhte CD83 Expression stört die Reifung von FO B-Zellen und reduzierte CD83 Expression die Reifung von MZ B-Zellen

Nach der Charakterisierung der CD83tg und CD83mut Mäuse bezüglich ihrer CD83 Expression und der Analyse der CD83 Expression während der B-Zell-Entwicklung (Abb.3.2) wurden die prozentualen Anteile der B-Zellpopulationen im Knochenmark und in der Milz von CD83 überexprimierender, CD83 defizienter und lösliches CD83Ig exprimierender Maus mit denen des Wildtyps verglichen. Abbildung 3.4A zeigt, dass in allen untersuchten Mäusen die Anzahl an pre B-Zellen vergleichbar war. Beide CD83tg Founder sowie der heterozygote Founder 2 wiesen verminderte Anzahlen unreifer B-Zellen auf. Zusätzlich zeigte CD83tg Founder 2 eine reduzierte Anzahl an pro B-Zellen und reifen rezirkulierenden B-Zellen. CD83mut und CD83Igtg Mäuse zeigten keine Veränderung der B-Zellpopulationen im Knochenmark im Vergleich mit C57BL/6 Wildtyp Tieren.

Die Untersuchungen der B-Zellpopulationen in der Milz zeigten reduzierte Anzahlen an FO B-Zellen und reziprok erhöhte Anzahlen an TN1 B-Zellen in CD83tg Mäusen. Dieser Effekt war in den CD83tg Founder 2 Tieren ausgeprägter als in CD83tg Founder 1. CD83tg Founder 2 heterozygote Mäuse zeigten diesen Defekt in intermediärer Intensität, was auf einen dosisabhängigen Effekt schließen läßt. Auch die Analyse von IgM/IgD exprimierenden Zellen nach der Definition von IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>low</sup> als unreife B-Zellen und IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>high</sup> als reife B-Zellen (Abb.3.1B) zeigte, dass weniger reife und mehr unreife B-Zellen in der Milz CD83tg Mäuse vorlagen. CD83mut Mäuse zeigten keine Veränderten Anzahlen an FO und TN1 B-Zellen, wiesen jedoch eine um 50% reduzierte Anzahl an MZ B-Zellen auf. Die Anzahl an MZ B-Zellen in CD83tg Founder 1 und im heterozygoten Founder 2 war leicht erhöht. Die B-Zellpopulationen in der Milz CD83Ig transgener Maus waren nicht verändert.



Abb.3.4: Einfluss der CD83 Expressionsintensitäts auf die B-Zellreifung im Knochenmark und in der Milz. Die B-Zell-Kompartimente im Knochenmark (A) und in der Milz (B) von CD83 transgenen (Founder 1, heterozygoter Founder 2 und homozygoter Founder 2), CD83Ig transgener, CD83 mutanter und C57BL/6-Wildtyp Mäusen wurde mittels FACS Färbung von  $2x10^5$  Zellen, wie in Abbildung 3.1 beschrieben, analysiert. Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

## 3.2.4 Erhöhte CD83 Expression führt zu einer verminderten Anzahl B1aund B2-Zellen im Peritoneum

Nach der Analyse der prozentualen Anzahlen der B-Zellvorläuferzellen im Knochenmark und der FO, d.h. B2 Zellen, und MZ B-Zellen in der Milz CD83 überexprimierender Mäuse und defizienter Maus wurde der Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von B1 Zellen untersucht. Abbildung 3.5 zeigt die Strategie zur Unterscheidung von B1a (IgM<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>), B1b (IgM<sup>+</sup>/CD5<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>), und B2 (IgM<sup>+</sup>/CD5<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup>) Zellen im Peritoneum.



Abb.3.5: Analyse der B-Zell-Kompartimente im Peritoneum mittels FACS. 2x10<sup>5</sup> Zellen wurden dreifach mit IgM, CD11b und CD5 spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Einstellung auf IgM<sup>+</sup> Zellen wurden die prozentualen Anteile von B2-Zellen (CD11b<sup>-</sup>/CD5<sup>-</sup>), B1a-Zellen (CD11b<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>) und B1b-Zellen (CD11b<sup>+</sup>/CD5<sup>-</sup>) ermittelt.

Die Untersuchung peritonealer B-Zellen CD83tg Mäuse (Abb.3.6) ergab einer reduzierte Anzahl B2 sowie B1a Zellen, wobei die Reduktion bei CD83tg Founder 2 - beide Populationen betreffend - stärker ausgeprägt war. CD83tg Founder 1 zeigte zudem eine erhöhte Anzahl an B1b Zellen. CD83 defiziente Mäuse zeigten keine Veränderung in den Anzahlen an B1a oder B1b Zellen, jedoch eine reduzierte Anzahl an B2 Zellen.



Abb.3.6: Einfluss der CD83 Expressionsintensität auf die B-Zellzusammensetzung im Peritoneum. Die B-Zellzusammensetzung im Peritoneum von CD83 transgenen (Founder 1 und Founder 2), CD83 mutanter und C57BL/6-Wildtyp Mäusen wurde mittels FACS Färbung von  $2x10^5$  Zellen, wie in Abbildung 3.20 beschrieben, analysiert. Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

## 3.2.5 Die veränderte B-Zell-Entwicklung CD83tg und CD83mut Mäuse ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass erhöhte Expression von CD83 mit einer Akkumulation von unreifen TN1 und einer reziproken Abnahme von reifen FO B-Zellen einhergeht. CD83 Defizienz führte dagegen zu reduzierter Anzahl an MZ B-Zellen. Um zu unterscheiden, ob die Expression von CD83 auf hämatopoetischen Zellen oder auf somatischen Zellen für die veränderte B-Zellreifung in CD83 transgener und defizienter Maus verantwortlich ist, wurden Knochenmarkschimären generiert. Mit Hilfe von congenen B- und T-Zellmarkern wurde in den generierten Chimären überprüft, zu wie viel Prozent B- und T-Zellen aus Spenderknochenmark regeneriert wurden bzw. aus rezipienten Lymphozyten bestanden. Abbildung 3.7 zeigt exemplarisch, dass 10 Wochen nach Knochenmarkstransfer 100% der B-Lymphozyten in der Milz von Chimären aus transferiertem Knochenmark hervorgegangen waren. Bezüglich der T-Lymphozyten zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt noch 10% der Zellen vom bestrahlten Empfänger stammten.



Abb.3.7: Prozentuale Anteile an T- und B-Lymphozyten von Spender und Rezipient in Knochenmarkschimären

Lethal bestrahlte C57BL/6-IgH<sup>a</sup>-CD90.1 Mäuse wurden mit 2x10<sup>6</sup> C57BL/6-IgH<sup>b</sup>-CD90.2 Knochenmarkszellen rekonstituiert. 10 Wochen nach Transfer wurde der prozentuale Anteil von Rezipient und Spender an den T- und B-Lymphozyten in der Milz bestimmt. 2x10<sup>5</sup> Milzzellen wurden mit CD3, CD90.1 und CD90.2 spezifischen bzw. mit CD19, IgM<sup>a</sup> und IgM<sup>b</sup> spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Einstellung auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde der Anteil an CD90.1<sup>+</sup> und CD90.2<sup>+</sup> Lymphozyten ermittelt bzw. nach Einstellung auf CD19<sup>+</sup> B-Zellen der Anteil an IgM<sup>a+</sup> und IgM<sup>b+</sup> Lymphozyten.

Für die Untersuchung des Einflusses von CD83 auf die B-Zellreifung wurde sowohl Wildtyp Knochenmark in CD83tg oder in CD83mut Mäuse transferiert (C57BL/6 -> CD83tg/CD83mut), CD83tg oder CD83mut Knochenmark in Wildtyp Mäuse (CD83tg/CD83mut -> C57BL/6) und Wildtyp Knochenmark in Wildtyp Mäuse als Kontrolle (C57BL/6 -> C57BL/6). Acht bis zehn Wochen nach Transfer wurden die B- Zellkompartimente der Chimären analysiert. Abbildung 3.8A zeigt, dass CD83tg Mäuse, die mit Wildtyp Knochenmark rekonstituiert wurden, eine zu Kontrollchimären vergleichbare Anzahl an FO und TN1 B-Zellen aufwiesen. C57BL/6 Mäuse, die mit CD83tg Knochenmark rekonstituiert wurden, zeigten dagegen eine reduzierte Anzahl an FO und erhöhte Anzahl TN1 B-Zellen.



## Abb.3.8: Die veränderte B-Zellreifung in der Milz von CD83tg und CD83mut Mäusen ist auf die veränderte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen

8-10 Wochen nach Transfer wurden die B-Zellpopulationen in der Milz von Knochenmarkschimären durchflusszytometrisch nach der in Abbildung 3.1B gezeigten Strategie analysiert. Jeder Punkt entspricht dem Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0.5; \*\*, p<0.05; \*\*, p<0.05).

A: Lethal bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit  $2x10^6$  C57BL/6, CD83tg Founder 1 oder Founder 2 Knochenmarkszellen rekonstituiert bzw. bestrahlte CD83tg Founder 1 Mäuse wurden mit  $2x10^6$  C57BL/6 Knochenmarkszellen rekonstituiert. B: Lethal bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit  $2x10^6$  C57BL/6 oder CD83mut Knochenmarkszellen rekonstituiert bzw. bestrahlte CD83mut Mäuse wurden mit  $2x10^6$  C57BL/6 Knochenmarkszellen rekonstituiert. Die Reduktion an FO B-Zellen und reziproke Steigerung an TN1 B-Zellen war bei den Chimären, die mit Knochenmark des CD83tg Founder 2 rekonstituiert wurden, ausgeprägter. Abbildung 3.8B zeigt, dass CD83mut Mäuse, die mit Wildtyp Knochenmark rekonstituiert wurden, eine normale Anzahl an MZ B-Zellen aufwiesen. Die Anzahl an MZ B-Zellen in C57BL/6 Mäusen, die mit CD83mut Knochenmark rekonstituiert wurden, war dagegen erniedrigt.

Wie in Abbildung 3.4A gezeigt, wiesen CD83 defiziente Mäuse keine veränderte B-Zellreifung im Knochenmark auf, CD83tg Founder 2 zeigte jedoch eine verringerte Anzahl an pro B-Zellen und beide CD83tg Founder zeigten eine erhöhte Anzahl an unreifen B-Zellen.



#### Abb.3.9: B-Zellreifung im Knochenmark von CD83tg Chimären

Lethal bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit  $2x10^6$  C57BL/6, CD83tg Founder 1 oder Founder 2 Knochenmarkszellen rekonstituiert bzw. bestrahlte CD83tg Founder 1 Mäuse wurden mit  $2x10^6$  C57BL/6 Knochenmarkszellen rekonstituiert. 8 Wochen nach Transfer wurden die B-Zellpopulationen im Knochenmark der Knochenmarkschimären durchflusszytometrisch nach der in Abbildung 3.1A gezeigten Strategie analysiert. Jeder Punkt entspricht dem Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

Um zu unterscheiden, ob die Expression von CD83 auf frühen B-Zellvorläuferzellen oder auf Stromazellen des Knochenmarks die B-Zellreifung in CD83tg Mäusen beeinflusst, wurden die B-Zellpopulationen im Knochenmark CD83tg Knochenmarkschimären analysiert. Abbildung 3.9 stellt dar, dass alle untersuchten B-Zellfraktionen in CD83tg Mäusen, die mit C57BL/6 Knochenmark rekonstituiert wurden, normale Anzahlen zeigten. C57BL/6 Mäuse, die mit CD83tg Founder 2 Knochenmark rekonstituiert worden waren, wiesen die gleiche Reduktion an pro B-Zellen auf, wie CD83tg Founder 2 Mäuse (Abb.3.4A). Auch die prozentualen Anteile an unreifen und reifen B-Zellen unterschieden sich in C57BL/6 Mäusen, die mit CD83tg Knochenmark rekonstituiert worden waren, im Vergleich mit Kontrollchimären. Der Transfer von CD83tg Founder 1 Knochenmark in C57BL/6 Mäuse führte zu einer erhöhten Anzahl an reifen und reziprok erniedrigten Anzahl an unreifen B-Zellen, dagegen führte der Transfer von CD83tg Founder 2 Knochenmark zu einer reduzierten Anzahl reifer B-Zellen.



Abb.3.10: B-Zellzusammensetzung im Peritoneum von CD83tg Knochenmarkschimären Lethal bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit 2x10<sup>6</sup> C57BL/6, CD83tg Founder 1 oder Founder 2

Knochenmarkszellen rekonstituiert bzw. bestrahlte CD83tg Founder 1 Mäuse wurden mit  $2x10^6$  C57BL/6 Knochenmarkszellen rekonstituiert. 8 Wochen nach Transfer wurden die B-Zellpopulationen im Peritoneum der Knochenmarkschimären durchflusszytometrisch nach der in Abbildung 3.5 gezeigten Strategie analysiert. Jeder Punkt entspricht dem Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

In den CD83tg Knochenmarkschimären wurde neben der Analyse der B-Zellkompartimente im Knochenmark und in der Milz auch die B-Zellzusammensetzung im Peritoneum analysiert. Abbildung 3.10 zeigt, dass CD83tg Mäuse, die mit C57BL/6 Knochenmark rekonstituiert worden waren, mit Kontrollchimären vergleichbare Anzahlen an B2, B1a und B1b Zellen aufwiesen. Der Transfer von CD83tg Knochenmark in bestrahlte C57BL/6 Mäuse führte jedoch zu einer reduzierten Anzahl B2 und B1a Zellen sowie zu einer erhöhten Anzahl an B1b Zellen.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass vermehrte CD83 Expression zur Akkumulation von unreifen TN1 und reziproken Abnahme an reifen FO B-Zellen in der Milz sowie zur erhöhten Anzahl an B1b und reduzierten Anzahlen B1a und B2 Zellen im Peritoneum führt. CD83 Defizienz interferiert dagegen mit der Entwicklung von MZ B-Zellen. Mittels der Analyse der B-Zellkompartimente in CD83tg und CD83mut Knochenmarkschimären, wurde gezeigt, dass diese beobachtete Veränderung in der B-Zell-Entwicklung von CD83tg und CD83mut Maus dosisabhängig auf die Intensität der CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen ist.

#### 3.2.6 Erhöhte Anzahl TN1 CD83tg B-Zellen in gemischten Chimären

Um zu unterscheiden, ob die erhöhte CD83 Expression auf der B-Zelle selbst oder auf anderen Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie auf dendritischen Zellen, zur gestörten FO B-Zell-Entwicklung führt, wurden gemischte Knochenmarkschimären generiert. Hierzu wurden bestrahlte C57BL/6 Mäuse mit einer Mischung aus Wildtyp und CD83tg Knochenmark rekonstituiert. Die Herkunft der B-Zellen aus CD83tg oder Wildtyp-Knochenmark konnte mit Hilfe congener B-Zell-Marker identifiziert werden (Abb.3.11A). Abbildung 3.11 zeigt, dass zum Zeitpunkt der Analyse der gemischten Knochenmarkschimären jeweils 50% der B-Zellen in der Milz aus Wildtyp hämatopoetischen Zellen und aus CD83tg hämatopoetischen Zellen hervorgegangen waren. Die Differenzierung der B-Zellsuptypen, aus Wildtyp oder aus CD83 transgenem Knochenmark, zeigte eine erhöhte Anzahl an TN1 CD83tg B-Zellen im Vergleich mit den in derselben Maus gereiften Wildtyp B-Zellen. Dieses Ergebnis demonstriert, dass die gestörte FO B-Zellreifung in CD83tg Mäusen auf die erhöhte CD83 Expression auf der sich entwickelnden B-Zelle selbst zurückzuführen ist.



## Abb.3.11: Die gestörte B-Zell-Entwicklung in CD83tg Mäusen ist auf die erhöhte CD83 Expression auf B-Zellen selbst zurückzuführen

A: Bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit  $1,2x10^6$  C57BL/6-IgHa und  $4,8x10^6$  CD83tg-IgHb transgenen Knochenmarkszellen rekonstituiert. **B**,**C**: Die Knochenmarkschimären wurden 21 Wochen nach Transfer auf ihre B-Zellkompositionen in der Milz mittels FACS-Färbung analysiert. B: Die prozentuale Anzahl an C57BL/6-Wildtyp B-Zellen (IgM<sup>a</sup>) und an CD83tg B-Zellen (IgM<sup>b</sup>) wurde nach Färbung von  $2x10^5$  Milzzellen mit IgM<sup>a</sup> und IgM<sup>b</sup> spezifischen Antikörpern ermittelt. C:  $2x10^5$  Milzzellen wurden dreifach mit IgM<sup>a</sup> oder IgM<sup>b</sup> und CD21 und CD23 spezifischen Antikörpern gefärbt. Nach Einstellung auf IgMa<sup>+</sup> bzw. IgMb<sup>+</sup> Zellen wurden die Prozente FO (CD21<sup>low</sup>/CD23<sup>high</sup>), TN1 (CD21<sup>-</sup>/CD23<sup>-</sup>) und MZ (CD21<sup>high</sup>/CD23<sup>low</sup>) B-Zellen ermittelt.

## 3.2.7 Die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen beeinflusst die Homöostase von B-Zellen

Um die Reifung und das Überleben von CD83 transgenen und defizienten B-Zellen in direkter Kompetition mit Wildtyp B-Zellen zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung der peripheren Blutlymphozyten in gemischten CD83tg und gemischten CD83mut Knochenmarkschimären über einen längeren Zeitraum verfolgt. Ab einem Zeitpunkt von vier bzw. fünf Wochen nach Transfer wurde die B-Zellzusammensetzung im peripheren Blut der gemischten Knochenmarkschimären über einen Zeitraum von 4 Monaten analysiert. Abbildung 3.12A zeigt, dass zum Zeitpunkt der ersten Analyse die B-Zellzusammensetzung im peripheren Blut der prozentualen Zusammensetzung der Knochenmarksmischung, von annähernd 50% Wildtyp und 50% CD83tg B-Zellen, entsprach. Über den Zeitraum der Analyse veränderten sich die Verhältnisse der CD83tg zu den Wildtyp B-Zellen: Die Anzahl CD83tg B-Zellen reduzierte sich auf 20% während eine reziproke Zunahme der Wildtyp B-Zellen, auf 80% zu einem Zeitpunkt von 20 Wochen nach Transfer, gemessen wurde. Bei einer initial höheren Gabe von CD83tg Knochenmark, ein Teil Wildtyp zu vier Teilen CD83tg Knochenmarks, zeigte sich erneut, dass vier Wochen nach Transfer die Verteilung von Wildtyp zu CD83tg B-Zellen im peripheren Blut das Verhältnis der Knochenmarktransplantation Wildytp zu CD83tg reflektierte (Abb.3.12B). Trotz dieser initialen Begünstigung von CD83tg B-Zellen reduzierte sich die Anzahl von CD83tg B-Zellen über die Zeit auf annähernd 50%. Auch die Analyse der Zusammensetung der peripheren Blutlymphozyten in gemischten Knochenmarkschimäre des CD83tg Founder 1 zeigte, dass CD83tg B-Zellen vermindert überleben (Abb.3.12C). Die Abnahme CD83tg B-Zellen des Founders 1 erfolgte jedoch langsamer als die der CD83tg Founder 2 B-Zellen. Da CD83tg Founder 2 mehr CD83 exprimiert als Founder 1 (Abb. 3.3) scheint die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen reziprok mit ihrem Überleben zu korrelieren.

Die Analyse CD83tg T-Zellen zeigte, dass der T-Zellpool über den gesamten Zeitraum stabil war. Die Transplantation von Wildtyp/CD83tg Knochenmarksmischungen führte sogar zu einem bevorzugtem Anwachsen von CD83tg T-Zellen, wobei jedoch, wie in Abbildung 3.7 dargestellt, beachtet werden muß, dass die Bestrahlung der Mäuse nur zur unvollständigen Beseitigung der rezipienten T-Zellen führte.

Der direkte Vergleich des Überlebens von CD83 defizienten mit Wildtyp B-Zellen zeigte wie auch in den CD83tg gemischten Chimären, dass zum ersten Zeitpunkt der Analyse die periphere B-Zellkomposition dem Mischungsverhältnis des transplantierten Knochenmarks entsprach (Abb.3.12D). Im Gegensatz zu CD83tg B-Zellen interferierte CD83 Defizienz nicht mit dem Überleben von B-Zellen: Die Anzahl CD83 defizienter B-Zellen erhöhte sich in Kompetition mit Wildtyp B-Zellen innerhalb des analysierten Zeitraums leicht. Die Anzahl CD83 defizienter T-Zellen reduzierte sich dagegen leicht.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass vermehrte CD83 Expression spezifisch und dosisabhängig mit dem peripheren Überleben von B-Zellen interferiert. Dagegen scheinen T-Zellen mit vermehrter CD83 Expression einen Selektionsvorteil gegenüber



Wildtyp-T-Zellen zu haben. CD83 Defizienz führt zu einem leichten Überlebenssvorteil von B-Zellen, interferiert jedoch schwach mit dem Überleben von T-Zellen.

Abb.3.12: Die Expressionsstärke von CD83 beeinflusst die Homöostase von B- und T-Zellen.

A-C: Tödlich bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit  $3x10^{6}$  IgHa-congenen C57BL/6 und mit  $3x10^{6}$  CD83tg Founder 1 oder Founder 2 Knochenmarkszellen oder mit  $1,2x10^{6}$  IgHa-congenen C57BL/6 und  $4,8x10^{6}$ CD83tg Founder 2 Knochenmarkszellen, wie in den Kopfzeilen beschrieben, rekonstituiert. D: Tödlich bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit  $3x10^{6}$  IgHa-congenen C57BL/6 und mit  $3x10^{6}$  CD83mut Knochenmarkszellen rekonstituiert.

Die Verteilung der aus Wildtyp (offenes Quadrat und Kreis) und CD83tg (geschlossenes Quadrat und Kreis) oder CD83mut (geschlossenes Dreieck und Raute) hervorgegangenen B- und T-Zellen im peripheren Blut der Chimären wurde durchflusszytometrisch durch Färbung CD19-IgMa/ oder IgMb- doppelt positiver Zellen bzw. durch Färbung CD3-CD90.1/CD90.2 doppelt positiver Zellen analysiert (N=5). Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

### 3.2.8 Funktionelle Untersuchung CD83tg B-Zellen

In dem vorangehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass die CD83 Expression auf der B-Zelle selbst und dosisabhängig einen Einfluss auf Reifung und Überleben der B-Zelle hat. Im Folgenden soll der Einfluss gesteigerter CD83 Expression auf die Funktion von B-Zellen analysiert werden. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Anaylsen zur Oberflächenexpression verschiedener kostimulatorischer Moleküle auf CD83tg und CD83mut B-Zellen hatten gezeigt, dass die Intensität der CD83 Expression auf B-Zellen positiv mit der Intensität der Expression von CD86 und MHC-II korrelierte (98). Desweiteren wurde gezeigt, dass vermehrte CD83 Expression auf B-Zellen selbst zur reduzierten Immunglobulinfreisetzung in vivo (97) sowie reduzierter Immunglobulinfreisetzung und gesteigerter IL-10 Sekretion in vitro (98) führte. Da diese Analysen in CD83 transgener und defizienter Maus durchgeführt worden sind, d.h. auch alle somatischen Zellen des Organismus in ihrer CD83 Expression verändert sind, ließ sich ein Effekt der CD83 Expression auf somatischen Zellen nicht ausschließen. Hier nun sollte durch die funktionelle Analyse von B-Zellen aus Knochenmarkschimären zwischen dem Einfluss veränderter CD83 Expression auf somatischen und hämatopoetischen Zellen unterschieden werden. Abbildung 3.13 zeigt, dass CD83tg B-Zellen, die aus CD83tg Knochenmarkszellen in C57BL/6 Wildtyp Mäusen gereift sind, vermehrt CD86 und MHC-II exprimierten. B-Zellen aus C57BL/6 Mäusen, die mit CD83 transgenem Knochenmark rekonstituiert wurden, zeigten dagegen keine veränderte CD86 und MHC-II Expression. Die Expression von CD80, CD40 sowie von MHC-I war dagegen in keinen der Chimären, verändert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die dargestellte positive Korrelation von CD83 mit CD86 sowie MHC-II (98) nicht durch CD83 Expression auf somatischen Zellen bedingt ist.



Abb.3.13: CD83, CD86 und MHC-II Expression auf B-Zellen CD83transgener Knochenmarkschimären

B-Zellen von Knochenmarkschimären wurden acht Wochen nach Knochenmarkstransfer durchflusszytometrisch analysiert.  $2x10^5$  Milzzellen wurden zweifach mit CD19 spezifischem und entweder CD83, CD86 oder MHC-II spezifischem Antikörper *ex vivo* oder nach 48 Stunden nach Stimulation mit 10µg/ml LPS gefärbt. Gezeigt ist die mittlerre Fluoreszenzintensität von CD83, CD86 und MHC-II nach Einstellung auf CD19<sup>+</sup> Zellen. Jeder Punkt entspricht dem Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,05).

Hinsichtlich der Stimulierbarkeit CD83 überexprimierender B-Zellen hat unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Immunglobulin Produktion CD83 transgener B-Zellen nach in vitro LPS Stimulation reduziert und die IL-10 Sekretion erhöht ist, während die Proliferation keine Unterschiede, bzw. eine sehr leichte Reduktion, zeigt (98). Um zu unterscheiden, ob der veränderte Phänotyp CD83 transgener B-Zellen auf einen Reifungsdefekt, ausgelöst durch erhöhte CD83 Expression auf somatischem Gewebe oder auf die erhöhte CD83 Expression auf der B-Zelle selbst zurückzuführen ist, wurde die Antwort stimulierter Milzzellen von CD83tg Knochenmarkschimären analysiert. Hinsichtlich der vermehrten CD83 Expression auf der B-Zelle selbst kann jedoch nicht zwischen einem Reifungsdefekt und einem Defekt bei der aktuellen Stimulation unterschieden werden. Abbildung 3.14 zeigt, dass CD83tg Lymphozyten der Milz, die in Wildtypumgebung gereift waren, reduzierte Mengen an Immunglobulinen freisetzten und erhöhte Mengen an IL-10 sezernierten. Wie auch bei CD83tg Mäusen zeigte sich eine zur Wildtypkontrolle vergleichbare Proliferation. Wildtyp Milzzellen, die in CD83tg Umgebung gereift waren, wiesen dagegen keine Veränderung in ihrer Ig und IL-10 Sekretion auf.



Abb.3.14: Reduzierte Ig- und erhöhte IL-10- Antwort CD83tg Milzzellen nach LPS Stimulation  $2x10^5$  Milzzellen von CD83tg Knochenmarkschimären wurden mit  $10\mu g/ml$  LPS stimuliert. Die Menge an gesamt Immunglobulinen im Kulturüberstand wurde nach sieben Tagen Kultur mittels ELISA bestimmt. Die Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-Thymidin Einbau nach 48 Stunden ermittelt. IL-10 im Kulturüberstand wurde nach 48 Stunden mittels ELISA quantifiziert. Jeder Punkt entspricht dem Ergebnis einer einzelnen Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,5; \*\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

Diese Experimente zeigen, dass die vermehrte CD83 Expression auf hämatopoetischen Zellen und nicht auf somatischen Zellen zur veränderten Aktivierbarkeit der B-Zellen aus CD83 transgener Maus führt.

#### 3.2.9 Zusammenfassung Teil I

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass die Expression von CD83 auf reifenden B-Zellen selbst die späte B-Zell-Entwicklung sowie das Überleben von B-Zellen beeinflusst. Vermehrte Expression von CD83 auf B-Zellen interferierte dosisabhängig mit der Reifung von FO B-Zellen, CD83 Defizienz hingegen mit der Entwicklung von MZ B-Zellen.

Auch das Überleben von B-Zellen wurde durch die Intensität der CD83 Expression bestimmt: CD83 überexprimierende B-Zellen zeigten eine ebenfalls dosisabhängige verringerte Überlebensrate und CD83 defiziente B-Zellen eine leicht gesteigerte Überlebensrate in Kompetition mit Wildtyp B-Zellen *in vivo*. Die Homöostase von T-Zellen war durch vermehrte CD83 Expression nicht beeinträchtigt. CD83 defiziente T-Zellen zeigten leicht verringertes Überleben in Kompetition mit Wildtyp T-Zellen *in vivo*.

Gesteigerte CD83 Expression auf hämotopoetischen und nicht somatischen Zellen beeinflusste ebenfalls Phänotyp und Funktion von reifen B-Zellen. Durch den Transfer von CD83tg Knochenmarkszellen in Wildtyp Mäuse wurde gezeigt, dass die positive Korrelation von CD83 mit CD86 und MHC-II auf CD83tg B-Zellen nicht durch gesteigerte CD83 Expression auf somatischen Zellen bedingt war. Desweiteren wurde gezeigt, dass CD83tg B-Zellen, die in Wildtyp Umgebung gereift waren, die gleiche veränderte Stimulierbarkeit wie CD83tg B-Zellen aus CD83tg Mäusen aufwiesen: verminderte Ig Produktion und gesteigerte IL-10 Sekretion.

## 3.3 Teil II: Einfluss eines transgen exprimierten mCD83-Immunglobulin-Fusionsproteins auf die Entwicklung und Aktivierung muriner T-Lymphozyten

## 3.3.1 Expression von löslichem CD83-Immunglobulin-Fusionsprotein in CD83Ig transgener Maus

Um den Einfluss von löslichem CD83 auf die Reifung von T-Zellen zu analysieren, wurde eine transgene Maus generiert (Cramer SO, 2001, BNI), die ein Fusionsprotein, bei dem an die extrazelluläre Domäne des murinen CD83 der Fc Teil von humanem IgG1 fusioniert ist, unter der Kontrolle des MHC-Klasse-II Promotors exprimiert. Als erster Schritt zur Charakterisierung der Maus wurde die Expression des transgenen CD83Ig sowohl auf mRNA als auch auf Protein Ebene analysiert.

Für den Nachweis des CD83Ig-Transkripts mittels RT-PCR wurden verschiedene Organe isoliert. Abbildung 3.15A zeigt die Detektion des CD83Ig Transkripts in Thymus, Lymphknoten, Milz und Niere. Zur Steigerung der Sensitivität wurde das zuvor entstandenen PCR Produkts als Template für eine wiederholte PCR ("Nested") verwendet. Dadurch wurde das CD83Ig Transkript auch in Leber und Muskel detektiert. Um zu zeigen, dass das transgene CD83Ig spezifisch unter der Kontrolle des MHC-Klasse-II Promotors exprimiert wurde, wurden Milzzellen in T-Zell-Rezeptor positive und T-Zell-Rezeptor negative Zellen mittels Durchflusszytometrie im FACS-Aria sortiert. CD83Ig mRNA wurde ausschließlich in der T-Zell-Rezeptor negative Zellpopulation detektiert (Abb.3.15 B). Die T-Zell-Rezeptor positive und somit MHC-Klasse-II negative T–Zell Population exprimierte kein CD83Ig.



#### Abb.3.15: Expression des CD83Ig Transkripts

Die Genexpression des mCD83Ig Transkripts wurde mittels RT-PCR in Gewebeproben (A) und in isolierten  $\alpha\beta$ T-Zellen aus Milzen (B) von CD83Ig transgenen und C57BL/6 Mäusen mittels  $\beta$ -Actin und CD83Ig spezifischen Primern analysiert. Die Expression von CD83Ig konnte mittels nested PCR in allen untersuchten Geweben gezeigt werden (A). T-Zellen transkribieren hingegen CD83Ig aufgrund des inaktiven MHCII Promotors nicht (B).

Zur Analyse des transgenen CD83 auf Proteinebene wurde ein Standard Sandwich ELISA mit den antiCD83 Antikörpern Michel17 (67) und Michel19 angewandt. Da beide Antikörper miteinander um die Bindung an CD83 kompetieren (Daten nicht gezeigt), wird nur dimeres CD83 detektiert. Abbildung 3.16 zeigt die Proteinmenge von dimerem CD83 in Serum und Thymus von CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen. OT-II Mäuse exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der einen Komplex aus I-A<sup>b</sup> und dem Peptid OVA<sub>323-339</sub> erkennt. Die MHC-Klasse-II Restrinktion führt zur Entwicklung von überwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen. CD83 wurde in einer Konzentration von 10-15 ng/ml im Serum und in Thymuslysaten in Konzentrationen von 10-15 ng/mg Gesamtprotein nachgewiesen. In Wildtyp Mäusen wurde kein dimeres CD83 detektiert.



Abb.3.16: CD83Ig Protein Gehalt in Serum und Thymus von CD83Ig transgenen Mäusen Der CD83Ig Protein Gehalt wurde in Serum Proben (A) und Thymus Lysaten (B) von CD83Ig/OT-2 transgenen (tg) und OT-2 (wt) Mäusen mittels CD83 spezifischem ELISA, unter Verwendung der CD83 spezifischen Antikörper Michel17 und Michel19, bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus zehn individuellen Serum Proben sowie aus fünf individuellen Thymusproben.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass das transgene CD83Ig-Transkript spezifisch von MHC-Klasse-II positiven Zellen exprimiert wird. Das CD83Ig-Protein zirkuliert im Serum und lässt sich in Thymuslysaten nachweisen.

### 3.3.2 CD4 positive T-Zellen in CD83Ig transgenen Mäusen entwickeln sich in normaler Anzahl aber mit verändertem Phänotyp

Studien mit CD83 defizienten Mäusen (99, 100) haben gezeigt, dass das Fehlen von CD83 die Entwicklung CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus inhibiert. Abbildung 3.17 zeigt, dass in CD83Ig transgenen Mäusen die Entwicklung CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus sowie die Anzahl CD4 und CD8 positiver T-Zellen in der Milz, trotz der Präsenz von CD83Ig im Thymus (Abb.3.16), nicht verändert war. Auch CD83Ig/OT-II transgene Mäuse, die auf Grund des MHC-Klasse-II restringierten transgenen T-Zell-Rezeptors fast ausschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Reifung bringen, zeigten normale Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Wie ich bereits in meiner Diplomarbeit analysierte, zeigten auch die Anzahlen an CD19<sup>+</sup> und NK1.1<sup>+</sup> Zellen sowie histologische Analysen von Milz und Thymus keine Unterschiede zwischen CD83Ig/OT-II transgener Maus und Wildtyp (Lüthje K., 2004).





Thymus und Milzzellen (1x106) von C57BL/6 und CD83Ig transgenen (A) sowie OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen (B) Mäusen wurden mit CD4 spezifischem und CD8 spezifischem Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Nummern in den Quadranten geben den Prozentsatz positiver Zellen an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für fünf individuelle Experimente.

Nachdem die Präsenz von löslichem CD83Ig keinen Einfluss auf die zelluläre Komposition von Lymphozyten im allgemeinen und vor allem auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen hatte, wurde deren Funktionalität untersucht. Milzzellen von OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen wurden mit OVA<sub>323-339</sub> Peptid, für das der OT-II T-Zell-Rezeptor in Verbindung mit dem MHC-Klasse-II Molekül vom Typ I-A<sup>b</sup> spezifisch ist, stimuliert. Die antigenspezifische T-Zell-Aktivierung wurde mittels Proliferation und Zytokinsekretion gemessen. Da die Immunreaktion der einzelnen Tiere sehr stark variierte, wurden 14 Individuen analysiert. Abbildung 3.18 beschreibt, dass CD83Ig/OT-II transgene Milzzellen

im Vergleich zu OT-II Milzzellen eine leichte aber signifikant reduzierte Proliferation sowie IL-2 Freisetzung und eine stark reduzierte IFN-γ Sekretion aufwiesen.



## Abb.3.18: Proliferation sowie IL-2 und IFN- $\gamma$ Sekretion CD83Ig/OT-II transgener Milzzellen ist herabgesetzt

Milzzellen (2x10<sup>5</sup>) von OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen wurden mit 300 ng/ml OVA<sub>323-339</sub> für 48 Stunden in 96well Platten stimuliert. Die Proliferation wurde über die Aufnahme von <sup>3</sup>H-Thymidine gemessen und die Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert das mittlere Ergebnis einer untersuchten Maus. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aller einzeln untersuchten Mäuse. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*, p<0,05; \*\*\*, p<0,005).

Um zu untersuchen, ob die reduzierte Zytokinfreisetzung auf eine geringere Sekretion jeder einzelnen Zelle oder auf eine geringere Frequenz sezernierender Zellen zurückzuführen ist, wurden ELISPOTS durchgeführt. Dabei wird nicht die Konzentration eines Zytokins im Zellkulturüberstand bestimmt, sondern die Anzahl der Zytokinsezernierenden Zellen gemessen. Abbildung 3.19 stellt dar, dass die verminderte IFN-γ Sekretion durch eine reduzierte Anzahl aktivierter Zellen verursacht war.





Die Frequenz IFN- $\gamma$  sezernierender Milzzellen von OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen wurde mittels ELISPOT analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aller einzeln untersuchten Mäuse. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*\*\*, p<0,005). Um den beschriebenen Defekt der antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung weiter zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle aktivierter T-Zellen in einer Kinetik untersucht. Hierzu wurden durchflusszytometrische Analysen von Milzzellkulturen durchgeführt, die mit dem Peptid OVA<sub>323-339</sub> stimuliert waren. Abbildung 3.20 zeigt, dass die Anzahl CD4<sup>+</sup> positiver T-Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen in stimulierten Milzzellkulturen von CD83Ig/OT-II transgener Maus und OT-II Wildtyp vergleichbar war. Auch die Kinetiken von CD25, CD69 und CD83 sowie die Expansion von T-Zell-Rezeptor positiven Zellen unterschieden sich in beiden Zellkulturen nicht. Trotz dieser gleichen Aktivierung wurden im Zellkulturüberstand von CD83Ig/OT-II transgenen Milzzellen während des gesamten Verlaufs stark reduzierte IFN-γ Mengen im Vergleich zu OT-II Zellen gemessen.



Abb.3.20: CD83Ig/OT-II transgene Milzzellen zeigen keine veränderte Oberflächenexpression des TZR und der Reifungsmarker CD25 und CD69

Mit oben beschriebenen Experimenten wurde dargestellt, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart von löslichem CD83 *in vivo* in normaler Anzahl aber mit verändertem Phänotyp reifen. Nach antigen-spezifischer Stimulation zeigten CD83Ig/OT-II transgene Milzzellen eine verminderte Zytokinfreisetzung sowie Proliferation. Die Analyse verschiedener T-Zell-aktivierungsmarker zeigte keine Unterschiede zwischen CD83Ig transgenen und Wildtyp Milzzellen. Somit liegt die reduzierte Aktivierbarkeit CD83Igtg T-Zellen nicht an zu geringer Oberflächenexpression des TZR, des IL-2 Rezeptors (CD25) oder des TZR-Korezeptors CD4.

Milzzellen (2x10<sup>6</sup>) von OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen wurden mit 500ng/ml OVA<sub>323-339</sub> in 2ml Medium in 24 well Platten kultiviert. Die Oberflächenexpression von  $\alpha\beta$ TCR, CD4, CD25, CD69 und CD83 wurde durchflusszytometrisch zu den angegebenen Zeitpunkten nach Färbung von 5x10<sup>5</sup> Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente. Der IFN- $\gamma$  Gehalt im Überstand von stimulierten Milzzellen ist im Zeitverlauf von 24 bis 96 Stunden mittels ELISA bestimmt worden.

### 3.3.3 Die reduzierte antigen-spezifische Antwort CD83Ig/OT-II transgener Milzzellen ist auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen

In anderen Arbeiten wurde beschrieben, dass die Zugabe von löslichem CD83 oder CD83Ig T-Zell Antworten *in vitro* inhibiert (63, 72, 75). Hier nun sollte getestet werden, ob das lösliche transgen exprimierte CD83Ig für die reduzierte Zytokinfreisetzung nach antigen-Stimulation von CD83Ig/OT-II transgenen Milzzellen verantwortlich war. In Abschnitt 3.3.1 (Abbildung 3.15B) wurde gezeigt, dass ausschließlich MHC-Klasse-II positive Zellen lösliches CD83 exprimieren. Deswegen wurden Milzzellen in T-Zellen, d.h. MHC-Klasse-II negativ, und Antigen-präsentierende Zellen, d.h. MHC-Klasse-II positiv, separiert. Es wurden entweder Wildtyp OT-II T-Zellen mit transgenen APZ, DZ oder B Zellen, oder CD83Ig/OT-II transgene T-Zellen mit Wildtyp OT-II APZ stimuliert. Abbildung 3.21 zeigt, dass CD83Ig/OT-II transgene T-Zellen, die antigen-spezifisch mit Wildtyp-B-Zellen oder DZ, und somit in Abwesenheit von CD83Ig, stimuliert wurden, die selbe Reduktion der IFN-γ Sekretion zeigten wie bei Stimulation gesamter CD83Igtg Milzzellen (Abb.3.18). Obwohl CD83Ig transgene B-Zellen und DZ CD83Ig exprimieren, wiesen sie die gleiche stimulatorische Kapazität auf Wildtyp T-Zellen wie Wildtyp APZs auf.





T Zellen  $(1x10^5)$  wurden mit  $5x10^4$  aus Milzen aufgereinigten B-Zellen oder DZ cokultiviert und mit 300ng/ml OVA<sub>323-339</sub> für 48h stimuliert. Der IFN- $\gamma$  Gehalt im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt.

Diese Stimulationsexpertimente zeigen, dass die reduzierte Zytokinfreisetzung CD83Ig/OT-II transgener T-Zellen nicht durch lösliches CD83Ig während der *in vitro* Stimulation verursacht sein kann.

## 3.3.4 CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Mäuse zeigen normale Proliferation und Zytokinfreisetzung nach Stimulation

Alternativ zur inhibitorischen Wirkung des löslichen CD83Ig während der aktuellen T-Zellaktivierung wäre denkbar, dass die Entwicklung von T-Zellen im Thymus in Gegenwart von CD83Ig zu einem intrinsischen Defekt der CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt. CD83 Defizienz im Thymus blockiert spezifisch die Reifung CD4<sup>+</sup> T-Zellen während die Reifung CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht betroffen ist. Aus diesem Grund sollte nun die Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Mäuse untersucht werden. Dazu wurden CD83Ig transgene Mäuse mit OT-I Mäusen gekreuzt. OT-I Mäuse sind TZR transgene Mäuse, deren TZR einen Komplex aus H2-K<sup>b</sup> und dem Peptid OVA<sub>257-264</sub> erkennt und somit MHC-Klasse-I restringiert ist, was zur Reifung von überwiegend CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt. In diesen zweifach transgenen Mäusen sollte nun die zelluläre Komposition lymphoider Organe und die antigen-spezifische T-Zellantwort untersucht werden.



Abb.3.22: Zelluläre Verteilung von CD8 und CD4 positiven Zellen in der Milz von CD83Ig/OT-I transgener Maus

Milzzellen (1x10<sup>6</sup>) von OT-I und CD83Ig/OT-I transgener Maus wurden mit CD4 und CD8 spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Nummern in den Quadranten geben den Prozentsatz positiver Zellen an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei individuelle Experimente.

Abbildung 3.22 zeigt, dass CD83Ig/OT-I transgene Mäuse, wie auch CD83Ig/OT-II transgenen Mäuse (Abb.3.17), keine Veränderung in ihrer zellulären Komposition der T-Zellen in der Milz und im Thymus (Daten nicht gezeigt) verglichen mit OT-I Wildtyp Mäusen (Abb.3.22) aufwiesen. Auch die antigen-spezifische Antwort von Milzzellen von zehn individuellen CD83Ig/OT-I Mäusen, in Abbildung 3.23 dargestellt, wies keine signifikanten Unterschiede in Proliferation und IFN- $\gamma$  Sekretion im Vergleich zu OT-I Mäusen auf, obwohl die CD83Ig/OT-I transgene Maus CD83Ig in gleicher Menge (Daten nicht gezeigt) wie die CD83Ig/OT-II transgene Maus exprimiert.



**Abb.3.23: CD83Ig/OT-I transgene Milzzellen zeigen vergleichbare Proliferation sowie IFN-γ Sekretion** Milzzellen (2x10<sup>5</sup>) von OT-1 und CD83Ig/OT-1 transgenen Mäusen wurden mit 300ng/ml OVA<sub>257-264</sub> für 48 Stunden in 96well Platten stimuliert. Die Proliferation wurde über die Aufnahme von <sup>3</sup>H-Thymidin gemessen und die Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aller einzeln untersuchten Mäuse. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Präsenz von CD83Ig spezifisch die Funktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen inhibiert, während die Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD83Igtg Maus nicht verändert ist. Desweiteren konnte durch die Stimulationsexperimente mit separierten T-Zellen und APZs gezeigt werden, dass die Gegenwart von löslichem CD83Ig während der aktuellen Stimulation nicht die Ursache der reduzierten IFN-γ Sekretion CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist. CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgner Maus zeigen auch ohne die Gegenwart von CD83Ig reduzierte IFN-γ Produktion. Es wäre denkbar, dass sie diesen Defekt durch Reifung oder Zirkulation in Gegenwart von CD83Ig erworben haben.

# **3.3.5** Funktionelle Untersuchung von CD4<sup>+</sup> Thymozyten CD83Ig transgener Mäuse

Um zu untersuchen, ob der beschriebene Defekt in der antigen-spezifischen Aktivierung  $CD4^+$  T-Zellen CD83Ig transgener Mäuse während der Reifung im Thymus oder während der peripheren Zirkulation in der Präsenz von löslichem CD83Ig entstanden ist, wurde die antigen-spezifische Antwort direkt aus dem Thymus isolierter  $CD4^+$  Thymozyten untersucht. Aus den Thymuszellen wurden  $CD8^+$  Zellen depletiert. Die verbleibenden Zellen bestehen aus CD4 SP Thymozyten und aus CD4/CD8 DN Zellen. CD4/CD8 DP Zellen, die auf Stimulation mit Apoptose reagieren würden, sind wie CD8 SP Zellen depletiert. Abbildung 3.24 zeigt die antigen spezifische Stimulation dieser thymischen T-Zell Kulturen. Wie auch Milzzellen von CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen zeigten CD4<sup>+</sup> Thymozyten, die noch nicht die periphere Zirkulation betreten hatten, eine reduzierte IFN- $\gamma$  Sekretion verglichen zu OT-II Wildtyp Kulturen.



Abb.3.24: CD8 depletierte Thymuszellen zeigen reduzierte IFN-y Sekretion in vitro.

Thymuszellen aus OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen Mäuse wurden aufgereinigt. CD8 positive Thymocyten wurden mittels magnetischer Zell Sortierung mit einer Reinheit >98% depletiert.  $8x10^5$  Zellen wurden mit 1µg/ml OVA<sub>323-339</sub> Peptid in 96 well Kulturplatten für 48 Stunden stimuliert. Der IFN- $\gamma$  Gehalt im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Jedes Quadrat repräsentiert das mittlere Ergebnis aus drei vereinten Thymi. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aller untersuchten Mäuse. Statistische Signifikanz wurde mittels des student's t test ermittelt (\*\*\*, p<0,005).

Um den beschriebenen Defekt der antigen-spezifischen Aktivierung der Thymus-Zell-Kulturen weitergehend zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle aktivierter T-Zellen in einer Kinetik untersucht. Hierzu wurden durchflusszytometrische Analysen mit dem Peptid OVA<sub>323-339</sub> stimulierter Thymus-Zell-Kulturen durchgeführt. Abbildung 3.25 zeigt, dass die Anzahlen CD4<sup>+</sup> Thymozyten über einen Zeitraum von fünf Tagen von CD83Ig/OT-II transgener Maus und OT-II Wildtyp vergleichbar waren. Auch die Kinetiken von CD25, CD69 und CD83 sowie die Expansion von TZR positiven Zellen war in beiden Zellkulturen vergleichbar. Im Zellkulturüberstand wurden während des gesamten Verlaufs reduzierte IFN-γ Mengen gemessen.



Abb.3.25: CD83Ig/OT-II transgene CD8 depletierte Thymuszellen zeigen keine veränderte Oberflächenexpression des T-Zell Rezeptors und der Reifungsmarker CD25 und CD69 CD8 depletierte Thymuszellen ( $8x10^5$ ) von OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen wurden mit 1µg/ml OVA<sub>323-339</sub> in 0,2 ml Medium in 96 well Platten kultiviert. Die Oberflächenexpression von V $\beta$ 5, CD4, CD25, CD69 und CD83 wurde durchflusszytometrisch zu den angegebenen Zeitpunkten nach Färbung von 5x10<sup>5</sup> Zellen analysiert sowie der IFN- $\gamma$  Gehalt im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente.

Um zu untersuchen, ob die herabgesetzte Stimulierbarkeit der CD83Ig/OT-II transgenen Thymus-Zell-Kulturen (Abb.3.24) auf die CD4<sup>+</sup> Thymozyten selbst zurückzuführen ist oder durch APZ verursacht ist, wurde die Zytokinsekretion von CD83Ig/OT-II und OT-II Thymus-Zell-Kulturen nach Stimulation mit Peptid gepulsten C57BL/6 Wildtyp-Milzzellen verglichen. Abbildung 3.26 zeigt, dass CD83Ig/OT-II transgene Thymus-Zell-Kulturen auch nach Antigenpräsentation durch Wildtyp-Zellen weniger IL-2 und IFN- $\gamma$  freisetzten.



## Abb.3.26: Die reduzierte Zytokin Sekretion ist auf die CD4<sup>+</sup> CD83Ig transgenen Thymocyten zurückzuführen

C57BL/6 Milzzellen wurden als Antigen Präsentierende Zellen wie folgt präpariert: Die Zellen wurden mit 2000rad bestrahlt.  $5x10^{6}$  Zellen wurden in 0,5 ml mit 0,1 mg/ml OVA<sub>323-339</sub> Peptid für 2 Stunden bei 37 °C gepulst und im Anschluß 5x gewaschen.  $6x10^{5}$  CD8 depletierte Thymuszellen aus OT-II und CD83Ig/OT-II transgenen Mäusen wurden mit  $1x10^{5}$  C57BL/6 Milzzellen für 48 Stunden cokultiviert. Der Gehalt an IL-2 und IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA bestimmt. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei Experimente.

Zusammenfassend wurde in diesem Abschnitt der Arbeit gezeigt, dass aus dem Thymus isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Maus den für CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz beschriebenen peripheren T-Zelldefekt aufwiesen. Da diese thymischen T-Zellen noch nicht die periphere Zirkulation betreten hatten, wurde indirekt gezeigt, dass CD83Ig transgene CD4<sup>+</sup> T-Zellen den beschriebenen Defekt bereits im Thymus erwarben.

## 3.3.6 CD83Ig transgene Mäuse zeigen erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit Flagellaten

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass CD83Ig transgene Mäuse eine gestörte antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort aufweisen, die durch einen während der Reifung im Thymus entstandenen intrinsischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Defekt verursacht ist. Da diese Daten in vitro unter Benutzung eines TZR transgenen und daher artifiziellen Systems gewonnen wurden, sollte zum Schluß untersucht werden, ob dieser Defekt auch während des Verlaufs einer Infektion in vivo relevant ist. Hierzu wurden zwei Infektionsmodelle mit Flagellaten gewählt. Zum einen sollten CD83Igtg Mäuse mit dem Protozoen Leishmania major infiziert werden. Die protektive Immunität bei einer Infektion mit L.major basiert auf aktivierten T<sub>H</sub>1-Zellen (101, 102). Die Infektion erfolgte subcutan in den Fußballen der Maus. Die sich anschließende Fußballenschwellung wurde als Indikator für die Parasitämie verfolgt. Als zweites Modell wurde eine Infektion mit dem Protozoen T. cruzi gewählt. Die erfolgreiche Immunantwort gegen T.cruzi benötigt alle Komponenten des Immunsystem angeborene Effektoren, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie B-Zellen - (103). Somit wurden zwei verschiedene Infektionsmodelle mit Protozoen gewählt, die sich in so fern unterscheiden, dass in dem einem T<sub>H</sub>1-Antworten Schutz vermitteln und in dem anderen alle Komponenten des Immunsystems benötigt werden.

Mit *L.major* infizierte C57BL/6 Mäuse zeigten eine initialle Schwellung des Fußballens, welche im Verlauf der Infektion wieder zurückging. Balb/c Mäuse, die eine  $T_H2$  gerichtete Immunantwort aufbauen, zeigten eine stetig ansteigende Fußballenschwellung. Die Infektion von Balb/c Mäusen diente in unseren Experimenten zur Kontrolle der Pathogenität des *L.major* Stamms. Abbildung 3.27 zeigt, dass die subkutane Infektion mit  $3x10^6 L.major$  in den Fußballen CD83Ig transgener Mäuse zu einer im Vergleich zum Wildtyp stärkeren Schwellung des Fußballens führte.



Abb.3.27: CD83Ig transgene Mäuse zeigen eine erhöhte Schwellung des Fußballens während einer *Leishmania major* Infektion

Die rechten Fußballen 8 Wochen alter männlicher C57Bl/6 (n = 5) und CD83Ig transgener (n = 5) Mäuse wurden mit  $3x10^6$  *Leishmania major* in 50 µl infiziert. Die Schwellung des Fußballens der infizierten Tiere wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen und ist als Mittelwert dargestellt. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Abbildung 3.28 zeigt, dass die sublethale Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $1x10^4$ *T.cruzi Tulahuen* zu einer sehr geringen Parasitämie führte. Mit der Ausnahme von einer Maus, die am Tag 40 nach Infektion mit 9,7x10<sup>6</sup> Parasiten pro ml Blut starb überlebten alle Mäuse der Wildtyp-Gruppe. CD83Ig transgene Mäuse zeigten dagegen signifikant höhere Parasitämien und geringere Überlebensraten.



Abb. 3.28: CD83Ig transgene Mäuse zeigen eine höhere Sterblichkeit und erhöhte Parasitämie nach einer *Trypanosoma Cruzi* Infektion

8 Wochen alte männliche C57Bl/6 (n = 8) und CD83Ig transgene (n = 9) Mäuse wurden intraperitoneal mit  $1x10^4$ , aus dem Blut von infizierten Balb/c Mäusen gewonnenen, *Trypanosoma cruzi* infiziert. Überlebensrate und Parasitämie der infizierten Tiere wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aufgezeichnet. Die Parasitämie ist als Mittelwert bis zum Zeitpunkt des zu erst gestorbenen Tieres dargestellt. Das Ergebnis ist repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

Sowohl die erhöhte Schwellung des Fußballens im Verlauf einer *L.major* Infektion als auch die erhöhte Parasitämie und Sterblichkeit in einer *T.cruzi* Infektion lassen auf eine reduzierte Immunantwort CD83Ig transgener Maus schließen. Somit wurde mit zwei

verschiedenen Infektionsmodellen mit Flagellaten gezeigt, dass der intrinsische Defekt CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Maus *in vivo* relevant ist.

Der intrinsische Defekt CD4<sup>+</sup> T-Zellen war *in vitro* vor allem durch reduzierte Sekretion von IFN $\gamma$  gekennzeichnet. IFN $\gamma$  ist im Serum *T. cruzi* infizierter Mäuse nicht nachweisbar, da pures oder nur schwach verdünntes Serum den ELISA stört und nur geringe IFN- $\gamma$ Mengen im Serum vorlagen. Da die Menge von Makrophagen oder auch Neutrophilen gebildeter freier Stickoxide ebenfalls auf die Freisetzung von IFN $\gamma$  hinweist wurde die Bestimmung des NO-Gehalts im Serum *T.cruzi* infizierter Mäuse als Ersatz für die IFN $\gamma$ Quantifizierung durchgeführt. Wie in Abbildung 3.29 dargestellt, war die Menge freier Stickoxide im Blut *T. cruzi* infizierter CD83Ig transgener Mäuse reduziert.



# Abb.3.29: NO Bestimmung in *Trypanosoma* cruzi infizierten CD83Ig transgenen Mäusen

8 Wochen alte männliche C57Bl/6 und CD83Ig transgene Mäuse wurden intraperitoneal mit  $1x10^4$ , aus dem Blut von infizierten Balb/c Mäusen gewonnenen, *Trypanosoma cruzi* infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde durch Herzpunktion das Blut der infizierten Tiere gewonnen. Mittels der Griess Reaktion wurde der Gehalt an Nitrat im Serum bestimmt. Der Nitratgehalt ist als Mittelwert von drei bis fünf individuellen Serum Proben zu jedem Zeitpunkt dargestellt. Fehlerbalken zeigen die SEM.

Um auszuschließen, dass die erhöhte Parasitämie und die reduzierte Überlebensrate CD83Ig transgener Maus während einer *T.cruzi* Infektion durch einen humoralen Defekt verursacht war, wurden *T. cruzi* spezifische Antikörper im Blut von infizierten CD83Ig transgenen und C57BL/6 Mäusen bestimmt. Abbildung 3.30 zeigt, dass sich die humoralen Antworten von CD83Ig transgener und C57BL/6 Wildtyp Maus nicht unterschieden.



Abb.3.30: Trypanosoma cruzi spezifische Antikörper in CD83Ig transgener Maus 8 Wochen alte männliche C57Bl/6 und CD83Ig transgene Mäuse wurden intraperitoneal mit  $1x10^4$ , aus dem Blut von infizierten Balb/c Mäusen gewonnenen, Trypanosoma cruzi infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde durch Herzpunktion das Blut der infizierten Tiere gewonnen. Das Serum wurde auf die Präsens T. cruzi spezifischer Antikörper in dreier Werten in 1 zu 100 Verdünnungen mittels ELISA

Fehlerbalken zeigen die SD.

Also ist die erhöhte Sterberate und erhöhte Parasitämie CD83Ig transgener Maus im Verlauf einer *T.cruzi* Infektion höchstwahrscheinlich auf einen Defekt von T-Lymphozyten zurückzuführen. Da auch die Abwehr einer *L. major* Infektion als überwiegend auf  $T_H1$ -Zellen basiernd beschrieben ist und für die protektive Immunität keine B-Zellen benötigt werden (101, 102), konnte mit zwei Infektionsmodellen gezeigt werden, dass der *in vitro* beschriebene Defekt CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Maus *in vivo* relevant ist.

untersucht. Gezeigt ist der Mittelwert von zwei bis sechs individuellen Serum Proben zu jedem Zeitpunkt.

# 3.3.8 Mit rekombinantem CD83Ig rekonstituierte C57BL/6 Mäuse zeigen einen gemischten Phänotyp in einer *T.cruzi* Infektion

Die verminderte Immunantwort während einer *T.cruzi* Infektion könnte sowohl durch CD83Ig im Serum verursacht sein oder die *in vitro* beobachtete entwicklungsbedingte beeinträchtigte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Funktion widerspiegeln. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden *T.cruzi* infizierte C57BL/6 Mäuse mit rekombinantem CD83Ig Protein intraperitoneal rekonstituiert.



#### Abb.3.31: Rekonstitution von C57BL/6 Mäusen mit rekombinantem CD83Ig

Je fünf 8 Wochen alte männliche C57Bl/6, CD83Ig transgene oder C57BL/6 Mäuse, denen intraperitoneal rekombinantes CD83 Immunglobulin Fusionsprotein injiziert wurde, wurden intraperitoneal mit 2 x10<sup>4</sup>, aus dem Blut von infizierten Balb/c Mäusen gewonnenen, *Trypanosoma cruzi* infiziert. Überlebensrate und Parasitämie der infizierten Tiere wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aufgezeichnet. Die Parasitemie ist als Mittelwert bis zum Zeitpunkt des zu erst gestorbenen Tieres dargestellt. Zur Rekonstitution von C57BL/6 Mäusen mit CD83Ig Fusionsprotein, erhielten die Tiere jeden dritten Tag 100µg Fusionsprotein in 200 µl PBS, wobei die erste Injektion einen Tag vor der Infektion verabreicht wurde. Die Serum Konzentration an CD83Ig Protein wurde mittels ELISA überwacht. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Abbildung 3.31 zeigt die Überlebensrate, die Parasitämie und CD83Ig Gehalt im Blut von mit CD83Ig rekonstituierten infizierten C57BL/6 Mäusen. Der Gehalt an CD83Ig im Blut dieser Mäuse lag zu jedem Zeitpunkt während der Infektion zwei- bis zehnfach höher als in CD83Ig transgenen Mäusen. Der Vergleich dieser rekonstituierten Mäuse mit CD83Ig transgenen Mäusen zeigte, dass die Rekonstitution mit CD83Ig zu einem gemischten Phänotyp führte: Die Applikation von CD83Ig führte nicht zur erhöhten Parasitämie und zu dem frühen Versterben an der Infektion, wie es in den CD83Ig transgenen Mäuse beobachtet wurde. Trotzdem hatte die Applikation von CD83Ig einen biologischen Effekt auf den Verlauf der Infektion: Im Verlauf der Infektion verstarben 80% der rekonstituierten Mäuse während 80% der nicht rekonstituierten Wildtypen überlebten.

Diese Experimente zeigen, dass die Suszeptibilität CD83Ig transgener Mäuse gegenüber einer Infektion mit *T.cruzi* in einem intrinsischen Defekt der T-Zellen bedingt war, dass aber auch die Präsenz von großen Mengen CD83Ig während der aktuellen Immunantwort diese negativ beeinflussen kann.

### 3.3.9 Zusammenfassung Teil II

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Präsenz von löslichem CD83Ig im Thymus zur Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in normaler Anzahl aber mit verändertem Phänotyp führte. Dieser ist durch reduzierte IFNγ und IL-2 Sekretion sowie reduzierter Proliferation nach antigen-spezifischer Stimulation *in vitro* charakterisiert. Die Kinetik zur Oberflächenexpression der Reifungsmarker CD69, CD25 und CD83 sowie die Expansion TZR<sup>+</sup> Zellen war unverändert. Desweiteren wurde gezeigt, dass MHC-Klasse-II<sup>+</sup> Zellen CD83Ig transgener Maus spezifisch CD83Ig exprimierten. Es wurde jedoch kein inhibitorischer Effekt des von diesen Zellen freigesetzten CD83Ig auf T-Zellen *in vitro* festgestellt.

Unter Verwendung von zwei Infektionsmodellen, *L.major* und *T.cruzi*, zeigte sich *in vivo* dass CD83Igtg Mäuse erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit Flagellaten aufwiesen. Humorale Defekte wurden ausgeschlossen. Im Serum *T.cruzi* infizierter Mäuse wurde, als Ersatz für die IFNγ Quantifizierung, der NO-Gehalt bestimmt und ebenfalls reduzierte Mengen gemessen. Darüberhinaus zeigte die Rekonstitution von *T.cruzi* infizierten Wildtyp-Mäusen mit rekombinantem CD83Ig, dass die höhere Suszeptibilität der CD83Ig transgenen Maus gegenüber der Infektion nicht durch lösliches CD83Ig während der aktuellen Immunantwort bedingt war, sondern auf den intrinsischen Defekt CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten infolge der Reifung in einem "CD83Ig-haltigem" Thymus zurückzuführen ist.

## 4 Diskussion

## 4.1 Die CD83 Expression reguliert die Entwicklung von B-Lymphozyten

Als zentrale Funktion von CD83 wurde die Selektion von DP Thymozyten zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert (71, 74). In dieser Arbeit wurde erstmals ein Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von B-Zellen beschrieben. Im Gegensatz zur Reifung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, bei welcher die Expression von CD83 auf somatischen Epithel-Zellen des Thymus essentiell ist, wurde hier gezeigt, dass die Expression von CD83 auf der unreifen B-Zelle selbst die weitere Differenzierung zur reifen B-Zelle beeinflusst.

Auf den frühen B-Zellstadien der pro- und pre-B-Zelle wurde keine Expression von CD83 detektiert. In Übereinstimmung mit Prazma et al. (104) exprimierten B-Zellen CD83 ab dem Stadium der unreifen B-Zelle, d.h. zu dem Zeitpunkt, an welchem zum ersten Mal der vollständig rearrangierte B-Zell-Rezeptor exprimiert wird (9). In der Milz wurden vergleichbare Intensitäten an CD83 Oberflächenexpression auf unreifen TN1, reifen FO und MZ B-Zellen detektiert, wohingegen *in vivo* (Abb.3.2) und *in vitro* (Abb.3.13) aktivierte B-Zellen stark gesteigerte CD83 Expression zeigten (97, 98). Die konstitutive und in ihrer Intensität vergleichbare Expression von CD83 auf unreifen und reifen naiven B-Zellen demonstriert, dass CD83 kein Marker für eine bestimmte B-Zellsubpopulation ist.

Die vermehrte Expression von CD83 in CD83 transgenen Mauslinien führte zu einer reduzierten Entwicklung von reifen FO B-Zellen und zu einer reziproken Akkumulation an unreifen TN1 B-Zellen in der Milz (Abb.3.4). Die Verwendung von zwei verschiedenen, unabhängig generierten CD83tg Linien zeigte eine deutliche Korrelation zwischen der Intensität der CD83 Expression (Abb.3.3) und dem B-Zell-Reifungsdefekt: Je mehr CD83 auf der B-Zelle exprimiert wird, desto mehr TN1 B-Zellen akkumulieren. Die Analyse von Knochenmarkschimären zeigte, dass diese partielle Blockade in der Entwicklung von FO B-Zellen nicht auf die vermehrte Expression von CD83 auf somatischen Zellen zurückzuführen war (Abb.3.8). Die Anwendung der Methode gemischter Knochenmarkschimären ermöglichte darüber hinaus den Vergleich der Reifung von CD83tg und Wildtyp-B-Zellen in ein und derselben Maus. Da nur B-Zellen CD83tg Ursprungs erhöhte Anzahl an TN1 B-Zellen aufwiesen (Abb.3.11), ist die beeinträchtigte B-Zell-Reifung nicht auf vermehrte Expression von CD83 auf akzessorischen Zellen hämatopoetischen Ursprungs zurückzuführen.

Die Analysen der CD83mut Maus und entsprechenden Knochenmarkschimären zeigte dagegen, dass fehlende CD83 Expression auf B-Zellen selbst zur reduzierten Entwicklung von MZ B-Zellen führte (Abb.3.4). Zusammenfassend zeigt Abbildung 4.1 die durch Modulation der CD83 Expression veränderte späte B-Zell-Differenzierung in der Milz.


Abb.4.1: CD83 Expression auf unreifen B-Zellen beeinflusst die Entwicklung zu reifen B-Zellen A: Die Reifung von Wildtyp-Knochenmark in Wildtyp-Ungebung führt zur Entwicklung von normalen Anzahlen an Fo und MZ B-Zellen in der Milz. B: Die Reifung von CD83tg Knochenmark in Wildtyp-Umgebung führt zur verminderten Anzahl FO B-Zellen und reziprok gesteigerten Anzahl TN1 B-Zellen, Wildtyp-Knochenmark in CD83tg Umgebung führt zur normalen B-Zell-Entwicklung. C: Die Reifung von CD83mut Knochenmark in Wildtyp-Umgebung führt zur verminderten Anzahl an MZ B-Zellen, Wildtyp-Knochenmark in CD83mut Umgebung führt zur normalen B-Zell-Entwicklung.

In CD83mut und CD83tg Mäusen zeigten die Analysen der B-Zellpopulationen im Knochenmark, d.h. der Entwicklungsstufen der frühen B-Zell-Reifung, keine auffälligen Veränderungen (17). Nur die höchste Expression von CD83 im CD83tg Founder 2 führte zu einer reduzierten Anzahl an pro B-Zellen, wohingegen die Anzahl der B-Zell-subpopulation des darauf folgenden Entwicklungsschritt, die pre B-Zellen, nicht verändert war. Die Anzahl unreifer B-Zellen war im Knochenmark der CD83tg Mäuse erhöht und die Anzahl reifer rezirkulierender B-Zellen erniedrigt. Diese Veränderung spiegelt wahrscheinlich keinen durch veränderte Expression von CD83 entstandenen Defekt in der frühen B-Zell-Entwicklung wider, sondern reflektiert die veränderte späte B-Zellreifung in der Milz und lässt sich als ein Problem des Fließgleichgewichts auffassen: Je stärker die Blockade in der Reifung der FO B-Zellen in der Milz ist, desto mehr TN1 B-Zellen akkumulieren und desto weniger neu gebildete unreife B-Zellen können aus dem Knochenmark nachrücken. Somit interferiert CD83 spezifisch mit der späten Differenzierung von B-Lymphozyten.

Die Entwicklung von B-Zellen ist abhängig von BZR vermittelten Signalen (17). Nach dem Signalstärke-Modell wird die Richtung, in die sich eine transitionelle B-Zelle in der Milz entwickelt, durch die Stärke des über den BZR empfangenen Signals bestimmt: relativ starke Signale fördern die Entwicklung von FO B-Zellen und schwache Signale die Generierung von MZ B-Zellen (22-24, 105). Mehrere Beispiele für beeinträchtigte B-Zell-

Reifung durch veränderte Expression von B-Zell-Korezeptoren sind beschrieben. Die für den positiven Korezeptor CD21 defiziente Maus zeigt eine reduzierte Anzahl an FO und B1a B-Zellen und eine erhöhte Anzahl an MZ B-Zellen (106, 107). Diese Daten zur veränderten B-Zell-Reifung lassen sich nach dem Signalstärke-Modell als abgeschwächtes über den BZR vermitteltes Signal interpretieren, welches auf den Verlust eines positiven Verstärkers zurückzuführen ist. Die für den negativen Regulator CD22 defiziente Maus (108) zeigt dagegen reduzierte Anzahl an MZ B-Zellen (109), wie es für Mäuse, die durch das Fehlen eines negativen Regulators verstärkte BZR vermittelte Signale erhalten, zu erwarten ist.

Der beobachtete Anstieg an TN1 CD83tg B-Zellen und die reziprok verminderte Anzahl an CD83tg FO B-Zellen könnte in diesem Zusammenhang als Ergebnis gesteigerter negativer Regulation der über den BZR vermittelten Signale interpretiert werden. Hierzu passt, dass die partielle Blockade in der Entwicklung von TN1 zu FO B-Zellen dosisabhängig ist, d.h. dass die Intensität der CD83 Expression mit der Stärke der Akkumulation an TN1 B-Zellen korreliert. Je mehr CD83 exprimiert wird, desto höher scheint die Suszeptibilität für den Empfang von negativen Signalen zu sein, welche die über den BZR erhaltenen positiven Signale abschwächen. Fehlende CD83 Expression interferiert dagegen mit der Generierung von MZ B-Zellen, was als ein durch fehlende negative Regulation verstärktes BZR vermitteltes Signal interpretiert werden kann.

Auch die Entwicklung von B1-Zellen wird durch BZR vermittelte Signale reguliert (27, 31). Nach dem Selektionsmodell zur B1-Zell-Entwicklung fördern besonders starke über den BZR vermittelte Signale die Generierung von B1a-Zellen. Vermehrte CD83 Expression resultierte in einer reduzierten Anzahl an B1a-Zellen und einer reziprok erhöhten Zahl B1b-Zellen (Abb.3.6). Wie auch bei der gestörten B-Zellreifung in der Milz CD83tg Mäuse kann dieses als gesteigerte negative Regulation der über den BZR vermittelten Signale interpretiert werden.

Da B1-Zellen nur unvollständig im adulten Organismus gebildet werden (27, 31), zeigten die Analysen zur peritonealen B-Zell-Zusammensetzung von Knochenmarkschimären stark reduzierte Anzahlen an B1a-Zellen (Abb.3.10) und entsprechend erhöhte Anzahlen an B2-Zellen. Trotz dieser allgemein veränderten prozentualen Zusammensetzung zeigte sich, dass die verminderte Reifung von B1a-Zellen und gesteigerte Anzahl an B1b-Zellen nicht auf die vermehrte Expression von CD83 auf somatischen Zellen zurückzuführen ist: Die Transplantation von Wildtyp-Knochenmark in CD83tg Empfänger führte zu einer zur Wildtyp-Kontrolle vergleichbaren B-Zellreifung, wohingegen Wildtyp-Empfänger, die CD83tg Knochenmark erhalten hatten, dieselbe peritoneale Zusammensetzung wie CD83tg Mäuse zeigten, d.h. eine reduzierte Anzahl an B2 und B1a-Zellen und eine reziprok erhöhte Anzahl an B1b-Zellen. Zusammenfassend wurde somit gezeigt, dass CD83 auf sich entwickelnden B-Zellen mit der späten Differenzierung transitioneller B-Zellen zu B2 als auch zu B1 Zellen interferiert.

## 4.2 Die Expression von löslichem CD83Ig interferiert mit der Reifung CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus

Die Charakterisierung der CD83<sup>-/-</sup> und CD83mut Mäuse hat als zentrale Funktion von CD83 die Thymusreifung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben (71, 74). Vermehrte Expression von CD83 führt dagegen zur Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in leicht erhöhter Anzahl (97).

In dieser Arbeit wurde mit dem Modell einer transgenen Maus, die CD83Ig unter der Kontrolle des MHC-Klasse-II Promotors exprimiert, die Entwicklung von T-Lymphozyten unter dem Einfluss von löslichem CD83 untersucht. Die Präsenz von CD83Ig im Thymus in einer Konzentration von 10-20 ng/mg Gesamtprotein (Abb.3.16) hatte keinen Einfluss auf die Anzahl sich entwickelnder CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Interessanterweise zeigten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche in der Präsenz von löslichem CD83Ig gereift waren, nach antigen-spezifischer Stimulation reduzierte Proliferation und Zytokinfreisetzung *in vitro*. Folgende Befunde zeigen, dass die reduzierte antigen-spezifische Stimulierbarkeit nicht auf lösliches CD83Ig während der aktuellen Stimulation zurückzuführen ist:

1) Die Konzentration von CD83Ig im Überstand von stimulierten Milzzellkulturen lag unterhalb des Detektionslimits des ELISA, das circa 300 pg/ml beträgt (Daten nicht gezeigt). Dagegen waren Konzentrationen von 10-20 µg/ml CD83Ig nötig um T-Zell-Stimulationen *in vitro* zu supprimieren (72).

2) Auch aufgereinigte T-Zellen aus CD83Ig/OT-II doppelt transgenen Mäusen, die, wie mittels RT-PCR analysiert (Abb.3.15), kein CD83Ig exprimieren, zeigten eine reduzierte Immunantwort (Abb.3.21).

3) APZ aus CD83Ig transgenen Mäusen, die theoretisch CD83Ig sezernieren, wiesen eine zu Wildtyp-APZ vergleichbare stimulatorische Kapazität auf.

4) CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die aus CD83Ig transgenen Mäusen gereinigt wurden, zeigten eine normale Immunantwort nach antigen-spezifischer Stimulation (Abb.3.23).

5) Bereits CD4 SP Thymozyten, d.h. reife T-Zellen, welche die Peripherie noch nicht betreten haben, zeigten wie CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz reduzierte Proliferation und IFNγ-Sekretion nach antigen-spezifischer Stimulierung *in vitro*. Deswegen muß der Defekt CD4<sup>+</sup> CD83Ig tg T-Zellen bereits im Thymus erworben worden sein, wahrscheinlich durch partielle Interferenz der CD83-CD83L Interaktion.

In Übereinstimmung mit den in der Veröffentlichung zur CD83<sup>-/-</sup> Maus gezeigten Ergebnissen, zeigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Maus eine normale Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69. Auch nach antigen-spezifischer Stimulation zeigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD83Ig transgener Maus eine normale Kinetik zur vermehrten Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 sowie normale Expansion TZR<sup>+</sup> Zellen, bei gleichzeitig reduzierter IFNγ-Sekretion *in vitro*. Die CD83Ig transgene Maus zeigte eine höhere Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit den pathogenen Protozoen, *T.cruzi* und *L.major* (101-103). Im Verlauf der *T.cruzi* Infektion litten die Mäuse an höheren Parasitämien und höheren Sterbensraten (Abb.3.27). Bei Infektionen mit *L.major* zeigten sich stärkere Schwellungen des Fußballens (Abb.3.28), was als Indikator der Parasitämie gewertet wird. Auch die Messung von erniedrigten Stickoxid-Konzentration im Serum *T.cruzi* infizierter Mäuse, als Ersatz für die IFNγ-Bestimmung, (Abb.3.29) bestätigte den immunsupprimierten Phänotyp der CD83Ig transgenen Maus *in vivo*.

Die höhere Suszeptibilität gegenüber den Infektionen mit den Protozoen war nicht auf eine beeinträchtigte Funktion der CD83Ig transgenen B-Zellen zurückzuführen, da zum einen die humorale, *T. cruzi* spezifische, Immunantwort in CD83Ig transgenen Mäusen und Wildtyp Mäusen vergleichbar war (Abb.3.30) und zum anderen die Immunantwort in *L.major* Infektionen sehr effizient von  $T_H$ 1-Zellantworten und nicht von B-Zell-Antworten vermittelt wird (101, 102).

Um zwischen einer Beeinträchtigung der Immunantwort bedingt durch den intrinsischen Defekt der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, erhalten während der Reifung im Thymus in der Präsenz von CD83Ig, oder durch CD83Ig in der aktuellen Immunantwort zu unterscheiden, wurden Wildtyp-Mäuse mit rekombinantem CD83Ig rekonstituiert und deren Verlauf der Infektion analysiert. Die Gabe von rekombinantem CD83Ig in Wildtyp-Mäuse veränderte nicht die Parasitämie und den initialen Verlauf der Krankheit. Obwohl die intraperitoneale Injektion von rekombinantem CD83Ig im Vergleich zu CD83Ig transgenen Mäusen geführt hat, zeigten CD83Ig transgene Mäuse eine höhere Suszeptibilität gegenüber der *T.cruzi* Infektion, in Form von erhöhter Parasitämie und reduzierter Überlebensrate (Abb.3.31). Somit reflektiert der *in vivo* gezeigte Phänotyp der CD83Ig transgenen Maus die beeinträchtigte Funktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die auf die Differenzierung aus DP Thymozyten in einem "CD83Ig-haltigen" Thymus zurückzuführen ist.

Generell sind zwei Möglichkeiten für den Wirkmechanismus von CD83Ig *in vivo* denkbar: Für den putativen Liganden von CD83 positive Zellpopulationen könnten depletiert werden oder CD83Ig interferiert mit der Signalübertragung über CD83L durch Kompetition. Verschiedene Präparationen von CD83Ig haben verschiedene Zellpopulationen, wie Monozyten, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und dendritische Zellen, aufgezeigt, an die CD83 bindet (71-75). Der Reifungsdefekt CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD83 defizienten Mäusen lässt indirekt auf einen CD83 Liganden auf DP Thymozyten schließen (71, 74). Trotzdem konnte bis heute der putative CD83 Ligand nicht eindeutig identifiziert und charakterisiert werden. Der Vergleich von dimeren und dodecameren humanem CD83Ig-Fusionsprotein hat gezeigt, dass die Avidität sechs verbundener CD83 Moleküle groß genug ist, um stabil an einen putativen Liganden auf humanen T-Zellen zu binden (84).

Die Tatsache, dass die zelluläre Komposition von Thymus und Milz in CD83Ig transgenen Mäusen normal ist, spricht gegen die Depletion einer für den CD83 Liganden positiven Zellpopulation durch das CD83Ig Fusionsprotein. Somit lässt sich vermuten, dass die transgene Expression von CD83Ig *in vivo* den Phänotyp CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch mögliche Interferenz der CD83-CD83L Interaktion und nicht durch Depletion CD83L positiver Zellen erzeugt.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass lösliches CD83Ig spezifisch mit der Reifung von CD4<sup>+</sup> und nicht CD8<sup>+</sup> T-Zellen interferiert. Der beeinträchtigte Phänotyp CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD83Ig transgenen Maus ist auf einen intrinsischen Defekt zurückzuführen, der spezifisch während der Reifung im Thymus, möglicherweise durch partielle Interferenz der Interaktion von CD83 mit seinem putativen Liganden, entstanden ist.



#### Abb.4.1: Lösliches CD83Ig interferiert mit der Reifung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Thymus

**A:** Reifung von Wildtyp-Thymozyten an Wildtyp-TEZ führt zur normalen Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. **B:** Die Reifung von Wildtyp-Thymozyten an CD83 defizienten TEZ führt zur Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in reduzierter Anzahl und mit beeinträchtigter Funktion. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten entwickeln sich in normaler Anzahl mit unbekannter Funktion. **C:** Lösliches CD83Ig führt, möglicherweise auf Grund partieller Interferenz der CD83-CD83L Interaktion, zur Reifung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in normaler Anzahl mit beeinträchtigter Funktion. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in normaler Anzahl mit beeinträchtigter Funktion.

## 4.3 CD83 reguliert die periphere Aktivierung von B-Lymphozyten

B-Lymphozyten exprimieren nach Aktivierung CD83 auf der Zelloberfläche in vivo (97) und in vitro (98). Hier ist die vermehrte CD83 Expression für B-Zellen des drainierenden Lymphknotens in einer *L.major* Infektion gezeigt (Abb.3.2). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Kinetik der CD83 Oberflächenexpression auf B-Zellen nach Stimulation von Milzzellen analysiert (98). Diese Analysen haben gezeigt, dass CD83 sehr schnell nach Aktivierung vermehrt exprimiert wird, wobei die höchste Expression fünf bis sechs Stunden nach Aktivierung detektiert wurde. In dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse mittels Western-Blot von LPS stimulierten Milzzellen reproduziert: auch hier zeigte sich wenige Stunden nach Aktivierung die stärkste Expression von CD83 (Abb.3.3). In Lysaten ruhender Milzzellen wurde kein CD83 detektiert. Diese Daten zeigen zusätzlich, dass CD83 nicht in intrazellulären Vorräten vorlag sondern durch de novo Proteinbiosynthese auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde auch eine Protein-Neu-Synthese von CD83 für reifende humane dendritische Zellen beschrieben (110, 111). Andere Arbeiten haben dagegen gezeigt, dass die vermehrte CD83 Oberflächenexpression auf humanen DZ auch durch die Translokation von Membranen intrazellulärer Vorratsvesikel (112) oder durch die Akkumulation eines rezirkulierenden CD83 Pools vermittelt wird (113).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass

1) CD83 weder ein Marker für einen bestimmten B-Zellvorläufer noch für eine Subpopulation der reifen B-Zellen ist, dass

2) CD83 konstitutiv mit geringer Intensität ab dem Stadium der unreifen B-Zelle auf der Zelloberfläche detektierbar ist und dass

3) CD83 nach Aktivierung durch de novo Proteinbiosynthese exprimiert wird.

Da CD83 spezifisch auf aktivierten B-Zellen exprimiert wird, stellt sich die Frage nach der Funktion von CD83 bei der Aktivierung von B-Zellen. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die transgene CD83 Expression auf B-Zellen selbst, und nicht auf akzessorischen Zellen, zu einer reduzierten humoralen Immunantwort *in vivo* (97) und zu einer signifikant verminderten Sekretion von Immunglobulinen *in vitro* (98) führt. Die transgene Überexpression von CD83 resultiert jedoch nicht in einem generell beeinträchtigten Phänotyp aktivierter B-Zellen *in vitro*, sondern in einem qualitativ veränderten Phänotyp: CD83tg B-Zellen zeigen eine zur reduzierten Ig Sekretion reziprok gesteigerte IL-10 Freisetzung nach LPS-Stimulation *in vitro* (98). Desweiteren wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Expression von CD86 und MHC-Klasse-II auf B-Zellen positiv mit der CD83 Expression korreliert (98). Allerdings scheint die vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers CD86 sowie von MHC-Klasse-II nicht in einem aktivierten Phänotyp zu resultieren, da

1) die Immunglobulin Sekretion aktivierter CD83tg B-Zellen stark herabgesetzt ist,

2) CD83 defiziente B-Zellen, die eine reduzierte CD86 und MHC-Klasse-II Expression aufweisen, einen leicht aktivierten Phänotyp mit etwas erhöhter Immunglobulin Sekretion zeigen und da

3) die Oberflächenexpression anderer Aktivierungsmarker wie CD40 in CD83tg und CD83mut Mäusen nicht verändert ist (98).

Mit Hilfe von CD83tg Knochenmarkschimären wurde zwischen einem durch artifizielle Expression von CD83 auf somatischen Zellen entstandenen Defekt der B-Zellen und einem B-Zell-Defekt durch veränderte CD83 Expression auf der B-Zelle selbst unterschieden. Hierfür wurde die Aktivierbarkeit sowie die Oberflächenexpression von CD86 und MHC-Klasse-II von CD83tg B-Zellen, die in Wildtyp-Umgebung gereift sind, und von Wildtyp-B-Zellen, die in CD83tg Umgebung gereift sind, analysiert.

Die Analyse der Immunantwort von Milzzellen aus CD83tg Knochenmarkschimären *in vitro* (Abb.3.14) hat gezeigt, dass vermehrte Expression von CD83 auf umgebenden Gewebszellen B-Zell-Antworten nicht verändert: B-Zellen, die in CD83tg Umgebung aus Wildtyp-Knochenmark hervorgegangen waren, zeigten normale Immunglobulin Produktion und IL-10 Sekretion sowie zum Wildtyp vergleichbare Oberflächenexpression von CD86 und MHC-Klasse-II. In Wildtyp-Umgebung gereifte B-Zellen CD83tg Ursprungs zeigten dagegen reduzierte Immunglobulin Produktion und erhöhte IL-10 Sekretion sowie erhöhte Oberflächenexpression von CD86 und MHC-Klasse-II.

In Abschnitt 4.1 wurde beschrieben, dass die Expression von CD83 auf der B-Zelle selbst die späte Reifung von B-Lymphozyten beeinflusst. An dieser Stelle wurde gezeigt, dass auch die Aktivierung einer reifen naiven B-Zelle dem Einfluss von CD83 unterliegt: Vermehrte Expression von CD83 auf der B-Zelle selbst resultiert in verändertem B-Zell-Phänotyp, geprägt durch reduzierte Immunglobulin Produktion *in vivo* und *in vitro*, reziprok gesteigerter IL-10 Sekretion *in vitro* sowie vermehrter Expression von CD86 und MHC-Klasse-II (97, 98). Wie auch bei der Analyse der B-Zell-Entwicklung wurde ausgeschlossen, dass die CD83tg Umgebung zur Reifung disfunktionaler B-Zellen führt.

## 4.4 CD83 beeinflusst die Homöostase von B- und T-Lymphozyten

Die Signaltransduktion über den BZR ist für viele Differenzierungschritte einer B-Zelle wie Reifung, Selektion und Aktivierung essentiell (17, 114). Auch für die Erhaltung von reifen naiven B-Zellen in der Peripherie sind über den BZR vermittelte positive Überlebenssignale nötig, welche nach Eintritt in lymphoide Follikel übermittelt werden (115).

In direkter Kompetition mit Wildtyp B-Zellen wurde ein starker Selektionsnachteil CD83 transgener B-Zellen und ein leichter aber signifikanter Selektionssvorteil CD83 defizienter B-Zellen *in vivo* beobachtet (Abb.3.12). Der Selektionsnachteil CD83tg B-Zellen könnte

als Ergebnis gesteigerter negativer Regulation der über den BZR vermittelten Signale interpretiert werden. Beim Vergleich der B-Zell-Entwicklung von CD83tg Founder 1 und Founder 2 zeigte sich, dass die Intensität der CD83 Expression mit der Stärke der Akkumulation der TN1 B-Zellen korrelierte. Auch bezüglich der Homöostase von CD83tg B-Zellen zeigte sich dieser dosisabhängige Effekt: Je mehr CD83 die B-Zellen exprimierten, desto größer war der Selektionsnachteil. Reziprok zum Selektionsnachteil CD83tg B-Zellen kann der Selektionsvorteil von CD83mut B-Zellen als Ergebnis eines durch Fehlen eines negativen Regulators verstärkten BZR vermittelten Signals interpretiert werden.

Da vermehrte CD83 Expression spezifisch die Homöostase von B-Lymphozyten beeinträchtigte, kann ein genereller Defekt aller CD83tg Lymphozyten ausgeschlossen werden. Es zeigte sich sogar, dass die CD83tg T-Zellen vom Zeitpunkt der ersten Analyse an den größten Anteil der T-Lymphozyten repräsentierten, und über den gesamten Zeitraum der Analyse von 26 Wochen stabil blieben.

Zur Etablierung der Generierung von Knochenmarkschimären wurde die Kinetik des Verlusts von B- und T-Lymphozyten rezipienten Ursprungs nach γ-Bestrahlung analysiert. Die Verwendung von Knochenmark mit für B- und T-Zellen kongenen Markern zeigte, dass bereits 4 Wochen nach Bestrahlung die B-Lymphozyten des Empfängers komplett eleminiert waren (Daten nicht gezeigt). T-Lymphozyten stammten dagegen auch zehn Wochen nach Transfer noch zu 10% vom Empfänger (Abb.3.7). Da im adulten Organismus die periphere T-Zell-Population durch Teilung vorhandener T-Zellen und die B-Zell-Population durch primäre B-Zell-Entwicklung im Knochenmark aufrechterhalten wird, übertrifft die generelle Lebensdauer einer T-Zelle die einer B-Zelle (116). Da in den hier gezeigten Versuchen sechs bis zehn Wochen alte und somit junge erwachsene Mäuse verwendet wurden, wird die T-Zell-Population zum Teil durch Regenerierung aus peripheren Blut-T-Lymphozyten und zum Teil durch Neusynthese von T-Zellen im Thymus aufrechterhalten. Daher verschwindet der Anteil an rezipienten T-Zellen langsam aus der Population CD90.2<sup>+</sup> T-Zellen.

Rezipiente und CD83tg T-Lymphozyten teilen sich den kongenen Marker CD90.2, dagegen sind aus Wildtyp-Knochenmark hervorgegangene T-Zellen eindeutig durch CD90.1 definierbar. Die dennoch stabile CD90.2<sup>+</sup> T-Zell-Population lässt sich dadurch erklären, dass CD83tg T-Zellen in Kompetition mit Wildtyp-T-Zellen einen Selektionsvorteil aufweisen. Der Raum, der entsteht, wenn die vom Empfänger stammenden T-Zellen absterben, scheint schneller von neugenerierten CD83tg T-Zellen als von Wildtyp-T-Zellen aufgefüllt zu werden. Die initiale Analyse der peripheren T-Zell-Population in CD3<sup>+</sup>CD83<sup>high</sup> T-Zellen versus CD3<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup> Zellen zeigte einen Anstieg CD83<sup>+</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt), die vornehmlich aus CD83tg Knochenmark generierte T-Zellen darstellten. In Übereinstimmung damit, dass CD83tg T-Lymphozyten einen leichten Selektionsvorteil zu haben scheinen, zeigte sich eine leichte aber signifikante prozentuale Abnahme CD83 defizienter T-Lymphozyten. Passend zu diesen Ergebnissen wurde vor kurzem beschrieben, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD83<sup>-/-</sup> Maus eine verkürzte Überlebensspanne in Kompetition mit Wildtyp-T-Zellen *in vivo* zeigten (104).

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass die Intensität der Expression von CD83 auf B-Lymphozyten reziprok mit ihrem peripheren Überleben korreliert (Abb.4.3), wohingegen das Überleben von T-Lymphozyten positiv mit der Expression von CD83 zu korrelieren scheint.



# Abb.4.3: Selektionsnachteil CD83 vermehrt exprimierender B-Lymphozyten und leichter Selektionsvorteil CD83 defizienter B-Lymphozyten *in vivo*

A: CD83tg B-Lymphozyten zeigen in direkter Kompetition mit Wildtyp-B-Lymphozyten reduziertes Überleben im peripheren Blut. B: CD83 defiziente B-Lymphozyten zeigen einen leichten Selektionsvorteil gegenüber Wildtyp-B-Lymphozyten in direkter Kompetition.

### 4.5 CD83 ist ein negativer Regulator von B-Zellen

Die Signalübertragung über den BZR ist für die Entwicklung, die Aktivierung und das Überleben von B-Zellen essentiell (17, 114, 115). In dieser Arbeit wurden mehrere Zusammenhänge zwischen CD83 und dem BZR beschrieben. 1) Die Oberflächenexpression von CD83 setzt während der B-Zell-Entwicklung parallel zur Expression des BZR ein. CD83 beeinflusst 2) die Entwicklung von B-Zellen, 3) die Aktivierung von B-Zellen und 4) deren Homöostase. Alle gezeigten Ergebnisse zum Einfluss von CD83 auf Entwicklung, Aktivierung und Homöostase von B-Zellen lassen auf eine negativ regulierende Wirkung von CD83 auf BZR vermittelte Signale schließen.

Abhängig vom Entwicklungsstatus einer B-Zelle und der Art des Antigens resultiert das über den BZR vermittelte Signal in einer großen Bandbreite an Reaktionen, die zu Aktivierung, Anergie oder Apoptose führen können. Im Knochenmark werden B-Zellen negativ selektioniert, in der Peripherie vermitteln sie humorale Immunität sowie B-Zell-Toleranz und B-Zell-Gedächtnis. Um dieses breite Spektrum an Reaktionsmöglichkeiten bewirken zu können, stellt der BZR kein simples an/aus-System dar. Mehrere positiv oder neagtiv wirkende Korezeptoren modulieren das über den BZR vermittelte Signal, um so eine Feinabstimmung zu gewährleisten.

Positiv regulierend wirken vor allem die Moleküle CD19 und CD21 des BZR-Korezeptor-Komplexes (117-119). Neben diesen das BZR Signal verstärkenden Molekülen sind mehrere negative Ko-Rezeptoren des BZR wie CD22, CD72, FcγRIIB und PIRB beschrieben (120-122). Diese besitzen eine oder mehrere ITIM-Signalsequenzen, über welche die Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 oder die Lipidphosphatase SHIP rekrutiert werden (123-125). Durch Dephosphorilierung von aktivierenden Molekülen wird nun die über den BZR vermittelte Signalstärke herabgesetzt, um eine übermäßige Stimulation der B-Zelle zu verhindern.

Unter der Annahme, dass CD83 ein negativer B-Zell-Regulator ist, würde eine vermehrte Expression von CD83 zu abgeschwächter BZR vermittelter Signalstärke führen. Das Fehlen von CD83 in der CD83mut Maus würde dagegen in einem verstärkten BZR vermitteltem Signal resultieren.

Alle Befunde zur veränderten B-Zell-Entwicklung, B-Zell-Aktivierung und B-Zell-Homöostase in CD83tg und CD83mut Maus sprechen für eine Funktion von CD83 als negativer B-Zell-Regulator:

1) Die vermehrte Expression von CD83 auf B-Zellen führte zur reduzierten Anzahl an FO und B1a B-Zellen. Nach dem Signalstärkemodell der B-Zell-Entwicklung fördern Signale von mittlerer Intensität die Generierung von FO-B-Zellen und sehr starke Signale die Entwicklung von B1a-Zellen (22-24). Somit lassen sich reduzierte Anzahlen an FO und B1a B-Zellen als Folge abgeschwächte BZR vermittelter Signale interpretieren. Hierzu passt die Annahme, dass CD83 negative Signale vermittelt. Im Gegensatz zur reduzierten Entwicklung der FO und B1a B-Zellen in der CD83tg Maus interferierte die fehlende CD83 Expression mit der Generierung von MZ B-Zellen. Reduzierte Anzahl an MZ B-Zellen lässt sich nach dem B-Zell-Entwicklungsmodell als Folge einer verstärkten BZR vermittelten Signaltransduktion interpretieren, da schwache Signale die MZ B-Zell-Reifung fördern. Somit muss durch das Fehlen von CD83 die Signalstärke verstärkt sein, was wiederum auf eine Funktion von CD83 als negativer Regulator schließen lässt.

2) CD83tg B-Zellen zeigten eine abgeschwächte humorale Immunantwort *in vivo* (97) und reduzierte Ig Sekretion *in vitro* (98). Da eine B-Zelle das primäre Aktivierungssignal über ihren BZR empfängt, lässt sich dieser Phänotyp als abgeschwächtes, durch vermehrte Expression eines negativen Regulators, über den BZR vermitteltes Signal interpretieren. Dementsprechend zeigten CD83mut B-Zellen eine leicht gesteigerte Ig Sekretion *in vitro*, was auf ein verstärktes BZR vermitteltes Signal schließen lässt.

3) Auch das Überleben von B-Zellen und somit deren Homöostase erfordert positive BZR vermittelte Signale. CD83tg B-Zellen zeigten in direkter Kompetition mit Wildtyp-B-Zellen einen Selektionsnachteil, wohingegen CD83mut B-Zellen einen Selektionsvorteil aufwiesen. Dies lässt sich erneut als verstärkt negative Signalübermittlung durch die erhöhte Expressionsstärke eines negativen Regulators beziehungsweise als Verstärkung des BZR vermittelten Signals durch das Fehlen eines negativen Regulators interpretieren.

4) Die Zunahme der freien zytosolischen Kalziumkonzentration ist ein sehr frühes Aktivierungssignal. CD83tg B-Zellen zeigten reduzierte Ca<sup>2+</sup> Freisetzung *in vitro* nach Stimulation des BZR (98). Diese Daten weisen erneut auf ein abgeschwächtes BZR vermitteltes Signal hin.

Gegen die Hypothese von CD83 als Vermittler von negativen Signalen an B-Zellen sprechen folgende Befunde:

1) Die 83<sup>-/-</sup> Maus zeigte nach Thymus-abhängiger Immunisierung keine überschießende Immunglobulin Produktion, was bei fehlender negativer BZR vermittelter Signaltransduktion zu erwarten wäre (71). Die CD83 Defizienz führt jedoch zur Reifung nur weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche zur vollständigen B-Zell-Aktivierung benötigt werden (38). Somit könnte die nicht gesteigerte Ig-Antwort auch auf unvollständige T-Zell-Hilfe zurückzuführen sein.

2) Die recht kurze, 39 Aminosäuren lange, cytosolische Domäne des CD83 Moleküls weist keine Tyrosine und somit keine signalübertragenden ITIM- oder ITAM-Motive auf (58, 59, 64, 65). Ebenfalls wurden bisher keine Serin- oder Threonin-Phosphorylierungen nachgewiesen. Somit ist eine direkte Signaltransduktion über CD83 unwahrscheinlich. CD83 könnte jedoch über die Bindung an andere Moleküle, in *cis* oder in *trans*, Signale übermitteln.

Nicht alle BZR regulierenden Moleküle enthalten zytosolische Signalsequenzen. So agiert der stimulatorische Rezeptor PIRA in Assoziation mit der ITAM tragenden FcRγ-Kette (126, 127). Auch für CD83 wäre denkbar, dass es in Assoziation mit einem noch nicht identifizierten Molekül BZR vermittelte Signale reguliert. Trotz fehlender ITIM-Motive lassen sich starke Gemeinsamkeiten von CD83 zu den negativen Regulatoren CD22 und CD72 aufzeigen. CD22 und CD72 sind zuckerbindende Moleküle. CD72 ist ein TypII Transmembranprotein der c-Typ Lektin Familie (122). CD22 ist wie CD83 ein TypI Transmembranprotein und gehört ebenfalls zur Familie der Siglecs (120). CD22 bindet an

spezifische Kohlenhydrate die oft bei N-verknüpften Kohlenhydraten auftreten, wie  $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäure. Als dominante Bindungspartner von CD22 wurden IgM und CD45 identifiziert, die CD22 *in cis* bindet. Ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wäre auch für CD83 denkbar.

Zusammenfassend wurde durch die funktionellen Analysen zur Entwicklung, Aktivierung und Homöostase von CD83tg und CD83mut B-Zellen in dieser Arbeit eine neue zentrale Funktion von CD83 als negativer Regulator von B-Zellen beschrieben.

### 4.6 Ausblick

Hinsichtlich der Analysen zur Entwicklung, Aktivierung und Homöostase von CD83tg und CD83mut B-Zellen zeigte sich, dass CD83 negative Signale zu übermitteln scheint. Diese Ergebnisse wurden jedoch mit nicht-konditionellen Maussystemen erhalten. Unter einem nicht-konditionellen System versteht man ein statisches System, welches nicht veränderlich ist sondern einer einmal eingefügten permanten Veränderung unterliegt. Sowohl die CD83tg als auch die CD83mut Maus sind nicht-konditionell genetisch veränderte Mäuse, da die CD83 Expressionsstärke in jeder Zelle und während jedes Zeitpunkts der Ontogenie und im adulten Organismus verändert ist. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass die artifiziell gesteigerte CD83 Expression auf B-Zellvorläufern während der B-Zell-Entwicklung zu disfunktionalen B-Zellen führt. Die beeinträchtigte Funktion von CD83tg B-Zellen während ihrer Aktivierung oder Homöostase wäre somit möglicherweise nicht auf die CD83 Expressionstärke während der aktuellen Stimulation zurückzuführen.

Um diese Frage zu beantworten, wäre die Generierung einer konditionellen CD83tg Maus nötig, in welcher das transgene CD83 zu gewünschtem Zeitpunkt gezielt aktiviert oder deaktiviert werden kann.

Ein bedeutender erster Schritt für die Etablierung konditioneller Mausmodelle gelang durch die Verwendung des Cre-lox Rekombinationssystems des Bakteriophagen P1 (128, 129). Dieses System wird zumeist für die Erzeugung konditioneller "knock-out" Mäuse verwendet (130). Desweiteren wurden verschiedene konditionelle transgene Maussysteme entwickelt, bei denen die Expression rekombinanter Proteine exogen und reversibel kontrolliert werden kann. Zu den bekanntesten zählt das *Tetracyclin-regulatorische System*, welches das Tetracyclin-Resistenz-Operon des *E.coli* Tn10 Transposons nutzt (131). Je nachdem ob ein Gen nach Applikation von Tetracylin oder seinem synthetischem Analoga Doxyciclin deaktiviert oder aktiviert wird, unterscheidet man zwischen dem *Tetoff* und dem *Tet-on* System (132, 133). Das *Isopropyl-β-D-thiogalaktosidase* (IPTG) induzierbare System stellt ein weiterss System zur Erzeugung konditioneller transgener Mäuse dar (134).

Mit einem solchen System könnte eine Maus generiert werden, welche CD83 konditionell unter einem B-Zell-spezifischen Promotor exprimiert. Durch gezielte Aktivierung des Transgens in adulten Mäusen ließe sich so zwischen einer Beeinträchtigung durch vermehrte CD83 Expression während der aktuellen Stimulation und disfunktionellen B-Zellen aufgrund einer veränderten B-Zell-Reifung unterscheiden.

Unklar bleibt auch, welche Signaltransduktionsmechanismen CD83 nutzt. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass BZR vermittelte Signale durch vermehrte oder fehlende CD83 Expression abgeschwächt oder verstärkt werden. Ob eine direkte Verbindung zur Signalkaskade des BZR vorliegt oder ob CD83 über einen anderen Weg signalisiert, wurde hingegen nicht gezeigt. Zur Aufklärung des Mechanismus von CD83 sollte zum einen der putative Ligand von CD83 identifiziert werden und zum anderen untersucht werden, ob CD83 das über den BZR erhaltene Signal moduliert.

Die recht kurze, 39 Aminosäuren lange, zytosolische Domäne des CD83 Moleküls weist keine Tyrosine und somit keine signalübertragenden ITIM- oder ITAM-Motive auf (64, 65). Die Übermittlung von Signalen könnte nach Bindung von CD83 an andere Moleküle stattfinden. Der putative Ligand könnte in *cis* oder in *trans* binden. Im Falle einer *cis*-Bindung könnte der identifizierte Bindungspartner direkt Auskunft über Signaltransduktion und Mechanismus der regulatorischen Funktion von CD83 geben.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung putativer koassoziierter Proteine von CD83 ist die Methode der Immunpräzipitation. In dieser Arbeit nicht gezeigte Experimente zur Präzipitation von CD83 haben ergeben, dass CD83 mit dem in unserer Arbeitsgruppe generierten monoklonalen CD83-spezifischem Antikörper Michel-19 möglich ist. Jedoch war die Präzipitation sehr ineffizient und CD83 konnte nur in deglykosylierter Form präzipitiert werden. Da Wechselwirkungen über Kohlenhydrate nur schwach sind und das in Lösung bringen eines Transmembranproteins sowie die Deglykosylierung ziemlich harsche sowie denaturierende Bedingungen erfordert, war es mit dieser Methode nicht möglich koassoziierter Proteine von CD83 zu identifizieren.

Nach Engagement des BZR assozieren mehrere positive und negative Korezeptoren mit dem BZR (117, 120-122, 127), wodurch eine Vielzahl an intrazellulären Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen rekrutiert werden (127). Eine erste Möglichkeit zur Aufklärung, ob CD83 das über den BZR vermittelte Signal moduliert, wäre die Analyse des Phosphorylierungsmusters aktivierter CD83tg und CD83mut B-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-B-Zellen mittels Phosphotyrosinblots. Veränderungen in der Genexpression von CD83tg und CD83 mut B-Zellen, die über diese ersten Aktivierungssignale hinaus gehen, könnten mit Hilfe von DNA-Mikroarrays untersucht werden (135, 136). Ein DNA-Mikroarray bietet die Möglichkeit die Expressionsprofile von Zellen zu vergleichen. Hierbei bedient man sich einer chemischen Matrix, an welche, auf kleinste Flächen separiert, einzelne Gensequenzen gekoppelt sind. Nach Hybridisierung mit den zu untersuchenden Transkriptomproben, welche mit einem fluoreszierenden Stoff gekoppelt sind, lässt sich das Expressionsprofil detektieren. Bei gleichzeitiger Hybridisierung zweier verschiedener Transkriptomproben mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern lassen sich Expressionsunterschiede auffinden.

## 5 Zusammenfassung

Als zentrale Funktion von CD83 wurde die Selektion von DP Thymozyten zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben. In dieser Arbeit wurde die Rolle von CD83 bei der Entwicklung, der Aktivierung und der Homöostase von murinen B-Lymphozyten analysiert. Zweitens wurde die Reifung von T-Lymphozyten in Gegenwart von löslichem CD83Ig untersucht. Für diese Analysen wurden Mausstämme verwendet, die CD83 transgen exprimierten, CD83 defizient waren oder lösliches CD83Ig sezernierten. Daher konnte sowohl der Einfluss fehlender und vermehrter CD83 Expression als auch die Wirkung von löslichem CD83 auf die Reifung von B- und T-Lymphozyten analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CD83 die späte Reifung von B- und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten reguliert. Damit wurde hier zum ersten Mal ein Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von B-Lymphozyten beschrieben. Die Analyse der B-Zell-Kompartimente in den CD83tg Mäusen und der CD83mut Maus sowie in gemischten Knochenmarkschimären zeigte, dass die Expressionsstärke von CD83 auf sich entwickelnden B-Zellen selbst die späte B-Zell-Reifung reguliert. Vermehrte Expression von CD83 auf B-Zellen resultierte in reduzierter Reifung von FO und B1a-Zellen, wohingegen die CD83 Defizienz mit der Generierung von MZ B-Zellen interferierte. Lösliches CD83Ig hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung von B-Lymphozyten.

Im Gegensatz zur späten Reifung von B-Zellen ist für die Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten die Expression von CD83 nicht auf Thymozyten selbst, sondern auf TEZ wichtig. CD83 Defizienz führte zur Reifung weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die eine verminderte Aktivierbarkeit aufwiesen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass lösliches CD83Ig keinen Einfluss auf die Anzahl sich entwickelnder T-Zellen hatte, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD83Ig transgenen Maus aber mit verändertem Phänotyp reiften. Spezifisch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, und nicht CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wiesen eine reduzierte Proliferation und IFNy Sekretion in vitro auf. Die CD83Ig transgene Maus zeigte in zwei Infektionsmodellen eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber den pathogenen Protozoen T.cruzi und L.major. Die Rekonstitution von T.cruzi infizierten Wildtyp-Mäusen mit rekombinantem CD83Ig führte jedoch nicht zur Entwicklung hoher Parasitämien und frühzeitigem Sterbens, wie es in den CD83Ig transgenen Mäuse beobachtet wurde. Somit reflektiert der in vivo gezeigte immunsupprimierte Phänotyp der CD83Ig transgenen Maus vornehmlich die beeinträchtigte Funktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge der Differenzierung aus DP Thymozyten in einem "CD83Ig-haltigem" Thymus. Als möglicher Wirkmechanismus wäre partielle Interferenz der CD83-CD83L Interaktion während der Reifung im Thymus denkbar.

Da die Entwicklung CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch CD83Ig nicht beeinflusst war und da sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus DP Thymozyten hervorgehen, wurde so gezeigt, dass CD83 spezifisch mit der späten Reifung CD4<sup>+</sup> T-Zellen interferiert. Also besteht die große Gemeinsamkeit bezüglich des Einflusses, den CD83 auf die Reifung von T- und B-Lymphozyten ausübt, darin, dass CD83 spezifisch mit der späten Differenzierung von Lymphozyten interferiert. Ein großer Unterschied besteht dagegen darin, dass die

Expression von CD83 auf somatischen TEZ für die Differenzierung zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigt wird und dass die Differenzierung einer unreifen zur reifen B-Zelle durch die Expression von CD83 auf dieser selbst beeinflusst wird.

Zusätzlich zeigte sich, dass CD83 auch Aktivierung und Homöostase von B-Zellen reguliert. CD83tg B-Zellen wiesen eine verminderte Immunglobulin Produktion *in vivo* und *in vitro* auf. In direkter Kompetition mit Wildytyp-B-Zellen zeigten CD83tg B-Zellen einen Selektionsnachteil und CD83 defiziente B-Zellen einen Selektionsvorteil *in vivo*. Die Entwicklung und die Aktivierung sowie das periphere Überleben von B-Lymphozyten werden über BZR vermittelte Signale gesteuert. Alle Befunde zur veränderten B-Zell-Entwicklung, B-Zell-Aktivierung und B-Zell-Homöostase in den CD83tg und CD83mut Mäusen wiesen darauf hin, dass CD83 BZR vermittelte Signale negativ zu regulieren scheint.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1. Aderem, A., and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593.
- 2. Lee, W. L., R. E. Harrison, and S. Grinstein. 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect 5:1299*.
- 3. Kirwan, S. E., and D. N. Burshtyn. 2007. Regulation of natural killer cell activity. *Curr Opin Immunol 19:46*.
- 4. Fearon, D. T. 1998. The complement system and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10:355.
- 5. Ramadori, G., and B. Christ. 1999. Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis 19:141.*
- 6. Janeway C.A., T. P., Walport M., Shlomchik M. 2002. *Immunologie*. Spektrum Verlag.
- 7. Cohn, M., N. A. Mitchison, W. E. Paul, A. M. Silverstein, D. W. Talmage, and M. Weigert. 2007. Reflections on the clonal-selection theory. *Nat Rev Immunol* 7:823.
- 8. Fazilleau, N., L. J. McHeyzer-Williams, and M. G. McHeyzer-Williams. 2007. Local development of effector and memory T helper cells. *Curr Opin Immunol* 19:259.
- 9. Matthias, P., and A. G. Rolink. 2005. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol 5:497*.
- 10. Kondo, M., I. L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661.
- 11. Hesslein, D. G., and D. G. Schatz. 2001. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol* 78:169.
- 12. Grawunder, U., T. M. Leu, D. G. Schatz, A. Werner, A. G. Rolink, F. Melchers, and T. H. Winkler. 1995. Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 3:601.
- 13. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell 68:869*.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855.
- 15. Karasuyama, H., A. Kudo, and F. Melchers. 1990. The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* 172:969.
- 16. Brouns, G. S., E. de Vries, C. J. van Noesel, D. Y. Mason, R. A. van Lier, and J. Borst. 1993. The structure of the mu/pseudo light chain complex on human pre-B cells is consistent with a function in signal transduction. *Eur J Immunol 23:1088*.
- 17. Rajewsky, K. 1992. Early and late B-cell development in the mouse. *Curr Opin Immunol 4:171*.
- 18. Kitamura, D., and K. Rajewsky. 1992. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 356:154.
- 19. Edry, E., and D. Melamed. 2004. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol 173:4265*.
- 20. Martin, F., and J. F. Kearney. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2:323.

- 21. Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran. 2005. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol 23:161*.
- 22. Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran. 2004. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol Rev 197:206*.
- 23. Casola, S. 2007. Control of peripheral B-cell development. *Curr Opin Immunol* 19:143.
- 24. Harnett, M. M., E. Katz, and C. A. Ford. 2005. Differential signalling during B-cell maturation. *Immunol Lett 98:33*.
- 25. Martin, F., and J. F. Kearney. 2000. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity 12:39.*
- 26. Martin, F., A. M. Oliver, and J. F. Kearney. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14:617.
- 27. Dorshkind, K., and E. Montecino-Rodriguez. 2007. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol* 7:213.
- 28. Tarakhovsky, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science 269:535*.
- 29. Bikah, G., J. Carey, J. R. Ciallella, A. Tarakhovsky, and S. Bondada. 1996. CD5mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science 274:1906*.
- 30. Baumgarth, N., J. W. Tung, and L. A. Herzenberg. 2005. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol 26:347*.
- 31. Hardy, R. R. 2006. B-1 B cell development. J Immunol 177:2749.
- 32. Konigshofer, Y., and Y. H. Chien. 2006. Gammadelta T cells innate immune lymphocytes? *Curr Opin Immunol 18:527*.
- 33. Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol 150:4244*.
- 34. Ismaili, J., M. Antica, and L. Wu. 1996. CD4 and CD8 expression and T cell antigen receptor gene rearrangement in early intrathymic precursor cells. *Eur J Immunol 26:731*.
- 35. Cammarota, G., A. Scheirle, B. Takacs, D. M. Doran, R. Knorr, W. Bannwarth, J. Guardiola, and F. Sinigaglia. 1992. Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature 356:799*.
- 36. Gao, G. F., J. Tormo, U. C. Gerth, J. R. Wyer, A. J. McMichael, D. I. Stuart, J. I. Bell, E. Y. Jones, and B. K. Jakobsen. 1997. Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* 387:630.
- 37. Mond, J. J., Q. Vos, A. Lees, and C. M. Snapper. 1995. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7:349.
- 38. Lane, P., A. Traunecker, S. Hubele, S. Inui, A. Lanzavecchia, and D. Gray. 1992. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol 22:2573*.
- 39. MacLennan, I. C., K. M. Toellner, A. F. Cunningham, K. Serre, D. M. Sze, E. Zuniga, M. C. Cook, and C. G. Vinuesa. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev 194:8*.

- 40. Jacob, J., and G. Kelsoe. 1992. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 176:679.
- 41. Hasbold, J., A. B. Lyons, M. R. Kehry, and P. D. Hodgkin. 1998. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol 28:1040*.
- 42. Cyster, J. G., S. B. Hartley, and C. C. Goodnow. 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature 371:389*.
- 43. Ekland, E. H., R. Forster, M. Lipp, and J. G. Cyster. 2004. Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells. *J Immunol* 172:4700.
- 44. Mackay, C. R. 1993. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol 5:423.*
- 45. Sagerstrom, C. G., E. M. Kerr, J. P. Allison, and M. M. Davis. 1993. Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8987.
- 46. Ho, W. Y., M. P. Cooke, C. C. Goodnow, and M. M. Davis. 1994. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med 179:1539*.
- 47. Schwartz, R. H. 1993. T cell anergy. Sci Am 269:62.
- 48. Croft, M., and C. Dubey. 1997. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit Rev Immunol 17:89*.
- 49. Hathcock, K. S., G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley, and R. J. Hodes. 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med 180:631*.
- 50. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233.
- 51. Schorle, H., T. Holtschke, T. Hunig, A. Schimpl, and I. Horak. 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352:621.
- 52. Boise, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, T. Lindsten, and C. B. Thompson. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity 3:87*.
- 53. Goldrath, A. W. 2002. Maintaining the status quo: T-cell homeostasis. *Microbes Infect 4:539*.
- 54. Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11:173.
- 55. Link, A., T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J. G. Cyster, and S. A. Luther. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*.
- 56. Zhou, L. J., R. Schwarting, H. M. Smith, and T. F. Tedder. 1992. A novel cellsurface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol 149*:735.
- 57. Kozlow, E. J., G. L. Wilson, C. H. Fox, and J. H. Kehrl. 1993. Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. *Blood* 81:454.

- 58. Twist, C. J., D. R. Beier, C. M. Disteche, S. Edelhoff, and T. F. Tedder. 1998. The mouse Cd83 gene: structure, domain organization, and chromosome localization. *Immunogenetics* 48:383.
- 59. Berchtold, S., P. Muhl-Zurbes, C. Heufler, P. Winklehner, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 1999. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Lett 461:211*.
- 60. Hansell, C., X. W. Zhu, H. Brooks, M. Sheppard, S. Withanage, D. Maskell, and I. McConnell. 2007. Unique Features and Distribution of the Chicken CD83+ Cell. *J Immunol* 179:5117.
- 61. Ohta, Y., E. Landis, T. Boulay, R. B. Phillips, B. Collet, C. J. Secombes, M. F. Flajnik, and J. D. Hansen. 2004. Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *J Immunol 173:4553*.
- 62. Lechmann, M., E. Kremmer, H. Sticht, and A. Steinkasserer. 2002. Overexpression, purification, and biochemical characterization of the extracellular human CD83 domain and generation of monoclonal antibodies. *Protein Expr Purif* 24:445.
- 63. Lechmann, M., N. Kotzor, E. Zinser, A. T. Prechtel, H. Sticht, and A. Steinkasserer. 2005. CD83 is a dimer: Comparative analysis of monomeric and dimeric isoforms. *Biochem Biophys Res Commun 329:132*.
- 64. Isakov, N. 1997. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J Leukoc Biol 61:6*.
- 65. Sinclair, N. R. 2000. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs on activating molecules. *Crit Rev Immunol 20:89*.
- 66. Zhou, L. J., and T. F. Tedder. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154:3821.
- 67. Wolenski, M., S. O. Cramer, S. Ehrlich, C. Steeg, G. Grossschupff, K. Tenner-Racz, P. Racz, B. Fleischer, and A. von Bonin. 2003. Expression of CD83 in the murine immune system. *Med Microbiol Immunol 192:189*.
- 68. Mailliard, R. B., S. M. Alber, H. Shen, S. C. Watkins, J. M. Kirkwood, R. B. Herberman, and P. Kalinski. 2005. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med 202:941*.
- 69. Iking-Konert, C., C. Wagner, B. Denefleh, F. Hug, M. Schneider, K. Andrassy, and G. M. Hansch. 2002. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol 130:501*.
- 70. Yamashiro, S., J. M. Wang, D. Yang, W. H. Gong, H. Kamohara, and T. Yoshimura. 2000. Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. *Blood* 96:3958.
- 71. Fujimoto. 2002. CD83 Expression Influences CD4<sup>+</sup> T Cell Development. *Cell 108:755*.
- 72. Cramer, S. O., C. Trumpfheller, U. Mehlhoop, S. More, B. Fleischer, and A. von Bonin. 2000. Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells. *Int Immunol* 12:1347.
- 73. Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, K. E. Hellstrom, I. Hellstrom, and J. A. Ledbetter. 2001. CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *J Immunol 166:3865*.

- 74. Garcia-Martinez. 2004. A Novel Mutation in CD83 Results in the Development of a Unique Population of CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* 173:2995.
- 75. Lechmann, M., D. J. Krooshoop, D. Dudziak, E. Kremmer, C. Kuhnt, C. G. Figdor, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 2001. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. J Exp Med 194:1813.
- 76. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature 392:245.*
- 77. Zinser. 2004. Prevention and Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomytis by Soluble CD83. *J.Exp.Med.* 200:345.
- Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, A. Dahlin, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom, and J. A. Ledbetter. 2002. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol 168:2599*.
- 79. Xu, J. F., B. J. Huang, H. Yin, P. Xiong, W. Feng, Y. Xu, M. Fang, F. Zheng, C. Y. Wang, and F. L. Gong. 2007. A limited course of soluble CD83 delays acute cellular rejection of MHC-mismatched mouse skin allografts. *Transpl Int 20:266*.
- Pashine, A., U. Gopfert, J. Chen, E. Hoffmann, P. S. Dietrich, and S. L. Peng. 2007. WITHDRAWN: Failed efficacy of soluble human CD83-Ig in allogeneic mixed lymphocyte reactions and experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for a lack of therapeutic potential? *Immunol Lett*.
- 81. Hock, B. D., L. F. Haring, A. Steinkasserer, K. G. Taylor, W. N. Patton, and J. L. McKenzie. 2004. The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res* 28:237.
- 82. Hock, B. D., J. L. O'Donnell, K. Taylor, A. Steinkasserer, J. L. McKenzie, A. G. Rothwell, and K. L. Summers. 2006. Levels of the soluble forms of CD80, CD86, and CD83 are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens* 67:57.
- 83. Senechal, B., A. M. Boruchov, J. L. Reagan, D. N. Hart, and J. W. Young. 2004. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood 103:4207*.
- 84. Hirano, N., M. O. Butler, Z. Xia, S. Ansen, M. S. von Bergwelt-Baildon, D. Neuberg, G. J. Freeman, and L. M. Nadler. 2006. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood* 107:1528.
- Aerts-Toegaert, C., C. Heirman, S. Tuyaerts, J. Corthals, J. L. Aerts, A. Bonehill, K. Thielemans, and K. Breckpot. 2007. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol 37:686*.
- 86. Yang, S., Y. Yang, J. Raycraft, H. Zhang, S. Kanan, Y. Guo, Z. Ronai, I. Hellstrom, and K. E. Hellstrom. 2004. Melanoma cells transfected to express CD83 induce antitumor immunity that can be increased by also engaging CD137. *Proc Natl Acad Sci U S A 101:4990*.
- 87. Wolenski, M., S. O. Cramer, S. Ehrlich, C. Steeg, B. Fleischer, and A. von Bonin. 2003. Enhanced activation of CD83-positive T cells. *Scand J Immunol 58:306*.
- 88. Taylo BA, B. D., Cherry M, Riblet R, Weigert M. 1975. Genes for immunglobulin heavy chain and serum prealbumin protein are linked in mouse. *Nature 21:644*.
- 89. Trowbridge IS, M. C. 1976. Immunological properties of murine thymus-dependent lymphocyte surface glycoproteins. *Eur J Immunol:557*.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17.

- 91. Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34.
- 92. Luthje, K., S. O. Cramer, S. Ehrlich, A. Veit, C. Steeg, B. Fleischer, A. Bonin, and M. Breloer. 2006. Transgenic expression of a CD83-immunoglobulin fusion protein impairs the development of immune-competent CD4-positive T cells. *Eur J Immunol 36:2035*.
- 93. Cramer, S. O. 2001. Funktionelle Charakterisierung des CD83-Moleküls und Identifizierung eines CD83-Liganden. In *Dissertation BNI-Immunologie*.
- 94. Dörner, L. 2003. Characterisation of a CD83-immunoglobulin fusion protein (CD83Ig) transgenic mouse. In *Diplomarbeit BNI-Immunologie*.
- 95. Lüthje, K. 2004. Funktionelle Charakterisierung einer Immunglobulin/T-Zellrezeptor (CD83Ig/TZR) transgenen Maus. In *Diplomarbeit BNI-Immunologie*.
- 96. Wolenski, M. 2003. Murines CD83: Funktionelle Charakterisierung eines Aktivierungsmarkers auf Zellen des Immunsystems. In *Dissertation BNI-Immunologie*.
- 97. Breloer, M., B. Kretschmer, K. Luthje, S. Ehrlich, U. Ritter, T. Bickert, C. Steeg, S. Fillatreau, K. Hoehlig, V. Lampropoulou, and B. Fleischer. 2007. CD83 is a regulator of murine B cell function in vivo. *Eur J Immunol* 37:634.
- 98. Kretschmer, B., K. Luthje, A. H. Guse, S. Ehrlich, F. Koch-Nolte, F. Haag, B. Fleischer, and M. Breloer. 2007. CD83 modulates B Cell function in vitro: increased IL-10 and reduced Ig secretion by CD83Tg B cells. *PLoS ONE 2:e755*.
- 99. Garcia-Martinez, L. F., M. W. Appleby, K. Staehling-Hampton, D. M. Andrews, Y. Chen, M. McEuen, P. Tang, R. L. Rhinehart, S. Proll, B. Paeper, M. E. Brunkow, A. G. Grandea, 3rd, E. D. Howard, D. E. Walker, P. Charmley, M. Jonas, S. Shaw, J. A. Latham, and F. Ramsdell. 2004. A novel mutation in CD83 results in the development of a unique population of CD4+ T cells. *J Immunol 173:2995*.
- 100. Fujimoto, Y., L. Tu, A. S. Miller, C. Bock, M. Fujimoto, C. Doyle, D. A. Steeber, and T. F. Tedder. 2002. CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell 108:755*.
- 101. Stebut, E. U., MC. 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with Leishmania major. *Microbes Infect 6:1102*.
- 102. Alexander, J. B., K. 2005. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters 99:17*.
- 103. Tarleton, R. L. 1991. Regulation of immunity in Trypanosoma cruzi infection. *Exp Parasitol* 73:106.
- 104. Prazma, C. M., N. Yazawa, Y. Fujimoto, M. Fujimoto, and T. F. Tedder. 2007. CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo. *J Immunol 179:4550*.
- Casola, S., K. L. Otipoby, M. Alimzhanov, S. Humme, N. Uyttersprot, J. L. Kutok, M. C. Carroll, and K. Rajewsky. 2004. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5:317.
- 106. Cariappa, A., M. Tang, C. Parng, E. Nebelitskiy, M. Carroll, K. Georgopoulos, and S. Pillai. 2001. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14:603.
- 107. Ahearn, J. M., M. B. Fischer, D. Croix, S. Goerg, M. Ma, J. Xia, X. Zhou, R. G. Howard, T. L. Rothstein, and M. C. Carroll. 1996. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 4:251.

- 108. O'Keefe, T. L., G. T. Williams, S. L. Davies, and M. S. Neuberger. 1996. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* 274:798.
- Samardzic, T., D. Marinkovic, C. P. Danzer, J. Gerlach, L. Nitschke, and T. Wirth. 2002. Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. *Eur J Immunol* 32:561.
- 110. Prechtel, A. T., N. M. Turza, A. A. Theodoridis, and A. Steinkasserer. 2007. CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol* 178:5454.
- 111. Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, D. Bevec, C. Kuhnt, A. Steinkasserer, G. Schuler, and J. Hauber. 2000. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. J Exp Med 191:1581.
- 112. Cao, W., S. H. Lee, and J. Lu. 2005. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J* 385:85.
- Klein, E., S. Koch, B. Borm, J. Neumann, V. Herzog, N. Koch, and T. Bieber. 2005. CD83 localization in a recycling compartment of immature human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 17:477.
- 114. Benson, M. J., L. D. Erickson, M. W. Gleeson, and R. J. Noelle. 2007. Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate. *Curr Opin Immunol 19:275*.
- 115. Lam, K. P., R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell 90:1073*.
- 116. Swain, S., K. Clise-Dwyer, and L. Haynes. 2005. Homeostasis and the ageassociated defect of CD4 T cells. *Semin Immunol 17:370*.
- 117. Tedder, T. F., L. J. Zhou, and P. Engel. 1994. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today* 15:437.
- 118. Tedder, T. F., and C. M. Isaacs. 1989. Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol 143:712*.
- 119. Fearon, D. T., and M. C. Carroll. 2000. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol 18:393*.
- 120. Nitschke, L. 2005. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol 17:290*.
- 121. Nitschke, L., R. Carsetti, B. Ocker, G. Kohler, and M. C. Lamers. 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 7:133.
- 122. Li, D. H., J. W. Tung, I. H. Tarner, A. L. Snow, T. Yukinari, R. Ngernmaneepothong, O. M. Martinez, and J. R. Parnes. 2006. CD72 downmodulates BCR-induced signal transduction and diminishes survival in primary mature B lymphocytes. *J Immunol* 176:5321.
- 123. Doody, G. M., L. B. Justement, C. C. Delibrias, R. J. Matthews, J. Lin, M. L. Thomas, and D. T. Fearon. 1995. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science 269:242*.
- 124. Ono, M., S. Bolland, P. Tempst, and J. V. Ravetch. 1996. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature 383:263*.
- Ono, M., H. Okada, S. Bolland, S. Yanagi, T. Kurosaki, and J. V. Ravetch. 1997. Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell 90:293*.

- 126. Maeda, A., M. Kurosaki, and T. Kurosaki. 1998. Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A is involved in activating mast cells through its association with Fc receptor gamma chain. *J Exp Med 188:991*.
- 127. Kurosaki, T. 2002. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol 2:354.*
- 128. Sauer, B. 2002. Cre/lox: one more step in the taming of the genome. *Endocrine* 19:221.
- 129. Sauer, B., and N. Henderson. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A 85:5166*.
- 130. Le, Y., and B. Sauer. 2001. Conditional gene knockout using Cre recombinase. *Mol Biotechnol 17:269*.
- 131. Gossen, M., and H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547.
- 132. Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmer, H. Lubbert, and H. Bujard. 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10933.
- 133. Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen, and H. Bujard. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766.
- 134. Cronin, C. A., W. Gluba, and H. Scrable. 2001. The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes Dev* 15:1506.
- 135. Pollack, J. R., C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein, and P. O. Brown. 1999. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet 23:41*.
- 136. Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467.