

Einfluss von CD83 auf die Funktion muriner B-Zellen

(*Mus musculus*; Linnaeus, 1758)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von Melanie Uhde

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

Hamburg, Dezember 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. FLEISCHER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER
Tag der Disputation: 01. März 2013

Hamburg, den 07. Februar 2013



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Fleischer
Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin
Immunologie
2. Gutachterin: PD Dr. Minka Breloer
Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin
Helminthenimmunologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 20.12.2012

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Uhde', is positioned above a horizontal line.

Melanie Uhde

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Bernhard Fleischer für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Immunologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, das interessante Arbeitsthema, die kompetente Betreuung der Arbeit und die Begutachtung meiner Doktorarbeit danken.

Frau PD Dr. Minka Breloer möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Anke Osterloh danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, die unermüdliche Geduld und ihr Verständnis, wenn doch mal was schief ging sowie ihre Hilfestellung bei Posterpräsentationen oder Vorträgen.

Außerdem möchte ich meiner gesamten Laborgruppe (oder auch Lerngruppe) für die intensiven, arbeitswütigen, lustigen, im November genervten aber trotzdem immer harmonischen 3 Jahre danken. Ulrike Richardt danke ich für ihre wissenschaftliche und menschliche Fürsorge. Wenn man selber nicht weiß, wo sich etwas befindet, ist es beruhigend, wenigstens jemanden zu kennen, der es weiß. Bei Svenja Kühl bedanke ich mich für ihre Arbeitswut und tatkräftige Unterstützung in den letzten Monaten meiner Doktorandenzeit.

Bei Yvonne Richter bedanke ich mich für ihr unglaubliches Organisationstalent und dafür, dass sie mit Sicherheit den Überblick behielt, wenn ich schon verloren gegangen bin.

Besonderer Dank geht an Irma Haben und Stefanie Papp. Die Melodie-reichen und Koffeinhaltigen Päuschen bleiben unvergessen und haben oftmals geholfen, einen Montag zu überstehen. Die Ghetto-Faust, "Kuchen" und "Strikes" bleiben für immer mit euch assoziiert. "Never mind, I'll find someone like you..."

Auch bei der gesamten Abteilung für Immunologie möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre, die gemeinsamen Ausflüge und den Spaß bei der Arbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	2
1.2	B-Zellen und B-Zellsubpopulationen	2
1.3	Aktivierung und Funktion von B-Zellen	3
1.3.1	Signalgebung durch den BZR	5
1.3.1.1	Korezeptoren des BZR	6
1.3.2	Signalgebung durch den TLR4	7
1.4	CD83	10
1.4.1	Struktur und Expression von CD83	10
1.4.2	Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten	12
1.4.3	Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von B-Lymphozyten	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Laborgeräte	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien (Glas- und Plastikmaterialien)	16
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Kits	17
2.1.3.1	Molekularbiologische Arbeiten	17
2.1.3.2	Biochemische Arbeiten	18
2.1.3.3	Zellbiologische Arbeiten	20
2.1.4	Antikörper	21
2.1.5	Mausstämme	22
2.1.6	Puffer und Stammlösungen	22
2.1.6.1	Allgemeine Lösungen	22
2.1.6.2	Molekularbiologische Arbeiten	22
2.1.6.3	Biochemische Arbeiten	24
2.1.6.4	Zellbiologische Arbeiten	26

2.2	Methoden	27
2.2.1	Molekularbiochemische Methoden	27
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.2	Agarosegelelektrophorese	28
2.2.1.3	Restriktionsverdau von DNS	28
2.2.2	Biochemische Methoden	29
2.2.2.1	Herstellung von Zelllysaten	29
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	29
2.2.2.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.2.2.4	Western Blot	30
2.2.2.5	Immunodetektion von Proteinen mit Chemilumineszenz (ECL)	30
2.2.2.6	Ablösen von Protein-Komplexen von Nitrocellulosemembranen (<i>stripping</i>)	31
2.2.2.7	Southern Blot	31
2.2.2.8	Detektion der DNS mittels einer radioaktiv-markierten Sonde	32
2.2.2.9	ELISA zum Nachweis von IL-10 im Zellkulturüberstand	32
2.2.3	Zellbiologische Methoden	33
2.2.3.1	Grundsätze der Zellkultur	33
2.2.3.2	Präparation muriner Milzzellen	33
2.2.3.3	Präparation muriner peripherer Blutzellen	33
2.2.3.4	Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau	34
2.2.3.5	Anreicherung von B-Zellen aus Milzpräparationen	34
2.2.3.6	Stimulationsexperimente <i>in vitro</i>	34
2.2.3.7	Nachweis der Proliferation durch den Einbau von ³ H-Thymidin	35
2.2.3.8	Nachweis der Proliferation durch Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE	35
2.2.3.9	Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)	36
2.2.3.10	Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen	36
2.2.3.11	Kolokalisationsstudien	37
2.2.4	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Teil 1: Einfluss von CD83 auf die Funktion verschiedener B-Zellsubpopulationen	38
3.1.1	CD83Tg B-Zellen zeigen eine reduzierte Proliferation nach BZR-, aber nicht nach TLR4-Engagement	38
3.1.2	Die Überexpression von CD83 führt zu einer gesteigerten Apoptose von FO B-Zellen	42

3.1.3	CD83Tg B-Zellen zeigen eine gesteigerte IL-10 Produktion nach LPS- aber nicht nach BZR-Stimulation	47
3.1.4	CD83 steigert die IL-10 Produktion selektiv in CD83Tg MZ B-Zellen . . .	49
3.1.5	CD83 wird nach LPS Stimulation auf MZ B-Zellen besonders schnell hoch-reguliert	52
3.1.6	Einfluss von CD83 auf die Signalgebung des BZR- und TLR4-Komplexes	53
3.1.6.1	CD83 inhibiert die ERK1/2 Aktivierung nach BZR-Engagement	54
3.1.6.2	CD83 verstärkt die ERK1/2 Aktivierung nach TLR4-Engagement selektiv in MZ B-Zellen	55
3.1.6.3	Die Aktivierung von ERK1/2 trägt zur vermehrten Expression von IL-10 in CD83Tg B-Zellen bei	56
3.1.7	CD83 kolokalisiert mit dem LPS-Rezeptorkomplex	58
3.2	Teil 2: Generierung einer konditionellen CD83KI Maus	60
3.2.1	Überprüfung des CTV-CD83-Vektors in COS1-Zellen	61
3.2.2	Transfektion embryonaler Stammzellen mit dem CTV-CD83-Vektor	62
3.2.3	Screening heterozygoter CD83KI Mäuse	64
4	Diskussion	67
4.1	Einfluss von CD83 auf die B-Zellaktivierung	67
4.1.1	CD83 ist ein negativer Regulator der BZR-vermittelten Signalgebung . . .	67
4.1.2	CD83 verstärkt die TLR4-vermittelte Signalgebung	70
4.1.3	Funktion von CD83 als Immunsuppressor	73
4.2	Generierung einer konditionellen CD83KI Maus	75
4.3	Ausblick	77
5	Zusammenfassung (deutsch)	79
6	Zusammenfassung (englisch)	81
	Literaturverzeichnis	81

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
Ag	Antigen
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BLNK	<i>B cell linker</i>
Breg	regulatorische B-Zellen
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Btk	<i>bruton's tyrosine kinase</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	Celsius
CAPS	N-Cyclohexyl-3-Aminopropansulfonicsäure
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DNS	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zellen
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>

ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinases</i>
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FO	follikulär
FSC	<i>forward scatter</i>
GEF	<i>guanin nucleotide exchange factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
h	Stunden
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFN	Interferon
I	Inhibitor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activatory motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
kb	Kilobasen
KI	<i>knock in</i>
LBP	LPS-Bindeprotein

LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine rich repeats</i>
M	Marker
MAL/TIRAP	<i>MyD88-adaptor-like/TIR-domain containing adaptor protein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation protein 2</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-II	<i>major histocompatibility complex class II</i>
M	molar
min	Minuten
mu	mutante
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
MZ	Marginalzone
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NK	Natürliche Killerzellen
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC γ -2	Phospholipase C γ -2
PRR	<i>cell-associated pattern recognition receptor</i>

ROSA	<i>reverse oriented splice acceptor</i>
RT	Raumtemperatur
SAPK	<i>signal activated protein kinases</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SH	<i>src-homolog</i>
Src	<i>sarcoma</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TAK	<i>TGFβ-activated kinase</i>
TD	<i>thymus dependent</i>
Tg	transgen
T _H	T-Helfer
TI	thymus independent
TIR	Toll/IL-1-Rezeptordomäne
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
T _M	Schmelztemperatur
TN	transitionell
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain containing adapter inducing IFNβ</i>
TRITC	Streptavidin-Tetramethylrhodamin-5- (und 6)-Isothiocyanat
TZR	T-Zell-Rezeptor
Wt	Wildtyp

Einbuchstaben-Bezeichnung der Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Lebende Organismen grenzen sich nach außen von ihrer Umwelt ab und schützen sich vor eindringenden Mikroorganismen. Diesem Zweck dient das Immunsystem, welches Strukturen wie Epithelschichten und Schleimhäute, Zellen sowie lösliche Faktoren umfasst. Das Immunsystem unterscheidet zwischen fremden Zellen und Partikeln wie Bakterien, Viren sowie Parasiten und körpereigenen harmlosen Zellen und schützt durch die Beseitigung von fremden aber auch körpereigenen entarteten Zellen. Die Immunabwehr höherer Vertebraten wird in zwei Systeme eingeteilt: das entwicklungsgeschichtlich ältere angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem, welche miteinander in Wechselwirkung stehen. Beide Systeme setzen sich aus verschiedenen zellulären und humoralen Faktoren zusammen, die sich in ihren Wirkmechanismen und ihrer Spezifität unterscheiden.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen dar und verhindert deren Ausbreitung zu Beginn einer Infektion. Die Aktivierung dieser ersten Immunantwort erfolgt Erreger-unspezifisch. Desweiteren werden durch das angeborene Immunsystem apoptotische, nekrotische aber auch mutierte körpereigene Zellen beseitigt, um die Homöostase zu bewahren. Das angeborene Abwehrsystem ist sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten ausgebildet. In Vertebraten umfasst es physische Barrieren wie die Haut und die Mukosa, Zellen wie dendritische Zellen (DZ) [1], Monozyten/Makrophagen [2], neutrophile Granulozyten [3] sowie Natürliche Killer (NK)-Zellen [4], aber auch die löslichen Plasmaproteine des Komplementsystems [5, 6]. Auf den meisten Zellen des angeborenen Immunsystems werden *cell-associated pattern recognition receptors* (PRRs) exprimiert, welche universelle Strukturen pathogener Mikroorganismen, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen [7]. Als Folge der Bindung kommt es zur Phagozytose des Pathogens [8] und zur Induktion verschiedener Effektormechanismen, wie zum Beispiel der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies oder löslicher Mediatoren wie Zytokine und Chemokine. *Toll-like receptors* (TLR) gehören zu der wichtigsten Familie der PRRs und werden auf der Zelloberfläche und in Endosomen von Makrophagen, dendritischen Zellen, B- und T-Zellen sowie von nicht-Immunzellen exprimiert [9, 10, 11]. Sie binden eine große Vielfalt an mikrobiellen Li-

ganden wie Zellwandbestandteile und Nukleinsäuren. Das Engagement der TLR resultiert in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie dem *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) [12], welcher die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert. [10]. Proinflammatorische Zytokine wie *tumor necrosis factor* (TNF)-Zytokine, *interleukin* (IL)-1, IL-12 sowie IL-6 werden vor allem von DZ und Makrophagen produziert und wirken entweder lokal am Infektionsort oder systemisch [13, 14]. Außerdem exprimieren DZ und Makrophagen Kostimulatoren und präsentieren mikrobielle Antigene (Ag) auf der Oberfläche, wodurch die T-Zellaktivierung induziert wird. Somit verhilft die angeborene Immunabwehr dazu, eine adaptive Immunantwort zu initiieren.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zu der angeborenen Immunität ist die adaptive Immunantwort Erreger-spezifisch. Dabei sind die Hauptkomponenten B- und T-Zellen. Sowohl B- als auch T-Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark [15, 16]. B-Zellen wurden erstmals in der Bursa fabricii (B von Bursa) der Vögel entdeckt und erhielten daher ihre Bezeichnung. Während T-Zellen (T von Thymus) ihre vollständige Reifung im Thymus durchlaufen [17], verlassen B-Zellen das Knochenmark im unreifen Zustand und schließen ihre Entwicklung in der Milz ab [18]. Beide Zelltypen zeichnen sich durch die Expression eines spezifischen Rezeptors aus, der für jede einzelne Zelle einzigartig ist [19]. Durch somatische Rekombination während der Reifung der B- und T-Zellen entsteht eine hohe Variabilität der Rezeptorspezifität, welche die spezifische Erkennung einer Vielzahl von Ag [20] gewährleistet. Nach dem Eindringen von Pathogenen wird innerhalb von sechs Tagen eine hoch effiziente adaptive Immunantwort initiiert, welche auch zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt [21]. Dieses ermöglicht eine schneller und effizientere Immunantwort nach jedem erneuten Ag-Kontakt.

1.2 B-Zellen und B-Zellsubpopulationen

B-Zellen als eine wichtige Komponente des adaptiven Immunsystems sorgen für eine spezifische und lang anhaltende Protektion gegen eine hohe Vielzahl von Pathogenen. Vor der Geburt entstehen B-Zellen aus Vorläuferzellen in der Leber. Diese bilden später die B1 B-Zellsubpopulation im Peritoneum, der Pleurahöhle und der Mukosa [22]. Nach der Geburt beginnt die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark [23, 24]. Zunächst exprimieren Vorläuferzellen noch keinen B-Zell-Rezeptor (BZR). Über verschiedene Entwicklungsstufen differenzieren sie schließlich zu unreifen B-Zellen, welche den vollständigen BZR exprimieren [25]. Dieser besteht aus membranständigem Immunglobulin M (IgM) mit zwei schweren und zwei leichten Ketten. In diesem Stadium verlassen die unreifen B-Zellen das Knochenmark und wandern in die Milz (Abbildung 1.2.1). Dort findet die endgültige Reifung über unreife transitionelle (TN) B-Zellen zu reifen follikulären (FO) und Marginalzonen (MZ) B-Zellen statt [18]. In welche Richtung sich eine transitionelle B-Zelle entwickelt, ist abhängig von der BZR-vermittelten

Signalstärke. Schwache Signale begünstigen die Entwicklung zu MZ B-Zellen, während starke tonische BZR-Signale die Differenzierung zu FO B-Zellen fördern [26, 27]. FO B-Zellen repräsentieren etwa 80% und MZ B-Zellen etwa 10% der gesamten B-Zellpopulation in der Milz [28]. FO B-Zellen exprimieren membranständiges IgM und IgD und zirkulieren nach der Reifung durch Blut- und Lymphgefäße in die Follikel der sekundären lymphatischen Organe, wo ihre Aktivierung erfolgt. Dagegen befinden sich murine MZ B-Zellen ausschließlich in der Marginalzone, welche die B- und T-Zellzone in der Milz umgibt [27]. MZ B-Zellen exprimieren vorwiegend IgM und reagieren schnell auf Pathogene, welche über das Blut verbreitet werden. Außerdem sezernieren MZ B-Zellen spontan IgM, welches auch als natürliches IgM bezeichnet wird. FO und MZ B-Zellen lassen sich neben IgM und IgD auch anhand weiterer Oberflächenmarker phänotypisch unterscheiden [22]. So werden FO B-Zellen als IgD^+ , IgM^+ , CD23^+ , $\text{CD21}^{\text{intermediär}}$ und $\text{CD1d}^{\text{niedrig}}$ und MZ B-Zellen als IgD^- , IgM^+ , CD23^- , CD21^+ und CD1d^+ charakterisiert [28].

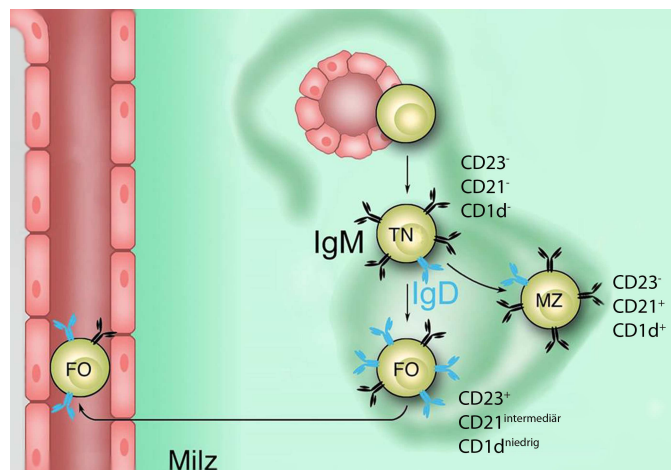


Abbildung 1.2.1: B-Zellreifung in der Milz. Unreife B-Zellen wandern aus dem Knochenmark in die Milz. Dort differenzieren sie über TN B-Zellen entweder zu FO oder MZ B-Zellen. FO B-Zellen exprimieren IgM und IgD und rezirkulieren zwischen lymphatischen Organen. MZ B-Zellen exprimieren IgM und nur wenig IgD und besiedeln die Marginalzone der Milz, welche die B- und T-Zellzone umgibt.

1.3 Aktivierung und Funktion von B-Zellen

Der Ag-Rezeptor der B-Zellen ist membranständiges IgM und IgD. Die Aktivierung einer B-Zelle erfolgt entweder thymusabhängig (*thymus dependent*, TD) oder thymusunabhängig (*thymus independent*, TI). Bei der TD-Aktivierung wird ein Ag spezifisch über den BZR gebunden, wobei zur vollständigen Aktivierung die Hilfe von CD4^+ T-Helferzellen (T_H -Zellen) nötig ist. Bei der TI-Aktivierung wird die B-Zelle über die Kreuzvernetzung des BZR oder über die Bindung von TI-Ag an andere Rezeptoren wie TLR aktiviert [29].

Ag der TD-Aktivierung sind Proteine. Für eine vollständige Aktivierung benötigt die B-Zelle zwei Signale. Das erste Signal erhält die B-Zelle durch die Bindung eines spezifischen Ag an den BZR. Das gebundene Ag wird durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert und proteolytisch fragmentiert. Über den *major histocompatibility complex class II* (MHC-II) wird das Peptidfragment auf der B-Zelloberfläche präsentiert [30, 31]. Für das Senden des zweiten Signals sind $CD4^+$ T_H -Zellen verantwortlich, welche einen für das Peptidfragment spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) exprimieren und dieses MHC-II-assoziierte Ag auf der B-Zelloberfläche binden. Durch die zusätzliche Interaktion des CD40-Liganden (CD40L) der T-Zelle mit dem CD40-Rezeptor (CD40) der B-Zelle wird das zweite Signal an die B-Zelle gesendet [32]. Neben der Ausbildung extrafollikulärer Zentren, in denen aktivierte B-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren [33], wird die Keimzentrumsreaktion initiiert [34]. In den Keimzentren erfolgt die Affinitätsreifung der B-Zellen [35], der Isotypenwechsel [36] und die Differenzierung zu langlebigen Plasmazellen oder Gedächtniszellen [37, 38]. Plasmazellen wandern in das Knochenmark, wo sie über lange Perioden überleben. In dieser Zeit produzieren sie weiterhin Antikörper, welche durch den Kreislauf zirkulieren. Diese Reaktion in den Keimzentren durchlaufen in erster Linie FO B-Zellen, da diese in den lymphatischen Organen in B-Zellfollikeln organisiert sind, die an die T-Zellareale angrenzen.

Im Gegensatz zu TD Ag handelt es sich bei TI Ag nicht um Proteine. Sie werden daher nicht in der B-Zelle prozessiert und können nicht von $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden. Somit induzieren TI-Ag keine Keimzentrumsreaktion. TI-Ag lassen sich in TI-1 und TI-2 Ag unterteilen.

TI-2 Ag sind polyvalente Strukturen wie Polysaccharide, Glykolipide und Nukleinsäuren, welche die BZR auf einer B-Zelle durch die sich wiederholenden Epitope maximal kreuzvernetzen und so ein starkes BZR-vermitteltes Signal vermitteln können [39, 29]. Dieses Signal ist stark genug, eine B-Zelle auch unabhängig von der T-Zellhilfe zu aktivieren. TI-1 Ag sind dagegen Strukturen, die eine B-Zelle nicht durch Bindung an den BZR, sondern über andere Rezeptoren wie TLR mitogen aktivieren [40]. Prominentes Beispiel hierfür ist bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), das in B-Zellen durch Aktivierung von TLR4 die Proliferation und IgM-Produktion induziert [41]. Auf TI-1 Ag reagieren insbesondere B1-Zellen in der Pleura und im Peritoneum sowie MZ B-Zellen in der Milz [27, 42, 43]. Aufgrund der Lokalisierung der MZ B-Zellen in der Marginalzone zwischen der roten und weißen Pulpa der Milz, sind diese prädestiniert, mit dem Blut zirkulierende TI-1 Ag wie LPS zu erkennen.

TI-aktivierte B-Zellen differenzieren schnell zu kurzlebigen Plasmazellen, welche IgM produzieren [43]. Die sekretierten Antikörper zeigen in der Regel eine niedrige Affinität zu ihren Ag und ein Isotypenwechsel kommt nur limitiert vor. Diese sogenannten natürlichen Antikörper zirkulieren im Organismus und werden konstant produziert [44].

Neben der Antikörperproduktion können B-Zellen auch regulatorische Funktionen einnehmen. IL-10-produzierende regulatorische B-Zellen (Bregs) wurden in den letzten Jahren als wichtige Komponenten des adaptiven Immunsystems beschrieben [45]. Die Charakterisierung dieser

B-Zellpopulation erfolgt anhand von Oberflächenmarkern wie CD21, CD23, CD5 und CD1d [46], da bisher keine spezifischen Transkriptionsfaktoren für regulatorische B-Zellen beschrieben wurden [47].

1.3.1 Signalgebung durch den BZR

Der BZR ist eine transmembrane Form eines Antikörpers und ist mit zwei Ketten assoziiert, welche für die Signaltransduktion verantwortlich sind. IgM und IgD besitzen eine kurze zytoplasmatische Domäne, zusammengesetzt aus nur drei Aminosäuren - Lysin, Valin, Lysin. Dieser zytoplasmatische Abschnitt ist zu kurz, um intrazelluläre Signale zu initiieren. Die Ag-induzierte Signaltransduktion der B-Zelle wird daher von einem Heterodimer, Ig α und Ig β , vermittelt, welches nicht-kovalent mit dem BZR assoziiert ist. Beide Moleküle sind miteinander über eine Disulfidbrücke verknüpft [48]. Diese Proteine weisen jeweils ein *immunoreceptor tyrosine-based activatory motif* (ITAM) in ihrer zytoplasmatischen Domäne auf [49] und bilden zusammen mit dem BZR den BZR-Komplex. Die Phosphorylierung dieser ITAM Tyrosinreste ist der Auslöser für alle nachgeschalteten intrazellulären Signale [50, 51]. Diese erfolgen nach Engagement des BZR durch Kinasen der *sarcoma* (Src)-Familie [52]. Dazu gehören in B-Zellen die Kinasen LYN, FYN und BLK, von denen die LYN-Kinase eine zentrale Rolle als Initiator des BZR-vermittelten Signals spielt [50, 48]. Die phosphorylierten ITAM-Motive von Ig α und Ig β bieten Bindestellen für die Tandem-SH2-Domäne (Src-homologe Domäne) der Tyrosin-Kinase SYK [53, 54], die ihrerseits durch LYN phosphoryliert wird. Die aktivierte SYK-Kinase initiiert durch die Phosphorylierung des zentralen Adapterproteins *B cell linker* (BLNK) distale Signalereignisse [55]. Aktiviertes BLNK bietet diverse Bindestellen für Signalmoleküle, die über eine SH2- oder SH3-Domäne verfügen [56]. Dazu gehören die Phospholipase C γ -2 (PLC γ -2) [57] und die *bruton's tyrosine kinase* (Btk). Die PLC γ -2 phosphoryliert und spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in der Zellmembran und generiert hierdurch zwei *Second Messenger*: Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) [58] und Diacylglycerol (DAG). IP3 öffnet IP3-abhängige Calciumkanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), was zu einem Einstrom von Calcium (Ca²⁺) in das Zytosol [57] und zur Calcineurin-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) führt [59, 60]. DAG initiiert dagegen die Proteinkinase C (PKC)-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B1 [61].

Phosphoryliertes BLNK bietet außerdem Bindestellen für *guanin nucleotide exchange factors* (GEFs) wie Vav und Sos. Letzteres bindet im Komplex mit dem SH2-Domänenprotein *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) an BLNK. Während Sos durch die Aktivierung des G-Proteins Ras die Aktivierung von *mitogen activated protein kinases* (MAPK) wie *extracellular signal regulated kinases 1/2* (ERK1/2) initiiert [55], induziert Vav die Aktivierung von Rac und *signal activated protein kinases* (SAPK) wie *c-Jun N-terminal kinases* (JNK1/2) [62]. Beide Signalwege zusammen resultieren unter anderem in der Aktivierung des heterodimeren Transkriptionsfaktors

activator protein-1 (AP-1), der sich aus Jun und Fos zusammensetzt. Abbildung 1.3.1 gibt einen Überblick über die beschriebenen BZR-vermittelten Signalwege.

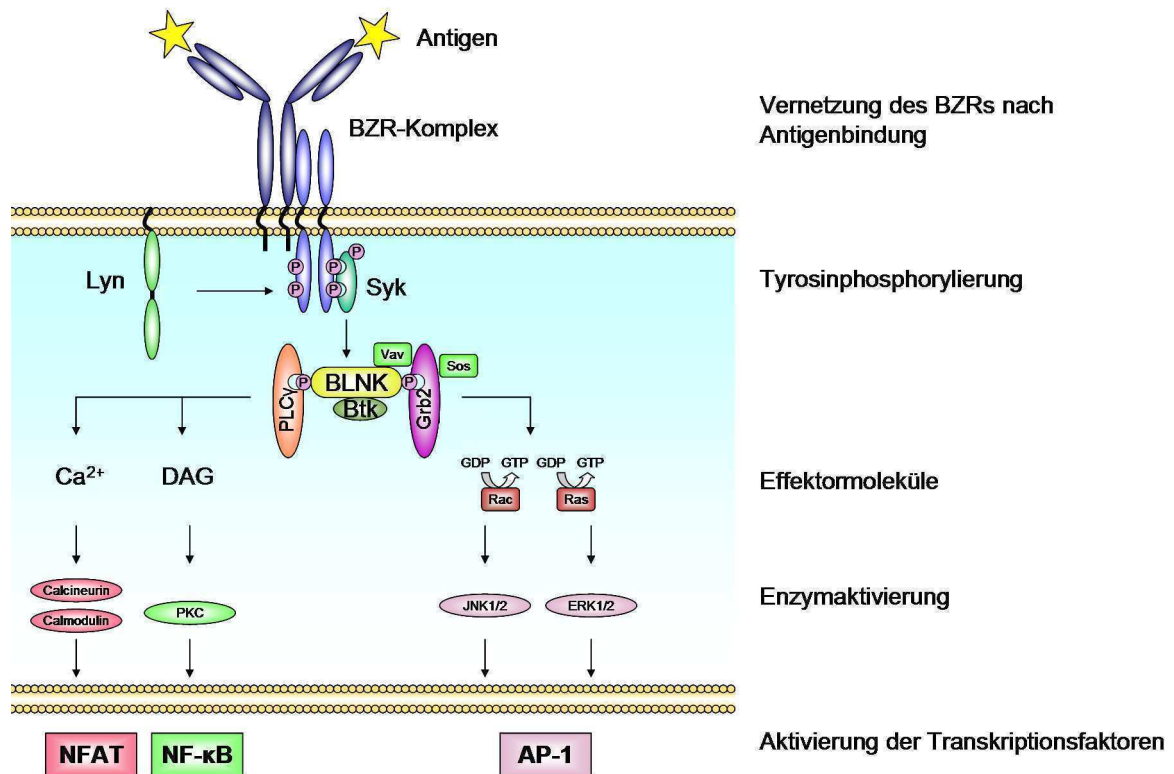


Abbildung 1.3.1: BZR-Signalgebung nach Aktivierung. Nach Ag-Bindung an den BZR erfolgt die Phosphorylierung der ITAM-Motive von Igα und Igβ durch die LYN-Kinase. Die phosphorylierten ITAM-Motive von Igα und Igβ bieten eine Bindestelle für die Tandem-SH2-Domäne der Tyrosin-Kinase Syk, die ihrerseits durch LYN phosphoryliert und aktiviert wird. Die aktivierte SYK-Kinase initiiert durch die Phosphorylierung des zentralen Adapterproteins BLNK distale Signalereignisse. Aktiviertes BLNK bietet diverse Bindestellen für SH2-Domäne-Proteine wie PLCγ-2 und Btk. Die PLCγ-2 phosphoryliert und spaltet PIP2 in der Zellmembran und generiert hierdurch zwei *Second Messenger*: IP3 und DAG. IP3 öffnet IP3-abhängige Calciumkanäle in der Membran des ER, was zu einem Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol und zur Calcineurin-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT führt. DAG initiiert dagegen die PKC-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB1.

Phosphoryliertes BLNK bietet außerdem Bindestellen für die GEFs Vav und Sos, wobei Sos im Komplex mit Grb2 an BLNK bindet. Sos initiiert durch die Aktivierung des G-Proteins Ras die Aktivierung von MAP-Kinasen wie ERK1/2 [55]. Vav induziert die Aktivierung von Rac und SAP-Kinasen wie JNK1/2. Beide Signalwege zusammen resultieren unter anderem in der Aktivierung des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1, der sich aus Jun und Fos zusammensetzt.

1.3.1.1 Korezeptoren des BZR

Eine Vielzahl BZR-assoziierter und koexprimierter Oberflächenmoleküle können die B-Zellaktivierung entweder verstärken oder attenuieren. Als Koaktivator dient der CD21/CD19/CD81-

Komplex. CD21 erkennt den an mikrobielle Ag gebundenen Komplementfaktor C3d. Bei gleichzeitiger Bindung des Ag durch den BZR, wird der CD19-Komplex in die Nähe des BZR gebracht [63]. Die Phosphorylierung der intrazellulären ITAM-Motive von CD19 führt zur Rekrutierung und Aktivierung der PI3K [64]. Die PI3K phosphoryliert ihrerseits PIP2 in der Membran zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) und generiert dadurch Bindestellen für Enzyme mit Pleckstrin-homologer Domäne, darunter die Proteinkinase B (PKB) und Btk, deren Aktivierung zusätzliche Signalwege initiiert. Das Ergebnis ist eine Verstärkung des BZR-vermittelten Signals.

Um eine Überaktivierung oder Autoreaktivität zu verhindern, wird die BZR-vermittelte Signalgebung jedoch durch eine Vielzahl von Korezeptoren stark negativ reguliert [65]. Zu diesen Rezeptoren gehören u. a. PD1, CD72 [66], CD22 [67] und der niedrig affine IgG-Rezeptor Fc γ RIIB1 [68]. All diese Rezeptoren besitzen intrazelluläre ITIM-Motive, die durch Src-Kinasen wie LYN phosphoryliert werden und in diesem Zustand Bindestellen für Tyrosin-Phosphatasen wie SHP-1, SHP-2 (PD1, CD72, CD22) und SHIP-1 (Fc γ RIIB1) bieten [69]. SHP-1 und SHP-2 inhibieren durch Dephosphorylierung von LYN, SYK und weiteren Kinasen die intrazelluläre Signalleitung [70], während SHIP-1 durch Dephosphorylierung von PIP3 die Aktivierung von PKB- und Btk-vermittelten Signalwegen blockiert [71]. Fc γ RIIB1 bindet in einer bereits bestehenden Immunantwort an den *fragment crystallisable* (Fc)-Teil von IgG in Immunkomplexen. Er wird bei gleichzeitiger Bindung des komplexierten Ag durch den BZR aktiviert und trägt dadurch zur Termination der B-Zellantwort bei [68]. Über die genauen Wirkmechanismen der übrigen Koinhibitoren ist wenig bekannt. Für CD22, das konstitutiv auf B-Zellen exprimiert wird, wurde gezeigt, dass dieses Molekül bei Engagement des BZR verstärkt mit dem BZR assoziiert [72]. Es wird deshalb angenommen, dass CD22 die Aktivierungsschwelle des BZR-vermittelten Signals heraufsetzt.

Die finale funktionale B-Zell-Antwort auf ein Ag wird demzufolge durch die bestehende Balance zwischen stimulierenden und inhibitorischen Signalen reguliert.

1.3.2 Signalgebung durch den TLR4

TLR gehören zu der IL-1-Rezeptorsuperfamilie und fungieren als PRR, die charakteristische PAMPs erkennen [73]. Sie zeichnen sich strukturell durch Leucin-reiche Wiederholungen (LRR) in der extrazellulären Domäne [74] und einer intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptordomäne (TIR) aus [75]. An diese können wiederum Adapterproteine, die selbst über eine solche Domäne verfügen, binden. Das zentrale Adaptermolekül, das von allen TLR mit Ausnahme von TLR3 genutzt wird, ist der *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) [76]. Daneben sind drei weitere TIR-Domäne enthaltende Adapterproteine bekannt: *MyD88-adaptor-like/TIR-domain containing adaptor protein* (MAL/TIRAP), *TIR domain containing adapter inducing IFN- β* (TRIF) und *TRIF-related adapter molecule* (TRAM) [76].

TLR4 ist verantwortlich für die Bindung von LPS Gram-negativer Bakterien [41]. Dabei asso-

ziiert LPS im Blut an das LPS-Bindeprotein (LBP) und wird darüber an CD14 gebunden, ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-gekoppeltes Protein [77]. Dieser Komplex wird zu dem extrazellulären Protein *myeloid differentiation protein-2* (MD-2) transferiert und schließlich von dem extrazellulären Teil des TLR4 gebunden [78]. Die Bindung des Liganden induziert die Dimerisierung des TLR4-Rezeptors, was die Bindung intrazellulärer Adapterproteine an dessen TIR-Domäne ermöglicht. TLR4 interagiert dabei sowohl mit MyD88 als auch MAL/TIRAP, TRIF und TRAM. Diese bilden nach Bindung des Liganden den signalgebenden Komplex. Der zentrale konservierte MyD88-abhängige Signalweg führt zur Aktivierung von NF- κ B [79]. MyD88 rekrutiert und interagiert zunächst mit der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase 4 (IRAK4) über konservierte *death domains*, die in beiden Molekülen vorkommen [80]. Hierdurch wird die IRAK4-Kinase aktiviert, die sich selbst autophosphoryliert und weitere IRAK-Kinasen, darunter IRAK1, aktiviert [81]. IRAK1 assoziiert weiter mit *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6). Dies führt zur Aktivierung von *TGF β -activated kinase 1* (TAK1) durch Ubiquitylierung [81]. Die TAK1-Kinase aktiviert den I κ B-Kinasekomplex, der seinerseits den Inhibitor von NF- κ B (I κ B) phosphoryliert. I κ B dissoziiert daraufhin von dem Komplex mit NF- κ B und gibt damit den aktiven Transkriptionsfaktor für die Translokation in den Zellkern frei [82]. Daneben kommt es auf noch nicht genau geklärtem Weg über die Aktivierung von TAK1 zur Aktivierung verschiedener MAPK-Signalwege, darunter p38, JNK1/2 und ERK1/2, die unter anderem den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren und hierdurch wichtige Überlebenssignale vermitteln [83]. Im Gegensatz zu anderen TLR verfügt TLR4 zusätzlich über einen MyD88-unabhängigen Signalweg, der über die Adaptern TRIF/TRAM vermittelt wird. Die Rekrutierung von TRIF zum Rezeptorkomplex führt zur Aktivierung von *IFN-regulatory-factor 3* (IRF3) und zur Expression von IFN- β . TLR4-aktivierte Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF- κ B, induzieren in Ag-präsentierenden Zellen wie DZ und Makrophagen schließlich die Expression überwiegend proinflammatorischer Zytokine wie IL-12, die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie MHC-II [84]. Eine Übersicht über die beschriebenen TLR4-vermittelten Signalwege ist in Abbildung 1.3.2 gezeigt.

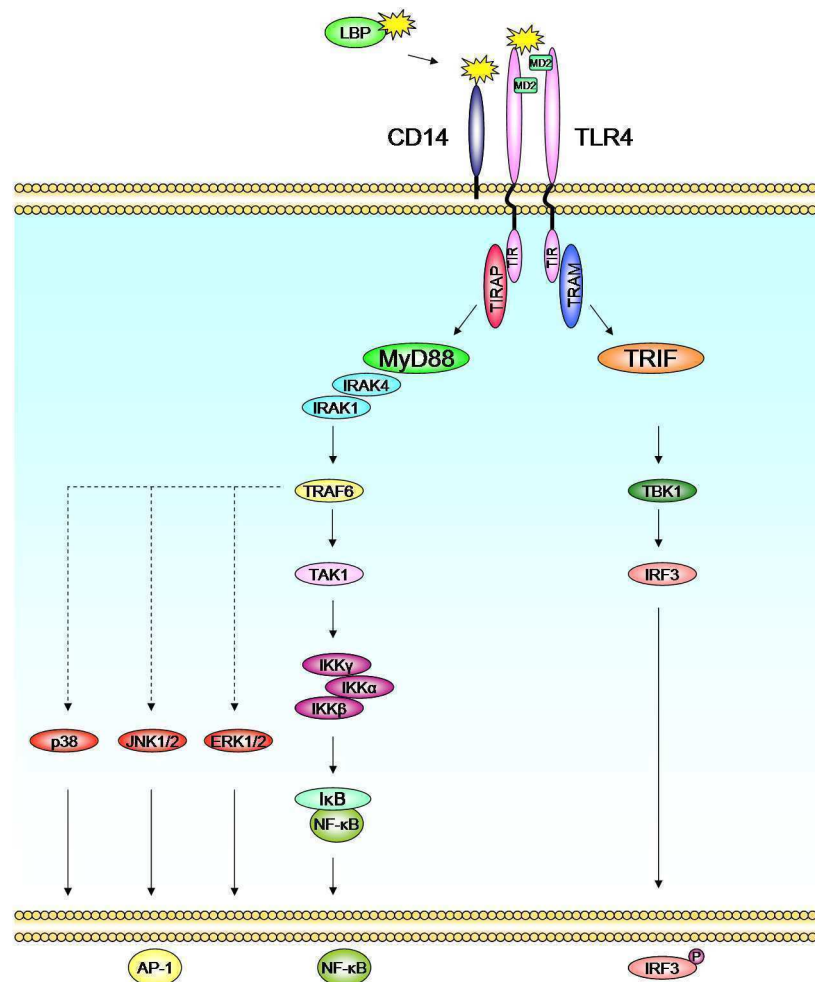


Abbildung 1.3.2: Der TLR4-Signalweg. LPS bindet an LBP und wird darüber an CD14 gebunden. Dieser Komplex wird zu dem extrazellulären Protein MD-2 transferiert und schließlich von dem extrazellulären Teil des TLR4 gebunden. Die Bindung des Liganden induziert die Dimerisierung des TLR4-Rezeptors, was die Bindung intrazellulärer Adapterproteine an dessen TIR-Domäne ermöglicht. TLR4 interagiert dabei sowohl mit MyD88 als auch MAL/TRAP, TRIF und TRAM. Diese bilden nach Bindung des Liganden den signalgebenden Komplex. Der zentrale konservierte MyD88-abhängige Signalweg führt zur Aktivierung von NF-κB. MyD88 rekrutiert und interagiert zunächst mit IRAK4 über konservierte *death domains*. Hierdurch wird die IRAK4-Kinase aktiviert, die sich selbst autophosphoryliert und weitere IRAK-Kinasen, darunter IRAK1, aktiviert. IRAK1 assoziiert weiter mit TRAF6. Dies führt zur Aktivierung von TAK1 durch Ubiquitinylierung. Die TAK1-Kinase aktiviert den IκB-Kinasekomplex, der seinerseits IκB phosphoryliert. IκB dissoziiert daraufhin von dem Komplex mit NF-κB und gibt damit den aktiven Transkriptionsfaktor für die Translokation in den Zellkern frei. Daneben kommt es über die Aktivierung von TAK1 zur Aktivierung verschiedener MAPK-Signalwege, darunter p38, JNK1/2 und ERK1/2, die unter anderem den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren. Im Gegensatz zu anderen TLR verfügt TLR4 zusätzlich über einen MyD88-unabhängigen Signalweg, der über die Adaptern TRIF/TRAM vermittelt wird. Die Rekrutierung von TRIF zum Rezeptorkomplex führt zur Aktivierung von IRF3 und zur Expression von IFN-β.

TLR-Aktivierung auf B-Zellen resultiert in der Differenzierung zu kurzlebigen Plasmazellen und der Antikörpersekretion wie IgM und IgA, auch in Abwesenheit von T-Zell-Hilfe [85,

86]. Dabei zeigen MZ B-Zellen eine stärkere funktionale Immunantwort auf TLR-Engagement als FO B-Zellen [28, 86].

1.4 CD83

1.4.1 Struktur und Expression von CD83

CD83 wurde erstmals im Jahr 1992 aus der cDNS humaner Tonsillen [87] und ein Jahr später aus cDNS humaner B-Lymphozyten kloniert [88]. 1998 wurde CD83 in der Maus identifiziert [89]. Das CD83-Gen besteht aus fünf Exons und ist beim Menschen auf Chromosom 6 [90] und in der Maus auf Chromosom 13 lokalisiert [89]. In der Aminosäure (AS)-Sequenz zeigen humanes und murines CD83 63% Identität. CD83-Homologe wurden nicht nur in Säugetieren sondern auch in Vögeln [91] sowie in Knochen- und Knorpelfischen [92] beschrieben. Dies zeigt eine Konservierung des CD83-Proteins über Jahrhunderte der Vertebratenevolution. Das murine CD83-Protein umfasst 196 AS, wovon 21 AS das Signalpeptid bilden [93]. Das reife murine CD83-Protein mit 175 AS [89] besteht aus einer 39 AS [87] oder 42 AS [88] umfassenden zytoplasmatischen, einer kurzen transmembranen und aus einer 114 AS langen extrazellulären Domäne (Abbildung 1.4.1). Der Vergleich der AS-Sequenz mit bekannten Proteinen zeigte eine starke Homologie mit Proteinen der Ig-Superfamilie, welche eine IgV-Domäne besitzen [88]. Daher wurde CD83 der Ig-Superfamilie zugeordnet, wobei zwei der fünf Cysteinreste (Cys¹⁶ und Cys⁷⁷) in der extrazellulären Domäne die Ausbildung einer Ig-Domäne ermöglichen [94]. Drei N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne führen zu einer starken Glykosylierung des reifen CD83-Proteins [90].

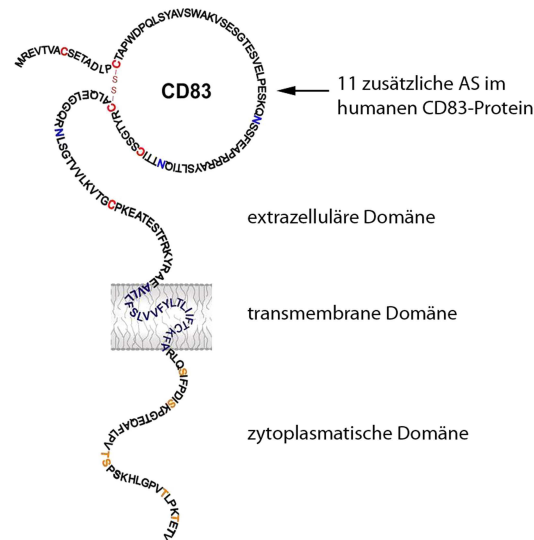


Abbildung 1.4.1: Struktur und Aminosäuresequenz des murinen CD83. Das reife murine CD83-Protein aus 175 AS besteht aus einer 39 AS oder 42 AS umfassenden zytoplasmatischen, einer kurzen transmembranen und aus einer 114 AS langen extrazellulären Domäne. Zwei (Cys¹⁶ und Cys⁷⁷) der fünf Cysteinreste in der extrazellulären Domäne ermöglichen die Ausbildung einer Ig-Domäne. Drei N-Glykosylierungsstellen führen zu einer starken Glykosylierung des reifen CD83-Moleküls.

Ursprünglich wurde CD83 als Aktivierungsmarker für humane und murine dendritische Zellen beschrieben [93, 95] und galt deswegen lange als spezifischer Reifungsmarker dieser [96]. In den vergangenen Jahren wurde jedoch gezeigt, dass CD83 auf vielen weiteren Immunzellen nach Aktivierung exprimiert wird, darunter aktivierte B- und T-Zellen [97, 98], humane Neutrophile [99, 100] und NK-Zellen [101]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CD83 auch auf nicht-Immunzellen wie Thymusepithelzellen [102] und noch nicht näher charakterisierten Zellen im Gehirn exprimiert wird [89, 88]. Besonders deutlich wird CD83 von aktivierten B-Zellen exprimiert. Während CD83 auf naiven B-Zellen kaum vorhanden ist [97], regulieren B-Zellen die Expression des Moleküls nach Aktivierung *in vitro* innerhalb weniger Stunden stark herauf [103, 97]. Zudem stellen B-Zellen in Infektionsmodellen mit *Leishmania major* und *Trypanosoma cruzi* nicht nur die dominante CD83⁺ Zellpopulation dar, sondern die Expression des Moleküls korreliert zudem mit dem Infektionsverlauf [104]. So wurde die Expression von CD83 bei der Infektion von resistenten C57BL/6-Mäusen mit *L. major* mit dem Verschwinden des Erregers herunterreguliert, während die CD83-Expression in suszeptiblen BALB/c-Mäusen, die den Erreger nicht eliminieren können und letztlich an der Infektion sterben, unverändert hoch blieb [104].

1.4.2 Einfluss von CD83 auf die Entwicklung von Lymphozyten

Die Expression von CD83 auf Epithelzellen des Thymus ist essenziell für die Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen [102, 105]. Untersuchungen mit einer CD83-defizienten Maus haben gezeigt, dass die fehlende Expression von CD83 auf Thymusepithelzellen zu einer stark reduzierten Frequenz an CD4⁺ Thymozyten und zu einer bis zu 90% verringerten Anzahl von CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie führt [102]. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung einer CD83-mutanten (CD83mu) Maus erhalten, die aufgrund einer Punktmutation im Stop-Codon des Moleküls kein funktionelles CD83 exprimiert [105]. Wurde Knochenmark aus CD83-defizienten Mäusen in letal bestrahlte Wildtyp (Wt) Mäuse transferiert, zeigt sich eine normale Reifung der T-Zellen [102]. Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen ist sowohl in CD83-defizienten als auch in CD83mu Mäusen die Anzahl und Funktion von CD8⁺ T-Zellen nicht beeinflusst [102, 105, 106]. Diese Experimente zeigen, dass die Expression von CD83 essenziell für die Reifung von CD4⁺ T-Zellen ist. Die wenigen CD4⁺ T-Zellen, welche sich in der CD83mu Maus entwickeln, zeigen zudem nach Aktivierung eine reduzierte Proliferation und Zytokin-freisetzung [105]. Darüber hinaus wurden Daten mit einer CD83Ig-transgenen Maus erhoben, welche die Rolle von CD83 bei der Entstehung von CD4⁺ T-Zellen bestätigen. Die Sekretion des CD83Ig-Fusionsproteins, bestehend aus der extrazellulären Domäne des CD83-Moleküls und dem Fc-Teil des humanen IgG1, in das Serum, führt zu einem funktionalen Defekt der CD4⁺ T-Zellen, obwohl die Anzahl derer normal ist [106]. Das kann damit erklärt werden, dass durch die Bindung des CD83Ig-Fusionsmoleküls an den putativen Liganden für CD83 auf den sich entwickelnden Thymozyten die Bindung an CD83 auf den Thymusepithelzellen verhindert wird.

CD83 zeigt auch einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung von B-Lymphozyten. Natürliches CD83 wird erstmals auf der Oberfläche unreifer B-Zellen, die bereits den IgM BZR auf der Oberfläche zeigen, exprimiert [97]. Die Untersuchung einer CD83-transgenen (CD83Tg) Maus, welche CD83 unter der Kontrolle des MHCI-Promotors auf allen kernhaltigen Zellen überexprimiert, hat gezeigt, dass die vorzeitige transgene CD83-Expression zu einer Störung bereits in der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark führt. So entwickeln CD83Tg Mäuse eine reduzierte Anzahl an pro-B-Zellen, obwohl schließlich eine normale Anzahl unreifer B-Zellen im Knochenmark entsteht [97]. Darüber hinaus zeigen CD83Tg Mäuse eine veränderte späte B-Zellentwicklung, da sie eine reduzierte Anzahl reifer FO B-Zellen bei reziprok erhöhter Anzahl unreifer TN B-Zellen entwickeln [97]. Die Anzahl von MZ B-Zellen wird dagegen nicht durch die Überexpression von CD83 beeinflusst. Außerdem zirkulieren in CD83Tg Mäusen weniger reife B-Zellen in der Peripherie verglichen mit Wt Mäusen. Die Generierung von gemischten Knochenmarkchimären, bei denen sich B-Zellen zu 50% aus Wt und 50% aus CD83Tg Knochenmark entwickelten, hat gezeigt, dass reife CD83Tg B-Zellen eine reduzierte Überlebensrate in der Peripherie aufweisen [97]. Da sich Wt und CD83Tg B-Zellen hier im selben Organismus unter identischen Bedingungen entwickelt haben, zeigen diese Ergebnisse, dass für die veränderte

Homöostase der CD83Tg B-Zellen die transgene CD83-Expression auf den sich entwickelnden B-Zellen selbst und nicht auf akzessorischen Zellen verantwortlich ist.

1.4.3 Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von B-Lymphozyten

Während der Einfluss von CD83 auf die Aktivierung von T-Zellen noch unklar ist, besitzt CD83 einen negativen Einfluss auf die B-Zellfunktion [107].

CD83Tg Mäuse reagieren bei Immunisierung mit TD- und TI-Ag sowie bei bakteriellen Infektionen mit dramatisch reduzierter Ig-Produktion, weisen jedoch eine normale T-Zellantwort auf [104]. Mit Hilfe von Knochenmarkchimären und adoptiven Transferexperimenten wurde gezeigt, dass die Ursache für die beobachteten Defekte der humoralen Immunantwort die CD83-Überexpression auf den B-Zellen selbst und nicht auf anderen Zellen ist [104]. In gemischten Knochenmarkchimären weisen nur CD83Tg B-Zellen eine defekte Ig-Antwort nach Immunisierung auf. In Knochenmarkchimären mit transplantierten CD83mu Zellen in Wt Umgebung ist die Ig-Produktion dagegen gleich oder leicht erhöht verglichen mit Wt Zellen in Wt Umgebung. Wt B-Zellen, welche in eine CD83Tg Maus transferiert wurden, produzieren dagegen normale Mengen Ig. Außerdem führt die Applikation eines monoklonalen anti-CD83-Antikörpers in Wt Mäusen zu einer gesteigerten Ag-spezifischen IgG1-Produktion nach TI Immunisierung. Diese Wirkung lässt sich dadurch erklären, dass die Bindung des Antikörpers an CD83 die Wechselwirkung von CD83 mit noch unbekannten Liganden blockiert und dadurch das CD83-vermittelte negative Signal neutralisiert wird. Gereinigte CD83Tg B-Zellen zeigen bei Stimulation *in vitro* ebenfalls eine reduzierte Ig-Sekretion, wohingegen CD83mu B-Zellen eine leicht gesteigerte Ig-Produktion aufweisen [103]. Die Beobachtung, dass isolierte CD83Tg B-Zellen auf das Engagement des BZR mit einem reduzierten Ca^{2+} -Einstrom [103] und einer reduzierten Aktivierung der Kinasen LYN und SYK (A. Osterloh, unveröffentlichte Daten) reagieren, deutet darauf hin, dass CD83 bereits mit frühen Ereignissen der BZR-Signalgebung interferiert. Die Mechanismen, die der Inhibition der B-Zellaktivierung durch CD83 zugrunde liegen, sind allerdings noch weitgehend unbekannt. CD83 selbst besitzt nur eine sehr kurze intrazelluläre Domäne, welche keine bekannten Signalmotive enthält. Die CD83-vermittelten Effekte können somit nur durch Interaktion mit anderen signalgebenden Molekülen erklärt werden. Bislang wurden keine Liganden für CD83 identifiziert. Aktuelle Studien unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass der inhibitorische BZR-Korezeptor CD22 ein *cis*-Ligand von CD83 auf B-Zellen ist und CD83 in den inhibitorischen CD22/LYN/SHP-1-Signalweg involviert ist (A. Osterloh, unveröffentlichte Daten). Jedoch sind CD83Tg B-Zellen nicht generell defekt. Obwohl CD83Tg B-Zellen auch bei Stimulation mit LPS hypoproliferativ reagieren, sekretieren sie gegenüber Wt B-Zellen erhöhte Mengen an IL-10, während CD83mu B-Zellen reziprok weniger IL-10 freisetzen [103].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass CD83 die B-Zellaktivierung und Funktion negativ beeinflusst und dabei mit BZR-vermittelten Signalen interferiert. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass B-Zellen aus CD83Tg Mäusen auf TLR4-Engagement zwar hypoproliferativ reagieren, jedoch erhöhte Mengen IL-10 freisetzen. Um dieses Phänomen aufzuklären, war das Ziel dieser Arbeit, die Reaktion von CD83Tg B-Zellen auf das Engagement des BZR sowie des TLR4 im Vergleich mit Wt B-Zellen näher zu charakterisieren. Dabei sollte die Antwort der FO, MZ und TN B-Zellsubpopulationen in Bezug auf die Proliferation und IL-10 Freisetzung auf diese Stimuli differenziert untersucht werden. Die Experimente sollten eine Aussage darüber erlauben, ob CD83 auf alle B-Zellsubpopulationen gleichermaßen wirkt oder möglicherweise verschiedene B-Zellen unterschiedlich beeinflusst.

In der CD83Tg Maus wird CD83 bereits überexprimiert, bevor es natürlicherweise auf der B-Zelloberfläche erscheint. Es wurde gezeigt, dass diese vorzeitige Expression von CD83 sowohl die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark als auch die Reifung und Differenzierung in der Milz stört. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Effekte von CD83 auf die B-Zellaktivierung auch auf einen bereits während der B-Zellentwicklung entstandenen Defekt zurückzuführen sind. Um einen negativen Einfluss von CD83 auf die B-Zellentwicklung auszuschließen, sollte in dieser Arbeit eine konditionelle CD83 *Knock-in* (CD83KI) Maus hergestellt werden, die erlaubt, dass das CD83-Molekül erstmals im Stadium der reifen B-Zelle überexprimiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Laborgerät

Analysenwaage
Autoklav - 6464L
CO₂-Inkubator - HERA cell 150
Digitalwaage
Durchflusszytometer - FACSCalibur
Durchflusszytometer - BD Accuri C6
Elektronische Pipettierhilfe - Accu-jet®pro
ELISA-Reader (MRX II)
Eppendor fzentrifuge 5415D
Feinwaage
Gamma-Bestrahlungsanlage (OB29/4)
Geldokumentation - FUSION-SL4 advanced
Gelkammern (Gelelektrophorese)
Gelkammern (SDS-PAGE)
Kühl- und Gefrieranlage
Lichtmikroskop
Magnet rührer
Megafuge 2,0R
Mehrkanalpipetten
MidiMACS-Zellseparationssystem
Mikroskop - Axioskop 2 Plus
Mikrowellengerät
Netzteil (DNS-Gelelektrophorese)
PCR-Cycler - peqSTAR 96 Universal Gradient
pH-Meter - pH211

Pipetten

Hersteller

Sartorius AG, Göttingen
Schlumbohm Medizintechnik, Hamburg
Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Sartorius AG, Göttingen
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Brand GmbH & Co. KG
Dynex Technologies, Berlin
Eppendorf, Hamburg
Denver Instrument GmbH, Göttingen
STS GmbH, Braunschweig
Vilber, Eberhardzell
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Liebherr, Ochsenhausen
Hund GmbH, Wetzlar
IKA Labortechnik, Staufen
Heraeus-Sepatech, Hanau
HTL Lab Solutions, Warschau
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Panasonic, Wiesbaden
Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl
am Rhein
Eppendorf AG, Hamburg; Gilson, Limburg

Reinluft-Werkbank - Steril GARD III Advance	The Baker Company, Maine, USA
Thermomagnetrührer - RET-GS	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Thermomixer - Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Flächenstrahler - N90 L (Gelelektrophorese)	Benda Konrad Laborgeräte, Wiesloch
Vortexer - VF2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage	SG Clear, Barsbüttel
Western Blot-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zählkammer - Neubauer improved (0,1 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön
Zellerntegerät „Microcell Harvester“	Inotech, Reppischhof, Schweiz
Zentrifuge - Cytospin 3	Shandon Life Sciences InterNSTionl, Frankfurt
Zentrifuge - Eppendorf zentrifuge 5417 J	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge - Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge - Mikro 20	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien (Glas- und Plastikmaterialien)

Alle mit * versehenen Waren wurden steril bezogen.

Materialname	Hersteller
Chamber Slide *	Nalge Nunc International, NewYork, USA
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
EDTA-Röhrchen	Kabe Labortechnik, Nümbrecht- Elsenroth
ELISA 96-Loch Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
FACS Röhrchen (5 mL Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
Glasobjektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kanülen*	Braun, Melsungen
MACS-Separationssäulen LS*	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Wisconsin, USA
Petrischalen (100 x 200 mm)*	Sarstedt, Nümbecht
Pipettenspitzen	Greiner bio-on, Frickenhausen; Sarstedt, Nümbrecht

Platten für Proteinbestimmung (96-Loch)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Safelock-Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Schottflaschen	Schütt Labortechnik, Göttingen
Spritzen (1, 5 und 10 mL)*	Braun, Melsungen
Sterilfilter (Porengröße 0,22 und 0,45 µm)*	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (5, 10 und 25 mL)*	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (96-, 24-, 6-Loch)*	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe "Cell Strainer" (70 µm)*	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber *	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

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

2.1.3.1 Molekularbiologische Arbeiten

Reagenz	Hersteller
Agarose	Biomol GmbH, Hamburg
6x DNS-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
DNS-Marker - GeneRuler™ 100bp	Fermentas, St. Leon-Rot
DNS-Ladder	
DNS-Marker - GeneRuler™ 1kb DNS-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
2 mM dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chlorwasserstoff (HCl)	
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fermentas GmbH, St-Leon-Rot
10x Taq-Puffer (+KCl, - MgCl ₂)	Fermentas, St. Leon-Rot

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

Primer	Sequenz
IL10-s	5'-ATACATGATGATCAAAATGAAAAGCT-3'
IL10-eGFP-as	5'-GCCGTAGGTCAGGGTGGTCACG-3'
For_ROSA26	5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'
Rev_ROSA26/2 (Wt)	5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'
Rev_ROSA26/1 (Tg)	5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'

Plasmid-Vektoren

CTV-CD83

Bestand des Bernhard-Nocht-Instituts

Enzyme

Enzym

EcoRI

Erkennungssequenz

5'-G^A A T T C-3'

Hersteller

Fermentas GmbH,
St-Leon-Rot

3'-C T T A A^G-5'

Taq DNS Polymerase (rekombinant) 1U/μL

Fermentas GmbH,
St-Leon-Rot

2.1.3.2 Biochemische Arbeiten

Reagenz

Acrylamid (30 %)/ Bisacrylamid (0,8 %)

Ammoniumpersulfat (APS)

Bradford-Reagenz Pierce,

CAPS

(3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure)

Chlorwasserstoff (HCl)

Dithiothreitol (DTT)

ECL Western Blotting Detection Reagents GE

Ethanol

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

HybondTM-ECL Nitrocellulose-Membran

N-HybondTM-ECL Nitrocellulose-Membran

Isopropanol

Milchpulver

Natriumcitrat (C₆H₅Na₃O₇ x H₂O)

Natriumchlorid (NaCl)

Natriumhydroxid (NaOH)

PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder

RestoreTMPlus Western Blotting *Stripping*

Rinderserumalbumin (BSA)

Streptavidin-HRP

TEMED

Tetramethylbenzidin (TMB)

Hersteller

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Rockford, IL, USA

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe

Healthcare, Freiburg

Merck KGaA, Darmstadt

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

GE Healthcare, Freiburg

GE Healthcare, Freiburg

Merck KGaA, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Fermentas, St. Leon-Rot

Buffer Pierce, Rockford, IL, USA

Serva Feinbiochemika, Heidelberg

DAKO, Glostrup, Dänemark

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (99,8 %)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

Kits

Kit	Hersteller
IL-10 DuoSet® ELISA Development Kits	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Labeling</i> Kits (für Antikörper)	Molecular Probes/Invitrogen, Leiden, Netherlands

2.1.3.3 Zellbiologische Arbeiten

Reagenz	Hersteller
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	BD Pharmingen, Heidelberg
Annexin V	BD Pharmingen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
10 mg/mL Gentamycin	PAA, Cölbe
200 mM L-Glutamin (100x)	PAA, Cölbe
1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	PAA, Cölbe
^3H -Thymidin (1 $\mu\text{Ci/mL}$)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Incidin Liquid	Ecolab, Düsseldorf
Lipopolysaccharid (LPS; E. coli 055:B5)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LPS-EB Biotin (<i>E.coli</i> 0111:B4)	InvivoGen, SanDiego, USA
Mausserum	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
<i>Permafluor Aqueous Mounting Medium</i>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
RPMI1640 (ohne L-Glutamin)	PAA, Cölbe
Streptavidin-TRITC	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
Triton X100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
U0126 (MEK1/2 inhibitor)	Cell Signaling Technology/New England Biolabs, Frankfurt

Kits

Kit	Hersteller
B-Zell-Isolationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
B-Zell-Isolationskit	StemCell, Grenoble, Frankreich

2.1.4 Antikörper

B-Zellstimulation

Antikörper

Hamster anti-Maus CD40 (HM40-3)

Ratte anti-Maus Ig κ (187.1)

Hersteller

BD Pharmingen, Heidelberg

BD Pharmingen, Heidelberg

FACS

Antikörper

Ratte anti-Maus CD19-FITC/-PE/-APC (1D3)

Ratte anti-Maus CD1d-PE (1B1)

Ratte anti-Maus CD21-FITC (7G6)

Ratte anti-Maus CD23-APC (B3B4)

Ratte anti-Maus CD83-Alexa488/-Alexa647

Ratte anti-Maus IgM-FITC

Hersteller

BD Pharmingen, Heidelberg

eBioscience, Frankfurt

BD Pharmingen, Heidelberg

Invitrogen, Karlsruhe

BNI, Hamburg

Invitrogen, Karlsruhe

Western Blot

Antikörper

Kaninchen anti-Maus phospho-ERK1/2
(Thr202/Tyr204; DE13.14.4E)

rabbit anti-mouse ERK1/2 (clone 137F5)

Ziege anti-Kaninchen-HRP

Hersteller

Cell Signaling Technology/New
England Biolabs, Frankfurt

Cell Signaling Technology/New
England Biolabs, Frankfurt

DAKO, Glostrup, Dänemark

Kolokalisation

Antikörper

anti-mouse CD83

(Michel-19)-Alexa488/-Alexa647

Ratte IgG1-FITC/-PE (R3-34)

Hersteller

BNI, Hamburg

BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.5 Mausstämme

Mausstamm	Herkunft	Beschreibung
C57BL/6J (Wt)	BNI, Hamburg	H-2b
CD83Tg	BNI, Hamburg	H-2b; transgene Maus; exprimiert unter der Kontrolle des MHC-I Promotors membranständiges CD83
IL-10eGFP Reportermaus	Dr. Matthias Haury und Dr. Dinis Calado, Instituto Gulbenkian de Ciência, Portugal	exprimiert eGFP, gekoppelt an die IL-10 Expression durch eine IRES-Sequenz

2.1.6 Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurden hitze-unempfindliche Lösungen autoklaviert (135°C, 2 bar, 20 min) und hitze-empfindliche Lösungen steril filtriert (Porengröße 0.22 µm). FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 30min bei 56°C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.6.1 Allgemeine Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
20x PBS	32 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 5.3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 164 g NaCl ad 1 L H_2O für 1x PBS ergibt sich hiermit pH 7.2

2.1.6.2 Molekularbiologische Arbeiten

Lösung	Zusammensetzung
ELISA-Beschichtungspuffer	Lösung A: 10 mM Na_2CO_3 Lösung B: 20 mM NaHCO_3 Lösungen werden bis zum Erreichen von pH 9.6 gemischt
ELISA-Blockpuffer	1x PBS mit 1 % BSA (w/v)
ELISA-Stopplösung	2 M H_2SO_4

Lösung**Zusammensetzung**

ELISA-Substratpuffer	100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ pH 5.5
ELISA-Substratlösung	12 mL ELISA-Substratpuffer 200 μL ELISA-TMB-Lösung 1,2 μL 30 % H_2O_2
ELISA-TMB-Lösung	30 mg TMB 5 mL Dimethylsulfoxid (DMSO)
ELISA-Waschpuffer	1x PBS mit 0.05 % (v/v) Tween20
Ethidiumbromidlösung	10 mg/mL Ethidiumbromid in H_2O
10x TBE	0.89 M Tris-Base 0.89 M Borsäure (H_3BO_3) 20 mM EDTA pH 8.0

2.1.6.3 Biochemische Arbeiten

Lösung

Zusammensetzung

Polyacrylamidgelelektrophorese

10x Laufpuffer

31 g Tris-Base

140 g Glycin

10 g SDS

ad 1 L H₂O

4x Lower

18 g Tris-Base

4 mL 10 % SDS

ad 100 mL H₂O

pH 8.8

Sammelgel

1.25 mL 4x Upper

0.8 mL Acrylamid (30 %)/ Bisacrylamid (0,8 %)

3 mL H₂O

50 µL 10 % APS

5 µL TEMED

5x SDS-Ladepuffer

50 mM Tris-Base

2 % SDS

5 % Glycerin

wenig Bromphenolblau

1 M DTT

pH 6.8

Trenngel (10%)

2.5 mL 4x Lower

3.5 mL Acrylamid (30 %)/ Bisacrylamid (0,8 %)

4 mL H₂O

100 µL 10 % APS

12.5 µL TEMED

4x Upper

6.06 g Tris-Base

4 mL 10 % SDS

ad 100 mL H₂O, pH 6.8

Western Blot

Blockpuffer	4 % Magermilchpulver in Waschpuffer
10x CAPS Stammlösung	0.05 M CAPS pH 11.0
1x CAPS-Puffer	100 mL 10x CAPS 100 ml Methanol ad 1 L H ₂ O
Waschpuffer	0.1 % Tween 20 in 1x PBS

Southern Blot

Denaturierungspuffer	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
100x Denhardt's	10 g Ficoll 400 10 g Polyvinylpyrrolidon K30 10 g BSA ad Aqua auf 500 mL
Depurinierungspuffer	0.25 M HCl
Neutralisationspuffer	0.5 M Tris-HCl 1.5 M NaCl
20x SSC	3 M NaCl 0.3 M Na-Citrat ph 7.0
Waschpuffer	2x SSC 0.1 % SDS

	5x SSC
	5x Denhardt's
Hybridisierungspuffer	25mM NaH ₂ PO ₄ , pH 6.5
	0.1 % SDS
	100 µg/ml einzelsträngige Heringssperma-DNS

2.1.6.4 Zellbiologische Arbeiten

Lösung	Zusammensetzung
	0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4)
	1.4 M NaCl
Annexin-V-Bindungspuffer	25 mM CaCl ₂
	Aqua dest
CFSE-Stammlösung	5 mM in DMSO
	10 % (v/v) 0.1 M Tris/HCl, pH 7.5
Erythrozytenlysepuffer	90 % (v/v) 0.16 M NH ₄ Cl
	1x PBS mit 1 % FCS und 0,1 %
FACS-Puffer	Natriumazid (NaN ₃)
FACS-Zellfixierer (PFA)	1x PBS mit 1 % Paraformaldehyd
	1x PBS mit 0,5 % BSA
MACS-Puffer	2 mM EDTA
	500 mL RPMI 1640
	50 mL FCS
	10 mL 1 M HEPES
RPMI/10 % FCS	10 mL 200 mM L-Glutamin
	2.5 mL 10 mg/mL Gentamycin
Trypanblau-Lösung	2 mg Trypanblau in 100 mL 1xPBS
	100 mM Tris
	5 mM EDTA
Zelllyse-Puffer	0.2 % SDS
	200 mM NaCl

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiochemische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht mit Hilfe hitzestabiler DNS-Polymerasen eine selektive Amplifikation von DNS-Sequenzen [108]. Die Methode beruht auf einem sich wiederholenden Zyklus aus drei aufeinanderfolgenden Schritten. Die Denaturierung der Ziel-Desoxyribonukleinsäure (DNS) erfolgt bei einer Temperatur von 94°C. Hierauf folgt die als *annealing* bezeichnete sequenzspezifische Anlagerung von zwei Oligonukleotid-Primern an die denaturierten DNS-Einzelstränge. Die gewählte *annealing*-Temperatur ist von der Länge und der Purin/Pyrimidin-Zusammensetzung der Primer abhängig. Nach der Wallace-Regel lässt sich die Schmelztemperatur (T_M) eines Primers wie folgt berechnen: $T_M = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$. Ausgehend von diesen Primern synthetisieren hitzestabile DNS-Polymerasen bei der Elongation komplementäre DNS-Stränge in 5' zu 3'-Richtung. Dieser Elongationsschritt erfolgt im Temperaturoptimum der *Thermophilus aquaticus* (Taq)-Polymerase bei etwa 72 °C. Der Zyklus aus Denaturierung, *annealing* und Elongation wird mehrmals wiederholt, wodurch die Menge der amplifizierten DNS-Sequenz exponentiell zunimmt. Die automatisierte zyklische Synthese erfolgte in einem programmierbaren Heizsystem (Thermocycler). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden autoklavierte Reaktionsgefäße sowie gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Reaktionsmischungen folgendermaßen angesetzt:

PCR-Mix	Volumen
10x Taq-Puffer (+KCl, -MgCl ₂)	2.0 µL
25 mM MgCl ₂	2.0 µL
10 pmol/µl Primer <i>forward</i>	2.5 µL
10 pmol/µl Primer <i>reverse</i>	2.5 µL
2 mM dNTP-Mischung	2.5 µL
DNS- <i>template</i>	1.0 µL
Taq DNS Polymerase 1 U/µL	0.2 µL
ddH ₂ O	7.3 µL

Als Negativkontrolle diente stets ein Ansatz mit Wasser anstelle des DNS-Templates. Folgende Programmeinstellungen wurden für die PCR des IL10eGFP-Transgens und der ROSA83KI-PCR verwendet:

IL10eGFP-PCR	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Wiederholung
Denaturierung	4	94	1x
Denaturierung	0.5	95	
<i>Annealing</i>	1	55	35x
Elongation	1	72	
Elongation	10	72	1x

ROSA83KI-PCR	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Wiederholung
Denaturierung	3	95	1x
Denaturierung	0.25	95	
<i>Annealing</i>	1.5	50	3x
Elongation	0.5	72	
Elongation	2	72	1x

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Größe. Die Trennung der DNS wird in einem horizontalen Agarosegel über ihre negative Nettoladung erzielt. Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Analyse 1 %-ige Agarosegele mit Tris-Borat/EDTA (TBE)-Laufpuffer verwendet. Die Detektion der DNS-Fragmente im Gel erfolgte mit 0.2 µg/ml Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid), welches beim Gießen des Gels zugesetzt wurde. Ethidiumbromid interkaliert in die DNS-Doppelhelix und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von circa 590 nm bei Anregung mit UV-Licht von 302 nm. Die Proben wurden vor der Auftrennung mit 6x Ladepuffer versetzt. Zur Größenbestimmung der DNS-Proben wurden 5 µl des Größenstandards GeneRuler 1 kb Plus DNS Ladder oder GeneRuler 100 bp Plus DNS Ladder verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 80-100 V durchgeführt. Die Überprüfung und Dokumentation der Agarosegele erfolgte mittels eines UV-Flächenstrahlers, einer Kamera und der Software Quantity One.

2.2.1.3 Restriktionsverdau von DNS

Restriktionsendonukleasen bakteriellen Ursprungs binden doppelsträngige DNS an spezifischen Erkennungssequenzen und spalten in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung hydrolytisch auf. In der Molekularbiologie werden in erster Linie Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die meist palindromische DNS-Motive von 4 bis 8 bp erkennen und innerhalb dieser Sequenz schneiden. Die Durchführung der Restriktionen der genomischen DNS der Stammzellklone erfolgte in der 96-Loch-Platte mit dem Restriktionsenzym EcoRI nach folgendem Schema:

Komponente	Volumen
10x Enzympuffer	10µl
EcoRI	2µl
ddH ₂ O	8µl

Reaktionsmix wurde auf präzipitierte DNS pipettiert

Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach 24 h wurden zusätzlich 2 µl Enzympuffer und 1 µl EcoRI zugegeben und weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung im Agarosegel.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse der ERK1/2-Aktivierung im Western Blot wurden Zelllysate stimulierter B-Zellen hergestellt. 2×10^5 bis 2×10^6 Zellen wurden nach Stimulation durch Zentrifugation bei 1200 rpm für fünf Minuten bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 25 µL Zelllysepuffer resuspendiert und dieser Ansatz 30-45 min auf Eis inkubiert. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurde eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Analyse in einer SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.2.3) elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Als Bradford-Assay bezeichnet man den Nachweis von Proteinen in Lösung mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau. In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Grund hierfür ist die unspezifische Bindung des Farbstoffs an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung wurde eine BSA-Verdünnungsreihe ($c_{\max} = 2$ mg/mL) in 1x PBS als Standard angesetzt, dessen Absorption ebenfalls bei 595 nm gemessen wurde. Nach Erstellung einer Standardkurve kann die Proteinkonzentration der unbekannten Probe direkt abgelesen werden. Für die Messung wurden die Proben (1:10) und BSA in PBS in einem Volumen von 20 µL eingesetzt. Diese wurden in einer 96-Loch-Platte mit 250 µL Bradford-Reagenz versetzt und unmittelbar nach Durchmischen im ELISA-Lesegerät bei 595 nm vermessen.

2.2.2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen auf Grund ihres Molekulargewichts im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei SDS (Natriumdodecylsulfat) handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das über seinen unpolaren Molekülteil mit unpolaren Seitenketten der Proteine interagiert. Der entstandene Komplex aus SDS

und denaturiertem Protein weist eine stark negative Ladung auf, die der Masse des Proteins in etwa proportional ist. Die durch das gebundene SDS erworbene negative Ladung ist meist wesentlich größer als die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins. Somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel in Richtung der Anode ausschließlich von der Molekülgröße abhängig. Bei der diskontinuierlichen PAGE passieren die Proteine zuerst ein Sammelgel, das grobmaschiger ist als das folgende Trenngel. Das Sammelgel hat einen pH-Wert von 6,8, der sehr nahe dem isoelektrischen Punkt des im Lauffuffer enthaltenen Glycins liegt. Das Glycin liegt hier demnach als Zwitterion vor und weist deshalb eine geringere Mobilität als die im Sammelgel enthaltenen Chloridionen auf. Zwischen den Lauffronten der Chloridionen und des Glycins bilden sich auf Grund der Potentialdifferenz Proteinstapel aus, welche alle gleich schnell wandern. Bei Erreichen des Trenngels nimmt der pH-Wert auf 8,8 zu, das Glycin geht in den geladenen Glycinat-Zustand über und überholt die Proteinfront. Die Proteine sind nun dem Siebeffekt des engporigen Sammelgels ausgesetzt und werden daher ihrer molekularen Größe nach aufgetrennt.

Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 5x konzentriertem Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert, bevor sie auf das Polyacrylamidgel geladen wurden. Die darauf folgende Elektrophorese erfolgte für 15 min bei 70 V und anschließend bei 120 V. Diese wurde beendet, sobald die Laufmittelfront den unteren Gelrand erreichte. Sammel- und Trenngel setzten sich dabei wie unter Abschnitt 2.4.3 beschrieben zusammen.

2.2.2.4 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen können diese nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran transferiert und gleichzeitig immobilisiert werden. Das elektrische Feld wird senkrecht zur Laufrichtung der Proteine im Gel angelegt, sodass die SDS-beladenen Proteine in Richtung der Anode wandern. Sie nehmen hierdurch auf der Membran die gleiche Position wie im ursprünglichen Gel ein. Die Detektion der immobilisierten Proteine kann direkt mit Hilfe spezifischer Antikörper erfolgen. Der Transfer erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen durch Semi-Dry-Western *blotting*. Dabei werden das Gel und die Membran, flankiert von je drei Whatman-Filterpapieren, zwischen den Plattenelektroden der Semi-Dry-Blot-Apparatur positioniert. Für den Aufbau wurden das Gel, die Membran und die Filterpapiere in 1x CAPS-Puffer getränkt. Der Transfer erfolgte bei konstantem Strom (1 mA pro cm² Blotfläche) für 45 min.

2.2.2.5 Immunodetektion von Proteinen mit Chemilumineszenz (ECL)

Die immobilisierten Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurden mit Antikörpern und Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern, die

gegen den Fc-Teil des jeweiligen primären Antikörpers gerichtet sind, nachgewiesen. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diazylhydrazid. Die hierbei frei werdende Energie, die in Form von Licht einer Wellenlänge von 426nm emittiert wird, kann mit Hilfe von Chemilumineszenz-Lesegeräten detektiert werden.

Die Nitrocellulosemembran wurde im ersten Schritt für 2 h bei RT in 1 % TBS/4 % Milchpulver gelockt. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Schütteln. Anschließend wurde der primäre Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1% TBS/0.01 %Tween20 für je 10 min wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem HRP-gekoppeltem sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen folgte die Detektion mit Hilfe des ECL-Detektionssystems. Die beiden Detektionslösungen des Kits wurden hierfür im Verhältnis 1:1 gemischt, der Blot eine Minute in der Reaktionslösung inkubiert und die Chemilumineszenz im Geldokumentationsgerät Fusion SL4 analysiert. Folgende Tabelle zeigt alle verwendete Antikörper und Verdünnungen:

Antikörper	Verdünnung
anti-pERK1/2-Antikörper	1:1000
anti-ERK1/2-Antikörper	1:1000
anti-Kaninchen-HRP	1:2000

2.2.2.6 Ablösen von Protein-Komplexen von Nitrocellulosemembranen (*stripping*)

Zur mehrmaligen Detektion von Proteinen mittels verschiedener Antikörper auf einer Nitrocellulosemembran müssen bereits gebundene Protein-Komplexe abgelöst werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Restore™Plus Western Blotting Stripping Buffer. Hiermit können hoch affine Antikörper von der Membran entfernt werden, ohne die auf die Membran transferierten Proteine abzulösen. Die Nitrocellulosemembran wurde einmal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Stripping-Puffer überdeckt. Nach 15 minütiger Inkubation unter Schütteln des Blots bei Raumtemperatur wurde die Membran dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit 1x PBS/4% Milchpulver/1 %Tween20 abgesättigt und die Proteine erneut detektiert.

2.2.2.7 Southern Blot

Ziel des Southern Blots ist es, DNS-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennt wurden, auf einer N⁺-geladenen Membran zu fixieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNS-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. Vor dem Blotten muss das Gel vorbehandelt werden. Um Fragmente über 5 kb Länge effizient auf die Membran zu transferieren, wurde das Gel zunächst für 30 min in 0.25 M HCl schüttelnd inkubiert. Dadurch wird die DNS teilweise depuriniert und zerbricht dann

in kleinere Fragmente. Anschließend wird die DNS durch eine 30-minütige Inkubation in Denaturierungslösung denaturiert und im letzten Schritt 30min in einer Neutralisationslösung inkubiert.

Unter Ausnutzung der Kapillarkräfte wird 20x SSC-Puffer durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Dafür wurden auf einer Glasplatte zunächst 3 Lagen Whatman-Filterpapieren, darauf das Agarosegel, dann die Membran und darüber wieder 3 Lagen Filterpapier gelegt. Die unteren Filterpapiere hängen dabei mit den Enden in einer Wanne, welche mit 20x SSC-Puffer gefüllt ist. Schließlich folgten mehrere Lagen Papiertücher und eine kleine Glasplatte, auf die kleine Gewichte gestellt werden. Es muss darauf geachtet werden, dass der Transferpuffer nicht am Gel vorbei läuft. Nach etwa 14h wird die Konstruktion abgebaut und die Membran getrocknet.

2.2.2.8 Detektion der DNS mittels einer radioaktiv-markierten Sonde

Die N⁺-Nitrocellulosemembran, auf welche die DNA wie in Abschnitt 2.2.2.7 beschrieben, transferiert wurde, muss zunächst geblockt werden, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Dazu wurde die Membran 30 min in einer 10 %igen SDS-Lösung inkubiert. Die Hybridisierung mit der ³²P-Sonde [109] erfolgte in der Hybridisierungslösung. Dafür wurde die Membran in eine Plastikschiene mit Deckel transferiert und bei 65°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer Waschlösung 2x 15 min bei 65°C gewaschen. Für die Detektion der DNA-Fragmente wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und für mindestens 3 h exponiert.

2.2.2.9 ELISA zum Nachweis von IL-10 im Zellkulturüberstand

Der Nachweis von IL-10 im Zellkulturüberstand erfolgte mithilfe eines Sandwich-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) durch den Einsatz zweier hochspezifischer Antikörper, welche je an unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Antigens binden. Im ersten Schritt wurde eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte mit einem anti-IL10 Antikörper beschichtet. Hierfür wurden je 50 µl anti-IL-10 (1:180 DuoSet ELISA-Kit; R&D Systems) in ELISA-Beschichtungspuffer pro Ansatz aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt und freie Oberflächenbindungsstellen mit 100 µl ELISA-Blockpuffer über zwei Stunden bei RT blockiert. Nach Entfernen des ELISA-Blockpuffers wurden im nächsten Schritt 50 µl der unverdünnten Zellkulturüberstände (Dreifachwerte), sowie Doppelwerte der jeweiligen Konzentration des Zytokinstandards pipettiert. Die Bindung von IL-10 an den immobilisierten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Für den Nachweis des gebundenen IL-10 wurden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet. Für diesen zweiten Bindungsschritt wurden die Platten nach dem Waschen mit 50 µl des IL-10 Biotin-Antikörpers in 1x PBS/0.1 % BSA für eine Stunde bei RT inkubiert.

(1:180 DuoSet ELISA-Kit; R&D Systems). Nach viermaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer erfolgte die Bindung eines Streptavidin-HRP (*horse radish peroxidase*)-Konjugats. Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:200 in 1x PBS/0.1% BSA und einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Die Bindung erfolgte über eine Stunde bei RT. Nach viermaligem Waschen wurden je 100 µl ELISA-TMB-Substratlösung pipettiert und die Reaktion, nach Erreichen einer ausreichenden Färbung, durch Zugabe von 25 µl ELISA-Stopplösung gestoppt. Die Detektion erfolgte unmittelbar im Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm. Die Zytokinkonzentration wurde dabei mithilfe der Standardreihe berechnet.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Grundsätze der Zellkultur

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur wurden in der sterilen Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Dabei wurden sterilisierte Glaswaren und Lösungen sowie sterile Einmal-Plastikwaren verwendet, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu verhindern. Materialien und Lösungen wurden dazu in feuchter Hitze (134°C) und bei 2.0-2.2 bar über 20 min autoklaviert. Glasmaterial wurde über drei Stunden bei 180°C sterilisiert. Die Kultivierung und Stimulation von Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C unter 5 %iger CO₂-Begasung. Wasch- und Pelletierschritte erfolgten für 5 min bei 300x g und 4°C.

2.2.3.2 Präparation muriner Milzzellen

Die Milz einer Maus wurde unter sterilen Bedingungen präpariert und in einer Petrischale in 10 ml Vollmedium mit dem Stempel einer 5 ml-Einmalspritze zerrieben. Das zerriebene Gewebe wurde anschließend durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, um grobes unzerriebenes Gewebe abzutrennen. Die Zellen wurden pelletiert und anschließend in 5 ml Erythrozytenlysepuffer für 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse der Erythrozyten wurde mit 20 ml Vollmedium gestoppt und nach dreimaligem Waschen in 10 ml Vollmedium wurde die Zellzahl bestimmt.

2.2.3.3 Präparation muriner peripherer Blutzellen

Durch submandibuläre Punktion wurde Mäusen etwa 30 µl Blut entnommen und direkt in EDTA-beschichtete Röhrchen überführt, um eine Agglutination zu verhindern. Die Erythrozytenlyse erfolgte mit 4 ml Lysispuffer in FACS-Röhrchen für 8-10 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und nochmals in 1x PBS gewaschen.

2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde Trypanblau verwendet. Da Trypanblau nur durch eine poröse Zellmembran toter Zellen dringt, lassen sich tote tiefblaue Zellen von ungefärbten lebenden Zellen im Mikroskop unterscheiden. Aufgrund der Zytotoxizität von Trypanblau musste die Zellzahlermittlung unmittelbar nach der Färbung erfolgen. Diese erfolgte in einer Neubauer-Zellkammer mit definiertem Volumen. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension zu 80 µl Trypanblau pipettiert und auf die Zählkammer, welche mit einem Deckglas bedeckt wurde, gegeben. Die Zellzahl ergibt sich aus der Multiplikation der gezählten Zellen mit dem Kammerfaktor (10^4) und dem Verdünnungsfaktor (1:5).

2.2.3.5 Anreicherung von B-Zellen aus Milzpräparationen

Die Anreicherung der B-Zellen aus einer murinen Milz erfolgte zunächst mithilfe des B-Zellisolation-Kits von Miltenyi. Dabei wurden B-Zellen negativ selektiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Reagenzien. Das Zellpellet einer Milz (etwa 1×10^8 Zellen) wurde in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl biotinylierter Antikörper, welche nicht-B-Zellen markieren, und der Ansatz wurde für 15 min bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 300 µl MACS-Puffer sowie 200 µl magnetische anti-Biotin-Partikel zugegeben und erneut für 15 min bei 4°C inkubiert. Nachdem die Zellen mit 20 ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert wurden, wurden diese über eine LS-Säule gegeben. Diese LS-Säule wurde vorher mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert und an einen magnetischen Ständer gekoppelt. Der Durchlauf mit den angereicherten B-Zellen wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend wurden 3x3 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und ebenfalls aufgefangen. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in entsprechendem Volumen in Vollmedium resuspendiert. Die Reinheit der B-Zellen wurde durch eine spezifische FACS-Färbung mit anti-CD19 Antikörper ermittelt und betrug 90-95 %.

2.2.3.6 Stimulationsexperimente *in vitro*

Stimulationsexperimente wurden, soweit nicht anders angegeben, in 96-Loch Rundbodenplatten durchgeführt. Das Endvolumen betrug 200 µl. Zu jedem Ansatz wurden Fünffachwerte angesetzt. Der Nachweis von IL-10 erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten durch einen spezifischen IL-10 ELISA (Abschnitt 2.2.2.9), die Proliferation wurde sowohl durch den Einbau von ^3H -Thymidin (Abschnitt 2.2.3.7) also auch durchflusszytometrisch (Abschnitt 2.2.3.8) bestimmt. Der Nachweis von Oberflächenmolekülen erfolgte durchflusszytometrisch (Abschnitt 2.2.3.9). Um den Einfluss des Inhibitors U0126 auf die B-Zellaktivierung zu untersuchen, wurden die B-Zellen vor der Zugabe der Stimuli mit diesem für 30 min bei RT inkubiert. Die Tabelle gibt einen Überblick über alle verwendeten Stimuli und Konzentrationen:

Stimulus	Konzentration
LPS	10 µg/ml
anti-Ig α -Antikörper	2 µg/ml
anti-CD40-Antikörper	2 µg/ml
U0126	20 µM

2.2.3.7 Nachweis der Proliferation durch den Einbau von ^3H -Thymidin

Durch die Zugabe von radioaktivem Tritium (^3H)-markiertem Thymidin zum Vollmedium, wird dieses während der Zellteilung in neusynthetisierte DNS eingebaut und ermöglicht die Analyse der Proliferation. Dabei ist die Einbaurate proportional zur Zellproliferation. Der Nachteil dieser Methode ist, dass zum Einen keine Aussagen über die Proliferation auf Einzelzellniveau gemacht werden können und zum Anderen unklar ist, ob ein reduzierter ^3H -Thymidin-Einbau aufgrund einer reduzierten Zellproliferation gemessen wurde oder ob durch Zelltod weniger Zellen proliferierten. Nach 48 h *in vitro* Stimulation wurden 150 µl Kulturüberstand abgenommen und mit 125 µl frischem Vollmedium ersetzt. Zusätzlich wurden 25 µl ^3H -Thymidin-enthaltendes Vollmedium zugegeben. Nach 17 h Inkubation bei 37°C wurde die eingebaute Radioaktivität gemessen. Dafür wurden die Zellen aus der Rundbodenplatte mithilfe eines Zellerntegerätes entnommen, mit *Aqua dest.* lysiert und dabei auf einen Glasfaserfilter übertragen. Freies ^3H -Thymidin wurde ausgewaschen, während die DNS mit eingebauten ^3H -Thymidin im Filter hängen blieb. Der getrocknete Filter wurde mit 5ml Szintillationsflüssigkeit befeuchtet, um die β -Strahlung in Lichtblitze umzuwandeln. Die Membran wurde schließlich in eine Folie eingeschweißt und die Messung der Radioaktivität, welche in Zerfälle pro Minute angegeben wurde, erfolgte mithilfe eines Szintillationszählers.

2.2.3.8 Nachweis der Proliferation durch Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE

Die Methode der CFSE-Färbung ermöglicht sowohl die Analyse der Zellproliferation auf Einzelzellniveau als auch die Unterscheidung von lebenden und apoptotischen oder nekrotischen Zellen. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE bindet kovalent an Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine. Bei einer Zellteilung wird dadurch der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen halbiert. Bei den durchflusszytometrischen Analysen kann somit anhand der Fluoreszenzintensität ermittelt werden, wieviele Teilungsschritte eine Zelle bereits durchlaufen hat. Für die Markierung mit CFSE wurden 1×10^7 B-Zellen in 10 ml 1x PBS mit 3 % FCS suspendiert. Anschließend wurden 200 µl CFSE (1:100 in 1x PBS) hinzugegeben und für 10 Sekunden durchmischt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 37°C im Dunkeln. Die Färbung wurde schließlich mit 40 ml 1x PBS/3 % FCS abgestoppt. Überschüssiges CFSE wurde dreimaliges Waschen mit je 10 ml eiskaltem PBS entfernt. Als Kontrolle der Färbung wurden 1×10^5 Zellen entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3.9 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)

Bei der Durchflusszytometrie kann die Expression von Oberflächenmolekülen durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper quantitativ bestimmt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome waren Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Alexa488, Alexa647, Phycoerythrin (PE) sowie Allophycocyanin (APC). Die Verwendung mehrerer unterschiedlich markierter Antikörper ermöglicht den Nachweis mehrerer Antigene auf einer Zelle. Im Durchflusszytometer passieren einzelne Zellen einen Laserstrahl, wodurch die Streuungseffekte und Fluoreszenzen gemessen werden. Dabei ist das Vorwärtstreulicht (forward scatter, FCS) ein Maß für die Zellgröße, wohingegen das Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC) die intrazelluläre Granularität misst. Pro Färbung wurden 2×10^5 Zellen eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Zur Absättigung der Fc-Rezeptoren wurden die pelletierten Zellen zunächst für 15 min mit 10 % (v/v) Mausserum in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der in FACS-Puffer verdünnten spezifischen Antikörper und eine Inkubation für mindestens 30 min. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen. War der erste Antikörper biotinyliert, folgte im nächsten Schritt die Inkubation mit einem Streptavidin-gekoppelten Antikörper für 30 min mit anschließendem Waschschritt. Schließlich wurden die Zellen entweder in 200 µl 1x PBS/1% PFA oder nur 1x PBS aufgenommen. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer Accuri und die Auswertung wurde mit der Software FlowJo durchgeführt.

Antikörper	Verdünnung
Ratte anti-Maus CD19-FITC/-PE/-APC (1D3)	1:200
Ratte anti-Maus CD1d-PE (1B1)	1:200
Ratte anti-Maus CD21-FITC (7G6)	1:200
Ratte anti-Maus CD23-APC (B3B4)	1:200
Ratte anti-Maus CD83-Alexa488/-Alexa647	1:200 bzw 1:500

2.2.3.10 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen

Um den Anteil apoptotischer Zellen von naiven und stimulierten B-Zellen zu bestimmen, wurde Annexin V und 7-AAD verwendet. 7-AAD durchdringt die Zellmembran von nicht-viablen Zellen und interkaliert in die DNS. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches bei vitalen Zellen an der Membranninnenseite lokalisiert ist und nur bei apoptotischen Zellen auf die Zelloberfläche gelangt. Durch die Doppelfärbung mit 7-AAD und Annexin V kann das Apoptosestadium bestimmt werden. Naive und für 24 h und 48 h stimulierte B-Zellen wurden geerntet und in Annexin V-Bindungspuffer auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Färbung von 100 µl dieser Zelluspension erfolgte in FACS-Röhrchen. Nach Zugabe von 5 µl FITC-konjugiertem Annexin V sowie CD23-APC (1:200) zu den Zellen wurden diese für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Annexin V-Bindungspuffer gewaschen. Im nächsten

Schritt folgte die Inkubation der Zellansätze mit 10 µl 7-AAD bei RT. Nach Zugabe von 180 µl Annexin V-Bindungspuffer erfolgte die Analyse der Frequenz apoptotischer Zellen der CD23⁺ und CD23⁻ B-Zellfraktion durchflusszytometrisch.

2.2.3.11 Kolokalisationsstudien

Für den Nachweis von Interaktionen zwischen zwei Molekülen, können Kolokalisationsstudien mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Für die Untersuchung der Interaktion von CD83 mit dem LPS-Rezeptorkomplex wurden 2×10^5 RAW264.7-Makrophagen in 6-Kammer-Objektträger mit und ohne LPS für 4 h bei 37°C kultiviert, um die Hochregulierung von CD83 zu stimulieren. Für die Absättigung der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen in 100 µl 1x PBS/10% Mausserum für 15 min bei 4°C inkubiert. Um den LPS-Rezeptorkomplex zu vernetzen, erfolgte zunächst die Inkubation mit 10 µg/ml biotinyliertem LPS für 15 min bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen und für 15 min bei 37°C mit Streptavidin-Tetramethylrhodamin-5- (und 6)-Isothiocyanat (TRITC, 1:1000) inkubiert. Kontrollzellen wurden mit den gleichen Reagenzien bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen erfolgte schließlich die Färbung mit einem anti-CD83-Alexa488 Antikörper (1:200) und 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, 1:1000) für 30 min bei 4°C. Nach dem finalen Waschschrift wurden die Zellen in 1x PBS/1% PFA fixiert und mit Permafluor bedeckt. Die Analyse der Kolokalisation erfolgte mit dem Axioskop 2 Plus Mikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) und der Software OpenLab 5.0.1 (Improvision, Coventry, UK).

2.2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde der *student's t-test (unpaired, two-tailed)* durchgeführt. Für alle statistischen Analysen wurde das Programm GraphPrism 4.0 verwendet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des transmembranen Glykoproteins CD83 auf die Aktivierung und Funktion muriner B-Zellen *in vitro* untersucht. Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil wird der Einfluss von CD83 auf die Immunantwort unterschiedlicher B-Zellsubpopulationen nach Ligation des BZR sowie des TLR4 beschrieben. Dabei wurde zwischen reifen FO und MZ sowie den unreifen TN B-Zellen unterschieden. Für diese Analysen wurde eine CD83Tg Maus verwendet, welche CD83 unter dem MHC-Klasse I Promotor auf allen kernhaltigen Zellen überexprimiert. Im zweiten Teil wird die Herstellung einer konditionellen CD83KI Maus beschrieben, welche eine gezielte Überexpression von CD83 auf definierten Zellpopulationen ermöglicht.

3.1 Teil 1: Einfluss von CD83 auf die Funktion verschiedener B-Zellsubpopulationen

3.1.1 CD83Tg B-Zellen zeigen eine reduzierte Proliferation nach BZR-, aber nicht nach TLR4-Engagement

Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass CD83Tg B-Zellen nach TLR4- und BZR-Engagement eine gegenüber Wt B-Zellen signifikant reduzierte ³H-Thymidin-Inkorporation zeigen, welche als reduzierte Proliferation interpretiert wurde [103]. Zunächst sollte die proliferative Antwort nach TLR4- und BZR-Engagement reanalysiert werden. Dafür wurden gereinigte B-Zellen aus der Milz von Wt und CD83Tg Mäusen über den BZR durch Zugabe von anti-Ig α und anti-CD40-Antikörper oder über den TLR4 durch Zugabe von LPS stimuliert. Als Kontrolle dienten in Medium kultivierte naive B-Zellen. Die Proliferation wurde anhand der ³H-Thymidin-Inkorporation gemessen. Im Vergleich zu Wt B-Zellen zeigten CD83Tg B-Zellen 48 h nach BZR-Ligation einen um etwa 70 % reduzierten Einbau von ³H-Thymidin (Abbildung 3.1.1 A). Um auszuschließen, dass dies auf unterschiedlich starker Expression des IgM BZR beruhte, wurde die Expression von IgM auf unstimulierten Wt und CD83Tg B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 3.1.1 B zeigt, dass CD83Tg B-Zellen vergleichbar viel IgM auf der Oberfläche exprimieren wie Wt B-Zellen. Der reduzierte ³H-Thymidin-Einbau ist deshalb nicht auf eine veränderte IgM-Expression zurückzuführen.

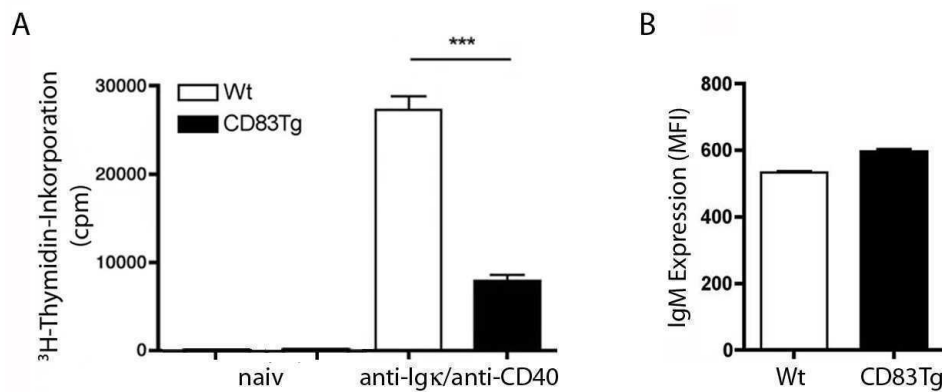
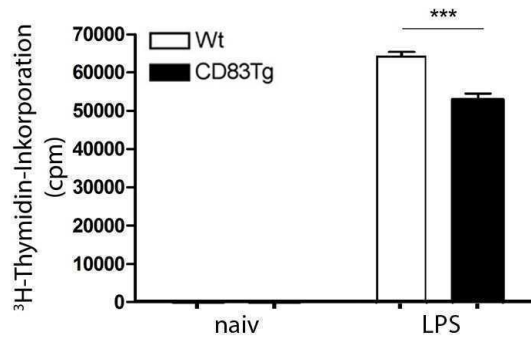


Abbildung 3.1.1: CD83Tg B-Zellen zeigen eine reduzierte ³H-Thymidin-Inkorporation nach BZR-Engagement. **A:** 2×10^5 B-Zellen aus Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit anti-Igk/anti-CD40 (je 2 μ g/ml) oder in Medium (naiv) für 48 h kultiviert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (*standard error of the mean*, SEM) von drei unabhängigen Experimenten (***) $p < 0.001$. **B:** 2×10^5 naive B-Zellen aus Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit anti-IgM Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IgM-Expression von zwei unabhängigen Experimenten.

Auch nach TLR4-Engagement durch LPS-Stimulation zeigten CD83Tg B-Zellen einen signifikant reduzierten ³H-Thymidin-Einbau gegenüber Wt B-Zellen (Abbildung 3.1.2 A). Jedoch war dieser Unterschied deutlich geringer als nach BZR-Engagement (Abbildung 3.1.1 A). Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf einer veränderten Expression des LPS-Rezeptor-Komplexes auf CD83Tg B-Zellen beruht, wurde die Zelloberflächenbindung von fluoreszenzmarkiertem LPS durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurde zusätzlich, basierend auf der Färbung der Oberflächenmarker CD1d und CD23, zwischen den B-Zellsubpopulationen FO, MZ und TN unterschieden. Die Abbildung 3.1.2 B oben zeigt repräsentativ eine solche Färbung von Wt und CD83Tg B-Zellen 24 h nach LPS-Stimulation. FO B-Zellen wurden als CD23⁺ CD1d^{intermediär}, MZ B-Zellen als CD23⁻ CD1d⁺ und TN B-Zellen als CD23⁻ CD1d⁻ definiert. Die durchflusszytometrische Analyse der LPS-Bindung zeigte, dass nur MZ B-Zellen LPS bereits in naivem Zustand binden. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen Wt und CD83Tg MZ B-Zellen festgestellt. Nach LPS-Zugabe regulierten alle Wt und CD83Tg B-Zellsubpopulationen die Expression des LPS-bindenden Rezeptorkomplexes auf ein vergleichbares Level herauf.

A



B

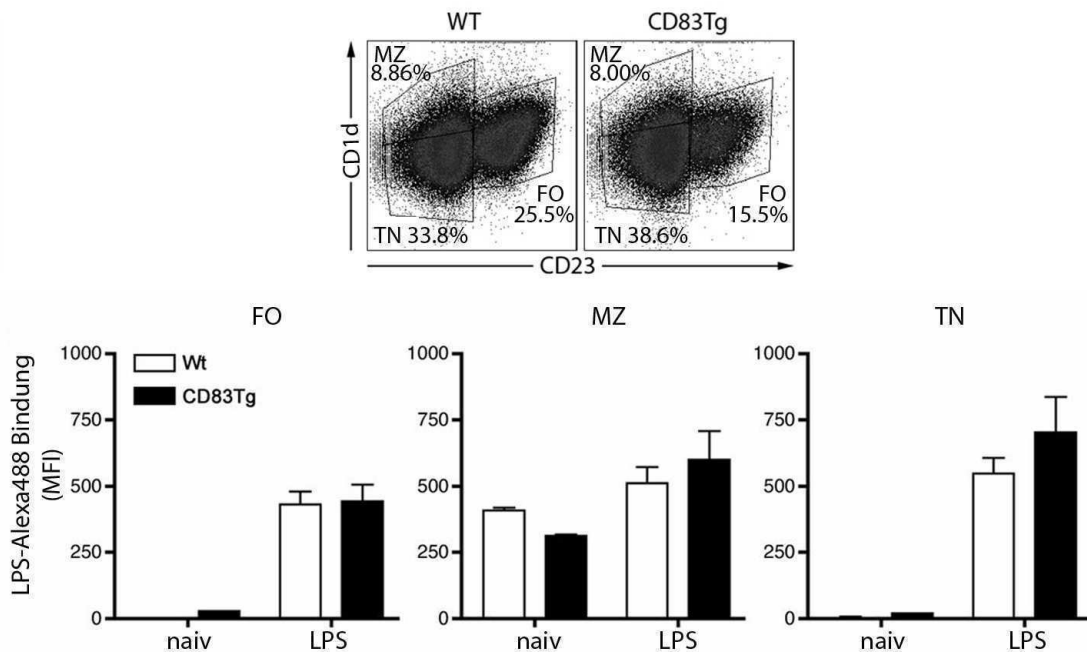


Abbildung 3.1.2: CD83Tg B-Zellen zeigen eine reduzierte ^3H -Thymidin-Inkorporation nach TLR4-Engagement. **A:** 2×10^5 B-Zellen aus Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder in Medium (naiv) für 48 h kultiviert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten (*** $p < 0.001$). **B (oben):** FO, MZ und TN B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden nach Stimulation mit LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) für 24 h anhand der Färbung von CD23 und CD1d unterschieden. **B (unten):** 2×10^5 naive oder 24 h mit LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) stimulierte B-Zellen aus Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit LPS-Alexa488 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die MFI-Mittelwerte und SEM der LPS-Alexa488-Bindung an FO, MZ und TN B-Zellen von zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass CD83Tg B-Zellen sowohl auf das Engagement des BZR als auch des TLR4 mit einer signifikant reduzierten Inkorporation von ^3H -Thymidin antworten. Dieser Effekt ist nicht auf eine veränderte Expression des BZR oder LPS-Rezeptor-Komplexes zurückzuführen.

Eine weitere Methode für die Bestimmung der Proliferation ist die Markierung der Zellen mit CFSE. Nach Stimulation halbiert sich die Fluoreszenzintensität einer CFSE-markierten Zelle bei

jeder Zellteilung, die so durchflusszytometrisch messbar ist. Zusätzlich lässt sich bei dieser Methode durch die Färbung von CD1d und CD23 die proliferative Antwort der FO, MZ und TN B-Zellsubpopulationen unterscheiden. Dafür wurden CFSE-markierte Wt und CD83Tg B-Zellen mit anti-Ig κ /anti-CD40 oder LPS stimuliert und FO, MZ und TN B-Zellen, wie in Abbildung 3.1.2 B gezeigt, differenziert.

Abbildung 3.1.3 A zeigt repräsentativ die Proliferation von B-Zellen^{Gesamt} aus Wt und CD83Tg Mäusen. Nach 72 h anti-Ig κ /anti-CD40 Stimulation befanden sich etwa 21 % der Wt B-Zellen in der ersten Proliferationsrunde, während sich nur etwa 13 % der CD83Tg B-Zellen teilten. Das Diagramm in Abbildung 3.1.3 B verdeutlicht, dass dabei in allen CD83Tg B-Zellsubpopulationen die Frequenz proliferierender CFSE^{niedrig} B-Zellen verglichen mit Wt B-Zellen signifikant um 50-70 % reduziert war .

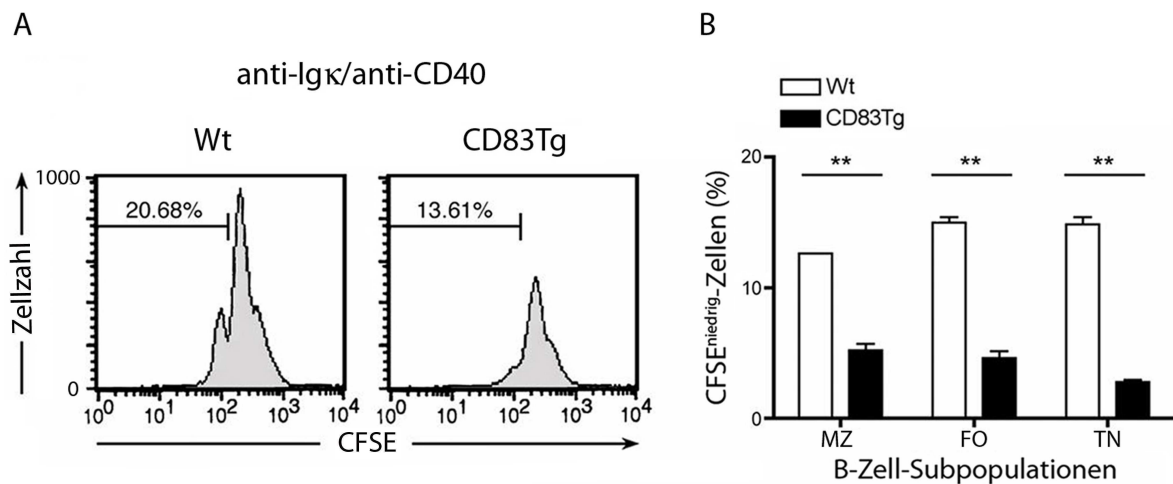


Abbildung 3.1.3: CD83Tg B-Zellen zeigen eine reduzierte Frequenz proliferierender CFSE^{niedrig}-Zellen nach BZR Engagement. **A:** 2×10^5 CFSE-markierte B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit anti-Ig κ /anti-CD40 (je 2 μ g/ml) stimuliert und die CFSE-Verdünnung nach 72 h durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm von drei unabhängigen Experimenten. **B:** 2×10^5 CFSE-markierte B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit anti-Ig κ /anti-CD40 (je 2 μ g/ml) stimuliert und die CFSE-Verdünnung nach 72 h durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich wurde CD1d und CD23 gefärbt, um zwischen MZ, FO und TN B-Zellen zu unterscheiden. Das Diagramm zeigt die Frequenz proliferierender CFSE^{niedrig}-Zellen innerhalb der B-Zellsubpopulationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten (** $p < 0.01$).

Im Gegensatz zu der Stimulation über den BZR zeigten CD83Tg B-Zellen überraschenderweise keine reduzierte Proliferation bei Stimulation mit LPS. Abbildung 3.1.4 A zeigt repräsentativ die Proliferation von B-Zellen^{Gesamt} aus Wt und CD83Tg Mäusen 72 h nach Stimulation mit LPS. Die weitere Unterscheidung von FO, MZ und TN B-Zellen ergab eine vergleichbare Proliferation von Wt und CD83Tg MZ B-Zellen aller Subpopulationen (Abbildung 3.1.4 B).

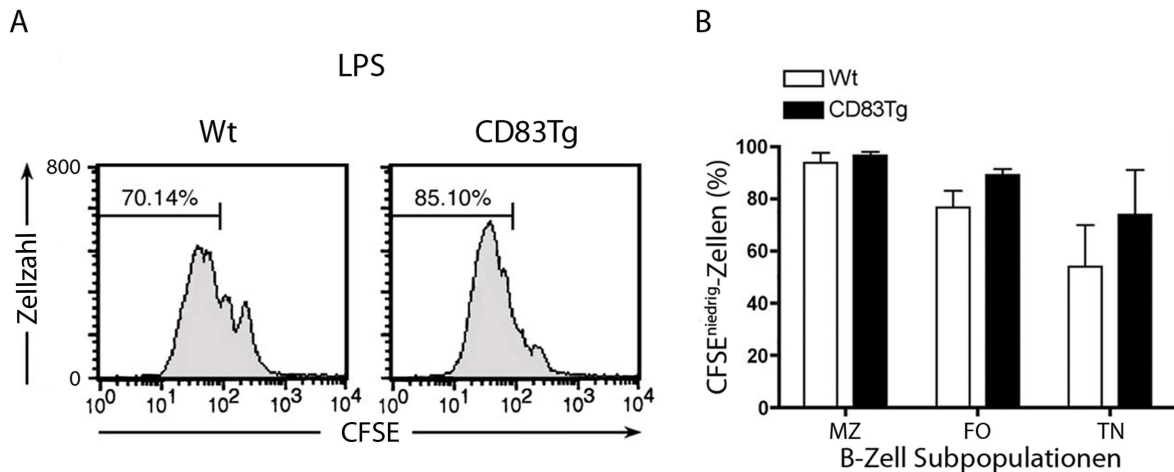


Abbildung 3.1.4: CD83Tg B-Zellen zeigen eine mit Wt B-Zellen vergleichbare Frequenz proliferierender CFSE^{niedrig}-Zellen nach TLR4-Engagement. **A:** 2×10^5 CFSE-markierte B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und die CFSE-Verdünnung nach 72 h durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm von drei unabhängigen Experimenten. **B:** 2×10^5 CFSE-markierte B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit LPS (je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und die CFSE-Verdünnung nach 72 h durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich wurde CD1d und CD23 gefärbt, um zwischen MZ, FO und TN B-Zellen zu unterscheiden. Das Diagramm zeigt die Frequenz proliferierender CFSE^{niedrig}-Zellen innerhalb der B-Zellsubpopulationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, dass CD83Tg B-Zellen aller Subpopulationen auf das Engagement des BZR mit einer signifikant reduzierten Proliferation reagieren, jedoch bei Stimulation mit LPS eine normale proliferative Antwort zeigen.

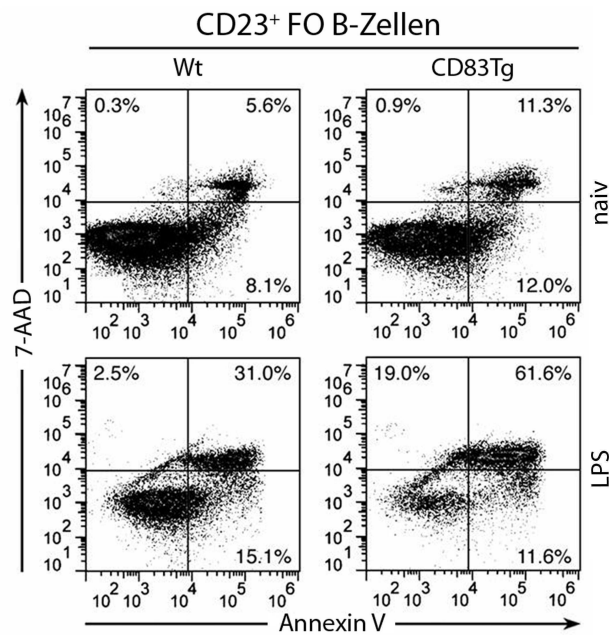
3.1.2 Die Überexpression von CD83 führt zu einer gesteigerten Apoptose von FO B-Zellen

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass CD83Tg B-Zellen bei Stimulation über den BZR, jedoch nicht auf TLR4 Engagement, schlechter proliferieren (Abbildung 3.1.3 und 3.1.4). Dennoch wurde nach TLR4-Engagement ein reduzierter ^3H -Thymidin-Einbau gemessen (Abbildung 3.1.2). Das bedeutet, dass die reduzierte ^3H -Thymidin-Inkorporation von CD83Tg B-Zellen nach LPS-Stimulation nicht eine reduzierte proliferative Reaktion reflektiert. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob CD83Tg B-Zellen vermehrt in Apoptose übergehen und ob es Unterschiede in den B-Zellsubpopulationen hinsichtlich der Apoptoserate gibt. Dafür wurden gereingte B-Zellen mit 7-AAD und Annexin V gefärbt. 7-AAD durchdringt die Zellmembran von nicht-vitalen Zellen und interkaliert in die DNS. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches bei vitalen Zellen an der Membraninnenseite lokalisiert ist und nur bei apoptotischen Zellen auf die Zelloberfläche gelangt. Durch die Doppelfärbung mit 7-AAD und Annexin V kann das Apoptosestadium bestimmt werden. Bei der durchflusszytometrischen

Analyse sind intakte Zellen negativ für beide Färbungen, frühapoptotische Zellen zeigen nur eine positive Annexin V-Färbung und spätapoptotische sind positiv für Annexin V und 7-AAD. Nekrotische Zellen hingegen sind nur positiv für 7-AAD. Zusätzlich wurde CD23 gefärbt, um zwischen der FO-Fraktion (CD23⁺) und der MZ+TN-Fraktion (CD23⁻) zu unterscheiden.

In Abbildung 3.1.5 A ist eine Färbung von naiven und LPS-aktivierten Wt und CD83Tg CD23⁺ FO B-Zellen exemplarisch dargestellt. Innerhalb der FO B-Zellsubpopulation zeigten sich bereits in naivem Zustand Unterschiede: 5-10% der CD83Tg B-Zellen waren spätapoptotisch, wohingegen nur 2.5-5% der Wt B-Zellen in Apoptose gegangen waren. Nach Stimulation mit LPS, anti-Ig κ /anti-CD40 oder nur anti-Ig κ stieg der prozentuale Anteil an apoptotischen FO B-Zellen von Wt und CD83Tg über die Zeit weiterhin (Abbildung 3.1.5 B). Die Frequenz spätapoptotischer Zellen blieb dabei innerhalb der CD83Tg FO B-Zellen gegenüber Wt B-Zellen stets um etwa 50% erhöht.

A



B

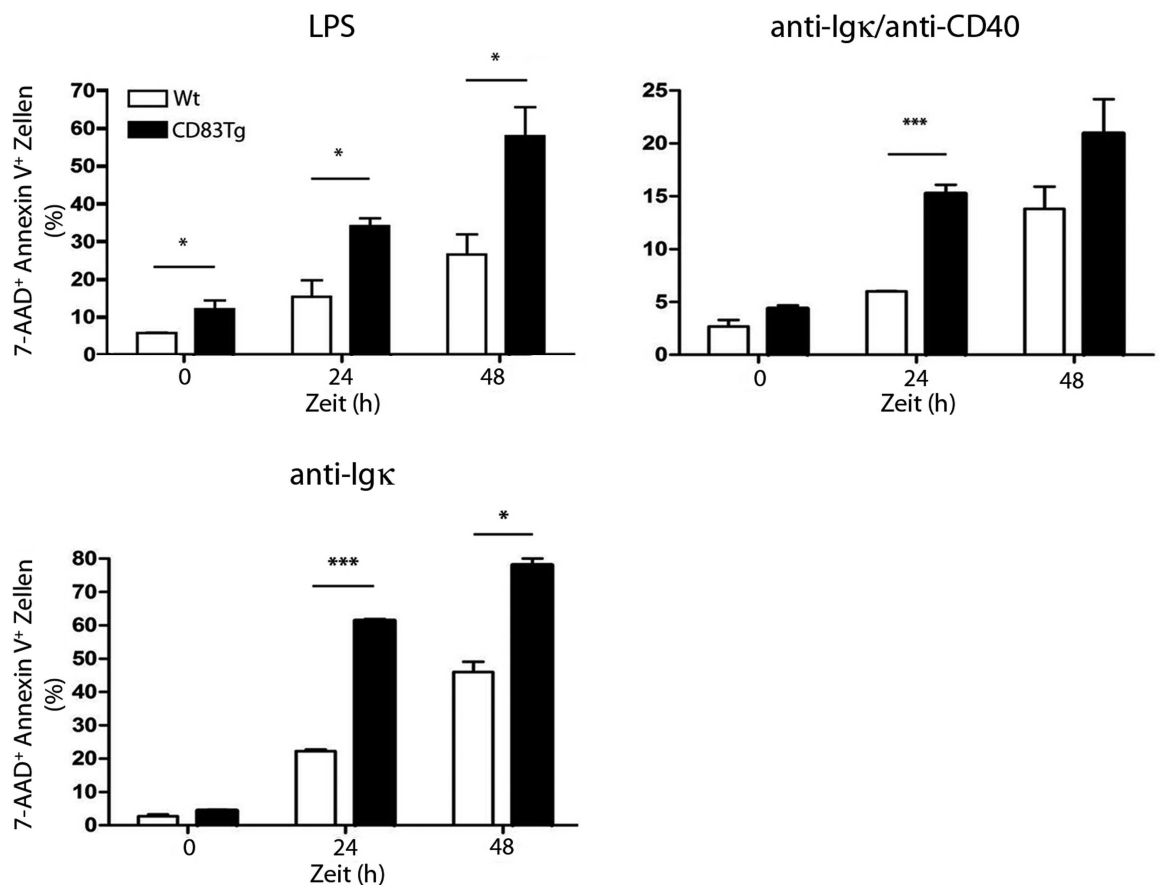
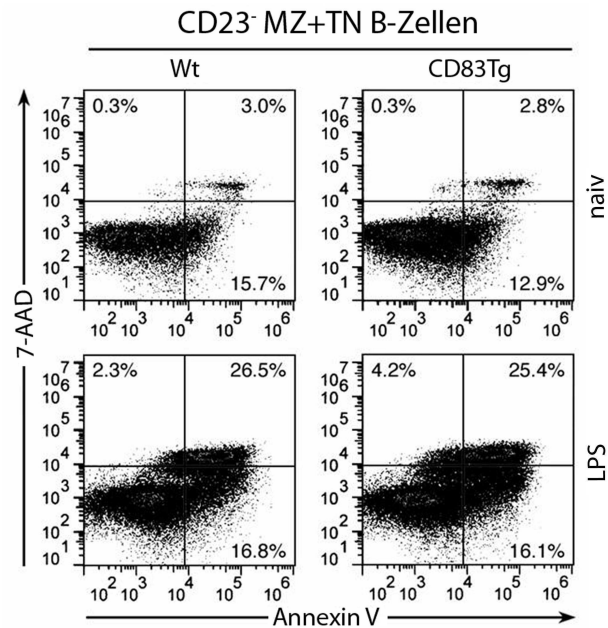


Abbildung 3.1.5: CD83Tg FO B-Zellen zeigen eine erhöhte Frequenz apoptotischer Zellen. 2×10^5 B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden unmittelbar nach Präparation (naiv) und nach LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), anti-Ig κ /anti-CD40 (je 2 $\mu\text{g/ml}$) oder nur anti-Ig κ (2 $\mu\text{g/ml}$) Stimulation mit 7-AAD, Annexin V und zusätzlich mit einem anti-CD23-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A:** Die Grafik zeigt eine exemplarische Färbung der FO B-Zellen mit 7-AAD und Annexin V. **B:** Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil 7-AAD⁺ und Annexin V⁺ naiver sowie für 24 h und 48 h stimulierter FO B-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD83Tg FO B-Zellen bereits in naivem Zustand und nach Stimulation über den TLR4 oder BZR eine erhöhte Frequenz apoptotischer Zellen aufweisen.

Die Zahl apoptotischer Zellen wurde ebenfalls innerhalb der CD23⁻ MZ+TN-Fraktion bestimmt. Aufgrund begrenzter Färbemöglichkeiten konnte dabei nicht weiter zwischen MZ und TN B-Zellen unterschieden werden, sodass die Analyse auf die MZ+TN-Fraktion beschränkt bleiben musste. Abbildung 3.1.6 A zeigt exemplarisch eine Färbung von naiven und LPS-aktivierten Wt und CD83Tg MZ+TN B-Zellen. Im Gegensatz zu CD23⁺ FO B-Zellen waren sowohl in naivem Zustand als auch nach LPS- oder BZR-Aktivierung prozentual vergleichbar viele CD23⁻ Wt und CD83Tg B-Zellen spätapoptotisch (Abbildung 3.1.6 B).

A



B

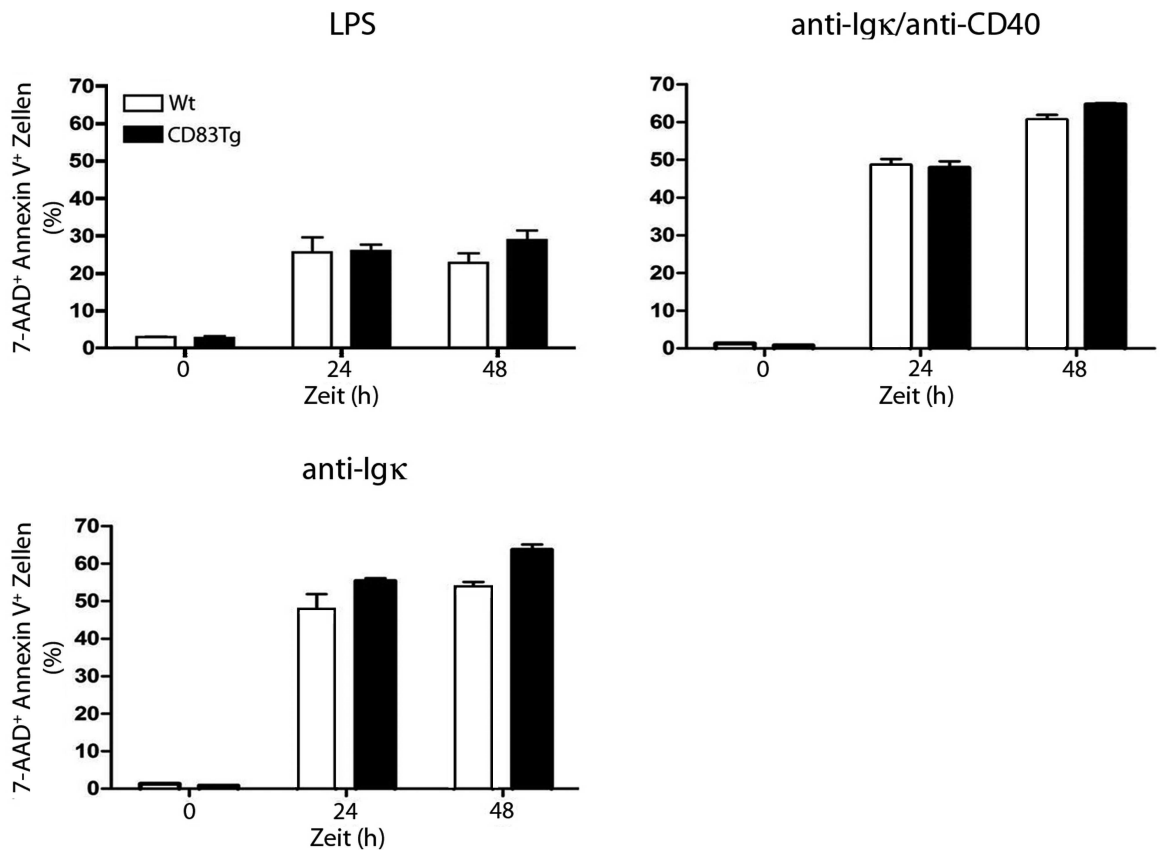


Abbildung 3.1.6: CD83Tg MZ+TN B-Zellen zeigen eine zu Wt B-Zellen vergleichbare Frequenz apoptotischer Zellen. 2×10^5 B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden unmittelbar nach Präparation (naiv) und nach LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-Igκ/anti-CD40 (je 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder nur anti-Igκ (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Stimulation mit 7-AAD, Annexin V und zusätzlich mit einem anti-CD23-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A:** Die Grafik zeigt eine exemplarische Färbung der MZ+TN B-Zellen mit 7-AAD und Annexin V. **B:** Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil 7-AAD⁺ und Annexin V⁺ naiver sowie für 24 h und 48 h stimulierter MZ+TN B-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Überexpression von CD83 ausschließlich in CD23⁺ FO B-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate führt, CD23⁻ MZ und TN B-Zellen jedoch nicht betroffen sind.

3.1.3 CD83Tg B-Zellen zeigen eine gesteigerte IL-10 Produktion nach LPS- aber nicht nach BZR-Stimulation

In vorherigen Arbeiten wurde beschrieben, dass CD83Tg B-Zellen nach TLR4-Engagement signifikant erhöhte Mengen IL-10 in den Überstand sekretieren [103]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob dieser Effekt der CD83-Überexpression auf die Stimulation mit LPS beschränkt oder auch bei Aktivierung der B-Zellen über den BZR sichtbar ist. Außerdem sollte die B-Zellsubpopulation identifiziert werden, welche für die erhöhte IL-10 Produktion verantwortlich ist.

Hierfür wurden zunächst B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen parallel entweder mit LPS oder anti-Ig κ /anti-CD40 stimuliert und IL-10 nach 48 h im Zellkulturüberstand quantifiziert. Abbildung 3.1.7 A zeigt erwartungsgemäß eine gesteigerte IL-10 Produktion durch CD83Tg B-Zellen nach LPS-Stimulation. Im Gegensatz hierzu sekretierten weder Wt noch CD83Tg B-Zellen detektierbare Mengen IL-10 nach BZR-Engagement (Abbildung 3.1.7 B).

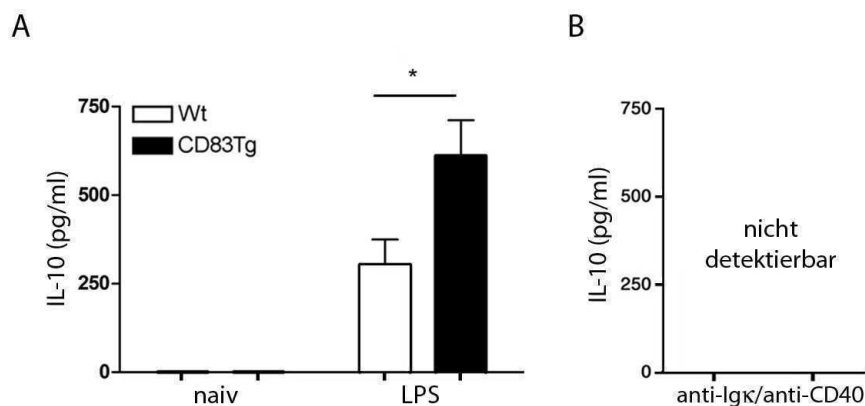


Abbildung 3.1.7: CD83Tg B-Zellen zeigen eine erhöhte IL-10 Produktion nach TLR4-Engagement. 2×10^5 B-Zellen wurden mit LPS (10 µg/ml) (**A**) oder anti-Ig κ /anti-CD40 (2 µg/ml) (**B**) stimuliert. IL-10 wurde nach 48 h Stimulation mit Hilfe eines spezifischen ELISA im Überstand quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0.05$).

Um die IL-10 produzierende B-Zellsubpopulation genauer zu identifizieren, sollten FO B-Zellen von der MZ+TN-Fraktion getrennt werden. Dafür wurde der Oberflächenmarker CD23 auf Wt und CD83Tg B-Zellen gefärbt und CD23⁺ FO B-Zellen mit Hilfe magnetischer Partikel von

der CD23⁺ MZ+TN-Fraktion getrennt. Durch die zusätzliche Färbung des Oberflächenmarkers CD21 wurden die Reinheit und die prozentualen Anteile der Fraktionen ermittelt. Diese wiesen eine Reinheit von etwa 90% (FO) und 39% MZ+42 % TN (Wt) beziehungsweise 26 % MZ+48% TN (CD83Tg) auf (Abbildung 3.1.8 A). Die FO- und MZ+TN-Fraktionen wurden anschließend mit LPS stimuliert und IL-10 wurde nach 48 h im Kulturüberstand quantifiziert. Abbildung 3.1.8 B zeigt, dass hauptsächlich MZ und TN B-Zellen IL-10 produzierten. Tendenziell wurde dabei eine erhöhte IL-10-Produktion von CD83Tg MZ und TN B-Zellen beobachtet, die jedoch statistisch nicht signifikant war. FO B-Zellen sekretierten dagegen kaum IL-10 in den Überstand.

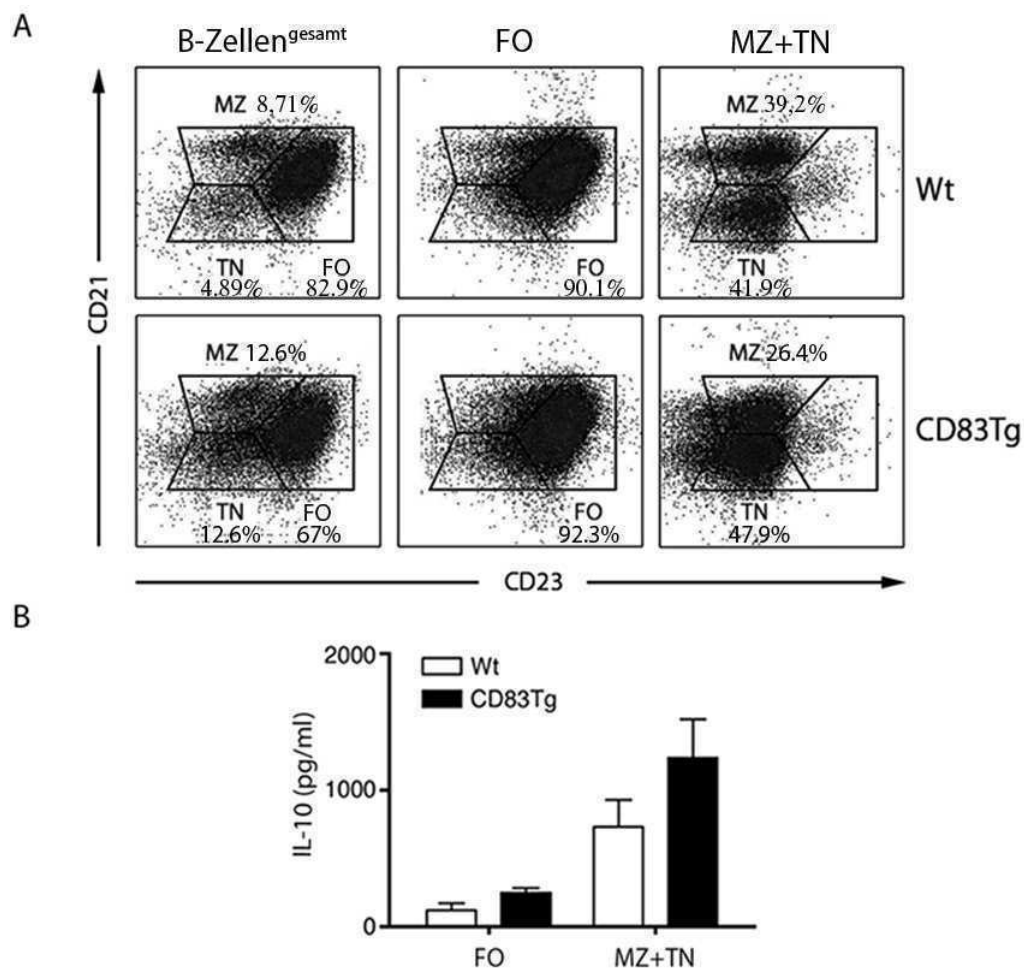


Abbildung 3.1.8: CD83Tg MZ und TN B-Zellen zeigen eine tendenziell gesteigerte IL-10 Produktion. **A:** Gereinigte B-Zellen von vier Wt Mäusen und fünf CD83Tg Mäusen wurden vereinigt, CD21 und CD23 gefärbt und mit Hilfe magnetischer Partikel in die CD23⁺ FO-Fraktion und CD23⁻ MZ+TN-Fraktion separiert. Die Grafik zeigt exemplarisch Wt und CD83Tg B-Zellen^{Gesamt} und die Reinheit der Wt und CD83Tg B-Zellfraktionen nach der Separation. **B:** 1×10^5 B-Zellen der FO und MZ+TN-Fraktionen wurden für 48 h mit LPS (10 μ g/ml) stimuliert. IL-10 wurde mit Hilfe eines spezifischen ELISA im Kulturüberstand quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Hauptproduzenten von IL-10 innerhalb der MZ+TN-Fraktion liegen und CD83 einen steigenden Einfluss auf die IL-10 Produktion dieser B-Zellen hat.

3.1.4 CD83 steigert die IL-10 Produktion selektiv in CD83Tg MZ B-Zellen

In Abschnitt 3.1.4 wurde gezeigt, dass CD83 die LPS-induzierte IL-10 Produktion steigert. Dabei stellte sich heraus, dass insbesondere MZ und TN B-Zellen die Hauptproduzenten von IL-10 darstellen. Um die B-Zellsubpopulationen hinsichtlich der IL-10 Produktion genauer zu analysieren, wurde eine IL-10 Reportermaus verwendet. Diese besitzt zwischen dem Exon 5 und der 3'-untranslatierten Region des IL-10 Gens eine eGFP-Kassette mit vorgeschalteter *internal ribosomal entry site* (IRES)-Sequenz (Abbildung 3.1.9). Auf diese Weise erfolgt die Transkription von IL-10 und eGFP von demselben mRNA-Strang, sodass die Expression beider Moleküle aneinander gekoppelt ist. Die Fluoreszenzintensität des eGFP korreliert folglich mit der IL-10 Produktion. Für die Analysen der IL-10 produzierenden B-Zellsubpopulationen wurde die IL-10 Reportermaus mit der CD83Tg Maus gekreuzt, um eine Maus zu generieren, welche sowohl CD83 überexprimiert als auch das IL-10 Gen mit gekoppelter eGFP-Kassette besitzt. Um Kontrolltiere zu erhalten, wurden IL-10eGFP Mäuse mit Wt Mäusen verpaart.

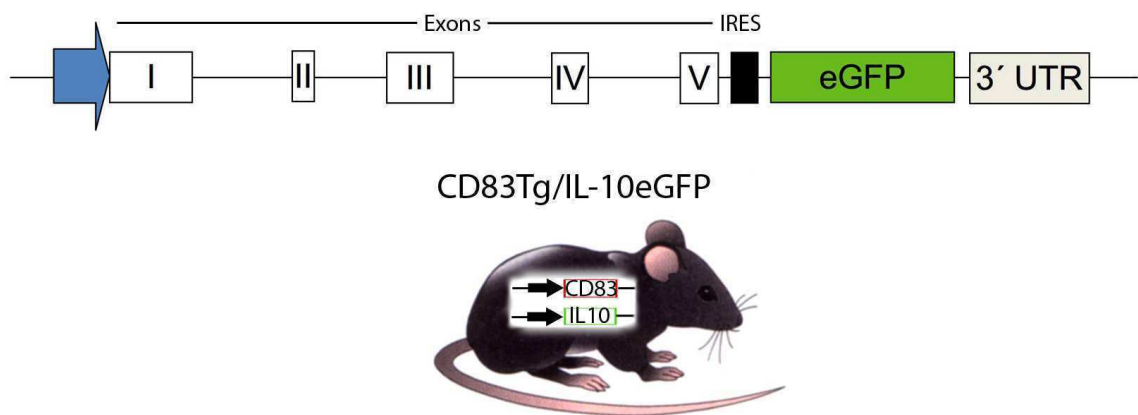


Abbildung 3.1.9: Generierung einer CD83Tg/IL10eGFP Maus. Die IL-10 Reportermaus mit einer integrierten cDNS für eGFP und vorgeschalteter IRES-Sequenz wurde mit der CD83Tg Maus gekreuzt, um eine doppelt-transgene Maus zu erhalten. Diese überexprimiert CD83 und zeigt eine an eGFP-gekoppelte IL-10 Produktion. IRES = *internal ribosomal entry site*, UTR = untranslatierende Region.

Um sicher zu gehen, dass die Nachkommen sowohl CD83 überexprimieren als auch IL-10eGFP exprimieren, wurden heterozygote F1 Nachkommen hinsichtlich des eGFP-Transgens per PCR und der CD83-Überexpression durchflusszytometrisch überprüft. Abbildung 3.1.10 zeigt am Beispiel von acht Nachkommen das Analyseverfahren. Die PCR für das IL-10eGFP Screening

ergab eine IL-10eGFP-Bande mit der erwarteten Größe von 800bp bei allen Nachkommen (Abbildung 3.1.10 A). Für die Analyse der CD83 Überexpression wurden Blutproben von den acht Nachkommen genommen. Als Kontrolle dienten Blutproben einer Wt und einer homozygoten CD83Tg Maus. Die Blutleukozyten wurden mit einem CD83-spezifischen Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Alle acht Nachkommen zeigten eine deutlich über dem Wt-Level liegende und untereinander vergleichbare CD83 Überexpression, welche jedoch stets etwas schwächer als in der homozygoten CD83Tg Maus war.

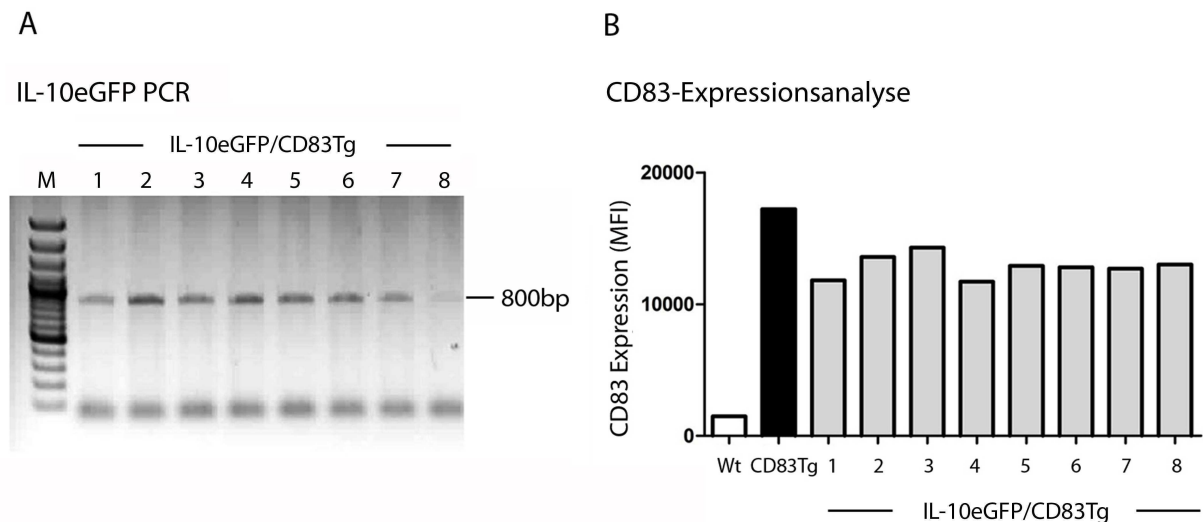


Abbildung 3.1.10: Überprüfung der IL-10eGFP/CD83Tg Maus. **A:** Aus Schwanzbiopsien der IL-10eGFP/CD83Tg Mäuse wurde genomische DNS gewonnen und eine IL10eGFP-spezifische PCR durchgeführt. Durch Verwendung der Primer IL10-s und IL10-eGFP-as wurde eine IL-10eGFP-Bande mit der Größe von 800bp amplifiziert. Gezeigt ist exemplarisch ein Agarosegel der PCR-Produkte von acht IL-10eGFP/CD83Tg Nachkommen. **B:** Die aus Blutproben der IL-10eGFP/CD83Tg Mäuse gewonnenen Zellen wurden mit einem CD83-spezifischen Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen aus Blutproben einer Wt und einer CD83Tg Maus. Gezeigt sind die MFI-Werte der CD83-Expression von acht IL-10eGFP/CD83Tg Nachkommen. M = Marker (100bp Plus DNS Ladder).

IL-10eGFP/Wt Mäuse wurden auf die gleiche Weise überprüft und exprimierten, wie reine Wt Mäuse, kein CD83 (Daten nicht gezeigt).

Zunächst wurde überprüft, ob die IL-10eGFP/CD83Tg Maus eine der homozygoten CD83Tg Maus vergleichbare Verteilung der B-Zellsubpopulationen in der Milz besitzt. Dazu wurden B-Zellen aus der Milz von IL10eGFP/Wt und IL-10eGFP/CD83Tg Mäusen isoliert. Zur Differenzierung der FO, MZ und TN B-Zellen wurde auf naiven B-Zellen CD21 und CD23 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.1.11). Wie für die CD83Tg Maus beschrieben (Abbildung 3.1.2), zeigt auch die IL-10eGFP/CD83Tg Maus eine verringerte Anzahl an FO B-Zellen, eine reziprok erhöhte Anzahl an TN B-Zellen und eine normale Anzahl an MZ B-Zellen.

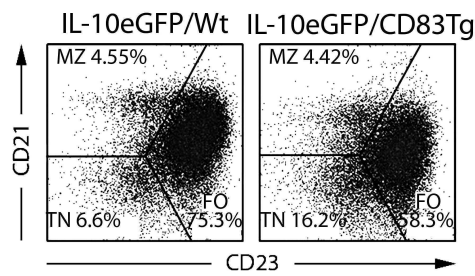


Abbildung 3.1.11: Verteilung der B-Zellsubpopulationen in der Milz der IL-10eGFP/Wt und IL-10eGFP/CD83Tg Maus. 2×10^5 naive B-Zellen der IL-10eGFP/Wt und IL-10eGFP/CD83Tg Maus wurden mit einem anti-CD21 und anti-CD23 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist eine exemplarische Färbung der FO, MZ und TN B-Zellsubpopulationen.

Als nächstes wurden gereinigte B-Zellen der IL-10eGFP/Wt und IL-10eGFP/CD83Tg Mäuse mit LPS stimuliert und IL-10eGFP-exprimierende Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Durch die zusätzliche CD1d und CD23 Färbung wie unter 3.1.1 beschrieben, wurde zwischen FO, MZ und TN unterschieden. Abbildung 3.1.12 zeigt die eGFP-Expression in den verschiedenen B-Zellsubpopulationen. Sowohl unter den MZ als auch TN B-Zellen wurde eine erhöhte Anzahl IL-10 produzierender Zellen festgestellt. Dagegen waren unter den FO B-Zellen kaum IL-10 Produzenten nachweisbar. CD83 steigerte jedoch exklusiv die Expression von IL-10 in MZ B-Zellen. Dabei war der prozentuale Anteil IL-10 produzierender CD83Tg MZ B-Zellen gegenüber Wt MZ B-Zellen um etwa 30% erhöht.

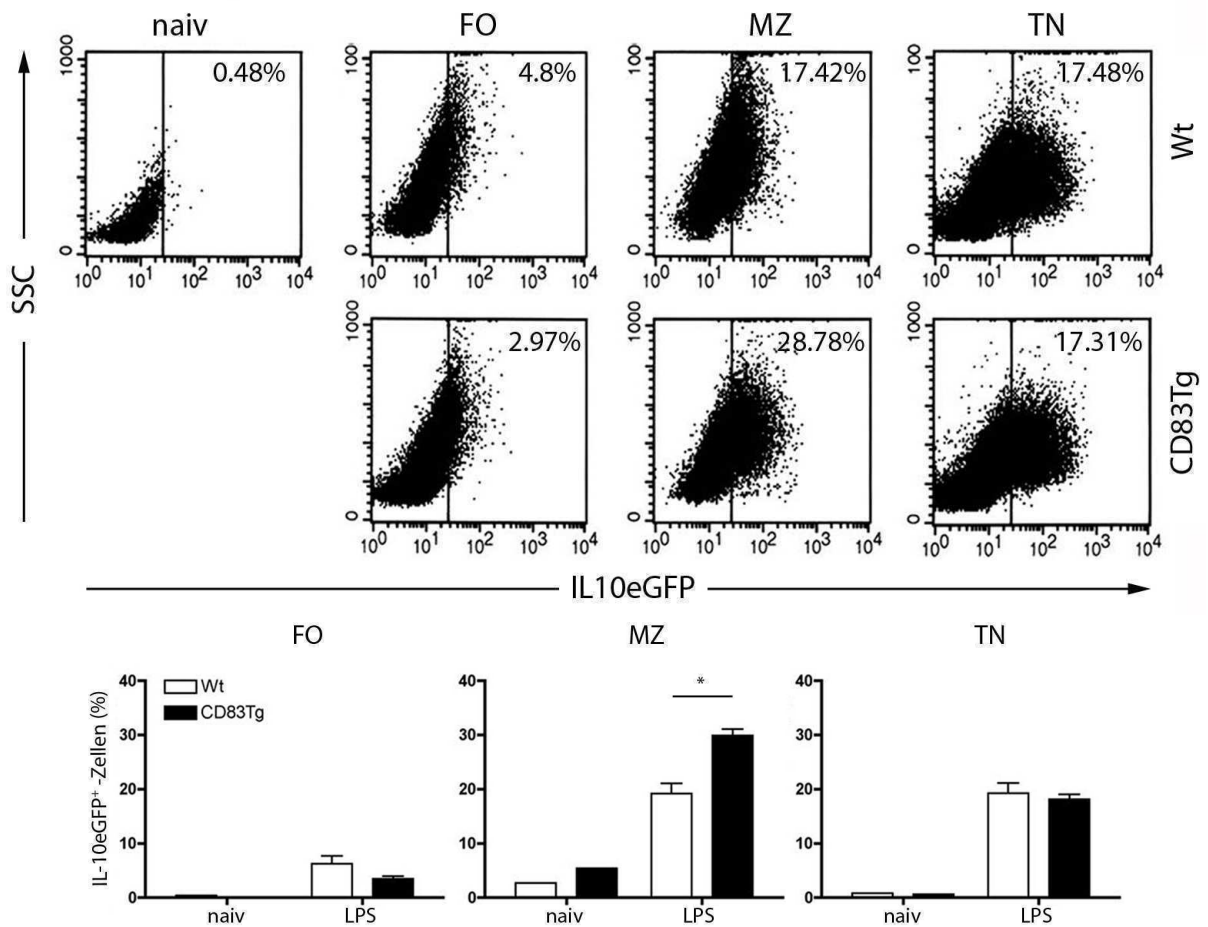


Abbildung 3.1.12: CD83 steigert selektiv in CD83Tg MZ B-Zellen die IL-10 Produktion. 2×10^5 B-Zellen von IL-10eGFP/Wt und IL-10eGFP/CD83Tg Mäusen wurden 48 h mit LPS (10 µg/ml) stimuliert und die IL-10eGFP Expression in FO, MZ und TN B-Zellen untersucht. Die obere Grafik zeigt ein Beispiel der durchflusszytometrischen IL-10eGFP-Analyse. Als Kontrolle dienten naive B-Zellen. Die Diagramme im unteren Teil der Abbildung geben den prozentualen Anteil an IL-10eGFP⁺-Zellen in den B-Zellsubpopulationen an. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Duplikaten. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente (* $p < 0.05$)

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD83 exklusiv in MZ B-Zellen die IL-10 Expression steigert, obwohl auch TN B-Zellen IL-10 nach LPS-Stimulation produzieren.

3.1.5 CD83 wird nach LPS Stimulation auf MZ B-Zellen besonders schnell hochreguliert

Da CD83 die IL-10 Produktion exklusiv in MZ B-Zellen steigert, stellte sich die Frage, ob diese Zellen natürlicherweise CD83 exprimieren und die CD83 Expression auf den verschiedenen B-Zellsubpopulationen unterschiedlich reguliert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Kinetik der natürlichen CD83-Expression auf den B-Zellsubpopulationen nach LPS-

Stimulation untersucht. Dafür wurden gereinigte Wt B-Zellen für 2 h, 18 h und 24 h mit LPS stimuliert und anschließend die CD83 Expression auf FO, MZ und TN B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 3.1.13). Die Unterscheidung der B-Zellsubpopulationen erfolgte wie in Abbildung 3.1.2 B gezeigt anhand der Färbung von CD1d und CD23. MZ B-Zellen exprimierten bereits in naivem Zustand signifikant mehr CD83 auf der Oberfläche als FO und TN B-Zellen. Nach LPS-Stimulation wurde CD83 auf MZ B-Zellen sehr schnell hochreguliert. Dabei erreichte die CD83-Expression das Maximum bereits nach etwa 2 h, welches bis 24 h nach Stimulation konstant blieb. Im Gegensatz zu MZ B-Zellen wurde auf FO B-Zellen CD83 verzögert hochreguliert und das Maximum erst nach etwa 24 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war das Expressionslevel von CD83 auf MZ und FO B-Zellen vergleichbar. Die Kinetik der CD83-Expression auf TN B-Zellen glich der auf FO B-Zellen, war jedoch zu allen Zeitpunkten signifikant geringer verglichen mit FO und MZ B-Zellen.

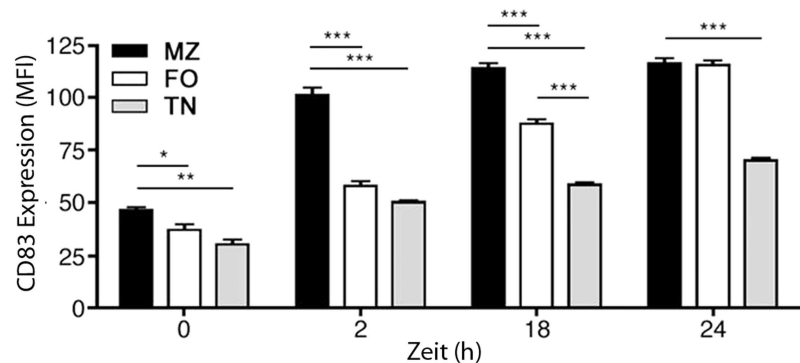


Abbildung 3.1.13: CD83 wird nach LPS Stimulation auf MZ B-Zellen besonders schnell hochreguliert. 2×10^5 B-Zellen von Wt Mäusen wurden für 2 h, 18 h und 24 h mit LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und mit einem CD83-spezifischen Antikörper gefärbt. Durch zusätzliche Färbung von CD1d und CD23 konnte zwischen den B-Zellsubpopulationen unterschieden werden. Anschließend wurde die CD83-Expression auf FO, MZ und TN B-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Das Diagramm zeigt die MFI-Werte der CD83-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass MZ B-Zellen die CD83-Expression nach LPS-Stimulation wesentlich schneller hochregulieren als FO und TN B-Zellen.

3.1.6 Einfluss von CD83 auf die Signalgebung des BZR- und TLR4-Komplexes

Die in den vergangenen Kapiteln beschriebenen Experimente lassen vermuten, dass CD83 nicht nur die BZR-, sondern auch TLR4-vermittelte Signalgebung beeinflusst. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass CD83Tg B-Zellen auf die Stimulation des BZR mit einer reduzierten Mobilisierung von Ca^{2+} reagieren [103]. Ein möglicher Einfluss von CD83 auf die

TLR4-Signalgebung wurde bislang nicht untersucht. In den folgenden Abschnitten wurden deshalb intrazelluläre Signalereignisse nach Engagement des BZR und des LPS-Rezeptors näher analysiert.

3.1.6.1 CD83 inhibiert die ERK1/2 Aktivierung nach BZR-Engagement

Die Phosphorylierung der MAP Kinase ERK1/2 ereignet sich spät in der BZR-Signalkaskade und liefert in B-Zellen wichtige Proliferations- und Überlebenssignale [110]. Da eine reduzierte Proliferation der CD83Tg B-Zellen und eine gesteigerte Apoptoserate der CD83Tg FO B-Zellen beobachtet wurde, sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung von ERK1/2 in CD83Tg B-Zellen beeinträchtigt ist. Dafür wurden B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen aufgereinigt und mit anti-Ig α stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 in Zelllysaten im Western Blot analysiert. Um sicher zu gehen, dass gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden, wurde der Antikörper anschließend von der Membran entfernt und ERK1/2^{Gesamt} detektiert. Abbildung 3.1.14 A zeigt exemplarisch einen solchen Western Blot. Um Unterschiede in der Proteinmenge der aufgetragenen Lysate auszugleichen, wurde die Signalintensität quantitativ ausgewertet und das Verhältnis von phosphoryliertem ERK1/2 zu ERK1/2^{Gesamt} (pERK1/2:ERK1/2) errechnet (Abbildung 3.1.14 B). In CD83Tg B-Zellen war pERK1/2 zu allen Zeitpunkten nach Stimulation gegenüber der Wt Kontrolle dramatisch reduziert.

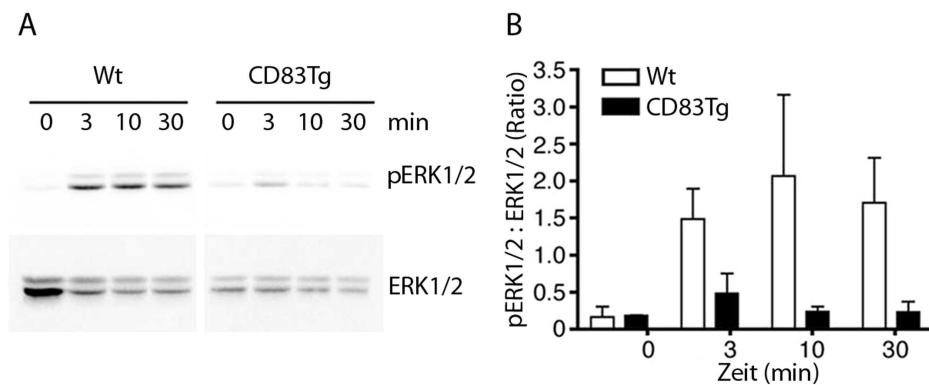


Abbildung 3.1.14: In CD83Tg B-Zellen wird ERK1/2 nach BZR-Engagement kaum aktiviert. **A:** 5×10^6 B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit anti-Ig α (2 μ g/ml) für 3 min, 10 min und 30 min stimuliert. Die B-Zelllysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes ERK1/2 spezifisch im Western Blot detektiert. Als Kontrolle wurde derselbe Western Blot nach Entfernen des pERK1/2-Antikörpers auf ERK1/2^{Gesamt} analysiert. Gezeigt ist exemplarisch ein solcher Western Blot. **B:** Die Signalintensitäten der Western Blots von zwei unabhängigen Experimenten wurden quantifiziert und die Ratio von pERK1/2 zu ERK1/2 errechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM der Ratio pERK1/2:ERK1/2.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach BZR-Engagement ERK1/2 in CD83Tg B-Zellen kaum aktiviert wird.

3.1.6.2 CD83 verstärkt die ERK1/2 Aktivierung nach TLR4-Engagement selektiv in MZ B-Zellen

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 essenziell für die TLR-vermittelte Induktion von IL-10 in Ag-präsentierenden Zellen wie DZ und Makrophagen ist [111]. Um zu untersuchen, ob die transgene CD83-Expression einen Einfluss auf die ERK1/2-Aktivierung in B-Zellen nach TLR4-Engagement hat, wurden B-Zellen zunächst anhand der Färbung von CD21 und CD23 und mit Hilfe magnetischer Partikel in FO (CD23⁺, CD21^{intermediär}) und MZ (CD23⁺, CD21⁺) B-Zellen separiert. Nach Stimulation mit LPS wurden die Zelllysate auf pERK1/2 und anschließend auf ERK1/2^{Gesamt} im Western Blot analysiert. Abbildung 3.1.15 zeigt exemplarisch einen solchen Western Blot für MZ (A, links) und FO (B, links) B-Zellen. Um Unterschiede in der Proteinmenge der aufgetragenen Lysate auszugleichen, wurden die Signalintensitäten quantitativ ausgewertet und das Verhältnis von pERK1/2:ERK1/2 errechnet (Abbildung 3.1.15 rechts). In CD83Tg MZ B-Zellen führte die Stimulation mit LPS zu einer gegenüber Wt MZ B-Zellen deutlich verstärkten Aktivierung von ERK1/2 (Abbildung 3.1.15 A). Nach 60 min LPS-Stimulation war etwa die doppelte Menge an pERK1/2 in CD83Tg MZ B-Zellen verglichen zu Wt MZ B-Zellen detektierbar, während keine Unterschiede in der ERK1/2 Aktivierung in Wt und CD83Tg FO B-Zellen feststellbar waren (Abbildung 3.1.15 B).

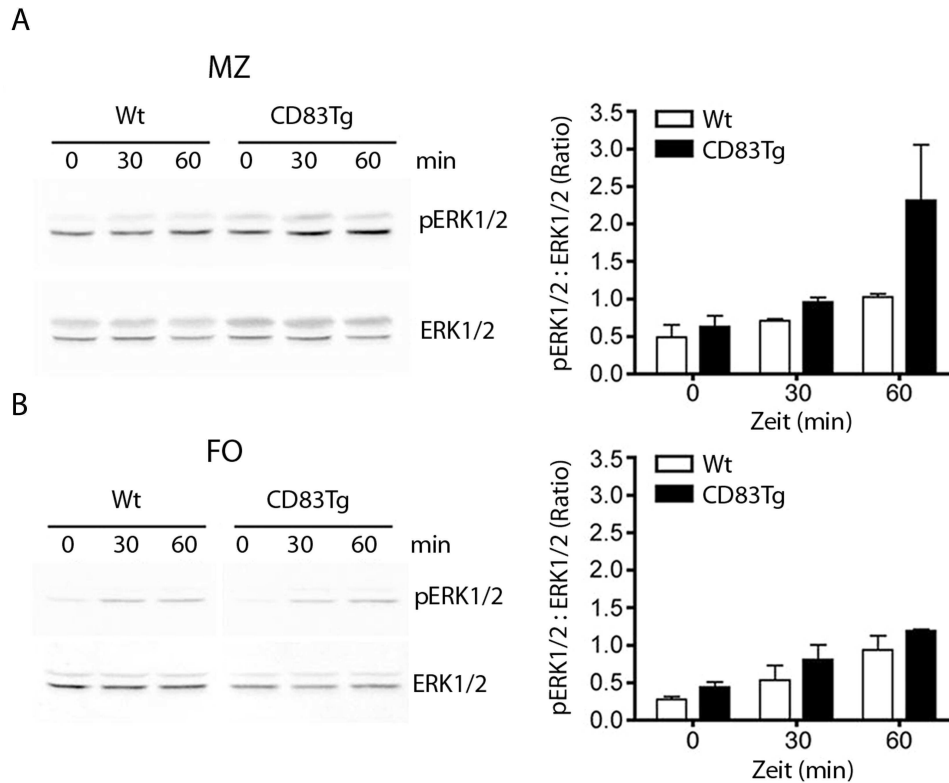


Abbildung 3.1.15: In CD83Tg MZ B-Zellen wird ERK1/2 nach TLR4-Engagement verstärkt aktiviert. 5×10^6 MZ (A) und FO (B) B-Zellen von Wt und CD83Tg Mäusen wurden mit anti-Ig κ (2 μ g/ml) für 30 min und 60 min stimuliert. B-Zelllysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes ERK1/2 spezifisch im Western Blot detektiert. Als Kontrolle wurde derselbe Western Blot nach Entfernen des pERK1/2-Antikörpers auf ERK1/2^{Gesamt} analysiert. Gezeigt sind je ein exemplarischer Western Blot für MZ und FO B-Zellen (links). Die Signalintensitäten der Western Blots von zwei unabhängigen Experimenten wurden quantifiziert (rechts) und die Ratio von pERK1/2 zu ERK1/2 errechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM der Ratio pERK1/2:ERK1/2.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von CD83 selektiv in MZ B-Zellen zu einer verstärkten Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 führt.

3.1.6.3 Die Aktivierung von ERK1/2 trägt zur vermehrten Expression von IL-10 in CD83Tg B-Zellen bei

In Abbildung 3.1.11 wurde gezeigt, dass CD83Tg MZ B-Zellen vermehrt IL-10 nach TLR4-Engagement produzieren. Um die funktionelle Bedeutung der gesteigerten Aktivierung von ERK1/2 in CD83Tg MZ B-Zellen bezüglich der IL-10 Produktion nach TLR4-Engagement zu untersuchen, wurden gereinigte Wt und CD83Tg B-Zellen mit dem Inhibitor U0126 behandelt. U0126 hemmt selektiv die Aktivierung der Kinase MEK, die ihrerseits für die Phosphorylierung von ERK1/2 verantwortlich ist [110] und blockiert somit die ERK1/2-vermittelte Signalgebung. Zunächst sollte die Wirkung von U0126 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 überprüft

werden. Hierfür wurden Wt und CD83Tg B-Zellen in Gegenwart von U0126 zunächst vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert. Als Kontrolle dienten B-Zellen, welche in Gegenwart einer entsprechenden Menge DMSO, dem Lösungsmittel von U0126, inkubiert wurden. Lysate der stimulierten B-Zellen wurden anschließend im Western Blot hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Abbildung 3.1.16 A zeigt, dass in Gegenwart von U0126 die Aktivierung von ERK1/2 sowohl in Wt als auch in CD83Tg B-Zellen vollständig inhibiert wurde. Im nächsten Schritt wurden gereinigte B-Zellen aus Wt und CD83Tg Mäusen in Gegenwart von U0126 oder DMSO für 48h Stunden mit LPS stimuliert und IL-10 im Kulturüberstand quantifiziert. Die Inhibierung von ERK1/2 führte sowohl in Wt als auch in CD83Tg B-Zellen zu einer signifikant reduzierten IL-10 Produktion. Jedoch exprimierten CD83Tg B-Zellen auch in Gegenwart von U0126 noch immer erhöhte Mengen an IL-10 verglichen mit Wt B-Zellen. Auf die Proliferation von Wt oder CD83Tg B-Zellen hatte U0126 dagegen keinen Einfluss (Abbildung 3.1.16 B), sodass ausgeschlossen werden kann, dass U0126 grundsätzlich die Aktivierung von B-Zellen inhibiert.

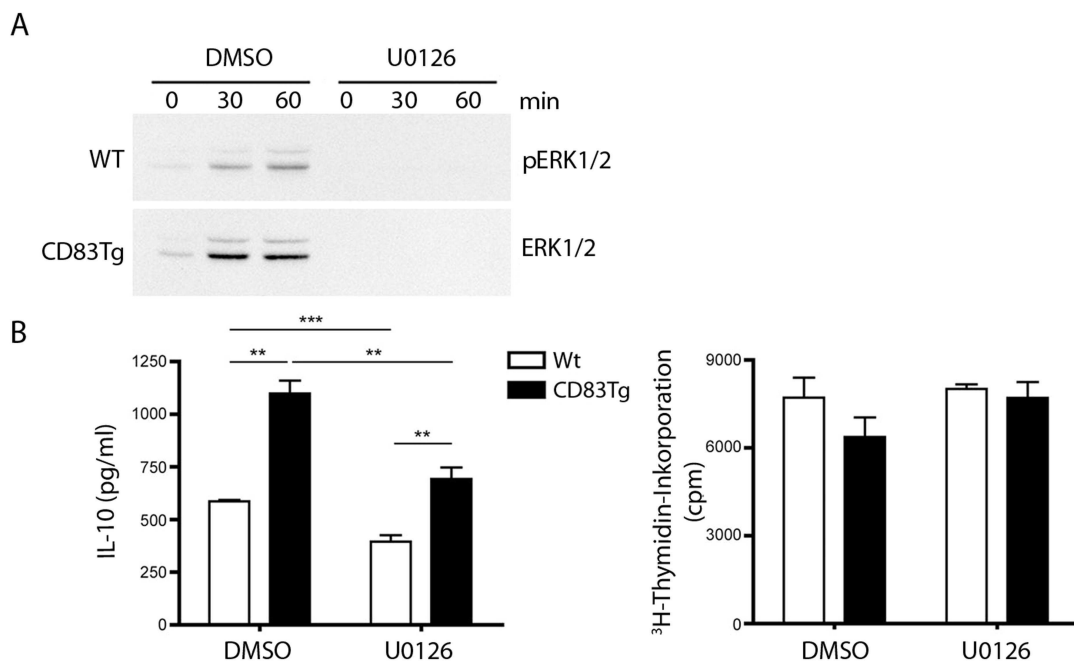


Abbildung 3.1.16: Aktiviertes ERK1/2 ist für die IL-10 Induktion in B-Zellen wichtig. **A:** 5×10^6 B-Zellen von Wt oder CD83Tg Mäusen wurden mit dem Inhibitor U0126 oder DMSO als Kontrolle für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden die B-Zellen in Gegenwart von U0126 oder DMSO mit LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) für 30 min und 60 min inkubiert. B-Zelllysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes ERK1/2 im Western Blot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von zwei unabhängigen Experimenten. **B:** 2×10^5 B-Zellen von Wt und CD83Tg B-Zellen wurden mit U0126 oder DMSO als Kontrolle für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden die B-Zellen in Gegenwart von U0126 oder DMSO für 48 h mit LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. IL-10 wurde mit Hilfe eines spezifischen ELISA im Kulturüberstand quantifiziert (links). Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt (rechts). Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von ERK1/2 für die Induktion der IL-10 Produktion auch in B-Zellen eine wichtige Rolle spielt und zur gesteigerten IL-10 Freisetzung durch CD83Tg B-Zellen beiträgt. Jedoch ist ERK1/2 nicht der einzige Faktor, der für die Freisetzung erhöhter Mengen IL-10 durch CD83Tg B-Zellen verantwortlich ist.

3.1.7 CD83 kolokalisiert mit dem LPS-Rezeptorkomplex

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass CD83 in die BZR- und TLR4-Signalgebung involviert ist. Da die kurze intrazelluläre Domäne von CD83 jedoch keine Signalmotive besitzt, muss dessen immunmodulatorische Funktion über die Interaktion mit anderen Rezeptoren vermittelt werden. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass CD83 mit dem BZR-Komplex kolokalisiert (A. Osterloh, unveröffentlichte Daten). Um zu untersuchen, ob CD83 ebenfalls mit dem LPS-Rezeptorkomplex assoziiert, wurden Kolokalisationsstudien mit der Makrophagenzelllinie RAW264.7 durchgeführt. RAW264.7 weisen gegenüber B-Zellen ein höheres TLR4-Expressionslevel auf (Abbildung 3.1.17 A) und exprimieren nach 4 h LPS-Stimulation ein Maximum an CD83 auf der Zelloberfläche (Abbildung 3.1.17 B). Für die Kolokalisationsstudien wurde der LPS-Rezeptorkomplex auf den RAW264.7 bei 37°C durch Bindung von biotinyliertem LPS und Streptavidin-TRITC kreuzvernetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem CD83-spezifischen Antikörper gefärbt. In der Immunfluoreszenzanalyse war die Akkumulation des LPS-Rezeptorkomplexes deutlich sichtbar im Vergleich zu Kontrollzellen, die bei 4°C inkubiert wurden (Abbildung 3.1.17). Zudem wurde eine deutliche Koakkumulation von CD83 mit LPS-bindenden Regionen auf der Zelloberfläche beobachtet.

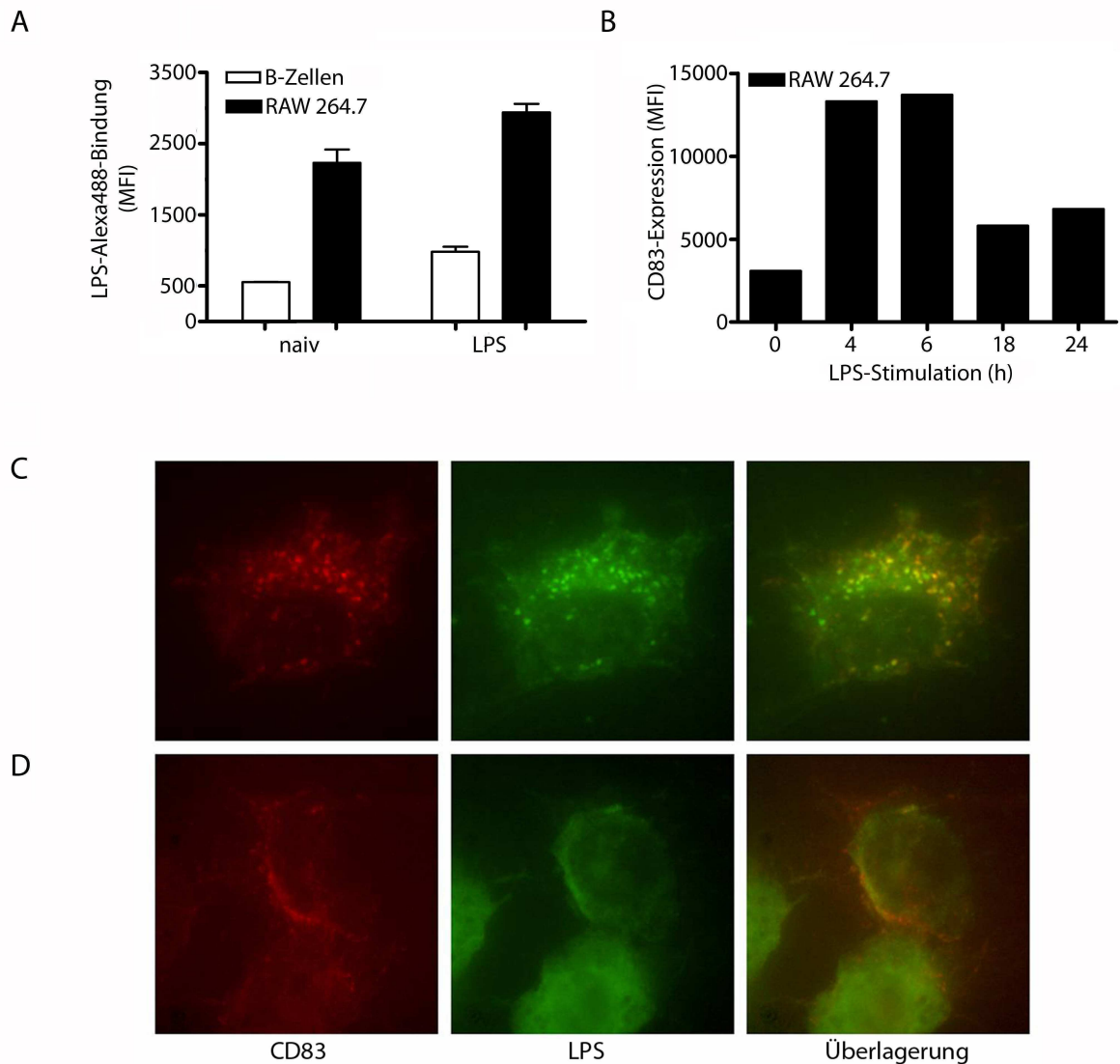


Abbildung 3.1.17: CD83 kolokalisiert mit dem LPS-Rezeptorkomplex. **A:** 2×10^5 B-Zellen und RAW264.7 Makrophagen wurden mit LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder in Medium (naiv) für 4 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit LPS-Alexa488 inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die MFI-Werte der LPS-Alexa488-Bindung an B-Zellen und RAW264.7 Makrophagen. **B:** 2×10^5 RAW264.7 Makrophagen wurden für 0 h, 4 h, 6 h, 18 h und 24 h mit LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und nach Färbung mit einem CD83-spezifischen Antikörper wurde die CD83-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die MFI-Werte der CD83-Expression. **C:** 2×10^5 RAW264.7 Makrophagen wurden für 4 h mit LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Der LPS-Rezeptorkomplex wurde durch Inkubation mit biotinyliertem LPS und Streptavidin-TRITC bei 37°C kreuzvernetzt (rot). Anschließend wurde CD83 mit einem spezifischen Antikörper bei 4°C gefärbt (grün). **D:** Kontrollzellen wurden mit den gleichen Reagenzien bei 4°C inkubiert. Gezeigt ist eine exemplarische Fluoreszenzaufnahme bei 800-facher Vergrößerung. Rechts ist jeweils die Überlagerung der Färbung des LPS-Rezeptorkomplexes und CD83 dargestellt.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass CD83 mit dem LPS-Rezeptorkomplex kolokalisiert und geben einen Hinweis darauf, dass CD83 mit einer oder mehreren Komponenten des LPS-Rezeptor-

komplexes interagiert.

Zusammenfassung Teil 1

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von CD83 auf die BZR- und TLR4-vermittelte Aktivierung der verschiedenen B-Zellsubpopulationen *in vitro* untersucht. Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass CD83 mit dem BZR kolokalisiert. In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass CD83 auch mit dem LPS-Rezeptorkomplex kolokalisiert. Die Überexpression von CD83 resultierte bei Engagement des BZR in der reduzierten Aktivierung distaler Effektormoleküle wie der MAP-Kinase ERK1/2, welche wichtige Proliferations- und Überlebenssignale liefert. Passend dazu reagierten alle CD83Tg B-Zellsubpopulationen auf Stimulation des BZR mit deutlich reduzierter Proliferation. Zudem wurde eine erhöhte Apoptoserate beobachtet, die jedoch ausschließlich auf die CD83Tg FO B-Zellpopulation beschränkt war. LPS-stimulierte CD83Tg B-Zellen aller Subpopulationen proliferierten dagegen normal, auch wenn die Stimulation mit LPS die gesteigerte Apoptose von CD83Tg FO B-Zellen nicht verhinderte. LPS-aktivierte CD83Tg B-Zellen produzierten zudem erhöhte Mengen IL-10, wofür allein die MZ B-Zellen verantwortlich waren. MZ B-Zellen aus CD83Tg Mäusen reagierten auf TLR4-Engagement mit einer gesteigerten Aktivierung von ERK1/2, die zur erhöhten IL-10 Freisetzung durch CD83Tg B-Zellen beitrug, jedoch nicht allein hierfür verantwortlich war.

3.2 Teil 2: Generierung einer konditionellen CD83KI Maus

Im ersten Abschnitt wurde der Einfluss von CD83 auf die B-Zell-Aktivierung untersucht. Die dafür verwendete CD83Tg Maus überexprimiert CD83 unter der Kontrolle des MHC-I Promotors auf allen kernhaltigen Zellen, einschließlich der Vorläufer-B-Zellen. Natürlicherweise erscheint CD83 jedoch erstmals zusammen mit dem IgM BZR auf der Zelloberfläche von unreifen B-Zellen im Knochenmark [97]. Es wurde gezeigt, dass die vorzeitige Überexpression von CD83 sowohl die frühe Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark als auch die B-Zellreifung in der Milz stört. So entwickeln CD83Tg Mäuse eine verringerte Anzahl an FO B-Zellen bei reziprok erhöhter Anzahl an TN B-Zellen [97]. Um auszuschließen, dass der beobachtete Phänotyp der reifen CD83Tg B-Zellen auf einen Einfluss von CD83 während der B-Zellentwicklung beruht, sollte eine Maus generiert werden, welche eine gezielte Überexpression von CD83 auf definierten Zellpopulationen ermöglicht. Hierfür sollte das Cre-loxP-System verwendet werden. Das Cre-loxP-System ist ein Rekombinationssystem, welches ermöglicht, gezielt DNS-Sequenzen zu entfernen. Die Cre (*cyclization recombination*)-Rekombinase erkennt dabei spezifisch loxP-Sequenzen innerhalb einer DNS-Sequenz und schneidet die dazwischen liegende Sequenz heraus. Auf diese Weise kann die Expression nachgeschalteter Gene initiiert werden, die vorher blockiert wurde.

Für die Generierung dieser Maus wurde der CTV-CD83-Vektor hergestellt, der in Abbildung 3.2.1 schematisch dargestellt ist. Dieser Vektor enthält eine Neomycin-Expressionskassette, welche von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen flankiert ist. Die entgegen gerichtete Neomycin-Kassette ist zwischen dem CAG-Startpromotor und der kodierenden DNS (cDNS) für CD83 geschaltet und verhindert dadurch die Transkription der CD83-cDNS. In Anwesenheit der Cre-Rekombinase wird die Neomycin-Kassette zwischen den loxP-Sequenzen heraus geschnitten, sodass die Transkription von CD83 initiiert werden kann. 3' der CD83-cDNS folgt die cDNS für das eGFP-Molekül mit vorgeschalteter IRES-Sequenz. Auf diese Weise ist die eGFP-Expression an die CD83-Expression gekoppelt.

Ein häufig gewählter Integrationsort für das gezielte Einbringen eines Transgens ist der *reverse oriented splice acceptor 26* (ROSA26)-Locus auf Chromosom sechs in Mäusen. Der CTV-CD83-Vektor verfügt dafür im 5'- und 3'-Bereich über Sequenzen, welche homolog zum ROSA26-Locus sind.

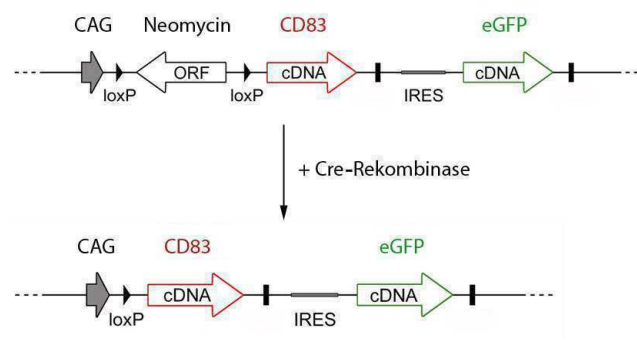


Abbildung 3.2.1: Darstellung des CTV-CD83-Vektors. Der CTV-CD83-Vektor besitzt eine zwischen dem CAG-Promotor und der cDNS für CD83 integrierte Neomycin-Expressionskassette. Diese wird von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen flankiert. Die loxP-Sequenzen ermöglichen ein gezieltes Herausschneiden der Neomycin-Kassette in Anwesenheit der Cre-Rekombinase. 3' der CD83-cDNS befindet sich eine IRES-Sequenz und eine nachfolgende für eGFP kodierende DNS. Auf diese Weise ist die eGFP-Expression an die CD83-Expression gekoppelt. Der CTV-CD83-Vektor besitzt außerdem im 5'- und 3'- Bereich zum ROSA26-Lokus homologe Sequenzen, welche eine gezielte homologe Rekombination ermöglichen.

3.2.1 Überprüfung des CTV-CD83-Vektors in COS1-Zellen

Um den CTV-CD83-Vektor zu testen, wurden COS1-Zellen mit dem Konstrukt und einem für die Cre-Rekombinase kodierenden Vektor kotransfiziert. Die Zellen wurden mit einem CD83-spezifischen Antikörper gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.2.2). Sowohl die CD83- als auch die eGFP-Expression waren in einem Teil der Zellen detektierbar, die sowohl den CTV-CD83-Vektor als auch den Cre-Vektor erhalten hatten. Kontrollen, bei denen entweder nur der CTV-Vektor mit und ohne den Cre-Vektor oder nur der

CTV-CD83-Vektor ohne den Cre-Vektor transfiziert wurden, zeigten keine CD83- und eGFP-Expression. Der CTV-CD83-Vektor ist somit funktionell.

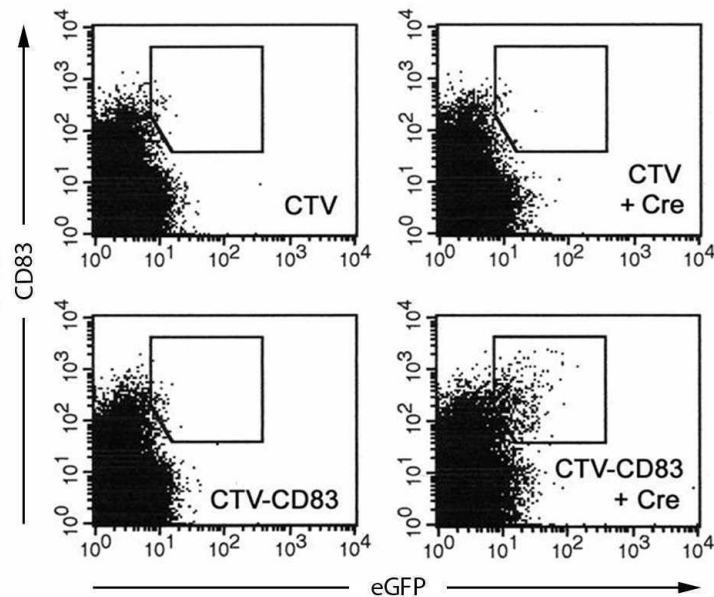


Abbildung 3.2.2: CD83-Expression in COS1-Zellen. COS1-Zellen wurden mit dem CTV-Vektor, dem CTV- und Cre-Vektor, dem CTV-CD83-Vektor oder dem CTV-CD83-Vektor und Cre-Vektor transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem CD83-spezifischen Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Expression von CD83 sowie von eGFP.

3.2.2 Transfektion embryonaler Stammzellen mit dem CTV-CD83-Vektor

Für die Generierung der konditionellen CD83KI Maus wurden embryonale Stammzellen (ES) des 129/Sv Mausstammes mit dem CTV-CD83-Vektor elektroporetisch transfiziert. Diese ES wurden anschließend kultiviert und durch Zugabe von Neomycin in das Kulturmedium negativ selektiert. Überlebende ES wurden schließlich auf homologe Rekombination getestet. Um die homologe Rekombination des CTV-CD83-Vektors in den ROSA26-Locus nachzuweisen, wurde das in Abbildung 3.2.3 schematisch dargestellte Analyseverfahren verwendet. Genomische DNS der Stammzellen wurde mit EcoRI verdaut und im Southern Blot eine transgene Bande mit der erwarteten Größe von 5.9 kb und eine Wt Bande mit einer Größe von 15.6 kb detektiert. Dafür wurde eine für dieses Analyseverfahren beschriebene radioaktiv markierte ^{32}P -Sonde verwendet [109].

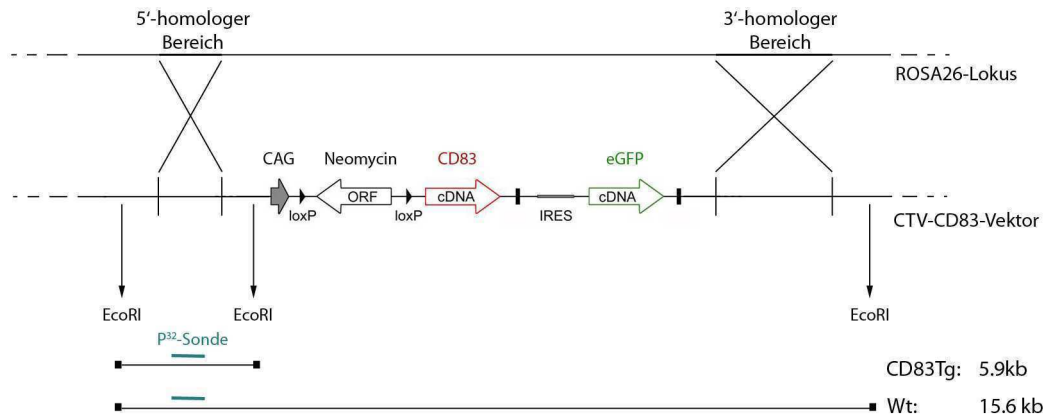


Abbildung 3.2.3: Southern Blot-System zum Nachweis homologer Rekombination in den ROSA26-Locus. Bei homologer Rekombination des CTV-CD83-Vektors in den ROSA26-Locus kann in EcoRI-verdauter genomischer DNS mit Hilfe einer ^{32}P -Sonde zwischen dem 15.6 kb Wt Allel und dem 5.9 kb transgenen Allel unterschieden werden, da durch die Integration des Vektors eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle eingeführt wird.

Der Southern Blot in Abbildung 3.2.4 zeigt, dass von den ES-Klonen A1-A12 und B1-B6 fünf Klone positiv für die transgene Bande mit einer Größe von 5.9kb waren. In diesen Zellklonen wurde der CTV-CD83-Vektor homolog in den ROSA26-Locus rekombiniert.



Abbildung 3.2.4: Analyse CTV-CD83-transfizierter Stammzellen. Aufgereingte genomische DNS der mit dem CTV-CD83-Vektor transfizierten ES wurde mit EcoRI bei 37°C über Nacht verdaut. Im Southern Blot wurde mit der ^{32}P -markierten DNS-Sonde die homologe Rekombination überprüft. Die Abbildung zeigt beispielhaft das Screening von 18 Klonen. Dabei wurden bei allen Klonen Wt-Banden mit einer Größe von 15.6 kb und bei fünf Klonen transgene Banden mit einer Größe von 5.9 kb (rote Kreise) detektiert.

Drei der positiv identifizierten Stammzellklone (A2, A7 und A10) wurden im nächsten Schritt in Blastozysten des C57BL/6 Mausstammes und diese in scheinsschwangere C57BL/6 Leihmütter injiziert. Unter den Nachkommen befanden sich sogenannte Chimäre, welche Erbinformationen des 129/Sv Stammes und des C57BL/6 Stammes enthielten. Da beide Mausstämme

sich in ihrer Fellfarbe unterscheiden, zeichnete sich der Phänotyp dieser Chimäre durch eine gemusterte Fellfarbe aus (Abbildung 3.2.5). Somit konnten diese von den reinen C57BL/6 Nachkommen differenziert werden.

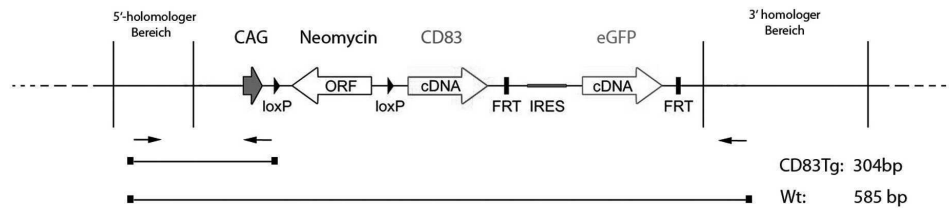


Abbildung 3.2.5: Phänotyp chimärer Nachkommen. Chimäre Nachkommen besaßen Erbinformationen des 129/Sv Stammes sowie des C57BL/6 Stammes, wodurch eine braun-schwarz gemusterte Fellfarbe entstand.

3.2.3 Screening heterozygoter CD83KI Mäuse

Im nächsten Schritt wurden chimäre Männchen mit C57BL/6 Weibchen gekreuzt, um für das CD83-Transgen heterozygote F1-Nachkommen zu erzeugen. Aus Schwanzbiopsien dieser F1 Nachkommen wurde genomische DNS isoliert, welche auf Keimbahntransmission des CD83-Transgens mittels PCR überprüft wurden. Hierfür wurden die von Sorrano et al. beschriebenen Primer verwendet [109]. Das Schema in Abbildung 3.2.6 A zeigt die Strategie des PCR-Screenings. Zur Detektion des Wt Allels wurden zwei Primer verwendet, welche im 5'- und 3'-homologen Bereich des Vektors binden und ein Fragment mit der Größe von 585 bp amplifizieren. Für den Nachweis des Transgens wurde derselbe *sense*-Primer sowie ein *anti-sense* Primer verwendet, welcher innerhalb des CTV-CD83-Vektors bindet. Dieses Amplifikat hat eine Größe von 304 bp. In Abbildung 3.2.6 B ist beispielhaft ein Agarosegel mit den PCR-Produkten von 11 F1 Nachkommen gezeigt. Das obere Gelbild zeigt das 585 bp große Wt Amplifikat, welches erwartungsgemäß bei allen 11 Nachkommen detektierbar war. Das untere Gelbild zeigt die PCR für das Transgen. Die transgene Bande mit einer Größe von 304 bp war bei drei Nachkommen sehr deutlich und bei weiteren fünf Nachkommen schwach detektierbar.

A



B

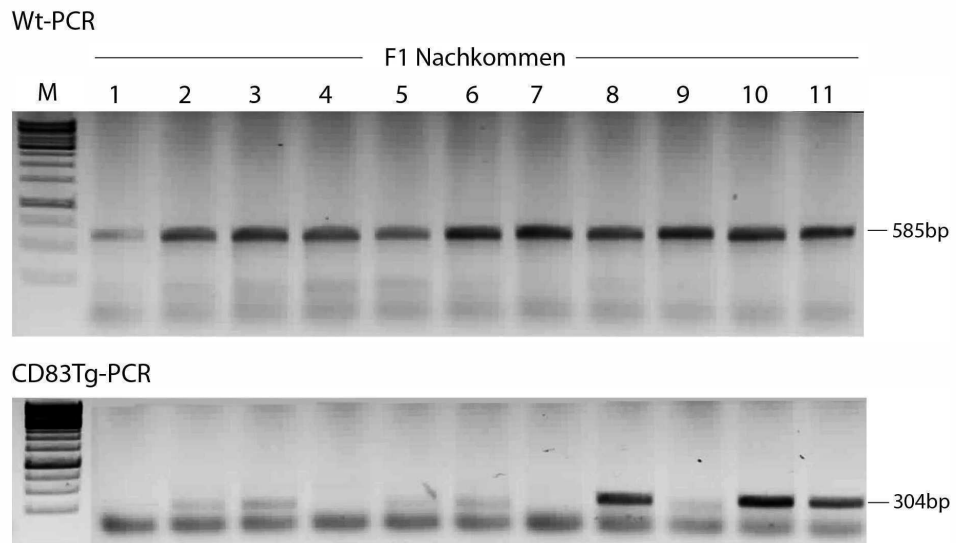


Abbildung 3.2.6: PCR-Screening der Chimäre x C57BL/6-Nachkommen. **A:** Der Nachweis des rekombinierten CTV-CD83-Vektors in F1 Nachkommen erfolgte mittels einer spezifischen PCR. Durch die Verwendung der Primer RevROSA26/2, RevROSA26/1 und ForROSA26 wurde eine Wt-Bande mit der Größe von 585 bp und eine transgene Bande mit der Größe von 304 bp amplifiziert. **B:** Aus Schwanzbiopsien der F1 Nachkommen wurde DNS aufgereinigt und mittels einer spezifischen PCR das Wt-Allel mit 585 bp und das Transgen mit 304 bp detektiert. Das Agarosegel zeigt exemplarisch die PCR-Amplifikate von elf F1 Nachkommen, von denen acht die transgene Bande aufwiesen (2,3,5,6,8-11). M = Marker (100bp DNS Plus Ladder).

Im nächsten Schritt soll die heterozygote ROSA83KI Maus für die Verpaarung mit geeigneten Mäusen eingesetzt werden, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle von Zelltyp-spezifischen Promotoren exprimieren. Um den Einfluss von CD83 auf die B-Zellaktivierung und Funktion zu untersuchen, eignen sich die Cre19 [112], Cre21 [113] und Cre23 [114] Mäuse, in denen die Expression der Cre-Rekombinase durch die jeweiligen Promotoren reguliert wird. Während der CD19-Promotor schon früh in der B-Zellentwicklung aktiv ist, ist der CD23-Promotor exklusiv in reifen FO B-Zellen und der CD21-Promotor in MZ sowie einem Teil der FO B-Zellen aktiv. Die Verpaarung der ROSA83KI Maus mit diesen Cre Mäusen führt deshalb zur Überexpression von CD83 entweder auf allen B-Zellen (Cre19), ausschließlich auf FO (Cre23) oder auf

MZ und teilweise FO B-Zellen (Cre21) (Abbildung 3.2.7).

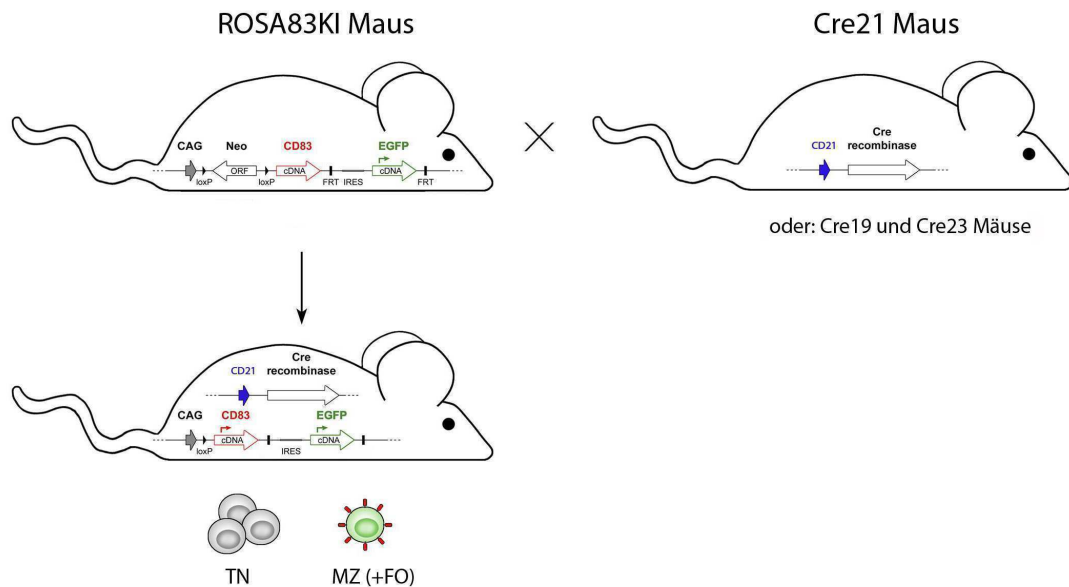


Abbildung 3.2.7: B-Zellspezifische Überexpression von CD83 durch die Kreuzung der ROSA83KI Maus mit geeigneten Cre Mäusen. ROSA83KI Mäuse mit integriertem CTV-CD83-Vektor sollen mit Cre-Mäusen verpaart werden. Hierfür geeignete Mäuse sind Cre19, Cre21 und Cre23 Mäuse. Die Verpaarung der ROSA83KI Maus mit diesen Cre Mäusen führt deshalb zur Überexpression von CD83 entweder auf allen B-Zellen (Cre19), ausschließlich auf FO (Cre23) oder auf MZ und teilweise FO B-Zellen (Cre21).

Zusammenfassung Teil 2

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Herstellung einer konditionellen CD83KI Maus beschrieben. Diese ROSA83KI Maus besitzt den heterozygot in den ROSA26-Locus integrierten CTV-CD83-Vektor. Mit diesen Mäusen stehen nun Tiere zur Verfügung, die für die Verpaarung mit etablierten Cre Mäusen eingesetzt werden können. Geeignete Mauslinien, welche die Cre-Rekombinase B-Zell-spezifisch exprimieren und damit eine transgene Expression von CD83 ermöglichen, sind die Cre19, Cre21 und Cre23 Mäuse. Die vergleichende Analyse der Nachkommen aus der Kreuzung der ROSA83KI Mäusen mit den Cre Mäusen wird eine Differenzierung des Einflusses von CD83 auf die Entwicklung von B-Zellen sowie deren Aktivierung und Funktion ermöglichen. Diese aufwendigen Verpaarungsschritte und Analysen konnten im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von CD83 auf die B-Zellaktivierung

CD83 galt lange Zeit als Aktivierungsmarker für reife dendritische Zellen [95]. In den vergangenen Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass viele weitere Immunzellen einschließlich B- und T-Zellen CD83 nach Aktivierung auf der Oberfläche exprimieren [97, 115]. Auf reifen B-Zellen wird CD83 innerhalb weniger Stunden nach BZR- und TLR4-Engagement *in vitro* hochreguliert [103]. In Infektionsmodellen mit *L. major* und *T. cruzi* stellen B-Zellen die dominante CD83⁺ Zellpopulation *in vivo* dar [104]. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass CD83 die B-Zellfunktion negativ reguliert. So führt die Überexpression von CD83 in CD83Tg Mäusen zu einer dramatisch reduzierten Ig-Freisetzung sowohl nach Immunisierung mit TD- und TI-Ag als auch bei Infektion mit *L. major* und *T. cruzi* [104]. Die inhibitorische Funktion von CD83 ist dabei auf die Überexpression des Moleküls auf den B-Zellen selbst zurückzuführen. Auch *in vitro* reagieren CD83Tg B-Zellen auf Stimulation über den BZR sowie mit LPS mit reduzierter Ig-Produktion und Proliferation [103]. Dennoch sind CD83Tg B-Zellen nicht generell defekt, sondern produzieren bei Stimulation mit LPS erhöhte Mengen an IL-10 [103].

Aufgrund der einerseits inhibierenden Wirkung von CD83 auf die B-Zellproliferation sowohl bei Stimulation des BZR als auch des TLR4 und der andererseits steigernden Wirkung von CD83 auf die IL-10 Produktion bei TLR4-Engagement, wurde in dieser Arbeit analysiert, ob und wie CD83 die BZR- und TLR4-Signalgebung beeinflusst. Um einen möglicherweise differenziellen Effekt von CD83 auf die FO, MZ und TN B-Zellsubpopulationen zu unterscheiden, wurden diese dabei getrennt untersucht.

4.1.1 CD83 ist ein negativer Regulator der BZR-vermittelten Signalgebung

Vorangegangene Arbeiten sowie die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die Überexpression von CD83 in B-Zellen zu einer reduzierten BZR-induzierten Proliferation führt. Eine verringerte Proliferationsrate nach Engagement des BZR war sowohl durch den ³H-Thymidin-Einbau als auch nach Markierung mit CFSE nachweisbar. Dabei waren alle untersuchten B-Zellsubpopulationen gleichermaßen betroffen. Zudem war exklusiv in CD83Tg FO B-Zellen eine erhöhte Zahl apoptotischer Zellen nachweisbar, die bereits in naivem Zustand, aber auch nach Stimulation über den BZR sowie über TLR4, messbar war. Die beobachteten Effekte sind nicht auf eine veränderte BZR-Expression zurückzuführen, da Wt und CD83Tg B-Zellen vergleich-

bare Mengen IgM auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen vielmehr, dass CD83 nicht nur die Aktivierung von B-Zellen über den BZR hemmt, sondern auch das Überleben von FO, MZ und TN B-Zellen differenziell reguliert. Dazu passt die Beobachtung, dass in der Peripherie zirkulierende reife CD83Tg B-Zellen eine reduzierte Überlebensdauer aufweisen [97]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass CD83 nicht nur mit der BZR-Signalgebung nach Ag-Kontakt, sondern auch mit tonischen BZR-vermittelten Signalen interferiert. Diese sind essenziell für das Überleben reifer peripherer B-Zellen [113, 116]. So führt die Ablation des BZR auf diesen Zellen zu einem schnellen Zelltod [117]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Blockade der tonischen Signalgebung über Ig α des BZR-Komplexes in einer reduzierten Anzahl peripherer B-Zellen resultiert [118]. Außerdem sind tonische BZR-Signale notwendig für die Reifung der B-Zellen in der Milz [119]. CD83Tg Mäuse besitzen gegenüber Wt Mäusen eine reduzierte Anzahl reifer FO B-Zellen bei reziprok erhöhter Anzahl unreifer TN B-Zellen in der Milz [97]. Nach dem Signalstärkmodell hängt die Differenzierung von TN zu reifen MZ oder FO B-Zellen sehr stark von der Intensität BZR-vermittelter tonischer Signale ab [120, 121]. Während die Differenzierung zu MZ B-Zellen nur ein schwaches BZR-vermitteltes Signal erfordert, ist für die Differenzierung zu FO B-Zellen sowie deren Überleben ein vergleichsweise starkes BZR-Signal notwendig [27]. Die in CD83Tg Mäusen beobachtete reduzierte Anzahl an FO B-Zellen kann daher auf die Interferenz von CD83 mit BZR-vermittelten Überlebens- und Reifungssignalen interpretiert werden. BZR-vermittelte tonische Signale werden durch Korezeptoren des BZR beeinflusst. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Mäuse, denen der kostimulierende CD19/CD21-Komplex fehlt, eine reduzierte Anzahl an FO und eine erhöhte Zahl an MZ B-Zellen besitzen, die durch das Fehlen des zusätzlichen CD19-vermittelten positiven Signales erklärt werden kann [122, 123]. Auf ähnliche Weise könnte die Überexpression eines Inhibitors wie CD83 sowohl die Differenzierung als auch das Überleben von FO B-Zellen stören. Die Überexpression von CD83 hat jedoch keinen Einfluss auf die Reifung und das Überleben von MZ B-Zellen, da diese lediglich ein schwaches tonisches BZR-Signal benötigen.

Bisher war bekannt, dass die transgene Expression von CD83 zu einem reduzierten Ca²⁺-Einstrom in BZR-aktivierten B-Zellen führt [103]. Außerdem wurde eine reduzierte Phosphorylierung der Kinasen LYN und SYK, welche für die Initiation des BZR-vermittelten Signals verantwortlich sind [50, 48], beobachtet (A. Osterloh, unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse zeigen, dass CD83 bereits sehr frühe BZR-vermittelte Signalereignisse beeinflusst. In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Kinase ERK1/2 untersucht. Die Aktivierung von MAPK wie ERK1/2 spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Differenzierung und das Überleben von B-Zellen als auch bei deren Proliferation nach Ag-Kontakt [124, 110]. So aktiviert ERK1/2 nach Engagement des BZR unter anderem die Transkriptionsfaktoren *serum response factor* (SRF), NFAT sowie AP-1, welche in die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung involviert sind [125]. Darüber hinaus vermittelt ERK1/2 anti-apoptotische Signale [126]. In dieser Arbeit

wurde die Aktivierung von ERK1/2 in B-Zellen^{Gesamt} von Wt und CD83Tg Mäusen nach Ligation des BZR untersucht. CD83Tg B-Zellen zeigen dabei eine drastisch reduzierte Aktivierung von ERK1/2. Alle untersuchten B-Zellsubpopulationen reagieren zudem auf Stimulation des BZR mit reduzierter Proliferation. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Überexpression von CD83 die BZR-Signalgebung in allen B-Zellsubpopulationen gleichermaßen inhibiert. Für FO B-Zellen reichen die durch ERK1/2 und andere Faktoren vermittelten Überlebenssignale für die Erhaltung jedoch nicht mehr aus, da diese verstärkt in Apoptose übergehen.

Die Ergebnisse vorangegangener Studien sowie der vorliegenden Arbeit zeigen, dass CD83 als Negativregulator der BZR-vermittelten Signalgebung fungiert. Auf welche Weise CD83 jedoch intrazelluläre Signale übermittelt, ist bisher nicht geklärt. Da CD83 selbst keine Signalmotive in der kurzen intrazellulären Domäne besitzt, ist eine Interaktion mit anderen Signalmolekülen notwendig. Der BZR selbst ist ein Beispiel für eine solche indirekte Signalgebung. Er assoziiert mit den Ig α und Ig β Ketten, die für die Weiterleitung intrazellulärer Signale verantwortlich sind [48]. CD83 könnte durch Interaktion mit anderen Regulatoren entweder positive Signale inhibieren oder negative Signale verstärken. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass CD83 auf der Oberfläche von B-Zellen sowohl mit dem BZR als auch mit dem inhibitorischen Korezeptor CD22 kolokalisiert. Zudem konnte mit Hilfe löslicher CD22Ig- und CD83Ig- Fusionsproteine eine direkte Interaktion beider Moleküle nachgewiesen werden. So kolokalisierte CD83 mit dem BZR sowie mit CD22 nach Engagement des BZR. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD83 als eine Art Adapter die Rekrutierung von CD22 zum BZR-Komplex fördert. Die räumliche Nähe von CD22 zum BZR ist notwendig für dessen inhibitorische Funktion [67]. Dabei werden seine intrazellulären ITIM-Motive durch die Kinase LYN phosphoryliert [127, 128]. Auf diese Weise würde eine verstärkte Phosphorylierung der ITIM-Motive von CD22 in einer gesteigerten Rekrutierung der Phosphatase SHP-1 resultieren, welche an diese Motive bindet [129]. Substrate von SHP-1 sind unter anderem die Kinase LYN und SYK [70], die maßgeblich an der Initiation der BZR-vermittelten Signalgebung beteiligt sind. Die Dephosphorylierung dieser Kinasen durch SHP-1 würde dann die weitere Signalleitung inhibieren. In CD83Tg B-Zellen wurde sowohl eine verstärkte Phosphorylierung von CD22 als auch eine reduzierte Phosphorylierung von LYN und SYK beobachtet (unveröffentlichte Daten), so dass angenommen werden kann, dass CD83 als Teil des CD22/SHP-1-vermittelten inhibitorischen Signalwegs bereits die Initiation der BZR-Signalgebung inhibiert. Dies setzt sich in einem reduzierten Ca²⁺-Influx [103] und einer reduzierten Aktivierung von ERK1/2 fort, wie sie in CD83Tg B-Zellen beobachtet wurde, und resultiert schließlich in einer reduzierten Proliferation, Ig-Produktion sowie Überlebensdauer ausschließlich von FO B-Zellen. Eine vergleichbare Situation wie bei CD83Tg B-Zellen ergibt sich für Wt B-Zellen nach Aktivierung, in deren Verlauf CD83 verstärkt exprimiert wird. Durch Wechselwirkung mit dem BZR und CD22 könnte CD83 hier einen Beitrag zur Beendigung der B-Zellantwort leisten. Ein Überblick über die dargelegte Hypothese ist in Abbildung 4.1.1 A dargestellt.

4.1.2 CD83 verstärkt die TLR4-vermittelte Signalgebung

Erstmals wurde in dieser Arbeit der Einfluss von CD83 auf die TLR4-vermittelte Signalgebung in B-Zellen genauer untersucht. Obwohl CD83Tg B-Zellen auf LPS-Stimulation mit einem reduzierten ^3H -Thymidin-Einbau reagieren (Abbildung 3.1.2), zeigt die durchflusszytometrische Analyse CFSE-markierter CD83Tg B-Zellen normale Frequenzen proliferierender Zellen verglichen mit Wt B-Zellen (Abbildung 3.1.4). Im Gegensatz zum BZR-Engagement führt somit das Engagement des TLR4 nicht zu einer verringerten Proliferation CD83Tg B-Zellen. Die beobachtete reduzierte ^3H -Thymidin-Inkorporation nach LPS-Stimulation lässt sich jedoch mit einer signifikant gesteigerten Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb der CD83Tg FO B-Zellen erklären, während MZ und TN B-Zellen normal reagieren (Abbildung 3.1.5 und 3.1.6). Der Verlust der CD83Tg FO B-Zellen ist wahrscheinlich ebenfalls ursächlich für die reduzierte Ig-Freisetzung *in vitro* [103]. Für B-Zellen, aber auch T-Zellen, ist die Aktivierung von ERK1/2 bei mitogener Stimulation wie der Aktivierung mit LPS überlebenswichtig [130]. Im Gegensatz zur verringerten ERK1/2-Aktivierung in CD83Tg B-Zellen nach BZR-Stimulation, wurde bei Engagement des TLR4 durch LPS eine gesteigerte Aktivierung von ERK1/2 exklusiv in MZ B-Zellen gemessen. CD83Tg FO B-Zellen zeigen dagegen keine gesteigerte Aktivierung. Eine mögliche Ursache hierfür ist die im Vergleich zu MZ B-Zellen deutlich schwächere Expression des LPS-Rezeptorkomplexes auf der Oberfläche naiver FO B-Zellen. Es ist deshalb anzunehmen, dass die TLR4-vermittelte Signalgebung und damit die Übermittlung von Überlebenssignalen durch die Aktivierung von ERK1/2 in FO B-Zellen generell schwächer ausfällt als in MZ B-Zellen. Durch den erhöhten Schwellenwert für BZR-vermittelte Überlebenssignale in CD83Tg FO B-Zellen reicht offenbar die mitogene LPS-Aktivierung nicht aus, um die verstärkte Apoptose der CD83Tg FO B-Zellen zu verhindern.

Neben der Übermittlung von Überlebenssignalen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ERK1/2 essenziell, jedoch nicht allein verantwortlich für die TLR-vermittelte Induktion von IL-10 in Ag-präsentierenden wie DZ und Makrophagen ist [111, 131]. Vergleichbare Mechanismen werden für die Induktion von IL-10 in B-Zellen nach TLR-Engagement vermutet, die jedoch bislang in keiner Studie beschrieben wurde. Mit Hilfe von IL-10eGFP Reportermäusen, die entweder mit Wt oder CD83Tg Mäusen verpaart wurden, konnte zunächst gezeigt werden, dass in erster Linie MZ und TN B-Zellen nach Stimulation mit LPS IL-10 produzieren, FO B-Zellen dieses Zytokin jedoch kaum freisetzen. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Literatur, in der beschrieben wurde, dass IL-10-produzierende B-Zellen Charakteristika von MZ und auch TN B-Zellen besitzen [132, 133]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CD83 exklusiv in MZ B-Zellen die Aktivierung von ERK1/2 steigert und nur unter CD83Tg MZ B-Zellen ein erhöhter Anteil IL-10-produzierender Zellen nachweisbar ist. Schließlich konnte mit Hilfe des Inhibitors U0126, welcher spezifisch die Aktivität der MEK und damit die Aktivierung von ERK1/2 hemmt [134, 135], gezeigt werden, dass ERK1/2 ebenfalls ein wichtiger Faktor für die

LPS-induzierte IL-10-Freisetzung in B-Zellen ist. Die Zugabe dieses Inhibitors führt zu einer 50%igen Reduktion der IL-10-Produktion LPS-stimulierter B-Zellen, jedoch weder in Wt noch CD83Tg B-Zellen zur vollständigen Blockade. Dabei setzten CD83Tg B-Zellen auch in Gegenwart von U0126 gegenüber Wt B-Zellen noch erhöhte Mengen IL-10 frei. Diese Beobachtungen zeigen zusammengefasst, dass

1. IL-10 hauptsächlich von MZ und TN B-Zellen produziert wird,
2. CD83 exklusiv in MZ B-Zellen, die die höchste Expression des LPS-Rezeptorkomplexes auf ihrer Oberfläche aufweisen, die IL-10-Freisetzung steigert und
3. die Aktivierung von ERK1/2 auch in B-Zellen für die Induktion von IL-10 wichtig, aber nicht allein verantwortlich ist.

Die verstärkte Aktivierung von ERK1/2 in CD83Tg MZ B-Zellen trägt daher wahrscheinlich zur erhöhten IL-10-Produktion bei. Daneben sorgen jedoch weitere Faktoren dafür, dass CD83Tg B-Zellen auch bei Inhibition von ERK1/2 gegenüber Wt B-Zellen vermehrt IL-10 freisetzen.

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass CD83 generell die TLR4-vermittelte Signalgebung fördert und in vergleichbarer Weise auch auf andere Immunzellen wirken könnte, die verstärkt auf LPS reagieren. Diese Vermutung wurde durch die Analyse von CD83Tg DZ bestätigt, die ebenfalls mit einer gesteigerten IL-10-Freisetzung auf die Stimulation mit LPS reagieren (Daten nicht gezeigt). CD83Tg DZ setzen darüber hinaus reduzierte Mengen IL-12 frei, produzieren jedoch normale Mengen an TNF α (Daten nicht gezeigt). Die reduzierte IL-12-Freisetzung ist dabei wahrscheinlich kein direkter Effekt der CD83-Überexpression, sondern eine indirekte Wirkung von IL-10, welches die Induktion von IL-12 hemmt [131, 136]. Auch für die verstärkte IL-10-Freisetzung durch CD83Tg DZ könnte ein Mechanismus ähnlich wie in MZ B-Zellen, einschließlich der Aktivierung von ERK1/2, wirksam sein. So zeigen CD83Tg DZ einen umgekehrten Phänotyp wie DZ von ERK1-Knockout Mäusen, die nach TLR-Stimulation reduzierte Mengen IL-10 und erhöhte Mengen IL-12 produzieren [137].

Die zugrunde liegenden Mechanismen für den CD83-vermittelten Einfluss auf die TLR4-Signalgebung sind bisher unklar. Der beobachtete Effekt ist jedoch nur möglich durch Interaktion von CD83 mit Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes, zu denen TLR4, MD-2 und CD14 gehören. CD14 ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Transmembranmolekül und bindet LPS im Komplex mit LBP [41]. Nach Ligandenbindung gelangt CD14 in unmittelbare Nähe des TLR4 [138]. Der CD14/LPS-Komplex assoziiert mit dem TLR4/MD-2-Komplex [139]. Letztlich führt die Dimerisierung von TLR4 zur Initiation der Signalkaskade. Trotzdem der TLR4/MD-2-Komplex LPS erkennen und eine Signalkaskade initiieren kann [140], wird die LPS-Erkennung um ein Vielfaches sensibler in Anwesenheit von CD14 [139]. In ersten Kollaborationsstudien dieser Arbeit wurde überprüft, ob CD83 nach Aktivierung mit dem

LPS-bindenden Komplex assoziiert. Nach Kreuzvernetzung des LPS-Rezeptorkomplexes auf der Makrophagenzelllinie RAW264.7, welche ein höheres TLR4-Expressionslevel als B-Zellen besitzen, wurde tatsächlich eine Koaggregation von CD83 mit LPS-bindenden Regionen auf der Zelloberfläche beobachtet (Abbildung 3.1.17 C). Ob und mit welchen Molekülen des LPS-Rezeptorkomplexes CD83 assoziiert, ist unbekannt. In dieser Arbeit wurden erste Koimmunopräzipitationsversuche unternommen. Dabei wurden entweder CD14 oder TLR4 selbst mit Hilfe eines Antikörpers präzipitiert, um anschließend CD83 im Western blot nachzuweisen. Dabei war CD83 jedoch weder nach Präzipitation von CD14 noch TLR4 detektierbar (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die putative Interaktion von CD83 mit diesen Molekülen zu schwach ist, um sie immunpräzipitatorisch nachzuweisen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass CD83 auch mit Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes assoziiert. CD83 verstärkt dabei die TLR4-vermittelte Aktivierung von ERK1/2, die zu einer gesteigerten Expression von IL-10 in LPS-responsiven Agpräsentierenden Zellen wie MZ B-Zellen und DZ führt. Abbildung 4.1.1 B fasst diese Beobachtungen zusammen.

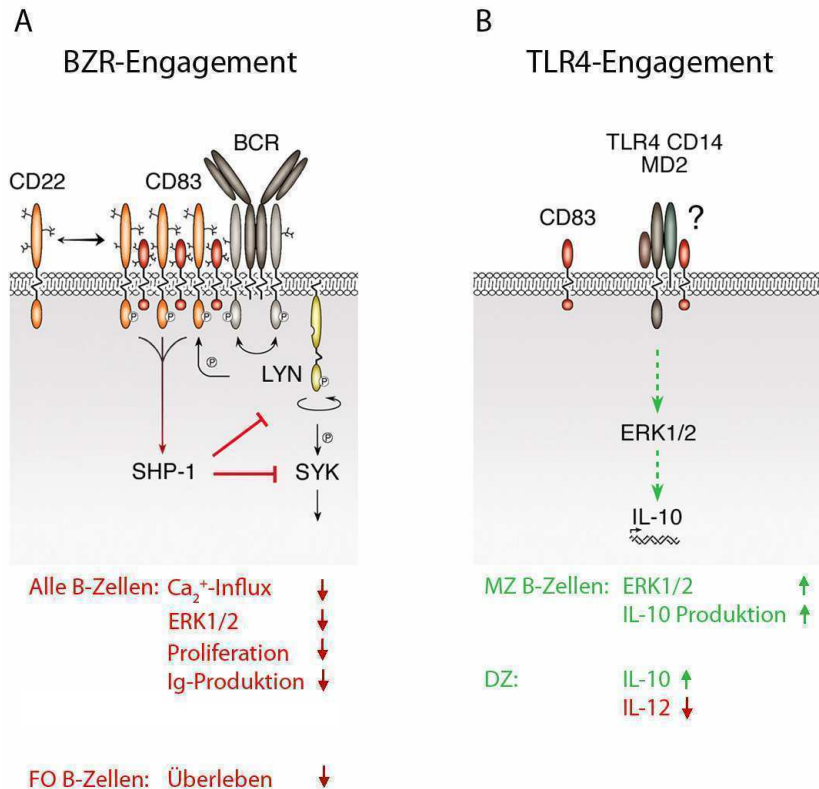


Abbildung 4.1.1: Hypothetische Funktion von CD83 in der BZR- und TLR4-Signalgebung. **(A)** CD83 trägt bei BZR-Engagement zu einer vermehrten Rekrutierung von CD22 zum BZR-Komplex bei. CD22 wird so verstärkt in intrazellulären ITIM-Motiven phosphoryliert und rekrutiert die Phosphatase SHP-1. Diese deaktiviert die an der Initiation der BZR-Signalgebung beteiligten Kinasen LYN und SYK. Auf diese Weise interferiert CD83 bereits mit der proximalen BZR-Signalgebung. Dies resultiert in einem reduzierten Ca_2^+ -Influx und einer reduzierten Aktivierung der ERK1/2-Kinase, was wiederum zu einer reduzierten Proliferation und Ig-Produktion führt. Dieser Effekt betrifft alle B-Zellsubpopulationen. Exklusiv CD83Tg FO B-Zellen zeigen zudem eine erniedrigte Überlebensrate. **(B)** Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von CD83 exklusiv auf MZ B-Zellen zu einer gesteigerten IL-10 Freisetzung bei Engagement des TLR4. CD83 assoziiert mit dem LPS-bindenden Komplex und verstärkt auf diese Weise die TLR4-vermittelte Aktivierung von ERK1/2, wobei die genauen Signalereignisse noch nicht genau bekannt sind. Letztlich führt die verstärkte ERK1/2-Aktivierung zu einer gesteigerten IL-10 Produktion in LPS-responsiven Ag-präsentierenden Zellen wie MZ B-Zellen und DZ.

4.1.3 Funktion von CD83 als Immunsuppressor

Die Gegenwart von CD83 auf der Oberfläche von B-Zellen hemmt über noch weitgehend unbekannte Mechanismen BZR-vermittelte Signale und wirkt so direkt inhibitorisch auf die B-Zelle selbst. Die nach Aktivierung induzierte Expression von CD83 stellt möglicherweise einen gegenregulatorischen Mechanismus dar, der zur Beendigung der BZR-vermittelten Signalgebung nach Aktivierung beiträgt. Solche inhibitorischen Mechanismen sind wichtig, um eine überschießende B-Zellantwort oder auch die Bildung von Antikörpern, welche gegen Selbst-Ag gerichtet sind, zu verhindern oder zu reduzieren.

Neben der direkten Rückwirkung auf die CD83-exprimierende B-Zelle selbst kann CD83 auch indirekt durch die Steigerung der IL-10-Freisetzung in MZ B-Zellen und DZ einen immu-

supprimierenden Effekt ausüben. Auf B-Zellen hat IL-10 lediglich einen schwachen Effekt. Es wirkt der Apoptose entgegen [141] und fördert die Proliferation, die Differenzierung zu Plasmazellen und die IgM-Synthese [142]. Ag-präsentierende Zellen und Lymphozyten, insbesondere CD4⁺ T-Zellen, stellen dagegen die Hauptzielzellen von IL-10 dar. So inhibiert IL-10 die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 und IL-12 in Monozyten und DZ [143], aber auch deren Ag-präsentierende Funktion durch Suppression der MHC-II- und CD86-Expression [144, 145]. IL-12 induziert die Freisetzung des inflammatorischen Zytokins IFN γ in T-Zellen und NK-Zellen, so dass die IL-10-vermittelte Inhibition der IL-12-Freisetzung in APZ indirekt auch die Produktion von IFN γ hemmt [145]. Außerdem hemmt IL-10 sowohl die IFN γ - als auch die IL-2-Synthese in CD4⁺ T-Zellen direkt [146]. Als Verstärker der LPS-induzierten IL-10-Freisetzung kann CD83 daher als genereller Immunsuppressor betrachtet werden.

Neben DZ [147], Makrophagen [148] und CD4⁺ T-Zellen [149] stellen B-Zellen potente IL-10-Produzenten dar [150, 151]. Mit Hilfe einer transkriptionellen IL-10 Reportermaus wurde erst kürzlich gezeigt, dass in peripheren lymphoiden Geweben B-Zellen sogar die dominante Zellpopulation unter den IL-10-Produzenten sowohl in naiven Mäusen als auch bei Infektionen *in vivo* darstellen [152]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass B-Zellen ebenfalls die dominante CD83⁺-Zellpopulation in verschiedenen Infektionsmodellen darstellen [104]. Ob diese Zellen IL-10 produzieren, ist jedoch nicht bekannt. Murine B-Zellen setzen IL-10 nach Engagement von TLR oder in Gegenwart einer Kombination von CD40- und TLR-Stimulation frei [153]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD83 die TLR-vermittelte IL-10-Freisetzung steigert. Widersprüchliche Daten existieren darüber, ob die alleinige Stimulation von CD40 für die Induktion von IL-10 in naiven B-Zellen der Maus ausreicht. Während postuliert wurde, dass murine B-Zellen zusätzlich TLR-vermittelte Signale benötigen, um IL-10 zu produzieren [153], zeigen andere Studien, dass allein das Engagement von CD40 die Expression von IL-10 in murinen B-Zellen induziert, während die kombinierte Aktivierung von BZR und CD40 nicht zur IL-10-Freisetzung führt [154]. Im Einklang mit dieser Beobachtung zeigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass nach kombiniertem Engagement von BZR und CD40 *in vitro* kein IL-10 im Kulturüberstand weder von Wt noch CD83Tg B-Zellen messbar war. Weitere Studien mit humanen B-Zellen belegen die CD40-induzierte IL-10-Expression. So wurde gezeigt, dass die alleinige Stimulation über CD40 ohne TLR- oder BZR-Signalgebung eine signifikante IL-10-Produktion in naiven humanen B-Zellen induziert [155]. Dies geschah im Kontext einer *Bystander*-Aktivierung, bei der in einer Kokultur von B- und T-Zellen nicht die B-Zellen direkt, sondern T-Zellen Ag-abhängig aktiviert wurden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in vergleichbaren Experimenten *Bystander*-aktivierte murine B-Zellen verstärkt CD83 exprimieren [156]. Diese Aktivierung war darüber hinaus partiell abhängig vom CD40-Engagement. Ob diese CD83-exprimierenden B-Zellen IL-10 freisetzen, wurde bislang nicht untersucht. Es ist deshalb unklar, ob CD83 auch im Kontext der *Bystander*-Aktivierung zu einer gesteigerten IL-10-Produktion beitragen kann.

IL-10-produzierende B-Zellen werden seit einigen Jahren als B10 oder regulatorische B-Zellen (Bregs) bezeichnet und spielen eine wichtige Rolle bei der Suppression inflammatorischer Reaktionen [45, 46]. Es wurde gezeigt, dass diese Zellen in Mausmodellen wesentlich zur Milderung inflammatorischer Erkrankungen wie entzündlichen Darmerkrankungen [47], der Kollagen-induzierten Arthritis [157] und der experimentellen autoimmunen Enzephalitis [158] beitragen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die regulatorische Funktion protektiver B-Zellen abhängig von der IL-10 Produktion ist [133, 152]. Anders als regulatorische T-Zellen, können Bregs bislang nicht anhand von Transkriptionsfaktoren klar definiert werden [47, 159] und bilden keine homogene B-Zellpopulation. Vielmehr finden sich Bregs sowohl unter den B1 als auch B2 Zellen. Experimente zur Charakterisierung dieser B-Zellen haben gezeigt, dass sich diese anhand der Expression von Oberflächenmarkern im Wesentlichen in drei Gruppen einteilen lassen:

1. CD21⁺CD23⁻ (MZ B-Zellen)
2. CD1d⁺CD21⁺CD23⁺ (unreife TN2-MZ B-Zellen)
3. CD1d^{hoch}CD5⁺CD19^{hoch} (B1a B-Zellen)

Von diesen weisen die ersten beiden Gruppen durch die Expression von CD21 und CD1d Merkmale von MZ B-Zellen beziehungsweise unreifen TN2-MZ B-Zellen, einer Vorstufe der MZ B-Zellen, auf. Die dritte Gruppe zeigt mit der Expression von CD5 Charakteristika von B1a B-Zellen. Es wird deshalb angenommen, dass sich Bregs vorrangig aus dem TN/MZ- und B1a-B-Zellpool entwickeln [46]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass etwa 24% der CD83Tg MZ B-Zellen (CD1d⁺CD23⁻) vermehrt IL-10 produzierten. Zudem wurde eine erhöhte IL-10-Freisetzung durch gereinigte CD83Tg CD21⁺CD23⁻ B-Zellen beobachtet, die sich aus MZ und unreifen TN B-Zellen zusammen setzen. Auch wenn eine weitere Charakterisierung der IL-10-Produzenten in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen wurde, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es sich hierbei um MZ B-Zellen und nicht TN2-MZ B-Zellen handelt. MZ B-Zellen sind aufgrund ihrer Lokalisation in der Marginalzone der Milz, in der eine Filtration des Blutes erfolgt, besonders geeignet, sehr schnell auf Blutantigene zu reagieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MZ B-Zellen das CD83-Molekül besonders schnell heraufregulieren und bereits zwei Stunden nach Stimulation mit LPS das maximale Expressionslevel erreichen. Deshalb könnte CD83 insbesondere bei bakteriellen Infektionen durch die Steigerung der TLR-vermittelten IL-10-Freisetzung in MZ B-Zellen dazu beitragen, eine überschießende Immunreaktion zu verhindern.

4.2 Generierung einer konditionellen CD83KI Maus

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die CD83-Überexpression die Reifung und Entwicklung von B-Zellen beeinflusst [97]. Im Knochenmark reifen B-Zellen aus Vorläuferzellen

und exprimieren als unreife B-Zellen zum ersten Mal den vollständig rearrangierten BZR [160]. Erst ab diesem Zeitpunkt wird natürliches CD83 auf B-Zellen exprimiert [97]. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von CD83 in CD83Tg Mäusen zu einer reduzierten Anzahl von pro-B-Zellen führt, wohingegen die Anzahl der pre-B-Zellen, eine auf den pro-B-Zellen folgende Entwicklungsstufe, normal ist im Vergleich mit Wt Mäusen. Zudem führte die vermehrte CD83-Expression zu einer reduzierten Entwicklung von reifen FO B-Zellen und zu einer reziproken Akkumulation unreifer TN B-Zellen in der Milz [97]. Diese Effekte waren abhängig von der Intensität der CD83-Expression. Dagegen entwickeln CD83Tg Mäuse eine normale Anzahl an MZ B-Zellen. Mit Hilfe von Knochenmarkchimären wurde weiter gezeigt, dass die veränderte B-Zellentwicklung auf die Überexpression von CD83 auf den sich entwickelnden hämatopoetischen Vorläuferzellen selbst und nicht auf akzessorischen Zellen wie Stromazellen zurückzuführen ist. Die hier dargestellten Analysen hinsichtlich der Entwicklung und Homöostase von CD83Tg B-Zellen wurden mit nicht-konditionellen Maussystemen durchgeführt. Das bedeutet, dass diese Maus in jeder Zelle und zu jedem Zeitpunkt während der Entwicklung sowie nach Abschluss der Reifung CD83 überexprimiert. Da die Überexpression von CD83 die B-Zellentwicklung beeinflusst, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte von CD83 auf die B-Zellaktivierung und -funktion auch einen Reifungsdefekt reflektieren. Daher sollte eine konditionelle CD83KI-Maus generiert werden, welche eine transgene CD83-Expression auf definierten B-Zellsubpopulationen zu gewünschten Zeitpunkten ermöglicht. Die einzelnen Schritte einer solchen Generierung sind in Abbildung 4.2.1 dargestellt. Über das Cre-loxP-Rekombinationssystem wurde der CTV-CD83-Vektor in das Genom von ES der Mauslinie 129/Sv erfolgreich eingebracht. Im Southern Blot konnten ES-Klone mit erfolgreicher homologer Rekombination des CTV-CD83-Vektors in den ROSA26-Locus identifiziert werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Injektion dieser Stammzellen in Blastozysten der Mauslinie C57BL/6. Leihmütter des gleichen Mausstammes trugen sogenannte Chimären aus, welche folglich Erbinformationen der Mauslinien C57BL/6 und 129/Sv enthielten und daher eine schwarz-braune Fellmusterung besaßen. Nach der Verpaarung dieser Chimären mit C57BL/6 Mäusen erfolgten weitere *Screening*-Analysen nach homologer Rekombination mittels einer spezifischen PCR. In der Zeit dieser Arbeit konnte erfolgreich eine transgene ROSA83KI Maus hergestellt werden, welche heterozygot den CTV-CD83-Vektor integriert hat und diesen über die Keimbahn vererbt. Diese steht nun für die Verpaarung mit geeigneten Cre-exprimierenden Mauslinien zur Verfügung, um eine konditionelle Überexpression auf gewünschten B-Zellsubpopulationen zu ermöglichen.

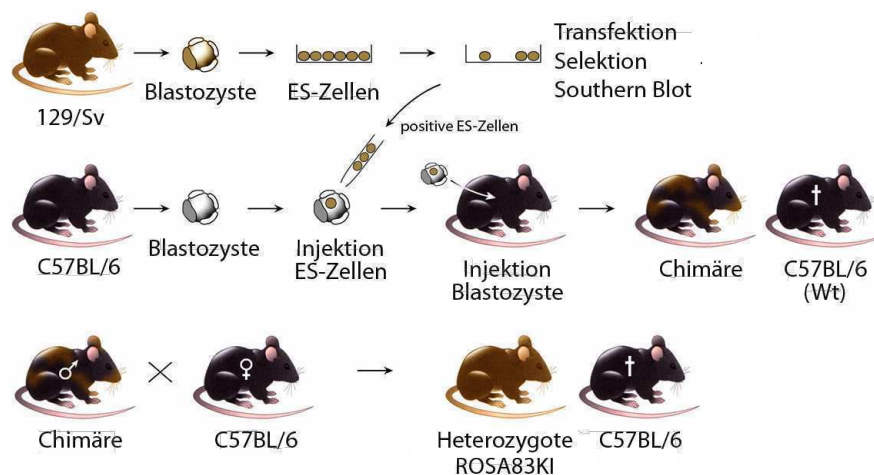


Abbildung 4.2.1: Schema zur Generierung der konditionalen CD83KI-Maus. Isolierte ES wurden mit dem CTV-CD83-Vektor transfiziert und mit Hilfe eines Southern Blots auf homologe Rekombination überprüft. Positive ES wurden anschließend in isolierte Blastozysten und diese in Leihmütter injiziert. Chimäre Mäuse, welche Erbinformationen der ES aus dem 129/Sv Stamm sowie der Blastozysten aus dem C57BL/6 Stamm enthielten, wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Die Nachkommen wurden mit einer spezifischen PCR auf Rekombination des CTV-CD83-Vektors analysiert. Auf diese Weise konnte die heterozygote CD83KI Maus im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden.

4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit erworbenen Daten verdeutlichen, dass CD83 die Funktion und Aktivierung muriner B-Zellen reguliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass CD83 einen differenziellen Einfluss auf FO und MZ B-Zellen hat, indem es BZR- und TLR4-vermittelte Signalwege moduliert.

Exklusiv in MZ B-Zellen steigert die transgene Expression von CD83 die TLR4-induzierte IL-10 Produktion *in vitro*. Da die zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar sind, sollte weiter untersucht werden, mit welchen Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes CD83 möglicherweise interagiert. Die Beobachtung, dass die gesteigerte ERK1/2-Aktivierung zwar zu einer erhöhten IL-10 Produktion von CD83Tg MZ B-Zellen beiträgt, jedoch nicht den einzigen verantwortlichen Faktor dafür darstellt, lässt vermuten, dass CD83 die Funktion zusätzlicher intrazellulärer Moleküle reguliert. Daher wäre interessant, intrazelluläre Signalwege zu entschlüsseln, welche durch CD83 beeinflusst werden. Zudem produzieren nicht alle CD83Tg MZ B-Zellen vermehrt IL-10, sondern nur ein prozentualer Anteil von etwa 24%. Eine weitere Charakterisierung dieser Zellpopulation könnte zeigen, ob diese Merkmale bereits beschriebener regulatorischer B-Zellen besitzen. Möglicherweise könnte CD83 ein Marker für regulatorische B-Zellen sein. Die Funktion von CD83 speziell auf MZ B-Zellen *in vivo* ist noch gänzlich unbekannt. Dabei wäre interessant zu untersuchen, ob MZ B-Zellen, welche bei Immunisierung mit LPS *in vivo* oder bei bakterieller Infektion natürliches CD83 hochregulieren, ebenfalls vermehrt

IL-10 produzieren und auf diese Weise einer überschießenden Immunantwort entgegenwirken. Dies würde eine Funktion von CD83 als Regulator der IL-10-Freisetzung auch *in vivo* bestätigen. Schließlich könnte untersucht werden, ob *Bystander*-aktivierte B-Zellen, welche lediglich über CD40 mit aktivierten T-Zellen interagieren und CD83 hochregulieren, ebenso IL-10 produzieren.

Die Ergebnisse wurden mit einer CD83Tg Maus generiert, welche auf allen kernhaltigen Zellen CD83 überexprimiert. Daher wurde eine ROSA83KI Maus generiert, welche nach Verpaarung mit geeigneten Cre Mäusen eine konditionelle CD83-Überexpression auf definierten Zellpopulationen erlaubt. Um die bisher gewonnen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zu bestätigen, sollte im nächsten Schritt eine Maus generiert werden, welche lediglich auf CD21⁺ B-Zellen CD83 transgen exprimiert und somit exklusiv auf MZ und einem Teil der FO B-Zellen. Neben der Cre21 Maus sind weitere Mauslinien verfügbar, wie die Cre23 Maus, welche die CD83-Überexpression ausschließlich auf FO B-Zellen ermöglicht, und die Cre19 Maus, die zur Überexpression von CD83 auf allen B-Zellen bereits ab einem frühen Entwicklungsstadium führt. Der Vergleich dieser Nachkommen hinsichtlich der B-Zellentwicklung, Aktivierung und Funktion wird zeigen, ob und welche der beobachteten Effekte von CD83 auf Reifungsdefizite oder einen Einfluss von CD83 auf die Signalgebung bei aktueller Stimulation von B-Zellen zurückzuführen sind.

5 Zusammenfassung (deutsch)

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass CD83 als Negativregulator die BZR-vermittelte Signalgebung hemmt. Die Analyse distaler Signalereignisse hat gezeigt, dass die Überexpression von CD83 zu einer reduzierten Aktivierung der MAPK ERK1/2 nach Engagement des BZR führt. Diese vermittelt in B-Zellen sowohl proliferative Signale als auch wichtige Signale für die Differenzierung und das Überleben. Aufgrund der verminderten Aktivierung von ERK1/2 und wahrscheinlich weiterer Faktoren, wurde in allen CD83Tg B-Zellsubpopulationen eine signifikant reduzierte Proliferation beobachtet, welche die reduzierte Ig-Freisetzung nach BZR-Aktivierung erklärt. Zudem konnte gezeigt werden, dass ausschließlich CD83Tg FO B-Zellen eine gesteigerte Apoptoserate aufweisen, die bereits bei frisch isolierten B-Zellen beobachtet wurde. Es kann deshalb angenommen werden, dass die Überexpression von CD83 nicht nur BZR-vermittelte Signale nach Ag-Kontakt inhibiert, sondern auch mit der tonischen Signalgebung durch den BZR interferiert. Tonische BZR-vermittelte Signale sind für die Differenzierung und das Überleben insbesondere von FO B-Zellen essenziell. Eine Störung dieser Signale durch die transgene CD83-Expression kann deshalb die Entwicklung reduzierter Anzahlen von FO B-Zellen in CD83Tg Mäusen sowie deren reduzierte Überlebensdauer erklären. Die Mechanismen, über die CD83 einen inhibitorischen Effekt auf die BZR-Signalgebung ausübt, sind nicht bekannt. CD83 selbst ist nicht in der Lage, intrazelluläre Signale zu übermitteln und muss daher mit anderen Signalmolekülen interagieren. Noch unveröffentlichte Daten zeigen, dass CD83 mit dem BZR sowie mit CD22, einem inhibitorischen Korezeptor des BZR, assoziiert. CD83 könnte deshalb Teil des CD22-vermittelten inhibitorischen Signalwegs sein.

Im Gegensatz dazu verstärkt CD83 die TLR4-vermittelten Signalgebung und steigert die LPS-induzierte IL-10-Produktion. Mit Hilfe von IL-10 Reportermäusen, die mit Wt beziehungsweise CD83Tg Mäusen gekreuzt wurden, konnte gezeigt werden, dass sowohl TN als auch MZ B-Zellen IL-10 produzieren. Die Überexpression von CD83 steigert jedoch ausschließlich die Expression von IL-10 in MZ B-Zellen. In dieser Subpopulation wurde eine erhöhte Frequenz IL-10-produzierender Zellen beobachtet. Die Untersuchung intrazellulärer Signalereignisse zeigte weiter, dass CD83Tg MZ B-Zellen, jedoch nicht FO B-Zellen, auf die Stimulation mit LPS mit einer gesteigerten Aktivierung von ERK1/2 reagieren. Es wurde bereits beschrieben, dass ERK1/2 für die Induktion von IL-10 in Ag-präsentierenden wie DZ und Makrophagen essenziell ist. Mit Hilfe des MEK-spezifischen Inhibitors U0126 konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 auch in B-Zellen eine wichtige Rolle für die Induk-

tion der IL-10-Expression spielt. Die verstärkende Wirkung von CD83 auf IL-10-Expression bei TLR4-Engagement war nicht auf das MZ B-Zellkompartiment beschränkt, sondern wurde auch in CD83Tg DZ beobachtet.

Die Untersuchung der Proliferation der verschiedenen B-Zellsubpopulationen aus Wt und CD83Tg Mäusen nach TLR4-Engagement zeigte keine Unterschiede. Allerdings konnte die Stimulation mit LPS nicht die Apoptose von CD83Tg FO B-Zellen verhindern. Mögliche Ursache hierfür ist die schwache Expression des TLR4 auf naiven FO B-Zellen, die keine starke Induktion überlebenswichtiger Faktoren wie ERK1/2 erlaubt. Naive MZ B-Zellen exprimieren dagegen den LPS-bindenden Rezeptor in stärkerem Maße und reagieren schneller auf diesen TLR-Liganden. So konnte auch gezeigt werden, dass Wt MZ B-Zellen das CD83-Molekül wesentlich schneller als FO oder TN B-Zellen heraufregulierten. Schließlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD83 mit LPS-bindenden Regionen auf der Oberfläche von Makrophagen koaggregiert. Die in Gegenwart von CD83 gesteigerte IL-10-Freisetzung bei Stimulation mit LPS beruht deshalb wahrscheinlich auf der Interaktion mit einer oder mehreren Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes, zu dem CD14, MD-2 und TLR4 selbst gehören.

Alle bislang beschriebenen Untersuchungen zur Funktion von CD83 wurden mit Hilfe der CD83Tg Maus erhalten, die das Molekül auf allen kernhaltigen Zellen überexprimiert. CD83 übt auch einen Einfluss auf die B-Zellentwicklung aus, was in einer reduzierten Anzahl reifer FO B-Zellen in CD83Tg Mäusen resultiert. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass auch während der Entwicklung erworbene Defizite zur veränderten Aktivierung und Funktion von reifen CD83Tg B-Zellen beitragen. Um solche Effekte auszuschließen, wurde in dieser Arbeit die CD83KI Maus hergestellt, die die konditionelle Expression des CD83-Moleküls in definierten Zellpopulationen erlaubt. Diese Maus steht nun zur Verpaarung mit Cre19-, Cre21- und Cre23-Mäusen zur Verfügung. Die vergleichende Analyse der Nachkommen wird eine Differenzierung der Effekte von CD83 auf die B-Zellentwicklung, -aktivierung und -funktion erlauben.

6 Zusammenfassung (englisch)

Results of this work have shown, that CD83 functions as a negative regulator of BCR-induced signaling. Transgenic overexpression of CD83 leads to a reduced activation of the kinase ERK1/2 in all B cell subsets, which mediates survival and differentiation signals. The observed reduction of proliferation and thus, Ig production of CD83Tg B cells can be explained by less activation of ERK1/2. Moreover, CD83Tg FO but not MZ or TN B cells show significantly enhanced cell death. This indicates that CD83 interferes with tonic BCR-signaling which is essential for differentiation and survival, especially of FO B cells. Inhibition of tonic BCR signals by CD83 might be the reason of reduced maturation of FO B cells in CD83Tg mice. Mechanisms, by which CD83 mediates its inhibitory effects, are yet not clear. CD83 lacks ITIMs in its intracellular domain. Therefore an interaction with other signaling molecules is required. Unpublished data show that CD83 associates with the BCR as well as with the inhibitory coreceptor CD22, indicating a role of CD83 in CD22-mediated inhibitory signaling. In contrast CD83 enhances the TLR4-mediated signaling. Crossing of IL10 reporter mice with Wt or CD83Tg mice revealed that TN and MZ B cells are the main IL10 producer upon LPS stimulation. However, CD83 overexpression leads to an increase of IL10 producing cells within the MZ B cell subset exclusively. Moreover, CD83Tg MZ but not FO B cells show increased activation of the kinase ERK1/2 after TLR4 engagement, which is involved in IL10 induction of Ag-presenting cells like dendritic cells and macrophages. By inhibition of the ERK1/2 activation with the inhibitor U0126 this work shows, that ERK1/2 activation is also important for IL10 production in B cells. The analysis of proliferation after TLR4 engagement shows no differences between the B cell subsets of Wt and CD83Tg mice. However, LPS stimulation can not rescue CD83Tg FO B cells to undergo strong apoptosis, which might be due to less expression of TLR4 compared to MZ B cells. Finally this work shows an aggregation of CD83 and the TLR4-complex on macrophages after LPS stimulation.

Previous work has shown that CD83 influences B cell development and differentiation resulting in less amounts of mature FO B cells in CD83Tg mice. To exclude, that the observed effects of CD83 on B cell activation and function are not due to its effect on immature precursor B cells, a conditional CD83KI mouse was generated. This mouse overexpresses CD83 on defined cell subsets controlled by defined promoters. Crossing with Cre19, Cre21, and Cre23 mice make it possible to define CD83-mediated effect on B cell development, activation, and function.

Literaturverzeichnis

- [1] T. Ohteki, "The dynamics of dendritic cell: mediated innate immune regulation.," *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* **56**, pp. 209–14, Sept. 2007.
- [2] A. Aderem and D. M. Underhill, "Mechanisms of phagocytosis in macrophages.," *Annual review of immunology* **17**, pp. 593–623, Jan. 1999.
- [3] W. L. Lee, R. E. Harrison, and S. Grinstein, "Phagocytosis by neutrophils.," *Microbes and infection / Institut Pasteur* **5**, pp. 1299–306, Nov. 2003.
- [4] S. E. Kirwan and D. N. Burshtyn, "Regulation of natural killer cell activity.," *Current opinion in immunology* **19**, pp. 46–54, Feb. 2007.
- [5] N. S. Laursen, F. Magnani, R. H. Gottfredsen, S. V. Petersen, and G. R. Andersen, "Structure, function and control of complement c5 and its proteolytic fragments.," *Current molecular medicine* **12**, pp. 1083–97, Oct. 2012.
- [6] M. Okroj, E. Holmquist, B. C. King, and A. M. Blom, "Functional analyses of complement convertases using c3 and c5-depleted sera.," *PloS one* **7**, p. e47245, Jan. 2012.
- [7] S. Gordon, "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response.," *Cell* **111**, pp. 927–30, Dec. 2002.
- [8] D. C. Dale, L. Boxer, and W. C. Liles, "The phagocytes: neutrophils and monocytes.," *Blood* **112**, pp. 935–45, Aug. 2008.
- [9] A. Bowie and L. A. O'Neill, "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products.," *Journal of leukocyte biology* **67**, pp. 508–14, May 2000.
- [10] S. Akira, "TLR signaling.," *Current topics in microbiology and immunology* **311**, pp. 1–16, Jan. 2006.
- [11] H. Rus, C. Cudrici, and F. Niculescu, "The role of the complement system in innate immunity.," *Immunologic research* **33**, pp. 103–12, Jan. 2005.

- [12] M. Karin and Y. Ben-Neriah, "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.," *Annual review of immunology* **18**, pp. 621–63, Jan. 2000.
- [13] K.-U. Belge, F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock, "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **168**, pp. 3536–42, Apr. 2002.
- [14] S. Akira, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, "Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF).," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **4**, pp. 2860–7, Aug. 1990.
- [15] R. Mansson, S. Zandi, K. Anderson, I. L. Martensson, S. E. Jacobsen, D. Bryder, and M. Sigvardsson, "B-lineage commitment prior to surface expression of B220 and CD19 on hematopoietic progenitor cells," *Blood* **112**(4), pp. 1048–1055, 2008.
- [16] D. Bryder and M. Sigvardsson, "Shaping up a lineage—lessons from B lymphopoiesis.," *Current opinion in immunology* **22**, pp. 148–53, Apr. 2010.
- [17] E. V. Rothenberg, J. E. Moore, and M. A. Yui, "Launching the T-cell-lineage developmental programme.," *Nature reviews. Immunology* **8**, pp. 9–21, Jan. 2008.
- [18] D. Allman, B. Srivastava, and R. C. Lindsley, "Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells.," *Immunological reviews* **197**, pp. 147–60, Feb. 2004.
- [19] M. Cohn, N. A. Mitchison, W. E. Paul, A. M. Silverstein, D. W. Talmage, and M. Weigert, "Reflections on the clonal-selection theory.," *Nature reviews. Immunology* **7**, pp. 823–30, Oct. 2007.
- [20] D. Jung, C. Giallourakis, R. Mostoslavsky, and F. W. Alt, "Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus.," *Annual review of immunology* **24**, pp. 541–70, Jan. 2006.
- [21] G. F. Mitchell, "Selection, memory and selective memories: T cells, B cells and Sir Mac 1968.," *Immunology and cell biology* **86**, pp. 26–30, Jan. 2008.
- [22] F. Martin and J. F. Kearney, "B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets," *Curr Opin Immunol* **13**(2), pp. 195–201, 2001.
- [23] S. Zandi, D. Bryder, and M. Sigvardsson, "Load and lock: the molecular mechanisms of B-lymphocyte commitment," *Immunol Rev* **238**(1), pp. 47–62.

- [24] S. Zandi, J. Ahsberg, P. Tsapogas, J. Stjernberg, H. Qian, and M. Sigvardsson, "Single-cell analysis of early B-lymphocyte development suggests independent regulation of lineage specification and commitment in vivo.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, pp. 15871–6, Sept. 2012.
- [25] K. Rajewsky, "Early and late B-cell development in the mouse.," *Current opinion in immunology* **4**, pp. 171–6, Apr. 1992.
- [26] T. Lopes-Carvalho and J. F. Kearney, "Development and selection of marginal zone B cells.," *Immunological reviews* **197**, pp. 192–205, Feb. 2004.
- [27] S. Pillai, A. Cariappa, and S. T. Moran, "Marginal zone B cells.," *Annual review of immunology* **23**, pp. 161–96, Jan. 2005.
- [28] A. M. Oliver, F. Martin, and J. F. Kearney, "IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **162**, pp. 7198–207, June 1999.
- [29] J. J. Mond, A. Lees, and C. M. Snapper, "T cell-independent antigens type 2.," *Annual review of immunology* **13**, pp. 655–92, Jan. 1995.
- [30] K. L. Rock, B. Benacerraf, and A. K. Abbas, "Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors.," *The Journal of experimental medicine* **160**, pp. 1102–13, Oct. 1984.
- [31] A. Lanzavecchia and S. Bove, "Specific B lymphocytes efficiently pick up, process and present antigen to T cells.," *Behring Institute Mitteilungen* , pp. 82–7, Aug. 1985.
- [32] P. Lane, A. Traunecker, S. Hubele, S. Inui, A. Lanzavecchia, and D. Gray, "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.," *European journal of immunology* **22**, pp. 2573–8, Oct. 1992.
- [33] I. C. M. MacLennan, K.-M. Toellner, A. F. Cunningham, K. Serre, D. M.-Y. Sze, E. Zúñiga, M. C. Cook, and C. G. Vinuesa, "Extrafollicular antibody responses.," *Immunological reviews* **194**, pp. 8–18, Aug. 2003.
- [34] L. J. McHeyzer-Williams, D. J. Driver, and M. G. McHeyzer-Williams, "Germinal center reaction.," *Current opinion in hematology* **8**, pp. 52–9, Jan. 2001.
- [35] C. Berek, A. Berger, and M. Apel, "Maturation of the immune response in germinal centers.," *Cell* **67**, pp. 1121–9, Dec. 1991.

- [36] J. Hasbold, A. B. Lyons, M. R. Kehry, and P. D. Hodgkin, "Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4.," *European journal of immunology* **28**, pp. 1040–51, Mar. 1998.
- [37] M. G. McHeyzer-Williams and R. Ahmed, "B cell memory and the long-lived plasma cell.," *Current opinion in immunology* **11**, pp. 172–9, Apr. 1999.
- [38] R. A. Manz, A. Thiel, and A. Radbruch, "Lifetime of plasma cells in the bone marrow.," *Nature* **388**, pp. 133–4, July 1997.
- [39] Q. Vos, A. Lees, Z. Q. Wu, C. M. Snapper, and J. J. Mond, "B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms.," *Immunological reviews* **176**, pp. 154–70, Aug. 2000.
- [40] J. J. Mond, I. Scher, D. E. Mosier, M. Baese, and W. E. Paul, "T-independent responses in B cell-defective CBA/N mice to *Brucella abortus* and to trinitrophenyl (TNP) conjugates of *Brucella abortus*.," *European journal of immunology* **8**, pp. 459–63, July 1978.
- [41] A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler, "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.," *Science (New York, N.Y.)* **282**, pp. 2085–8, Dec. 1998.
- [42] F. Martin and J. F. Kearney, "B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory".," *Immunological reviews* **175**, pp. 70–9, June 2000.
- [43] F. Martin, A. M. Oliver, and J. F. Kearney, "Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens.," *Immunity* **14**, pp. 617–29, May 2001.
- [44] M. R. Ehrenstein and C. A. Notley, "The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator.," *Nature reviews. Immunology* **10**, pp. 778–86, Nov. 2010.
- [45] C. Mauri and M. R. Ehrenstein, "The 'short' history of regulatory B cells.," *Trends in immunology* **29**, pp. 34–40, Jan. 2008.
- [46] K. Yanaba, J. D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, and T. F. Tedder, "The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals," *J Immunol* **182**(12), pp. 7459–7472, 2009.
- [47] A. Mizoguchi and A. K. Bhan, "A case for regulatory B cells," *J Immunol* **176**(2), pp. 705–710, 2006.

- [48] A. L. DeFranco, "The complexity of signaling pathways activated by the BCR.," *Current opinion in immunology* **9**, pp. 296–308, June 1997.
- [49] M. Reth, "Antigen receptor tail clue.," *Nature* **338**, pp. 383–4, Mar. 1989.
- [50] J. M. Dal Porto, S. B. Gauld, K. T. Merrell, D. Mills, A. E. Pugh-Bernard, and J. Cambier, "B cell antigen receptor signaling 101.," *Molecular immunology* **41**, pp. 599–613, July 2004.
- [51] M. Reth and J. Wienands, "Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor.," *Annual review of immunology* **15**, pp. 453–79, Jan. 1997.
- [52] J. M. Bradshaw, "The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches.," *Cellular signalling* **22**, pp. 1175–84, Aug. 2010.
- [53] R. B. Rowley, A. L. Burkhardt, H. G. Chao, G. R. Matsueda, and J. B. Bolen, "Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation.," *The Journal of biological chemistry* **270**, pp. 11590–4, May 1995.
- [54] I. Tamir and J. C. Cambier, "Antigen receptor signaling: integration of protein tyrosine kinase functions.," *Oncogene* **17**, pp. 1353–64, Sept. 1998.
- [55] T. Kurosaki, "Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins.," *Nature reviews. Immunology* **2**, pp. 354–63, May 2002.
- [56] C. Fu, C. W. Turck, T. Kurosaki, and A. C. Chan, "BLNK: a central linker protein in B cell activation.," *Immunity* **9**, pp. 93–103, July 1998.
- [57] M. Hikida and T. Kurosaki, "Regulation of phospholipase C-gamma2 networks in B lymphocytes.," *Advances in immunology* **88**, pp. 73–96, Jan. 2005.
- [58] M. R. Gold, V. W. Chan, C. W. Turck, and A. L. DeFranco, "Membrane Ig cross-linking regulates phosphatidylinositol 3-kinase in B lymphocytes.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **148**, pp. 2012–22, Apr. 1992.
- [59] R. E. Dolmetsch, R. S. Lewis, C. C. Goodnow, and J. I. Healy, "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration.," *Nature* **386**, pp. 855–8, Apr. 1997.
- [60] L. A. Timmerman, J. I. Healy, S. N. Ho, L. Chen, C. C. Goodnow, and G. R. Crabtree, "Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **159**, pp. 2735–40, Sept. 1997.

- [61] K. Saijo, I. Mecklenbräuker, A. Santana, M. Leitger, C. Schmedt, and A. Tarakhovsky, "Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha.," *The Journal of experimental medicine* **195**, pp. 1647–52, June 2002.
- [62] C. Dong, R. J. Davis, and R. A. Flavell, "MAP kinases in the immune response.," *Annual review of immunology* **20**, pp. 55–72, Jan. 2002.
- [63] D. Depoil, S. Fleire, B. L. Treanor, M. Weber, N. E. Harwood, K. L. Marchbank, V. L. J. Tybulewicz, and F. D. Batista, "CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand.," *Nature immunology* **9**, pp. 63–72, Jan. 2008.
- [64] R. H. Carter and R. A. Barrington, "Signaling by the CD19/CD21 complex on B cells.," *Current directions in autoimmunity* **7**, pp. 4–32, Jan. 2004.
- [65] T. Tsubata, "Role of inhibitory BCR co-receptors in immunity.," *Infectious disorders drug targets* **12**, pp. 181–90, June 2012.
- [66] T. Adachi, H. Flaswinkel, H. Yakura, M. Reth, and T. Tsubata, "The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **160**, pp. 4662–5, May 1998.
- [67] L. Nitschke, "The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation.," *Current opinion in immunology* **17**, pp. 290–7, June 2005.
- [68] T. Muta, T. Kurosaki, Z. Misulovin, M. Sanchez, M. C. Nussenzweig, and J. V. Ravetch, "A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling.," *Nature* **368**, pp. 70–3, Mar. 1994.
- [69] N. R. Pritchard and K. G. C. Smith, "B cell inhibitory receptors and autoimmunity.," *Immunology* **108**, pp. 263–73, Mar. 2003.
- [70] H. Jiao, K. Berrada, W. Yang, M. Tabrizi, L. C. Platanias, and T. Yi, "Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1.," *Molecular and cellular biology* **16**, pp. 6985–92, Dec. 1996.
- [71] A. M. Scharenberg, O. El-Hillal, D. A. Fruman, L. O. Beitz, Z. Li, S. Lin, I. Gout, L. C. Cantley, D. J. Rawlings, and J. P. Kinet, "Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals.," *The EMBO journal* **17**, pp. 1961–72, Apr. 1998.
- [72] G. M. Doody, L. B. Justement, C. C. Delibrias, R. J. Matthews, J. Lin, M. L. Thomas, and D. T. Fearon, "A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP.," *Science (New York, N.Y.)* **269**, pp. 242–4, July 1995.

- [73] S. Akira and K. Takeda, "Toll-like receptor signalling.," *Nature reviews. Immunology* **4**, pp. 499–511, July 2004.
- [74] J. K. Bell, G. E. D. Mullen, C. A. Leifer, A. Mazzoni, D. R. Davies, and D. M. Segal, "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors.," *Trends in immunology* **24**, pp. 528–33, Oct. 2003.
- [75] Y. Xu, X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. L. Manley, and L. Tong, "Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains.," *Nature* **408**, pp. 111–5, Nov. 2000.
- [76] L. A. J. O'Neill and A. G. Bowie, "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.," *Nature reviews. Immunology* **7**, pp. 353–64, May 2007.
- [77] S. D. Wright, R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison, "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.," *Science (New York, N.Y.)* **249**, pp. 1431–3, Sept. 1990.
- [78] R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto, "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.," *The Journal of experimental medicine* **189**, pp. 1777–82, June 1999.
- [79] E. N. Hatada, D. Krappmann, and C. Scheidereit, "NF-kappaB and the innate immune response.," *Current opinion in immunology* **12**, pp. 52–8, Feb. 2000.
- [80] M. Loiarro, G. Gallo, N. Fantò, R. De Santis, P. Carminati, V. Ruggiero, and C. Sette, "Identification of critical residues of the MyD88 death domain involved in the recruitment of downstream kinases.," *The Journal of biological chemistry* **284**, pp. 28093–103, Oct. 2009.
- [81] S. Janssens and R. Beyaert, "Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members.," *Molecular cell* **11**, pp. 293–302, Feb. 2003.
- [82] S. Janssens, K. Burns, E. Vercammen, J. Tschopp, and R. Beyaert, "MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression.," *FEBS letters* **548**, pp. 103–7, July 2003.
- [83] Q. Huang, J. Yang, Y. Lin, C. Walker, J. Cheng, Z.-g. Liu, and B. Su, "Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3.," *Nature immunology* **5**, pp. 98–103, Jan. 2004.
- [84] T. Kaisho, O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira, "Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, pp. 5688–94, May 2001.

- [85] M. Gururajan, J. Jacob, and B. Pulendran, "Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets.," *PloS one* **2**, p. e863, Jan. 2007.
- [86] L. Genestier, M. Taillardet, P. Mondiere, H. Gheit, C. Bella, and T. Defrance, "TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, pp. 7779–86, June 2007.
- [87] L. J. Zhou, R. Schwarting, H. M. Smith, and T. F. Tedder, "A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **149**, pp. 735–42, July 1992.
- [88] E. J. Kozlow, G. L. Wilson, C. H. Fox, and J. H. Kehrl, "Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes.," *Blood* **81**, pp. 454–61, Jan. 1993.
- [89] C. J. Twist, D. R. Beier, C. M. Disteche, S. Edelhoff, and T. F. Tedder, "The mouse Cd83 gene: structure, domain organization, and chromosome localization.," *Immunogenetics* **48**(6), pp. 383–93.
- [90] S. Berchtold, T. Jones, P. Mühl-Zürbes, D. Sheer, G. Schuler, and A. Steinkasserer, "The human dendritic cell marker CD83 maps to chromosome 6p23.," *Annals of human genetics* **63**, pp. 181–3, Mar. 1999.
- [91] C. Hansell, X. W. Zhu, H. Brooks, M. Sheppard, S. Withanage, D. Maskell, and I. McConnell, "Unique features and distribution of the chicken CD83+ cell.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, pp. 5117–25, Oct. 2007.
- [92] Y. Ohta, E. Landis, T. Boulay, R. B. Phillips, B. Collet, C. J. Secombes, M. F. Flajnik, and J. D. Hansen, "Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **173**, pp. 4553–60, Oct. 2004.
- [93] S. Berchtold, P. Mühl-Zürbes, C. Heufler, P. Winklehner, G. Schuler, and A. Steinkasserer, "Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation.," *FEBS letters* **461**, pp. 211–6, Nov. 1999.
- [94] M. Lechmann, N. Kotzor, E. Zinser, A. T. Prechtel, H. Sticht, and A. Steinkasserer, "CD83 is a dimer: Comparative analysis of monomeric and dimeric isoforms.," *Biochemical and biophysical research communications* **329**, pp. 132–9, Apr. 2005.

- [95] L. J. Zhou and T. F. Tedder, "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **154**, pp. 3821–35, Apr. 1995.
- [96] J. Banchereau and R. M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature* **392**, pp. 245–52, Mar. 1998.
- [97] K. Luthje, B. Kretschmer, B. Fleischer, and M. Breloer, "CD83 regulates splenic B cell maturation and peripheral B cell homeostasis," *Int Immunol* **20**(8), pp. 949–960, 2008.
- [98] M. Wolenski, S. O. Cramer, S. Ehrlich, C. Steeg, G. Grossschupff, K. Tenner-Racz, P. Racz, B. Fleischer, and A. von Bonin, "Expression of CD83 in the murine immune system," *Medical microbiology and immunology* **192**, pp. 189–92, Nov. 2003.
- [99] S. Yamashiro, J. M. Wang, D. Yang, W. H. Gong, H. Kamohara, and T. Yoshimura, "Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils," *Blood* **96**, pp. 3958–63, Dec. 2000.
- [100] C. Iking-Konert, C. Wagner, B. Deneff, F. Hug, M. Schneider, K. Andrassy, and G. M. Hansch, "Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease," *Clinical and experimental immunology* **130**, pp. 501–8, Dec. 2002.
- [101] R. B. Mailliard, S. M. Alber, H. Shen, S. C. Watkins, J. M. Kirkwood, R. B. Herberman, and P. Kalinski, "IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells," *The Journal of experimental medicine* **202**, pp. 941–53, Oct. 2005.
- [102] Y. Fujimoto, L. Tu, A. S. Miller, C. Bock, M. Fujimoto, C. Doyle, D. A. Steeber, and T. F. Tedder, "CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus," *Cell* **108**, pp. 755–67, Mar. 2002.
- [103] B. Kretschmer, K. Luthje, A. H. Guse, S. Ehrlich, F. Koch-Nolte, F. Haag, B. Fleischer, and M. Breloer, "CD83 modulates B cell function in vitro: increased IL-10 and reduced Ig secretion by CD83Tg B cells," *PLoS One* **2**(1), p. e755, 2007.
- [104] M. Breloer, B. Kretschmer, K. Luthje, S. Ehrlich, U. Ritter, T. Bickert, C. Steeg, S. Fillatreau, K. Hoehlig, V. Lampropoulou, and B. Fleischer, "CD83 is a regulator of murine B cell function in vivo," *Eur J Immunol* **37**(3), pp. 634–648, 2007.
- [105] L. F. García-Martínez, 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, E. D. Howard, D. E. Walker, P. Charmley, M. Jonas, S. Shaw, J. A. Latham, and F. Ramsdell, "A novel mutation in CD83 results in the development of a unique population of CD4+ T cells," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **173**, pp. 2995–3001, Sept. 2004.

- [106] K. Lüthje, S. O. Cramer, S. Ehrlich, A. Veit, C. Steeg, B. Fleischer, A. von Bonin, and M. Breloer, "Transgenic expression of a CD83-immunoglobulin fusion protein impairs the development of immune-competent CD4-positive T cells.," *European journal of immunology* **36**, pp. 2035–45, Aug. 2006.
- [107] M. Breloer and B. Fleischer, "CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis.," *Trends in immunology* **29**, pp. 186–94, Apr. 2008.
- [108] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.," *Science (New York, N.Y.)* **239**, pp. 487–91, Jan. 1988.
- [109] P. Soriano, "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain," *Nat Genet* **21**(1), pp. 70–71, 1999.
- [110] J. D. Richards, S. H. Davé, C. H. Chou, A. A. Mamchak, and A. L. DeFranco, "Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, pp. 3855–64, Mar. 2001.
- [111] M. Saraiva and A. O'Garra, "The regulation of IL-10 production by immune cells.," *Nature reviews. Immunology* **10**, pp. 170–81, Mar. 2010.
- [112] R. C. Rickert, K. Rajewsky, and J. Roes, "Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice.," *Nature* **376**, pp. 352–5, July 1995.
- [113] M. Kraus, M. B. Alimzhanov, N. Rajewsky, and K. Rajewsky, "Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer.," *Cell* **117**, pp. 787–800, June 2004.
- [114] K. Kwon, C. Hutter, Q. Sun, I. Bilic, C. Cobaleda, S. Malin, and M. Busslinger, "Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development.," *Immunity* **28**, pp. 751–62, June 2008.
- [115] M. Wolenski, S. O. Cramer, S. Ehrlich, C. Steeg, B. Fleischer, and A. von Bonin, "Enhanced activation of CD83-positive T cells.," *Scandinavian journal of immunology* **58**, pp. 306–11, Sept. 2003.
- [116] S. H. Smith and M. Reth, "Perspectives on the nature of BCR-mediated survival signals.," *Molecular cell* **14**, pp. 696–7, June 2004.
- [117] K. P. Lam, R. Kühn, and K. Rajewsky, "In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death.," *Cell* **90**, pp. 1073–83, Sept. 1997.

- [118] R. M. Torres, H. Flaswinkel, M. Reth, and K. Rajewsky, "Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex.," *Science (New York, N.Y.)* **272**, pp. 1804–8, June 1996.
- [119] S. Pillai, A. Cariappa, and S. T. Moran, "Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development.," *Immunological reviews* **197**, pp. 206–18, Feb. 2004.
- [120] S. Casola, "Control of peripheral B-cell development.," *Current opinion in immunology* **19**, pp. 143–9, Apr. 2007.
- [121] M. M. Harnett, E. Katz, and C. A. Ford, "Differential signalling during B-cell maturation.," *Immunology letters* **98**, pp. 33–44, Apr. 2005.
- [122] A. Cariappa, M. Tang, C. Parng, E. Nebelitskiy, M. Carroll, K. Georgopoulos, and S. Pillai, "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21.," *Immunity* **14**, pp. 603–15, May 2001.
- [123] J. C. Poe, M. Hasegawa, and T. F. Tedder, "CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction.," *International reviews of immunology* **20**, pp. 739–62, Jan. 2001.
- [124] Z. Chen, T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb, "MAP kinases.," *Chemical reviews* **101**, pp. 2449–76, Aug. 2001.
- [125] S. Yoon and R. Seger, "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.," *Growth factors (Chur, Switzerland)* **24**, pp. 21–44, Mar. 2006.
- [126] Z. Lu and S. Xu, "ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis.," *IUBMB life* **58**, pp. 621–31, Nov. 2006.
- [127] K. G. Smith, D. M. Tarlinton, G. M. Doody, M. L. Hibbs, and D. T. Fearon, "Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn.," *The Journal of experimental medicine* **187**, pp. 807–11, Mar. 1998.
- [128] R. J. Cornall, J. G. Cyster, M. L. Hibbs, A. R. Dunn, K. L. Otipoby, E. A. Clark, and C. C. Goodnow, "Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection.," *Immunity* **8**, pp. 497–508, Apr. 1998.
- [129] M. Fujimoto, Y. Kuwano, R. Watanabe, N. Asashima, H. Nakashima, S. Yoshitake, H. Okochi, K. Tamaki, J. C. Poe, T. F. Tedder, and S. Sato, "B cell antigen receptor and CD40 differentially regulate CD22 tyrosine phosphorylation.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, pp. 873–9, Jan. 2006.

- [130] L. A. O'Reilly, E. A. Kruse, H. Puthalakath, P. N. Kelly, T. Kaufmann, D. C. S. Huang, and A. Strasser, "MEK/ERK-mediated phosphorylation of Bim is required to ensure survival of T and B lymphocytes during mitogenic stimulation.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, pp. 261–9, July 2009.
- [131] A.-K. Yi, J.-G. Yoon, S.-J. Yeo, S.-C. Hong, B. K. English, and A. M. Krieg, "Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **168**, pp. 4711–20, May 2002.
- [132] R. Brummel and P. Lenert, "Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, pp. 2429–34, Feb. 2005.
- [133] J. G. Evans, K. A. Chavez-Rueda, A. Eddaoudi, A. Meyer-Bahlburg, D. J. Rawlings, M. R. Ehrenstein, and C. Mauri, "Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, pp. 7868–78, June 2007.
- [134] J. V. Duncia, J. B. Santella, C. A. Higley, W. J. Pitts, J. Wityak, W. E. Fietze, F. W. Rankin, J. H. Sun, R. A. Earl, A. C. Tabaka, C. A. Teleha, K. F. Blom, M. F. Favata, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, K. Horiuchi, R. A. Copeland, P. A. Scherle, J. M. Trzaskos, R. L. Magolda, G. L. Trainor, R. R. Wexler, F. W. Hobbs, and R. E. Olson, "MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products.," *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **8**, pp. 2839–44, Oct. 1998.
- [135] M. F. Favata, K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle, and J. M. Trzaskos, "Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.," *The Journal of biological chemistry* **273**, pp. 18623–32, July 1998.
- [136] C.-Q. Xia and K. J. Kao, "Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase.," *Scandinavian journal of immunology* **58**, pp. 23–32, July 2003.
- [137] A. Agrawal, S. Dillon, T. L. Denning, and B. Pulendran, "ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, pp. 5788–96, May 2006.

- [138] Q. Jiang, S. Akashi, K. Miyake, and H. R. Petty, "Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, pp. 3541–4, Oct. 2000.
- [139] S. Akashi, H. Ogata, F. Kirikae, T. Kirikae, K. Kawasaki, M. Nishijima, R. Shimazu, Y. Nagai, K. Fukudome, M. Kimoto, and K. Miyake, "Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2.," *Biochemical and biophysical research communications* **268**, pp. 172–7, Feb. 2000.
- [140] P. J. Godowski, "A smooth operator for LPS responses.," *Nature immunology* **6**, pp. 544–6, June 2005.
- [141] Y. Levy and J. C. Brouet, "Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein.," *The Journal of clinical investigation* **93**, pp. 424–8, Jan. 1994.
- [142] F. Rousset, S. Peyrol, E. Garcia, N. Vezzio, M. Andujar, J. A. Grimaud, and J. Banchereau, "Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4.," *International immunology* **7**, pp. 1243–53, Aug. 1995.
- [143] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries, "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.," *The Journal of experimental medicine* **174**, pp. 1209–20, Nov. 1991.
- [144] J. C. Cyktor and J. Turner, "Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens.," *Infection and immunity* **79**, pp. 2964–73, Aug. 2011.
- [145] K. Asadullah, W. Sterry, and H. D. Volk, "Interleukin-10 therapy–review of a new approach.," *Pharmacological reviews* **55**, pp. 241–69, June 2003.
- [146] M. Matsuda, F. Salazar, M. Petersson, G. Masucci, J. Hansson, P. Pisa, Q. J. Zhang, M. G. Masucci, and R. Kiessling, "Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression.," *The Journal of experimental medicine* **180**, pp. 2371–6, Dec. 1994.
- [147] P. McGuirk, C. McCann, and K. H. G. Mills, "Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*.," *The Journal of experimental medicine* **195**, pp. 221–31, Jan. 2002.
- [148] L. Siewe, M. Bollati-Fogolin, C. Wickenhauser, T. Krieg, W. Müller, and A. Roers, "Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response.," *Journal of experimental medicine* **195**, pp. 101–11, Jan. 2002.

ry response to LPS but not the response to CpG DNA.," *European journal of immunology* **36**, pp. 3248–55, Dec. 2006.

- [149] C. F. Anderson, M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks, "CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis.," *The Journal of experimental medicine* **204**, pp. 285–97, Feb. 2007.
- [150] S. Fillatreau, "Novel regulatory functions for Toll-like receptor-activated B cells during intracellular bacterial infection," *Immunol Rev* **240**(1), pp. 52–71.
- [151] N. Burdin, F. Rousset, and J. Banchereau, "B-cell-derived IL-10: production and function.," *Methods (San Diego, Calif.)* **11**, pp. 98–111, Jan. 1997.
- [152] R. Madan, F. Demircik, S. Surianarayanan, J. L. Allen, S. Divanovic, A. Trompette, N. Yorgev, Y. Gu, M. Khodoun, D. Hildeman, N. Boespflug, M. B. Fogolin, L. Gröbe, M. Greweeling, F. D. Finkelman, R. Cardin, M. Mohrs, W. Müller, A. Waisman, A. Roers, and C. L. Karp, "Nonredundant roles for B cell-derived IL-10 in immune counter-regulation.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, pp. 2312–20, Aug. 2009.
- [153] S. Fillatreau, D. Gray, and S. M. Anderton, "Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology.," *Nature reviews. Immunology* **8**, pp. 391–7, May 2008.
- [154] P. A. Blair, K. A. Chavez-Rueda, J. G. Evans, M. J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein, and C. Mauri, "Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, pp. 3492–502, Mar. 2009.
- [155] M. E. Duddy, A. Alter, and A. Bar-Or, "Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, pp. 3422–7, Mar. 2004.
- [156] B. Kretschmer, S. Köhl, B. Fleischer, and M. Breloer, "Activated T cells induce rapid CD83 expression on B cells by engagement of CD40.," *Immunology letters* **136**, pp. 221–7, May 2011.
- [157] C. Mauri, D. Gray, N. Mushtaq, and M. Londei, "Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells.," *The Journal of experimental medicine* **197**, pp. 489–501, Feb. 2003.
- [158] S. Fillatreau, C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray, and S. M. Anderton, "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10.," *Nature immunology* **3**, pp. 944–50, Oct. 2002.
- [159] F. E. Lund, B. A. Garvy, T. D. Randall, and D. P. Harris, "Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease.," *Current directions in autoimmunity* **8**, pp. 25–54, Jan. 2005.

- [160] P. Matthias and A. G. Rolink, "Transcriptional networks in developing and mature B cells.," *Nature reviews. Immunology* **5**, pp. 497–508, June 2005.