



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchungen zur Untermauerung einer
Immunglobulin-Isotyp-spezifischen Signaltransduktion

verfasst von

Romana Reitböck

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 441

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Genetik und Mikrobiologie

Betreut von:

Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die vorliegende Arbeit ist mit dem elektronisch übermittelten Textdokument identisch.*

(Ort und Datum)

(Unterschrift)

* Quelle Eidesstattliche Erklärung: Universität Salzburg und Universität Linz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung der Diplomarbeit und dem vorausgehenden Studium so tatkräftig unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Mag. Dr. Gertrude Achatz für die Betreuung von meiner Diplomarbeit bedanken, insbesondere für die stets gute Unterstützung während der Erstellung der Diplomarbeit.

Weiters gilt mein Dank meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Elisabeth Schwaiger, Susanne Wolkerstofer, Dr. Stefan Feichtner und Sybille Vrabell für die stets vorhandene Bereitschaft, bei anstehenden Fragen zu helfen und mir auf der Suche nach Lösungswegen immer Rede und Antwort standen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern für all ihre Liebe, ihre unermüdliche Unterstützung und dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben. Weiters gilt mein tiefer Dank meinem verstobenen Lebensgefährten, Klaus-Jürgen Geroldinger, der mich nicht nur in all meinen Entscheidungen unterstützt hat und mir den Rücken gestärkt hat, sondern mich immer wieder ermutigte. Außerdem danke ich meinen Freundinnen Ingrid und Doris, die mir in jeder Lebenslage zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung.....	10
1.1. Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark	10
1.2. Die reife B-Zelle	14
1.3. Allergische Reaktionen verursacht durch IgE	18
1.3.1. IgE-Klassenwechsel.....	18
1.3.2. HAX1 ein mIgE interagierendes Protein.....	21
2. Ziele der Diplomarbeit.....	24
3. Materialien	26
3.1. Instrumente	26
3.2. Zellkultur	27
3.2.1. Zellkulturschalen, Röhrchen, Pipetten, Spitzen, Spritzen, Nadeln und Zellsiebe	27
3.2.2. Zellkulturmedien, Reagenzien and Puffer	28
3.2.3. Zellzahlbestimmung mit CASY1® Zellzahl-Zähler	29
3.2.4. Reaktionskits.....	29
3.2.5. Antikörper	29
3.2.6 Stimuli	30
3.3. RNA-Techniken	30
3.3.1. Puffer, Lösungen and Primer.....	30
3.3.2. Röhrchen/Säulen	31
3.3.3. Reaktionskits.....	32
3.4. Protein-Techniken	32
3.4.1. ELISA- und ELISpot-Puffer, Reagenzien and Lösungen.....	32

3.4.2. Pipetten und Platten	34
3.5. Mäuse	34
3.5.1. Serumgewinnung	34
4. Methoden	35
4.1. Zellkulturtechniken.....	35
4.1.1. Präparation von B-Zellen der Maus	35
4.1.1.1. Präparation des Knochenmarks	35
4.1.1.2. Präparation der Milz.....	36
4.1.2. Erythrozytenlyse	36
4.1.3. Zellzahlbestimmung mittels Casy®.....	37
4.1.4. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS).....	38
4.1.4.1. MACS-Säulen-Technologie	38
4.1.4.1.1. Depletions-Säulen (Miltenyi Biotech)	38
4.1.4.1.2. Separations-Säulen (Miltenyi Biotech)	39
4.1.5.1. Pan B Cell Isolation Kit® (Maus/Miltenyi Biotech).....	39
4.1.5.1.1. Magnetische Markierung von Nicht-B-Zellen	40
4.1.5.1.2. Magnetische Separation: Depletion von Nicht-B-Zellen via LD-Depletion-Säule	40
4.1.4.1.3. In-vitro-Stimulation	41
4.1.6. FACS-Methodik	42
4.1.6.1 Stripping.....	42
4.1.6.2. Fc-Blocking	43
4.1.6.3. Viabilitätsfärbung.....	43
4.1.6.4. Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern	44
4.1.6.5. Fixation, Permeabilisierung und intrazelluläre CXCR4-Färbung	44
4.1.6.6. FACS-Analyse (Durchflussszytometrie)	45
4.2. RNA-Techniken	47
4.2.1. RNeasy Mini Kit® (Qiagen)	47
4.2.2. cDNA Synthese	48
4.2.3. QIAquick® PCR Purification Kit Protokoll (Qiagen®).....	49
4.2.4. Real Time PCR (Polymerase chain reaction)	50
4.3. Protein-Techniken.....	51
4.3.1. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	51
4.3.1.1. Durchführung des ELISA	52
4.3.1.1.1. Schema des ELISA	52
4.3.1.1.1.1. Coating	52
4.3.1.1.1.2. Blocking.....	54
4.3.1.1.1.3. Auftragen der Standards, der Überstände oder der Sera	54
4.3.1.1.1.4. Entwicklung des ELISA	57

4.3.2. Immunisierungsschema.....	58
4.3.3. Serumgewinnung.....	60
4.3.4. ELISpot (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	60
4.3.4.1. Schema des ELISpot:	61
4.3.4.1.1. Coating des ELISpots	61
4.3.4.1.2. Blocken	61
4.3.4.1.3. Inkubation der Zellen	62
4.3.4.1.4. Inkubation mit dem AP-gekoppelten Antikörper	63
4.3.4.1.5. Farbreaktion	63
5. Ergebnisse.....	64
5.1. HAX1-Knockout beeinflusst die Immunglobulin-Expression.....	64
5.1.1. Der Verlust des HAX1 Proteins bewirkte ein verringerte Immunantwort nach einer Immunisierung.....	64
5.2. Hax1 ^{-/-} -defiziente Mäuse zeigen ein verändertes Gedächtnis nach einer OVA-Immunisierung.....	68
5.2.1. Der Verlust von HAX1 führt zu einer erhöhten Bildung von IgG1 und IgE sekretierenden Zellen in der Milz als auch im Knochenmark	68
5.3. HAX1-Knockout führt zu einer Abnahme der Zellzahl	80
5.3.1. HAX1-Deletion führt zu einer geringeren Gesamzellzahl in der Milz	80
5.3.2. HAX1-Verlust führte zu einer Reduktion der Knochenmarkszellen	82
5.3.3. Verlust von HAX1 hat eine Abnahme von B-Zellen in der Milz zur Folge	83
5.3.4. Hax1 ^{-/-} -defiziente Mäuse zeigen eine Abnahme von B-Zellen im Knochenmark.....	84
5.4. Hax1 ^{-/-} -defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte apoptotische Zellaktivität	86
5.4.1. Verlust von HAX1 hat <i>in vivo</i> eine höhere Zelltodrate zur Folge	86
5.5. HAX1 beeinflusst abhängig vom Proliferations-Stimulus den Immunglobulin-Isotyp-vermittelten Klassenwechsel	90
5.5.1. FACS-Analysen von <i>in vitro</i> induzierten B-Zellen der WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	90
5.5.2. ELISA von <i>in vitro</i> induzierten B-Zellen der WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	97
5.6. Einfluss von HAX1 auf die B-Zellentwicklung.....	103
5.6.1. Verlust von HAX1 führt im Knochenmark zur Abnahme der Zellzahl	103

5.6.1.1. Quantifizierung von B220-IgM-/IgG1-/IgE-Zellen des Knochenmarks der naiven WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse via FACS-Analyse	103
5.6.1.2. Quantifizierung der B220-Verteilung in Splenozyten von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via FACS-Analyse.....	105
5.6.1.3. Kontrollanalyse von B220-gesorteten Zellen der Milz von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via FACS	108
5.6.1.4. Quantifizierung der B220-Verteilung in Knochenmarkszellen von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via FACS-Analyse	109
5.6.1.5. Kontrollanalyse von B220-gesorteten Zellen des Knochenmarks von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via FACS.....	112
5.7. Der Einfluß von HAX1 auf die CXCR4-Expression.....	113
5.7.1. CXCR4-Expression wird in B-Zellen des Knochenmarks der Hax1 ^{-/-} -Mäuse herunterreguliert	113
5.7.1.1. Untersuchung der CXCR4-Verteilung in B-Zellen des Knochenmarks von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen	113
5.7.1.2. Untersuchung der CXCR4-Verteilung von B220-gesorteten Zellen des Knochenmarks von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen.....	114
5.7.2. Die Zellen des Gesamtknochenmarks von Hax1 ^{-/-} -Mäusen zeigen keine veränderte CXCR4-Expression	118
5.7.2.1. Untersuchung der CXCR4-Verteilung in Knochenmarkszellen von WT- und der Hax1 ^{-/-} -Maus via Real Time Analyse	118
5.7.2.2. Untersuchung der intrazellulären CXCR4-Verteilung (CXCR4-Fixed-Färbung) in B-Zellen des Knochenmark von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen via FACS-Analyse	119
5.7.3. CXCR4-Expression wird in B-Zellen der Milz in Hax1 ^{-/-} -Mäusen herunterreguliert	121
5.7.3.1. Untersuchung der CXCR4-Expression in B-Zellen der Milz von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via Real Time Analyse	121
5.7.3.2. Quantifizierung der intrazellulären CXCR4-Expression in B-Zellen der Milz von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via FACS-Analyse.....	122
5.7.4. CXCR4-Expression wird in den gesamten Splenozyten von Hax1 ^{-/-} -Mäusen herunterreguliert	123

5.7.4.1. Untersuchung der CXCR4-Verteilung in Milzzellen von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via Real Time-Analyse	123
5.8. Einfluss von HAX1 auf das Stromazell-Milieu.....	124
5.8.1.1. Untersuchung der IL1RA-Verteilung in Knochenmarkszellen einer Non-B- Zellfraktion von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via Real Time Analyse.....	124
5.8.1.2. Untersuchung der IL1RA-Verteilung in Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via Real Time Analyse.....	125
5.8.2. IL6 zeigt kein verändertes Expressionsverhalten in Hax1 ^{-/-} -defizienten Mäusen.....	127
5.8.2.1. Untersuchung der IL6-Verteilung in Knochenmarkszellen von Hax1 ^{-/-} - und WT- Mäusen via Real Time Analyse	127
5.8.2.2. Weitere Untersuchung der IL6-Verteilung in Knochenmarkszellen von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via Real Time Analyse	128
5.8.2.3. Weitere Untersuchung der IL6-Verteilung in Knochenmarkszellen von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via Real Time Analyse	129
5.8.2.4. Untersuchung der IL6-Verteilung in Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen via Real Time Analyse.....	130
5.9. HAX1-Verlust beeinflusst die Zellzahl von CD138-tragenden Plasmazellen	131
5.9.1. Quantifizierung von IgG1- und IgE-produzierenden Plasmablasten (CD138PE ⁺ /IgG1 ⁺ /IgE ⁺) von α -CD40/IL4- bzw. LPS/IL4-induzierten Milzzellen der WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse via FACS-Analyse	131
5.9.2. Quantifizierung von Plasmazellen im Knochenmark der WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus.....	135
5.10. Hax1 ^{-/-} -defiziente Mäuse zeigen eine veränderte T-Zell-Verteilung (CD4/CD8) in der Milz und dem Knochenmark	136
5.10.1. Quantifizierung von T-Zellen einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen via FACS-Analyse	136
5.10.2. Quantifizierung von T-Zellen der Milz von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen via FACS- Analyse	140
5.10.3. Quantifizierung von T-Zellen des Knochenmarks von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen via FACS-Analyse	144
6. Diskussion	148

7. Zusammenfassung	155
7.1. Deutsch.....	155
7.2. English.....	158
8. Abkürzungsverzeichnis	161
8.1. Synonyme.....	168
9. Abbildungsverzeichnis	169
10. Tabellenverzeichnis.....	175
11. Lebenslauf.....	177
12. Referenzen	179

1. Einleitung

1.1. Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark

Das Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem höherer Lebewesen gegen Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren und Pilze. Bereits einfache Organismen besitzen einen Abwehrmechanismus, der sehr unspezifisch den Wirt vor Krankheitserregern schützt. Dieser evolutionär betrachtet sehr alte Mechanismus, der als „angeborene Immunität oder innate immunity“ (1) bezeichnet wird, wurde auch mehr oder minder in der Weiterentwicklung des Immunsystems beibehalten. Zusätzlich entwickelte sich das „adaptive Immunsystem“, welches gemeinsam mit der „angeborenen Immunität“ ein schlagkräftiges System in der Abwehr von Krankheitserregern höherer Wirbeltiere (2) darstellt (Abbildung 1).

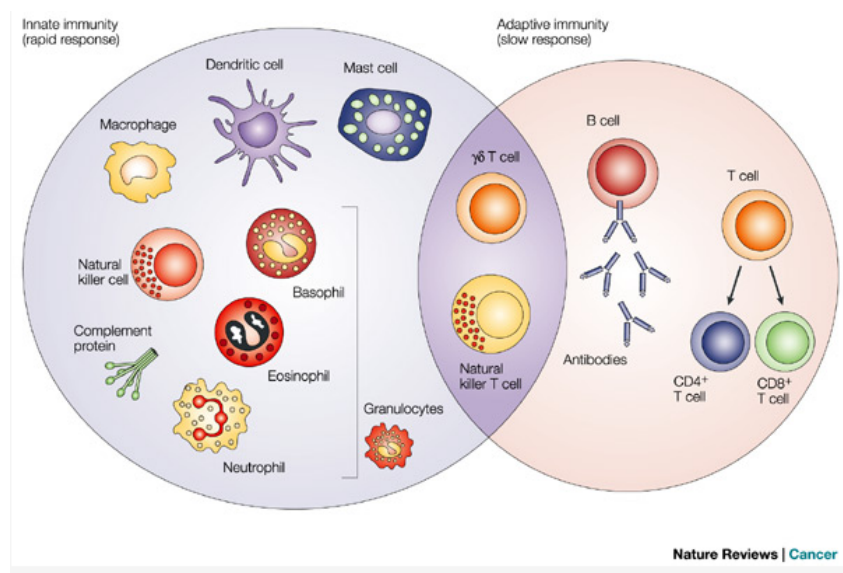


Abbildung 1: „Zelluläre Komponenten der angeborenen Immunität (Innate Immunity) und adaptiven Immunität (Adaptive Immunity) (3)

Das adaptive Immunsystem wird durch ein komplexes Regelwerk vieler verschiedener Immunzellen bewerkstelligt, wobei die B-Zellen die Hauptkomponenten der humoralen Immunantwort darstellen, während die T-Zellen bzw. die antigenpräsentierenden Zellen die zelluläre Immunität vermitteln (Abbildung 2).

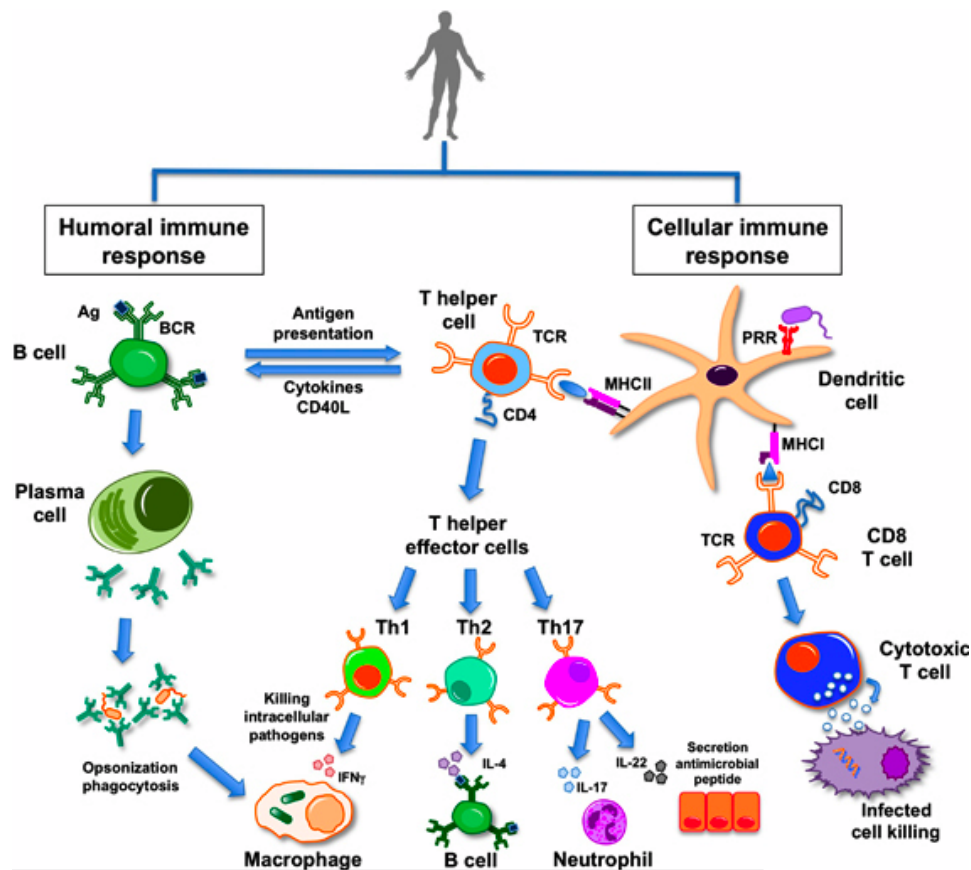


Abbildung 2: „Komponenten der humoralen und zellulären Immunantwort“ (4).

Die Entwicklung der B-Lymphozyten beginnt bereits in der fötalen Leber, deren Entstehung und Reifung sich im erwachsenen Organismus im Knochenmark fortsetzt (5, 6). Dabei differenzieren pluripotente hämatopoietische Stammzellen (HSC, Hematopoietic Stem Cell) zu lymphoiden bzw. myeloiden Vorläuferzellen (CLP, Common Lymphoid Progenitor; CMP Common Myeloid Progenitor), die noch Stammzellcharakter aufweisen (7). Die CLP-Zellen entwickeln sich über viele Differenzierungsstadien zu T- und B-Zellen (8).

Im Folgenden wird die B-Zell-Entwicklung genauer erläutert:

Die Vorläufer der B-Zellen durchlaufen im Knochenmark mehrere wesentliche Kontrollpunkte, wobei die Funktionalität des Rezeptors überprüft wird und die Reaktivität gegenüber körpereigenem Gewebe ausgeschlossen wird (9-13) (Abbildung 3). Die frühen Vorstufen der lymphoiden B-Zelllinie, welche einheitlich das Oberflächenprotein B220 exprimieren, werden in verschiedene Fraktionen unterteilt: die Prä-Pro-Zellen, die Pro-B-Zellen und die Prä-B-Zellen (7). Abhängig vom Differenzierungsstadium wird jeweils eine entsprechende Kombination von Markern an der Oberfläche präsentiert.

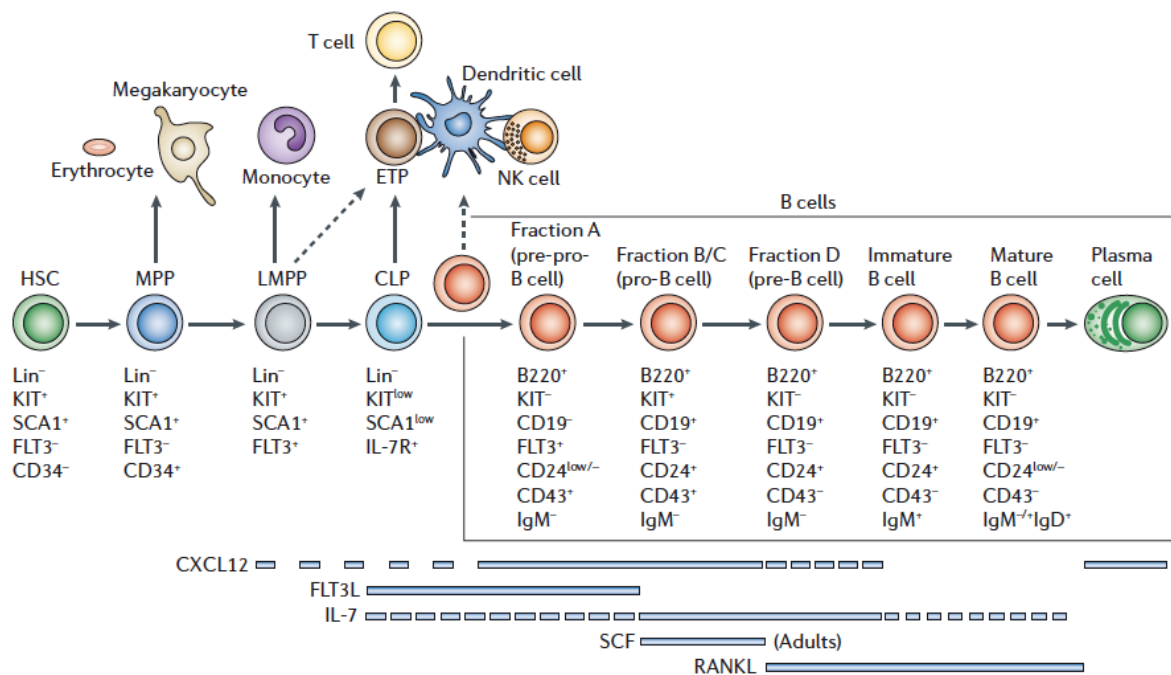


Abbildung 3: Die Entwicklung der B-Zelle im Knochenmark und Veränderungen der B-Zell-Oberflächenmarker während der Reifung (7).

Der Reifungsprozess der B-Lymphozyten wird vom Mikromilieu des Knochenmarks (KM) bestimmt. Stromazellen (SZ) übermitteln hierbei wichtige Signale, die die Differenzierung, das Wachstum und das Überleben der sich entwickelnden Zellen ermöglichen (7). Die Entwicklung findet in sogenannten Stammzellnischen statt, einem sehr dynamischen System, wobei ein intensives Wechselspiel zwischen den

SZ und den sich entwickelnden B-Vorläuferzellen stattfindet. Generell stellen die Osteoblasten, die aus KM-SZ differenzieren, einen wesentlichen Regulator für die Blutbildung, einschließlich der B-Zellen, im Knochenmark dar. Wesentlich für diese Reifungsprozesse sind die von den SZ-gebildeten Proteine, wie CXCL12 (SDF-1) und Interleukin 7 (IL7). Dabei werden die Prä-Pro-B-Zellen durch den CXCL12 Liganden zu den retikulären Zellen (netzförmig) gelockt und assoziieren dann mit diesen, während sich dagegen die Pro-B-Zellen zu den angrenzenden IL7-sezernierenden Zellen bewegen (Abbildung 4). Der auf den B-Zellen vorhandene IL7R (CD127) wird durch IL7 stimuliert, was wiederum die Differenzierung der B-Zellen vorantreibt (14). Dabei fördert die Signalwirkung des IL7R die Bildung eines Transkriptionsfaktor-Netzwerks und somit den Übergang zur Prä-Pro-B-Zelle (15, 16).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, können die verschiedenen Entwicklungsstadien durch bestimmte auf der Oberfläche der B-Zellen vorhandene Rezeptoren unterschieden werden, wie etwa durch CD43 (Leukosialin, Sialophorin, Ly48), welcher auf Prä-Pro- und Pro-B-Zellen nachweisbar ist. Pro-B-Zellen exprimieren CD19 (B4) und vermehrt CD24 (HSA, Heat Shock Antigene; Nectadrin, Ly52), während der c-kit Rezeptor (CD117; SCFR) im Laufe der B-Zell-Entwicklung stetig niedriger exprimiert wird (17). Für die B-Zell-Entwicklung ist einerseits die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren (TF's), wie Ikaros (18, 19), TF E2A (19-21), EBF (Early B-cell factor) (19, 22) und PAX5 (19, 21, 23) sowie die Sekretion von Wachstumsfaktoren von Stromazellen in Knochenmarksnischen, wie CXCL12, FLT3 Ligand (FLT3L), SCF (stem-cell factor) und RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) von Bedeutung. Dabei stehen B220⁺FLT3⁺-Zellen in Verbindung mit CXCL12^{hi}(high)-retikulären Zellen, während B220⁺KIT⁺-Pro-B-Zellen mit IL7-exprimierenden Zellen assoziiert sind (7).

Im Anschluss bewegen sich die Prä-B-Zellen von den IL7-exprimierenden Zellen weg. IgM-exprimierende B-Zellen verlassen schließlich das Knochenmark, gelangen sodann ins Blut und zur Milz, wo diese letztendlich zu peripheren reifen B-Zellen heranreifen (Abbildung 4). Das Knochenmark ist nicht nur der Ort der B-Zellreifung, sondern liefert auch die „Nischen“ für die Plasmazellen, die wieder zu den CXCL12-retikulären Zellen in das Knochenmark zurück einwandern.

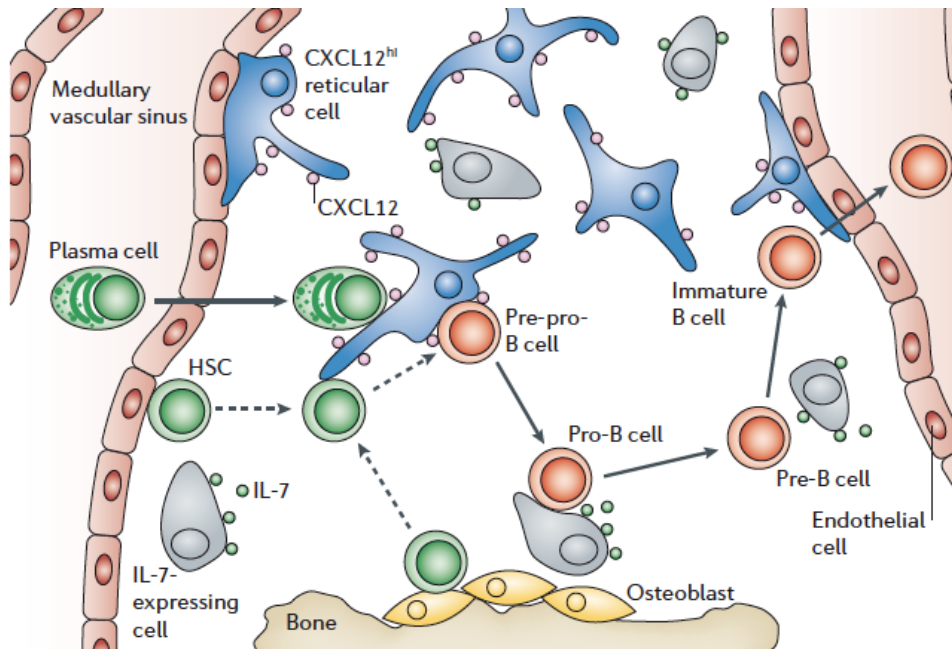


Abbildung 4: Zelluläre Zusammensetzung von spezifischen zellulären Nischen für die B-Zellentwicklung (7).

1.2. Die reife B-Zelle

Die aus dem Knochenmark entlassenen, unreifen B-Zellen wandern in die sekundären lymphatischen Organe, wie der Milz oder den Lymphknoten, ein und reifen dort zu sogenannten Marginalzonen-B-Zellen (MZB) und follikulären B-Zellen (FB). Diese können zu Plasmablasten und kurzlebigen Plasmazellen differenzieren. FB-Zellen können mit der Hilfe von T Helfer-Zellen (T_H) auch zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen differenzieren (Abbildung 5).

IgM- und IgD-positive Zellen (naive B-Zellen) werden bei Antigenkontakt aktiviert und können daraufhin einen Klassenwechsel und zusätzlich eine Affinitätsreifung mit somatischer Hypermutation durchführen. Der Aktivierungsprozess wird mit Hilfe von T-Zellen eingeleitet. Dabei dient der Klassenwechsel der Bildung von Antikörpern (AK) verschiedener Isotypen mit gleicher Antigenspezifität. Hierbei haben die T-Zell-sezernierenden Zytokine einen entscheidenden Einfluss auf den Klassenwechsel („Class switch“, CS) des Isotypes von IgM auf IgG, IgE oder IgA.

Während IFN- γ den Klassenwechsel zu IgG Antikörpern hin begünstigt, führt IL4 zu einer T_H2-Immunantwort und in der Folge zur IgE-Produktion (24, 25). Diese Vorgänge finden in den sogenannten Keimbahnzentren („Germinal Center“ (GC)) statt.

Die B-Zell-Aktivierung erfolgt einerseits durch die Erkennung des Antigens (Ag) über den B-Zellrezeptor (BCR) (26, 27). Zunächst wird das gebundene Fremdmolekül (Antigen) über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert und endosomal prozessiert (28). Die derart erzeugten Peptide werden an der Oberfläche der B-Zelle über den „Major Histocompatibility complex II“ (MHC II) präsentiert. Wird das präsentierte Antigen nun von einer zuvor durch dasselbe Antigen aktivierten CD4⁺-T-Zelle (T_H2-Zelle) durch ihren T-Zellrezeptor (TCR) erkannt, hat dies zusammen mit kostimulatorischen Signalen die vollständige Aktivierung der B-Zelle zur Folge (28). Die kostimulatorischen Signale sind zum einen die Interaktion mit dem CD40-Liganden (CD40L) auf der T-Zelle und dem Oberflächenmolekül CD40 auf der B-Zelle und zum anderen die von T_H2-Zellen ausgeschütteten Zytokine (28). Ein weiteres essentielles kostimulatorisches Signal ist die CD80/86-CD28-Interaktion. Derart vollständig aktivierte B-Lymphozyten können verschiedene Differenzierungswege durchlaufen, wie in Abbildung 5 dargestellt wird.

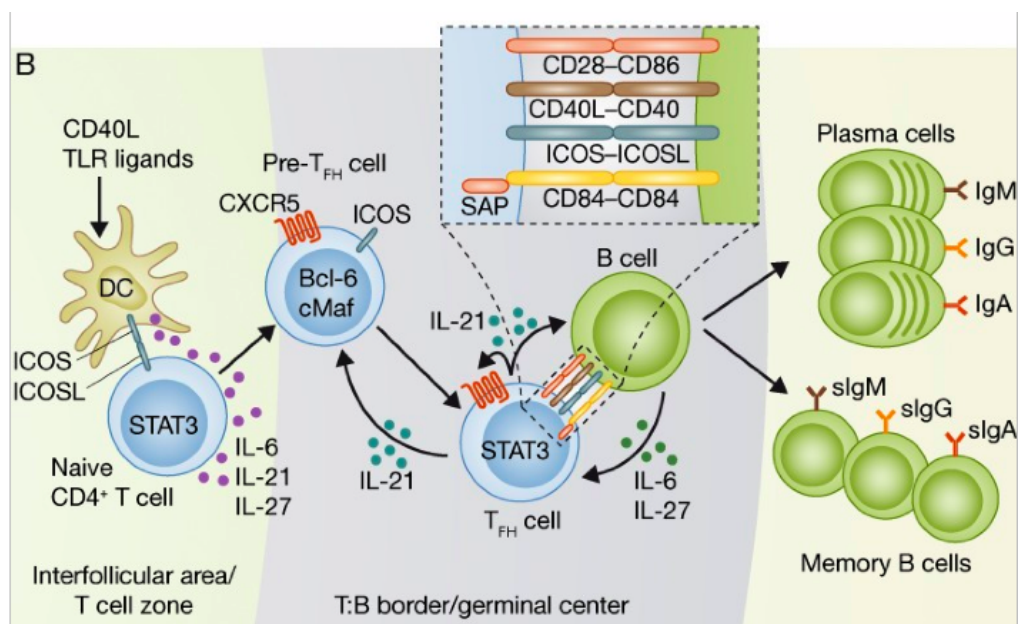


Abbildung 5: Die Interaktion von DCs (dendritischen Zellen), T-Zellen und B-Zellen in den Keimbahnzentren („Germinal Center“) (29).

Bei den follikulären T-Zellen (T_{FH} -Zellen) handelt es sich um eine Untergruppe der $CD4^+$ -T-Zellen, die den Chemokin-Rezeptor CXCR5 exprimieren. Dendritische Zellen (DCs) produzieren IL6, IL21 und IL27, die die Expression von Bcl-6 und c-Maf in $CD4^+$ - T_H -Zellen fördern. Dabei bedarf es der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und naiven $CD4^+$ - T_H -Zellen. Die Expression von CXCR5 mit dem gleichzeitigen Verlust des CCR7 ermöglicht den T_{FH} -Zellen von der T-Zell-Zone in die B-Zell-Follikel zu wandern. Der Standortwechsel von der T-Zell-Zone in die T-B-Randzone führt zur Bildung von $Bcl6^+CXCR5^+$ -Prä- T_{FH} -Zellen, die dann über eine Differenzierung in T_{FH} -Zellen nachträgliche Interaktionen mit Ag-spezifischen B-Zellen erlauben. Dabei assoziieren ICOS-L (B-Zelle) mit ICOS (T_{FH} -Zelle), CD40 (B-Zelle) mit CD40L (T_{FH} -Zelle), CD86 (B-Zelle) mit CD28 (T-Zelle), sowie CD84 (SAP-assoziiertes Rezeptor; B-Zelle) mit SAP (T_{FH} -Zelle) miteinander, die für die weiteren T_{FH} -vermittelten Differenzierungsschritte der B-Zellen in Gedächtnis-B- und Plasma-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Obwohl die T_{FH} -Zellen die Differenzierung von Ag-spezifischen B-Zellen regulieren, sind auch reziproke Signale von B-Zellen für die T_{FH} -Bildung ausschlaggebend.

Die terminale Differenzierung erfolgt entweder zu kurzlebigen extrafollikulären Plasmazellen, die Antikörper mit niedriger Affinität sezernieren (30), und für eine schnelle, unspezifische Immunantwort (Primärantwort) sorgen. Andererseits können auch langlebige Plasmazellen („Antibody secreting cells“ (ASC)) sowie B-Gedächtniszellen („Memory B cells“ (MBC)) entstehen, die an einer sogenannten Keimbahnzentrumreaktion teilnehmen, um hochaffine antigen-spezifische Antikörper zu produzieren (31). Bei den kurzlebigen („short-lived“) B-Zellen kann die Lebensspanne einige Tage betragen, während die Lebenszeit von langlebigen („long-lived“) Zellen sogar einige Monate bis Jahre erreichen kann (32). Nur wenige der langlebigen Plasmablasten verbleiben in den sekundären lymphatischen Organen. Der Großteil der Plasmablasten wandert entweder in entzündetes Gewebe oder ins Knochenmark ein. Die erfolgreiche Besetzung einer

Nische führt zur Plasmazellendifferenzierung und zum Verlust des migratorischen Potentials. Die Anzahl der Überlebensnischen ist allerdings begrenzt und es müssen neu-gebildete Plasmablasten mit bereits sesshaften und unbeweglichen Plasmazellen um die Nischen konkurrieren (33). Überlebensnischen existieren auch in entzündlichen Geweben (34). Kommt es zu einer Aufhebung der Entzündung führt dies zum Verlust dieser Überlebensnischen und folglich zum Zelltod dieser Plasmazellen. Für das Wandern der Plasmablasten wird unter anderem der Chemokinrezeptor CXCR4, der an der Oberfläche von Plasmablasten vorhanden ist, verantwortlich gemacht. Dieser Rezeptor wird von dem Liganden CXCL12 (SDF-1), welcher von Zellen der Milz, der Lymphknoten, sowie von den SZ des Knochenmarks produziert wird, angelockt (Abbildung 6).

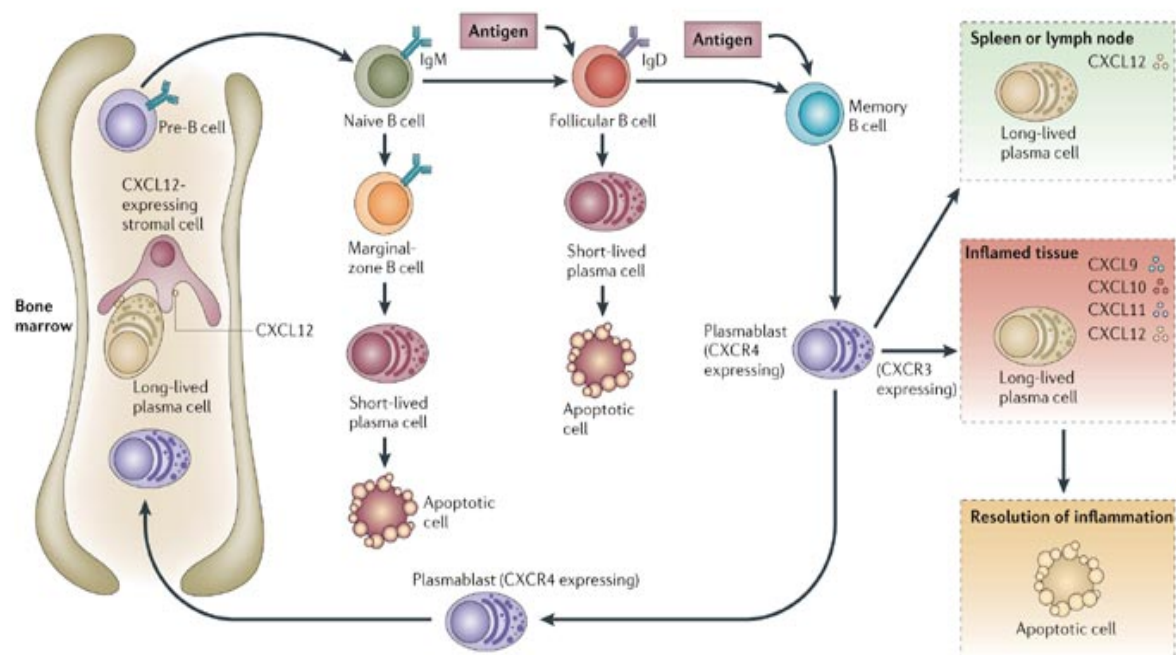


Abbildung 6: Die Entwicklung der Plasmazellen in den verschiedenen Überlebensnischen (32).

Unreife B-Zellen (Prä-B-Zellen) wandern aus dem Knochenmark aus (Naive B-Zellen) und reifen zu sogenannten Marginalzonen-B-Zellen (MZB) und folliculären B-Zellen (FB). Diese können zu Plasmablasten und kurzlebigen Plasmazellen differenzieren. FB-Zellen können via T-Zell-Hilfe auch zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen differenzieren, die hochaffine Antigen-spezifische Antikörper exprimieren.

Im Unterschied zu der T-Zell-abhängigen ("T dependent (TD)") Aktivierung von B-Zellen, die zuvor beschrieben wurde, existiert auch eine T-Zell-unabhängige ("T independent (TI)") Aktivierung. Hierbei können die B-Zellen auch ohne T-Zell-Hilfe stimuliert werden. Dabei handelt es sich meistens um „Toll like receptor (TLR)“-Liganden, wie mikrobielle Polysaccharide, Lipopolysaccharide (LPS) und polymere Proteine (26, 35-37). Ogata et al. (38) konnten zeigen, dass die LPS-induzierte Aktivierung der B-Zellen von dem TLR4 abhängig ist (38).

1.3. Allergische Reaktionen verursacht durch IgE

Bei einer Allergie, die auch als IgE-vermittelte Überempfindlichkeit vom Soforttyp bezeichnet wird (39), wird von einer fehlgeleiteten Reaktion des Immunsystems gegen Fremdstoffe gesprochen. Bei einer veränderten Immunantwort kommt es bei der Exposition von üblicherweise harmlosen Antigenen (Allergene) nicht mehr zu einer vorwiegend IgG-vermittelten Antwort, sondern es wird ein Umschaltprozess zu IgE vollzogen. IgE spielt vor allem bei allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle, die von leichten, lokalen Hautausschlägen bis hin zum lebensbedrohlichen, anaphylaktischen Schock reichen können. Dabei können unterschiedliche Allergene für diese Überreaktion des Immunsystems verantwortlich sein (39).

Bei erstmaligem Allergen-Kontakt kommt es zunächst zu einer Sensibilisierung, dabei differenzieren B-Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen. Die sezernierten IgE-Antikörper binden an Fc ϵ -RI auf Mastzellen und Basophilen. Erst ein wiederholter Kontakt bzw. Bindung des spezifischen Allergens an den IgE/Fc ϵ -Rezeptor-Komplex induziert das Degranulieren der Zellen und das Freisetzen von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie Histamin (40), die für die allergischen Symptome verantwortlich sind (41).

1.3.1. IgE-Klassenwechsel

Der Klassenwechsel zu IgE-produzierenden Plasmazellen wird von Zytokinen, wie IL4 und/oder IL13, die zumeist von T_H2-Zellen stammen, vermittelt (1. Signal) (42, 43). IL4

induziert nicht nur den Klassenwechsel zu IgE, sondern auch den zu IgG1 (Maus) und IgG4 (Mensch) (44). Andererseits bedarf es einer kostimulatorischen Wechselwirkung zwischen dem CD40-Rezeptor der B-Zelle und mit dem CD40-Liganden der T-Zelle (2. Signal), was die DNA-Rekombinationskaskade aktiviert (43, 45). CD40 nimmt über NF- κ B mit IL4-induziertem STAT6 synergistisch am Klassenwechsel teil (46-49) (Abbildung 7). So kann bei „*in vitro* Versuchen“ mit Maus-B-Zellen bei Zugabe von rekombinantem IL4 (rIL4) und α -CD40, ein Klassenwechsel auf IgG1 und IgE induziert werden (49, 50). Dies gelingt auch mit einem T-Zell-unabhängigen Stimulus, nämlich mit LPS und rIL4 (51-53).

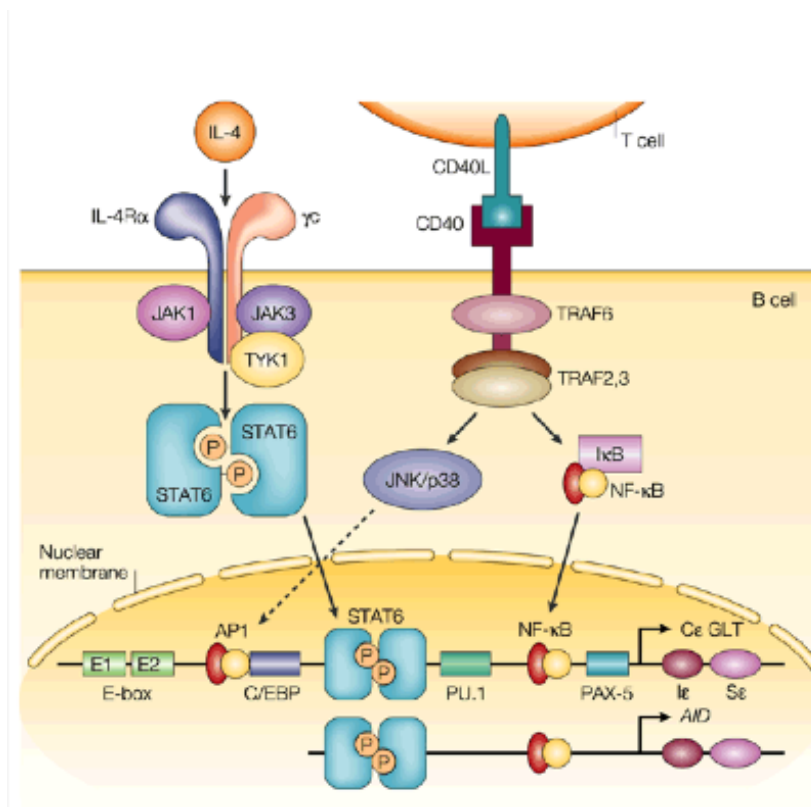
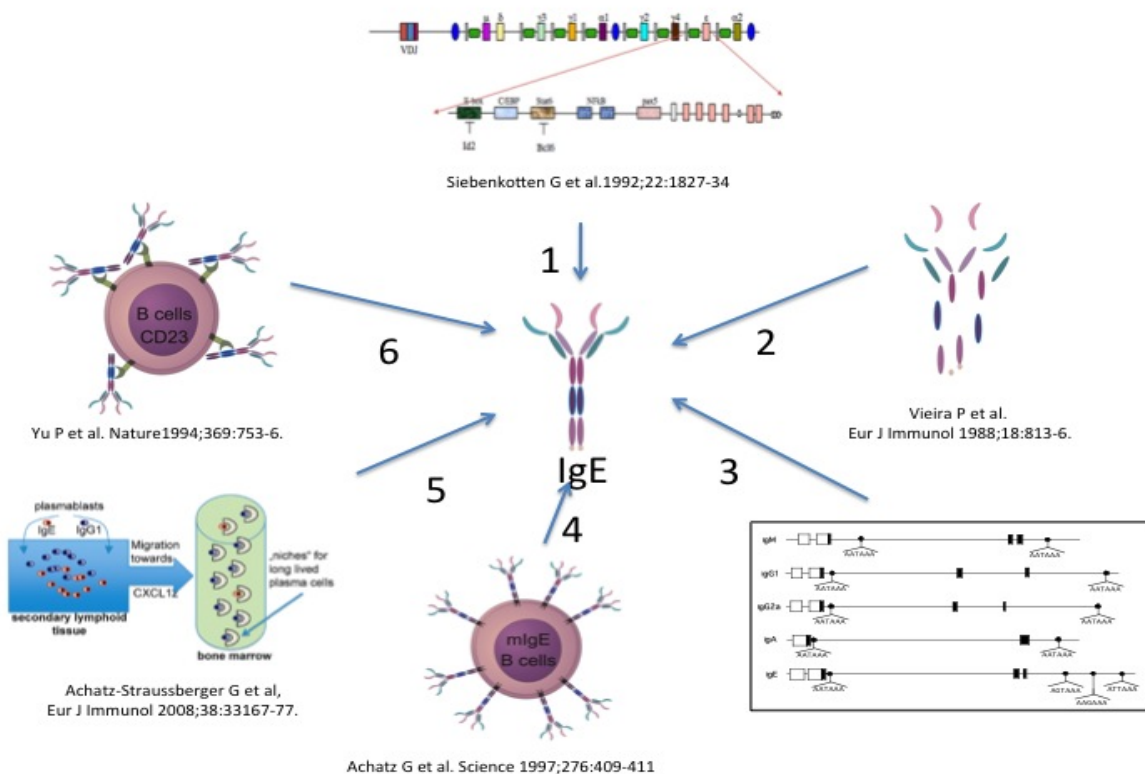


Abbildung 7: IL4 und CD40-Aktivierungssignale führen zur C ϵ -Keimbahn- und AID-Transkription (43).

Während der IgE-Spiegel im Serum gesunder Menschen niedrig ist (μ g- bis mg-Konzentrationen pro ml), ist er bei allergischen Patienten und bei Parasitenbefall stark erhöht (bis zu 1000fach höhere Konzentrationen) (5). Der biologische Mechanismus

für den geringen IgE-Spiegel in gesunden Menschen ist nicht genau bekannt, aber es scheinen mehrere unabhängige Mechanismen dafür verantwortlich zu sein (siehe Abbildung 8):

- 1) Der Klassenwechsel auf den IgE-Lokus erfolgt wesentlich seltener (54).
- 2) IgE besitzt die kürzeste Halbwertszeit im Serum verglichen zu anderen Ig-Isotypen (55).
- 3) Die Bildung reifer mIgE-Transkripte ist aufgrund der verminderten Polyadenylierungseffizienz eingeschränkt (56).
- 4) Membran-gebundenes IgE (mIgE) ist Voraussetzung für sekretiertes IgE (sIgE) (57).
- 5) IgE-Plasmablasten haben eine geringere Chance zum langlebigen Plasmazellpool und folglich auch zum humoralen immunologischen Gedächtnis beizutragen (58).
- 6) Der „Low affinity“ Rezeptor von IgE (CD23), der auf den B-Zellen vorhanden ist, senkt die IgE-Expression durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus (59).



1.3.2. HAX1 ein mIgE interagierendes Protein

In Untersuchungen von Oberndorfer et. al. (60) wurde eine Assoziation von mIgE (membrangebundenes IgE) mit HAX1 nachgewiesen. Hierbei ging man davon aus, dass diese Interaktion speziell für IgE zutrifft und HAX1 nicht mit cytoplasmatischen Domänen anderer Immunglobulinisotypen interagiert. Hierbei vermutete man eine Funktion des HAX1 Proteins für die Internalisierung des Rezeptors. Der Aufbau eines BCR ist unter Abbildung 9 genau dargestellt. Generell besteht er aus dem Immunglobulin und den beiden Mantelproteinen Ig α und Ig β . Zur Zeit werden nur diese beiden Mantelproteine für die Signalweiterleitung verantwortlich gemacht. Dem Immunglobulinrezeptor wird diesbezüglich derzeit keine Funktion zugeschrieben. Der Immunglobulinrezeptor besteht aus zwei leichten (vom λ - oder κ -Typus) und zwei schweren Ketten. Die beiden schweren Ketten bestehen entweder aus drei (IgD, IgG, IgA) oder aus vier (IgM, IgE) konstanten Exons und zwei weiteren Exons, die für die transmembrane und die zytoplasmatische Domäne kodieren. Die variable Domäne bzw. die Antigenerkennungsdomäne wird von der leichten und schweren Kette gemeinsam gebildet und ist den konstanten Exons vorgelagert.

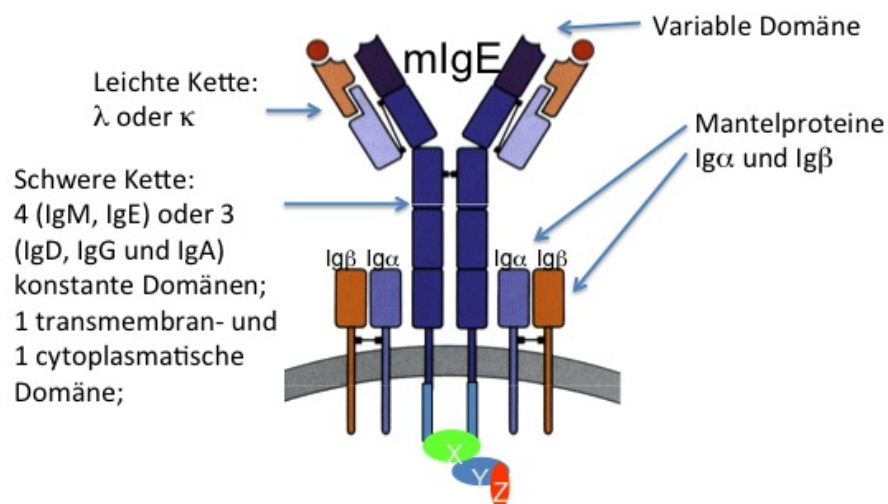


Abbildung 9: HAX1 als „IgE-tail interagierendes Protein“ (60).

HAX1 wurde erstmals als HS1-assoziiierendes Protein X beschrieben (61). Hinsichtlich der HAX1/HS1 (*hematopoietic stem cell specific protein-1*) Interaktion nimmt man an, dass HAX1 das Überleben nach B-Zell-Rezeptor (BCR)-vermittelter Apoptose erhöht (62-64). Dabei wird dem HAX1-Protein die Funktion eines endogenen Inhibitors der Bax-induzierten und Caspase 9-vermittelten Apoptose zugeschrieben (77, 78).

In diesem Zusammenhang kann der Mitochondrien-vermittelte intrinsische Apoptoseweg durch viele verschiedene Todessignale ausgelöst werden, wodurch proapoptotische Proteine zu den Mitochondrien rekrutiert werden. Hierdurch kommt es zur Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, was zur Freisetzung weiterer proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c (Cyt c), Omi/HtrA2 (high temperature requirement A2), Smac/DIABLO (second mitochondria derived activator of Caspases/direct IAP-binding protein with low pI) und AIF (apoptosis inducing factor) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien und zur Aktivierung von Effektor-Caspasen führt (80, 81).

Freigesetztes Cytochrom C interagiert mit Apaf-1 (apoptotic-protease activating factor 1) und der Procaspase 9, die das Apoptosom bilden (82, 83). In Anwesenheit von dATP kommt es zur Selbstaktivierung der Caspase 9, welche infolgedessen die Todes-Effektorcaspasen (wie Caspase 3) sowie den Zelltod auslöst. HAX1 hemmt gewöhnlich die Aktivierung der Caspasen und greift derart in die Apoptose ein.

Die freigesetzten mitochondrialen Moleküle Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 induzieren die Apoptose durch Hemmung von IAPs (inhibitory apoptosis proteins) und HAX1, deren Aufgabe es ist die Caspasen zu inhibieren bzw. das mitochondriale Membranpotenzial zu stabilisieren (71, 84, 85). Omi/HtrA2 wird auch eine anti-apoptotische Funktion zugeschrieben (77). In diesem Fall führt die Bildung eines Komplexes von HAX1 mit PARL zur Prozessierung einer aktiven

HtrA2-Protease, die in den Intermembranraum freigesetzt wird und dort die Anreicherung von Bax und somit die Apoptoseauslösung verhindert (77, 86).

Zusätzlich schreibt man dem HAX1 Protein Funktionen in der Zytoskelett-Dynamik (65, 66) und der Zell-Motilität (67) zu. Weiters wird vermutet, dass HAX1 RNA-bindende Eigenschaften besitzt (68, 69), und als nukleozytoplasmatisches Shuttle-Protein mit Retentionsfunktionen agieren kann (70). Primär liegt HAX1 in der Zelle an den Membranen assoziiert vor, wie etwa an den Mitochondrien (65), dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder der Kernmembran (71).

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe auch die Bindung zu anderen membrangebundenen Immunglobulinen untersucht wurde, stellte sich heraus, dass HAX1 auch an die cytoplasmatischen Domänen von IgG1 und IgG2a binden konnte. Somit handelt es sich hierbei um keine isotypspezifische Interaktion. Allerdings konnte keine Affinität zu IgA festgestellt werden. Es wurde im Weiteren eindeutig belegt, dass HAX1 und CXCL12 einen Komplex bilden können. Somit scheint HAX1 auch eine wesentliche Rolle für die B-Zellentwicklung zu spielen (Wolkerstorfer et al. unpublished data / paper in preparation) (72).

2. Ziele der Diplomarbeit

Wie bereits in der Arbeit von Peckl-Schmid et al. erläutert (74), führt der Verlust von HAX1 zu einer schwerwiegenden Störung in der Hämatopoese und in weiterer Folge zu einer stark reduzierten B-Zellentwicklung. Es wurde aber auch gezeigt, dass diese Defekte hauptsächlich nicht durch die B-Zellen selbst begründet sind, sondern die Umgebung „das Environment“ eventuell nicht die notwendigen Stimuli für die Entwicklung der Vorläuferzellen zur Verfügung stellt und die stark reduzierte Anzahl an B-Zellen in der Milz und dem peripheren Gewebe das Resultat einer geschädigten Entwicklung im Knochenmark ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von HAX1 auf die reife B-Zelle zu untersuchen. Dabei werden Themenkomplexe bearbeitet, die folgende Fragestellungen detaillierter erläutern: 1) Zeigt die Deletion von HAX1 Auswirkungen auf die Immunantwort der B-Zelle auf ein Antigen und die damit verbundene Immunglobulinproduktion? 2) Können Hax1^{-/-}-defiziente B-Zellen infolge einer Immunantwort den Switch z.B. auf IgG1 und IgE in einer normalen Frequenz durchlaufen? 3) Ist die Bildung von langlebigen Gedächtniszellen und das damit verbundene Einwandern der Plasmablasten in das Knochenmark verändert? 4) Zeigen B-Zellen und ihre Vorläuferzellen ein verändertes Wandern? 5) Ist ein verändertes Zytokinprofil der Hax1^{-/-}-defizienten Mäuse im Knochenmark Ursache für eine defekte B-Zellreifung?

Durch vergleichende Analysen zwischen Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen konnten infolge veränderter Immunantworten Rückschlüsse auf die Funktion des HAX1-Proteins in der B-Zellentwicklung gezogen werden. Dabei bediente man sich unter anderem eines *in vivo* Experiments, indem durch Immunisierung mit Ovalbumin gezeigt wurde, ob der HAX1-Verlust auf die Immunglobulin- bzw. Plasmazell-Produktion Einfluss nimmt. Hierbei konnte infolge der Untersuchung einer HAX1-bedingten

veränderten B-Zell-Einwanderung ins Knochenmark gezeigt werden, ob das immunologische Gedächtnis beeinträchtigt ist.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Gesamt-Zellzahl sowie die B-Zellzahl der Milz und des Knochenmarks von naiven und immunisierten WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen verglichen.

Mit Hilfe von Real Time- und FACS-Analysen konnte herausgefunden werden, ob die reduzierte B-Zellentwicklung auf Veränderungen im Stromazellmilieu zurückzuführen sind.

Durch *in vitro* Stimulations-Experimente konnten via FACS-Analyse Unterschiede im Isotyp-Switch festgestellt werden.

3. Materialien

3.1. Instrumente

- Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss)
- Zentrifuge 5415C (Eppendorf)
- Zentrifuge 5415R (Eppendorf)
- FACS BD Canto™ (BD Falcon)
- FACS BD Aria III cell sorter (BD Falcon) (BD FACS Diva™ Software v6.1.3.)
- FlowJo (Tree Star Inc.®)
- Forma Scientific Water-Jacketed Brutschrank 3250 (37°C, 7% CO₂) (Forma Scientific)
- Schüttelwasserbad GFL 1083
- Gilsenpipetten Pipetman P1000/P200/P20/P10 (UniLab)
- Hirschmann Laborgeräte Pipetus
- Horizontale Laminar Flow Werkbank (UniEquip)
- Uniflow Mars (UniEquip)
- PTC-200 Peltier Thermal Cycle DNA Engine (MJ Research)
- Realtime Rotor-Gene Q (Qiagen)
- Sempercare water Powder-free (Sempermed)
- Schärfe System (Casy®1)
- Sigma Laboratory Zentrifugen 3K10 (Sigma)
- Sigma Laboratory Zentrifugen 4K15C (Sigma)
- Lab instruments S6PW (SLT)
- ELISA measurementSpectra (SLT)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- Vortex-Genie-2™ (VWR Scientific)
- Rotlichtlampe

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zellkulturschalen, Röhrchen, Pipetten, Spitzen, Spritzen, Nadeln und Zellsiebe

- Zellkulturschalen
 - Petrischalen, PS 60 x 15 mm steril (Greiner-Bio-one)
 - 6-Well-Kulturplatte steril mit Deckel (Greiner Bio-one)
- Röhrchen
 - Polystyrol-Röhrchen mit Rundboden, unsteril (BD Falcon)
 - Casy®-Zellzählbecher mit Deckel
 - Zentrifugenröhrchen 15 ml (blaue Verschlußkappe) (Greiner Bio-One GmbH)
 - Zentrifugenröhrchen 50 ml (blaue Verschlußkappe) (Greiner Bio-One GmbH)
 - Eppendorf Tubes (1,5 ml, 2 ml) (Greiner Bio-One GmbH)
- Pipetten
 - Pipette mit Spitze, steril 1-ml, 2-ml, 5-ml, 10-ml, 25-ml, einzeln verpackt (Greiner Bio-One GmbH)
- Spitzen
 - Filterspitzen Universal 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl (Greiner Bio-One GmbH)
- Spritzen und Nadeln
 - Injektionsspritze (Injekt 10 ml/Luer Solo Braun Sterican)
 - Injektionsspritze: Injekt Omnifix-F 1 ml (Braun Sterican)
 - Einweg-Injektionsnadel, Ø 0,55 x 25 mm "24Gx1" Gr. 17 (Braun Sterican)
- Zellsiebe

- Zellsieb 70 µm Nylon (BD Falcon)

3.2.2. Zellkulturmedien, Reagenzien and Puffer

- RPMI Complete Medium (A20 Medium)
 - 500 ml RPMI ohne L-Glutamin (PAA)
 - 58 ml FCS – hitzeinaktiviert (cend: 10%) (GIBCO)
 - 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA)
 - 5 ml L-Glutamin (200 mM) (PAA)
 - 14,5 ml HEPES (1 M) (GIBCO®)
 - 5,8 ml (NaPyr) (100 mM) (PAA)
 - 0,58 ml β-Mercaptoethanol (50 mM) (GIBCO)
- Dulbecco's PBS (1x; w/o Kalzium, Magnesium) (PAA)
- FACS Puffer
 - Dulbecco's PBS (1x; w/o Kalzium, Magnesium) (PAA)
 - 3 % FCS – hitzeinaktiviert (GIBCO)
- MACS Puffer
 - Dulbecco's PBS (1x; w/o Kalzium, Magnesium) (PAA)
 - 0,5% BSA
 - 2 mM EDTA → steril filtriert
- Stripping Puffer
 - Dulbecco's PBS (1x; w/o Kalzium, Magnesium) (PAA)
 - 0,05 M Natriumazetat
 - 0,01 M EDTA
 - 0,005 M KCl
 - 0,085 M NaCl
 - auf pH 4 eingestellt

- Erythrozytenlyse-Puffer
 - 1x Pharmlyse-Puffer (BD Pharmingen)→ verdünnt in Zellkulturwasser (10x Pharmlyse-Stock)
- Isofluran Inhalationsnarkotikum (Abott Forane)
- Casyton Isoton
- Ovalbumin-Stocklösung (10 mg/ml) (Albumin, Chicken egg, Grade V: Minimum 98%, Lot 54H7070) (Fa. Sigma-Aldrich Handels GmbH)
- Alu-Gel-S (2% Al(OH)₃) (Fa. Serva)

3.2.3. Zellzahlbestimmung mit CASY1® Zellzahl-Zähler

- 1:2000 Verdünnung in 10 ml CASY®ton
- 1:4000 Verdünnung in 10 ml CASY®ton

3.2.4. Reaktionskits

- Pan B cell isolation Kit®, mouse (MACS Miltenyi Biotec)
- Regulatory B cell isolation Kit®, mouse (MACS Miltenyi Biotec)
- α-FITC-MicroBeads® (MACS Miltenyi Biotec)

3.2.5. Antikörper

- FITC
 - FITC rat α-mouse IgM (0,5 mg/ml) (BD Pharmingen)
 - FITC rat α-mouse IgG1 (0,5 mg/ml) (BD Pharmingen)
 - FITC rat α-mouse IgE (0,5 mg/ml) (BD Pharmingen)
 - FITC rat IgG1 κ Isotypkontrolle (0,5 mg/ml) (BD Pharmingen)
- PE
 - PE rat α-mouse CD138 (0,2 mg/ml) (BD Pharmingen)
 - PE rat α-mouse CD184 (CXCR4) (0,2 mg/ml) (BD Pharmingen)

- PE rat IgG2b κ Isotypkontrolle (0,2 mg/ml) (eBioscience)
- APC
 - APC rat α -mouse CD4 (0,2 mg/ml) (BD Pharmingen)
 - APC rat α -mouse CD8 (0,2 mg/ml) (BD Pharmingen)
 - APC rat α -mouse CD45R/B220 (0,2 mg/ml) (BD Pharmingen)

3.2.6 Stimuli

- Lipopolysaccharid (LPS) 10 μ g/ μ l (Sigma)
- IL4 500 U/mg (5000-20000 U/ μ l) (BD Pharmingen)
- α -CD40 (1 mg/ml) (BD Pharmingen)

3.3. RNA-Techniken

3.3.1. Puffer, Lösungen and Primer

- RNeasy® Mini Kit (Qiagen®)
 - RLT Puffer
 - RLT Lyse-Puffer
 - β -Mercaptoethanol (AppliChemicals)
 - RW1 Puffer
 - RPE Puffer
 - RPE Wasch-Puffer
 - 70% Ethanol
 - QD/RNase freies Wasser
- Ready-to-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare)
- QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®)
 - QD/RNase freies Wasser
 - PB Puffer

- PB Bindungs-Puffer
 - 96-100% Ethanol
 - PE Puffer
 - PE Wasch-Puffer
 - pH-Indikator I
 - 3M Natriumazetat (NaAc) (pH 5) oder
 - 2,5M Kaliumazetat (KAc) (pH 4,8)
 - EB Puffer (Elutions-Puffer)
- Real-Time Primer
 - Arbp fwd: 5' TGC ACT CTC GCT TTC TGG AGG GTG 3'
 - Arbp rev: 5' AAT GCA GAT GGA TCA GCC AGG AAG G 3'
 - CXCR4 fwd: 5' AGC CTG TGG ATG GTG GTG TTT C 3'
 - CXCR4 rev: 5' CCT TGC TTG ATG ACC CCC AAA AG 3'
 - IL6 fwd: 5' AGC CAG AGT CCT TCA GAG AGA TAC AGA AAC 3'
 - IL6 rev: 5' TAG GCA TAA CGC ACT AGG TTT GCC GAG T 3'
 - IL1RA fwd: 5' CCA AAT ACC TAT CAT GGA TGA ATA 3'
 - IL1RA rev: 5' AAA CTG AAC CCC TGA GAA GA 3'
- dNTPs (100 mM) (Promega)
- Oligo (dT) Primer (1 µg) (49mer (Eurofins MWG Operon))

5'-GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAA CTA GTC TCG AGT TTT TTT
TTT TTT TTT T-3'
- GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)

3.3.2. Röhrchen/Säulen

- PCR® Strip Tubes & Caps (Genuine Oxygen Quality®) PCR-0104-c 0,1 ml Röhrchen-Streifen mit Deckel
- RNeasy Spin-Säule, in einem 2 ml-Sammelröhrchen eingesetzt (RNeasy® Mini Kit (Qiagen®))
- MikroSpin-Säule (QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®))

3.3.3. Reaktionskits

- RNeasy® Mini Kit (Qiagen)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

3.4. Protein-Techniken

3.4.1. ELISA- und ELISpot-Puffer, Reagenzien and Lösungen

- Coating Puffer
 - o Dulbecco's PBS (1x; ohne Kalzium, Magnesium) (PAA)
 - o 0,01% Azid
- Blocking Puffer
 - o Dulbecco's PBS (1x; ohne Kalzium, Magnesium) (PAA)
 - o 1% BSA
 - o 0,01% Azid → steril filtriert
- Antikörperversdünnungs-Puffer
 - o Dulbecco's PBS (1x; ohne Kalzium, Magnesium) (PAA)
 - o 0,1% BSA
 - o 0,01% Azid
- Wasch-Puffer
 - o 10 g KCl
 - o 10 g KH_2PO_4
 - o 72 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - o 400 g NaCl
 - o 25 ml TWEEN 20
 - o 50 ml 10% Azid
 - o mit QD auf 5 l aufgefüllt
- Diethanolamin-Puffer
 - o 97 ml Diethanolamin

- 0,02% Azid (= 2 mM 10% NaN₃)
- 0,8 g MgCl₂ + 6H₂O
- → 1 l ddH₂O pH 9,8 (HCl)
- + 100 mg Sigma 104 Phosphatase-Substrat (Sigma Life science) per 100 ml Diethanolamin-Puffer

- Waschpuffer (ELISpot)
 - Dulbecco's PBS (1x; w/o Kalzium, Magnesium) (PAA)
 - 0,01% TWEEN 20

- Entwickler-Lösung (ELISpot)
 - NBT-BCIP-Tablette (Roche, Ref 11697471001)
 - → in 10 ml QD gelöst

- ELISA-und ELISpot-Coating Antikörper
 - goat α-mouse IgG1-unlabeled, human adsorbed (1 mg/ml) (Southern Biotech)
 - goat α-mouse IgG2a-unlabeled , human adsorbed (1 mg/ml) (Southern Biotech)
 - rat α-mouse IgE (0,5 mg/ml) (BD Pharmingen)
 - 84-1C (0,7 µg/ml) (in-house production)
 - Ovalbumin-Stocklösung (10 mg/ml) → verdünnt in PBS

- ELISA Standards
 - mouse IgG1-unlabeled (Clone 15HG, 1 mg/ml) (Southern Biotech)
 - mouse IgG2a-unlabeled (Clone HOPC-1, 1 mg/ml) (Southern Biotech)
 - mouse IgE κ Isotypkontrolle (0,5 mg/ml) (BD Pharmingen)

- AP-gekoppelte Antikörper für ELISA und ELISpot
 - goat α-mouse IgG1-AP, human adsorbed (Southern Biotech)
 - goat α-mouse IgG2a-AP, human adsorbed (Southern Biotech)
 - rat α-mouse IgE-AP (Clone 23G3) (Southern Biotech)

3.4.2. Pipetten und Platten

- Finnpipette Multikanal-Pipette (Labsystems)
- Eppendorf Kombitips plus 5 ml
- Eppendorf Multipipette plus
- Nunc-Immuno Platte
- Deckel für 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc)

3.5. Mäuse

- Wildtyp BALB/c Maus (WT)
- Hax1^{-/-}-Knock-out-Maus (Hax1^{-/-})

3.5.1. Serumgewinnung

- Sterile Skalpelklingen aus chirurgischem Stahl, einzeln verpackt (Schreiber Instrumente)
- 70% Ethanol

4. Methoden

4.1. Zellkulturtechniken

4.1.1. Präparation von B-Zellen der Maus

Die Mäuse wurden zunächst in einen mit Isofluran gesättigtem Behälter narkotisiert und sodann durch zervikale Dislokation* getötet. Anschließend wurden sie auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die nachfolgenden Schritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

*zervikale Dislokation: Genickbruch; dabei werden Schädel und Halswirbelsäule gegeneinander verschoben

4.1.1.1. Präparation des Knochenmarks

Die Mäuse wurden zunächst mit Isofluran betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Zur Isolation des Knochenmarks wurde der Femur* der Maus mit Hilfe eines Skalpells freipräpariert und in eine mit 5ml PBS befüllte Petrischale überführt, um das Knochenmark mit einer 5ml-Spritze (Kanüle) heraus zu spülen. Die mit Hilfe des Skalpells geöffneten Gelenksenden wurden zusätzlich mit PBS gespült und zum Schluss die Petrischale mit 5ml PBS ausgewaschen. Um die Zellen zu vereinzeln wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines 70 µm Nylonfilters gesiebt, um Zellklumpen zu entfernen. Mit der Verwendung des Nylonfilters werden bei anschließender Verwendung des „Pan B Cell Isolation Kit®“ Verstopfungen in der LD-Säule vermieden. Anschließend wurde mit 300x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und eine Erythrozytenlyse (siehe 3.1.2) durchgeführt. In der Folge wurde mit Hilfe des Casy® die Zellzahl ermittelt.

*Femur: Oberschenkelknochen

4.1.1.2. Präparation der Milz

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben betäubt, getötet und sterilisiert. Zur Milzpräparation wurde die Bauchdecke und der Brustkorb geöffnet. Die linksseitig im Bauchraum liegende Milz wurde vom umliegenden Gewebe befreit, entnommen und in 5ml PBS (Petrischale) überführt. Mittels der 90°-gebogener Hohnadel einer 10ml-Injektionsspritze wurden die Milzzellen mit PBS aus dem Organ rausgespült. Zusätzlich wurde die Milz mit dem Pistill der 10 ml-Spritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde mit einem 70 µm-Zellsieb filtriert und in einem 50 ml Greiner-Röhrchen aufgefangen. Die Petrischale wurde mit 5 ml PBS nachgespült. Diese 5 ml wurden ebenfalls zu den zuvor erhaltenen Zellen hinzugefiltert. Im Anschluss wurde mit 300x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurde mit der Erythrozytenlyse fortgefahren, um mittels Casy® die Gesamtzellzahl des präparierten Organs zu bestimmen.

4.1.2. Erythrozytenlyse

Da die Milz (sowie das Knochenmark) ein blutreiches Gewebe darstellt und die Erythrozyten bspw. die Zellzählung, FACS-Analyse und die Kultivierung von Zellen stören würden, wurde eine Lyse der Erythrozyten vorgenommen. Dafür wurde das Zellpellet in 2 ml BD Pharmlyse-Puffer resuspendiert. Nach 2minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurde die Erythrozytenlyse mit 10 ml PBS gestoppt und die Zellen mit 300x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Via Casy® wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurde mit dem "Pan B Cell Isolation Kit®" fortgefahren.

Die Zellen wurden während der gesamten Präparation und der späteren Analyse auf Eis kühl gehalten! Außerdem wurden vorgekühlte Lösungen verwendet, um ein Abdecken („Capping“) von Antikörpern auf der Zelloberfläche und eine unspezifische Zellmarkierung zu verhindern.

4.1.3. Zellzahlbestimmung mittels Casy®

Die Zellzahl wurde durch die Änderung des Widerstandes in einem Spannungsfeld bestimmt (Widerstandsmessprinzip). Die Zellsuspension wurde mit einer isotonischen Elektrolytlösung (CASY®ton) in einem Proberöhrchen verdünnt (1:4000-Verdünnung) und mit Hilfe eines Vakuums durch eine Messkapillare gesaugt, an der eine konstante Spannung angelegt ist. Wenn eine lebende Zelle (Isolatorwirkung) die Kapillare passiert, ändert sich der Widerstand (Erhöhung des Widerstands) und es entsteht ein elektrischer Impuls, der von einem Detektor registriert wird. Das Volumen der angesaugten Zellen kann bestimmt werden, da diese eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung verdrängen. Da jede Zelle eine Änderung des Widerstandes auslöst, ergibt sich die Zellzahl aus der Anzahl der durchlaufenden Ereignisse. Die Angabe der Messung erfolgt in Zellen/ml.

Dabei wird angesichts des Stromausschlussverfahrens eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen anhand der Bestimmung der Integrität der Zellmembran möglich. Die Lipiddoppelschicht stellt bei Unversehrtheit eine Isolierung des elektrisch leitfähigen Cytoplasmas dar. Da tote Zellen über keine intakte Zellmembran mehr verfügen, wird der zytoplasmatische Raum leitfähig. Aufgrund der unterschiedlichen detektierten Größen von vitalen und toten Zellen, wird eine separate Zählung möglich. Unter Berücksichtigung der charakteristischen Cursorposition eines jeden Zelltyps, wird eine getrennte Bestimmung von toten und lebenden Zellen sowie toten Zellen und Zelldebris* garantiert (Abbildung 10) (73).

*Zelldebris: Fragmente toter Körperzellen

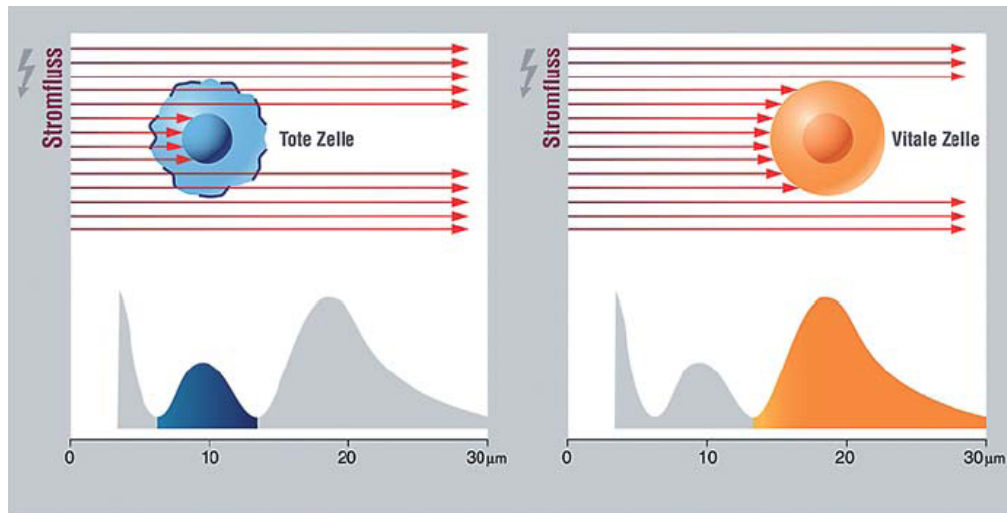


Abbildung 10: Stromausschlussverfahren: Lebende Zellen mit intakter Zellmembran schließen den elektrischen Strom aus, während bei toten Zellen mit defekter Membran der zytoplasmatische Raum leitfähig wird (73).

4.1.4. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

4.1.4.1. MACS-Säulen-Technologie

4.1.4.1.1. Depletions-Säulen (Miltenyi Biotech)

Die gewünschte Zellpopulation (siehe 4.1.5.1. Pan B Cell Isolation Kit® (Maus)) durchläuft als nicht markierte Zellfraktion die Säule, wobei alle unerwünschten anderen Zellen markiert und an die Säule gebunden, d.h. depletiert werden (MD/LD middle/large depletion) (Abbildung 11). Somit erhält man zum Beispiel für die B-Zell-Induktionsversuche eine reine B-Zellpopulation. Eine etwaige Markierung der B-Zellen durch Antikörper könnte zu einer Aktivierung und vorzeitigen Apoptose führen. Die Nicht-B-Zellfraktion wird dabei zuerst mit einem Antikörpercocktail markiert, wobei diese Antikörper selbst wiederum durch eine Biotin-Gruppe markiert sind. Durch einen α -Biotin-Antikörper, der an magnetische MicroBeads gekoppelt ist, erfolgt eine zweite Markierung. Diese MicroBeads werden in einem vom MACS-Separator erzeugten Magnetfeld in der Säule gebunden und somit depletiert.

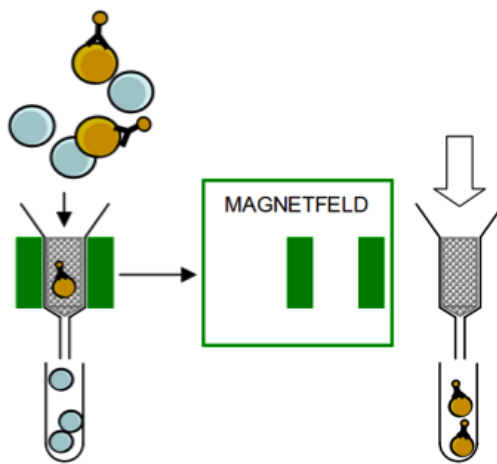


Abbildung 11: Auftrennung zwei unterschiedlicher Zellpopulationen mit Hilfe einer MACS-Trennsäule. Bild rechts: Solange sich die Säule innerhalb des Magnetfeldes befindet, werden die Beads-beladenen Zellen (markierten Zellen) zurückgehalten. Die nicht-markierten Zellen werden aus der Säule gespült. Bild links: Wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, können auch die markierten Zellen eluiert werden.

4.1.4.1.2. Separations-Säulen (Miltenyi Biotec)

Die MS oder LS (middle/large separation) Säule kann vorzugsweise zur Isolierung einer bestimmten Zellpopulation verwendet werden. Es werden dabei Zellen mit einem Antikörper, gekoppelt an eine Fluoreszenzgruppe (z.B. B-Zellmarkierung mit α -B220-FITC), markiert. Die Fluoreszenzgruppe wird sodann wiederum durch α -FITC-MicroBeads magnetisch markiert, wobei die gewünschten Zellen in der Säule durch das Magnetfeld zurückgehalten werden und nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld durch den Einsatz des mitgelieferten Pistills aus der Säule gespült werden können.

4.1.5.1. Pan B Cell Isolation Kit® (Maus/Miltenyi Biotec)

Hierbei werden B-Zellen „untouched“, d.h. ohne dabei durch einen Antikörper markiert und eventuell stimuliert zu werden, aus den lymphoiden Geweben isoliert. Dieses Faktum ist natürlich ein Vorteil für anschließende B-Zellinduktionen oder funktionale Analysen.

Die B-Zell-Isolierung erfolgt via „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS)-Separation, wonach Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker heraussortiert werden können. Dabei erfolgt die Isolierung der B-Zellen durch Depletion von Nicht-B-Zellen, indem die Nicht-B-Zellfraktion magnetisch mit einem Biotin-konjugierten Antikörpercocktail (primäre Markierung) und einem α -Biotin-konjugierten, monoklonalen Antikörper, der an MicroBeads gekoppelt ist (sekundäre Markierung), markiert wird. Die Zellen werden dann auf eine Säule geladen, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet. Die Zellen mit den magnetischen Kügelchen werden durch das Magnetfeld angezogen und bleiben in der Säule, während die ungebundenen Zellen die Säule passieren können. Abhängig von der gemessenen Zellzahl wurden adäquate Volumina, entsprechend der Kit-Anleitung, eingesetzt.

4.1.5.1.1. Magnetische Markierung von Nicht-B-Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Milzzellsuspension mit PBS bei 300x g bei 4°C für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im Anschluss wurden 10^7 Zellen in 40 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Zu der Zellsuspension wurden 10 μ l „B Cell Biotin-Antibody Cocktail“ dazugegeben, gemischt und bei 4°C für 10 min inkubiert. Nachher wurden 20 μ l „Anti-Biotin MicroBeads“ sowie 30 μ l MACS-Puffer zugegeben und bei 4°C für 15 min gelagert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Magnetische Separation (siehe 4.1.5.1.2.) durchgeführt.

4.1.5.1.2. Magnetische Separation: Depletion von Nicht-B-Zellen via LD-Depletion-Säule

Beim Aufbau und der Äquilibration der MACS-Säule wurde wie folgt vorgegangen: Die LD-Säule wurde in den magnetischen MACS-Separator positioniert und mit 2 ml MACS-Puffer äquilibriert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurde unterhalb der Säule ein 15 ml-Greiner-Röhrchen platziert, um den Durchfluss (B-Zellen) aufzufangen. Es wurde sodann die Säule mit der Zellsuspension beladen und noch zweimal mit jeweils 1 ml MACS-Puffer gewaschen, wobei erst nach vollständigem Passieren des Säulenreservoirs neuer Puffer hinzugefügt wurde. Der Durchfluss der Zellsuspension, sowie die beiden nachfolgenden Waschvolumina wurden in einem 15

ml-Greiner-Röhrchen, aufgefangen. Es wurde mit der *in-vitro*-Stimulation (siehe 4.1.4.1.3.) fortgefahren.

4.1.4.1.3. In-vitro-Stimulation

Von den eluierten, unmarkierten B-Zellen der Milz wurde die Zellzahl via Casy® bestimmt. Es sollte eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt werden. Aus der mittels Casy® bestimmten Zellzahl wurde somit das Volumen des zu verwendenden A20 Complete-Mediums berechnet. Die Zellen wurden bei 300x g bei 4°C für 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in dem berechneten Volumen resuspendiert.

B-Zellen, die in Gegenwart von α -CD40-Antikörpern und IL4 bzw. LPS und IL4 kultiviert wurden, führen einen Isotypwechsel von IgM zu IgG1 und zu IgE durch. Hierbei entstehen sogenannte Plasmablasten, die IgE und IgG1 sekretieren. Die membranständigen Antikörper werden mittels FACS-Analyse und die sekretierten Antikörper mittels ELISA-Messung aus dem Kulturüberstand nachgewiesen.

Die eine Hälfte der in A20-Medium resuspendierten B-Zellpopulation (1×10^6 Zellen pro ml Medium) wurde mit LPS (10 μ g/ml) und IL4 (500 U/ml) stimuliert, während der andere Teil der isolierten Zellen mit α -CD40 (2,5 μ g/ml) und IL4 (500 U/ μ l) behandelt wurde. Die Induktionsansätze wurden auf adäquate Well-Kultur-Platten aliquotiert und für 5 Tage im Brutschrank/Inkubator bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurde abhängig von den zu untersuchenden Zellpopulationen mit einer entsprechenden Analyse-Methode fortgefahren.

- Zur Analyse der sekretierten Antikörper wurde der Überstand der Induktions-B-Zell-Ansätze für ELISA-Messungen verwendet. Die Daten der ELISA-Messung wurden mit den Ergebnissen aus der FACS-Analyse verglichen.
- Das Zellpellet wurde außerdem für (a) FACS- oder für (b) Real-Time-Analysen verwendet.

a) FACS-Analyse:

- Bei FACS-Analysen mit IgE-Färbungen wurden die Zellen zuerst mit einem sauren Puffer (Stripping Puffer) behandelt, um CD23(Fc ϵ RI „low-affinity receptor“)-gebundenes IgE zu entfernen und eine unspezifische Färbung zu verhindern. Weiters wurden via Fc-Blocking derartige falsch-positive Signale verhindert.
- Dann erfolgte eine eFluor(APC-Cy7)-Färbung (Viabilitätsbestimmung). Da eFluor nur tote Zellen färbt, sind die lebenden Zellen entsprechend eFluor-negativ.
- Anschließend wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert, um den Switch zu untersuchen. Demnach konnte die %-Anzahl von lebenden B-Zellen des jeweiligen Isotyps bestimmt werden.

b) Real Time Analyse:

- Abhängig vom Experiment wurden die gesamten Zellen mit RLT-Puffer (inkl. β -ME) behandelt, um die Zellen zu lysieren und RNA zu gewinnen.

4.1.6. FACS-Methodik

4.1.6.1 Stripping

Um ausschließlich membran-gebundene IgE-Antikörper zu detektieren, müssen vor der Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, mögliche sekretierte IgE's (sIgE), die am CD23-Rezeptor (Fc ϵ RI) („low-affinity receptor“) gebunden haben, mit Hilfe des sauren Stripping Puffers abgelöst werden. Dies trägt zu einer spezifischeren Färbung bei und vermeidet somit die Detektion von falsch-positiven B-Zellen.

Dem sauren Stripping Puffer (pH 4) wurde 1% FCS zugesetzt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Stripping-Puffer resuspendiert und für 1-2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml PBS gestoppt, für 5 min bei 4°C bei 300x

g zentrifugiert und der Überstand absaugt. Das Zellpellet wurde in einem adäquaten Volumen FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte das Fc-Blocking bevor mit der Färbung fortgefahren wurde (siehe 4.1.6.2. und 4.1.6.3.). Bei manchen Färbungen wurde auch auf das Blocking verzichtet.

4.1.6.2. Fc-Blocking

Durch die Verwendung von einem α -Fc γ II/III-Rezeptor-spezifischen Antikörper („Purified α -mouse FcR Blocking Reagent CD16/32 (0,5 mg/ml)“) sollen unspezifische Färbungen verhindert werden. Fluorochrom-gekoppelte AK können unspezifisch an die niedrig-affinen Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RIII-A/-B (CD16) und Fc γ RII-A/-B (CD32) Rezeptoren) binden und für falsch-positive Signale sorgen.

Zu diesem Zweck wurde das Zellpellet in jeweils 100 μ l Fc-Blocking-Reagenz (CD16/CD32)–Verdünnung resuspendiert. Dabei wurde zur Herstellung der 1:100-Verdünnung 1 μ l der Stock-Lösung des Fc-Blocking-Reagenz auf 100 μ l FACS-Puffer pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wird das Zellpellet einmal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde bei 300x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Fc-Blocking wurde im Speziellen bei der intrazellulären CXCR4-Färbung eingesetzt. Zumeist bestand keine Notwendigkeit das Fc-Blocking durchzuführen und es wurde darauf verzichtet.

4.1.6.3. Viabilitätsfärbung

Bei der Viabilitätskontrollfärbung wurde der prozentuelle Anteil lebender Zellen mit Hilfe einer eFluor-Färbung bestimmt. Da eFluor (APC-Cy7) nur tote Zellen färbt, sind die lebenden Zellen entsprechend eFluor-APC-Cy7-negativ. Das Zellpellet wurde in 100 μ l eFluor-Verdünnung (1:1000 in FACS-Puffer) resuspendiert. „Unstained“-Kontrollen wurden ausschließlich in FACS-Puffer gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, bei 300x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es wurde abhängig vom Versuch entweder gleich mit der FACS-Analyse fortgefahren oder es folgte noch eine weitere Markierung mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.

Eine Lebend/Tot-Färbung ist im Speziellen bei in vitro Kulturen notwendig, da hier ein großer Prozentsatz sich als nicht lebend erweist.

4.1.6.4. Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

Die Zellpellets wurden in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 0,5 µl des entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers für 30 min in einer verschlossenen und abgedunkelten Eisbox gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml FACS-Puffer gewaschen, um die ungebundenen markierten Antikörper zu entfernen. Dabei wurde jeweils bei 300x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert und entsprechend der Überstand abgesaugt. Am Ende wurde das Zellpellet für die FACS-Messung in 70 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension in beschriftete FACS-Röhrchen überführt. Bis zur Messung wurden die FACS-Röhrchen im Dunkeln und auf Eis gelagert.

4.1.6.5. Fixation, Permeabilisierung und intrazelluläre CXCR4-Färbung

CXCR4 ist auf der Oberfläche der B-Zellen in sehr geringer Zahl vorhanden, sodass bei einer extrazellulären Detektion zumeist keine Färbung erreicht werden kann. Daher behilft man sich mit einer intrazellulären Färbung des CXCR4.

Das Pellet jedes Zellansatzes wurde zunächst in 100 µl einer 1:100-Fc-Blocking-Reagenz-Verdünnung resuspendiert. Hinterher wurde für 15 min auf Eis inkubiert, und dann bei 300x g bei 4°C für 5 min abzentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Danach wurde mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellen erneut bei 300x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert, sowie der Überstand verworfen.

Dabei wurde 1 µl Stock-Lösung des CD16/CD32-Fc-Blocking-Reagenz auf 100 µl FACS-Puffer pipettiert. Die Zellpopulations-Ansätze wurden dann für 15 min auf Eis inkubiert, um die Fc-Rezeptoren innerhalb dieser Zeit zu blockieren. Hinterher wurden die Zellsuspensionen bei 300x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert und die Überstände abgesaugt

Bei der intrazellulären CXCR4-Färbung wurden die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert. Dabei wurde das Pellet ($\sim 4 - 5 \times 10^6$ Zellen) in 100 µl

Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und nach 20minütiger Inkubationszeit bei 4°C im Kühlschrank zweimal mit jeweils 1 ml der 1x Perm-Waschlösung (10x Stock 1:10 in QD-Wasser) durch Waschen wieder entfernt. Die Zentrifugation erfolgte bei 300x g bei 4°C für 5 min. Die Überstände wurden abgesaugt und verworfen.

Für die intrazelluläre Markierung wurde zu jedem Zellansatz ein adäquates Volumen der 1x Perm-Waschlösung zugegeben und anschließend in mehrere Aliquote in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt. Für jeden Farbeansatz wurden 100 µl der Waschlösung gerechnet, die zur Aufrechterhaltung der Permeabilität der Zellen dient. Zur Zellsuspension wurden jeweils 0,5 µl des α -CXCR4-PE- oder des α -IgG2b-PE- (Isotypkontrolle) Antikörpers zugegeben, mit Ausnahme der „Unstained“-Ansätze, und für weiteren 30 min auf Eis in einer abgedunkelten und verschlossenen Box gefärbt. Die Zellen wurden erneut zweimal mit jeweils 1 ml 1x Perm-Waschpuffer gewaschen. Die im Überstand befindlichen ungebundenen Antikörper wurden durch zwei Zentrifugationsschritte bei 300x g bei 4°C für 5 min entfernt. Zur durchflusszytometrischen Messung wurde jedes Zellpellet in 70 µl gelöst und in beschriftete FACS-Röhrchen überführt. Bei fixierten Zellansätzen bedarf es bis zur FACS-Messung, im Gegensatz zu unfixierten (extrazellulären) Zellansätzen, keiner kühlen und abgedunkelten Lagerung. Stattdessen können die intrazellulär-gefärbten Proben bei RT gehalten werden.

4.1.6.6. FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)

Bei FACS („Fluorescent activated cell sorting“) können verschiedene Zellpopulationen (z.B. T- und B-Zellen) aber auch Subpopulationen (verschiedene B-Zellreifestadien) unterschieden werden. Prinzipiell unterscheidet man zwischen einer extrazellulären FACS-Färbung, bei der Oberflächenmarker nachgewiesen werden und einer intrazellulären FACS-Färbung, bei der intrazelluläre Bestandteile detektiert werden. Bereits ungefärbte Zellen ergeben im Durchflusszytometer ein charakteristisches Bild, das durch die Zellgröße und Granularität bestimmt wird. Diese beiden Zelleigenschaften korrelieren mit der Menge des gestreuten Lichtes und macht eine Differenzierung unmarkierter Zellpopulationen möglich. Die einzelnen Zellen passieren in der Trägerflüssigkeit einzeln einen Laser und je unregelmäßiger die Oberfläche, desto mehr Licht wird gestreut. Das Zellvolumen wird mit dem „forward

scatter“ (FSC) untersucht, wobei der Detektor gegenüber vom Laser liegt. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt von der Zellgröße ab. Dagegen wird mit dem „side scatter“ (SSC) die Granularität der Zellen bestimmt, indem das Streulicht von dem im rechten Winkel zum Laser angebrachten Detektor erfasst wird. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die in Abhängigkeit von der Zunahme der Komplexität, ebenso zunimmt.

Eine gleichzeitige Untersuchung von mehreren Zellmerkmalen wird mit Fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern ermöglicht. Dabei erlaubt der Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und Filtern, dass mehrere Fluoreszenzfarbstoffe, verwendet werden können. Die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale werden dann von mehreren Photodetektoren erfasst, die in elektrische Signale transferiert werden. Die wichtigsten Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün 488 nm), Phycoerythrin (PE, rot, 633 nm) und Allophycocyanin (APC; violett, 405 nm)

Der Anregungslaser, der monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittiert, regt die Zellen einzeln bei Durchtritt durch eine Kapillare an. Dabei werden das erzeugte Streulicht und das emittierte Fluoreszenzlicht, der Antikörper-gekoppelten Fluorochromfarbstoffe separat detektiert. Zellen, die positiv für mehrere verschiedene Marker sind, erlauben eine Zunahme des Informationsgehalts der zu untersuchenden Zellprobe. Dabei darf es zu keiner Überlappung des Emissionsspektrums der eingesetzten Fluorophore kommen. Um zu verhindern, dass das Fluoreszenzsignal in einen nicht für sie vorgesehenen Kanal gelangt, wird eine Kompensation durchgeführt. Mit Hilfe einer Einzel-Fluorochrom-Färbung kann man das Überstrahlen der jeweiligen Fluorochrom-Fluoreszenz in andere Fluoreszenzkanäle ermitteln, indem man die gemessenen Intensitätswerte mit denen einer vollständig ungefärbten Probe vergleicht.

Die Durchflusszytometrische Messung wurde mit dem Zellsorter-Gerät der Marke „FACS BD Canto™ (BD Falcon, Firma Becton Dickinson)“, durchgeführt. Außerdem wurden folgende Softwareprogramme eingesetzt: für die FACS-Aufnahme wurde die „BD FACSDiva Software“ verwendet und in der Folge die

Resultate mit der FlowJo Software ausgewertet. Dabei waren die Messdaten der Ergebnisse als prozentueller Anteil (%-Anteil) für einen fluoreszierenden Marker positiver Zellen registriert.

Für die Auswertung der gemessenen Signale wurden das Streudiagramm (Zellbild/Dotplot) und die Histogrammdarstellung verwendet. Mit Hilfe des Dotplot-Diagramms werden zwei Zelleigenschaften zueinander in Beziehung gesetzt. Dabei ist eine Unterscheidung von Zellpopulationen möglich. Jeder Punkt der Zweiparameter-(Dotplot)-Darstellung entspricht einer Zelle mit den beiden zusammenhängenden Eigenschaften. Im Streubild kann man die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen erkennen (wie Lymphozyten, Granulozyten, tote Zellen, usw) und entsprechend die zu interessierende Zellfraktion abgrenzen. Durch Setzen eines „Gates“ werden für weitere Auswertungen folglich nur die definierten Zellen, die innerhalb dieses Gates liegen, berücksichtigt.

4.2. RNA-Techniken

4.2.1. RNeasy Mini Kit® (Qiagen)

Zunächst wurde zu 1 ml RLT-Puffer 10 µl β-ME zugesetzt und folglich ein Master-Mix entsprechend der Anzahl der Zellansätze hergestellt. Dabei wurde abhängig von der Zellpopulation das Zellpellet zwischen einem Volumen von 300 µl und 600 µl resuspendiert. Beispielsweise wurde eine Gesamt-Splenozyten-Population mit 600 µl RLT-Puffer versetzt, während eine isolierte B-Zellfraktion des Knochenmarks nur mit 300 µl RLT-Puffer gelöst wurde. Das Zelllysate wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Danach wurde das aufgetaute homogenisierte Lysat mit 1 Volumen (Vol.) 70%igem Ethanol versetzt und gut vermischt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen auf eine RNeasy Minisäule auftragen, welche in ein 2 ml-Sammelröhrchen eingesetzt

war. Dann wurde für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Unterstand verworfen und das 2 ml-Sammeltube erneut für die Säule verwendet. Beim Überschreiten des Füllvolumens kann ein eventuelles zweites Auftragen auf die Säule notwendig werden. Dann erfolgte ein Waschschrift, indem 700 µl des RW1-Puffers (Waschpuffer) auf die RNeasy Säule zugegeben wurden. Dabei wurde erneut für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Unterstand verworfen und das 2 ml-Sammeltube erneut für die Säule verwendet. In der Folge wurden 500 µl RPE-Puffer (Waschpuffer mit zugesetztem Ethanol) auf die RNeasy Säule pipettiert. Dabei wurde die Säule einem weiteren Waschvorgang unterzogen, indem für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Hierbei wurde der Unterstand erneut verworfen und das 2 ml-Sammeltube erneut für dieselbe Säule verwendet. Hiernach wurde die Säule zum Trockenfugen für 1 min bei 14.000 rpm (full speed) zentrifugiert. Im Weiteren wurde der Unterstand samt verwendetes 2 ml-Sammeltube verworfen und die RNeasy Minisäule in ein neues RNase-freies 2 ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt. Am Ende wurde mit 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. In diesem Fall wurde für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNA aus der Säulenmembran zu lösen. Alternativ wurde dieser Schritt abhängig von der erhaltenen RNA-Menge wiederholt, um die RNA-Konzentration zu erhöhen. Ferner wurde die eluierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren, um dann später eine cDNA-Synthese durchzuführen (siehe 4.2.2).

4.2.2. cDNA Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird mit dem Oligo-d(T)-Primer, der am Poly-A-Tail der RNA primen kann, einzelsträngige, komplementäre DNA erzeugt.

32 µl RNA wurden für 10 min in einem DNA-Thermal Cycler bei 65°C denaturiert und anschließend für etwa 2 min auf Eis gekühlt. Die restliche RNA wurde wieder bei -20°C eingefroren. Dann wurde 1 µl Oligo-d(T)-Primer hinzugemischt. Das Gesamtvolumen von nun 33 µl wurde zu den „Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads“ (GE Healthcare) überführt. Die PCR-Ansätze wurden bis zur vollständigen Auflösung der Beads gevortext, um dann für 2 h auf einen 37°C-eingestellten PTC-200 Peltier Thermal Cycle DNA Engine (MJ Research) inkubiert zu werden. Abschließend wurden die PCR-Ansätze auf dem Thermal Cycler auf eine Temperatur

von 70°C für 20 min erhitzt, um DNA-RNA Komplexe aufzuschmelzen. Es wurde danach mit dem QIAquick®PCR Purification Kit (Qiagen) fortgefahren um Oligo-d(T)-Primer bzw. Nukleotide, Polymerasen und Salz zu entfernen (siehe 4.2.3.).

4.2.3. QIAquick® PCR Purification Kit Protokoll (Qiagen®)

Nach der cDNA-Synthese wurden die 33 µl des PCR-Ansatzes auf ein Volumen von 100 µl mit RNase-freiem Wasser (68 µl) aufgefüllt. Es folgte eine Zugabe von 5 Volumen (500 µl) des PB-Puffers (PB-Puffer mit zugesetztem pH-Indikator). Dabei wurde bei einer Orange- bzw. Violett-Färbung 10 µl einer 2,5 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) zugegeben, um den zu hohen pH-Wert von > 7,5 unter diesen Bereich zu bringen. Der optimale pH-Bereich von < 7,5 wurde durch eine gelbliche Färbung angezeigt. Die DNA-Absorption an die QIAquick-Säule ist vom pH-Wert abhängig und beträgt bei einem pH-Wert > 7,5 ca. 95% und nimmt drastisch ab, wenn der pH-Wert < 7,5 ist.

Nach Abschätzen des pH-Bereichs durch Farberkennung wurde der gesamte Ansatz auf eine QIAquick-Säule gegeben, die in einem 2 ml-Sammeltube eingelegt war. Damit die DNA an der Säule bindet, wird bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die QIAquick-Säule wieder in dasselbe 2 ml-Sammeltube eingelegt. Es folgte ein Waschschriff, wofür 750 µl PE-Puffer (PE-Puffer mit zugesetztem 96-100% Ethanol) auf die Säule aufgetragen wurde. Dann wurde für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die QIAquick-Säule erneut in dasselbe 2 ml-Sammeltube eingelegt. Im Anschluss wurde die Säule für 1 min bei 13.000 rpm trockengefugt. Die QIAquick-Säule wurde auf ein neues 2 ml-Eppendorf-Tube platziert. Am Ende wurden 60 µl EB-Puffer (10 mM TrisCl, pH 8,5) auf das QIAquick-Säulenzentrum pipettiert, um die DNA aus der Säule zu eluieren. Diesbezüglich wurde ein weiteres Mal für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Alternativ wurde dieser Elutionsschritt mit 60 µl EB-Puffer wiederholt, um die DNA-Konzentration zu erhöhen. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Es wurde mit der „Real Time“ fortgefahren (siehe 4.2.4.).

4.2.4. Real Time PCR (Polymerase chain reaction)

Mittels der Real Time Analyse kann die relative Menge von bestimmten RNA-Transkripten im Verhältnis zu einem „House keeping gene Arbp“ (60S acidic ribosomal protein P0) berechnet werden.

Bei der Real-Time PCR wird das Fluoreszenzsignal (PCR-Produkt) kontinuierlich vom Gerät detektiert, welches während der PCR proportional zur Menge des entstehenden Amplifikats ansteigt. Das Fluoreszenzsignal wird von einem fluoreszierenden DNA-bindenden Farbstoff erzeugt, der ein Bestandteil des GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) darstellt. Am Ende der Elongationsphasen, wenn die meiste DNA als Doppelstrang vorliegt, ist die maximale fluoreszierende Farbstoff-Menge gebunden, was dem maximalen Fluoreszenzsignal entspricht. Somit ist die steigende DNA-Menge von Zyklus zu Zyklus detektierbar.

Folgende Bestandteile wurden in ein Real Time PCR® Strip Tube (Genuine Asygen Quality®) pipettiert:

- 5 µl cDNA
- 0,3 µl Primer-Mix-Verdünnung (enthält Forward- und Reverse-Primer)
- 5 µl GoTaq qPCR Mastermix (enthält fluoreszierenden DNA-bindenden Farbstoff)

Es wurden 5,3 µl des Primer-Master-Mix (5,0 µl GoTaq qPCR-Master-Mix + 0,3 µl Primer-Mix) in den Real Time PCR® Strip Tube's vorgelegt. Im Anschluss wurden 5,0 µl der jeweiligen cDNA-Lösung dazupipettiert.

Primer Mix: 10 µl des Forward- und 10 µl des Reverse-Primers (Stocklösungen 100 pmol/µl) wurden mit 80 µl QD verdünnt. Die Primer-Mix-Verdünnung mit einem Endvolumen von 100 µl wurde bei -20°C eingefroren. Um ein mehrmaliges Auftauen der Stocklösungen zu vermeiden, wurden mehrere verdünnte Primer-Mix-Aliquote zubereitet und bei Bedarf aufgetaut.

Schritt	Zeit	Temperatur
1	3 min	95°C
2	60 sec	95°C
3	15 sec	65°C
4	45 sec	72°C
5	50 Zyklen: Wiederholung der Schritte 2-4	
6	5 min	72°C

Tabelle 1: Real-Time PCR-Programm

Die Proben wurden mit einem Real-Time-Gerät der Marke Rotor-Gene-Q (PCR Cycler) analysiert, und dabei mit der Real-Time Rotor-Gene 6-Software evaluiert. Die Real-Time-Messdaten wurden mit dem Windows Excel-Software-Programm entsprechend ausgewertet. Für die Datenauswertung wurde jede Probe zweimal gemessen und der entsprechende Mittelwert (MW) berechnet. Aus dem MW des Kontrollgens (Arbp) und dem MW des „Gene of Interest“ errechnete sich der relative Wert des Transkriptes (= „Log-Wert“). Folgende Formel wurde hierbei verwendet:

$$\text{Relative Expression} = 2^{(\text{MW Arbp} - \text{MW „Gene of Interest“})}$$

4.3. Protein-Techniken

4.3.1. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

ELISA ist eine immunologische Methode, die auf der Antigen-Antikörper-Bindung beruht. Generell dient der ELISA dem quantitativen Nachweis von Antigenen oder Antikörpern in einer Probe. Der Assay beruht darauf, dass der Bindungspartner des Analyten auf der Plastikoberfläche (Polystyrol) einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert wird, um im Anschluss die daran gebundenen und zu identifizierenden Zielproteine einer Probe durch einen Detektions-Antikörper nachzuweisen. Dabei wird die Konzentration des gebundenen Analyten durch einen Enzym-gekoppelten Zweit-

Antikörper (AP-(Alkalische Phosphatase)-gekoppelt) detektiert. Das Substrat wird durch eine enzymatisch-katalysierte Farbreaktion umgesetzt, die photometrisch gemessen wird. Die Stärke der Farbreaktion bzw. Intensität ist proportional zur Antikörperkonzentration. Dabei kann anhand einer Eichkurve die Konzentration des zu identifizierbaren Analytproteins bestimmt werden. Für die Auswertung der nachzuweisenden IgG1-Konzentration wurde eine 4-Parametrische Eichgerade erstellt, während der IgE-Nachweis durch Erstellung einer linearen Eichkurve bewerkstelligt wurde.

Man unterscheidet zwei Grundformen des ELISAs: Direkter und Sandwich-ELISA. Im direkten ELISA kann die Antikörperkonzentration gegen ein bestimmtes Antigen in einer Probe bestimmt werden. Im Sandwich-ELISA hingegen, kann die Antigenkonzentration, die an einen spezifischen Antikörper bindet, bestimmt werden.

4.3.1.1. Durchführung des ELISA

- Die ELISA-Methode wurde angewendet, um die sekretierten Mengen von IgG1- und IgE-Antikörpern in den Kulturüberständen von stimulierten B-Zellansätzen (α -CD40/IL4 und LPS/IL4) festzustellen.
- Im Weiteren wurden die Sera Ovalbumin(OVA)-immunisierter Mäuse auf Immunglobulinstatus hin untersucht.

4.3.1.1.1. Schema des ELISA

1. Coating
2. Blocking
3. Auftragen der Standards, der Überstände oder der Sera
 - a. Verdünnungen
4. Entwicklung

4.3.1.1.1.1. Coating

Für den Nachweis der gesamten Serum-AK wurden die Primärantikörper in einer α -AK-Coating-Verdünnung auf einer 96-Well-Mikrotitrationsplatte immobilisiert. In

diesem Fall wurden jeweils 50 µl der verdünnten Coating-Antikörper in ein „well“ pipettiert und über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Detaillierte Beschreibung der verwendeten ELISA-Coating Antikörper folgt unter Punkt 4.3.1.1.1.3. Die Antikörper wurden mit Coating-Puffer (1x PBS/0,01% Azid) verdünnt.

Zur Bestimmung der OVA-spezifischen Antikörper wurden die Platten mit einer Ovalbumin-Verdünnung beschichtet. Hierfür wurden zunächst 60 mg Ovalbumin-Pulver abgewogen, dass in 600 µl PBS (1 mg/10 µl) gelöst wurde, um dann 60 µl dieses OVA-Stocks in 6 ml PBS (1:1000) zu verdünnen. Danach wurden 50 µl der 1:1000-OVA-Verdünnung via der „Eppendorf Multipipette plus“ in jedes Well pipettiert und über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert.

Die Außenreihen der ELISA-Platte wurden nicht „gecoatet“, da es zu einer veränderten Absorption in diesen Wells kommen kann. Außerdem wurden auch die letzten drei unteren Wells der vertikalen Reihe auf der rechten Seite nicht gecoatet, die zur Kontrolle (1. Kontrolle) dienten (siehe Abbildung 12).

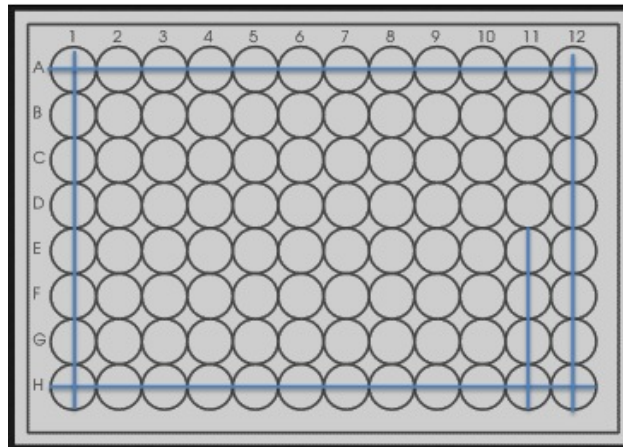


Abbildung 12: Die durchgestrichenen „Wells“ werden nicht gecoatet. In die nicht markierten „Wells“ werden 50 µl des verdünnten Coating-Antikörpers pipettiert.

4.3.1.1.1.2. Blocking

Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen mit 100 µl Blocking-Puffer (PBS/1% BSA) wurde die Platte dreimal im ELISA-Washer (Tecan) mit Waschpuffer gewaschen. Dafür wurde zunächst aus einer 10x Waschpuffer-Stocklösung ein 1x Waschpuffer hergestellt.

4.3.1.1.1.3. Auftragen der Standards, der Überstände oder der Sera

Bis auf Reihe B wurden 50 µl Antikörper-Verdünnungs-Puffer (1xPBS/0,1% BSA/0,01% Azid) vorgelegt (siehe Abbildung 13).

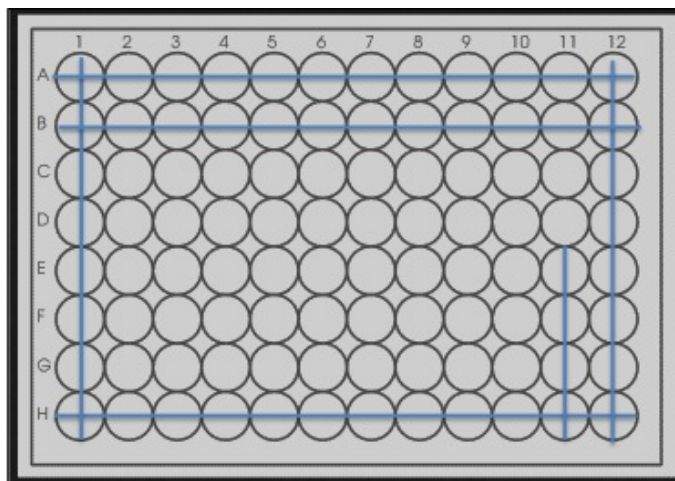


Abbildung 13: In den nicht markierten Wells werden 50 µl Antikörper-Verdünnungs-Puffer vorgelegt.

Folgende Verdünnungen wurden mit Antikörperverdünnungspuffer (1xPBS/0,1% BSA/0,01% Azid) hergestellt:

- Überstände: unverdünnt
- Standards (*) (IgG1, IgG2a, IgE): siehe Tabelle 2
- Poolserum (**): siehe Tabelle 2

- Sera von ovalbumin-immunisierten Mäusen: siehe Tabelle 3

(*) Standard-Verdünnungen wurden zum Nachweis der Gesamt-Serum-AK-Konzentration verwendet.

(**) gepooltes Standardpoolserum: Pool von Sera Ovalbumin-sensibilisierter Mäuse zur Auswertung der OVA-spezifischen Immunglobuline.

Gesamt IgG1 ELISA	Verdünnung
Coating: goat α -mouse IgG1-unlabeled, human adsorbed (1 mg/ml)	1:1000
ST: mouse IgG1-unlabeled (Clone 15HG, 1 mg/ml)	1:2000
AP-Antikörper: goat α -mouse IgG1-AP, human adsorbed	1:1000
Gesamt IgG2a ELISA	
Coating: goat α -mouse IgG2a-unlabeled, human adsorbed (1 mg/ml)	1:1000
ST: mouse IgG2a-unlabeled (Clone HOPC-1, 1 mg/ml)	1:2000
AP-AK: goat α -mouse IgG2a-AP, human adsorbed	1:1000
Gesamt IgE ELISA	
Coating: rat α -mouse IgE (0,5 mg/ml) bzw. 84-1C (0,7 μ g/ml) (in-house production)	1:1000 bzw. 1:125
ST: mouse IgE κ Isotypkontrolle (0,5 mg/ml)	1:2000
AP-Antikörper: rat α -mouse IgE-AP (Clone 23G3)	1:1000
Ovalbumin spezifischer IgG1 ELISA	
Coating: Ovalbumin-Stocklösung (10 mg/ml)	500 μ g
ST: Poolserum	1:3000
AP-AK: goat α -mouse IgG1-AP, human adsorbed	1:1000
Ovalbumin spezifischer IgG2a ELISA	
Coating: Ovalbumin-Stocklösung (10 mg/ml)	500 μ g
ST: Poolserum	1:100
AP-Antikörper: goat α -mouse IgG2a-AP, human adsorbed	1:1000
Ovalbumin spezifischer IgE ELISA	
Coating: Ovalbumin-Stocklösung (10 mg/ml)	250 μ g
ST: Poolserum	1:10
AP-AK: rat α -mouse IgE-AP (Clone 23G3)	1:1000

Tabelle 2: Angaben der verwendeten Antikörper (AK), Standards (ST) bzw. Poolsera und den eingesetzten Verdünnungen für die Gesamt- und Spezifischen-ELISA.

	Verdünnung der Sera d14, d21, d28	Verdünnung der Sera d0, d7
Gesamt IgG1 ELISA	1:3000	1:3000
Gesamt IgG2a ELISA	1:100	1:3000
Gesamt IgE ELISA	1:20	1:20
Ovalbumin spezifischer IgG1 ELISA	1:3000	1:3000
Ovalbumin spezifischer IgG2a ELISA	1:100	1:3000
Ovalbumin spezifischer IgE ELISA	1:10	1:10

Tabelle 3: Angaben zu den Sera-, die bei Gesamt- und Spezifischen-ELISA verwendet wurden.

- Auftragen der Standards:

Im Weiteren wurden 75 µl der Standards (IgE, IgG1 und IgG2a) in B2, B3 und B11 pipettiert (siehe Abbildung 14). Reihe B11 stellt die Kontrollreihe dar, in der 75 µl der entsprechenden Standard-Verdünnung zugegeben wird.

- Auftragen der Zellkulturüberstände:

75 µl der unverdünnten Proben-Zellkultur-Überstände wurden in die Wells B4, B5; B6, B7, B8, B9, B10 und wenn möglich als Doppelwert aufgetragen.

- Auftragen der Sera:

75 µl der verdünnten Sera wurden in die Wells B4, B5; B6, B7, B8, B9, B10 und wenn möglich als Doppelwert aufgetragen.

Die Verdünnungsreihen wurde derart erreicht, indem 25 µl aus der ersten Reihe mit einer Multikanalpipette herausgenommen wurden und in die nächste darunterliegende Reihe zugegeben wurden (siehe Abbildung 14). Ein mehrmaliges Auf-und-Ab-Pipettieren diente zur Vermischung der Lösungen. Dabei wurde der Pipettierschritt bis zum Erreichen der letzten Reihe wiederholt und die restlichen 25 µl verworfen. Am Ende wurden die ELISA-Platten über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert.

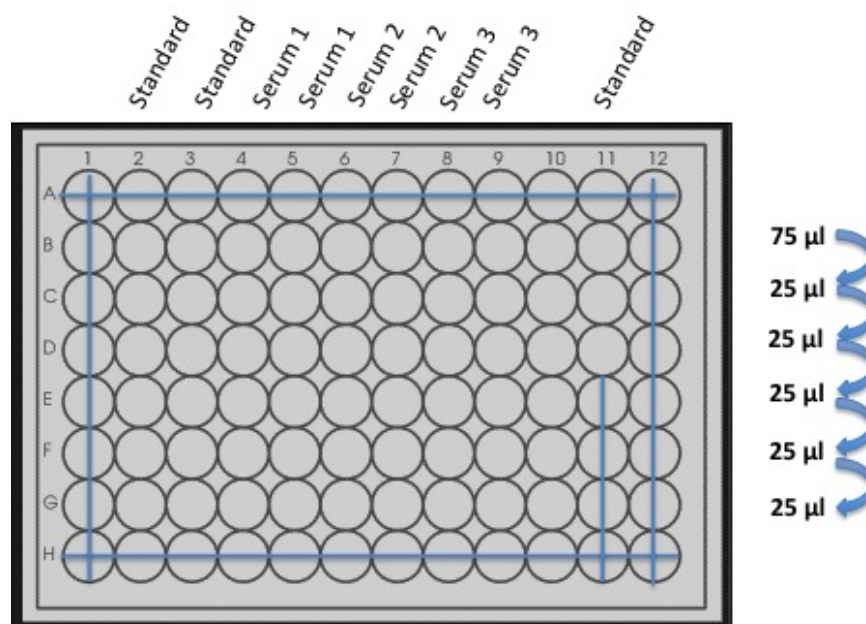


Abbildung 14: In die Reihe B werden die jeweiligen Standardverdünnungen, Überstände oder verdünnten Sera pipettiert. Dann erfolgt eine 1:3 Verdünnung von Reihe zu Reihe, indem aus Reihe B 25 µl in die nächste Reihe überführt werden. Aus Reihe C werden abermals 25 µl in die nächste Reihe überführt, usw.

4.3.1.1.4. Entwicklung des ELISA

Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe des AP(Alkalische Phosphatase)-gekoppelten Sekundärantikörpers, der 1:1000 in Antikörper-Verdünnungs-Puffer verdünnt wurde. Mit Ausnahme von B11, C11 und D11 (2. Kontrolle) wurden in jedes Well 50 µl der entsprechenden Sekundär-Antikörper-Verdünnung pipettiert (siehe Abbildung 15). Die Inkubation konnte folglich über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT durchgeführt werden.

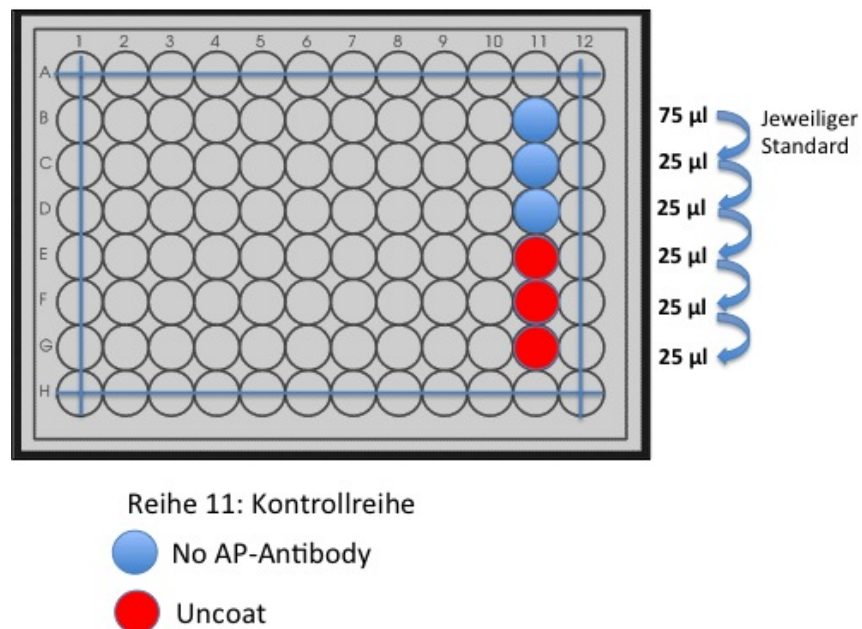


Abbildung 15: E11, F11 und G11 werden nicht gecoated, wobei in B11, C11 und D11 kein AP-gekoppelter Antikörper zugegeben wird. In B11 wird der jeweilige verwendete Standard pipettiert und in einer 1:3 Verdünnung vertikal weiterverdünnt.

Im nächsten Schritt wurde zunächst dreimal gewaschen, um ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Danach wurden zur Detektion 50 µl in jedes „Well“ des auf Raumtemperatur erwärmten Substrats (1 Tablette Sigma 104 Phosphatase Substrat in 100 ml Diethanolamin-Puffer) zugegeben. Die Zugabe des Substrates sorgt für eine katalytische Reaktion durch die alkalische Phosphatase, wonach ein Farbumschlag entsteht, dessen Intensität von der IgE-, IgG2a- bzw. IgG1-Konzentration der Probe abhängig ist. Parallel wurde immer eine Standardreihe mit IgE, IgG2a und IgG1 mitgeführt. Abhängig von dem nachzuweisenden Ig-Isotyp-Gehalt wurde zwischen 2 min und 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Diesbezüglich wurden im Abstand von einigen Minuten mehrere Messungen pro Platte durchgeführt, bis eine gelbliche Farbsättigung verzeichnet werden konnte. Die Messung der Extinktion bzw. der Proteinkonzentration erfolgt im ELISA-Reader (ELISA measurementSpectra (SLT)).

Bei der Auswertung wurde eine zweifache Messung (Dualmessung) in einem SLT Spectra Reader Version 1.1 X (Mikrotiterplattenphotometer von SLT/Tecan) durchgeführt. Es wurde die Absorption bei 404 nm und 492 nm gelesen. Die Untersuchung wurde via der Software Delta Soft 3-1.575 Alias analysiert. Bei allen Gesamt-AK-Ergebnissen wurde zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Erstellung von Diagrammen das Excel-Software-Programm verwendet.

4.3.2. Immunisierungsschema

Folgende Bestandteile wurden zur Herstellung einer Immunisierungslösung im Verhältnis von 1:1:2 in einem 15 ml-Greiner-Röhrchen vereint (ausreichend für 40 Injektionen):

- 400 µl PBS
- 400 µl OVA-Verdünnung (1:1000)
- 800 µl Alum

Nach einer 1stündigen Inkubationszeit bei RT wurden 10 ml PBS zugegeben. Innerhalb dieses Zeitraums adsorbiert Ovalbumin an das Aluminium-Hydroxid-Gel,

das für eine Verzögerung der Resorption des Antigens sorgt und somit zu einer Verstärkung der Immunantwort beiträgt. Es wurde dann bei 5000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in ein adäquates Volumen PBS gelöst. Dabei wurden 100 µl (10 µg Ovalbumin) für jede Injektion eingerechnet, das bei 40 Injektionen ein Volumen von 4 ml PBS ausmachte. Eine wöchentliche Immunisierung mit 100 µl des adsorbierten Impfstoffes subkutan und intraperitoneal sollte die Untersuchung einer veränderten Immunreaktion im Hax1^{-/-}-Mausstammes im Vergleich zum WT ermöglichen.

Am Tag 0 wurde nur eine Immunisierung im subkutanen Bereich durchgeführt, während an den restlichen Immunisierungs-Tagen entsprechend dem Immunisierungsschema zusätzlich eine intraperitoneale Immunisierung vorgenommen wurde.

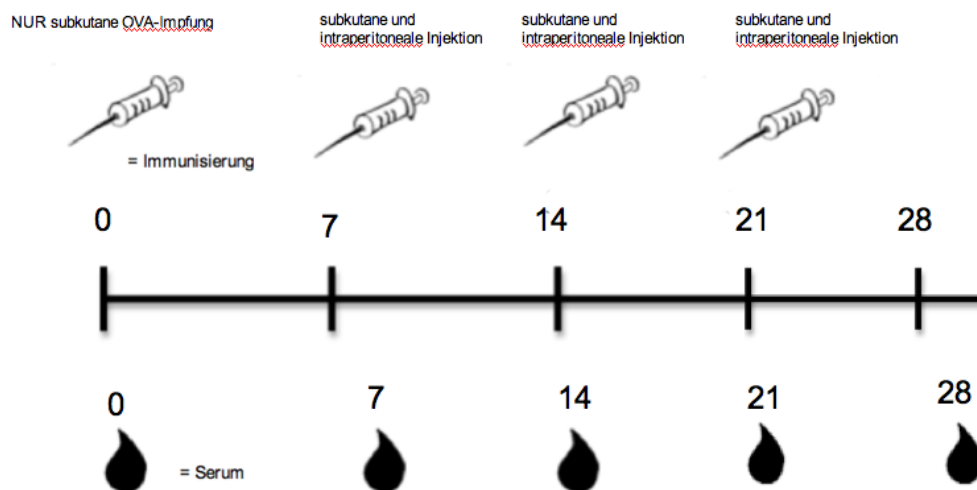


Abbildung 16: Immunisierungs-Schema mit Ovalbumin und Blutentnahme-Verzeichnis. Zur Vermeidung von Stress für die Mäuse wurde die Blutentnahme am darauffolgenden Tag der Immunisierung durchgeführt.

4.3.3. Serumgewinnung

Die Blutentnahme wurde jeweils einen Tag versetzt nach der OVA-Immunisierung vorgenommen. Durch eine Punktion der Schwanzvene einer Maus wurde ca. 100 µl Blut in einem 1,5 ml-Eppendorf-Tube gesammelt. Die Blut-Proben wurden anschließend für 1 h bei 37°C auf dem Thermal Cycler inkubiert und sodann für 15 min bei 14.000 rpm bei RT zentrifugiert. Die Sera enthalten die Antikörper, die sich durch die Zentrifugation von den zellulären Blutbestandteilen abtrennen. Die Sera wurden sodann abgehoben, in ein neues Tube überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Es wurde mit dem ELISA-Assay fortgefahren (siehe 4.3.1.).

4.3.4. ELISpot (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Die Methode des Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay wurde verwendet, um B-Zellen, die antigen-spezifische Antikörper (IgG1 und IgE) sekretieren zu detektieren. Es kann aber auch ein Status der Plasmazellen eines bestimmten Immunglobulin (z.B. IgG1) erstellt werden. Im Gegensatz zum ELISA, wo ein Nachweis von sekretierten Immunglobulinen (in ng/ml) stattfindet, werden beim ELISpot einzelne Plasmazellen sichtbar gemacht.

In dieser Arbeit wurde der ELISpot zum Nachweis der gesamten IgG1- und IgE-Plasmazellen als auch der OVA-spezifischen IgG1- und IgE-Plasmazellen eingesetzt, wobei der 1. ELISpot am Tag 35, der 2. ELISpot am Tag 37 und der 3. ELISpot am Tag 42 der Immunisierung durchgeführt wurde. Die letzte Immunisierung erfolgte am Tag 28.

Es erfolgte eine Zellpräparation aus der Milz (siehe 4.1.1.2.) und dem Knochenmark (siehe 4.1.1.) von OVA-immunisierten WT und Hax1^{-/-} Mäusen mit anschließender Erythrozytenlyse. Die Knochenmarkszellen als auch die Splenozyten wurden mit 2 ml Pharmlyse für 2 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde mit 10 ml PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann für 5 min bei 300x g bei 4°C zentrifugiert und der

Überstand abgehoben. Daraufhin wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Gesamtzellzahl via Casy® (1:4000-Verdünnung) bestimmt. Es wurde mit den regulären Arbeitsschritten des ELISpots fortgefahren.

4.3.4.1. Schema des ELISpot:

1. Coating
2. Blocken
3. Inkubation der Zellen
4. Inkubation mit dem AP-gekoppelten Antikörper
5. Farbreaktion

4.3.4.1.1. Coating des ELISpots

Das Coaten für den Gesamt-IgG1 bzw. Gesamt-IgE ELISpot erfolgte gänzlich analog zum ELISA. Es wurden dafür auch dieselben Antikörper benutzt (siehe Tabelle 2). In jedes „Well“ wurden 50 µl Coating-Verdünnung gefüllt, was pro Vertiefung einer Ig-Konzentration von 50 ng/µl entspricht. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT.

Zur Bestimmung der OVA-spezifischen Anzahl an IgG1/IgE-produzierenden Plasmazellen wurde zunächst eine OVA-Verdünnung hergestellt. Dabei wurden 60 mg in 600 µl PBS gelöst, um dann 60 µl von diesem OVA-Stock mit 6 ml PBS zu verdünnen. Danach wurden 50 µl der 1:1000-OVA-Verdünnung mit der Eppendorf Multipipette plus in jedes „Well“ pipettiert und über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert.

4.3.4.1.2. Blocken

Durch Zugabe von 100 µl Blocking-Puffer (enthält 1% BSA) wurden die freien Bindungsstellen abgesättigt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 2h bei RT. Die Platte wurde mit Hilfe der Finnpipette (Multikanalpipette) gewaschen. Dabei wurde dreimal mit einem Volumen von 200 µl 1x PBS/0,01 % TWEEN-

Waschpuffer gewaschen und im Anschluss zwischenzeitlich jedes Mal kräftig auf Papiertüchern ausgeklopft.

4.3.4.1.3. Inkubation der Zellen

Für die Inkubation mit der Zellsuspension wurden mit Ausnahme der ersten Reihe 100 µl A20-Medium via Finnpiptette (Multikanalpipette) vorgelegt. In die erste Reihe wurden dann 200 µl der jeweiligen zu untersuchenden Zellsuspension in die entsprechend-beschrifteten Wells pipettiert. In der Folge wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diesbezüglich wurden 100 µl der Zellsuspension von der 1. Reihe in die darunter liegende 2. Reihe pipettiert. Dieser Schritte wurde bis zum Erreichen der letzten Reihe reihenweise wiederholt und abschließend die restlichen 100 µl verworfen (siehe Abbildung 17). Es wurden dann die Platten über Nacht bei 37°C bei 7% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

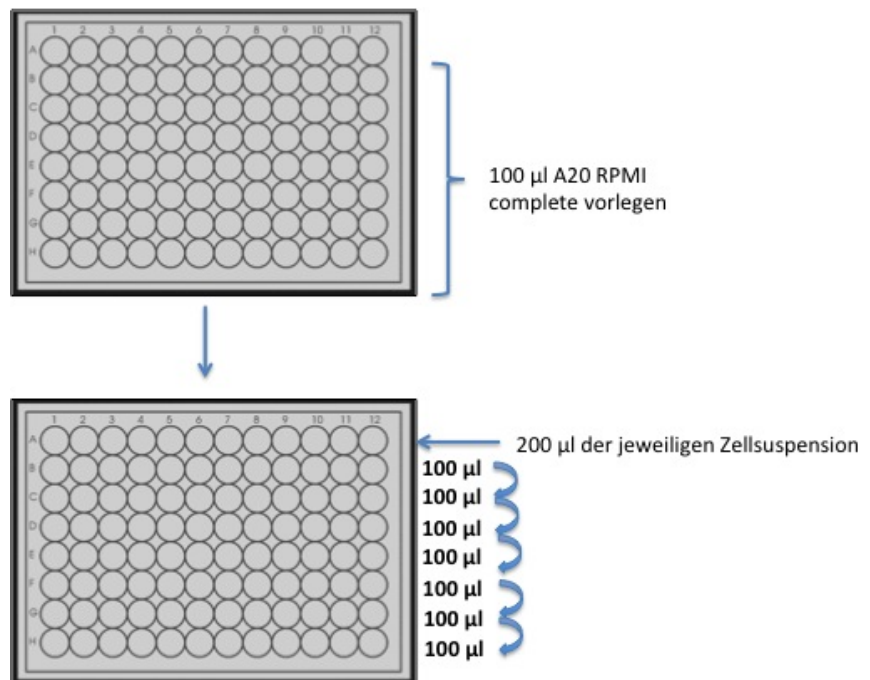


Abbildung 17: Arbeitsschema des ELISpots

Am Folgetag wurde die Platte erneut mit Hilfe der Finnpiquette (Multikanalpipette) dreimal mit 200 µl ELISpot-Waschpuffer (1x PBS/0,01 % TWEEN-Waschlösung) gewaschen. Zwischenzeitlich wurde die Platte wieder kräftig auf Papiertüchern ausgeklopft.

4.3.4.1.4. Inkubation mit dem AP-gekoppelten Antikörper

Es folgte analog dem ELISA (siehe Tabelle 2) die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären AP-gekoppelten Antikörper. Mit einer „Eppendorf Multipipette plus“ wurden 50 µl der verdünnten sekundären Antikörper-Lösungen (IgG1/IgE) in jedes Well pipettiert und über Nacht bei 4°C (mindestens 1 h bei RT) inkubiert.

4.3.4.1.5. Farbreaktion

Im Anschluss erfolgte ein neuerlicher Waschschrift. Danach wurde eine Farbreaktion mit NBT-BCIP erzielt. Hierfür wurde eine Entwickler-Lösung hergestellt. Dabei wurde 1 Tablette NB-BCIP (Roche, Ref 1697471) in 10 ml QD bei RT gelöst. Mit der Eppendorf Multipipette plus wurden 50 µl in jedes Well pipettiert. Bei diesem Pipettierschrift wurde darauf geachtet, dass mit den unteren Wells begonnen wurde. Bei Verwendung der Finnpiquette (Multikanalpipette) wurde die Reaktion dann durch Zugabe von 200 µl Milliporewasser je Well gestoppt. Der Überstand wurde entfernt und noch zweimal mit Milliporewasser gewaschen, um ein nachträgliches Färben zu verhindern. Am Ende wurden die Platten für etwa 30 min bei 37°C im Inkubator getrocknet.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Wells einer jeden Multiscreen HTS Filterplatten (96 Well-Platte) ausgestanzt, aufgeklebt und eingescannt (Auflösung 600 dpi). Jeder Spot eines Wells repräsentiert eine Isotyp-produzierende Plasmazelle. Durch die Bestimmung der eingesetzten Zellzahl (ausgehend von der Gesamtzellzahl) und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung kann nun die Anzahl der Plasmazellen auf das gesamte Organ (Milz oder Knochenmark) ermittelt werden.

5. Ergebnisse

5.1. HAX1-Knockout beeinflusst die Immunglobulin-Expression

Mittels ELISA-Messungen wurde der Einfluss des HAX1-Verlustes auf die Immunglobulinproduktion IgG1, IgG2a und IgE untersucht.

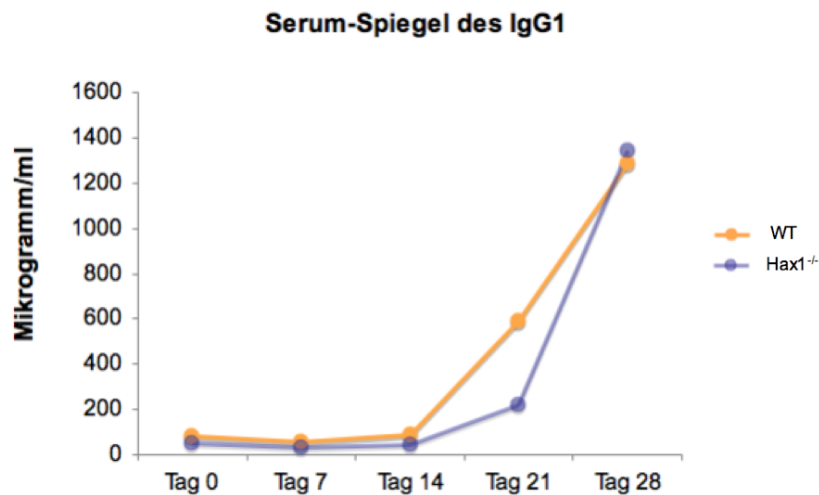
5.1.1. Der Verlust des HAX1 Proteins bewirkte ein verringerte Immunantwort nach einer Immunisierung

Zur Untersuchung einer eventuell durch die HAX1-Deletion veränderten Immunreaktion wurden die Hax1^{-/-} und WT-Stämme jeweils im Abstand von einer Woche insgesamt vier Mal mit OVA immunisiert. Wie im Immunisierungsschema unter Punkt 4.3.2. beschrieben, wurde zusätzlich zu der wöchentlichen OVA-Immunisierung am Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 eine Blutprobe von den beiden Mausstämmen entnommen. Im Blutserum (Herstellung beschrieben unter Punkt 4.3.3.) wurde jeweils der Gesamt-Serum-Spiegel von IgG1, IgG2a und IgE, sowie der OVA-spezifische IgG1-, IgG2a- und IgE-Titer gemessen. Für die im Folgenden dargestellten Graphen wurden die Mittelwerte von den immunisierten Mausstämmen herangezogen. Während der Immunisierung starben einige Mäuse, sodass für die Analyse nur drei Hax1^{-/-} und vier WT-Mäuse herangezogen werden konnten. Die hohe Sterblichkeit der Hax1^{-/-}-Mäuse wird durch ihre kurze Lebenserwartung und der geringer körperlichen Robustheit begründet.

Der Gesamt-Serum-Spiegel an IgG1 der Hax1^{-/-} und WT-Mäuse zeigte keine signifikanten Unterschiede an den jeweiligen Immunisierungstagen (Abbildung 18 A). Hinsichtlich des OVA-spezifischem IgG1, das ausschließlich am Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nachzuweisen war, war der gemessene IgG1-Titer der WT-Maus nicht wesentlich höher, als im Vergleich zu den Hax1^{-/-}-Mäusen (Abbildung 18 B).

Dennoch ist eine moderate Reduktion des gesamten IgG1- und OVA-spezifischen IgG1-Spiegels in $Hax1^{-/-}$ -Mäusen erkennbar.

(A)



(B)

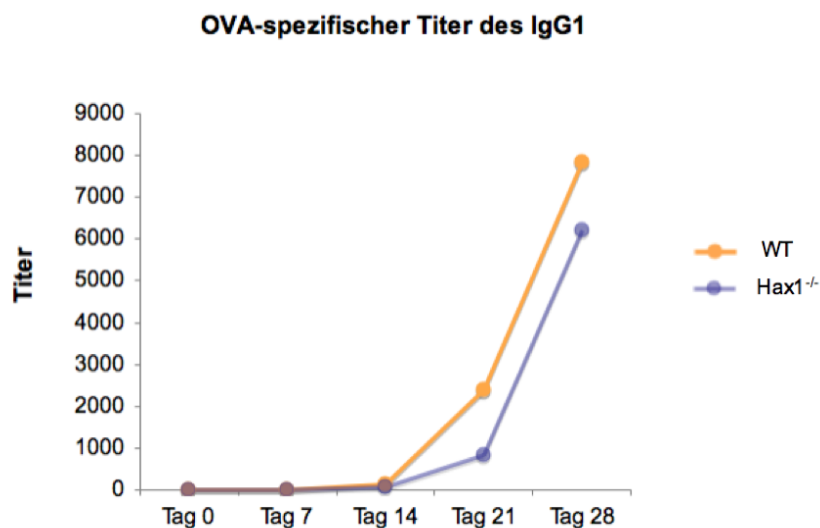
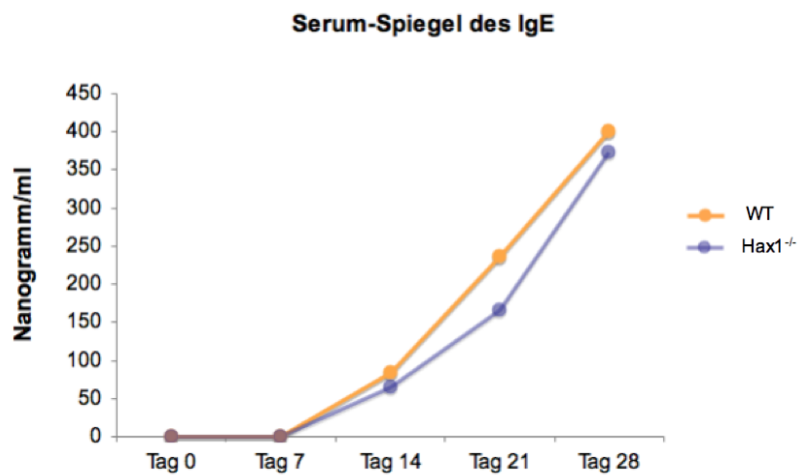


Abbildung 18: IgG1-Serum-Spiegel und OVA-spezifischer IgG1 Titer von immunisierten $Hax1^{-/-}$ - und WT-Mäusen. (A) Die orange-gefärbte Graphenlinie der WT-Maus zeigt eine geringfügig höhere Verlaufslage, als vergleichsweise der blaue Graph der $Hax1^{-/-}$ -Maus. (B) Lediglich am Tag 14, Tag 21 und Tag 28 konnte OVA-spezifisches IgG1 ermittelt werden.

Zusätzlich wurde auch der totale und der spezifische IgE-Gehalt festgestellt. Die Messungen zeigten zwar keine statistische Signifikanz (Tag 14: pValue 0,6152,

Tag 21: pValue 0,4049, Tag 28: pValue 0,8066) zwischen den immunisierten Hax1^{-/-}- und WT-Mausstämmen, dennoch ist ein reduzierter IgE-Serum-Spiegel in Hax1^{-/-}-Mäusen erkennbar (Abbildung 19, A und B).

(A)



(B)

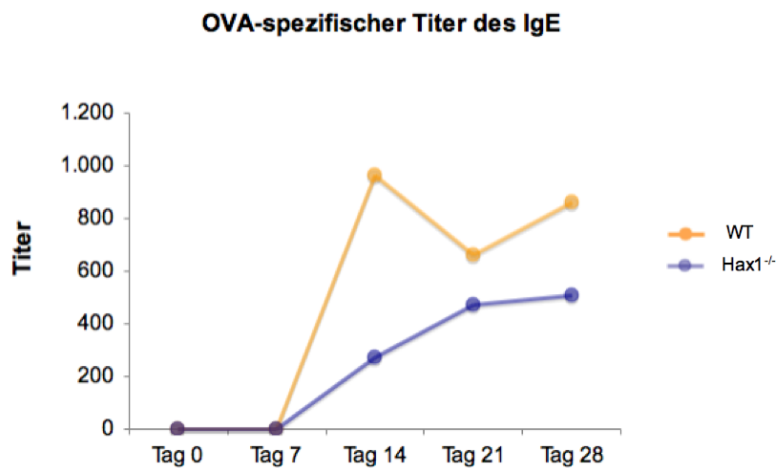
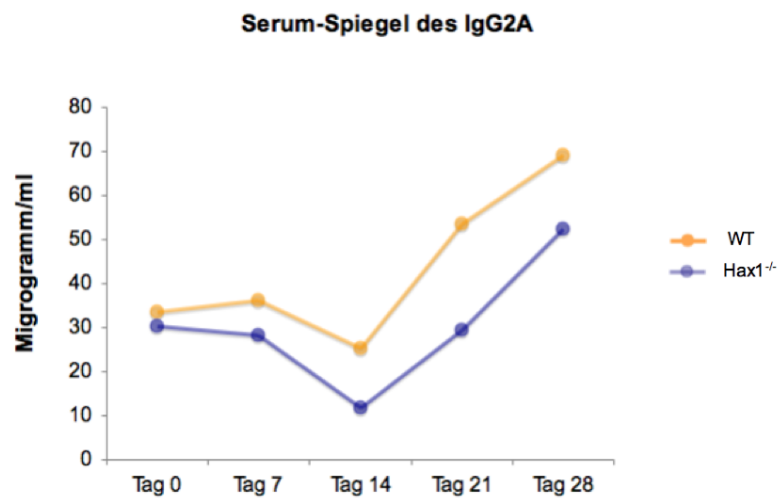


Abbildung 19: Gesamt-Serum-Spiegel des IgE und der OVA-spezifische IgE-Titer von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen wurde untersucht. (A) Bestimmung des gesamten Serum-IgE-Spiegels in Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen. (B) Vergleich des OVA-spezifischen IgE-Titers zwischen den beiden Mausstämmen. OVA-spezifisches IgE war ausschließlich an den Tagen 14, 21 und 28 nachweisbar.

Die Ergebnisse der IgG2a-Nachweisversuche zeigten tendenziell erniedrigte Werte in Hax1^{-/-}-Mäusen an (Abbildung 20, A und B). Dies war für den gesamten IgG2a- als auch den spezifischen IgG2a-Spiegel erkennbar. OVA-spezifisches IgG2a konnte, im Gegensatz zum IgG2a-Gesamt-Serum, lediglich am Tag 21 und Tag 28 nachgewiesen werden.

(A)



(B)

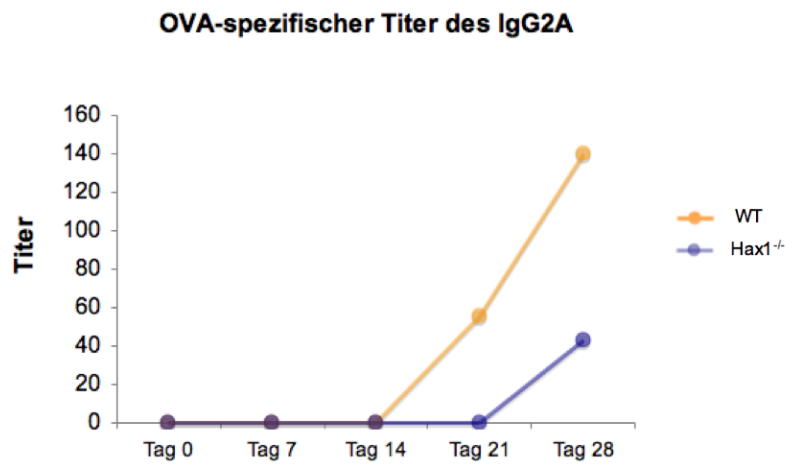


Abbildung 20: Analyse des Gesamt-Serum-Spiegels des IgG2a und des OVA-spezifischen IgG2a-Titers von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen. (A) Vergleich des gesamten IgG2a Serum-Spiegel zwischen den Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen. (B) OVA-spezifische IgG2a-Titer von beiden Mausstämmen wurde ermittelt.

Anhand der ELISA-Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich die HAX1-Deletion sowohl auf die Produktion der Gesamt-Serum-Immunglobuline als auch auf die spezifische Immunantwort gegen Ovalbumin auswirkt. Insgesamt ist eine langsamere und auch verringerte Immunantwort erkennbar.

5.2. Hax1^{-/-}-defiziente Mäuse zeigen ein verändertes Gedächtnis nach einer OVA-Immunisierung

5.2.1. Der Verlust von HAX1 führt zu einer erhöhten Bildung von IgG1 und IgE sekretierenden Zellen in der Milz als auch im Knochenmark

Der ELISpot unterscheidet sich vom ELISA dadurch, dass anstelle der Seren Zellsuspensionen, z.B. des Knochenmarks und der Milz, aufgetragen werden und außerdem erfolgt beim ELISpot kein generalisierter Farbumschlag. Die sekretierten Antikörper der Plasmablasten und Plasmazellen bleiben durch den Coating-Antikörper lokal und punktuell an der Membran fixiert. Die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers bildet mit dem Substrat (BCIP) ein Präzipitat, welches punktuell zu einer Färbung der Membran führt. Man kann daher davon ausgehen, dass ein Spot einer antikörpersekretierenden Zelle entspricht.

Um eventuelle Veränderungen in der Immunantwort, verursacht durch die HAX1-Deletion zu untersuchen, wurde zu bestimmten Zeitpunkten nach der OVA-Immunisierung ein ELISpot-Assay durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Immunreaktion einer OVA-immunisierten WT-Maus als Referenzwert einer normal verlaufenden Immunantwort herangezogen. Im Folgenden wurden Vergleiche der gesamten IgG1-, IgE- und OVA-spezifischen IgG1-, IgE-produzierenden Plasmazellen sowohl aus der Milz, als auch aus dem Knochenmark angestellt und durch ein Punktediagramm dargestellt.

Es wurde bei jedem der drei durchgeführten ELISpots, die am Tag 35, Tag 37 und Tag 42 nach der Immunisierung erfolgten, jeweils eine immunisierte Kontroll-WT- mit einer immunisierten Hax1^{-/-}-Maus verglichen. Hierfür wurde vor Durchführung jedes ELISpots die Gesamtzellzahl des jeweiligen Organs (Milz und Knochenmark) mit der Casy®-Zellzählung bestimmt. Die ermittelte Gesamtzellzahl wurde als 100% angenommen. Die Zellen wurden sodann in vier Teile aufgeteilt und jeweils für die Detektion der Gesamt-IgG1-, Gesamt-IgE-, OVA-spezifischen IgG1- und OVA-spezifischen IgE-produzierenden Plasmazellen herangezogen. Bei der Analyse des ELISpots wurde im Folgenden die jeweilige Plasmazellzahl eines Organs als Prozentsatz der Gesamtzellzahl dargestellt. Es wurde der Wert jedes auszählbaren Wells ermittelt und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus den derart erhaltenen Werten der auszählbaren Wells wurde ein Mittelwert errechnet, der dann zur Ermittlung des prozentuellen Anteils der Zellen (Gesamt-IgG1, Gesamt-IgE, OVA-spezifisches-IgG1, OVA-spezifisches-IgE) pro Organ (Knochenmark oder Milz) herangezogen wurde (Tabelle 4, A; Tabelle 5, A; Tabelle 6, A; Tabelle 7, A).

Bei der Auswertung der drei ELISpots wurden folgende Ergebnisse herausgefunden:

1. IgG1

Gesamt-IgG1 Tag 35:

Sowohl im Knochenmark als auch in der Milz war die Anzahl der gesamten IgG1-Plasmazellen zwischen den Mausstämmen vergleichbar und eine Veränderung der Immunantwort war zu diesem Stadium nicht zu bemerken (Abbildung 21; 1. ELISpot; Tabelle 4, A).

Gesamt-IgG1 Tag 37:

Die Anzahl der Zellen des WT übertraf bei Weitem den Gehalt der Zellen in der Hax1^{-/-}-Milz. Allerdings war im Knochenmark eine leichte Erhöhung bemerkbar (Abbildung 21; 2. ELISpot und Abbildung 22; Tabelle 4, A).

Gesamt-IgG1 Tag 42:

Am Tag 42 wies nun die Hax1^{-/-}-Maus im Knochenmark einen deutlich erhöhten Spiegel an IgG1-sezernierenden Plasmazellen auf, wobei nun die Anzahl in der Milz auf ein zwischen den Mausstämmen vergleichbaren niedrigen Wert zurückfiel (Abbildung 21; 3. ELISpot; Tabelle 4, A).

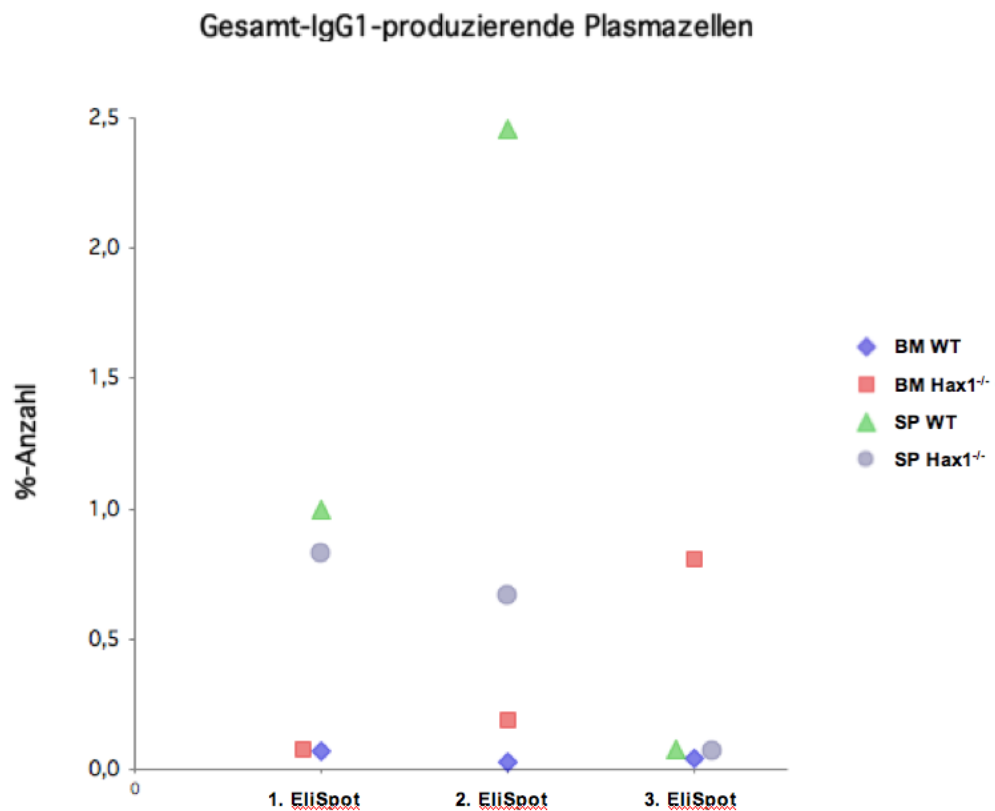


Abbildung 21: Verlauf der Gesamt-IgG1-produzierenden Plasmazellen (1. ELISpot = Tag 35; 2. ELISpot = Tag 42; 3. ELISpot = Tag 47)

Gesamt-IgG1 Knochenmark

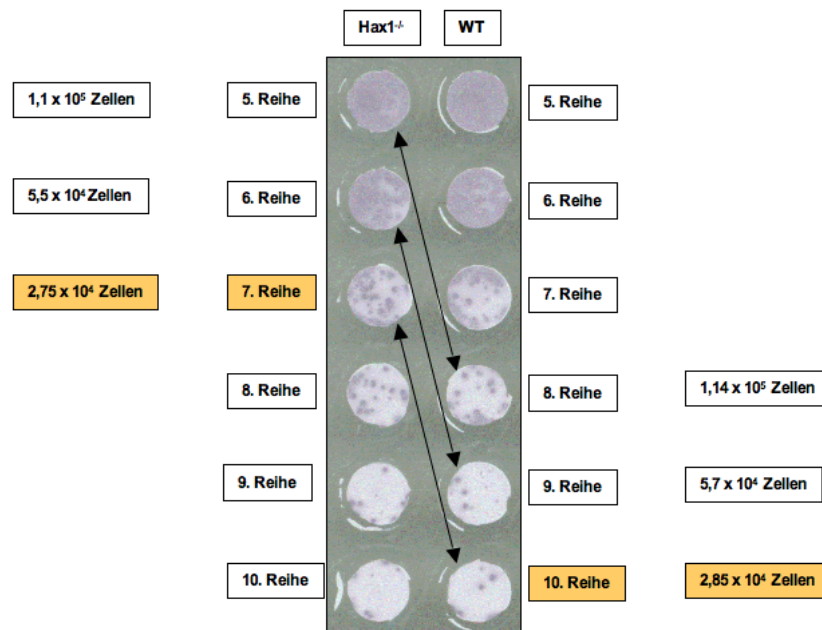


Abbildung 22: Auszug aus dem **2. ELISpot Gesamt-IgG1 Knochenmark**; aufgrund der unterschiedlichen Zellzahl sind die mit Pfeilen verbundenen Wells miteinander zu vergleichen. Die Gesamtzellzahl an Gesamt-IgG1-produzierenden Plasmazellen wurde durch Multiplikation der jeweiligen Verdünnung in dieser Reihe (WT: 10. Reihe: 4096-fache Verdünnung ergibt ~ 28.700 Gesamt-IgG1-produzierende PZ; Hax1^{-/-}: 7. Reihe: 512-fache Verdünnung ergibt ~ 20.500 Gesamt-IgG1-produzierende PZ) errechnet.

(A)

1. ELISpot (Tag 35) - Gesamt-IgG1				
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM	WT Milz	Hax1 ^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,46 x 10 ⁷	1,74 x 10 ⁷	1,43 x 10 ⁸	8,49 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	10.906	12.581	392.640	704.512
%-Zahl von Gesamt-IgG1-produzierenden PZ	0,0727	0,0740	0,9947	0,8288
2. ELISpot (Tag 37) - Gesamt-IgG1				
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM	WT Milz	Hax1 ^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,15 x 10 ⁸	1,41 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁷	3,76 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	29.696	26.829	491.520	253.952
%-Zahl von Gesamt-IgG1-produzierenden PZ	0,0270	0,1916	2,4576	0,6683
3. ELISpot (Tag 42) - Gesamt-IgG1				
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM	WT Milz	Hax1 ^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	2,18 x 10 ⁷	2,06 x 10 ⁷	8,8 x 10 ⁷	5,38 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	163	947	13.328	10.368
%-Zahl von Gesamt-IgG1-produzierenden PZ	0,0007	0,0047	0,0152	0,0192

(B)

Gesamt-IgG1 (Tag 37)		
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM
ausgezählte Spots	7	40
IgG1-positive Zellen	28672	20480

Tabelle 4: (A) Angaben der via Casy® bestimmten Gesamtzellzahlen, der Mittelwerte der Plasmazellen der auszählbaren Wells und die prozentuellen Anteile der Gesamt-IgG1-produzierenden Plasmazellen des Knochenmarks und der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Maus (1. ELISpot, 2. ELISpot, 3. ELISpot). (B) Aufzählung der Zahlenwerte der ausgezählten Spots und der Gesamt-IgG1-produzierenden Plasmazellen des Knochenmarks von WT- und Hax1^{-/-}-Maus.

Die erhobene Anzahl von Gesamt-IgG1-positiven Zellen wurde in Relation zur via Casy® bestimmten Gesamtzellzahl gestellt, die im Diagramm (Abbildung 21) ersichtlich ist.

OVA-spezifisches IgG1 Tag 35:

Wie bei der Bildung der Gesamt-IgG1-produzierenden Plasmazellen ist auch bei der Bildung der OVA-spezifischen Plasmazellen zu diesem frühen Stadium der Immunisierung, sowohl in der Milz als auch im Knochenmark zwischen den Mausstämmen kein Unterschied ersichtlich (Abbildung 23; 1. ELISpot; Tabelle 5, A).

OVA-spezifisches IgG1 Tag 37:

Die erhöhte Anzahl an Gesamt-IgG1-produzierenden Plasmazellen in der Milz der WT-Maus spiegelte sich auch in der erhöhten Anzahl an OVA-spezifischen Zellen im Vergleich zur Hax1^{-/-}-Maus wieder (Abbildung 23; 2. ELISpot; Tabelle 5, A). Die Menge im Knochenmark hingegen zeigt in der Hax1^{-/-}-Maus eine minimale Erhöhung (Abbildung 24).

OVA-spezifisches IgG1 Tag 42:

Die erhaltenen Werte an OVA-spezifischen Plasmazellen fiel auf einem vergleichbaren Tiefpunkt in der Milz und im Knochenmark zurück (Abbildung 23; 3. ELISpot; Tabelle 5, A).

OVA-spezifische IgG1-produzierende Plasmazellen

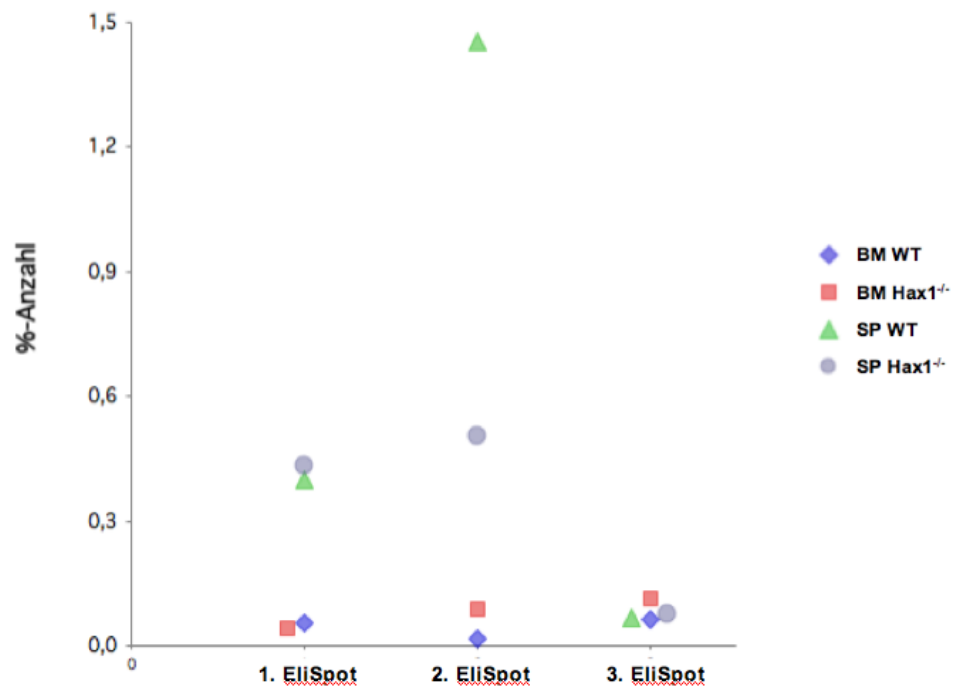


Abbildung 23: Verlauf der OVA-IgG1-produzierenden Plasmazellen (1. ELISpot = Tag 35, 2. ELISpot = Tag 42, 3. ELISpot = Tag 47)

OVA-spezifisches IgG1 Knochenmark

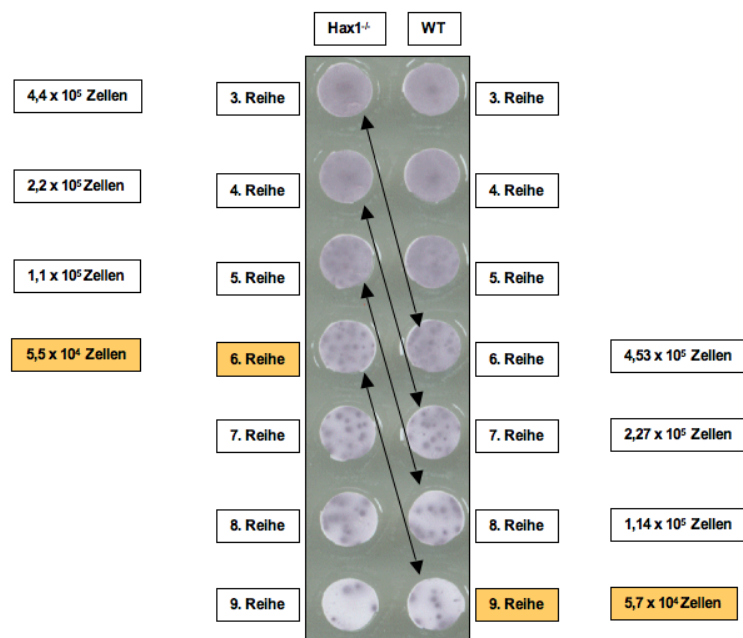


Abbildung 24: Auszug aus dem **2. ELISpot: OVA-spezifisches IgG1 im Knochenmark:** Der Ausschnitt aus dem 2. ELISpot lässt eine erhöhte Produktion von OVA-spezifischen IgG1-produzierenden Plasmazellen im Knochenmark der Hax1^{-/-}-Maus erkennen. Die Pfeile signalisieren eine ähnlich eingesetzte Zellzahl in diesen Wells, die entsprechend zu vergleichen sind. In der 9. Reihe (2048-fache Verdünnung) der WT-Maus sind 7 Spots, während in der 6. Reihe (256-fache Verdünnung) der Hax1^{-/-}-Maus 26 Punkte ausgezählt worden sind. Durch Hochrechnung mit der entsprechenden Verdünnung ergaben sich für die Hax1^{-/-}-Maus ~ 6.700 PZ und für die WT-Maus ~ 14.300 PZ.

(A)

1. ELISpot (Tag 35) - OVA-spez.-IgG1				
	WT KM	Hax1^{-/-} KM	WT Milz	Hax1^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,46 x 10 ⁷	1,74 x 10 ⁷	1,43 x 10 ⁸	8,49 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	7.979	7.296	557.056	368.640
%-Zahl von OVA-spezifischen IgG1-PZ	0,0532	0,0429	0,3979	0,4337
2. ELISpot (Tag 37) - OVA-spez.-IgG1				
	WT KM	Hax1^{-/-} KM	WT Milz	Hax1^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,15 x 10 ⁸	1,41 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁷	3,76 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	18.048	12.203	290.816	191.147
%-Zahl von OVA-spezifischen IgG1-PZ	0,0164	0,0872	1,4542	0,5030
3. ELISpot (Tag 42) - OVA-spez.-IgG1				
	WT KM	Hax1^{-/-} KM	WT Milz	Hax1^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	2,18 x 10 ⁷	2,06 x 10 ⁷	8,8 x 10 ⁷	5,38 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	14.131	23.040	57.856	40.960
%-Zahl von OVA-spezifischen IgG1-PZ	0,0642	0,1152	0,0658	0,0759

(B)

OVA-spezifisches IgG1 (Tag 37)		
	WT KM	Hax1^{-/-} KM
ausgezählte Spots	7	26
OVA-spezifische IgG1-Zellen	14336	6656

Tabelle 5: (A) Die via Casy® bestimmten Gesamtzellzahlen, die Mittelwerte der Plasmazellen der auszählbaren Wells und die Prozentzahlen der OVA-spezifischen IgG1-Plasmazellen des Knochenmarks und der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Maus sind in (A) angegeben (1. ELISpot, 2. ELISpot, 3. ELISpot). (B) Zahlenwerte der ausgezählten Spots und der OVA-spezifischen IgG1-produzierenden Plasmazellen des Knochenmarks von WT- und Hax1^{-/-}-Maus

Die erhobene Anzahl von OVA-spezifischen IgG1-produzierenden Plasmazellen wurde in Relation zur via Casy® bestimmten Gesamtzellzahl gestellt, die im Diagramm (Abbildung 23) ersichtlich ist.

Zusammenfassend kann erwähnt werden, dass in der Hax1^{-/-}-Maus eine tendenziell höhere IgG1-Gedächtniszellzahl im Knochenmark, in Rücksichtnahme auf die niedrige getestete Anzahl an Mäusen, erkennbar ist.

2. IgE

Gesamt-IgE Tag 35:

Die Anzahl der Gesamt-IgE-produzierenden Plasmazellen von beiden Stämmen ist sowohl in der Milz als auch im Knochenmark ähnlich und miteinander vergleichbar (Abbildung 25; 1. ELISpot; Tabelle 6, A).

Gesamt-IgE Tag 42:

Ähnlich wie beim Gesamt-IgG1-Gehalt ist auch der Gesamt-IgE-Gehalt in der Milz im WT höher als bei der Hax1^{-/-}-Maus. Die Zellzahl der Gesamt-IgE-Plasmazellen im Knochenmark ist vergleichbar niedrig (Abbildung 25; 2. ELISpot; Tabelle 6, A).

Gesamt-IgE Tag 47:

Es ist kein Unterschied in der Anzahl der gesamten IgE-produzierenden Plasmazellen in der Milz ersichtlich, hingegen ist eine minimale Erhöhung in der Hax1^{-/-}-Maus im Knochenmark bemerkbar (Abbildung 25; 3. ELISpot und Abbildung 26; Tabelle 6, A).

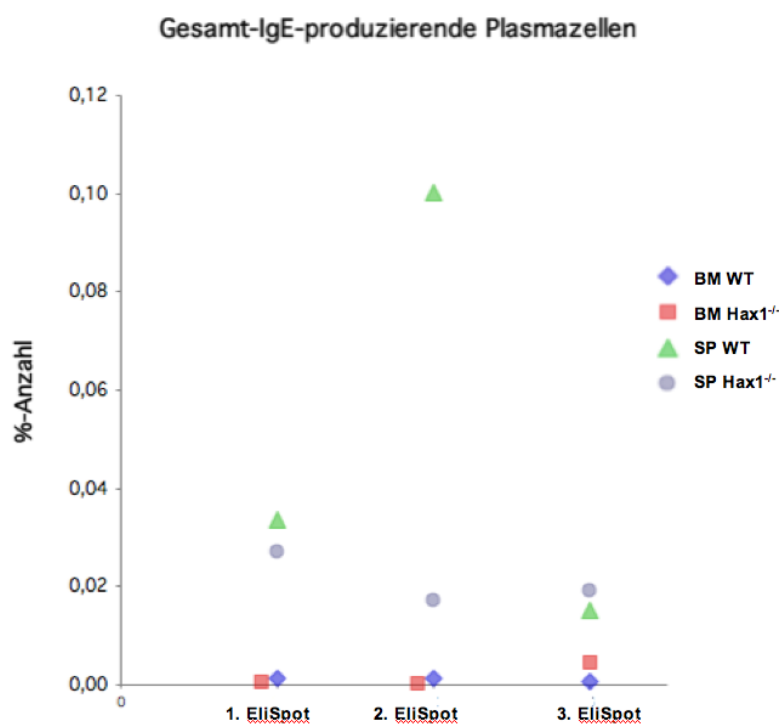


Abbildung 25: Verlauf der gesamten IgE-produzierenden Plasmazellen (1. ELISpot = Tag 35; 2. ELISpot = Tag 42; 3. ELISpot = Tag 47)

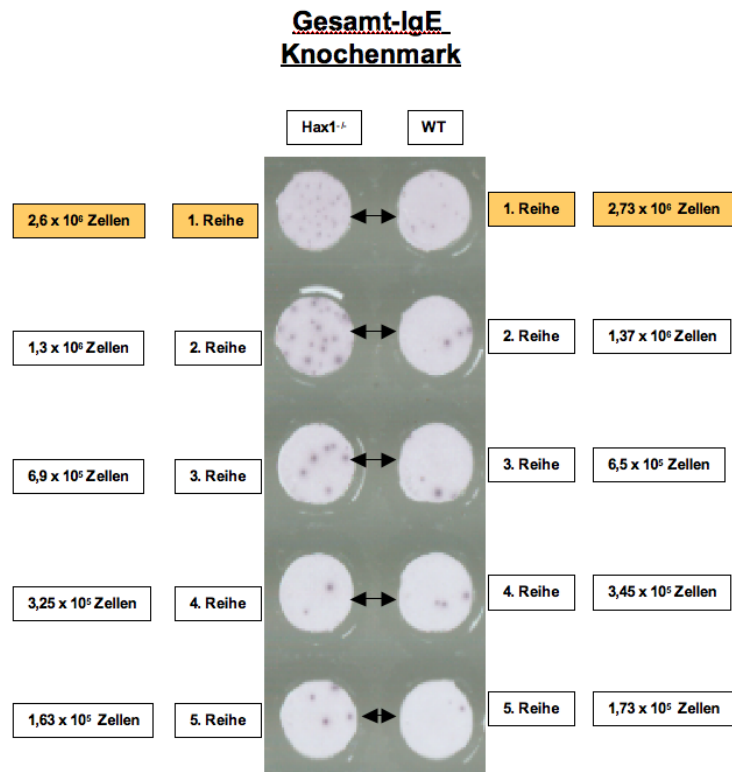


Abbildung 26: Auszug aus dem **3. ELISpot: Gesamt-IgE Knochenmark:**

Beim Vergleich der (8-fache Verdünnung) gegenüberliegenden Wells in der 1. Reihe ergeben sich bei der Hax1^{-/-}-Maus 280 Gesamt-IgE-produzierende PZ (35 ausgezählte Spots) und bei der WT-Maus ~ 100 Gesamt-IgE-produzierende PZ (12 ermittelte Punkte).

(A)

1. ELISpot (Tag 35) - Gesamt-IgE				
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM	WT Milz	Hax1 ^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,46 x 10 ⁷	1,74 x 10 ⁷	1,43 x 10 ⁸	8,49 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	158	86	46.885	22.894
%-Zahl von Gesamt-IgE-produzierenden PZ	0,0012	0,0005	0,0335	0,0269
2. ELISpot (Tag 37) - Gesamt-IgE				
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM	WT Milz	Hax1 ^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,15 x 10 ⁸	1,41 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁷	3,76 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	1.415	58	20.041	6.544
%-Zahl von Gesamt-IgE-produzierenden PZ	0,0013	0,0004	0,1002	0,0172
3. ELISpot (Tag 42) - Gesamt-IgE				
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM	WT Milz	Hax1 ^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	2,18 x 10 ⁷	2,06 x 10 ⁷	8,8 x 10 ⁷	5,38 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	163	947	13.328	10.368
%-Zahl von Gesamt-IgE-produzierenden PZ	0,0007	0,0047	0,0152	0,0192

(B)

Gesamt-IgE (Tag 42)		
	WT KM	Hax1 ^{-/-} KM
ausgezählte Spots	12	35
IgE-positive Zellen	96	280

Tabelle 6: In (A) sind die via Casy® bestimmten Gesamtzellzahlen, die Mittelwerte der Plasmazellen der auszählbaren Wells und die Prozentzahlen der OVA-spezifischen IgG1-Plasmazellen des Knochenmarks und der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Maus angegeben (1. ELISpot, 2. ELISpot, 3. ELISpot). (B) Zahlenwerte der ausgezählten Spots und der Gesamt-IgE-produzierenden Plasmazellen des Knochenmarks der WT- und der Hax1^{-/-}-Maus

Die erhobene Anzahl von Gesamt-IgE-positiven Zellen wurde in Relation zur via Casy® bestimmten Gesamtzellzahl gestellt, die im Diagramm (Abbildung 25) zu erkennen ist.

OVA-spezifisches IgE Tag 35:

Die errechnete Anzahl an OVA-spezifischen IgE-Plasmazellen ist zwischen der Hax1^{-/-}- und der WT-Maus sowohl in der Milz als auch im Knochenmark vergleichbar (Abbildung 27; 1. ELISpot; Tabelle 7, A).

OVA-spezifisches IgE Tag 42:

Vergleichbar mit dem Gesamt-IgG1-, dem Gesamt-IgE- und dem OVA-spezifischen IgG1-Gehalt in der Milz erscheint auch der OVA-spezifische IgE-Gehalt an Plasmazellen im WT höher als bei der Hax1^{-/-}-Maus. Die Zellzahl der OVA-spezifischen IgE-produzierenden Plasmazellen im Knochenmark ist nicht unterschiedlich zum WT (Abbildung 27; 2. ELISpot; Tabelle 7, A).

OVA-spezifisches IgE Tag 47:

Die spezifische IgE-Immunantwort gegen das Antigen Ovalbumin ist zwischen den Stämmen vergleichbar niedrig, wobei wiederum die Hax1^{-/-}-Maus im Knochenmark eine leicht erhöhte Anzahl an spezifischen IgE-Plasmazellen aufweist. (Abbildung 27; 3. ELISpot und Abbildung 28; Tabelle 7, A).

OVA-spezifische IgE-produzierende Plasmazellen

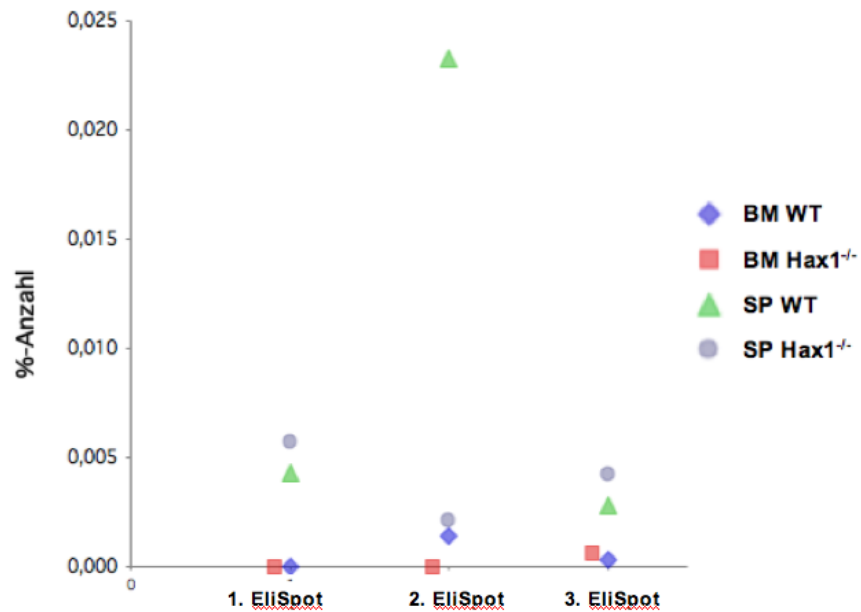


Abbildung 27: Verlauf der OVA-IgE-produzierenden Plasmazellen (1. ELISpot = Tag35, 2. ELISpot = Tag 42, 3. ELISpot = Tag 47)

OVA-spezifisches IgE Knochenmark

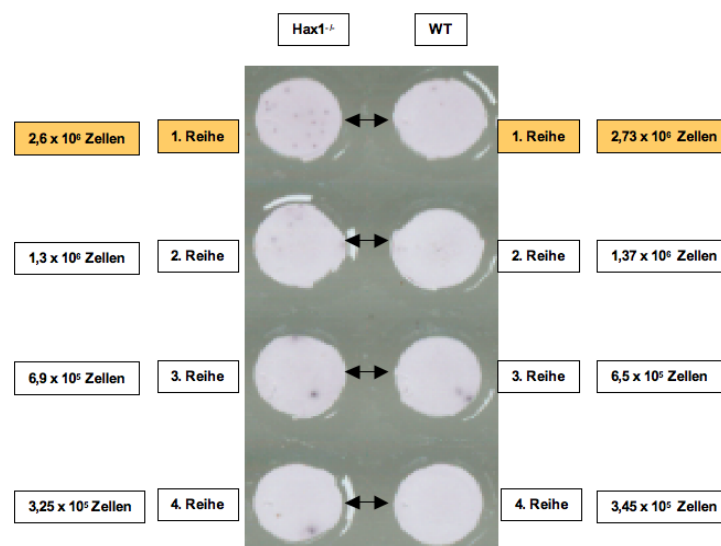


Abbildung 28: Auszug aus dem 3. ELISpot: OVA-spezifisches IgE Knochenmark:

Bei der Errechnung der unterschiedlichen Plasmazellzahl wurden die beiden Wells der 1. Reihe (8-fache Verdünnung) miteinander verglichen. Dabei errechneten sich bei der Hax1^{-/-}-Maus ~ 110 OVA-spezifische IgE-produzierende PZ (14 ausgezählte Spots) und bei der WT-Maus ~ 15 OVA-spezifische IgE-produzierende PZ (2 ermittelte Punkte).

(A)

1. ELISpot (Tag 35) - OVA-spez.-IgE				
	WT KM	Hax1^{-/-} KM	WT Milz	Hax1^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,46 x 10 ⁷	1,74 x 10 ⁷	1,43 x 10 ⁶	8,49 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	0	0	5.961	4.821
%-Zahl von OVA-spezifischen IgE-PZ	0	0	0,0043	0,0057
2. ELISpot (Tag 37) - OVA-spez.-IgE				
	WT KM	Hax1^{-/-} KM	WT Milz	Hax1^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	1,15 x 10 ⁸	1,41 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁷	3,76 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	197	0	4.668	795
%-Zahl von OVA-spezifischen IgE-PZ	0,0014	0	0,0233	0,0021
3. ELISpot (Tag 42) - OVA-spez.-IgE				
	WT KM	Hax1^{-/-} KM	WT Milz	Hax1^{-/-} Milz
Gesamtzellzahl via Casy®-Zählung (Zellen/ml)	2,18 x 10 ⁷	2,06 x 10 ⁷	8,8 x 10 ⁷	5,38 x 10 ⁷
Mittelwert an PZ der auszählbaren Wells	56	125	2.496	2.249
%-Zahl von OVA-spezifischen IgE-PZ	0,0003	0,0006	0,0028	0,0042

(B)

OVA-spezifisches IgE (Tag 42)		
	WT KM	Hax1^{-/-} KM
ausgezählte Spots	2	14
OVA-spezifische IgE-Zellen	16	112

Tabelle 7: Die Anzahl der via Casy® bestimmten Gesamtzellzahlen, der Mittelwerte der Plasmazellen der auszählbaren Wells und die Prozentzahlen der OVA-spezifischen IgE-produzierenden Plasmazellen des Knochenmarks und der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Maus ist in (A) angegeben (1. ELISpot, 2. ELISpot, 3. ELISpot). In (B) ist die Anzahl der ausgezählten Spots und der OVA-spezifischen IgE-produzierenden Plasmazellen des Knochenmarks von WT- und Hax1^{-/-}-Maus angezeigt.

Die erhobene Anzahl von OVA-spezifischen IgE-produzierenden Plasmazellen wurde in Relation zur via Casy® bestimmten Gesamtzellzahl gestellt, die im Diagramm (Abbildung 27) zu erkennen ist.

Zusammenfassend sei gesagt, dass die langlebige totale als auch die spezifische IgE Immunantwort gegen das Antigen Ovalbumin der Hax1^{-/-}-defizienten Maus leicht erhöht im Vergleich zum WT erscheint.

5.3. HAX1-Knockout führt zu einer Abnahme der Zellzahl

Die verringerte Größe der Milz der Hax1^{-/-}-Mäuse lässt die Annahme einer verminderten Zellzahl an Splenozyten aufkommen. Aufgrund dieser Vermutung wurde gleichzeitig auch die Anzahl an Knochenmarkszellen untersucht.

5.3.1. HAX1-Deletion führt zu einer geringeren Gesamtzellzahl in der Milz

In diesem Zusammenhang wurde ein Vergleich der Gesamtzellen der Milz von naiven und OVA-immunisierten WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse angestellt. Dementsprechend wurden die Mediane (MD) der via Casy® ermittelten Anzahl an Milzzellen von naiven (Abbildung 29) und immunisierten (Abbildung 30) WT-Mäusen denen von Hax1^{-/-}-Mäusen vergleichend gegenübergestellt.

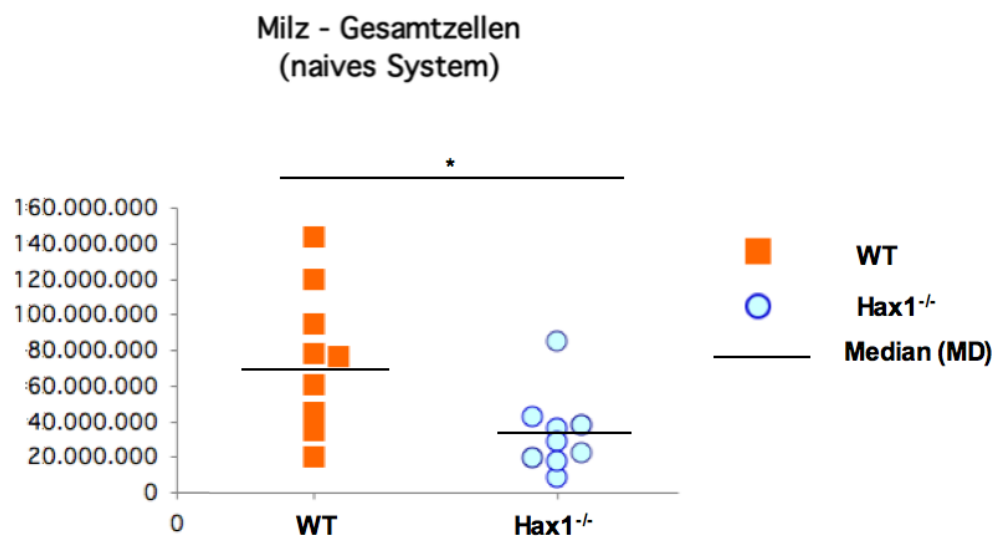


Abbildung 29: In der graphischen Darstellung sind die ermittelten Gesamtzellzahlen der Milz von beiden Mausstämmen abgebildet. Dabei entspricht jedes Symbol einer Maus. Es werden die via Casy® ermittelten Gesamtzellzahlen von nicht-immunisierten WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen (je 9 Mäuse) miteinander verglichen, die sich statistisch signifikant unterscheiden (p*0,0145; errechnet mittels Students t-Test). Der daraus errechnete Median (MD) eines jeden Mausstammes ist durch eine schwarze, horizontale Linie angezeigt.

Die Splenozytenzahl von unimmunisierten WT-Mäusen ist zweimal so hoch, als die der Hax1^{-/-}-Mäuse (Abbildung 29). Das Verhältnis von WT-Mäusen und Hax1^{-/-}-Mäusen entspricht einem 2:1-Verhältnis.

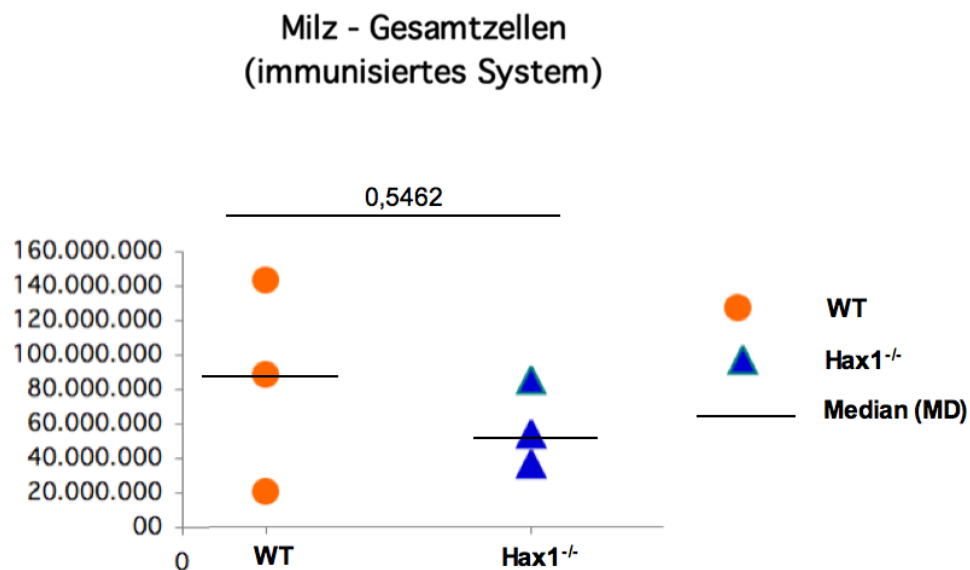


Abbildung 30: Im Punkte-Diagramm sind die errechneten MD (schwarze, horizontale Linie) der Milzzellen von OVA-immunisierten WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen gegenübergestellt (pValue 0,5462; ermittelt mit Students t-Test). Dabei wurden die Gesamtzellzahlen via Casy®-Zellzähler bestimmt.

Die Anzahl der gesamten Splenozyten von OVA-immunisierten WT-Mäusen ist etwa doppelt so hoch, als die Zellzahl von Hax1^{-/-}-Mäusen (2:1-Verhältnis) (Abbildung 30). Dennoch konnte aufgrund der Schwankungen innerhalb eines Mausstammes keine statistische Relevanz festgestellt werden.

5.3.2. HAX1-Verlust führte zu einer Reduktion der Knochenmarkszellen

In gleicher Weise wurden die Mediane der Knochenmarkszellen von nicht-immunisierten (Abbildung 31) und immunisierten (Abbildung 32) WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen miteinander verglichen, um festzustellen, ob der HAX1-Verlust zu einer verringerten Knochenmarks-Zellzahl führt.

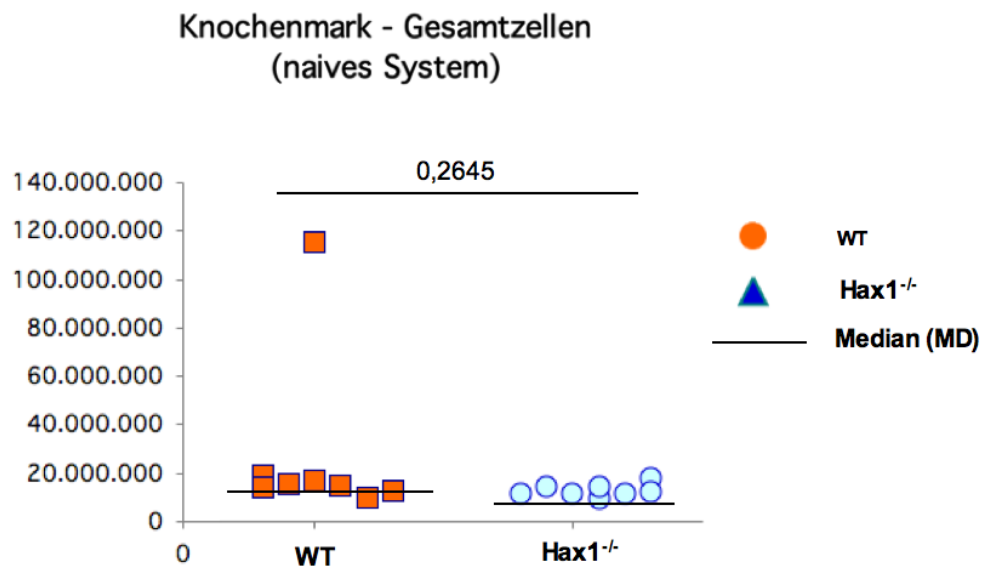


Abbildung 31: Für die statistische Darstellung wurden die Mediane aus den via Casy® ermittelten Gesamtzellzahlen des Knochenmarks von naiven WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen berechnet und graphisch in einem Punkt-Diagramm dargestellt (pValue 0,264; ermittelt mit Students t-Test). Dabei wurden die Mediane der beiden Mausstämme miteinander verglichen. Der MD gibt den zentralen Zellzahlwert der überwiegenden Datensätze eines Mausstammes an. Dabei ist der MD im Vergleich zum Mittelwert robuster gegenüber extrem abweichenden Werten.

Die Zellzahl der Knochenmarkszellen von naiven Hax1^{-/-}-Mäusen ist im Unterschied zu der von unimmunisierten WT-Mäusen geringfügig kleiner (Abbildung 31).

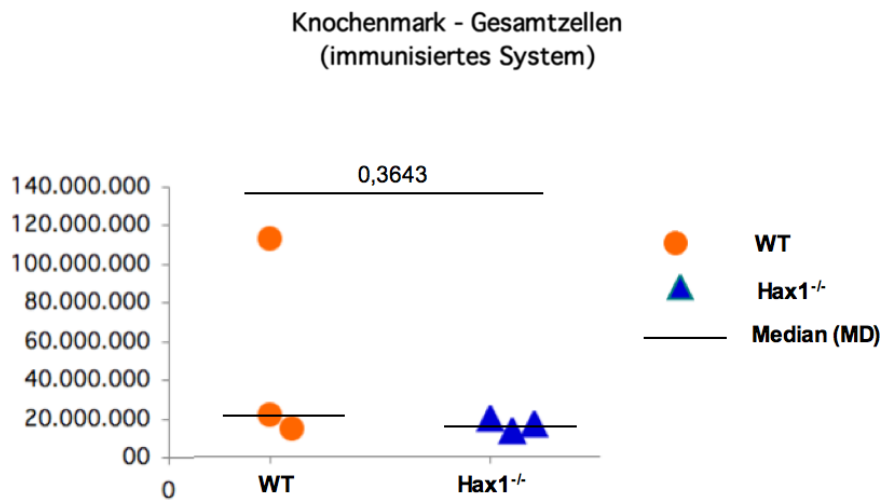


Abbildung 32: Im Punkte-Diagramm sind die Gesamtzellzahlen des Knochenmarks von OVA-immunisierten WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen, die via Casy® ermittelt wurden, symbolisch als Einzelwerte angegeben (pValue 0,3643; ermittelt mit Students t-Test). Die daraus errechneten Mediane (schwarze, horizontale Linie) der beiden immunisierten Mäuse-Stämme wurden entsprechend miteinander verglichen.

Die Anzahl der gesamten Knochenmarkszellen von OVA-immunisierten Hax1^{-/-}-Mäusen ist tendenziell niedrigerer, als vergleichsweise die von immunisierten WT-Mäusen (Abbildung 32).

5.3.3. Verlust von HAX1 hat eine Abnahme von B-Zellen in der Milz zur Folge

Um den Einfluss von HAX1 auf die B-Zellentwicklung zu untersuchen, wurde die B-Zellzahl in der Milz von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die isolierten B-Zellen der beiden Mausstämme via Casy®-Zellzähler bestimmt und miteinander verglichen (Abbildung 33).

Milz - B-Zellfraktion

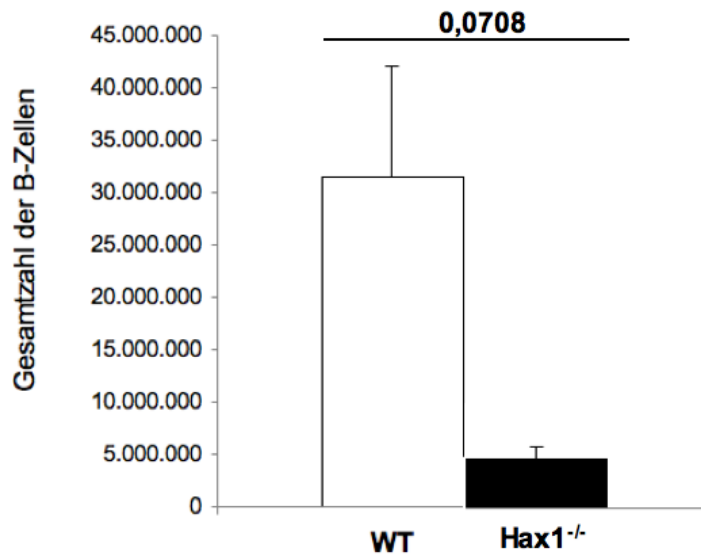


Abbildung 33: In der graphischen Darstellung werden die gemittelten Zellzahlen von B-Zellen in der Milz von 2 WT-Mäusen und 2 Hax1^{-/-}-Mäusen gegenübergestellt (pValue 0,0708; ermittelt mit Students t-Test). Die präparierten Milzzellen wurden einer Erylyse unterzogen und anschließend eine B-Zellisolierung entsprechend dem “Pan B Cell Isolation Kit” der Firma Miltenyi Biotech durchgeführt. Die Bestimmung der Anzahl von B-Zellen erfolgte via Casy®-Zellzähler.

Bei der Auswertung zeigte der Vergleich beider Mausstämme einen siebenfach erhöhten Wert der Milz-B-Zellfraktion der WT-Maus im Vergleich zu der Hax1^{-/-}-Maus (7:1-Verhältnis) (Abbildung 33). Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Mäusen (n = 2) konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden (pValue = 0,0708).

5.3.4. Hax1^{-/-}-defiziente Mäuse zeigen eine Abnahme von B-Zellen im Knochenmark

In weiterer Folge stellte sich die Frage in wie weit sich die Anzahl von B-Zellen im Knochenmark der Hax1^{-/-}-Maus von der Zellzahl der B-Zellfraktion der WT-Maus

unterscheiden. In diesem Fall wurden die isolierten B-Zellen der beiden Mausstämme ebenfalls via Casy®-Zellzähler bestimmt. Aus den ermittelten Zellzahlen der B-Zellfraktionen verschiedener Hax1^{-/-}- und WT-Mäuse wurde der Mittelwert errechnet, um in Relation zu setzen (Abbildung 34).

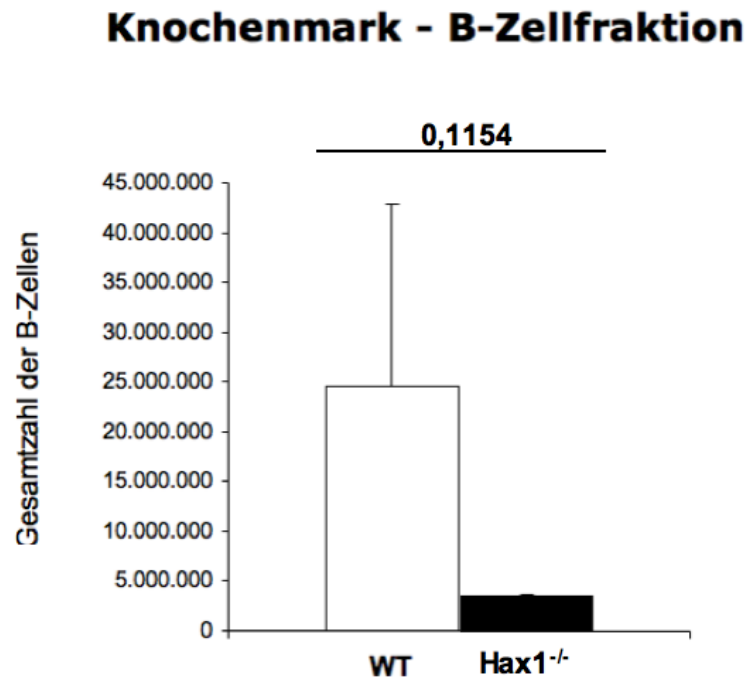


Abbildung 34: Im Säulen-Diagramm wurden die B-Zellen beider Mausstämme via “Pan B Cell Isolation Kit” der Firma Miltenyi Biotech gewonnen. Die isolierten B-Zellen wurden via Casy®-Zellzähler bestimmt und die Mittelwerte der B-Zellfraktionen des Knochenmarks von 2 WT- und 2 Hax1^{-/-}-Mäusen miteinander verglichen (pValue 0,1154; ermittelt mit Students t-Test).

Die Auswertung zeigt eine siebenfach höhere gemittelte Zellzahl an B-Zellen im Knochenmark von WT-Mäusen, als vergleichsweise zu den Hax1^{-/-}-Mäusen (7:1-Verhältnis) (Abbildung 34). Auch in diesem Fall konnte angesichts der geringen Anzahl an untersuchten Mäusen (n = 2) keine statistische Relevanz verzeichnet werden (pValue = 0,1154).

In vorherigen Untersuchungen von Peckl-Schmid et al. (74) und Wolkerstorfer et al. (72) wurde festgestellt, dass abhängig vom Alter der Hax1^{-/-}-Mäuse sich die B-Zellzahl verändert. In diesem Zusammenhang nimmt die Zellzahl der B-Zellen mit zunehmendem Alter der Hax1^{-/-}-Mäuse ab.

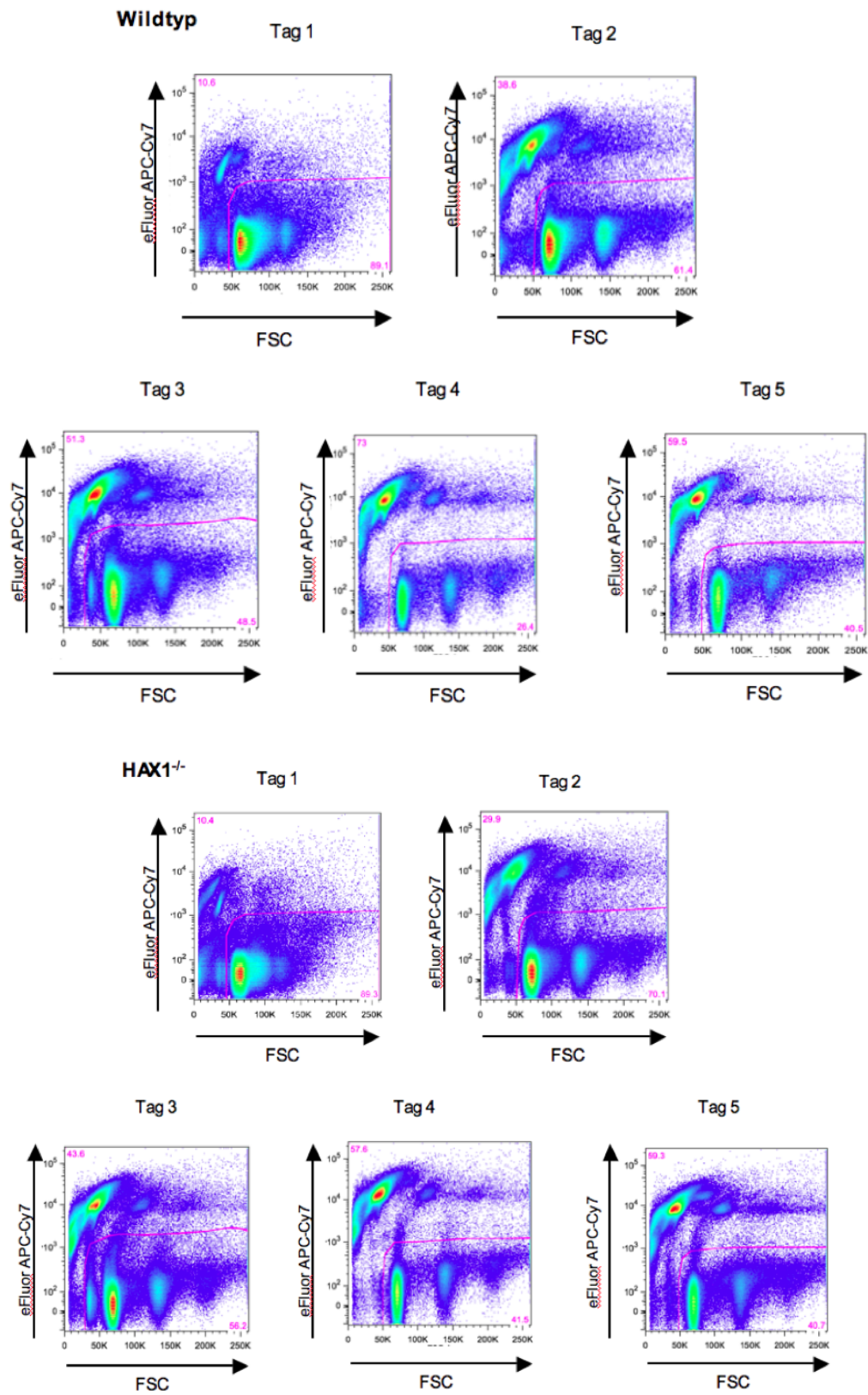
5.4. Hax1^{-/-}-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte apoptotische Zellaktivität

5.4.1. Verlust von HAX1 hat *in vivo* eine höhere Zelltodrate zur Folge

Um zu eruieren, welchen Einfluss HAX1 auf die Viabilität von Milzzellen hat, wurden dahingehend unabhängige Viabilitäts-Experimente mit jeweils 5 WT- und 5 Hax1^{-/-}-Mäusen durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde von jedem Lebend-Tot-Färbeversuch, der sich über einen Zeitraum von 5 Tagen (d0 bis d4) erstreckte, die Zelltodrate von kultivierten unstimulierten Milzzellen von 7 bis 12 Wochen alten WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen via FACS-Analyse bestimmt. Die Zellen wurden mit eFluor gefärbt. Dabei wurden die lebenden Zellen als eFluor-negativ und die toten Zellen eFluor-positiv detektiert.

Durch Setzen der entsprechenden Gates wurden im Dot Plot-Diagramm der FACS-Auswertung die prozentuelle Rate an toten bzw. lebenden Zellen berechnet. Von den durchflusszytometrisch bestimmten %-Werten an toten Zellen (eFluor-positiv) wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und graphisch dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Unpaired Student's T-Test errechnet. Dabei ergab die statistische Analyse am Tag 1 (*p0.0498), Tag 2 (*p0.0283) und Tag 3 (*p0.0260) eine statistisch signifikant bessere Überlebensrate der Hax1^{-/-}-Milzzellen. Die pValue-Werte sind unterhalb der graphischen Abbildung angeführt.

(A)



(B)

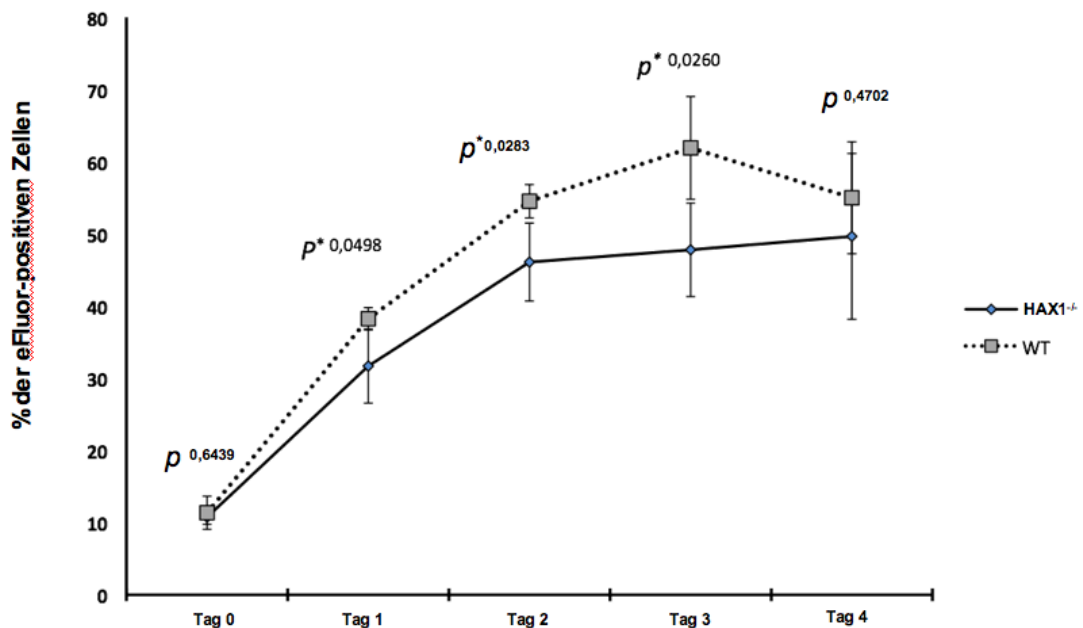


Abbildung 35: (A) Repräsentative FACS-Abbildung (1. eFluor-Viabilitäts-Versuch) eines Lebend-Tot-Experiments einer WT- und einer Hax1^{-/-}-Maus mit entsprechender Gatesetzung zur Ermittlung der Zellzahl an toten bzw. lebenden Zellen. Die Milzzellen (bzw. Knochenmarkszellen) von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen kultiviert und täglich (Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4, Tag 5) die Anzahl an toten Zellen via FACS-Analyse gemessen. Die Zellen wurden mit eFluor gefärbt, wobei die toten Zellen entsprechend eFluor-positiv sind. (B) Statistische Vergleich von toten Zellen. Die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen von toten Zellen der 5 WT- und 5 Hax1^{-/-}-Mäusen wurden an jedem Tag statistisch miteinander verglichen.

Gegensätzlich aller derzeitigen Auffassungen, muss davon ausgegangen werden, dass die Lymphozyten der Milz der Hax1^{-/-}- Maus eine gesteigerte Überlebensrate im Vergleich zur WT-Maus aufweisen. Dies führt zu der Annahme, dass B-Zellen, die das defekte Knochenmark überlebt haben, eine besondere Robustheit aufweisen müssen.

Parallel zu der Lebend-Tot-Bestimmung von Milzzellen wurden auch Viabilitäts-Versuche von Knochenmarkszellen von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen durchgeführt und statistisch ausgewertet (nicht angeführt). Aufgrund von Schwankungen der

Prozentsätze an toten Zellen innerhalb der Mausstämme an den jeweiligen Tagen konnte keine statistische Relevanz festgestellt werden, weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde.

Untersuchungen von Wolkerstorfer et al. (72) zeigten, dass Knochenmarkszellen der Hax1^{-/-}-Maus eine signifikant höhere Anzahl an frühapoptotischen toten Zellen aufweisen. Wolkerstorfer et al. benützte zusätzlich zur eFluor- eine Annexinfärbung, um auch frühe Apoptose detektieren zu können (72). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass es sich bei HAX1 um ein anti-apoptotisches Protein handelt. Demnach kommt es bei der Deletion des HAX1-Gens vermehrt zur Induktion der Apoptose, was eine vermehrte Zellzahl an toten Zellen zur Folge hat. Im Gegensatz dazu werden in der WT-Maus die Zellen vermehrt daran gehindert in die Apoptose zu gehen, was in einer vermehrten Anzahl an lebenden Zellen resultiert.

Im Zuge einer B-Zell-Induktion wurden präparierte, erythrozyten-freie Milzzellsuspensionsansätze von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen einerseits mit α -CD40 und IL4, andererseits mit LPS und IL4 kultiviert. Abhängig von den Stimuli entstanden unterschiedlich hohe Mengen an IgG1- und IgE-Rezeptor-positiven B-Zellen, die miteinander verglichen und Aufschluß über veränderte Viabilitätsmessungen gaben. Eine 1. eFluor-Färbung mit einer anschließenden 2. Fluorochrom-gekoppelten Antikörper-Färbung des IgE- bzw. IgG1-Isotyps zeigten somit den %-Satz an lebenden B-Zellen des jeweiligen Isotyps an (siehe 5.5.).

Der Vergleich zwischen α -CD40/IL4-stimulierten B-Zellen der WT-Maus mit denen der Hax1^{-/-}-Maus lässt eine beinahe doppelt so hohe Anzahl an toten Zellen im Hax1^{-/-}-Mausstamm erkennen. Das gleiche 2:1-Verhältnis ist auch bei den mit LPS/IL4-stimulierten B-Zellen zugunsten der Hax1^{-/-}-Maus feststellbar (Abbildung 36, A bis D).

Wie oben angeführt (Abbildung 35, B), zeigen Hax1^{-/-}-Milzzellen ein gesteigertes Überleben. Dies konnte bei *in vitro* stimulierten B-Zellen nicht beobachtet werden.

Zwischen diesen Versuchen liegen mehrere prinzipielle Unterschiede: In Abbildung 33 wurde ein Gemisch aus T- und B-Zellen auf seine Viabilität untersucht, die auch keine weiteren Stimuli ausgesetzt waren. Möglicherweise steigert die Anwesenheit der T-Zellen das Überleben der B-Zellen. Bei den *in vitro* Versuchen wurden B-Zellen (ohne T-Zellen) bestimmten Proliferationsstimuli ausgesetzt, die möglicherweise den Defekt in der Apoptose des Hax1^{-/-}-Mausstammes wieder sichtbar machten.

5.5. HAX1 beeinflusst abhängig vom Proliferations-Stimulus den Immunglobulin-Isotyp-vermittelten Klassenwechsel

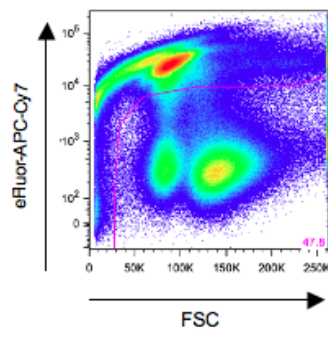
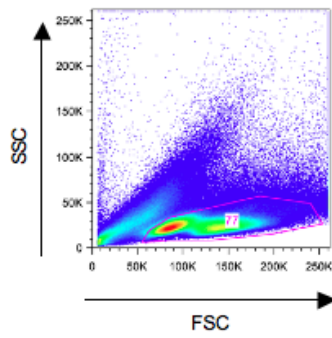
5.5.1. FACS-Analysen von *in vitro* induzierten B-Zellen der WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse

Unterschiedliche Induktionsansätze sorgen für unterschiedliche Konzentrationen an sekretierten Antikörpern. In diesem Zusammenhang können Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen hinsichtlich eines veränderten Immunglobulin-Klassenwechsels nachgewiesen bzw. untersucht werden.

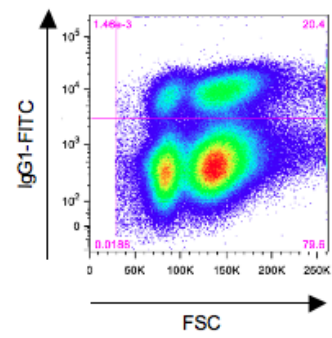
Um Unterschiede hinsichtlich des Klassenwechsels *in vitro* zu untersuchen, wurden Milzzellen von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen zum einen mit α -CD40 und IL4 und zum anderen Teil mit LPS und IL4 kultiviert. Abhängig von den Proliferations-Stimuli wurden unterschiedliche Prozentwerte von IgG1- bzw. IgE-spezifischen B-Zellen in der WT- bzw. Hax1^{-/-}-Maus gebildet. Die Milzzellen wurden zunächst gestrippt, eFluor-gefärbt und anschließend einer Fluorochrom-gekoppelten Antikörper-Färbung des IgE- bzw. IgG1-Isotyps unterzogen.

(A)

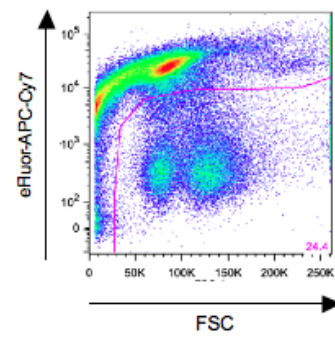
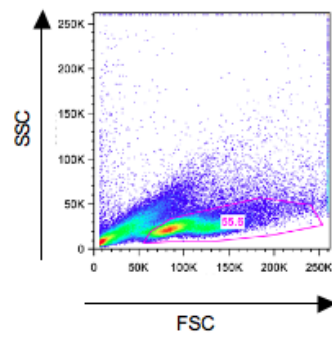
Wildtyp



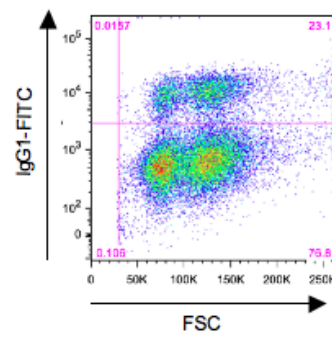
Wildtyp



Hax1^{-/-}

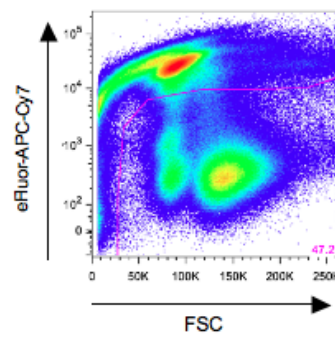
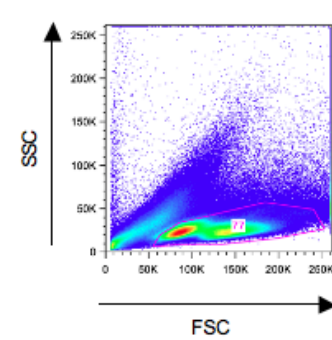


Hax1^{-/-}

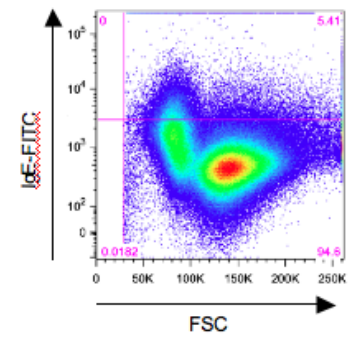


(B)

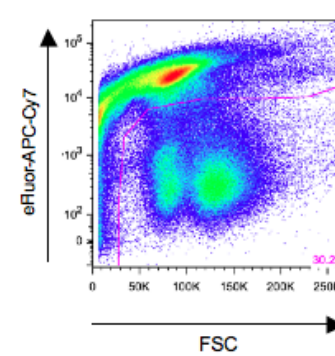
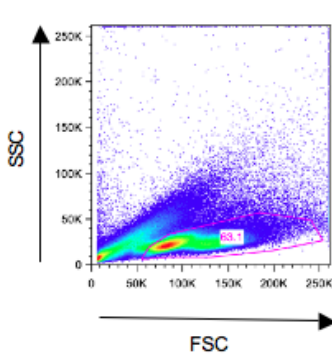
Wildtyp



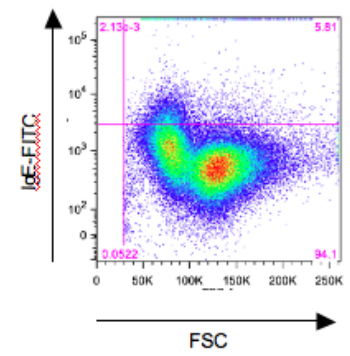
Wildtyp



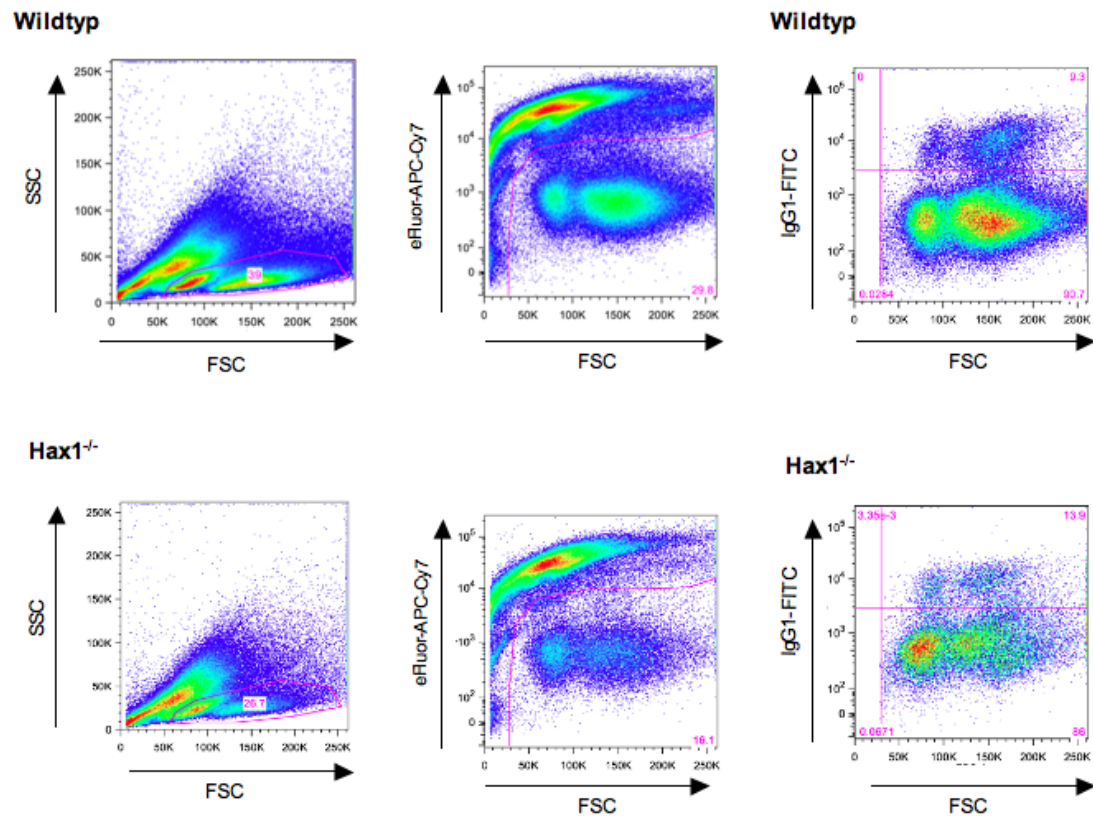
Hax1^{-/-}



Hax1^{-/-}



(C)



(D)

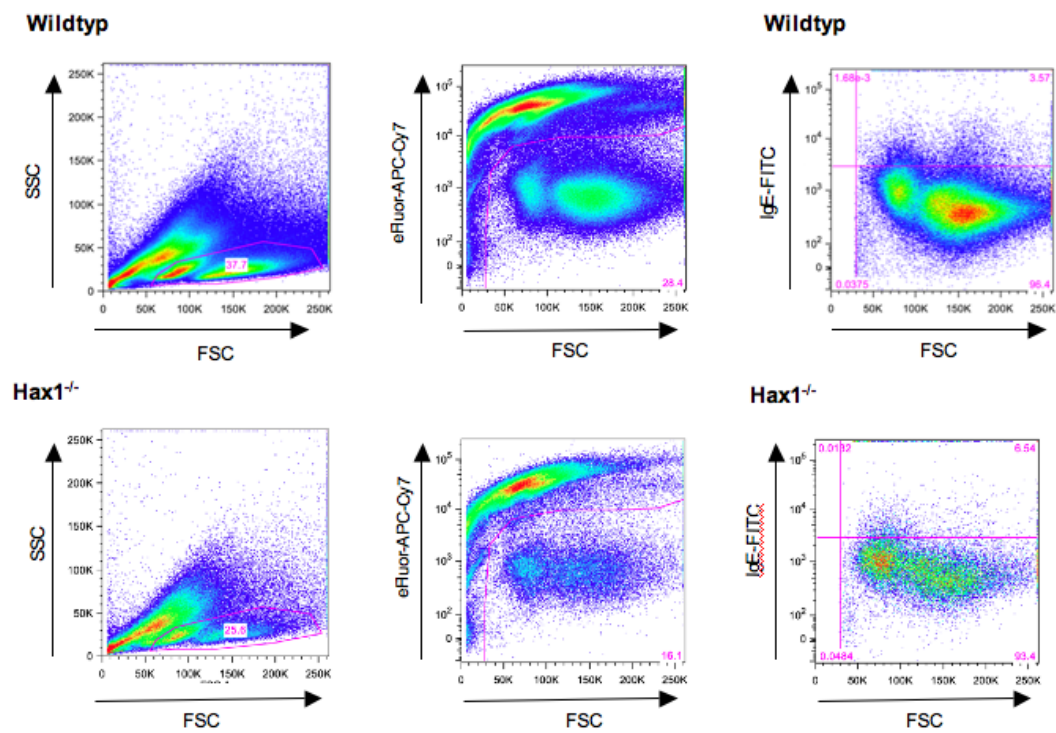


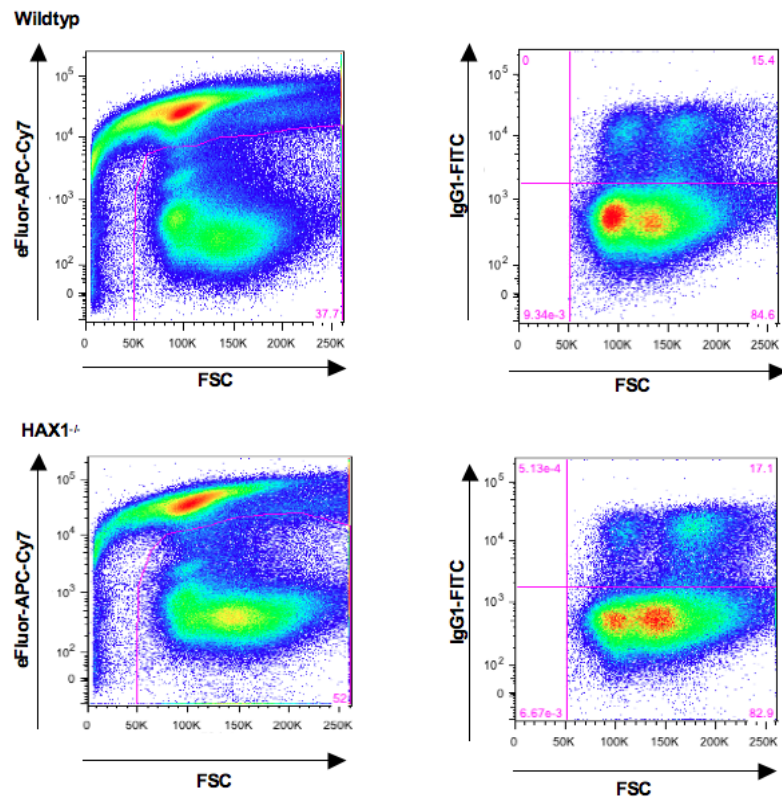
Abbildung 36: *In vitro* Induktionen von WT und Hax1^{-/-}-Mäusen. (A) IgG1-Klassenwechsel via α -CD40/IL4-Stimulierung. (B) IgE-Klassenwechsel via α -CD40/IL4-Stimulierung. (C) IgG1-Klassenwechsel via LPS/IL4-Stimulierung. (D) IgE-Klassenwechsel via LPS /IL4-Stimulierung.

Versuch 1: Isotyp-Switch-Kontrolle (BcellInd) v. 06.02.2013: B-Zellen (untouched isolation with Miltenyi Kit) der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen wurden *in vitro* für 5 Tage induziert. 1×10^6 Zellen/ml RPMI-Medium (10 μ g/ml LPS, 2,5 μ g α -CD40/IL4, 1000 U/ml IL4). Die induzierten B-Zellen wurden gestrippt und eFluor-gefärbt. Nach Zugabe des FITC-gekoppelten IgG1-/IgE-Antikörpers, wurden die Induktionsansätze der beiden Mausstämme via FACS-Analyse miteinander verglichen.

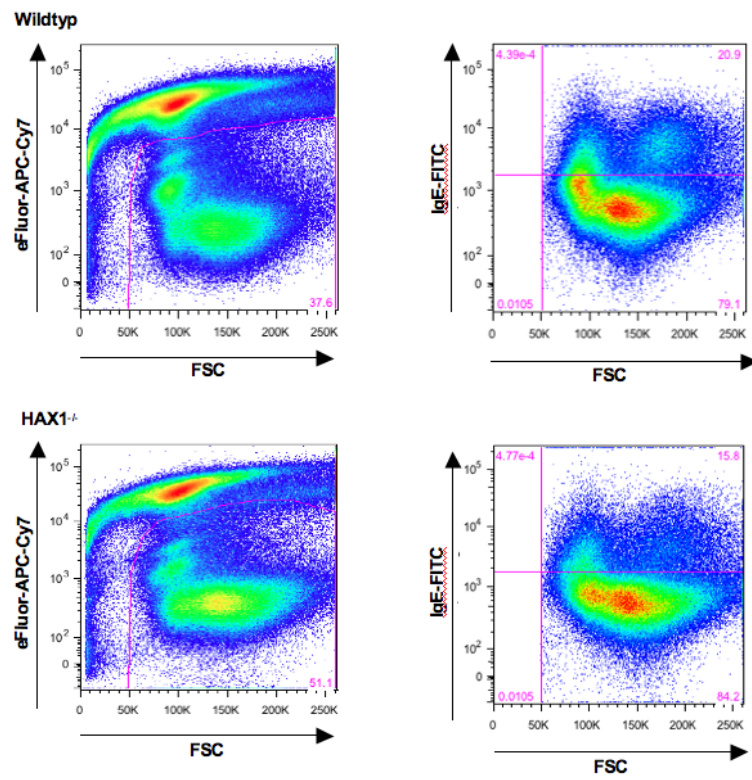
LPS/IL4-induzierte IgG1- und IgE-produzierende B-Zellen kommen bei der Hax1^{-/-}-Maus in beinahe doppelt so hoher Anzahl vor, als in der WT-Maus (Abbildung 36, C und D). Hingegen liegen die prozentuellen Werte von α -CD40/IL4-induzierten IgG1- und IgE-produzierenden B-Zellen in der WT- und der Hax1^{-/-}-Maus in etwa der gleichen Höhe (Abbildung 36, A und B). Dennoch ist ein tendenziell höherer Wert von α -CD40/IL4-induzierten IgG1- und IgE-produzierenden Hax1^{-/-}-B-Zellen bezogen auf die lebenden Zellen identifiziert worden.

Im Zuge eines zweiten FACS-Experiments (Versuch 2 vom 21.01.2013) wurden diese durchflusszytometrisch-bestimmten Daten bestätigt (Abbildung 37, A bis D).

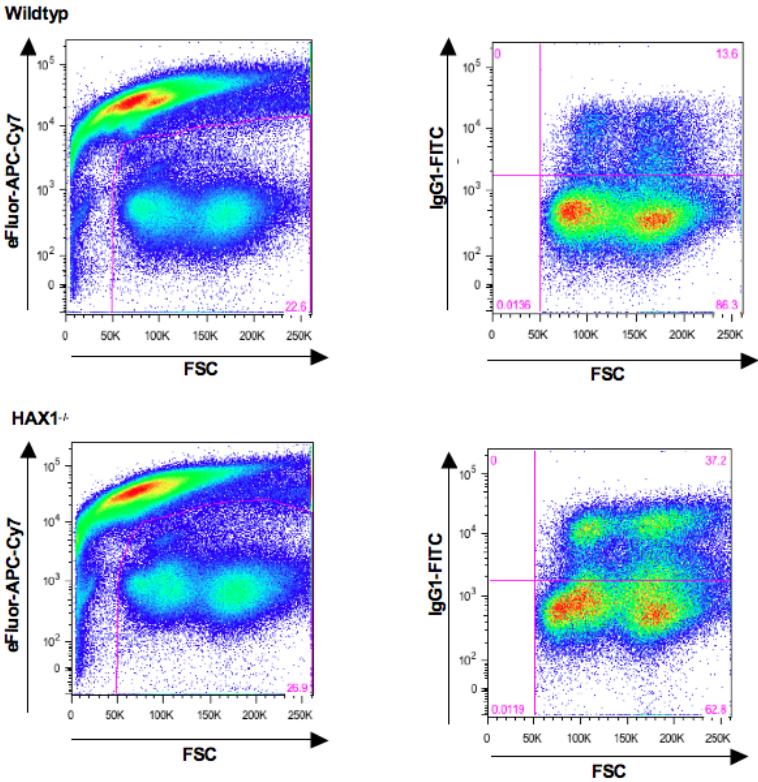
(A)



(B)



(C)



(D)

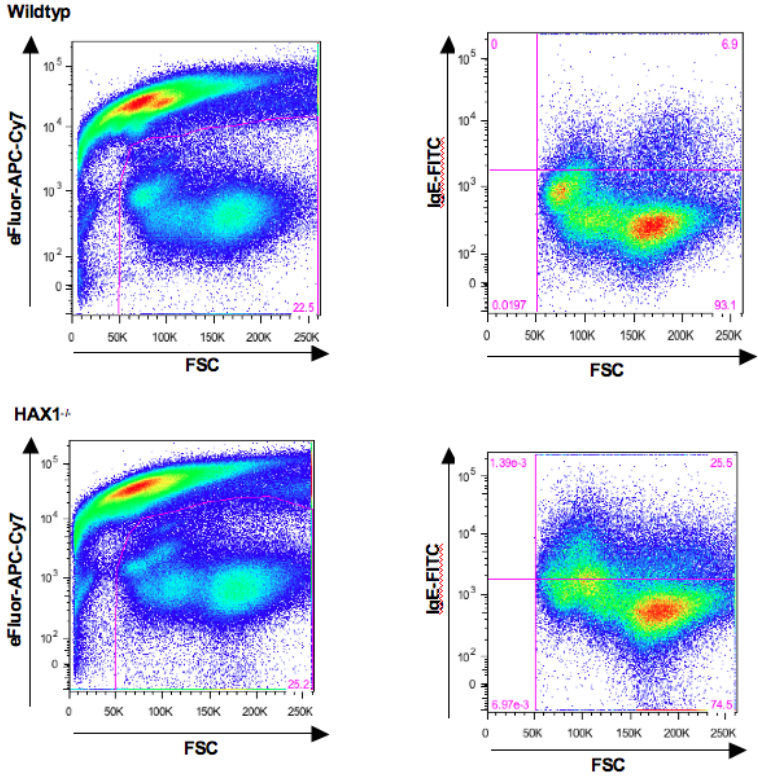


Abbildung 37: *In vitro* Induktionen von WT und Hax1^{-/-}-Mäusen. (A) IgG1-Klassenwechsel via α -CD40/IL4-Stimulierung von WT und Hax1^{-/-}-Mäusen. (B) IgE-Klassenwechsel via α -CD40/IL4-Stimulierung von WT und Hax1^{-/-}-Mäusen. (C) IgG1-Klassenwechsel via LPS/IL4-Stimulierung von WT und Hax1^{-/-}-Mäusen. (D) IgE-Klassenwechsel via LPS /IL4-Stimulierung von WT und Hax1^{-/-}-Mäusen.

Versuch 2: Isotyp-Switch-Kontrolle (BcellInd) v. 21.1.2013: Die B-Zellen wurden via "Pan B cell Isolation Kit ®" (Fa. Miltenyi Biotec) isoliert und für fünf Tag mit LPS/IL4 und α -CD40/IL4 bei 37°C inkubiert. Nach der Induktionszeit wurden die Zellen gestrippt, eFluor-gefärbt sowie mit FITC-markierten Antikörpern (IgG1, IgE) gegengefärbt.

Die FACS-Ergebnisse lassen eindeutig darauf schließen, dass etwa dreimal höhere IgG1-Werte bei einem TLR4-Proliferationsstimulus (LPS/IL4) im Hax1^{-/-}-Mausstamm entstehen, als vergleichsweise in der WT-Maus. Die IgE-Werte im Hax1^{-/-}-Mausstamm liegen bei einer LPS/IL4-Stimulation sogar viermal höher, als in der WT-Maus (Abbildung 37, C und D).

Im Gegensatz dazu erreichen die IgG1-Werte in der Hax1^{-/-}-Maus bei einer α -CD40/IL4-Stimulation nur WT-Niveau. Die gleiche Mengenverteilung von IgG1 im Hax1^{-/-}- bzw. WT- Mausstamm trifft auch bei IgE zu, wenn mit α -CD40/IL4 induziert wurde (Abbildung 37, A und B). Dieses Ergebnis weist eindeutig darauf hin, dass ein Verlust von HAX1 für die durch α -CD40 vermittelte Stimulierung und die Signalweiterleitung des Rezeptors keine wesentliche Bedeutung zu besitzen scheint. Es liegt sogar eine gleichwertige Switchfrequenz vor. Allerdings konnte Oberndorfer et al. zeigen, dass die Internalisierung des Rezeptors verändert war (60).

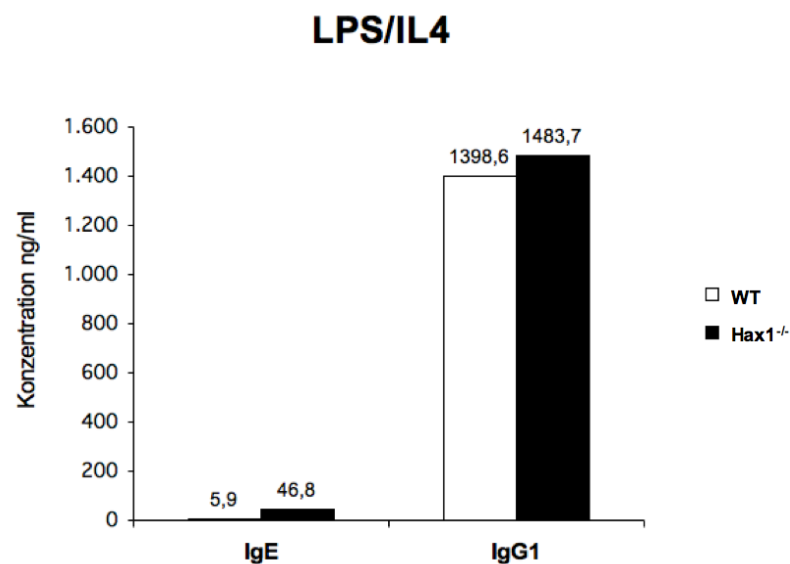
Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen der FACS-Analyse vom 06.02.13 (Abbildung 36).

5.5.2. ELISA von *in vitro* induzierten B-Zellen der WT- und Hax1^{-/-}-

Mäuse

Zur Bestätigung der FACS-Ergebnisse wurden diese mit den ELISA-Analysen verglichen und auf Korrelationen überprüft. Dafür wurden die Überstände der jeweiligen Induktionskulturen verschiedener Mausstämmen gesammelt und die Konzentrationsmenge von sekretierten IgE- und IgG1-Antikörpern bestimmt.

(A)



(B)

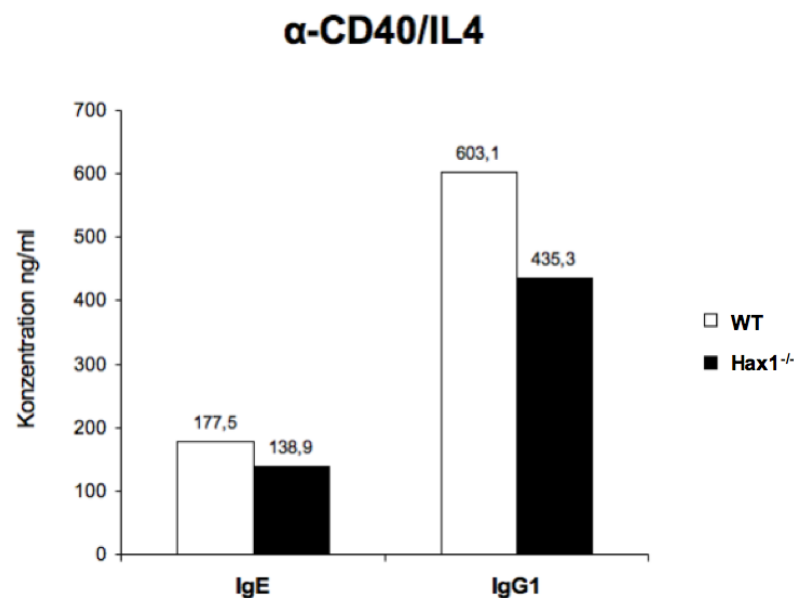


Abbildung 38: Versuch 1: Isotyp-Switch-Kontrolle (BcellInd) v. 06.02.2013:

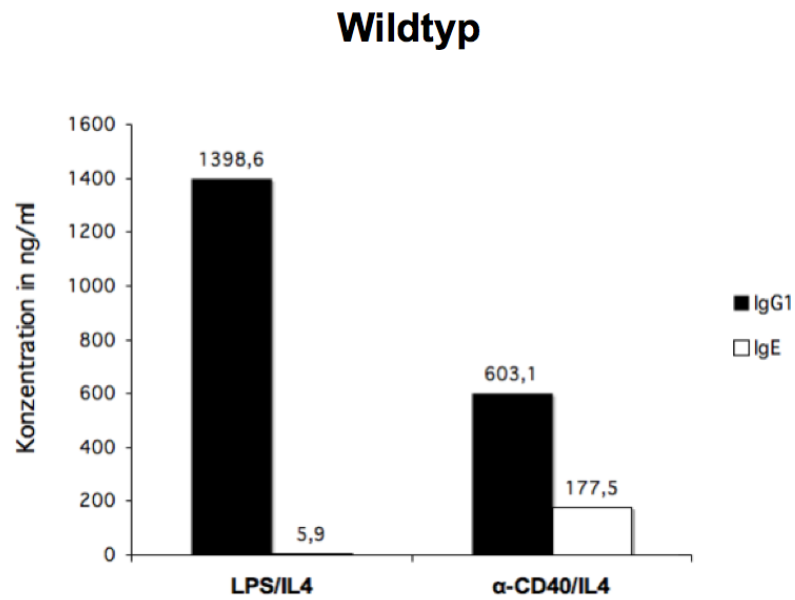
Die Überstände von *in vitro* induzierten B-Zellen, die für 5 Tage mit α -CD40/IL4 und LPS/IL4 induziert wurden, wurden gesammelt und in Aliquote aufgeteilt. Dabei wurden die B-Zellen beider Mausstämme mit dem "Pan B Cell Isolation Kit" der Firma Miltenyi Biotech isoliert. 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium wurden mit unterschiedlichen Stimuli kultiviert. Dabei wurde ein Teil der B-Zellen mit 2,5 μ g/ml α -CD40 und 1000 U/ml IL4 (A) während ein anderer Teil mit 10 μ g/ml LPS und 1000 U/ml IL4 (B) stimuliert wurden.

In den Überständen von Hax1^{-/-}-B-Zellen, die mit LPS/IL4 stimuliert wurden, ist eine merklich höhere Antikörpermengende des IgG1- und IgE-Isotyps identifizierbar, als vergleichsweise zur WT-Maus (Abbildung 38, A). Wohingegen eine α -CD40/IL4-Stimulierung zu einer reduzierten Menge an sekretierten IgG1- und IgE-Antikörpern in der Hax1^{-/-}-Maus führt (Abbildung 38, B).

Die gemessenen Konzentrationen an sekretierten IgG1- und IgE-Antikörpern bei unterschiedlicher Stimulierung wurden mit den via FACS-ermittelten Ergebnissen verglichen. Bei α -CD40/IL4-Stimulierung ist via FACS-Analyse jeweils eine geringfügig höhere Menge an IgG1- und IgE-sekretierenden B-Zellen in der WT-Maus nachweisbar, als im Vergleich zu der Hax1^{-/-}-Maus. Entsprechend der Auswertung des ELISAs sind jedoch gegenteilige Ergebnisse zu verzeichnen.

Bei einer LPS/IL4-Stimulierung kommt es angesichts der FACS-Analyse zu einem doppelt so hohen Wert an IgG1- und IgE-produzierenden Hax1^{-/-}-B-Zellen. Dieses Ergebnis wird durch die ELISA-Analyse bestätigt, wonach bei einer LPS/IL4-Induktion von Hax1^{-/-}-B-Zellen eine größere Menge an IgG1- und IgE-Antikörpern im Überstand detektierbar waren.

(A)



(B)

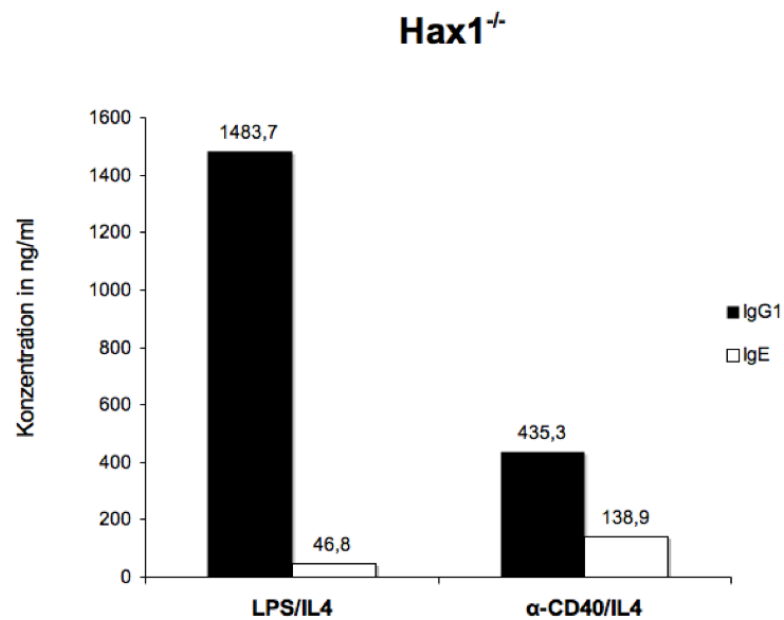


Abbildung 39: ELISA von gesorteten B-Zellen der WT- (A) und der Hax1^{-/-}-Maus (B), die *in vitro* mit LPS/IL4 und α-CD40/IL4 stimuliert wurden.

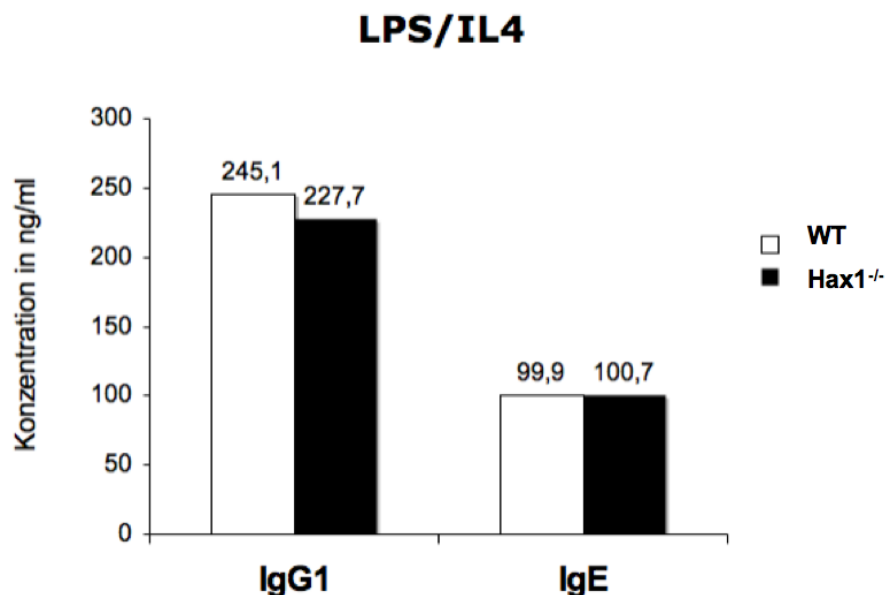
Die Menge an sekretiertem IgE in der WT- bzw. Hax1^{-/-}-Maus ist vom Proliferations-Stimulus abhängig. α-CD40/IL4-Stimulierung sorgt für einen

höheren Wert an sekretierten IgE-Antikörpern, als vergleichsweise eine LPS/IL4-Induktion. Diese Unterschiede sind auch in der Hax1^{-/-}-Maus nachweisbar.

Im Zuge des zweiten ELISA-Experiments (Versuch 2 vom 21.01.2013) wurden diese Daten im 2. Immunassay vom 21.1.2013 zum Teil bestätigt (Abbildung 40, A und B).

Es wurden die Überstände von induzierten B-Zellsuspensionen einer anderen WT- und Hax1^{-/-}-Maus analysiert, und anhand unterschiedlicher Stimulierung erneut die Konzentrationsmenge von sekretiertem IgG1 und IgE miteinander verglichen. Zusätzlich wurden Vergleiche zwischen den ermittelten IgG1- und IgE-Konzentrationen und den via FACS-bestimmten Ergebnissen angestellt. Eine α -CD40/IL4- und LPS/IL4-Stimulierung führt zu unterschiedlichen Konzentrationen von sekretierten Antikörpern.

(A)



(B)

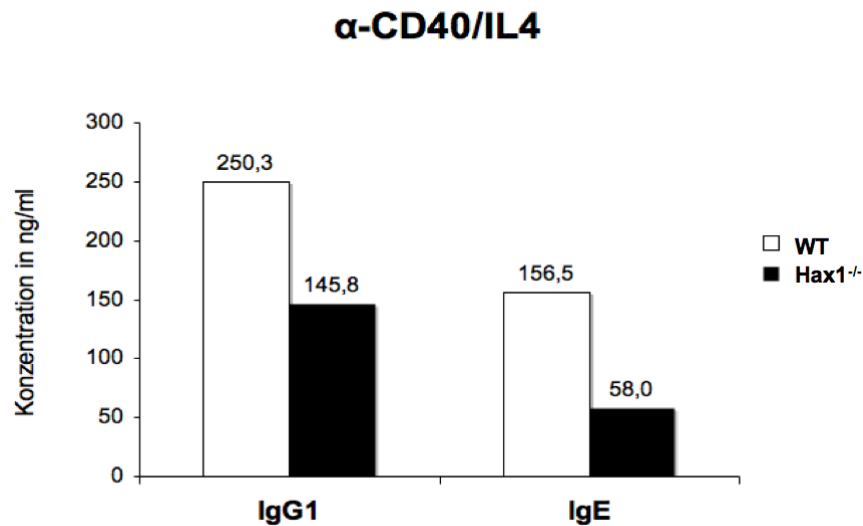
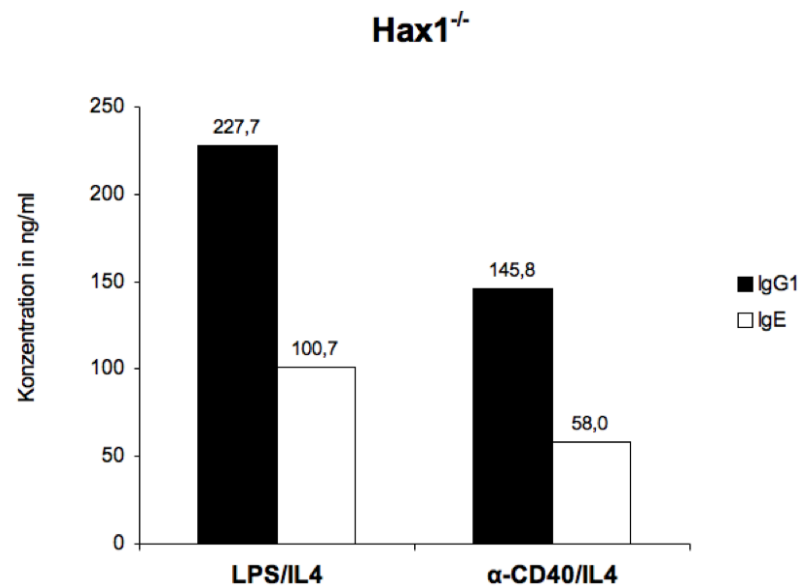


Abbildung 40: Versuch 2: Isotyp-Switch-Kontrolle (*BcellInd*) v. 21.1.2013:

Ein Teil der B-Zellen beider Mausstämmen wurde mit α -CD40/IL4 stimuliert (B), während ein anderer Teil mit LPS/IL4 (B) induziert wurde.

Im Überstand von LPS/IL4-stimulierten B-Zellen war in der WT-Maus ein ähnlicher Anteil an sekretierten IgG1-/IgE-Antikörpern feststellbar, als vergleichsweise in der Hax1^{-/-}-Maus (Abbildung 40, A). Bei der α -CD40/IL4-Stimulierung ist in der Hax1^{-/-}-Maus eine zweifach geringere Menge an sekretiertem IgG1 nachweisbar, als im Vergleich zu der WT-Maus. Diesbezüglich kann man von einem 1:2-Verhältnis sprechen. Sekretiertes IgE in der WT-Maus zeigt vergleichsweise zur Hax1^{-/-}-Maus ein 3:1-Größenverhältnis (Abbildung 40, B).

(A)



(B)

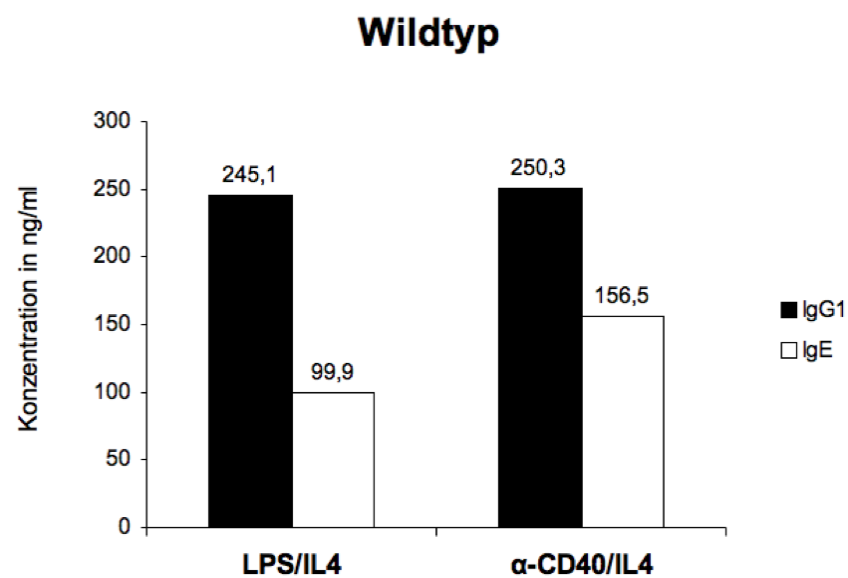


Abbildung 41: ELISA von gesorteten B-Zellen der WT- (B) und der Hax1^{-/-}-Maus (A), die *in vitro* mit LPS/IL4 und α-CD40/IL4 stimuliert wurden.

Die Menge an sekretiertem IgE in der WT- bzw. Hax1^{-/-}-Maus ist vom Proliferations-Stimulus abhängig. α-CD40/IL4-Stimulierung sorgt in der WT-Maus (Abbildung 41, B), im Gegensatz zur Hax1^{-/-}-Maus (Abbildung 41, A), für eine

höhere Anzahl sekretierter IgE-Antikörper, als vergleichsweise eine LPS/IL4-Induktion.

5.6. Einfluss von HAX1 auf die B-Zellentwicklung

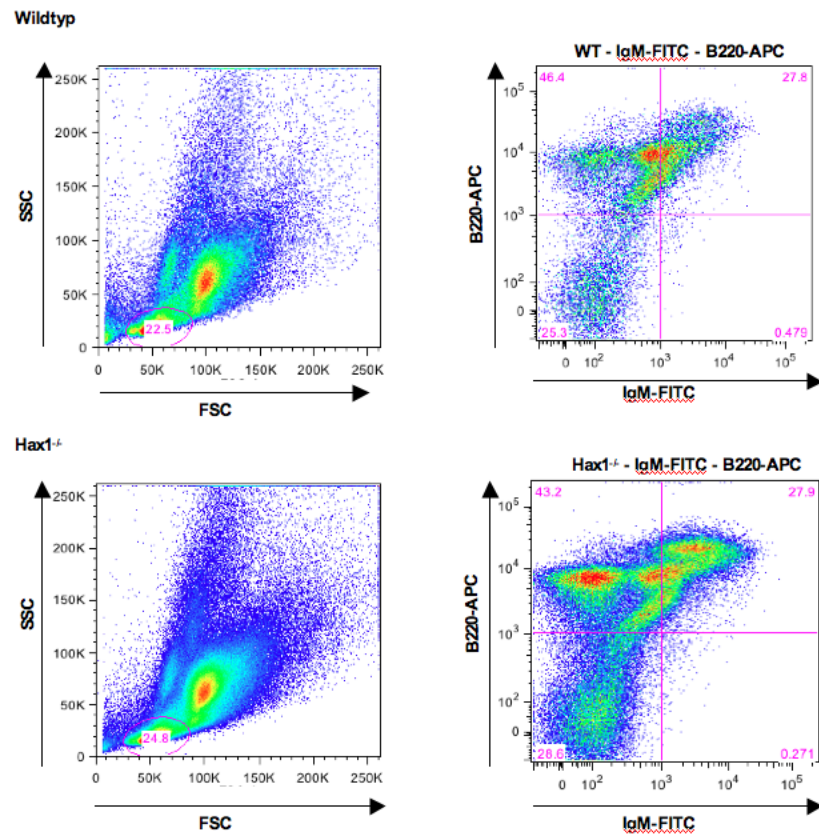
5.6.1. Verlust von HAX1 führt im Knochenmark zur Abnahme der Zellzahl

5.6.1.1. Quantifizierung von B220-IgM-/IgG1-/IgE-Zellen des Knochenmarks der naiven WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse via FACS-Analyse

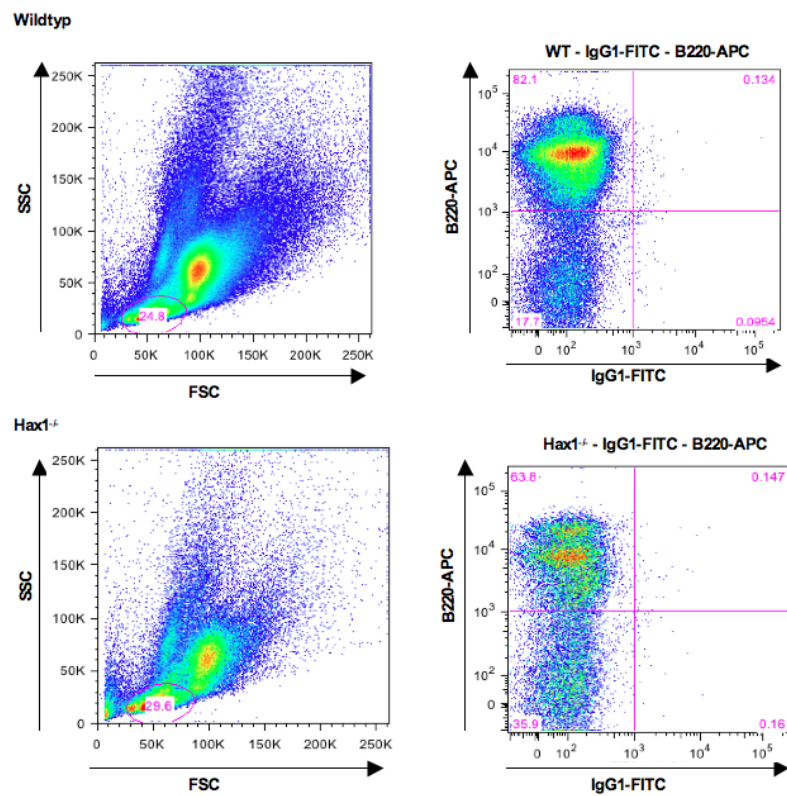
Nach vollendeter Reifung der B-Zellen im Knochenmark, werden IgM-positive, unreife Zellen an die Peripherie entlassen, wo diese Zellen bei Antigenkontakt in sogenannten "Reifungszentren" reifen und den Isotyp des BCR auf IgG und IgE ändern können. Diese Zellen sind zu diesem Zeitpunkt noch B220 positiv. Dies ändert sich im Verlauf der Plasmazellreifung, wobei sie dann B220 als Rezeptor verlieren und CD138 exprimieren. Die Plasmazelle stellt den Endpunkt der B-Zellreifung dar.

B220⁺/IgM⁺-Zellen liegen zwischen den WT und Hax1^{-/-}-Mausstämmen bezogen auf das Lymphozytengate in vergleichbaren Prozentsätzen vor (Abbildung 42, A). B220⁺/IgG1⁺-Zellen (Abbildung 42, B) sind naturgegeben keine nachzuweisen, da dieses B-Zellstadium in der Milz vorliegt. Für die B220⁺/IgE⁺-Färbung erscheinen sowohl im WT als auch in der Hax1^{-/-}-Maus Zellen positiv (Abbildung 42, C). Hierbei dürfte es sich aber nicht um eine reelle, sondern um eine unspezifische Färbung handeln.

(A)



(B)



(C)

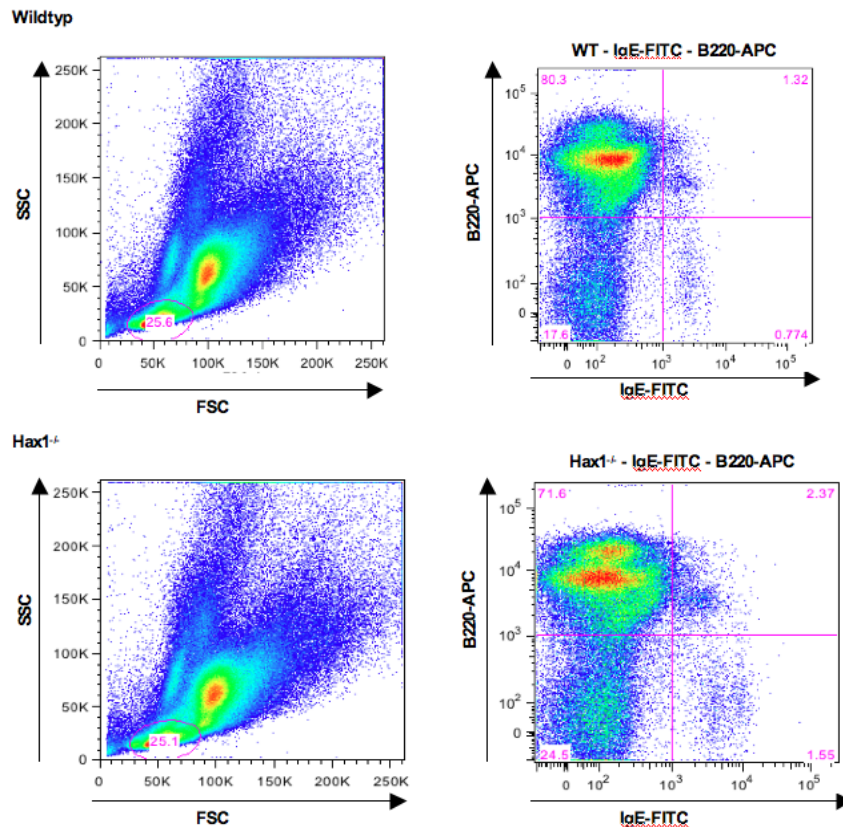
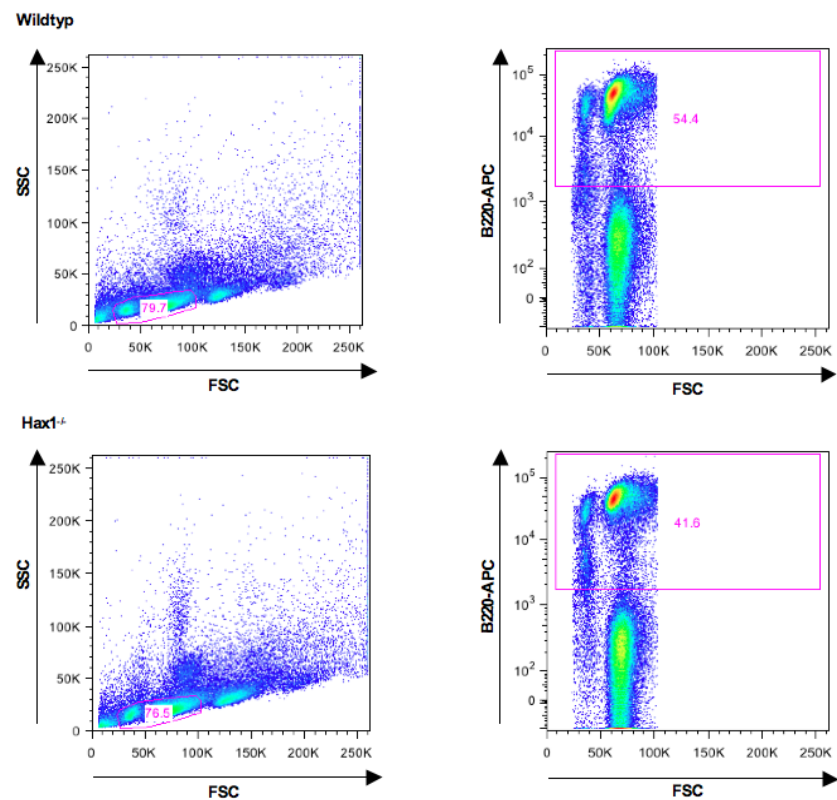


Abbildung 42: FACS-Analyse von Knochenmarkszellen einer naiven Hax1^{-/-}- und einer WT-Maus, die zum Nachweis von B220⁺/IgM⁺- (A), B220⁺/IgG1⁺- (B) bzw. B220⁺/IgE⁺-Zellen (C) entsprechend markiert wurden. Die Zellen wurden auf Lymphozyten im Forward und Side Scatter vorgegated. Die Zellen wurden mit Stripping Puffer vorbehandelt, worauf eine Doppelfärbung mit dem B220-APC- und dem IgM-, oder IgG1-, oder IgE-FITC-Antikörper folgte.

5.6.1.2. Quantifizierung der B220-Verteilung in Splenozyten von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via FACS-Analyse

Anlässlich einer vergleichenden Analyse der B220-Verteilung in Milzzellen wurde die Expression des B220-B-Zellmarkers durch Färbung mit dem entsprechenden Antikörper (B220-APC) im Durchflusszytometer analysiert.

(A)



(B)

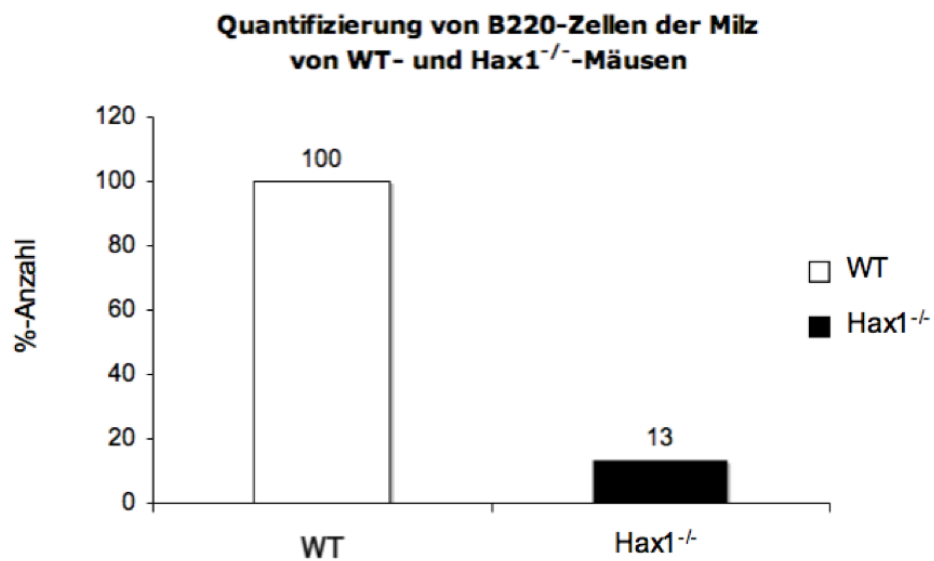


Abbildung 43: (A) FACS-Analyse von Milzzellen einer Hax1^{-/-}- und WT-Maus, die extrazellulär mit dem APC-gekoppelten B220-Antikörper markiert wurden; zuvor wurde ein FcR-Blocking

durchgeführt. (B) Graphische Darstellung der errechneten Zellzahlen an B220-Zellen der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Maus. Dabei wurde die B220⁺-Gesamtzellzahl (via Casy®-Bestimmung) in der WT-Maus als 100% angenommen und die B220⁺-Zellpopulation der Hax1^{-/-}-Maus in Relation zu der WT-Maus gestellt.

Zur Berechnung der %uellen Verteilung von B220-Milzzellen in der Hax1^{-/-}-Maus wurde die B220-Splenozytenzahl der WT-Maus als 100% angenommen (Abbildung 43, B), die zunächst zu berechnen war (Tabelle 4, A und B). In diesem Zusammenhang war erst ein "Lymphozyten-Gate" im Forward und Side Scatter der WT- und der Hax1^{-/-}-Mäuse zu setzen, um dann ausgehend von dieser Zellpopulation den %uellen B220-Zellbestand der WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse anzuzeigen.

Anfangs wurde die Zellzahl der gegateten B220-Zellpopulationen der Hax1^{-/-}- und WT-Mäuse berechnet. Dabei wurde die via FACS-ermittelte "Ereignis-Zellzahl" ("event count") als 100% angenommen und anhand der angegebenen Prozentzahl der gegateten B220-Population ermittelt. In der Folge wurde die errechnete B220-Zellzahl der Hax1^{-/-}- und WT-Maus mit einem bestimmten Faktor multipliziert, der die tatsächliche Zellzahl ergibt. Dieser Faktor berechnete sich wie folgt:

Gesamtzellzahl (via Casy®) : Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)

In weiterer Folge wurde der prozentuelle Anteil der effektiven B220-Zellzahl der Hax1^{-/-}-Maus berechnet, indem die absolute B220-Zellzahl der WT-Maus als 100% angenommen wurde und dabei in Relation zueinander gesetzt wurden. Wie in der Abbildung 43, B zu erkennen ist, kommt es in der Hax1^{-/-}-Maus zu einer B-Zellabnahme auf etwa 13% (Tabelle 4). Die verringerte Anzahl der B-Zellpopulation in der Milz lässt eine verringerte Immunreaktion vermuten.

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der B220⁺-Verteilung in der Milz der Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	22.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	220
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	76,50%
% der B220 ⁺ -Zellpopulation (Gate)	41,60%
Zellzahl der B220 ⁺ -Zellpopulation	76.501 Zellen
% der B220 ⁺ -Verteilung in der Milz	13,46%

(B)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der B220⁺-Verteilung in der Milz der WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	120.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	1200
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	79,70%
% der B220 ⁺ -Zellpopulation (Gate)	54,40%
Zellzahl der B220 ⁺ -Zellpopulation	79.697 Zellen

Tabelle 8: Berechnung der B220-Verteilung in der Milz der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

5.6.1.3. Kontrollanalyse von B220-gesorteten Zellen der Milz von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via FACS

Um die via „Pan B Cell Isolation Kit“-isolierten B-Milzzellfraktionen der WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse auf deren Reinheit zu überprüfen, wurde eine Kontrollfärbung mit dem B220-PE-Antikörper durchgeführt. Im Zuge der FACS-Analyse wurde von den „gemacsten“ B-Zellfraktionen der Milz beider Mausstämme die Menge von B220-exprimierenden Splenozyten bestimmt und gegenübergestellt.

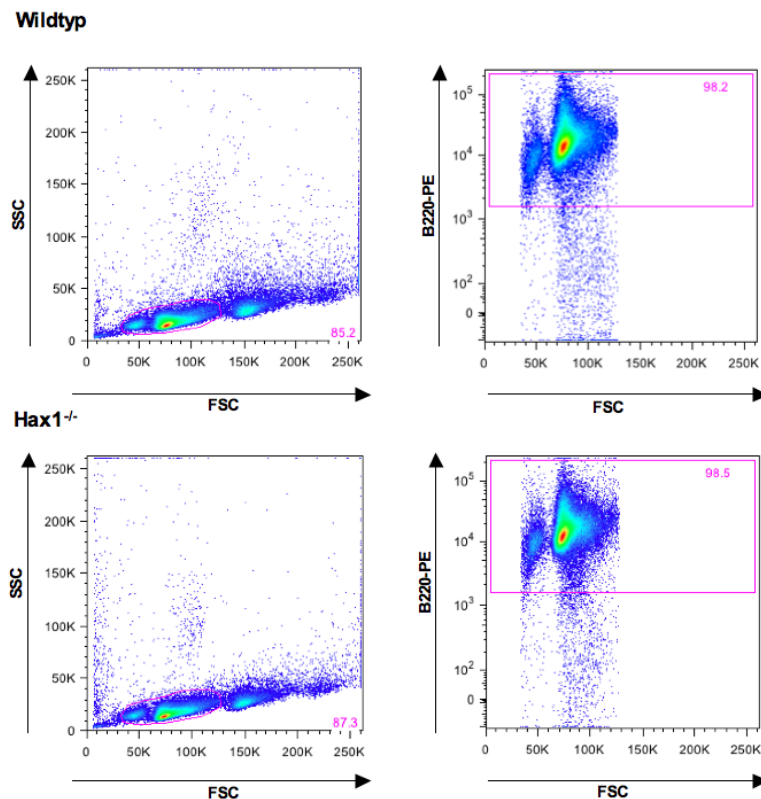


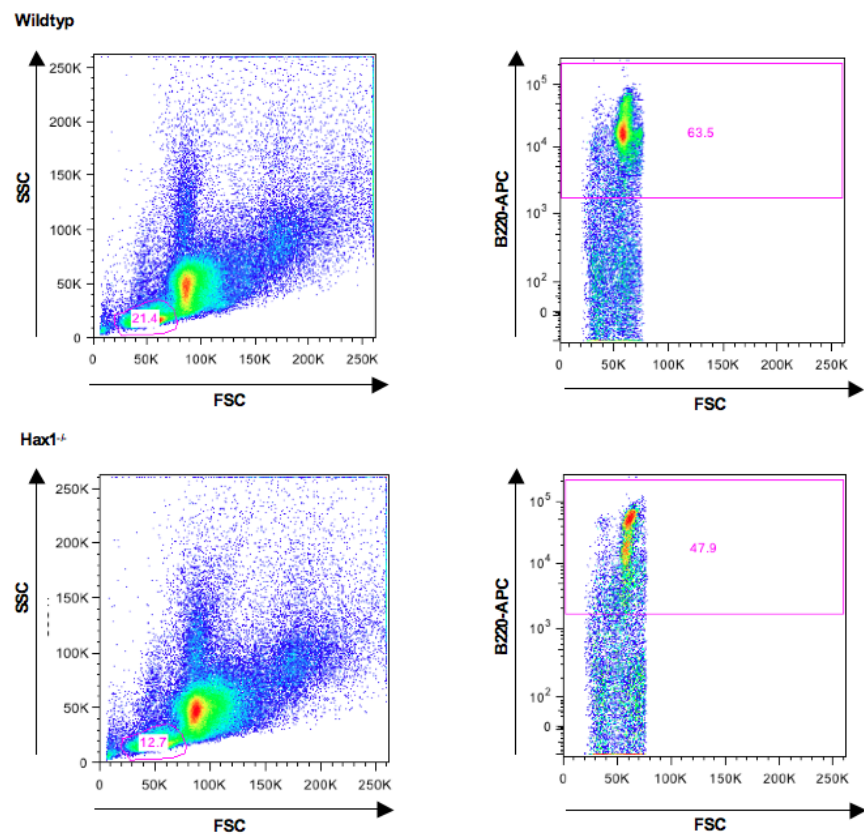
Abbildung 44: FACS-Analyse von B220-Splenozyten beider Mausstämme, die zunächst FcR-geblockt wurden und in der Folge extrazellulär mit dem PE-gekoppelten B220-Antikörper gefärbt wurden.

Bei der Kontrollfärbung wurden ausschließlich Zellen nachgewiesen, die das B220-Oberflächenprotein exprimieren, wobei sich eine Reinheit von 96,2% (WT) bzw. 98,5% ($Hax1^{-/-}$) herausstellte (Abbildung 44).

5.6.1.4. Quantifizierung der B220-Verteilung in Knochenmarkszellen von $Hax1^{-/-}$ - und WT-Mäusen via FACS-Analyse

Um Vergleiche zwischen der B220-Verteilung in Knochenmarkszellen von $Hax1^{-/-}$ - und WT-Mäuse anzustellen, wurde eine Färbung mit dem APC-gekoppelten B220-Antikörper vorgenommen und wie im Punkt 5.6.1.2. beschrieben, berechnet und in Relation gesetzt.

(A)



(B)

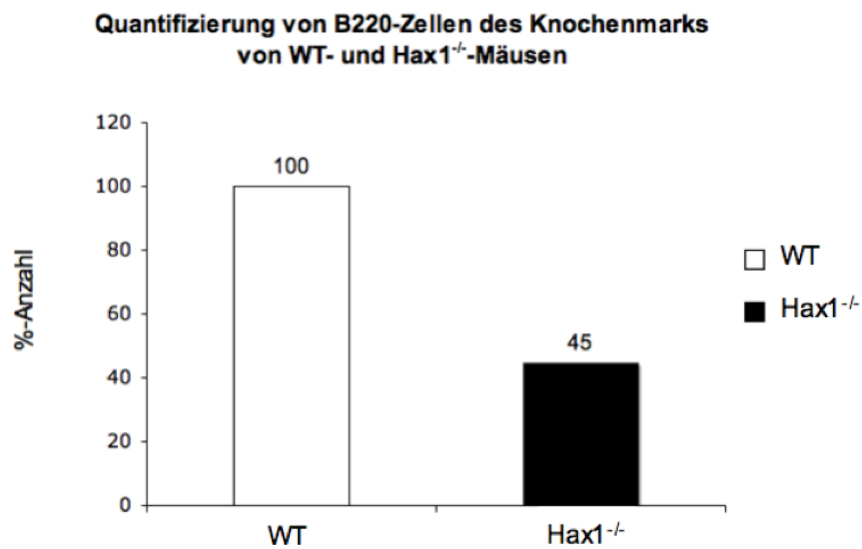


Abbildung 45: (A) FACS-Analyse von B220-Knochenmarkszellen der WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse. Diese wurden vor der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper-Färbung geblockt, um unspezifische

Antikörper-Bindungen während der Farbreaktion zu verhindern. Die B220-APC-Bindung sorgt somit für eine B-Zell-Detektion. (B) Das Diagramm zeigt die errechneten %uellen Zellzahlen an B220-Zellen des Knochenmarks von einer WT- und Hax1^{-/-}-Maus. Die Zellzahl der WT-Maus wurde als 100% angenommen.

Im Wildtyp (63,5%) wurde eine höhere Menge von B220-Zellen detektiert, als im Vergleich zur Hax1^{-/-}-Maus (47,9%) (Abbildung 45, A). Demnach konnte in der Hax1^{-/-}-Maus eine etwa um die Hälfte niedrigere B220-Zellzahl, relativ zur WT-Maus, festgestellt werden (Abbildung 45, B).

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse der B220-Verteilungen in Knochenmarkszellen wurden die kalkulierten Beträge der Hax1^{-/-}- (Tabelle 5, A) und WT-Maus (Tabelle 5, B) tabellarisch angeführt.

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der B220⁺-Verteilung im Knochenmark der Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	14.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	140
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	12,70%
% der B220 ⁺ -Zellpopulation (Gate)	47,90%
Zellzahl der B220 ⁺ -Zellpopulation	12.663 Zellen
% der B220 ⁺ -Verteilung im Knochenmark	44,65%

(B)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der B220⁺-Verteilung im Knochenmark der WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	14.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	140
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	21,40%
% der B220 ⁺ -Zellpopulation (Gate)	63,50%
Zellzahl der B220 ⁺ -Zellpopulation	21.366 Zellen

Tabelle 9: Berechnung der B220-Verteilung im Knochenmark der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

In dieser Arbeit wurde bereits unter Punkt 5.3. bestätigt, dass der HAX1-Verlust die Zellzahl beeinflusst. Auch vorausgegangene Untersuchungen von Peckl-Schmid et al. (74) und Wolkerstorfer et al. (72) belegen eine eindeutige Zellzahlabnahme.

5.6.1.5. Kontrollanalyse von B220-gesorteten Zellen des Knochenmarks von Hax1^{-/-} und WT-Mäusen via FACS

Die Kontroll-Färbung von via „Pan B Cell Isolation Kit“-isolierten B-Zellen des Knochenmarks sollte zur Überprüfung der Reinheit der gemachten Knochenmarkszellen beider Mausstämmen dienen, um den mengenmäßigen Anteil von B220-positiven Zellen zu bestimmen.

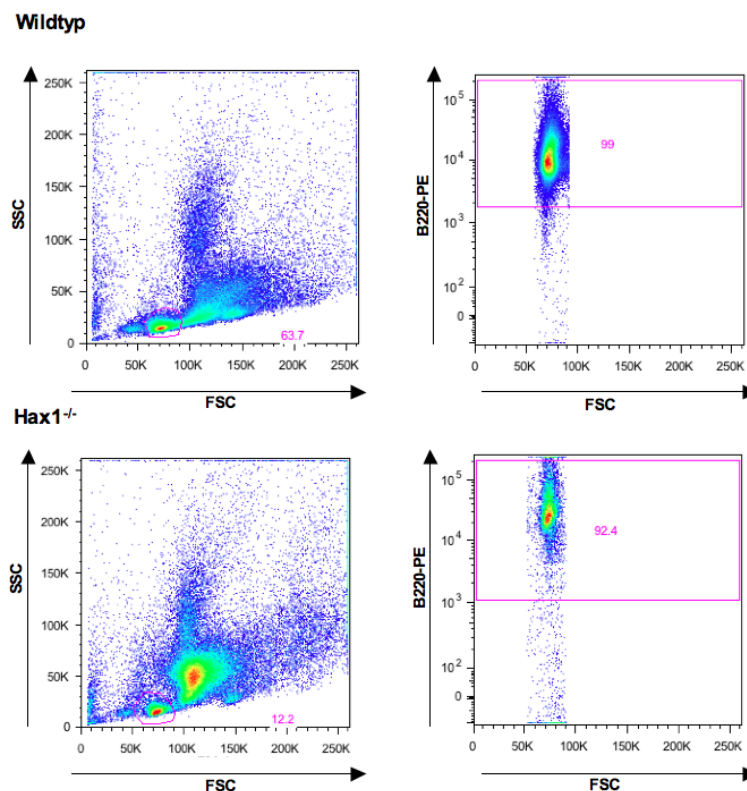


Abbildung 46: FACS-Kontrolle von via „Pan B Cell Isolation Kit®“ (Miltenyi Biotech) isolierten B-Zellen des Knochenmarks der Hax1^{-/-} und WT-Maus, die mit dem PE-gekoppelten B220-Antikörper markiert wurden. Vor der B220-Färbung wurde allerdings ein FcR-Blocking durchgeführt.

Im Zuge der FACS-Auswertung wurden 99% der isolierten WT-B-Zellen des Knochenmarks als B220-positive Zellen bestimmt. In der Hax1^{-/-}-Maus wurde ein etwas niedrigerer Reinheitsgrad von 92,4% nachgewiesen (Abbildung 46).

5.7. Der Einfluß von HAX1 auf die CXCR4-Expression

Der CXCR4-Rezeptor wird von unterschiedlichen B-Zell-Stadien exprimiert. CXCR4 interagiert mit seinem Bindungspartner, dem sogenannten CXCL12 oder SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), das von den Stromazellen im Knochenmark sekretiert wird. CXCL12/SDF-1 sorgt für die Zurückhaltung von Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark.

5.7.1. CXCR4-Expression wird in B-Zellen des Knochenmarks der Hax1^{-/-}-Mäuse herunterreguliert

5.7.1.1. Untersuchung der CXCR4-Verteilung in B-Zellen des Knochenmarks von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen

Anhand der Auswertung der Real Time-Analyse wurde eine tendenziell geringere CXCR4-Expression (pValue 0,7225) in Hax1^{-/-}-Mäusen beobachtet (Abbildung 47).



Abbildung 47: Die Datenanalyse einer Real Time von Knochenmarkszellen aus Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen ist als Punkte-Diagramm dargestellt. Das Arbp-Gen (Arbp; acidic ribosomal

phosphoprotein), ein sogenanntes Housekeeping-Gen, wird als Referenz eingesetzt. Infolge der stabilen und vergleichbaren Expressionsstärke des Referenzgens ist eine Auswertung der RT-PCR Ergebnisse möglich. Die schwarze, horizontale Linie stellt den MW des jeweiligen Mausstammes dar.

Via „Pan B Cell Isolation Kit®“-isolierte B-Zellen aus dem Knochenmark von $Hax1^{-/-}$ -Mäusen (MW: 0,0176) zeigen eine verringerte CXCR4-Expression, im Vergleich zu WT-Mäusen (MW: 0,0208). Die niedrigere CXCR4-Menge in den $Hax1^{-/-}$ -Mäusen ist aber nicht signifikant geringer, da in jedem der beiden Mausstämme jeweils ein „Ausreißer“ zu verzeichnen war (Abbildung 47).

5.7.1.2. Untersuchung der CXCR4-Verteilung von B220-gesorteten Zellen des Knochenmarks von $Hax1^{-/-}$ - und WT-Mäusen

In diesem Fall wurden die Knochenmarkszellen via BD FACS Aria III Zellsorter nach entsprechender B220-Markierung gesortet, um anschließend einen Mengenunterschied von CXCR4-RNA-Transkripten zwischen den beiden Mausstämmen zu bestimmen.



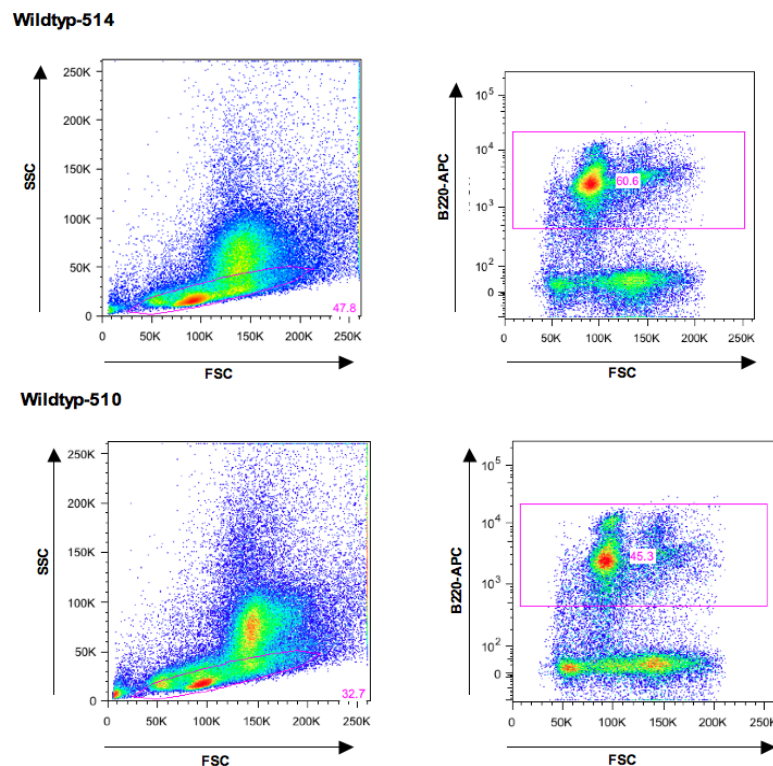
Abbildung 48: Streudiagramm einer CXCR4-Real Time Analyse von B220-gesorteten Knochenmarkszellen der $Hax1^{-/-}$ - und WT-Mäuse (n = 2). Nach Isolierung der Knochenmarkszellen

wurde eine Erylyse der Zellen angeschlossen. Dann erfolgte die α -B220-APC-Färbung, mit anschließender Isolierung der B220-positiven Zellen via BD FACS Aria III-Zellsorter. In weiterer Folge wurden die B220-Zellen reanalysiert und auf deren Oberflächenstruktur (APC-geoppelt) bzw. Größe (FSC) hin aufgetrennt. Der Lauf der Real-Time Analyse wurde um etwa 15 Zyklen verlängert, womit die Laufzeit ca. 3 h betrug.

Die Symbole entsprechen jeweils einem CXCR4-Einzelwert einer Maus. Mit Hilfe der Real Time Datensätze wurde jeweils der MW eines Mausstammes ($Hax1^{-/-}$: 0,0641; WT: 0,0657) errechnet, der im Diagramm in Form einer schwarzen, horizontalen Linie dargestellt ist. Dabei waren geringfügige Unterschiede (pValue 0,9545) an CXCR4-Werten zwischen den WT- und $Hax1^{-/-}$ -Mäusen zu erkennen (Abbildung 48).

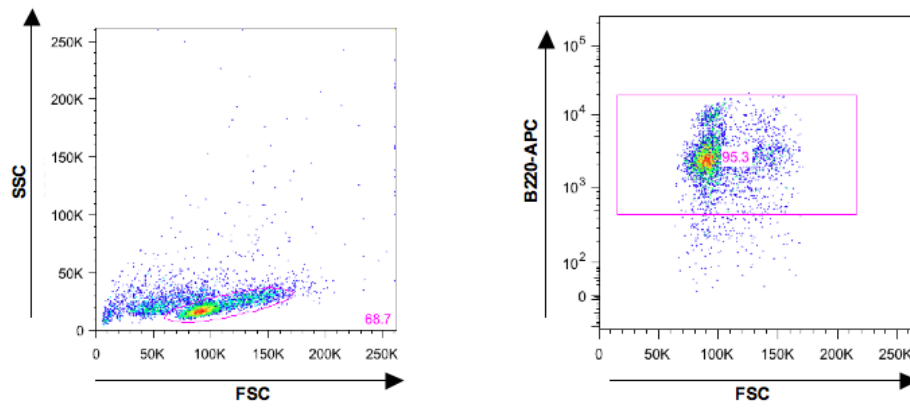
Mit Hilfe des Zellsortierers (BD FACS Aria III cell sorter) wurden Zellen, die den Oberflächenmarker B220 tragen isoliert, um eine anschließende Expressionsanalyse des CXCR4 mittels der Real Time Methode durchzuführen.

(A)



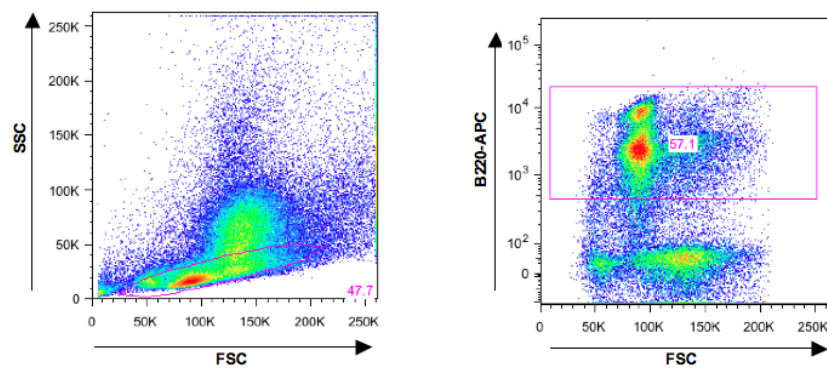
(B)

Reanalysierte B220-Zellfraktion des Wildtyp

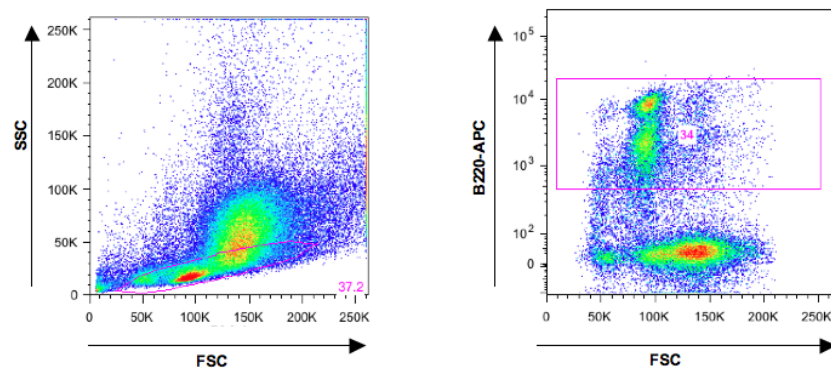


(C)

Hax1^{-/-}516



Hax1^{-/-}518



(D)

Reanalyzierte B220-Zellfraktion der Hax1^{-/-}

Hax1^{-/-}520

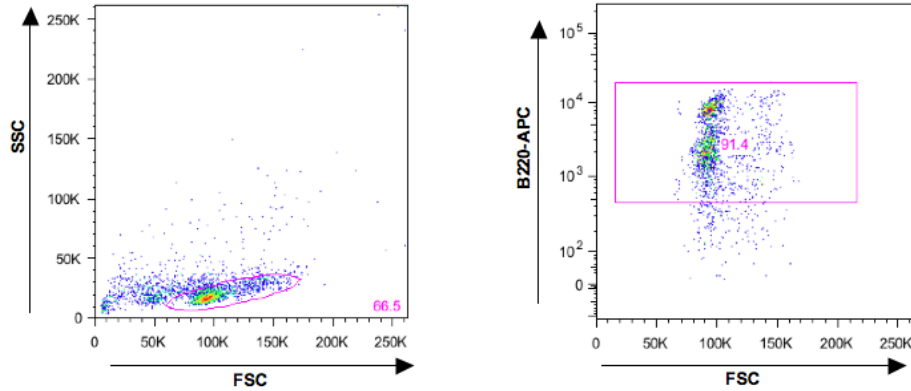


Abbildung 49: (A) Sorting von B220-markierten Knochenmarkszellen der WT-Mäuse (WT₅₁₄, WT₅₁₀) via FACS ARIA III; (B) Reanalyzierte B220-Zellfraktion einer WT-Maus; (C) Sorting von B220-markierten Knochenmarkszellen der Hax1^{-/-}-Mäuse (Hax1^{-/-}₅₁₆, Hax1^{-/-}₅₁₈) via FACS ARIA III; (D) Reanalyzierte B220-Zellfraktion einer Hax1^{-/-}-Maus;

In der Reanalyse wird die B220-Zellfraktion erneut auf deren Oberflächenstrukturen (Fluoreszenzsignal via B220-PE-Antikörper) hin untersucht. Die Reinheit der B220-Population der WT-Maus ergab 95,3% (Abbildung 49, B) und die der Hax1^{-/-}-Maus 91,4% (Abbildung 49, D). Um Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen aufzuzeigen, wurde weiters der gemittelte B220-Prozentwert der beiden WT-Mäuse (WT₅₁₄ = 60,6%, WT₅₁₀ = 45,3%; MW: ~ 53%) dem prozentuellen B220-Mittelwert der beiden Hax1^{-/-}- Mäuse (Hax1^{-/-}₅₁₆ = 57,1%, Hax1^{-/-}₅₁₈ = 34%; MW: ~ 45%) gegenübergestellt.

5.7.2. Die Zellen des Gesamtknochenmarks von Hax1^{-/-}-Mäusen zeigen keine veränderte CXCR4-Expression

5.7.2.1. Untersuchung der CXCR4-Verteilung in Knochenmarkszellen von WT- und der Hax1^{-/-}-Maus via Real Time Analyse

In diesem Fall wurde die gesamte Zellpopulation an Knochenmarkszellen zur Untersuchung der CXCR4-RNA-Mengen von beiden Mausstämmen im Zuge einer Real Time Analyse herangezogen.

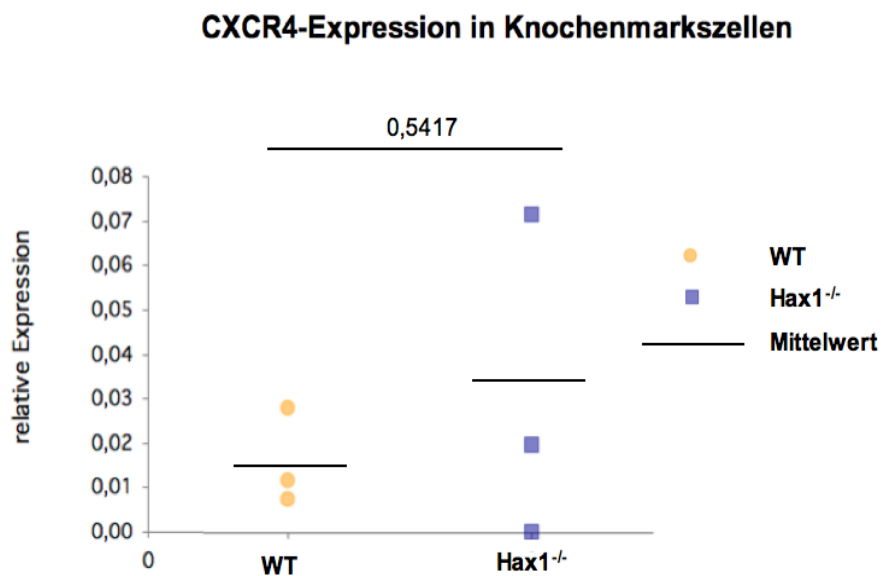


Abbildung 50: Streudiagramm einer CXCR4-Real Time Analyse der gesamten Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen. Jeder Symbolpunkt entspricht einem Einzelwert einer Maus. Dabei wurde der MW aus den errechneten Log-Werten ermittelt und entsprechend im Diagramm eingezeichnet. Der Lauf der Real Time Analyse wurde um etwa 15 Zyklen verlängert, womit die Laufzeit ca. 3 h betrug.

Entsprechend des oben dargestellten Diagramms waren kaum Unterschiede (pValue 0,5417) an CXCR4-Werten zwischen den WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen erkennbar (Abbildung 50).

5.7.2.2. Untersuchung der intrazellulären CXCR4-Verteilung (CXCR4-Fixed-Färbung) in B-Zellen des Knochenmark von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen via FACS-Analyse

Durch eine intrazelluläre CXCR4-Färbung von via „Pan B Cell Isolation Kit®“-isolierten B-Zellen des Knochenmarks wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich unterschiedlicher CXCR4-Level in WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen via FACS-Analyse angestellt (Abbildung 51, A).

Um die intrazellulären Proteinmengen des Cytokins CXCR4 zu messen, wurde die Membran der Knochenmarkszellen im Zuge eines Permeabilisierungsschrittes durchlässig gemacht, um anschließend mit einem speziellen Färbeprotokoll eine Färbereaktion zu erzielen. Die angefärbten Strukturen wurden im Durchflusszytometer quantitativ bestimmt, wobei die markierten Proteingruppen mit der Fluoreszenzintensität korrelieren (Abbildung 51).

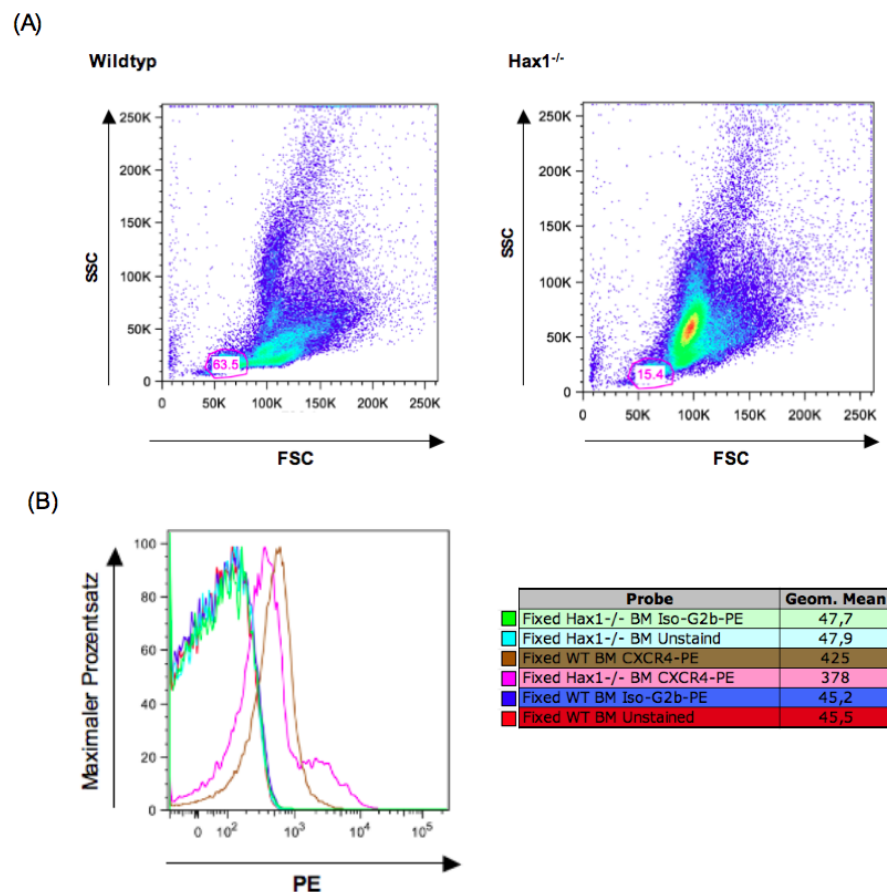


Abbildung 51: FACS-Analyse von via Pan B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech)-isolierten B-Zellen des Knochenmarks, die mit PE-gekoppelten CXCR4-Antikörpern intrazellulär gefärbt wurden. (A) Die Lymphozyten wurden im Forward und Side Scatter der WT- und der Hax1^{-/-}-Maus vorgegated. (B) Histogramm von B-Zellen des Knochenmarks (pregated auf Lymphozyten) von einer repräsentativen WT- und Hax1^{-/-}-Maus. Zusätzlich wurde zur Isotypkontrolle mit einem IgG2b-PE-Antikörper gefärbt. Nach der Erylyse wurden aus den präparierte Knochenmarkszellen die B-Zellen via "Pan B Cell Isolation Kit" der Firma Miltenyi Biotech isoliert (siehe Punkt 4.1.5.1.). Die Zellzahl wurde vor und nach der Erylyse via Casy® berechnet. Nach dem FcR-Blocking wurden die Zellen mit einer Fixierungslösung der Firma BD Biosciences behandelt und folglich mit dem PE-gekoppelten CXCR4-Antikörper gefärbt.

In Abbildung 51 A ist eindeutig ersichtlich, dass der Pan B Cell Isolation Kit® (funktioniert aufgrund von Depletion) eingeschränkt funktioniert. Die meisten Vorläuferzellen besitzen noch keine Oberflächenmarker und können daher durch den vorhandenen Antikörpercocktail nicht depletiert werden. Bei einem großen Anteil der isolierten Zellen handelt es sich um Granulozyten. Von den mittels Pan B Cell Kit-isolierten vermeintlichen B-Zellen befinden sich im angezeigten Lymphozytengate der WT-Maus nur 63,5% und der Hax1^{-/-}-Maus nur 15,4% der Zellen. Hierbei wird auch offensichtlich, dass aufgrund der unterschiedlichen Kontamination der B-Zellfraktion der beiden Mausstämme diese nicht unmittelbar vergleichbar sind. Trotzdem zeigt die Hax1^{-/-}-Maus eine eindeutig geringere CXCR4-PE-Färbung. Der braun-gefärbte Graph, der für die WT-Maus steht, verläuft sichtlich weiter rechts als der pink-eingefärbte Graph, der den Hax1^{-/-}-Mausstamm repräsentiert. Dies spricht für eine mengenmäßig höhere CXCR4-Expression in der WT-Maus, als vergleichsweise in der Hax1^{-/-}-Maus. Dabei beträgt der geometrische Mean der fixierten B-Zellen des Knochenmarks der WT-Maus 425, während der der Hax1^{-/-}-Maus 378 ausmacht. Demzufolge ist die CXCR4-Expression in der WT-Maus etwas höher als in der Hax1^{-/-}-Maus (Abbildung 51, B).

5.7.3. CXCR4-Expression wird in B-Zellen der Milz in Hax1^{-/-}-Mäusen herunterreguliert

5.7.3.1. Untersuchung der CXCR4-Expression in B-Zellen der Milz von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time Analyse

Zur Untersuchung der unterschiedlichen CXCR4-Expression in B-Zellen der Milz (isoliert mittels Pan B Cell Isolation Kit®, Miltenyi Biotec) wurde von acht Wochen alten Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen eine Real Time Analyse durchgeführt.

(A)

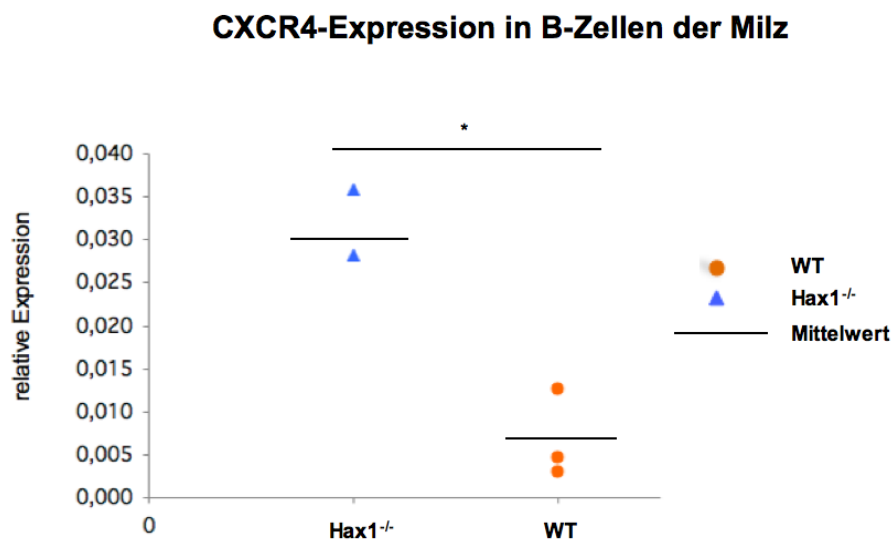


Abbildung 52: Punkte-Diagramm einer CXCR4-Real Time Analyse von Hax1^{-/-}- und WT-isolierten B-Zellen der Milz. Es wurde die CXCR4-cDNA von B-Zellen der Milz von Hax1^{-/-}- (n = 2) und WT-Mäusen (n = 3) unter Verwendung des Houskeeping-Gens Arbp als Referenzwert miteinander verglichen. pValue 0,0135 wurde mittels student's T-Test errechnet.

In diesem Experiment kommt in der B-Zellfraktion der Milz von Hax1^{-/-}-Mäusen eine bis zu 5fach höhere CXCR4-Transkriptmenge vor, als in der WT-Maus (Abbildung 52). Gegenteilig aller derzeitigen Meinungen und ermittelten Ergebnissen war dennoch in diesem Versuch eine deutlich höhere CXCR4-

Transkriptmenge in der Hax1^{-/-}-Maus, als im Vergleich zur WT-Maus verzeichnet worden.

5.7.3.2. Quantifizierung der intrazellulären CXCR4-Expression in B-Zellen der Milz von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via FACS-Analyse

Um Vergleiche zwischen WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen hinsichtlich derer CXCR4-Verteilung in B-Zellen der Milz anzustellen, wurde eine intrazelluläre Färbung des Rezeptorproteins CXCR4 (CXCR4-Fixed-Färbung) vorgenommen, um anhand der FACS-Analyse entsprechende Unterschiede aufzeigen zu können (Abbildung 53).

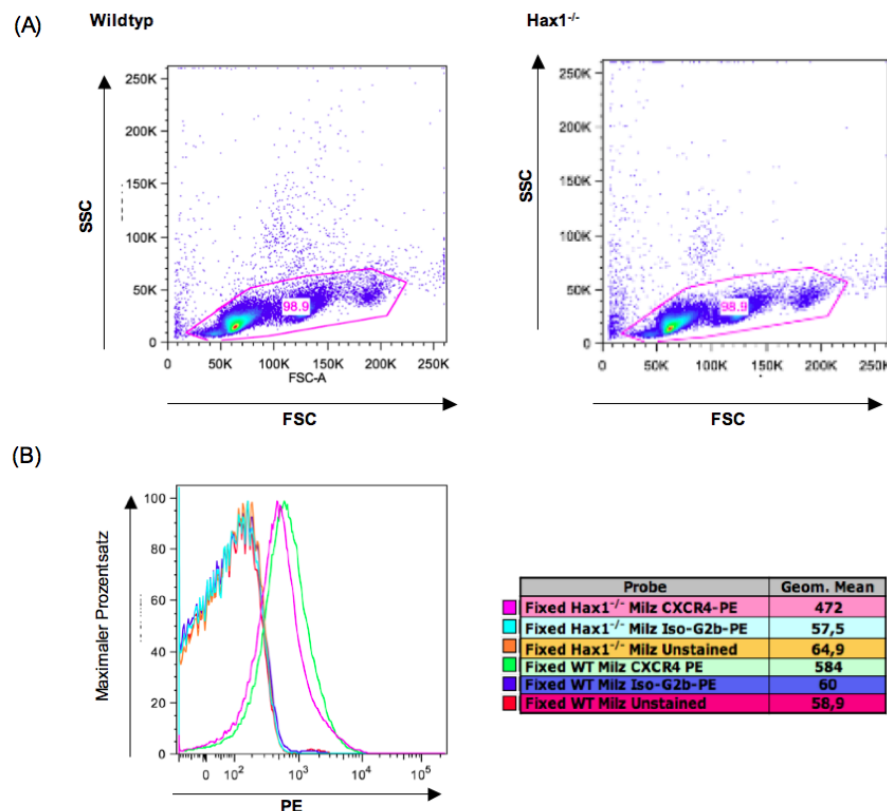


Abbildung 53: FACS-Analyse von isolierten B-Zellen der Milz, die mit PE-gekoppelten CXCR4-Antikörpern intrazellulär gefärbt wurden. (A) Es ist eine repräsentative B-Zellkultur der Milzzellen einer WT- und Hax1^{-/-}-Maus gezeigt. (B) Histogramm von isolierten B-Zellen der Milz von einer repräsentativen WT- und Hax1^{-/-}-Maus. Gleichzeitig wurde für die Isotypkontrolle mit PE-Iso-gekoppelten IgG2b-Antikörper gefärbt.

B-Zellen wurden via "Pan B Cell Isolation Kit ®" der Firma Miltenyi Biotech isoliert und folglich mit dem Fc-Blocking-Reagenz versetzt. Via des "Fixation/Permeabilization Kit" der Firma BD Bioscience wurden die Zellen fixiert und mit dem PE-gekoppelten CXCR4-Antikörper gefärbt.

Der pink-eingefärbte Graph, der für die Hax1^{-/-}-Maus steht, verläuft geringfügig weiter links als die grün-gefärbte Verlaufskurve der WT-Maus. Dies spricht dafür, dass CXCR4 in der WT-Maus häufiger exprimiert wird und somit quantitativ häufiger vorliegt, als in der Hax1^{-/-}-Maus (Abbildung 53, B).

5.7.4. CXCR4-Expression wird in den gesamten Splenozyten von Hax1^{-/-}-Mäusen herunterreguliert

Anlässlich der Ergebnisse der Untersuchung der CXCR4-Verteilung in B-Zellen der Milz von beiden Mausstämmen wurde eine weitere Untersuchung hinsichtlich der CXCR4-Verteilung in den gesamten Milzzellen beider Mausstämmen ermittelt.

5.7.4.1. Untersuchung der CXCR4-Verteilung in Milzzellen von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time-Analyse

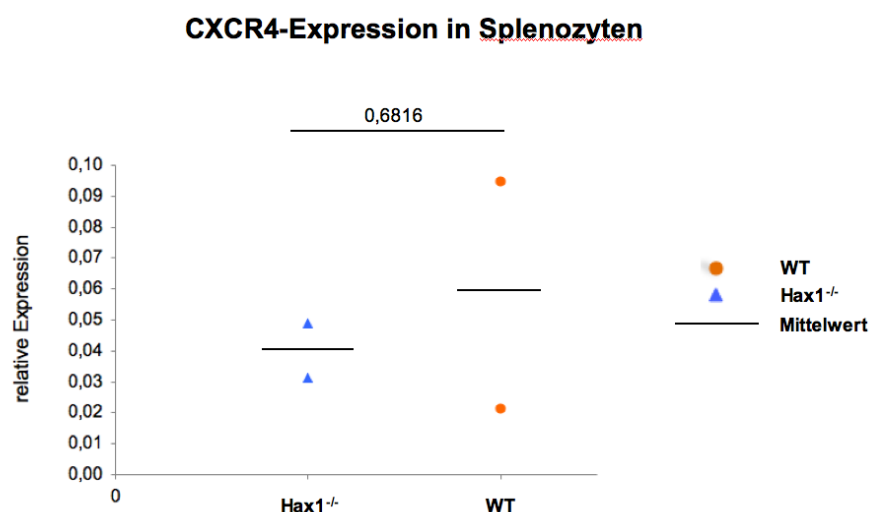


Abbildung 54: Streudiagramm einer CXCR4-Real Time Analyse von Splenozyten der WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse (n = 2). Es wurde die CXCR4-Mengenverteilung in Hax1^{-/-}-Mäusen mit der von WT-Mäusen verglichen, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede erfasst wurden (pValue 0,6816). Anhand der Real Time Daten wurden die Log-Werte berechnet, aus denen die Mittelwerte berechnet wurden. Unter Verwendung des Arbp-Proteins als Referenzwert wurde die relative Expression von CXCR4 bestimmt.

Aus den ermittelten Log-Werten wurden die Mittelwerte des jeweiligen Mausstammes errechnet und graphisch im Diagramm in Form einer schwarzen, horizontalen Linie dargestellt. Bei der Gegenüberstellung der Mittelwerte ist erkennbar, dass die WT-Mäuse (MW: 0,0580) eine geringfügig größere CXCR4-Transkriptmenge aufweisen, als die Hax1^{-/-}-Mäuse (MW: 0,0401). Trotz ähnlicher Zahlenwerte, ist dennoch eine tendenziell höhere CXCR4-Expression im WT festzumachen (Abbildung 54).

5.8. Einfluss von HAX1 auf das Stromazell-Milieu

5.8.1.1. Untersuchung der IL1RA-Verteilung in Knochenmarkszellen einer Non-B-Zellfraktion von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time Analyse

Da die Real Time Analysen von B-Zellfraktionen der verschiedenen Mausstämme keine eindeutigen Ergebnisse ergaben, wurden Real Time Analysen von Nicht-B-Zellen der beiden Mausstämme durchgeführt, um Vergleiche dahingegen anzustellen.

Bei den zuvor angeführten B-Zellisolierungen mittels "Pan B Cell Isolation Kits®" (Miltenyi Biotech) wurde die Nicht-B-Zellfraktion für eine IL1RA-Real Time Analyse verwendet (Abbildung 55).

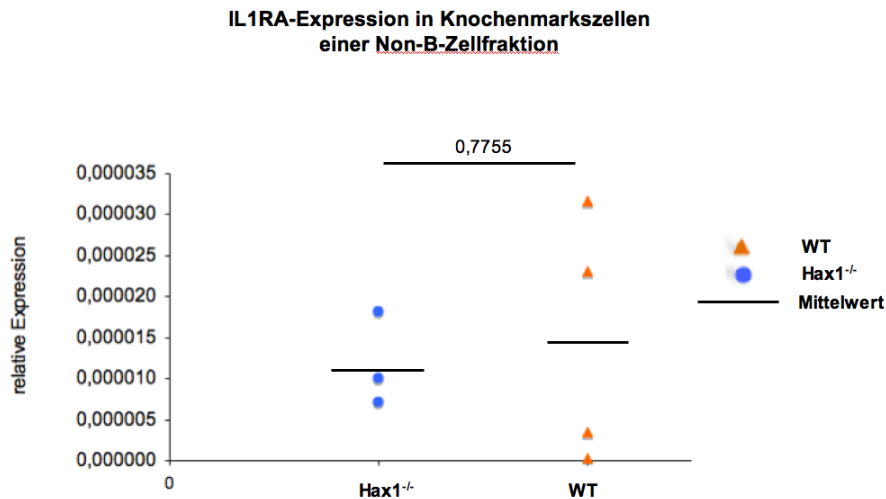


Abbildung 55: Punkte-Diagramm einer IL1RA-Real Time Analyse von Knochenmarkszellen einer Non-B-Zellfraktion der Hax1^{-/-}- und WT-Mäuse. Es werden die cDNA-Level beider Mausstämmen miteinander verglichen. Die Real Time Daten wurden mit Hilfe des “Houskeeping”- Proteins (Arbp-Protein), das als Referenzwert fungiert, gemessen.

Aus den errechneten Log-Werten wurde der Mittelwert einer jeder Maus kalkuliert. Anhand der im Diagramm eingezeichneten Mittelwerte kann kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen festgestellt werden. Ein Vergleich der Zahlenwerte lässt eine tendenziell höhere IL1RA-Transkriptmenge in WT-Mäusen (MW: 0,0000146) erkennen, als vergleichsweise in Hax1^{-/-}-Mäusen (MW: 0,0000117). Da es innerhalb der Mausgruppen zu großen Schwankungen der IL1RA-Levels kam, konnte keine statistische Relevanz festgestellt werden (pValue 0,7755).

5.8.1.2. Untersuchung der IL1RA-Verteilung in Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time Analyse

Zur Ermittlung einer veränderten IL1RA-Produktion in der Milz von Hax1^{-/-}-Mäusen wurde eine Real Time Analyse durchgeführt und mit der von WT-Mäusen verglichen.

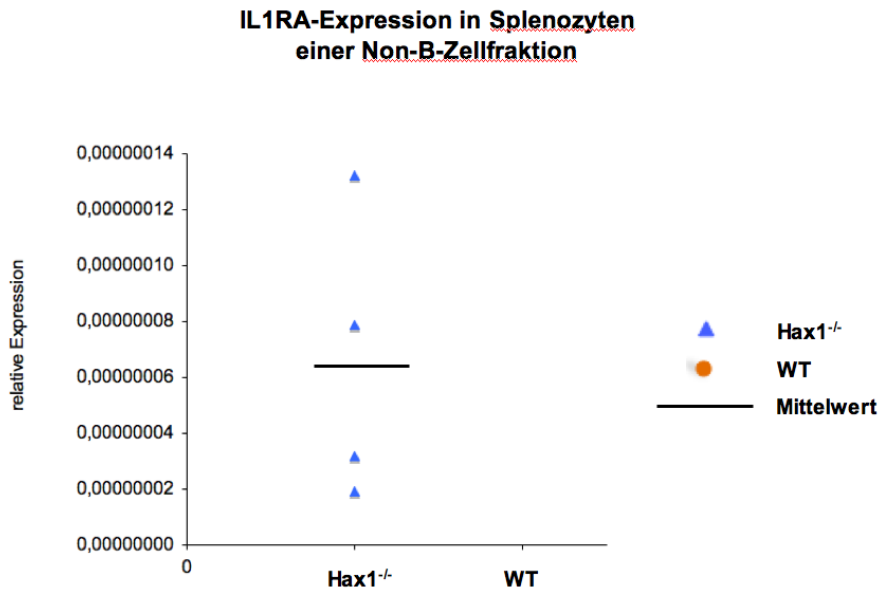


Abbildung 56: Streudiagramm einer IL1RA-Real Time Analyse von Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion der Hax1^{-/-}- und WT-Mäuse. Der MW der HAX1^{-/-}-Maus ist dargestellt.

Überraschenderweise wurde in keiner der WT-Mäuse (n = 4) ein IL1RA-Transkript nachgewiesen, wonach anzunehmen ist, dass in den Milzzellen der Nicht-B-Zellfraktion kein IL1RA exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte in den Hax1^{-/-}-Mäusen (n = 4) eine relative Menge der Transkriptionslevel der IL1RA-RNA (MW: Hax1^{-/-}: 0,0000000655) verzeichnet werden (Abbildung 56).

5.8.2. IL6 zeigt kein verändertes Expressionsverhalten in Hax1^{-/-}-defizienten Mäusen

5.8.2.1. Untersuchung der IL6-Verteilung in Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time Analyse

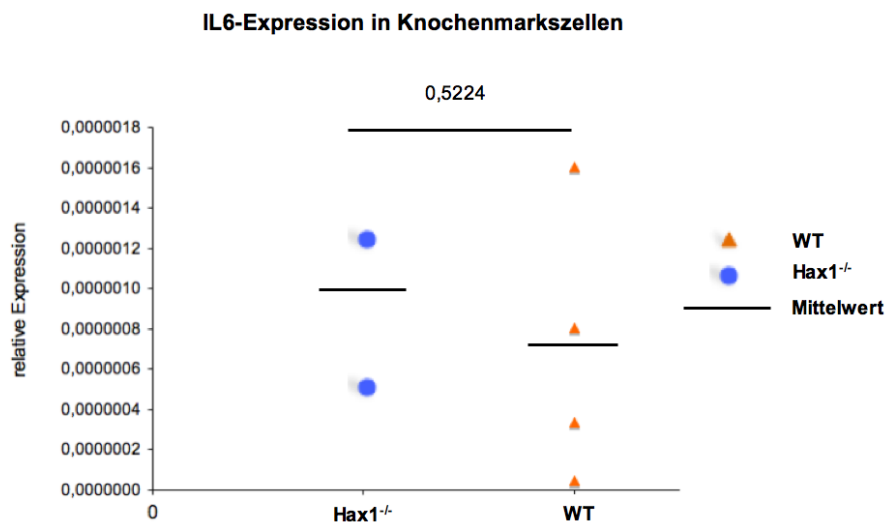


Abbildung 57: Streudiagramm einer IL6-Real Time Analyse von Knochenmarkszellen der Hax1^{-/-}- und WT-Mäuse. Es wurde die cDNA-Menge eines jeden Mausstammes miteinander verglichen.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in den Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen keine veränderte IL6-Expression vorliegt (MW: Hax1^{-/-}: 0,000001009; WT: 0,000000698). Aufgrund der auftretenden Schwankungen innerhalb eines Mausstammes, konnte keine statistisch signifikante Relevanz festgestellt werden (pValue 0,5224). Der MD (nicht eingezeichnet; Hax1^{-/-}: 0,000001258; WT: 0,000000570) gibt den Mittelwert der Hauptpopulation innerhalb eines Mausstammes an. Dieser wird von Ausreißer-Werten kaum beeinflusst (Abbildung 57).

5.8.2.2. Weitere Untersuchung der IL6-Verteilung in Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time Analyse

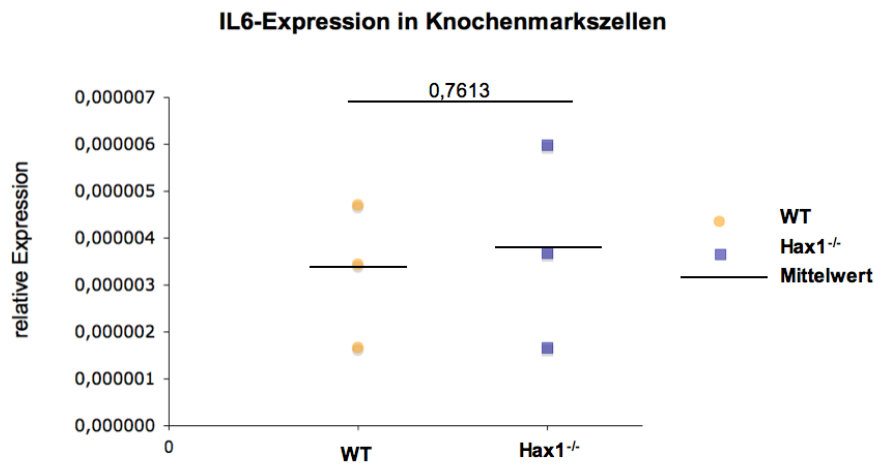


Abbildung 58: Streudiagramm einer IL6-Real Time Analyse von Knochenmarkszellen der WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse. Es wurden die errechneten Log-Werte einer jeden Maus als Symbol im Diagramm dargestellt. Ein Symbol entspricht jeweils einem Einzelwert einer Maus. Die MW jedes Mausstammes wurden bestimmt und eingezeichnet.

Hinsichtlich der Untersuchung der unterschiedlichen IL6-Expression in WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen konnte ein geringfügig höherer IL6-Anteil in Hax1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Da es innerhalb der Mausgruppen zu großen Schwankungen der IL6-Verteilung kam, konnte keine statistische Relevanz nachgewiesen werden. Die Symbole stellen die gemessenen Einzelwerte jedes Tieres dar, wobei für jeden Mausstamm ein anderes Symbol steht (Abbildung 58).

5.8.2.3. Weitere Untersuchung der IL6-Verteilung in Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time Analyse

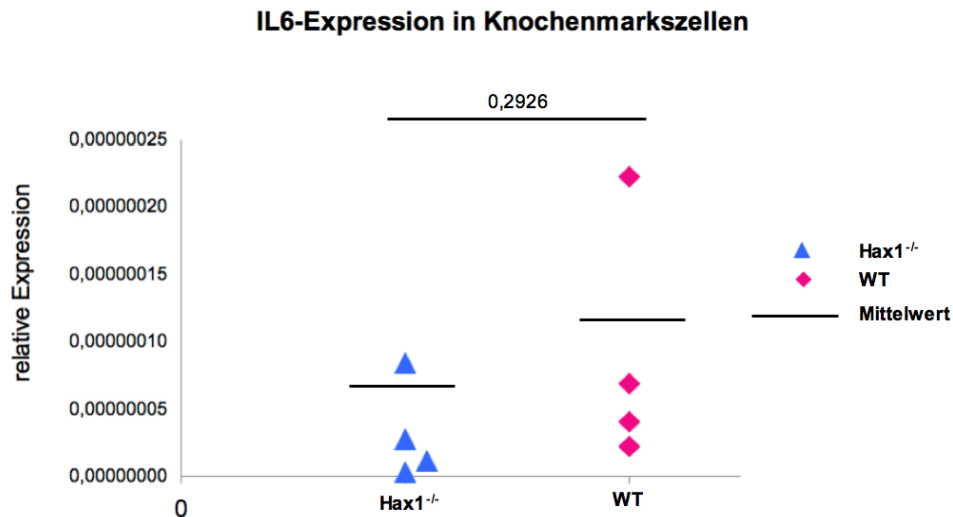


Abbildung 59: Die IL6-Transkriptmenge wurde via Real Time Analyse in den Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse wurde in einem Punkte-Diagramm dargestellt.

IL6 kommt in den Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}-Mäusen (MW: 0,0000000316) in etwas geringerer Menge vor, als in WT- Mäusen (MW: 0,0000000884). Dennoch konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden (pValue 0,2926) (Abbildung 59).

5.8.2.4. Untersuchung der IL6-Verteilung in Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via Real Time Analyse

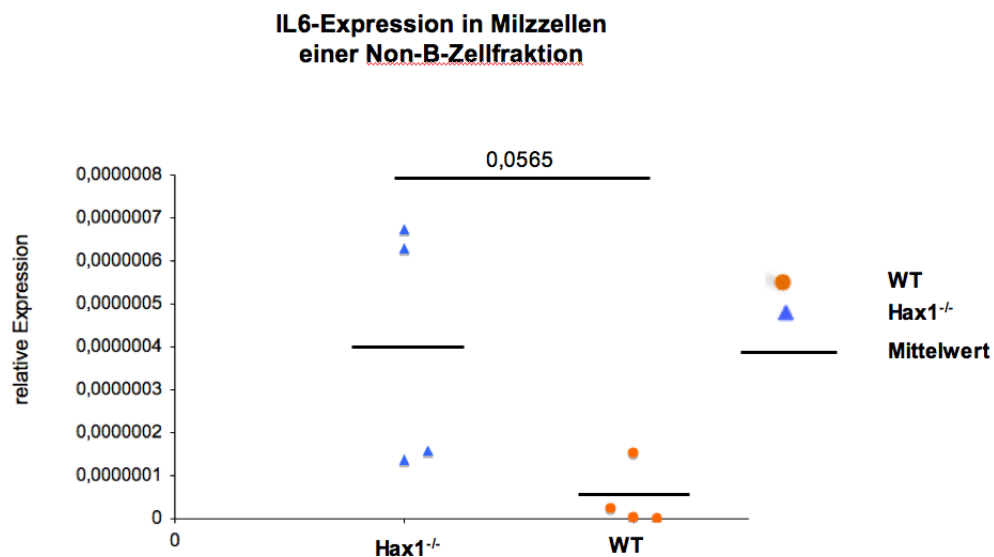


Abbildung 60: Streudiagramm einer IL6-Real Time Analyse von Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion der Hax1^{-/-}- und WT-Mäuse. Die Non-B-Zellansätze wurden wie im obigen Versuch beschrieben, gewonnen (siehe Punkt 5.8.1.1.).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in den Milzzellen von WT-Mäusen eine geringere Menge an IL6-RNA-Transkripten vorkommt, als vergleichsweise zu den Hax1^{-/-}-Mäusen (pValue 0,0565). Die Mittelwerte (Hax1^{-/-}: 0,0000003994; WT: 0,0000000447) jedes Mausstammes wurden berechnet und graphisch dargestellt (Abbildung 60).

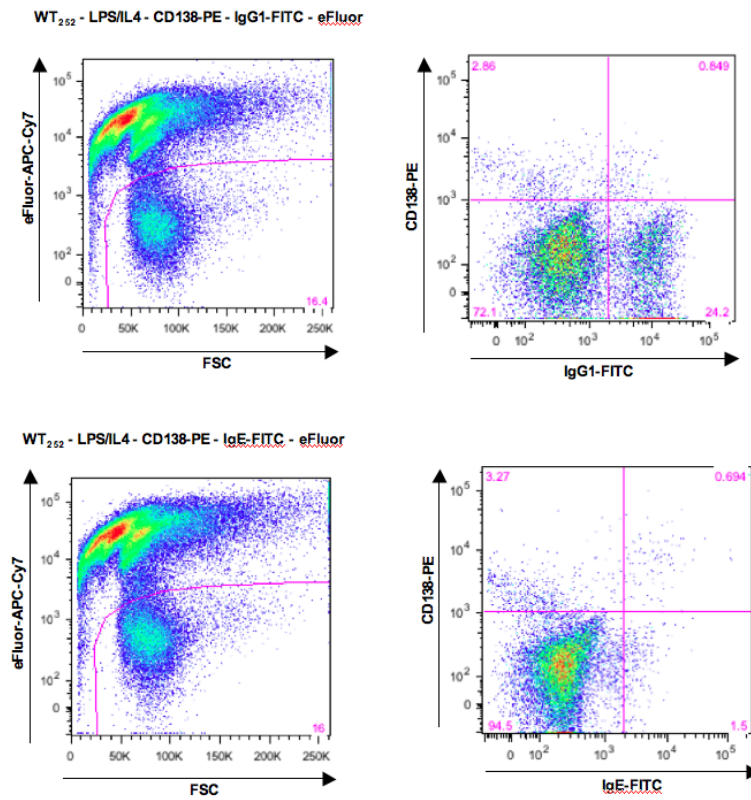
5.9. HAX1-Verlust beeinflusst die Zellzahl von CD138-tragenden Plasmazellen

5.9.1. Quantifizierung von IgG1- und IgE-produzierenden Plasmablasten (CD138PE⁺/IgG1⁺/IgE⁺) von α -CD40/IL4- bzw. LPS/IL4-induzierten Milzzellen der WT- und Hax1^{-/-}-Mäuse via FACS-Analyse

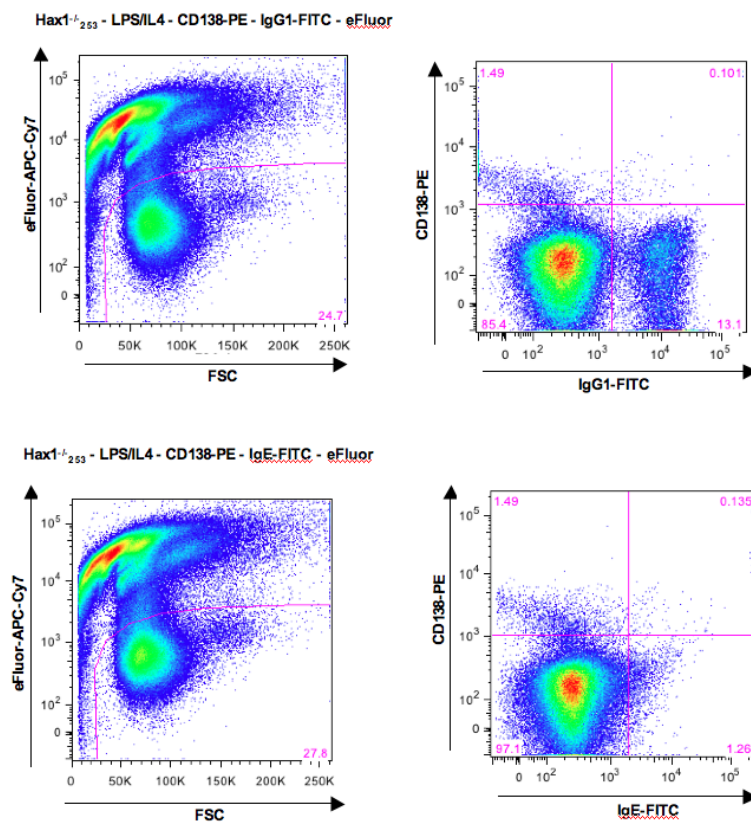
Die B-Zell-Induktionsansätze wurden nach 5-tägiger Inkubation bei 37°C für durchflusszytometrische Messungen entsprechend gefärbt. Die eFluor-Färbung erlaubt eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, wobei die lebenden Zellen entsprechend eFluor-negativ sind.

Ausgehend von dieser eFluor-negativen Population sollten die IgG1-/IgE-produzierenden Plasmablasten der Milz in WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen durchflusszytometrisch identifiziert und quantitativ bestimmt werden. Diesbezüglich wurde mit dem PE-gekoppelten CD138-Antikörper gegen CD138 (auf der Oberfläche) gefärbt.

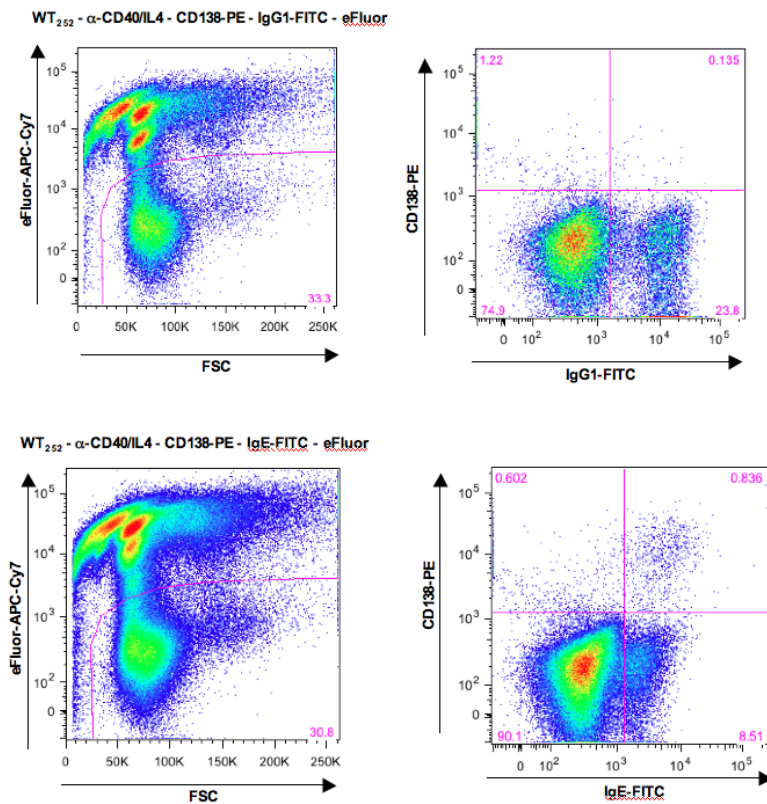
(A)



(B)



(C)



(D)

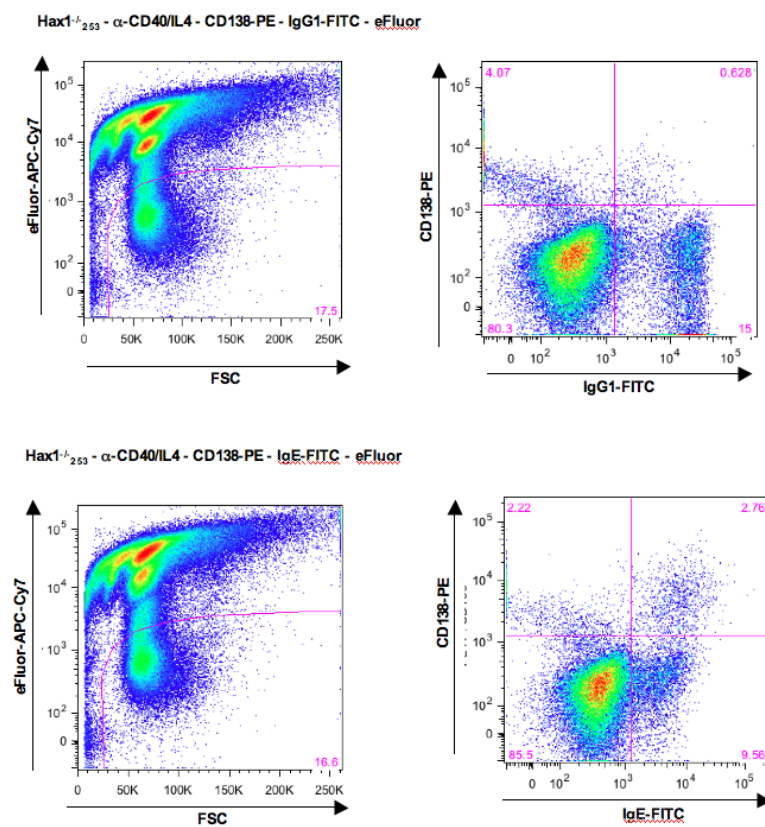


Abbildung 61: FACS-Analyse von induzierten B-Zellen auf die Bildung von CD138-tragenden Plasmablasten. (A) LPS/IL4-induzierte IgG1⁺CD138⁺- und IgE⁺CD138⁺-produzierende Plasmazellen der WT₂₅₂-Maus; (B) LPS/IL4-induzierte IgG1⁺CD138⁺- und IgE⁺CD138⁺-produzierende Plasmazellen der Hax1^{-/-}₂₅₃-Maus; (C) α-CD40/IL4-induzierte IgG1⁺CD138⁺- und IgE⁺CD138⁺-produzierende Plasmazellen der WT₂₅₂-Maus; (D) α-CD40/IL4-induzierte IgG1⁺CD138⁺- und IgE⁺CD138⁺-Plasmazellen d der Hax1^{-/-}₂₅₃-Maus

Nach einer 5tägigen Induktionszeit mit LPS/IL4 und α-CD40/IL4 wurden die Zellen gestrippt und mit eFluor gefärbt. Lebende Zellen sind demnach eFluor-negativ. Die Färbung mit dem PE-gekoppelten CD138-Antikörper sowie einer anschließenden Markierung mit FITC-IgE-/IgG1-konjugierten Antikörpern erlaubt den Nachweis von lebenden IgE-/IgG1-produzierenden Plasmazellen via FACS-Analyse. Eine Gegenüberstellung von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen lässt Isotyp-spezifische quantitative Mengen-Unterschiede erkennen.

LPS/IL4

Nach einer LPS/IL4-Induktion zeigen B-Zellen der Hax1^{-/-}-Maus verringerte Mengen an CD138⁺/IgG1⁺ (WT 0,849% vs Hax1^{-/-} 0,101%), an CD138⁻/IgG1⁺ (WT 24,2% vs Hax1^{-/-} 13,1%), an CD138⁺/IgE⁺ (WT 0,694% vs Hax1^{-/-} 0,135%) und CD138⁻/IgE⁺ (WT 1,5% vs Hax1^{-/-} 1,26%) Zellen (Abbildung 61, A und B).

α-CD40/IL4

Nach einer α-CD40/IL4-Induktion zeigen B-Zellen der Hax1^{-/-}-Maus erhöhte Mengen an CD138⁺/IgG1⁺ (WT 0,135% vs Hax1^{-/-} 0,628%), an CD138⁺/IgE⁺ (WT 0,836% vs Hax1^{-/-} 2,76%) und CD138⁻/IgE⁺ (WT 8,51% vs Hax1^{-/-} 9,56%) Zellen sowie verringerte Mengen an CD138⁻/IgG1⁺ (WT 23,8% vs Hax1^{-/-} 15,0%) Zellen (Abbildung 61, C und D).

LPS/IL4 versus α-CD40/IL4 im WT

Ein wirklich wesentlicher Unterschied ergibt sich in der Bildung der CD138⁻/IgE⁺ positiven WT-Zellen, wobei die Induktion mit α-CD40/IL4 zu einer erhöhten Produktion der IgE-Plasmablasten führt (LPS 1,5% vs α-CD40 8,51%) (Abbildung 61, A und C). Dieser Unterschied ist auch für Hax1^{-/-}-Zellen zu bemerken (LPS 1,26% vs α-CD40 9,56%) (Abbildung 61, B und D).

5.9.2. Quantifizierung von Plasmazellen im Knochenmark der WT- und Hax1^{-/-}-Maus

Ziel der Untersuchung war es festzustellen, ob es hinsichtlich der CD138-positiven Plasmazellen zu einer Zellzahlabnahme in der Hax1^{-/-}-Maus, im Vergleich zur WT-Maus, kommt.

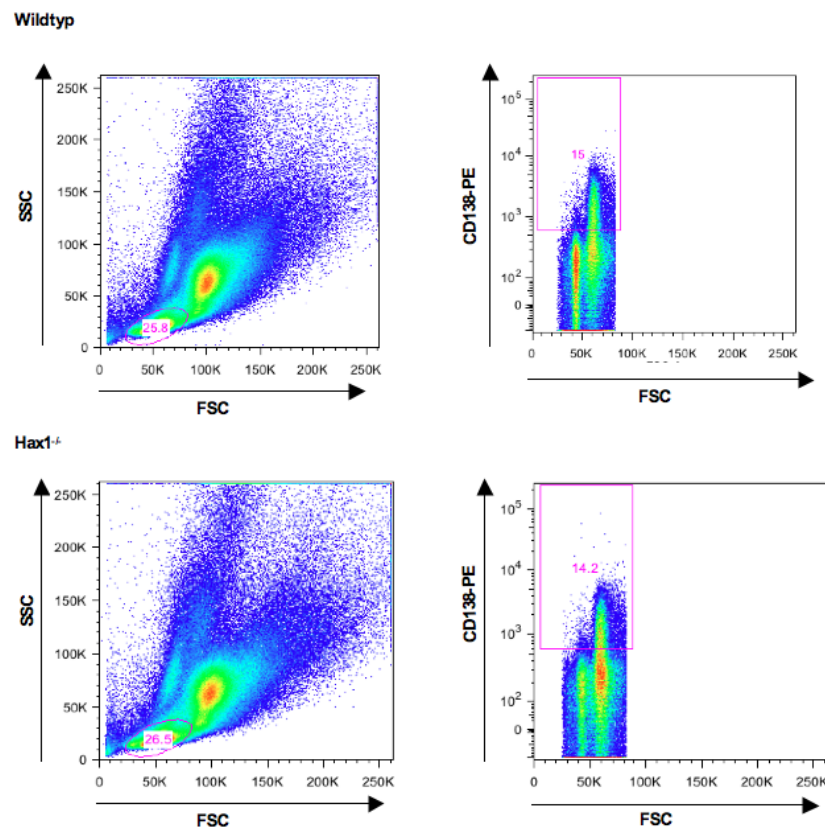


Abbildung 62: FACS-Analyse von geprüften Knochenmarkszellen einer WT- und einer Hax1^{-/-}-Maus. Nach der Erylyse wurden die Zellen gestrippt, um im Anschluß eine spezifischere Färbung via dem Plasmazell-Marker CD138-PE zu erzielen.

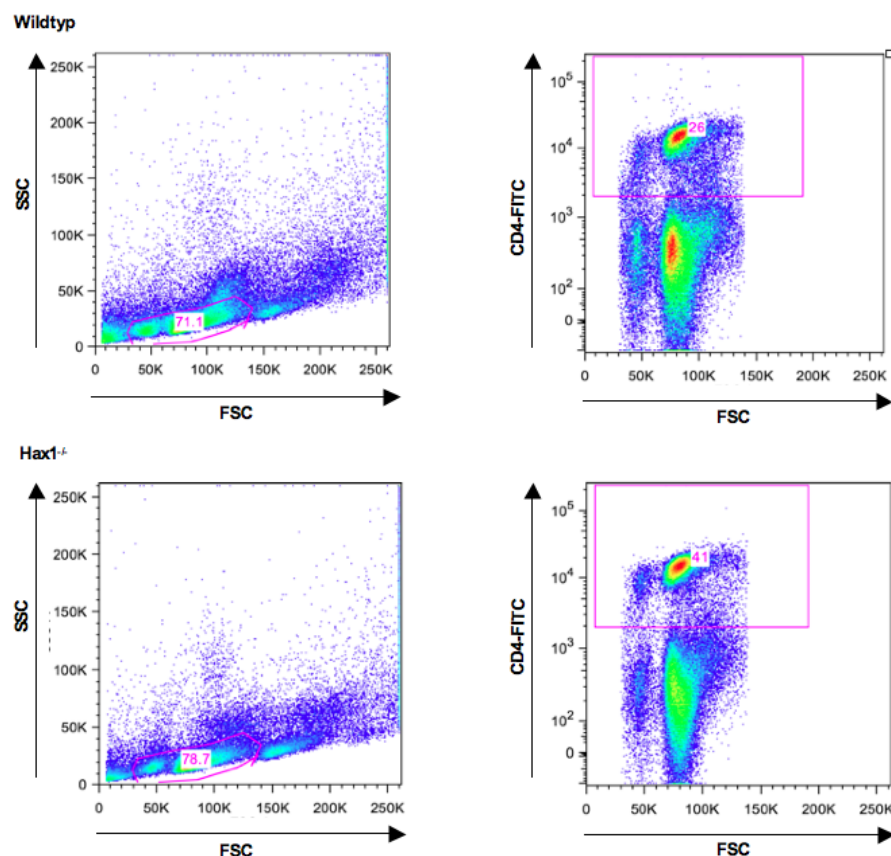
Via des Plasmazellmarkers CD138-PE wurde im Durchflusszytometer zwischen dem CD138-Plasmazell-Level von WT- und Hax1^{-/-}-Maus prozentuell unterschieden. Den Ergebnissen zufolge zeigt die WT-Maus eine zur Hax1^{-/-}-Maus vergleichbare CD138⁺-Plasmazellzahl (Abbildung 62).

5.10. Hax1^{-/-}-defiziente Mäuse zeigen eine veränderte T-Zell-Verteilung (CD4/CD8) in der Milz und dem Knochenmark

5.10.1. Quantifizierung von T-Zellen einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen via FACS-Analyse

Zum quantitativen Nachweis wurde aus einer Nicht-B-Zellfraktion der Anteil an Zellen bestimmt, die die Oberflächenproteine (T-Zell-Marker) CD4 bzw. CD8 exprimieren. Hierfür wurde mit den FITC-gekoppelten CD4- bzw. CD8-Antikörpern gefärbt, um unterschiedliche Mengenbestände zwischen WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen festzustellen.

(A)



(B)

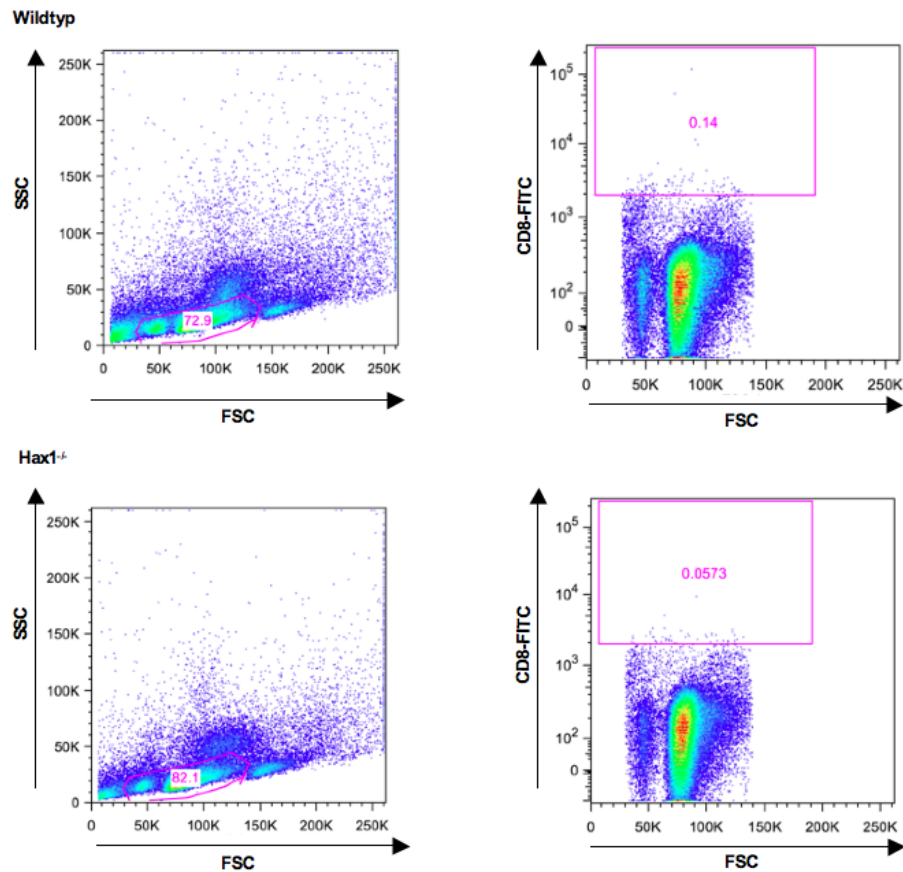


Abbildung 63: FACS-Analyse von Nicht-B-Zellen, die im Zuge des „Pan B Cell Isolation Kits®“ (Miltenyi Biotech) aus der Säule gespült wurden. (A) CD4: Nicht-B-Zellfraktion: WT (26%) vs Hax1^{-/-} (41%); (B) CD8: Nicht-B-Zellfraktion: WT (0,14%) vs Hax1^{-/-} (0,0573%)

Die MicroBeads-gekoppelten Nicht-B-Zellen wurden einem FcR-Blocking unterzogen, dem ein Färbeschritt mit APC-gekoppelten CD4- und -CD8-Antikörpern folgte. Es ist die FACS-Analyse einer repräsentativen Nicht-B-Zell-Fraktion gezeigt.

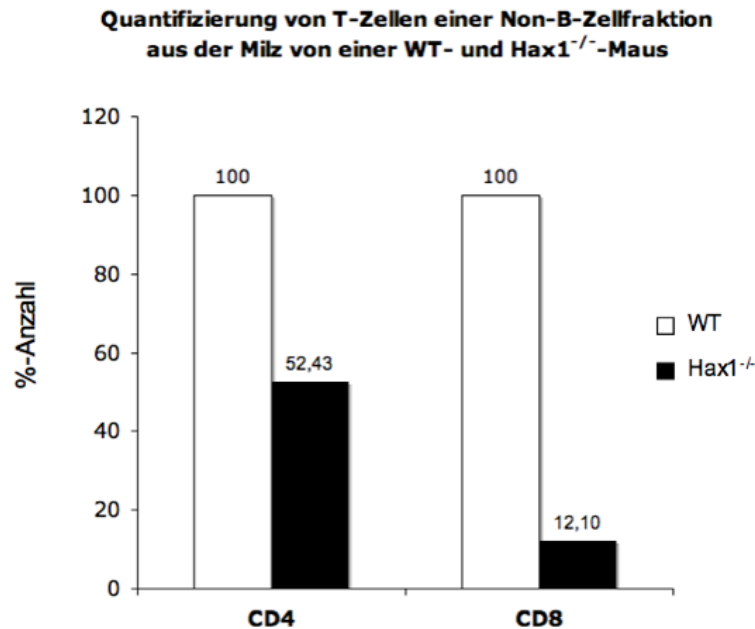


Abbildung 64: Graphische Darstellung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen einer Non-B-Zellfraktion von einer WT- und Hax1^{-/-}-Maus. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellzahl von 1×10^6 Zellen, der aufgenommenen Zellmenge via FACS und die Prozentwerte der CD4- bzw. CD8-T-Zellpopulationen, wurde das Verhältnis von Hax1^{-/-} zu WT-Mäusen errechnet. Man geht bei der WT-Maus von 100% aus.

In der Hax1^{-/-}-Maus kommen etwa 50% weniger CD4-T-Zellen vor, als vergleichsweise in der WT-Maus. In der Hax1^{-/-}-Maus sind dagegen 12,10% CD8-T-Zellen vorhanden (Abbildung 64). Die ermittelten Laborparameter der CD4- (Tabelle 10, A und B) und CD8-T-Zell-Verteilung (Tabelle 11, A und B) in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz von Hax1^{-/-} und WT-Mäusen wurden tabellarisch dargestellt (Tabelle 11 und 12) (siehe Punkt 5.6.1.2.).

Die Summierung der beiden %-Sätze von CD4- (~ 52%) und CD8-Zellen (~ 12%) ergibt einen prozentuellen Gesamt-T-Zell-Gehalt von etwa 64% in der Nicht-B-Zell-Fraktion der Milz.

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD4-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz einer Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	18.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	180
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	78,70%
% der CD4-Zellpopulation (Gate)	41,00%
Zellzahl der CD4-Zellpopulation	78.716 Zellen
% der CD4-Verteilung in der Milz	52,43%

(B)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD4-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz einer WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	60.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	600
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	71,10%
% der CD4-Zellpopulation (Gate)	26,00%
Zellzahl der CD4-Zellpopulation	71.136 Zellen

Tabelle 10: Berechnung der CD4-T-Zell-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD8-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz einer Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	18.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	180
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	82,05%
% der CD8-Zellpopulation (Gate)	0,05%
Zellzahl der CD8-Zellpopulation	82.055 Zellen
% der CD8-Verteilung in der Milz	12,10%

(B)

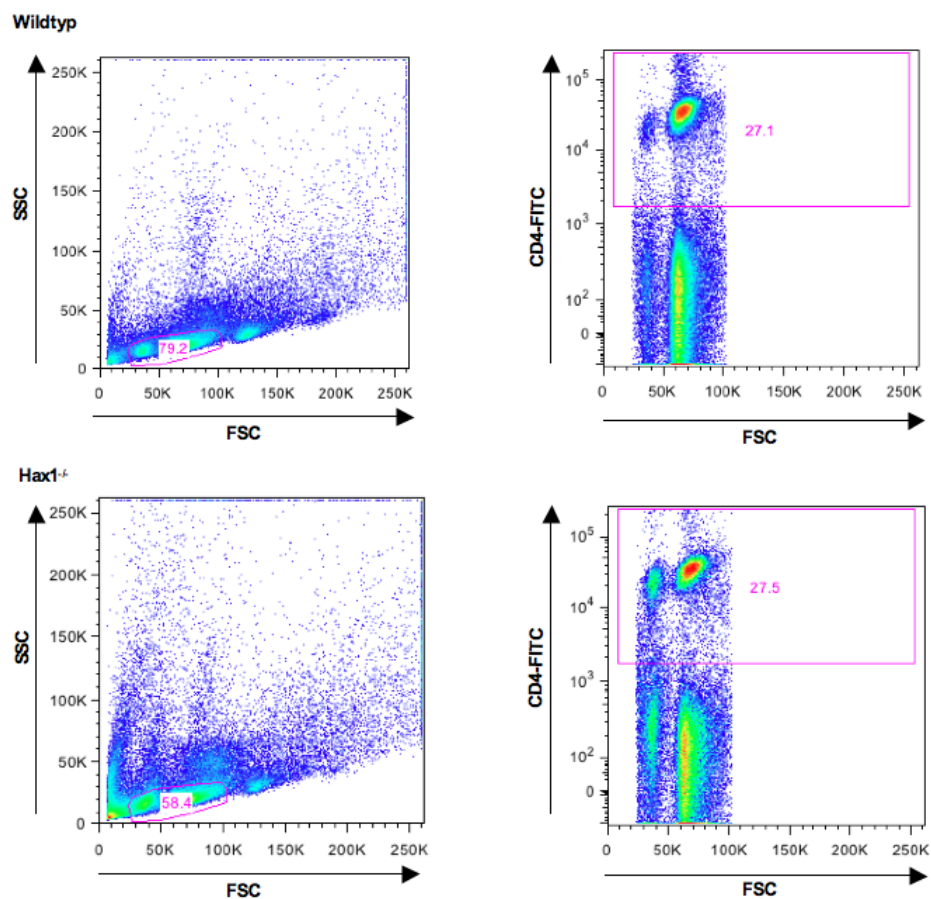
<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD8-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz einer WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	60.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	600
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	72,85%
% der CD8-Zellpopulation (Gate)	0,14%
Zellzahl der CD8-Zellpopulation	72.854 Zellen

Tabelle 11: Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

5.10.2. Quantifizierung von T-Zellen der Milz von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen via FACS-Analyse

Um den Anteil an CD4- bzw. CD8-Zellen in einer gesamten Milzzellenpopulation in WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen quantitativ zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

(A)



(B)

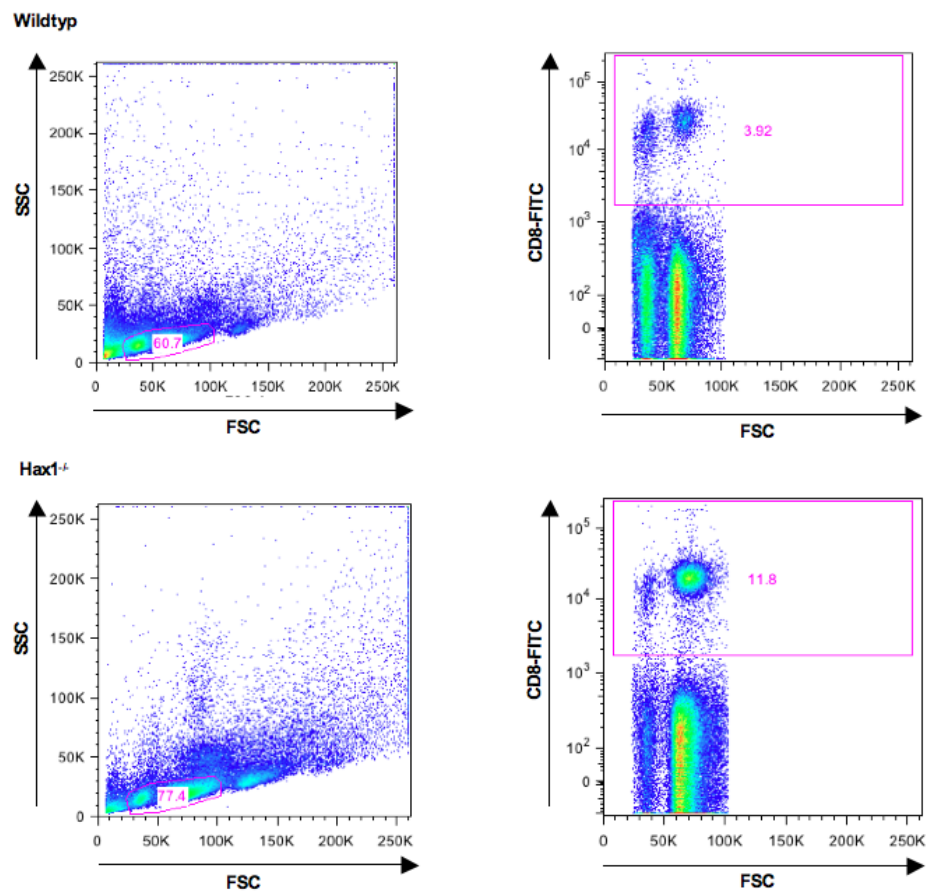


Abbildung 65: FACS-Analyse von Splenozyten, die zuvor Fc-geblickt wurden, bevor eine Fluorochrom-gekoppelte CD4- und CD8-Antikörper-Färbung vorgenommen wurde. Dabei wurde angesichts CD4- bzw. CD8-tragender T-Zellen zwischen WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen unterschieden. (A) CD4: gesamte Milzzellen: WT (100%) vs Hax1^{-/-} (13,7%); (B) CD8: gesamte Milzzellen: WT (100%) vs Hax1^{-/-} (70,0%)

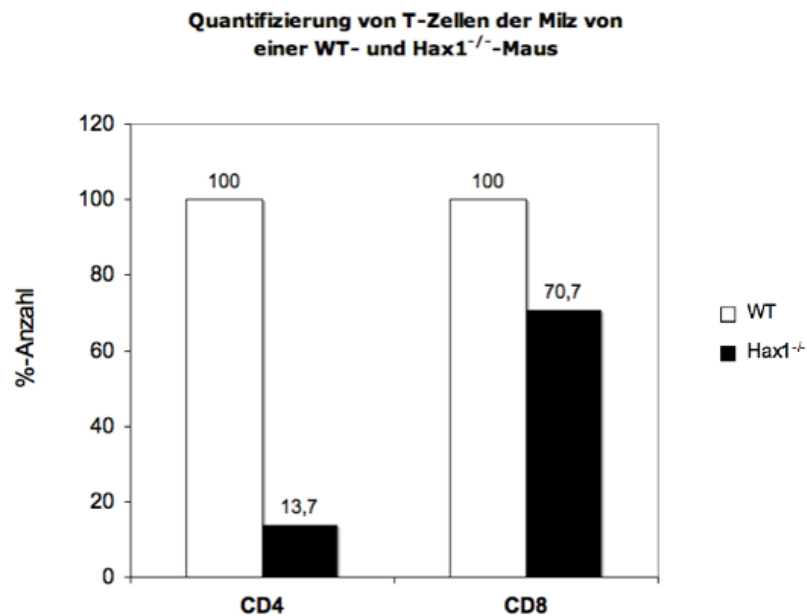


Abbildung 66: Graphische Darstellung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen der Milz von einer WT- und Hax1^{-/-}-Maus. Die eingesetzte Zellzahl, die via Casy® bestimmt worden ist, beträgt 1 x 10⁶ Zellen. Zur Berechnung der prozentuellen CD4- bzw. CD8-T-Zellpopulationen wurde die WT-Maus als 100% angenommen.

CD8-T-Lymphozyten sind in der Milz der Hax1^{-/-}-Maus mit einer verringerten T-Zell-Verteilung von ~ 70% angegeben. CD4-Zellen (~ 13%) kommen in der Hax1^{-/-}-Maus ebenfalls in geringeren Mengen vor. Demnach machen die T-Zellen der Hax1^{-/-}-Maus ~ 85% im Vergleich zu der WT-Maus aus (Abbildung 66).

Das Verhältnis der CD4- (Tabelle 8, A und B) bzw. CD8-T-Zell-Verteilung (Tabelle 9, A und B) in der Milz der Hax1^{-/-}-Maus zu der WT-Maus wurde mithilfe der tabellarisch angeführten Datenwerte entsprechend errechnet (siehe Punkt 5.6.1.2.).

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD4-Verteilung in der Milz einer Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	22.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	220
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	58,40%
% der CD4-Zellpopulation (Gate)	27,50%
Zellzahl der CD4-Zellpopulation	58.358 Zellen
% der CD4-Verteilung in der Milz	13,70%

(B)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD4-Verteilung in der Milz einer WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	120.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	1200
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	79,20%
% der CD4-Zellpopulation (Gate)	27,10%
Zellzahl der CD4-Zellpopulation	79.180 Zellen

Tabelle 12: Berechnung der CD4-T-Zell-Verteilung in der Milz der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD8-Verteilung in der Milz einer Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	22.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	220
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	77,40%
% der CD8-Zellpopulation (Gate)	11,80%
Zellzahl der CD8-Zellpopulation	77.362 Zellen
% der CD8-Verteilung in der Milz	70,70%

(B)

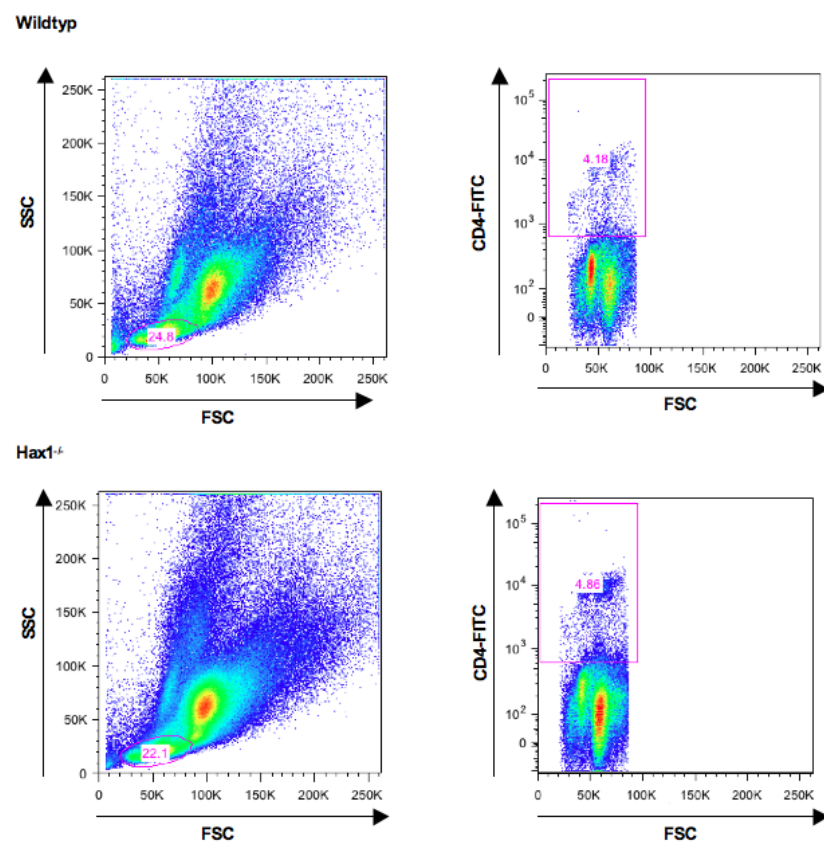
<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD8-Verteilung in der Milz einer WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	120.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	100.000 Zellen
Faktor	1200
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	60,70%
% der CD8-Zellpopulation (Gate)	3,90%
Zellzahl der CD8-Zellpopulation	60.698 Zellen

Tabelle 13: Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung in der Milz der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

5.10.3. Quantifizierung von T-Zellen des Knochenmarks von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen via FACS-Analyse

Via FACS-Analyse wurde der Anteil an CD4- bzw. CD8-Zellen im gesamten Knochenmark von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen bestimmt und miteinander verglichen.

(A)



(B)

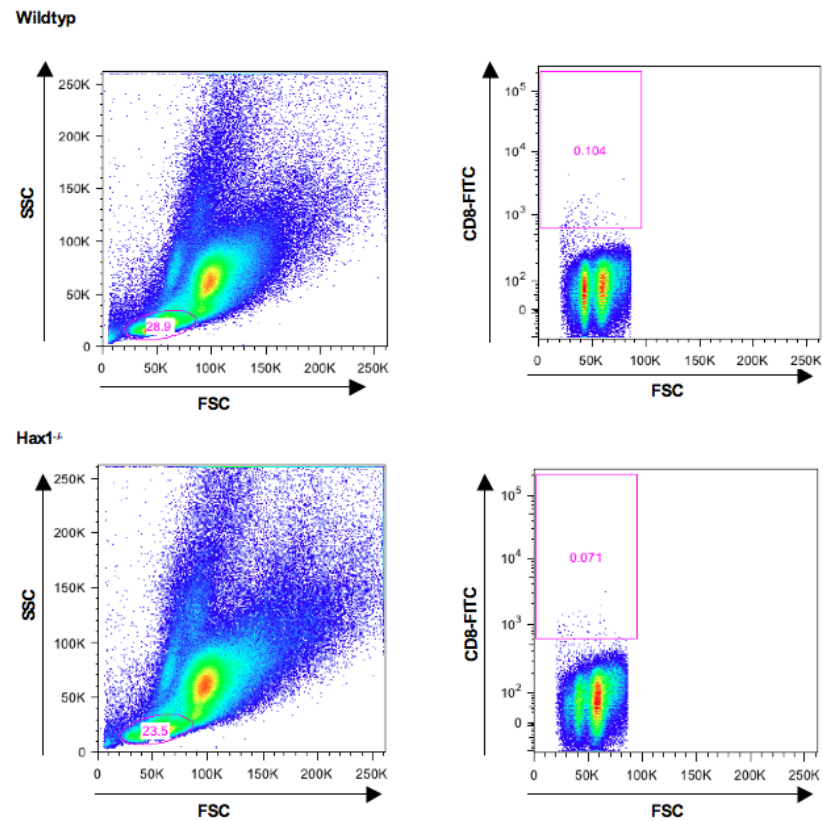


Abbildung 67: FACS-Analyse von Knochenmarkszellen, die zunächst FcR-geblockt und anschließend via CD4- und CD8-FITC-Antikörper markiert wurden, um T-Zellen nachzuweisen. (A) CD4: gesamte Knochenmarkszellen: WT (4,18%) vs Hax1^{-/-} (4,86%); (B) CD8: gesamte Knochenmarkszellen: WT (0,104%) vs Hax1^{-/-} (0,071%)

Quantifizierung von T-Zellen des Knochenmarks von einer WT- und Hax1^{-/-}-Maus

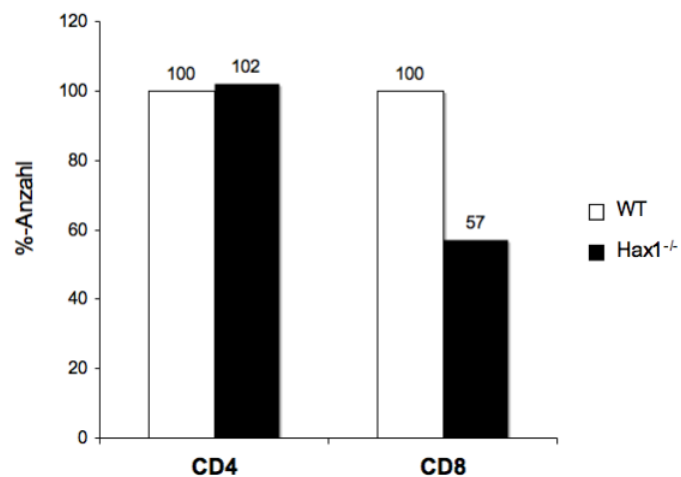


Abbildung 68: Graphische Darstellung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen des Knochenmarks von einer WT- und Hax1^{-/-}-Maus. Die eingesetzte Zellzahl von 1 x 10⁶ Zellen wurde zur prozentuellen Berechnung der CD4- bzw. CD8-T-Zellpopulation in der Hax1^{-/-}-Maus herangezogen, um Vergleiche hinsichtlich der WT-Maus anzustellen, die jeweils als 100% angenommen wurde.

T_H-Zellen mit dem Oberflächenantigen CD4 kommen geringfügig häufiger in Knochenmarkszellen der Hax1^{-/-}-Maus (102%) vor, als vergleichsweise zur WT-Maus (100%). T-Killerzellen mit dem CD8-Rezeptor werden sowohl in der WT- (100%), als auch in der Hax1^{-/-}-Maus (57%) in sehr geringen Mengen nachgewiesen (Abbildung 68).

Zur Bestimmung der CD4- (Tabelle 14, A und B) bzw. CD8-T-Zell-Verteilung (Tabelle 15, A und B) in Knochenmarkszellen der Hax1^{-/-}- und WT-Maus wurden die entsprechenden Datenwerte zur Reproduzierbarkeit der Endresultate tabellarisch dargestellt.

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD4-Verteilung im Knochenmark einer Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	1.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	300.000 Zellen
Faktor	3,3
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	22,10%
% der CD4-Zellpopulation (Gate)	4,86%
Zellzahl der CD4-Zellpopulation	66.437 Zellen
% der CD4-Verteilung im Knochenmark	102,00%

(B)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD4-Verteilung im Knochenmark einer WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	1.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	118.044 Zellen
Faktor	8,5
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	24,80%
% der CD4-Zellpopulation (Gate)	4,20%
Zellzahl der CD4-Zellpopulation	29.326 Zellen

Tabelle 14: Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung im Knochenmark der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

(A)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD8-Verteilung im Knochenmark einer Hax1^{-/-}-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	1.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	300.000 Zellen
Faktor	3,3
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	23,50%
% der CD8-Zellpopulation (Gate)	0,07%
Zellzahl der CD8-Zellpopulation	70.427 Zellen
% der CD8-Verteilung im Knochenmark	57,00%

(B)

<i>Zahlenwerte zur Berechnung der CD8-Verteilung im Knochenmark einer WT-Maus</i>	
Gesamtzellzahl via Casy®	1.000.000 Zellen
Zellzahl (absolute Partikel-Aufnahme via FACS)	300.000 Zellen
Faktor	3,3
% der Lymphozytenpopulation (Gate)	28,90%
% der CD8-Zellpopulation (Gate)	0,10%
Zellzahl der CD8-Zellpopulation	86.662 Zellen

Tabelle 15: Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung im Knochenmark der Hax1^{-/-}-Maus (A) und der WT-Maus (B).

6. Diskussion

Die Deletion von HAX1 führt zu einer stark reduzierten Bildung an B-Zellen und ihren Vorläufern (74). Dabei geht man davon aus, dass dies das Resultat der gestörten Entwicklung im Knochenmark ist, welches durch ein gestörtes Zytokinmuster der Stromazellen verursacht wird. Durch frühere Arbeiten der Gruppe wurden Hinweise für eine eventuell erhöhte Produktion des IL1RA und eine erniedrigte Produktion von IL6 in Stromazellen von Hax1^{-/-}-Mäusen gefunden (72). Um dies genauer zu untersuchen wurden Real Time-Analysen durchgeführt. In der Nicht-B-Zell-Fraktion des Knochenmark konnte keine Veränderungen der IL1RA-Werte festgestellt werden. Hierbei wäre es aber von großer Wichtigkeit sich zukünftig auf die Stromazellen zu konzentrieren und diese einer genaueren Analyse zu unterziehen. Stromazellen sichern diese Versorgung der sich entwickelnden B-Zellen durch die Sekretion verschiedener Stimuli und könnten daher möglicherweise in ihrer IL1RA-Produktion Veränderungen aufweisen. Bei Real Time Analysen aus der Nicht-B-Zellfraktion der Milz wurden jedoch sehr wohl erhöhte IL1RA-Werte detektiert. Hierbei handelt es sich in erster Linie um T-Zellen, die, verursacht durch die HAX1-Deletion, vermehrt IL1RA produzieren. HAX1 spielt, wie in der Literatur beschrieben wird, im Interleukin1-Pathway eine wichtige regulatorische Rolle. Es bildet mit Prä-IL1 α (über IL1 α -NTP (= N-terminales Peptid (NTP) Interleukin-1 α) und IL1RII bilden einen Komplex, der nun in den Zellkern translozieren kann (88) (70). Demnach ist die nukleäre Lokalisation von Prä-IL1 α von der Bindung zu HAX1 abhängig. Prä-IL1 α wird proteolytisch in die reife Form IL1 α gespalten. Da der N-terminale Bereich von Prä-IL1 α (NTP-IL1 α) eine NLS (nuclear localization sequence) besitzt, kann Prä-IL1 α in den Nukleus translozieren, während reifes IL1 α aus der Zelle freigesetzt wird (88). Fehlt somit HAX1 als funktionierendes Shuttleprotein, verbleiben die entsprechenden Proteine in den unüberbrückbaren Zellkompartimenten, was eine Abnahme des IL1RA erklären würde. Dabei haben erhöhte IL1RA-Level Einfluss

auf die IL6-Expression (72). IL6 zeigte keine eindeutig gerichtete Tendenz einer Expression in Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}-Mäusen. Demnach wurden in Hax1^{-/-}-defizienten Mäusen sowohl erhöhte, als auch verringerte RNA-Level im Vergleich zur WT-Kontroll-Maus detektiert. Im Unterschied dazu konnten in der Milz von Hax1^{-/-}-Mäusen eine moderate Überexpression von IL6 festgestellt werden. Aufgrund des geringen Unterschiedes kann man diesem Hinweis wahrscheinlich keine wesentliche Rolle beimessen.

Weiters wird dem HAX1-Protein eine wesentliche Funktion als antiapoptotisch-wirkendes Protein zugeschrieben. In diesem Zusammenhang wurden unstimulierte Knochenmarkszellen über mehrere Tage *in vitro* kultiviert und durch eFluor-Viabilitäts-Färbungen (Lebend-Totfärbung) an den Tagen 0, 1, 2, 3, 4 und 5 analysiert. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Knochenmarkszellen der Hax1^{-/-}- und der WT-Maus nachgewiesen werden. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass die antiapoptotische Funktion des HAX1 für die Knochenmarkszellen eine untergeordnete Rolle spielt. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass eventuell apoptosesensitive Zellen hier schon verloren gegangen sind, und wir diese in unserer Versuchsanordnung nicht berücksichtigen. Susanne Wolkerstorfer bearbeitete in ihrer Dissertation den Einfluss von HAX1 auf die Apoptose in ähnlicher Weise (72). Dazu wurden die Knochenmarkszellen zur eFluor-Färbung (Lebend- Totfärbung) zusätzlich mit Annexin V gefärbt. Dies macht eine Unterteilung in verschiedene Apoptosestufen möglich. Lediglich am Tag zwei der *in vitro* Kultur konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Hax1^{-/-}- und der WT-Maus gezeigt werden, hierbei zeigten die Hax1^{-/-}-Knochenmarkszellen einen erhöhten Anteil an frühapoptotischen Zellen. An allen beobachteten Folgetagen war kein offensichtlicher Unterschied mehr zu detektieren. Dies unterstützt unsere Vermutung, dass die HAX1-Deletion nur eine sehr minimale Auswirkung auf die apoptotischen Vorgänge der Knochenmarkszellen aufweist. Es wurden auch Hax1^{-/-}-Splenozyten von uns auf dieselbe Weise verglichen, wobei wir hier sogar ein signifikant verbessertes Überleben nachweisen konnten. Die Ergebnisse

zeigten eine erniedrigte Zelltod-Rate an unstimulierten, kultivierten Hax1^{-/-}-Splenozyten an den Tagen 1, 2 und 3 (Abbildung 33). Diese Beobachtungen korrelieren auch mit jenen von Susanne Wolkerstorfer, die in ihrer Dissertation ebenfalls ein verbessertes Überleben der Splenozyten mit ihrer Versuchsanordnung zeigen und offensichtlich keine antiapoptotische Relevanz des HAX1 für die reife B-Zelle nachweisen konnte. Werden B-Zellen der Milz jedoch einem Proliferationsstimulus ausgesetzt, wie α -CD40 oder LPS, so weisen Hax1^{-/-}-B-Zellen sehr wohl eine höhere Sterberate auf. Diese Daten wurden durch *in vitro* Stimulations-Experimente via FACS-Analysen bestätigt, wobei abhängig von den Stimuli unterschiedlich hohe Mengen an IgG1-/IgE-spezifischen Milz-B-Zellen in Hax1^{-/-}-Mäusen detektiert wurden.

HAX1 spielt auch in der Zellmigration von Immunzellen eine wichtige Rolle (67). Mittels Real Time- und FACS-Analysen sollten veränderte CXCR4-Expressionsmuster in Hax1^{-/-}-Mäusen untersucht werden. Es wurden verschiedene Zellpopulationen, wie Gesamtknochenmark, Splenozyten oder B-Zellen (isoliert aus Knochenmark oder Milz) oder B220-positive Zellen (isoliert aus dem Knochenmark) untersucht. In diesem Zusammenhang wurde ein Pool aus sich entwickelnden B-Zellen der Milz bzw. des Knochenmarks analysiert. Eine Erklärung für die hohen Abweichungen der CXCR4-Werte im Knochenmark und der Milz könnten die verschiedenen hohen CXCR4-Spiegel sein, die in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen auftreten. Während in Prä-Pro-B- und Prä-B-Zellen vorwiegend hohe CXCR4-Level vorliegen, besitzen im Vergleich dazu die Pro-B-Zellen, die eine hohe Affinität zu IL7-produzierenden Stromazellen haben, geringe CXCR4-Werte (89). Untersuchungen an SDF1- und CXCR4-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass der Verlust eines dieser Proteine sich erheblich auf die B-Zell-Entwicklung und die frühe Hämatopoiese auswirkt (90, 91). In diesem Zusammenhang könnte die verringerte CXCR4-Expression in Hax1^{-/-}-Mäusen für eine veränderte B-Zell-Entwicklung sprechen. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die veränderte Expression von CXCR4-Oberflächenrezeptorproteinen im Knochenmark und der Milz eine insuffiziente B-

Zellreifung bewirkt. Dabei wird einerseits angenommen, dass die Übergänge zwischen den Entwicklungsstadien, aufgrund einer unzureichenden Migration zwischen den Überlebensnischen, gestört sind. Andererseits wird aufgrund der schwächeren Einwanderung der Gedächtniszellen ins Knochenmark von einer Beeinträchtigung des immunologischen Gedächtnisses ausgegangen.

Die hohe Varianz der CXCR4-Werte innerhalb einer Mausgruppe könnte möglicherweise auch aufgrund der "ungeeigneten" Verwendung des "Pan B Cell Isolation Kits" (Miltenyi Biotech) auftreten. Der Kit wird zur Isolierung von B-Zellen eingesetzt, wobei Zellen, die bestimmte Oberflächenmarker tragen, depletiert werden. Dabei gelangen auch jene Zellen durch die Säule in das B-Zell-Eluat, die aufgrund ihres Entwicklungszustandes noch keine entsprechenden Oberflächenmarker tragen. Dabei sollte erwähnt werden, dass FACS-Analysen in der Hax1^{-/-}-Maus größere Verunreinigungen zeigen, als vergleichsweise in der WT-Maus. Dabei nimmt die Debris-Menge, abhängig von der Zellmenge der zu isolierenden B-Zellfraktion, umgekehrt proportional zu. Im Gegensatz dazu wird mit zunehmender Größe der Zellpopulation eine geringere Menge an Kontaminationen registriert. Zudem enthält die isolierte B-Zellfraktion reichlich andere Zelltypen, da der Depletions-Kit keine Biotin-gekoppelten Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD43 und CD11b im Depletions-Cocktail enthält. Demnach ist die gemacste B-Zellfraktion mit Zellen wie Granulozyten, NK-Zellen, T-Zellen, DC-Zellen, Monozyten,... verunreinigt.

Wolkerstorfer et al. konnten zeigen, dass es im Knochenmark von Hax1^{-/-}-Mäusen zu Ansammlungen von Fettzellen kommt (72, 79). Dabei handelt es sich um sogenannte Adipozyten, von denen angenommen wird, dass sie an der verminderten Migration und der beeinträchtigten B-Zell-Entwicklung in der Hax1^{-/-}-Maus mitbeteiligt sind (92). Dabei könnte die Einlagerung solcher Fettcluster zu einer Verdrängung des Knochenmarks führen. Dies wiederum könnte ursächlich sein für eine inhomogene Verteilung von CXCL12 (SDF-1) und somit eine verminderte CXCL12- und CXCR4-Signalwirkung zur Folge haben (72).

CXCL12 spielt nicht nur für die B-Zellreifung eine wesentliche Rolle, sondern ist auch für das Rückeinwandern der Plasmazellen ins Knochenmark wichtig. Dahingehend wurden auch weitere Untersuchungen durchgeführt. Plasmablasten repräsentieren die noch nicht vollständig differenzierten Vorläufer der Plasmazellen und besitzen im Unterschied zu den Plasmazellen noch Proliferationsaktivität. Die differenzierte Plasmazelle hat die Proliferationsaktivität verloren, ist langlebig und sezerniert eine große Anzahl von Antikörpern mit hoher Affinität (93). Bei der Reifung von Plasmablasten (CD138⁺-Zellen aus dem peripheren Blut) zu Plasmazellen (CD138⁺-Zellen aus dem Knochenmark) kommt es zur veränderten Expression von bestimmten Oberflächenproteinen. Charakteristisch sind dabei die Reduktion der MHC II-Moleküle und des B-Zellrezeptors (BCR) sowie die starke Expression des Heparan-Sulfat-Proteoglykans Syndekan-1 (CD138), der auch als Plasmazellmarker bezeichnet wird. CD138 wirkt als Rezeptor für extrazelluläre Matrix-Bestandteile. Die Bindung von CD138 an die extrazelluläre Matrix kann dabei zur Fixierung der Vorläuferzellen im Knochenmark fungieren, während der Verlust von CD138 zur Freisetzung der reifen B-Zellen aus dem Knochenmark führen kann (94).

CD138 wird abhängig vom Stadium der B-Zell-Differenzierung auf B-Zellen exprimiert. Vorläufer-B-Zellen haben bei der Plasmazell-Differenzierung im Knochenmark CD138 hochreguliert, während es bei der Auswanderung aus dem Knochenmark von reifen B-Zellen downreguliert wird. Die peripheren, zirkulierenden B-Zellen tragen dagegen kein CD138 an der Oberfläche (94). Untersuchungen haben gezeigt, dass ungefähr die Hälfte aller Plasmazellen im Blut CD138 exprimieren. Demnach exprimieren etwa 50 – 60% aller IgE- oder IgG-sekretierenden Plasmazellen (bzw. 25 – 50% der IgA-sezernierenden Plasmazellen) CD138. Via FACS-Analyse wurden die CD138-Plasmazell-Level von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen miteinander verglichen, um festzustellen, ob es in der Hax1^{-/-}-Maus, im Vergleich zur WT-Maus, zu einer Zellzahlabnahme der CD138-positiven Plasmazellen kommt. Die Ergebnisse der beiden Mausstämme

zeigten ähnliche Plasmazellzahlen, womit keine veränderte Immunität festgestellt werden konnte.

Um den Einfluss von HAX1 auf die Immunglobulin-Produktion zu untersuchen, wurden Blutseren von OVA-immunisierten Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via ELISA-Assays verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein HAX1-Verlust zu geringfügig veränderten Immunglobulin-Werten in Hax1^{-/-}-Mäusen führt. Demnach liegt sowohl ein verminderter Gesamt-Serum-Spiegel, als auch OVA-spezifische Immunglobulin-Titer im Vergleich zu den WT-Mäusen vor. Da es innerhalb der Versuchsgruppen der OVA-immunisierten Hax1^{-/-}- und WT-Mäuse zu großen Schwankungen bei den Immunglobulin-Niveaus kam, konnten zwischen den Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen keine statistisch signifikanten Unterschiede erfasst werden. Zudem dezimierte sich die Anzahl an Versuchstieren während der Versuchsdauer der OVA-Immunisierung aufgrund des frühzeitigen Ablebens einiger Tiere.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die geringfügig veränderten Immunglobulin-Werte in den Hax1^{-/-}-Mäusen lediglich die Tendenz einer verminderten Immunantwort in Hax1^{-/-}-Mäusen widerspiegeln. Im Zuge des OVA-Immunisierungsexperiments lieferte ein weiteres Nachweisverfahren, wie der ELISpot, zusätzliche Auskunft über eine veränderte B-Zellentwicklung in der HAX1-Knockout-Maus. Außerdem können im Rahmen der Sekundärantwort verändertes Migrationsverhalten von Plasmazellen aus der Milz ins Knochenmark zwischen den beiden Mausstämmen nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Produktionsmengen von Gesamt-IgG1- bzw. IgE- und OVA-spezifischen IgG1- bzw. IgE-sezernierenden Plasmazellen in der Milz und dem Knochenmark von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen wurden periodisch detektiert und miteinander verglichen. Bei der wiederholten Verabreichung des OVA-Antigens kommt es in der Milz von immunisierten Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen nach dem Erreichen eines Maximums von Gesamt- und OVA-spezifischen IgG1-/IgE-sekretierenden Plasmazellen nach einigen Tagen zu einer massiven Plasmazellabnahme. Hierbei handelt es sich um die kurzlebigen Gedächtniszellen, die ohne weiteren Antigenkontakt absterben

(Abbildung 21 und 22, 2. ELISpot). Im Zuge der sekundären Immunantwort migrieren langlebige Plasmazellen von der Milz in das Knochenmark, wo sie zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses beitragen. Es ist offensichtlich, dass sich zuerst die Gesamt- und OVA-spezifischen IgG1-produzierenden Plasmazellen im Knochenmark etablieren können, während die Gesamt- und OVA-spezifische IgE-produzierenden Plasmazellen verzögert einwandern (5). Die Zunahme der Gesamtzellzahl im Knochenmark ist auf eine erhöhte Zell-Migration der langlebigen Antikörper-sezernierenden Immunzellen aus der Milz ins Knochenmark zurückzuführen. Im 2. ELISpot konnte eine höhere Gesamt- und OVA-spezifische IgG1- Plasmazellzahl, sowie eine Zunahme der Gesamt- und OVA-spezifischen IgE-sekretierenden Plasmazellen im 3. ELISpot im Knochenmark von Hax1^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 23 – 26). Die tendenziell erhöhten IgG1-/IgE-Immunresponses im Knochenmark von immunisierten Hax1^{-/-}-Mäusen ergaben keine statistischen Unterschiede zu den immunisierten WT-Mäusen. Die Ergebnisse des ELISpots zeigen auch eine komplette Funktionalität der B-Zellen auf. Der Verlust von HAX1 hat somit keine Auswirkung auf die reife B-Zelle und das Entstehen der Plasmazellen.

Darüber hinaus wurde die CD4- und CD8-T-Zellverteilung in Milz- und Knochenmarkszellen von Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen via FACS-Analyse auf veränderte Zellbestände hin untersucht. Die Auswertungen der CD4 und CD8-positiven T-Zellen in Hax1^{-/-}-Mäusen lassen allgemein eine tendenziell verminderte T-Zell-Menge erkennen. Trotz HAX1-bedingter T-Zellabnahme konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

7. Zusammenfassung

7.1. Deutsch

Das Hauptaugenmerk meiner Masterarbeit besteht in der Untersuchung der Funktionalität von HAX1 in B-Zellen und welchen Einfluss der HAX1-Verlust auf die B-Zellentwicklung hat. Zu diesem Zweck wurden vergleichende Analysen von WT-Kontroll-Mäusen mit Hax1^{-/-}-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Deletion von HAX1 hat einen frühzeitigen Tod der Tiere im Alter von etwa 12 Wochen zur Folge. Dabei litten die Tiere an schweren Defekten der Lymphopoese sowie neuronalen Defekten. Es war daher zu klären, was zu dieser massiven Abnahme der B-Zellen führt und wie es zu der damit verbundenen Beeinträchtigung der B-Zelldifferenzierung kommt.

Dem HAX1-Protein wird eine antiapoptotische Funktion zugeschrieben. Im Zuge von Viabilitätsversuchen wurden unstimulierte Knochenmarks- und Milzzellen analysiert. Angesichts der derzeitigen Erkenntnisse schützt das HAX1-Protein die Zellen vor dem Zelltod, weshalb im Vorfeld davon ausgegangen wurde, dass es in den WT-Kontroll-Mäusen zu einem verbesserten Überleben der Zellen kommt. In diesem Zusammenhang weist die HAX1-Deletion in Knochenmarkszellen nur eine sehr minimale Auswirkung auf die apoptotischen Vorgänge auf. Demgegenüber wurde beim Vergleich von Hax1^{-/-}-Splenozyten widersprüchliche Ergebnisse festgestellt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der HAX1-Knockout in der Milz zu einer verringerten Zelltodrate in Hax1^{-/-}-Mäusen, im Vergleich zu WT-Mäusen führt. Demnach zeigt HAX1 keine antiapoptotische Relevanz für die reife B-Zelle in der Milz.

HAX1 spielt auch in der Zellmigration von Immunzellen eine wichtige Rolle. Im Rahmen eines Immunisierungsexperiments wurde untersucht, ob der HAX1-Verlust einen Einfluss auf die Produktion der Immunglobuline hat. Dazu wurden

Hax1^{-/-}- und WT-Kontroll-Mäuse mit OVA mehrmals über einen bestimmten Zeitraum immunisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die HAX1-Deletion sowohl auf die Produktion der Gesamt-Serum-Immunglobuline als auch auf die spezifische Immunantwort gegen Ovalbumin auswirkt. Somit ist eine verringerte Immunantwort erkennbar. Die verringerten IgG1-, IgG2a- bzw. IgE-Level, die auf eine verminderte T_H2-polarisierte Immunantwort hindeuten, hängen womöglich mit der Interaktion zwischen HAX1 und BCR zusammen.

Parallel dazu wurde ein quantitativer Nachweis von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen mittels ELISpot durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Bestimmung der Immunglobulin-Level, konnte hierbei ein Anstieg an Gesamt- und OVA-spezifischen Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen im Knochenmark von Hax1^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Dies könnte auf einen noch unbekannten Kompensationsmechanismus hindeuten.

Darüber hinaus wurde die Gesamtzell- und B-Zellzahl der Milz und des Knochenmarks von immunisierten und naiven Hax1^{-/-}- und WT-Mäusen miteinander verglichen. Des Weiteren wurde die Isotyp-spezifische B220⁺-Zellmenge in beiden Organen untersucht. Die Ergebnisse beider Untersuchungen zeigten eine in Hax1^{-/-}-Mäusen geringfügige Verringerung der B-Lymphozyten-Zellzahl.

Die Resultate bisheriger Untersuchungen deuten darauf hin, dass der HAX1-Verlust zwar mit einer verringerten Immunantwort einhergeht, die B-Zellentwicklung aber dennoch nicht vollständig inhibiert wird. Aus diesem Grund wurde die CXCR4-Expression im Knochenmark und der Milz von Hax1^{-/-}-Mäusen via Real Time- und FACS-Analysen auf Veränderungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten vorwiegend eine geringe Abnahme der CXCR4-Werte in Hax1^{-/-}-Mäusen. Zudem wurde festgestellt, dass die Levels des Stroma-Liganden SDF-1, der kürzlich als ein von der Arbeitsgruppe interagierendes HAX1-Protein identifiziert wurde, in Hax1^{-/-}-Mäusen ebenfalls reduziert waren.

Aus diesem Grund wird vermutet, dass die insuffiziente B-Zellreifung durch ein verändertes Knochenmarksmilieu begründet ist, was mit einer ungleichmäßigen CXCR4-SDF-1-Verteilung einhergeht. Der HAX1-Verlust beeinträchtigt die B-Zellentwicklung dahingehend, dass die B-Zellübergänge zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien, aufgrund einer unzureichenden Migration zwischen den Überlebensnischen, gestört sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das HAX1-Protein eine entscheidende Aufgabe in der Migration und der Apoptose spielt.

7.2. English

The main focus of my master thesis is studying the functionality of HAX1 in B cells. For this purpose a HAX1 knockout mouse has been generated by our working group. Compared to wild-type animals, knockout animals showed altered immune responses, which provided information about the effect of the HAX1 knockout in the B-cell development. The HAX1 knockout leads to the animals' premature death at the age of about 12 weeks. The animals are seriously affected by severe impact on the whole lymphopoiesis and neuronal development.

An antiapoptotic function is ascribed to the HAX1 protein. Unstimulated bone marrow and spleen cells were analyzed via viability experiments. Given the current findings, the HAX1 protein protects cells from cell death. For this reason, it was presupposed that it comes in the WT control mice must have an improved survival of the cells. In this context, the HAX1 deletion shows only a very minimum effect on the apoptotic processes of the bone marrow cells. In contrast, conflicting results were found with the comparison of Hax1^{-/-} splenocytes. In the present work it was shown that the HAX1 deficiency in spleen provides a lower cell death rate compared to WT mice, in opposite to all current opinions. Therefore, HAX1 doesn't show any antiapoptotic relevance for the mature B cell in the spleen.

HAX1 also plays an important role in the cell migration of immune cells. To investigate the impact of HAX1 on the immunoglobulin production, immunization experiments were performed. Hax1^{-/-} and control WT mice were immunized several times with the antigen ovalbumin. The results indicated that a lack of HAX1 has an influence on the production of both, the total serum levels, as well as on the ovalbumin-specific immunoglobulin titer. Therefore, a weak immune response is recognizable. The reduced level of IgG1, IgG2a and IgE points to an impaired T_H2 immune response, possibly related with the interaction between HAX1 und BCR.

Simultaneously, the antigen specific plasma cells of the bone marrow and spleen were measured via ELISpot. A comparison of Hax1^{-/-} and WT bone marrow cells showed an increase of the total number of plasma cells as well as an elevation of the antigen-specific number of plasma cells in the Hax1^{-/-} mice. This may be triggered by an unknown compensation mechanism.

Measuring both, the total number of bone marrow and splenic B cells in immunized and naïve Hax1^{-/-} and WT mice revealed a reduction in the Hax1^{-/-} mice. In addition, the total number of bone marrow as well as splenic B220⁺ cells were determined in both mouse groups. The outcome of these experiments was in agreement with the above-described results, which displayed a reduced number of B220⁺ cells in the Hax1^{-/-} mice compared to the WT mice.

The results of previous works indicate that the loss of HAX1 is accompanied by a reduced immune reaction, however, the B cell development isn't completely inhibited. For this reason, the CXCR4 expression in bone marrow and spleen of Hax1^{-/-} mice was examined via real time and FACS analysis. The results mainly showed a slightly reduced CXCR4 level in Hax1^{-/-} mice. It was also noted that the levels of stromal ligand SDF-1, which was recently identified as an interaction partner of HAX1 protein, was also reduced in Hax1^{-/-} mice.

In summary, the results suggested an impact of HAX1 on the stromal niche milieu, which is accompanied with an imbalanced CXCR4/SDF-1 distribution and obviously impaired B cell development in Hax1^{-/-} mice. Referring to the strong effects of HAX1 on B cell development, B cell transitions are disturbed between the stages of development because of the decelerated migration between survival niches.

The findings in this work suggest that the HAX1 protein has a crucial role in migration and apoptosis.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Description (English)	Beschreibung (deutsch)
™	unregistered Trade Mark	unregistriertes Warenzeichen-Symbol
Ø	diameter	Durchmesser
®	registered Trade Mark	registriertes Markenzeichen-Symbol
°C	degree celsius	Grad Celsius
µg	microgram	Mikrogramm
µl	microlitre	Mikroliter
Ag	antigen	Antigen
AID	activation-induced cytidine deaminase	aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
AIF	apoptosis inducing factor	Apoptose-induzierender Faktor
AK	antibody	Antikörper
Al(OH) ₃	aluminium hydroxide	Aluminiumhydroxid
AP	alkaline phosphatase	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	apoptotic-protease activating factor 1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor 1
APC	allophycocyanin	Allophycocyanin
APC-Cy7	allophycocyanin conjugated cyanine dye (Cy 7 = eFluor)	Allophycocyanin mit Alexa Fluor® 750 (eFluor)
Arbp	60S acidic ribosomal protein P0	60S ribosomales Protein P0
ASC	antibody secreting cell	Antikörper-sekretierende Zelle
BALB/c	Bagg Albino (inbred research mouse strain)	Bagg gezüchtete Albino-Mäuse-Inzuchtlinie
BAX	Bcl-2-associated X protein	Bcl-2-assoziiierendes Protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	B-Zell-Lymphoma-Protein 2
Bcl-6	B-cell CLL/Lymphoma-6	B-Zell-Lymphoma-Protein 6
BCR	B-cell receptor	B-Zellrezeptor

BD	Becton, Dickinson and Company	Becton, Dickinson and Company
BH1	Bcl-homology domain 1	Bcl-2 Homologiedomäne
BH2	Bcl-homology domain 2	Bcl-2 Homologiedomäne
Bp	base pair	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
BSAP	B-cell specific activator protein	B-Zell-spezifisches Aktivatorprotein
CD	Cluster of Differentiation	Unterscheidungsgruppen
CD40L	CD40 ligand	CD40-Ligand
cDNA	complementary desoxy ribonucleic acid	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C _ε	Ig constant region epsilon	konstante Region epsilon der Ig-Loci
CLP	common lymphoid progenitor	Lymphoide Vorläuferzelle
cMaf	musculoaponeurotic fibrosarcoma (human)	aviärer muskulo-aponeurotischer Fibrosarkom-Faktor
CMP	common myeloid progenitor	Myeloide Vorläuferzelle
CO ₂	carbon dioxide	Kohlendioxid
COE1	Collier, Olf and EBF transcription factor 1	Collier, Olf und EBF-Transkriptionsfaktor 1
CS	class switch	Klassenwechsel
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	C-X-C Motiv-Chemokinligand 12
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	C-X-C Chemokinrezeptor 4
CXCR5	C-X-C chemokine receptor type 5	C-X-C Chemokinrezeptor 5
Cyt c	cytochrome C	Cytochrom c
dATP	deoxyadenosine triphosphate	Desoxyadenosintriphosphat
DC	dendritic cell	dendritische Zelle
ddH ₂ O	double distilled water	entionisiertes Wasser
dNTP	deoxynucleoside triphosphate	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dpi	dots per inch (image resolution)	Punkte pro Zoll (Punktedichte/Bildauflösung)
dT	deoxythymidine	Desoxythymidin

EBF1	early B-cell factor 1	früher B-Zellfaktor 1
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	Enzymatisches Immunadsorptionsnachweisverfahren
EliSpot	Enzym-gekoppelter Immunabsorptionstest	Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay
ER	endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	et cetera	et cetera
EtOH	ethyl alcohol	Ethanol
ETP	early T lineage progenitor	frühe T-Vorläufer-Zelle
FACS	fluorescence activated cell sorting	Fluss-Sortierer, Durchflusszytometrie
FB	follicular B-cell	follikuläre B-Zelle
FcR	fragment crystallizable receptor	Kristallisierbarer Fragment-Rezeptor
FCS	fetal calf serum	Fötales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate	Fluorescein-5-isothiocyanat
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand	FMS-ähnlicher Tyrosinkinase 3-Ligand
FSC	forward scatter	Vorwärtstreulicht
fwd	forward	Vorwärts-
GC	germinal center	Keimbahnzentrum
h	hour(s)	Stunde(n)
HAX1	HS1-associated protein X-1	HS1-assoziiertes Protein X-1
Hax1 ^{-/-}	Hax1 Knock-out strain	Hax1-Knock-out Mausstamm
HCl	hydroxychloride	Hydroxychlorid
HEPES	hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
hi	high	hoch-reguliert
HS1	hematopoietic stem cell specific protein-1	hämatopoetisches Stammzellspezifisches Protein 1
HSC	hematopoietic stem cell	Hämatopoetische Stammzelle

ICOS	inducible costimulator	Induzierbarer Kostimulator
ICOSL	inducible costimulator-ligand	Induzierbarer Kostimulator-Ligand
IFN- γ	interferone gamma	Interferon gamma
Ig	immunglobulin	Immunglobulin
IgA	immunglobulin alpha	Immunglobulin Alpha
IgD	immunglobulin delta	Immungloblin Delta
IgE	immunglobulin epsilon	Immunglobulin Epsilon
IgG	immunglobulin gamma	Immunglobulin Gamma
IgM	immunglobulin my	Immunglobulin My
IL13	interleukin 13	Interleukin 13
IL1RA	interleukin 1 receptor antagonist	Interleukin 1 Rezeptor-Antagonist
IL4	interleukin 4	Interleukin 4
IL6	interleukin 6	Interleukin 6
IL7	interleukin 7	Interleukin 7
IL7R	interleukin 7 receptor	Interleukin 7 Rezeptor
KAc	potassium acetate	Kaliumazetat
kB	kilobase	Kilobasenpaar
KCl	calcium chloride	Kalziumchlorid
KH ₂ PO ₄	potassium dihydrogen	Kaliumdihydrogenphosphat
	orthophosphate	
KM	bone marrow	Knochenmark
l	litre	Liter
Lin	lineage marker	Entwicklungslinien-Marker
LMPP	lymphoid-primed multipotent	lymphoide multipotente
	progenitor	Vorläuferzelle
LPS	lipopolysaccharide	Lipopolysaccharid
M	mole	Mol
mA	milliampere	Milliampere
MACS	magnetic activated cell sorting	Magnetische Zellseparation
MBC	memory b cell	Gedächtnis-B-Zell
MD	median	Median
MD/LD	middle/long depletion	Mittlere/Lange Depletionssäule
		(LD: 10 ⁸ - 5 x 10 ⁸ Zellen)

mg	milligram	Milligramm
MgCl ₂ + 6H ₂ O	magnesium chloride hexahydrate	Magnesiumchloridhexahydrat
MHC I	major histocompatibility complex I	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex I
MHC II	major histocompatibility complex II	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex II
mlgE	membrane immunoglobuline E	membranständiges Immunglobulin E
min	minutes	Minute(n)
ml	millilitre	Milliliter
mM	millimole	Millimol
MPP	multipotent progenitor	multipotente Vorläuferzelle
MS/LS	middle/long separation (positiv selection column)	Mittlere/Lange Positiv-Selektionssäule (MS: 10 ⁷ - 2x 10 ⁸ Zellen; LS: 10 ⁸ - 2 x 10 ⁹ Zellen)
MW	mean	Mittelwert
MZB	marginal zone B-cell	Marginalzonen-B-Zelle
NaAc	sodium acetate	Natriumazetat
NaCl	sodium chloride	Natriumchlorid
NaHPO ₄ ⁻ 2H ₂ O	sodium hydrogen phosphate	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	sodium azide	Natriumazid
NaPyr	sodium pyruvate	Natriumpyruvat
NBT-BCIP	nitro blue tetrazolium 5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-ylphosphate	Nitroblau Tetrazoliumchlorid 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
NF-κB	nuclear factor-κB	p-Toluidinsalz Nukleärer Faktor-κB
ng	nanogram	Nanogramm
NK	natural killer cell	natürliche Killerzelle
NLS	nuclear localization sequence	Kernlokalisierungssignal
NTP	nucleotide triphosphate	Nukleotid-Triphosphat
Oligo-dT	oligo (15 - 20 nt) deoxy-thymine	15 - 20 Desoxythymidin-

		Nukleotide
OVA	ovalbumin	Ovalbumin
PARL	Presenilin-associated rhomboid-like protein	Presenilin-assoziiertes Protein
PAX5	paired box gene 5	TF der Paired Box Genfamilie
PBS	phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
PE	phycoerythrin	Phycoerythrin
pmol	picomole	Pikomol
Poly-A	poly-adenine nucleotides	Poly-Adenin-Nukleotide
PRR	pattern recognition receptor	Muster-Erkennungs-Rezeptor
PS	pooled serum	Poolstandard-Serum
PZ	plasma cell	Plasmazelle
QD	quartz distilled	quarzdestilliert
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	quantitative Echtzeit-PCR
RANKL	receptor activator of nuclear factor- κ B ligand	Rezeptoraktivator des NF κ B-Ligand
rev	reverse	Rückwärts-
rIL4	recombinant interleukine 4	rekombinates Interleukin 4
RLT	RNA lysis buffer	RNA-Lysepuffer
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute	Umdrehung pro Minute
RT	room temperature	Raumtemperatur
SAP	SLAM-associated protein	SLAM-assoziiertes Protein
SCA-1	stem-cell-antigen 1	Stammzell-Antigen 1
SCF	stem-cell factor	Stammzellfaktor
SDF-1	stromal cell-derived factor-1	Stromazellfaktor 1
sec	seconds	Sekunde(n)
slgE	secreted immunoglobuline E	sekretiertes Immunglobulin E
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule	signalisierendes Lymphozyten-Aktivatormolekül
SP	spleen	Milz

SSC	side scatter	Seitwärtsstreulicht
ST	standard	Standard
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 6
SZ	stroma cell	Stromazelle
TCR	t-cell receptor	T-Zellrezeptor
TD	thymus-dependent/T-cell-dependent	Thymus-abhängig/T-Zell-abhängig
TF	transcription factor	Transkriptionsfaktor
T _{FH}	T follicular helper cell	T-follikuläre Helferzelle
T _H	T helper cell	T-Helferzelle
TI	thymus-independent/T-cell-independent	Thymus-unabhängig/T-cell-unabhängig
TLR	toll like receptor	Toll-ähnlicher Rezeptor
TrisCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN	polysorbate 20	Polysorbat 20
U	units	Enzym-Einheit
vs	versus	versus
w/o	without	ohne
WT	wild type	Wildtyp
x g	g-force, RCF = relative centrifocal force	Gravitationskraft, RZB = Relative Zentripetalbeschleunigung
β-ME	β-mercaptoethanol	β-Mercaptoethanol

8.1. Synonyme

Antigen	Weitere Bezeichnungen
B220	CD45R; CD45; GF180; LCA; Ly-5; T200
BP-1	Enpep; Ly-51; APA
CD117	c-Kit; SCFR (Stem Cell Factor Receptor);
CD127	IL7R; IL7R α (Interleukin 7 receptor subunit alpha)
CD19	B4
CD24	HSA (heat stable antigen); Nectadrin; Ly52
CD43	S7; Leukosialin; Sialophorin
CXCL12	SDF-1
CXCR4	SDF-1-Rezeptor; CD184; Fusin
E2A	TCF-3
EBF1	Early B-cell factor 1; OLF1; COE1
Fc ϵ -RI	CD23
ICOS	CD278
ICOSL	CD275
PAX5	BSAP
SCA-1	Ly6A
SCF	c-Kit-Ligand (tmKL, transmembraner c-Kit Ligand);
VLA-4	(α 4 β 1)-Integrin

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	
Abbildung 1:	Zelluläre Komponenten der angeborenen Immunität (Innate Immunity) und adaptiven Immunität (Adaptive Immunity) (3)	10
Abbildung 2:	Komponenten der humoralen und zellulären Immunantwort (4)	11
Abbildung 3:	Die Entwicklung der B-Zelle im Knochenmark und Veränderungen der B-Zell-Oberflächenmarker während der Reifung (7)	12
Abbildung 4:	Zelluläre Zusammensetzung von spezifischen zellulären Nischen für die B-Zellentwicklung (7)	14
Abbildung 5:	Interaktion von DCs, T-Zellen und B-Zellen in den Keimbahnzentren („Germinal Center“) (29)	15
Abbildung 6:	Entwicklung der Plasmazellen in den Überlebensnischen (32)	17
Abbildung 7:	IL4- und CD40-Aktivierungssignale führen zur C ϵ -Keimbahn- und AID-Transkription (43)	19
Abbildung 8:	IgE regulatorische Mechanismen	20
Abbildung 9:	HAX1 als „IgE-tail interagierendes Protein“ (60)	21
Abbildung 10:	Stromausschlussverfahren (Casy®-Zellzähler)	38
Abbildung 11:	Auftrennung zweier Zellpopulationen mit MACS-Trennsäule	39
Abbildung 12:	Auftragsschema beim Coating (ELISA)	53
Abbildung 13:	Auftragsschema des Antikörper-Verdünnungs-Puffers	54
Abbildung 14:	Auftragsschema für Standards, Überstände, Sera (ELISA)	56
Abbildung 15:	Auftragsschema von Kontrolle 1 und Kontrolle 2 (ELISA)	57
Abbildung 16:	Immunisierungs-Schema mit Ovalbumin	59
Abbildung 17:	Arbeitsschema des ELISpots	62
Abbildung 18:	(A) IgG1-Serum-Spiegel und (B) OVA-spezifischer IgG1-Titer von immunisierten Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen	65
Abbildung 19:	(A) Gesamt-Serum-Spiegel des IgE und (B) der OVA-spezifischen IgE-Titer von immunisierten Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen	66

Abbildung 20:	(A) Analyse des Gesamt-Serum-Spiegels des IgG2a und (B) OVA-spezifischen IgG2a-Titers von immunisierten Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen	67 67
Abbildung 21:	Verlauf der Gesamt-IgG1-produzierenden Plasmazellen	71
Abbildung 22:	Auszug aus dem 2. ELISpot: Gesamt-IgG1 im KM	71
Abbildung 23:	Verlauf der OVA-IgG1-produzierenden Plasmazellen	73
Abbildung 24:	Auszug aus dem 2. ELISpot: OVA-spezifisches IgG1 im KM	73
Abbildung 25:	Verlauf der gesamten IgE-produzierenden Plasmazellen	75
Abbildung 26:	Auszug aus dem 3. ELISpot: Gesamt-IgE im KM	77
Abbildung 27:	Verlauf der OVA-IgE-produzierenden Plasmazellen	78
Abbildung 28:	Auszug aus dem 3. ELISpot: OVA-spezifisches IgE im KM	78
Abbildung 29:	Statistische Analyse der Gesamtzellzahl der Milz von naiven WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen	80
Abbildung 30:	Statistische Analyse der Gesamtzellzahl der Milz von OVA- immunisierten WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	81
Abbildung 31:	Statistische Analyse der Gesamtzellzahl des KM von nicht-immunisierten WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	82
Abbildung 32:	Statistische Analyse der Gesamtzellzahl des KM von OVA-immunisierten WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	83
Abbildung 33:	Statistische Analyse der Milz-B-Zellen von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen	84
Abbildung 34:	Statistische Analyse der KM-B-Zellen von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen	85
Abbildung 35:	(A) Repräsentative FACS-Abbildung des 1. eFluor- Viabilitäts-Versuchs der WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (B) Statistische Vergleich von toten Zellen	87 88
Abbildung 36:	In vitro Induktionen von WT- und HAX1 ^{-/-} -Mäusen (06.02.): (A) IgG1-Klassenwechsel via α -CD40/IL4 (B) IgE-Klassenwechsel via α -CD40/IL4 (C) IgG1-Klassenwechsel via LPS/IL4 (D) IgE-Klassenwechsel via LPS /IL4	91 91 92 92
Abbildung 37:	In vitro Induktionen von WT und Hax1 ^{-/-} -Mäusen (21.01.): (A) IgG1-Klassenwechsel via α -CD40/IL4 (B) IgE-Klassenwechsel via α -CD40/IL4	94 94

	(C) IgG1-Klassenwechsel via LPS/IL4	95
	(D) IgE-Klassenwechsel via LPS /IL4	95
Abbildung 38:	Untersuchung des Gesamt-Serum-IgE/-IgG1-Levels	
	(A) ELISA Assay von LPS-induzierten B-Zellen: (06.02.)	97
	(B) ELISA Assay von α -CD40/IL4-induzierten B-Zellen	97
Abbildung 39:	(A) ELISA Assay von LPS/IL4- und α -CD40/IL4-induzierten B-Zellen der WT-Maus	99
	(B) ELISA Assay von LPS/IL4- und α -CD40/IL4-induzierten B-Zellen der Hax1 ^{-/-} -Maus	99
Abbildung 40:	Untersuchung des Gesamt-Serum-IgE/-IgG1-Levels	
	(A) ELISA Assay von LPS-induzierten B-Zellen: (21.01.)	100
	(B) ELISA Assay von α -CD40/IL4-induzierten B-Zellen	101
Abbildung 41:	(A) ELISA Assay von LPS/IL4- und α -CD40/IL4-induzierten B-Zellen der WT-Maus	102
	(B) ELISA Assay von LPS/IL4- und α -CD40/IL4-induzierten B-Zellen der Hax1 ^{-/-} -Maus	102
Abbildung 42:	FACS-Analyse von naiven Hax1 ^{-/-} - und WT-KM-Zellen: Nachweis von B220 ⁺ /IgM ⁺ - (A), B220 ⁺ /IgG1 ⁺ - (B) bzw. B220 ⁺ /IgE ⁺ -Zellen (C)	104 105
Abbildung 43:	(A) FACS-Analyse von B220 ⁺ -Milzzellen der Hax1 ^{-/-} - und WT-Maus	106
	(B) Statistische Analyse von B220-Milzzellen der WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	106
Abbildung 44:	FACS-Analyse von B220-Splenozyten von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	109
Abbildung 45:	(A) FACS-Analyse von B220-KM-Zellen von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	110
	(B) Statistische Analyse von B220-KM-Zellen von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen	110
Abbildung 46:	FACS-Kontrolle von KM-B-Zellen der Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäuse zum Nachweis von B220-Zellen	112
Abbildung 47:	Punkte-Diagramm einer CXCR4-Real Time-Analyse von KM-Zellen der Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäuse	113

Abbildung 48:	Streudiagramm einer CXCR4-Real Time Analyse von B220-gesorteten KM-Zellen der Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäuse	114
Abbildung 49:	(A) Sorting von B220-markierten KM-Zellen der WT-Mäuse via FACS-Cell Sorter ARIA III	115
	(B) Reanalyisierte B220-Zellfraktion einer WT-Maus	116
	(C) Sorting von B220-markierten KM-Zellen der Hax1 ^{-/-} -Mäuse via FACS ARIA III	116
	(D) Reanalyisierte B220-Zellfraktion einer Hax1 ^{-/-} -Maus	117
Abbildung 50:	Streudiagramm einer CXCR4-Real Time Analyse der gesamten KM-Zellen von Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäusen	118
Abbildung 51:	FACS-Analyse von KM-B-Zellen zum Nachweis von intrazellulärem CXCR4	
	(A) Lymphozyten im Forward und Side Scatter der WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus vorgegated	119
	(B) Histogramm von KM-B-Zellen einer repräsentativen WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus	119
Abbildung 52:	Punkte-Diagramm einer CXCR4-Real Time Analyse von Hax1 ^{-/-} - und WT-isolierten Milz-B-Zellen	121
Abbildung 53:	FACS-Analyse von isolierten Milz-B-Zellen: Nachweis von intrazellulärem CXCR4	
	(A) Gatesetzung einer repräsentativen Lymphozytenpopulation der WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus	122
	(B) Histogramm von Milz-B-Zellen einer repräsentativen WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus	122
Abbildung 54:	Streudiagramm einer CXCR4-Real Time-Analyse von gesamten Milzzellen der WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	123
Abbildung 55:	Punkte-Diagramm einer IL1RA-Real Time-Analyse von KM-Zellen einer Non-B-Zellfraktion der Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäuse	125
Abbildung 56:	Streudiagramm einer IL1RA-Real Time-Analyse von Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion der Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäuse	126
Abbildung 57:	Streudiagramm einer IL6-Real Time Analyse von KM-Zellen der Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäuse	127

Abbildung 58:	Streudiagramm einer IL6-Real Time Analyse von gesamten KM-Zellen der WT- und HAX1 ^{-/-} -Mäuse	128
Abbildung 59:	Punkte-Diagramm einer IL6-Real Time Analyse von KM-Zellen der WT- und HAX1 ^{-/-} -Mäuse	129
Abbildung 60:	Streudiagramm einer IL6-Real Time Analyse von Milzzellen einer Non-B-Zellfraktion der Hax1 ^{-/-} - und WT-Mäuse	130
Abbildung 61:	FACS-Analyse von B-Zell-induzierten CD138-tragenden Plasmazellen (PZ): (A) LPS/IL4-induzierte IgG1 ⁺ CD138 ⁺ - und IgE ⁺ CD138 ⁺ -produzierende PZ der WT ₂₅₂ -Maus (B) LPS/IL4-induzierte IgG1 ⁺ CD138 ⁺ - und IgE ⁺ CD138 ⁺ -produzierende PZ der Hax1 ^{-/-} ₂₅₂ -Maus (C) α-CD40/IL4-induzierte IgG1 ⁺ CD138 ⁺ - und IgE ⁺ CD138 ⁺ -produzierende PZ der WT ₂₅₂ -Maus (D) α-CD40/IL4-induzierte IgG1 ⁺ CD138 ⁺ - und IgE ⁺ CD138 ⁺ -produzierende PZ der Hax1 ^{-/-} ₂₅₂ -Maus	132 132 133 133
Abbildung 62:	FACS-Analyse von KM-Zellen einer WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus: Nachweis von CD138 ⁺ -PZ	135
Abbildung 63:	(A) FACS-Analyse von Non-B-Zellen: CD4-Nachweis: WT vs Hax1 ^{-/-} (B) FACS-Analyse von Non-B-Zellen: CD8-Nachweis: WT vs Hax1 ^{-/-}	136 137
Abbildung 64:	Statistische Analyse von CD4- und CD8-positiven T-Zellen einer Non-B-Zellfraktion der WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäuse	138
Abbildung 65:	(A) FACS-Analyse von Splenozyten: CD4-Nachweis: WT vs Hax1 ^{-/-} (B) FACS-Analyse von Non-B-Zellen: CD8-Nachweis: WT vs Hax1 ^{-/-}	140 141
Abbildung 66:	Statistische Analyse von CD4- und CD8-positiven T-Zellen der Milz von WT- und Hax1 ^{-/-} -Mäusen	142
Abbildung 67:	(A) FACS-Analyse von KM-Zellen: Nachweis von CD4: WT vs Hax1 ^{-/-} (B) FACS-Analyse von KM-Zellen: Nachweis von CD8: WT vs Hax1 ^{-/-}	144 145

Abbildung 68: Statistische Analyse von CD4- und CD8-positiven T-Zellen
des KM von WT- und Hax1^{-/-}-Mäusen

145

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	
Tabelle 1:	Real-Time PCR-Programm	51
Tabelle 2:	Antikörper (AK), Standards (ST) bzw. Poolsera inkl. Verdünnungen für die Gesamt- u. Spezifischen-ELISA	55
Tabelle 3:	Sera-Verdünnungen bei Gesamt- und Spezifischen-ELISA	55
Tabelle 4:	(A) Anzahl der Gesamtzellen, der Mittelwerte der PZ und der %-Werte der gesamten IgG1-PZ des KM und der Milz von WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (1., 2., 3., ELISpot)	71
	(B) Zahlenwerte der ausgezählten Spots und der gesamten IgG1-PZ des KM von WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (2. ELISpot, Tag 37)	72
Tabelle 5:	(A) Angaben der via Casy® bestimmten Gesamtzellzahlen, der Mittelwerte der PZ und der %-Werte der der OVA-spezifischen IgG1-PZ des KM und der Milz von WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (1., 2., 3., ELISpot)	74
	(B) Zahlenwerte der ausgezählten Spots und der OVA-spezifischen IgG1-PZ des KM von WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (2. ELISpot, Tag 37)	74
Tabelle 6:	(A) Angaben der via Casy® bestimmten Gesamtzellzahlen, der Mittelwerte der PZ und der %-Werte der gesamten IgE-PZ des KM und der Milz von WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (1., 2., 3., ELISpot)	76
	(B) Zahlenwerte der ausgezählten Spots und der gesamten IgE-PZ des KM von WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (3. ELISpot, Tag 42)	77
Tabelle 7:	(A) Angaben der via Casy® bestimmten Gesamtzellzahlen, der Mittelwerte der PZ und der %-Werte der OVA- spezifischen IgE-PZ des KM und der Milz von WT-	

	und Hax1 ^{-/-} -Maus (1., 2., 3., ELISpot)	79
	(B) Zahlenwerte der ausgezählten Spots und der OVA-spezifischen IgE-PZ des KM von WT- und Hax1 ^{-/-} -Maus (3. ELISpot, Tag 42)	79
Tabelle 8:	Berechnung der B220-Verteilung in der Milz der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	108
	und der WT-Maus (B)	108
Tabelle 9:	Berechnung der B220-Verteilung im KM der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	111
	und der WT-Maus (B)	111
Tabelle 10:	Berechnung der CD4-T-Zell-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	139
	und der WT-Maus (B)	139
Tabelle 11:	Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung in einer Nicht-B-Zellfraktion der Milz der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	139
	und der WT-Maus (B)	139
Tabelle 12:	Berechnung der CD4-T-Zell-Verteilung in der Milz der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	143
	und der WT-Maus (B)	143
Tabelle 13:	Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung in der Milz der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	143
	und der WT-Maus (B)	143
Tabelle 14:	Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung im KM der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	146
	und der WT-Maus (B)	146
Tabelle 15:	Berechnung der CD8-T-Zell-Verteilung im KM der Hax1 ^{-/-} -Maus (A)	147
	und der WT-Maus (B)	147

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Romana Reitböck
Adresse: Ornetsmühl 75, 4911 Tumeltsham
Staatsbürgerschaft: Österreich
Telefon: +43 699 / 170 648 71
Email: romana_reitboeck@yahoo.de
Geburtsdatum/-ort: 30.12.1981, Ried im Innkreis, OÖ
Familienstand: Ledig

Ausbildung

Oktober 2005 – laufend	Diplomstudium Genetik und Molekulare Mikrobiologie an der Universität Wien am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Genetik <u>Studienschwerpunkte:</u> - <i>Immunologie</i> - <i>Neurobiologie</i> - <i>Molekulare Mikrobiologie</i>
Oktober 2007	Abschluss des ersten Studienabschnitts
September 2007	Zusatzprüfung Biologie und Umweltkunde
Juni 2005	Abschluß der Berufsreifeprüfung (Berufsmatura) über den 2. Bildungsweg
März 2011 – November 2012	Unterbrechung des Studiums aufgrund Pflege Tätigkeit

Studienbezogene Praktika

Februar – Juli 2013

Beginn der Diplomarbeit an der Universität Salzburg, Abteilung Allergie und Immunologie
Titel der Diplomarbeit: *Untersuchungen zur Untermauerung einer Immunglobulin-Isotyp-spezifischen Signaltransduktion*

Dezember 2012 – Jänner 2013

Praktikum an der Universität Salzburg, Fachbereich Molekulare Biologie, Abteilung **Allergie und Immunologie**

August/September 2007

Praktikum im Pharmaziezentrum am Institut für Pharm.-Med. Chemie, Universität Wien
Projektmitarbeit: *Zellkultivierung in Zuge einer Untersuchung von Arzneistoffen auf das Blut-Hirn-Schranken-Endothel*

Weitere Qualifikationen

Anfang 2008 – Ende 2009

Wahlfächer im Bereich Biologischer
Anthropologie: *Grundkenntnisse in Biologie des Menschen (Physiologie, Anatomie), Hominidenevolution, Humanökologie, Sozialanthropologie, Humangenetik und Humanethologie*

Sprachen

Deutsch, Englisch

12. Referenzen

1. Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.
2. Dobrev, I., A. Fielding, L. J. Foster, and S. Dedhar. 2008. Mapping the integrin-linked kinase interactome using SILAC. *J Proteome Res* 7:1740-1749.
3. Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 4:11-22.
4. Mortellaro, A., and P. Ricciardi-Castagnoli. 2011. From vaccine practice to vaccine science: the contribution of human immunology to the prevention of infectious disease. *Immunol Cell Biol* 89:332-339.
5. Achatz-Straussberger, G., N. Zaborsky, S. Konigsberger, S. Feichtner, S. Lenz, D. Peckl-Schmid, M. Lamers, and G. Achatz. 2009. Limited humoral immunoglobulin E memory influences serum immunoglobulin E levels in blood. *Clin Exp Allergy* 39:1307-1313.
6. Osmond, D. G. 1990. B cell development in the bone marrow. *Semin Immunol* 2:173-180.
7. Nagasawa, T. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 6:107-116.
8. Hardy, R. R., and K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annual review of immunology* 19:595-621.
9. Melchers, F., A. Rolink, U. Grawunder, T. H. Winkler, H. Karasuyama, P. Ghia, and J. Andersson. 1995. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 7:214-227.
10. Nemazee, D. 2000. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 18:19-51.
11. Nemazee, D., and K. A. Hogquist. 2003. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 15:182-189.
12. Rolink, A. G., C. Schaniel, J. Andersson, and F. Melchers. 2001. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol* 13:202-207.
13. Nemazee, D., and M. Weigert. 2000. Revising B cell receptors. *J Exp Med* 191:1813-1817.
14. Dias, S., H. Silva, Jr., A. Cumano, and P. Vieira. 2005. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* 201:971-979.
15. Hardy, R. R. 2003. B-cell commitment: deciding on the players. *Curr Opin Immunol* 15:158-165.
16. Kikuchi, K., A. Y. Lai, C. L. Hsu, and M. Kondo. 2005. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med* 201:1197-1203.
17. Pelayo, R., R. S. Welner, Y. Nagai, and P. W. Kincade. 2006. Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol* 18:2-11.
18. Matthias, P., and A. G. Rolink. 2005. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 5:497-508.

19. Nutt, S. L., and B. L. Kee. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26:715-725.
20. Kee, B. L. 2009. E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol* 9:175-184.
21. Ye, M., and T. Graf. 2007. Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 19:123-128.
22. Lukin, K., S. Fields, J. Hartley, and J. Hagman. 2008. Early B cell factor: Regulator of B lineage specification and commitment. *Semin Immunol* 20:221-227.
23. Cobaleda, C., A. Schebesta, A. Delogu, and M. Busslinger. 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8:463-470.
24. Snapper, C. M., and W. E. Paul. 1987. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 139:10-17.
25. Stavnezer, J., J. E. Guikema, and C. E. Schrader. 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26:261-292.
26. Gulbranson-Judge, A., and I. MacLennan. 1996. Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c. *Eur J Immunol* 26:1830-1837.
27. O'Rourke, L., R. Tooze, and D. T. Fearon. 1997. Co-receptors of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 9:324-329.
28. Pierce, S. K. 2002. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2:96-105.
29. Ma, C. S., E. K. Deenick, M. Batten, and S. G. Tangye. 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209:1241-1253.
30. MacLennan, I. C., K. M. Toellner, A. F. Cunningham, K. Serre, D. M. Sze, E. Zuniga, M. C. Cook, and C. G. Vinuesa. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194:8-18.
31. Jacob, J., and G. Kelsoe. 1992. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periaarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 176:679-687.
32. Radbruch, A., G. Muehlinghaus, E. O. Luger, A. Inamine, K. G. Smith, T. Dorner, and F. Hiepe. 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6:741-750.
33. Tokoyoda, K., A. E. Hauser, T. Nakayama, and A. Radbruch. 2010. Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat Rev Immunol* 10:193-200.
34. Cassese, G., S. Lindenau, B. de Boer, S. Arce, A. Hauser, G. Riemekasten, C. Berek, F. Hiepe, V. Krenn, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2001. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* 31:2726-2732.
35. Gulbranson-Judge, A., M. Casamayor-Palleja, and I. C. MacLennan. 1997. Mutually dependent T and B cell responses in germinal centers. *Ann N Y Acad Sci* 815:199-210.
36. Parker, D. C. 1993. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol* 5:413-420.
37. Parker, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11:331-360.
38. Ogata, H., I. Su, K. Miyake, Y. Nagai, S. Akashi, I. Mecklenbrauker, K. Rajewsky, M. Kimoto, and A. Tarakhovsky. 2000. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med* 192:23-29.

39. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
40. Jarjour, N. N., W. J. Calhoun, E. A. Kelly, G. J. Gleich, L. B. Schwartz, and W. W. Busse. 1997. The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1515-1521.
41. Fritsch, P. 2004. Dermatologie, Venerologie: Lehrbuch und Atlas (Springer-Lehrbuch) [Gebundene Ausgabe]. Verlag: Springer; Auflage: 1 (8. Dezember 1998):959 Seiten.
42. Constant, S. L., and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15:297-322.
43. Geha, R. S., H. H. Jabara, and S. R. Brodeur. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 3:721-732.
44. Stavnezer, J. 1996. Antibody class switching. *Adv Immunol* 61:79-146.
45. Armitage, R. J., W. C. Fanslow, L. Strockbine, T. A. Sato, K. N. Clifford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, C. R. Maliszewski, and et al. 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357:80-82.
46. Iciek, L. A., S. A. Delphin, and J. Stavnezer. 1997. CD40 cross-linking induces Ig epsilon germline transcripts in B cells via activation of NF-kappaB: synergy with IL-4 induction. *J Immunol* 158:4769-4779.
47. Linehan, L. A., W. D. Warren, P. A. Thompson, M. J. Grusby, and M. T. Berton. 1998. STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol* 161:302-310.
48. Jeppson, J. D., H. R. Patel, N. Sakata, J. Domenico, N. Terada, and E. W. Gelfand. 1998. Requirement for dual signals by anti-CD40 and IL-4 for the induction of nuclear factor-kappa B, IL-6, and IgE in human B lymphocytes. *J Immunol* 161:1738-1742.
49. Jabara, H. H., S. M. Fu, R. S. Geha, and D. Vercelli. 1990. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J Exp Med* 172:1861-1864.
50. Splawski, J. B., S. M. Fu, and P. E. Lipsky. 1993. Immunoregulatory role of CD40 in human B cell differentiation. *J Immunol* 150:1276-1285.
51. Snapper, C. M., F. D. Finkelman, D. Stefany, D. H. Conrad, and W. E. Paul. 1988. IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol* 141:489-498.
52. Snapper, C. M., F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1988. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* 167:183-196.
53. Snapper, C. M., F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1988. Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4. *Immunol Rev* 102:51-75.
54. Siebenkotten, G., C. Esser, M. Wabl, and A. Radbruch. 1992. The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* 22:1827-1834.
55. Vieira, P., and K. Rajewsky. 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18:313-316.
56. Karnowski, A., and M. C. Lamers. 2006. Inefficient processing of mRNA transcripts for the membrane form of the IgE heavy chain: Impact on serum IgE levels. 2006.
57. Achatz, G., L. Nitschke, and M. C. Lamers. 1997. Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* 276:409-411.

58. Achatz-Straussberger, G., N. Zaborsky, S. Konigsberger, E. O. Luger, M. Lamers, R. Crameri, and G. Achatz. 2008. Migration of antibody secreting cells towards CXCL12 depends on the isotype that forms the BCR. *Eur J Immunol* 38:3167-3177.
59. Yu, P., M. Kosco-Vilbois, M. Richards, G. Kohler, and M. C. Lamers. 1994. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369:753-756.
60. Oberndorfer, I., D. Schmid, R. Geisberger, G. Achatz-Straussberger, R. Crameri, M. Lamers, and G. Achatz. 2006. HS1-associated protein X-1 interacts with membrane-bound IgE: impact on receptor-mediated internalization. *J Immunol* 177:1139-1145.
61. Suzuki, Y., C. Demoliere, D. Kitamura, H. Takeshita, U. Deuschle, and T. Watanabe. 1997. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol* 158:2736-2744.
62. Yamanashi, Y., M. Okada, T. Semba, T. Yamori, H. Umemori, S. Tsunasawa, K. Toyoshima, D. Kitamura, T. Watanabe, and T. Yamamoto. 1993. Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3631-3635.
63. Fukuda, T., D. Kitamura, I. Taniuchi, Y. Maekawa, L. E. Benhamou, P. Sarthou, and T. Watanabe. 1995. Restoration of surface IgM-mediated apoptosis in an anti-IgM-resistant variant of WEHI-231 lymphoma cells by HS1, a protein-tyrosine kinase substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7302-7306.
64. Yamanashi, Y., T. Tamura, T. Kanamori, H. Yamane, H. Nariuchi, T. Yamamoto, and D. Baltimore. 2000. Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev* 14:11-16.
65. Gallagher, A. R., A. Cedzich, N. Gretz, S. Somlo, and R. Witzgall. 2000. The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4017-4022.
66. Radhika, V., D. Onesime, J. H. Ha, and N. Dhanasekaran. 2004. Galpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1. *J Biol Chem* 279:49406-49413.
67. Ramsay, A. G., M. D. Keppler, M. Jazayeri, G. J. Thomas, M. Parsons, S. Violette, P. Weinreb, I. R. Hart, and J. F. Marshall. 2007. HS1-associated protein X-1 regulates carcinoma cell migration and invasion via clathrin-mediated endocytosis of integrin alphavbeta6. *Cancer Res* 67:5275-5284.
68. Grzybowska, E. A., V. Zayat, R. Konopinski, A. Trebinska, M. Szwarc, E. Sarnowska, E. Macech, J. Korczynski, A. Knapp, and J. A. Siedlecki. 2013. HAX-1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a possible role in mRNA processing. *FEBS J* 280:256-272.
69. Al-Maghrebi, M., H. Brule, M. Padkina, C. Allen, W. M. Holmes, and Z. E. Zehner. 2002. The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1gamma and HAX-1. *Nucleic Acids Res* 30:5017-5028.
70. Yin, H., H. Morioka, C. A. Towle, M. Vidal, T. Watanabe, and L. Weissbach. 2001. Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* 15:122-137.

71. Cilenti, L., M. M. Soundarapandian, G. A. Kyriazis, V. Stratico, S. Singh, S. Gupta, J. V. Bonventre, E. S. Alnemri, and A. S. Zervos. 2004. Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death. *J Biol Chem* 279:50295-50301.
72. Wolkerstorfer, S. 2013. HS1-associated protein X1 (HAX1): Multifunctional protein with an important role in B cell development and as interaction partner of M2 tail region of immunoglobulin isotypes. *Dissertation*.
73. Glauner, B. 2006. Stromaausschlussverfahren, Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. *BIOspektrum* 0406:394-395.
74. Peckl-Schmid, D., S. Wolkerstorfer, S. Konigsberger, G. Achatz-Straussberger, S. Feichtner, E. Schwaiger, N. Zaborsky, M. Huemer, I. K. Gratz, R. Schibli, M. Lamers, R. Cramer, K. Moser, E. O. Luger, and G. Achatz. 2010. HAX1 deficiency: impact on lymphopoiesis and B-cell development. *Eur J Immunol* 40:3161-3172.
75. Suzuki, Y., C. Demoliere, D. Kitamura, H. Takeshita, U. Deuschle, and T. Watanabe. 1997. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol* 158:2736-2744.
76. Yamanashi, Y., T. Fukuda, H. Nishizumi, T. Inazu, K. Higashi, D. Kitamura, T. Ishida, H. Yamamura, T. Watanabe, and T. Yamamoto. 1997. Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J Exp Med* 185:1387-1392.
77. Chao, J. R., E. Parganas, K. Boyd, C. Y. Hong, J. T. Opferman, and J. N. Ihle. 2008. Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature* 452:98-102.
78. Yuchi Han, Y.-S. C., Zhilin Liu, Natalya Bodyak, Debra Rigor, Egbert Bisping, William T. Pu, Peter M. Kang. 2006. Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition. *Circulation Research* 99:415-423.
79. Naveiras, O., V. Nardi, P. L. Wenzel, P. V. Hauschka, F. Fahey, and G. Q. Daley. 2009. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460:259-263.
80. Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez, and J. C. Martinou. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276:11615-11623.
81. Cande, C., N. Vahsen, C. Garrido, and G. Kroemer. 2004. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 11:591-595.
82. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
83. Boatright, K. M., and G. S. Salvesen. 2003. Caspase activation. *Biochem Soc Symp*:233-242.
84. Sharp, T. V., H. W. Wang, A. Koumi, D. Hollyman, Y. Endo, H. Ye, M. Q. Du, and C. Boshoff. 2002. K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function. *J Virol* 76:802-816.
85. Klein, C., M. Grudzien, G. Appaswamy, M. Germeshausen, I. Sandrock, A. A. Schaffer, C. Rathinam, K. Boztug, B. Schwitzer, N. Rezaei, G. Bohn, M. Melin, G. Carlsson, B. Fadeel, N. Dahl, J. Palmblad, J. I. Henter, C. Zeidler, B.

- Grimbacher, and K. Welte. 2007. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* 39:86-92.
86. Lees, D. M., I. R. Hart, and J. F. Marshall. 2008. Existence of multiple isoforms of HS1-associated protein X-1 in murine and human tissues. *J Mol Biol* 379:645-655.
 87. Fadeel, B., and E. Grzybowska. 2009. HAX-1: a multifunctional protein with emerging roles in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1790:1139-1148.
 88. Kawaguchi, Y., E. Nishimagi, A. Tochimoto, M. Kawamoto, Y. Katsumata, M. Soejima, T. Kanno, N. Kamatani, and M. Hara. 2006. Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14501-14506.
 89. Tokoyoda, K., T. Egawa, T. Sugiyama, B. I. Choi, and T. Nagasawa. 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20:707-718.
 90. Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D. R. Littman. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393:595-599.
 91. Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson, and T. A. Springer. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9448-9453.
 92. Yun, T. J., M. D. Tallquist, A. Aicher, K. L. Rafferty, A. J. Marshall, J. J. Moon, M. E. Ewings, M. Mohaupt, S. W. Herring, and E. A. Clark. 2001. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol* 166:1482-1491.
 93. Abram, M. 2009. Nerve Growth Factor (NFG) vermitteltes Überleben pulmonaler Plasmazellen in der Atemwegsentszündung des murinen allergischen Astma bronchiale *Dissertation*.
 94. Rottach, E.-M. 2012. Generierung und Charakterisierung neuer marker für Hühner B-Zellen. *Dissertation*.