

Max-Planck-Institut
für Immunbiologie



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Auszüge

■ aus den Jahrbüchern
1996–2001



Inhalt

- 2 Inhalt**
- 4 Grußwort**
Prof. Dr. Klaus Eichmann
- 6 Personal**
- 7 Forschungsthemen im Überblick**
- 8 Institutsgeschichte**
- 9 Kuratorium und
Wissenschaftlicher Fachbeirat**
- 10 Molekulare Embryologie**
Prof. Dr. Rolf Kemler

E-Cadherin/Catenin-Zelladhäsionskomplex in der Embryonalentwicklung
- 14 Medizinische Mikrobiologie**
Dr. Chris Galanos und
Dr. Horst Mossmann

LPS-Überempfindlichkeit unter Schockwirkung
- 16 Molekulare Immunologie**
Prof. Dr. Michael Reth

Exportkontrolle des B-Zell-Antigenrezeptors
- 20 Nachwuchsgruppe Hammerschmidt**
Dr. Matthias Hammerschmidt

Dorsoventrale Musterbildung im Embryo des Zebrafisches
- 28 Entwicklungsbiologie**
Prof. Dr. Davor Solter
Autor: Dr. Heinrich Schrewe

Aktivine und Aktivinrezeptoren in der Mausentwicklung

- 32 Nachwuchsgruppe Klingmüller**
Dr. Ursula Klingmüller

Identifizierung und Visualisierung von Signaltransduktionskaskaden in der Erythropoese
- 38 Zelluläre Immunologie**
Prof. Dr. Klaus Eichmann
Autor: Dr. Manuel Modolell

Immunologische Steuerung des Argininmetabolismus in Makrophagen
- 42 Nachwuchsgruppe Steimle**
Dr. Viktor Steimle

Regulation der Klasse II Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes: Struktur/Funktionsanalyse des Hauptregulators CIITA („class II transactivator“)
- 48 Entwicklung des Immunsystems**
Prof. Dr. Thomas Boehm
Autoren: Dr. T. Neil Dear,
Dr. Rita Carsetti

Die Funktion der Milz bei der Immunabwehr
- 51 Impressum**

Grußwort



Prof. Dr. Klaus Eichmann
Geschäftsführender
Direktor

Sehr verehrte Damen und Herren,

Aus einem industriellen Forschungsinstitut hervorgegangen, feiert das Max-Planck-Institut für Immunbiologie, kurz MPIIB, in diesem Jahr seine 40 jährige Zugehörigkeit zur Max-Planck-Gesellschaft. Zwei Phasen seiner Geschichte lassen sich abgrenzen. Von 1961-1981 war das zentrale Thema des Institutes die Erforschung des Endotoxins, eines bakteriellen Wirkstoffes mit vielfältigen Wirkungen auf den Wirtsorganismus, unter anderem die Induktion von Fieber und die Aktivierung des Immunsystems. Endotoxin stellt eines der wichtigsten molekularen Prinzipien in der Wechselwirkung zwischen Infektionserregern und dem Säugetierorganismus dar und das MPIIB war in seiner Erforschung für viele Jahrzehnte international führend. Seit 1981 stellt jedoch die Erforschung des Immunsystems selbst, seit 1990 ergänzt von Forschungen zur Entwicklung der Säugerorganismen, die Hauptaktivität des MPIIB dar. Die Erforschung keines anderen Organismus hat in den letzten Jahrzehnten einen vergleichbaren Beitrag zum Verständnis der Organentwicklung, der Zellbiologie, und der Molekülfunktionen höherer Organismen geleistet, wie die des Immunsystems. Dabei hat die immunologische Forschung nicht nur neue Untersuchungsreagenzien beigesteuert, wie die monoklonalen Antikörper, an deren Entwicklung unser früh verstorbener Co-Direktor, Nobelpreisträger Georges Köhler, massgeblich beteiligt war. Vielmehr waren die Zellen und Organe des Immunsystems besonders geeignete Studienobjekte zur Erforschung allgemeiner biologischer und molekularer Prinzipien, denen auch andere Zellen und Organe höherer Organismen einschließlich des Menschen gehorchen. In der Verbindung von Immun- und Entwicklungsbiologie ist das MPIIB einzigartig in Deutschland und gehört auch international zu den führenden Forschungs- und Ausbildungsstätten. Die Beiträge der Mitarbeiter des MPIIB zu der weltweiten Forschung auf diesem Gebiet sind jährlich in bis zu 100 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften und Büchern dokumentiert. Als Institut der Max-Planck-Gesellschaft ist das MPIIB überwiegend der reinen Grundlagenforschung verpflichtet. Trotzdem ergeben sich aus der Arbeit des Instituts immer wieder auch Ansätze, die sich zur Weiterentwicklung für die medizinische Anwendung eignen. Als Beispiel sei hier die unter massgeblicher

Federführung von Wissenschaftlern des MPIIB entwickelte Vakzine gegen die Borreliose genannt, einer von Zecken übertragenen Erkrankung von steigender medizinischer Bedeutung, deren Behandlung mit Antibiotika nicht zuverlässig gelingt. Während der am MPIIB entwickelte Impfstoff in den USA bereits Anwendung findet, steht ein für Europa geeigneter Impfstoff noch im Entwicklungsstadium.

Entsprechend bewährter Strukturen in der Max-Planck-Gesellschaft beherbergt das MPIIB vier Forschungsabteilungen, sowie drei Nachwuchsgruppen. Letztere wurden nach dem berühmten Freiburger Entwicklungsbiologen Hans-Speeman-Laboratorien genannt. Seit diesem Jahr wurde eine weitere Nachwuchsforschergruppe am Institut angesiedelt, die den Namen Georges-Köhler-Nachwuchsgruppe erhielt. Besonders stolz sind wir auf unsere engen Beziehungen zur Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität, deren Lehrstuhl für molekulare Immunbiologie im MPIIB angesiedelt ist und mit dem wir gemeinsam den Studiengang „Molekulare Immunbiologie“ für Studenten der Biologie anbieten. Mit dem Heft „Auszüge“ stellen wir uns anlässlich unseres Jubiläums einer interessierten Öffentlichkeit vor. Es enthält Kurzbeschreibungen der Forschungsgebiete in den Abteilungen und Arbeitsgruppen, sowie ausgewählte Aufsätze aus den Jahrbüchern der Max-Planck-Gesellschaft der letzten fünf Jahre, die beispielhaft aktuelle Forschungsschwerpunkte des MPIIB in größerer Ausführlichkeit, jedoch in für Laien verständlicher Form beschreiben.

Klaus Eichmann
Geschäftsführender Direktor

Personal

■ Geschäftsführender Direktor

Prof. Dr. Dr. h.c. Klaus Eichmann

Stübeweg 51
79108 Freiburg
Telefon 07 61/51 08-5 40
Telefax 07 61/51 08-5 45
E-Mail: eichmann@immunbio.mpg.de
<http://www.immunbio.mpg.de>

Wissenschaftliche Mitglieder, Kollegium, Direktoren

Prof. Dr. Thomas Boehm
Prof. Dr. Klaus Eichmann
Prof. Dr. Rolf Kemler
Prof. Dr. Davor Solter

Selbständige Nachwuchsgruppen Hans-Spemann-Laboratorium

Dr. Matthias Hammerschmidt
Dr. Ursula Klingmüller
Dr. Viktor Steimle

Am Institut tätig

Forschungsgruppe und Lehrstuhl für molekulare Immunologie der Universität Freiburg

Prof. Dr. Michael Reth

Arbeitsgruppe Medizinische Mikrobiologie

Dr. Chris Galanos

Mitarbeiter

Ende 2000 waren insgesamt 257 Mitarbeiter (einschließlich der Drittmittelbeschäftigten) am Institut tätig, darunter 53 Wissenschaftler; dazu kamen im Berichtsjahr 52 Nachwuchs- und Gastwissenschaftler.

Forschungsthemen im Überblick

■ Biologie lymphoider Organe, insbesondere Thymus; Evolution des adaptiven Immunsystems (Boehm)

Das zelluläre Immunsystem, Entwicklung, Aktivierung und Bedeutung bei Allergie und Infektion (Eichmann)

Zelladhäsionsmoleküle als Morphoregulatoren; Signalübertragungsprozesse in der Maus-Embryonalentwicklung (Kemler)

Genexpression in Maus-Präimplantationsembrionen; molekulare Basis des genomischen Imprintings und der Keimblattentstehung in der Maus-Embryonalentwicklung (Solter)

Zebrafiscentwicklung; dorsoventrale Musterbildung; kardiovaskuläres System (Hammerschmidt)

Signalübertragung; Erythropoietin-Rezeptor (Klingmüller)

Molekulare Mechanismen der MHC Klasse II-Regulation und der T-Zelldifferenzierung (Steimle)

Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten; Struktur- und Funktionsanalyse der B-Zell-Antigenrezeptoren (Reth)

Wirkungsweise des Endotoxins; Infektionsstudien mit *Trypanosoma cruzi* (Galanos, Mossmann)

Institutsgeschichte



Das 1961 gegründete Institut ist aus einem industriellen Forschungsinstitut der Firma Wander AG in Freiburg hervorgegangen.

Unter der Leitung von Prof. Dr. Otto Westphal, Prof. Dr. Herbert Fischer und Dr. Otto Lüderitz befaßte sich das Institut bis Ende der 70er Jahre schwerpunktmäßig mit den Wechselwirkungen zwischen Infektionserregern und dem Immunsystem unter besonderer Berücksichtigung des bakteriellen Wirkstoffes Endotoxin.

Mit dem Eintritt von Prof. Dr. Klaus Eichmann (1981) und Prof. Dr. Georges Köhler (1984) fand eine thematische Neuorientierung des Instituts statt. Zudem wurde infolge des Nobelpreises für Georges Köhler 1984 durch Sonderfinanzierung des Landes Baden-Württemberg mit den Berufungen von Prof. Dr. Davor Solter (1990) und Prof. Dr. Rolf Kemler (1992) die Entwicklungsbiologie als weiterer wissenschaftlicher Schwerpunkt am Institut etabliert.

Am 1. März 1995 verstarb unerwartet Prof. Dr. Georges Köhler, und als sein Nachfolger wurde 1996 Prof. Dr. Thomas Boehm berufen. Bestrebungen um eine verstärkte Kooperation zwischen dem Institut und der Fakultät für Biologie der Universität führten zur Einrichtung des Lehrstuhls für Molekulare Immunologie am Institut und zu der Berufung von Prof. Dr. Michael Reth zum C4-Professor der Universität Freiburg (1996). Darüber hinaus wurden dem Institut unter der Bezeichnung Spemann-Laboratorien drei Selbständige Nachwuchsgruppen angegliedert.

Die wissenschaftliche Identität des Instituts ergibt sich aus der Verbindung von Immun- und Entwicklungsbiologie mit dem generellen Ziel, die Entstehung multizellulärer Systeme und Organismen besser verstehen zu lernen.

Kuratorium

Dr. Rolf Böhme, Oberbürgermeister, Freiburg

Dr. Horst Freisler, Teningen-Nimburg

Prof. Dr. Hermann Frommhold, Vorsitzender des Universitätsklinikums, Freiburg

Dr. Christa Maar, Mitglied des Vorstands Hubert Burda Foundation for Cancer Research, München

Dr. Dieter Salomon, Fraktionsvorsitzender Bündnis 90/Die Grünen, Landtag Baden-Württemberg, Stuttgart

Dr. Sven von Ungern-Sternberg, Regierungspräsident, Freiburg

Wissenschaftlicher Fachbeirat

Prof. Jonathan Howard, Köln

Prof. Diane Mathis, Boston, USA

Prof. Michael Neuberger, Cambridge/England

Prof. Dr. Elizabeth J. Robertson, Cambridge, USA

Prof. Günther Schütz, Heidelberg

Prof. Albrecht Sippel, Freiburg

Prof. Jim Smith, London/England

Prof. Jean-Paul Thiery, Paris/Frankreich

Molekulare Embryologie



Abteilung „Molekulare Embryologie“

Prof. Dr. Rolf Kemler

E-Cadherin/Catenin-Zelladhäsionskomplex in der Embryonalentwicklung

In der Entwicklung multizellulärer Organismen, wie derjenigen der Säugetiere, ist die Bildung einfacher Epithelzellschichten ein wesentliches morphogenetisches Ereignis. Epithelzellen bilden in vielerlei Hinsicht eine wichtige physiologische Barriere und sind für die Erhaltung der Histoarchitektur der Gewebe von entscheidender Bedeutung. Die Differenzierung nichtpolarisierter Zellen zu polarisierten Epithelzellen stellt einen entwicklungsbiologischen und zellbiologisch wichtigen Differenzierungsschritt dar. Unsere Arbeitsgruppe untersucht die molekularen Vorgänge und die Kaskade molekularer Ereignisse, die den Übergang von einer nichtpolarisierten zu einer polarisierten Epithelzelle kontrollieren. Ausgangspunkt unserer Arbeiten waren Überlegungen, daß Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle in der Entwicklung multizellulärer Organismen spielen, was zur Beschreibung des embryonal- und Epithelzell-spezifischen Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin führte. Epithelzellen sind hochspezialisierte Zellen mit klar definierten basalen, lateralen und apikalen Membrankompartimenten. E-Cadherin ist ausschließlich in den basolateralen Membranbereichen zu finden und ist hier besonders in der „zonula adhaerens“ angereichert.

Um die molekularen Mechanismen der Zelladhäsion zu untersuchen und Informationen über die Rolle von E-Cadherin in der Bildung von Epithelzellen zu gewinnen, wurden detaillierte Untersuchungen des Proteins E-Cadherin und seines Gens vorgenommen. E-Cadherin ist ein integrales Membranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Es ist in seinem zytoplasmatischen Teil phosphoryliert, nur in Gegenwart von Kalzium adhäsiv und gehört deshalb zu der Familie der Kalziumabhängigen Zelladhäsionsmoleküle, den Cadherinen.

Strukturvergleiche mit anderen Kalziumabhängigen Zelladhäsionsmolekülen zeigten, daß die zytoplasmatische Domäne dieser Moleküle die stärkste Homologie zu anderen Cadherinen aufweist. So sind in den zytoplasmatischen Domänen von Maus-E-Cadherin und Huhn-L-CAM 9 von 10 Aminosäuren identisch. Diese starke Homo-

logie deutet auf eine während der Evolution konservierte Funktion hin. Proteinanalysen ergaben erste Hinweise, daß E-Cadherin auf der Zelloberfläche als Proteinkomplex vorliegt. Dieser Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von über 300 kDa setzt sich aus E-Cadherin und drei weiteren Proteinen zusammen. Durch Deletionsmutanten, deren E-Cadherin-Gen in dem Abschnitt verändert war, der für die zytoplasmatische Domäne codiert, konnten wir zeigen, daß diese drei Proteine mit dem zytoplasmatischen Teil des E-Cadherins assoziiert sind. Diese assoziierten Proteine sind in allen von uns untersuchten Wirbeltieren vorhanden: Wir konnten sie durch die Expression des E-Cadherin-Gens in E-Cadherin-negativen Zellen von Maus, Huhn und Mensch nachweisen. Diese E-Cadherin-assoziierten Proteine wurden α -, β -, und γ -Catenin genannt (Molekulargewicht: 102, 88 und 80 kDa). Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß das γ -Catenin identisch mit dem bereits bekannten Plakoglobin ist.

Wir haben die E-Cadherin-Catenin-Komplexbildung untersucht, weil sie von grundlegender biologischer Bedeutung ist. Nur wenn Catenine mit E-Cadherin assoziiert sind, zeigt dieses seine volle adhäsive Funktion. Das bedeutet, daß die zytoplasmatische Region von E-Cadherin durch die Assoziation mit Cateninen die Adhäsion der Zellen an ihre Umgebung und damit auch die Eigenschaften von Geweben reguliert. Catenine verbinden darüber hinaus E-Cadherin mit Zytoskelettstrukturen.

Der Komplex zwischen E-Cadherin und den Cateninen bildet sich bereits während der Entstehung dieser Proteine im endoplasmatischen Retikulum. Diese Assoziation dirigiert möglicherweise den intrazellulären Transport dieser Proteine zu den basolateralen Membrankompartimenten der Epithelzellen.

Auf der Zelloberfläche befinden sich freie E-Cadherin-Catenin-Komplexe, die fortlaufend mit dem – sich ständig umbildenden – Aktinfilamentensystem verbunden werden. Über diese Verknüpfung wird E-Cadherin in der „zonula adhaerens“ angereichert. Das quantitative und/oder qualitative Verhältnis von nichtverknüpftem E-Cadherin-Catenin-Komplex und dem mit Aktinfilamenten verknüpften Komplex definiert den adhäsiven Status einer Zelle.

Die Verknüpfung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit Aktinfilamenten ist ein dynamischer Prozeß, denn während des Zellwachstums, während der Zellteilung oder auch während der Zellwanderung werden diese Verknüpfungen ständig verändert. Wir fanden, daß das Zusammenspiel dieses Komplexes mit dem Aktinfilament-

system durch Wachstumsfaktoren reguliert wird. Nach Stimulierung von Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) wurden in unseren Experimenten Tyrosinreste von β -Catenin und Plakoglobin phosphoryliert. Gleichzeitig entkoppelten sich der Adhäsionskomplex und das Aktinfilamentsystem. Wir stellten fest, daß β -Catenin an den Rezeptor von EGF binden kann. Deshalb stellen wir uns den Aufbau und die Regulation dieses Komplexes so vor, wie es in *Abbildung 1* dargestellt ist. Wir vermuten ein generelles Wechselspiel zwischen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und Cadherin-vermittelter Zelladhäsion. Über dieses Wechselspiel wird die Zell-Zell-Adhäsion reguliert. Wir haben den molekularen Aufbau des E-Cadherin-Catenin-Komplexes proteinbiochemisch untersucht und die Bindungsstellen bei den jeweiligen Partnermolekülen entdeckt. Danach nimmt β -Catenin eine zentrale Stelle in dem Komplex ein, da es sowohl an E-Cadherin als auch an β -Catenin bindet. Plakoglobin kann zu einem gewissen Ausmaß die Rolle von β -Catenin ersetzen, während α -Catenin die Verbindung zum Zytoskelett herstellt.

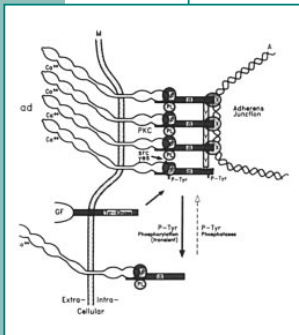


Abbildung 1

zungen, während α -Catenin die Verbindung zum Zytoskelett herstellt.

Unsere molekulargenetischen Untersuchungen und die Erstellung der Primärsequenz zeigen, daß es in den Cateninen Bereiche gibt, die mit anderen Proteinen homolog sind und die auch im peripheren Bereich des Zytoplasmas vorkommen. Von besonderem Interesse hierbei ist, daß β -Catenin und Plakoglobin ausgedehnte homologe Bereiche zum Protein Armadillo besitzen, das in *Drosophila* entdeckt wurde und Teil eines Signalübertragungsweges ist. Es ist es nicht auszuschließen, daß – in Analogie zu Armadillo – sowohl β -Catenin als auch Plakoglobin ebenfalls Teil eines Signalübertragungsweges sind.

Um die funktionelle Bedeutung von E-Cadherin und den Cateninen während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, haben wir die Gene dieser beiden Proteine in embryonalen Stammzelllinien (ES-Zellen) inaktiviert und haben transgene Mäuse hergestellt, die kein E-Cadherin und keine Catenine mehr produzieren konnten. Durch diese sogenannten k.o.-Mäuse kann die Wirkung eines Gens im Organismus studiert werden. Wegen des fehlenden E-Cadherins stirbt der Embryo in einem frühen Entwicklungsstadium ab. Zwar können E-Cadherin-negative Embryonen noch die ersten Teilungsstadien durchführen, doch sterben sie im Blastozystenstadium wegen eines Defektes in der Trophektodermbildung ab. Diese Untersuchungen belegen, daß E-Cadherin

für die Embryonalentwicklung essentiell ist und besonders für die Bildung und Aufrechterhaltung eines Epithels benötigt wird (*Abb. 2*).

Um den Einfluß von E-Cadherin auf Zelldifferenzierung und Organogenese zu untersuchen, haben wir aus Embryonen mit einem inaktiven E-Cadherin-Gen ES-Zelllinien etabliert. Aufgrund der bereits erwähnten zentralen Funktion von β -Catenin für die Bildung des Adhäsionskomplexes war zu erwarten, daß der Verlust von β -Catenin einen Phänotyp hervorbringen könnte, der dem des E-Cadherin-Verlustes entspricht. Dies ist jedoch nicht der Fall, da der Verlust von β -Catenin die Embryonalentwicklung erst im Gastrulationsstadium beeinflusst. Vermutlich vermag Plakoglobin zu einem gewissen Grad die Abwesenheit von β -Catenin zu kompensieren. Embryonen mit inaktivem β -Catenin-Gen haben einen spezifischen Defekt im embryonalen Ektoderm und können kein Mesoderm bilden. Da β -Catenin in allen Zellen des Embryos exprimiert wird, sein Verlust einen spezifischen Phänotyp jedoch nur im embryonalen Ektoderm verursacht, muß angenommen werden, daß β -Catenin in diesen Zellen eine nicht zu ersetzende biologische Funktion hat.

Wir nehmen daher an, daß β -Catenin in embryonalen Ektodermzellen in der Tat Teil eines Signalübertragungsweges ist, der die Differenzierung einer epithelialen zu einer mesenchymalen Zelle kontrolliert.

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Aufbau und Regulation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes, wie er sich in der „zonula adherens“ von Epithelzellen darstellt. Danach wird die laterale Anordnung von E-Cadherin durch die intrazelluläre Vernetzung mit Cateninen kontrolliert. Catenine und wahrscheinlich zusätzliche Proteine (X) dienen als Bindungsstelle für Aktinfilamente. Eine Regulation der Zytoskelettverknüpfung erfolgt über Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und andere Kinasen (PKS, Yes, Src) sowie über Phosphorylierung von β -catenin und Plakoglobin. Cad = E-Cadherin; α = α -catenin; v = vinculin; β = β -catenin; PL = Plakoglobin; A = Aktinfilamente; src und yes: Proto-Onkogene; PKC: Protein-Kinase C; P-Tyr: Tyrosin-Phosphorylierung; GF: Wachstumsfaktor; Tyr-Kinase: Protein Kinase Rezeptor (aus: TIG, Vol.19, 317-321, 1993).

Abbildung 2: Inaktivierung von E-Cadherin durch homologe Rekombination und Herstellung von transgenen Mäusen. Der Verlust von E-Cadherin beeinflusst die Trophektodermbildung im Blastozystenstadium. Oben links: normaler Blastozyst; Phänotypen von drei E-Cadherin-negativen Embryonen mit defektem Trophektoderm.

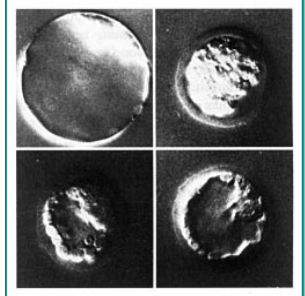


Abbildung 2

Medizinische Mikrobiologie

Dr. Chris Galanos und Dr. Horst Mossmann

LPS-Überempfindlichkeit unter Schock- einwirkung

Am klinischen Bild vieler Erkrankungen, die durch eine Infektion mit gramnegativen Bakterien verursacht werden, ist nach dem heutigen Verständnis die Freisetzung des Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) wesentlich beteiligt. So wird insbesondere die Entstehung des septischen Schocks (Endotoxinschock) maßgeblich durch LPS ausgelöst.

Unsere Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigen, daß die LPS-Empfindlichkeit eines Organismus durch verschiedene Behandlungen verändert werden kann. So können Infektionen, wachsende Tumoren, eine bestimmte Form der Hypersensibilität gegen Bakterienbestandteile oder Leberfunktionsstörungen zu einer dramatischen Zunahme der LPS-Empfindlichkeit führen.

Die LPS-Empfindlichkeit ist einerseits gekennzeichnet durch eine erhöhte Bereitschaft, Tumornekrosefaktor- α (TNF α) zu produzieren, und andererseits durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der toxischen Wirkung von TNF α . Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Bereitschaft der infizierten Tiere, verstärkt TNF α zu bilden, durch eine erhöhte Interferon- γ (IFN γ)-Produktion verursacht wird. So können C57BL/10ScCr-Mäuse, deren IFN γ -Produktion gestört ist, während einer Infektion mit *Salmonellatyphimurium* oder nach Behandlung mit abgetatetem *Propionibacterium acnes* keine LPS-Überempfindlichkeit entwickeln. Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung von IFN γ an der Entwicklung einer LPS-Überempfindlichkeit erbrachten Versuche mit anti-IFN γ -Antikörpern. C57BL/10ScSn-Mäuse mit intakter IFN- γ -Produktion entwickeln unter der Wirkung von Antikörpern, die gegen IFN γ gerichtet sind, also Antikörpern, die die Wirkung von IFN γ neutralisieren, keine bakterienbedingte LPS-Überempfindlichkeit. Einen endgültigen Beweis lieferte Untersuchungen an IFN- γ R-/-Mäusen; diese Mäuse können keinen IFN- γ -Rezeptor herstellen, also kann vorhandenes IFN γ keine Wirkung entfalten. Diese Mäuse entwickelten in unseren Untersuchungen keine LPS-Überempfindlichkeit und bestätigten dadurch die essentielle Betei-

gung von IFN γ an der Entstehung von LPS-Überempfindlichkeit während einer Infektion.

In-vitro-Untersuchungen an Milzzellen und Makrophagen der IFN γ -defekten C57BL/10ScCr-Mäuse zeigen, daß die IFN γ -produzierenden Zellen selbst zwar intakt sind, daß aber die für die IFN γ -Erzeugung notwendigen Makrophagen in ihrer „accessory cell function“ gestört sind. Dieser Defekt konnte durch die Substitution eines laslichen Makrophagen-Mediators Interferon- β (IFN β) teilweise behoben werden. Dadurch konnten wir zeigen, daß IFN β ein Kofaktor der IFN γ -Induktion ist.

Molekulare Immunologie

Prof. Dr. Michael Reth

Exportkontrolle des B-Zell-Antigenrezeptors



Abteilung „Molekulare Immunologie“

Antigenrezeptoren auf B- und T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle bei der spezifischen Immunantwort gegen körperfremde Stoffe (Antigene). Gelangt z. B. ein bakterielles Toxin wie das Tetanus-Toxin in unseren Körper, so kann unser Immunsystem gegen dieses Protein Antikörper bilden, die an das

Toxin binden und es neutralisieren. Die Erkennung des Toxins durch das Immunsystem erfolgt über Antigenrezeptoren auf den B-Lymphozyten. Die Antigen-Bindungsstelle dieser Rezeptoren ist hochvariabel, da die Genbereiche welche für diese Struktur kodieren während der B-Zellentwicklung aus verschiedenen Gensegmenten variabel zusammengesetzt werden. Nahezu jeder der 10^{12} B-Lymphozyten des Menschen unterscheidet sich daher von seiner Nachbar-B-Zelle durch die Antigen-Bindungsspezifität seiner Antigenrezeptoren. Im nicht-immunisierten Menschen gibt es nur wenige Lymphozyten mit einem Toxin-spezifischen Antigenrezeptor. Die Bindung des Toxins an den Antigenrezeptor bewirkt jedoch eine Aktivierung des B-Lymphozyten, der sich anschließend rapide vermehrt und sich zu Gedächtniszellen oder Antikörper-sezierenden Plasmazellen differenziert.

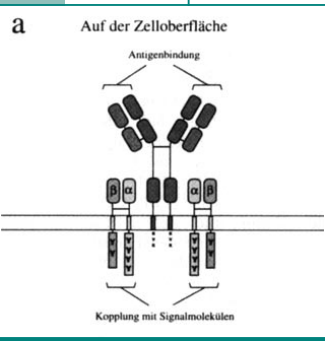


Abbildung 1

Unsere Arbeiten beschäftigen sich mit der Struktur, dem Zusammenbau und der Signalleitung der Antigenrezeptoren. Der B-Zell-Antigenrezeptor (BZR) ist ein komplexer Rezeptor, der aus mehreren Protein-ketten zusammengesetzt ist (Abb. 1). Dies sind zum einen die schwere und leichte Kette, die sich zu einem Membran-gebundenen Immunglobulin-Molekül (mIg) zusammenschließen, zum anderen zwei Membran-

proteine (Ig- α und Ig- β), die ein Ig- α /Ig- β -Heterodimer bilden, das nicht-kovalent mit dem mIg-Molekül assoziiert ist. Das mIg-Molekül trägt die beiden Antigenbindungsstellen des BZR, während Ig- α und Ig- β längere, ins Zellinnere ragende Sequenzanteile besitzen, die für die Kopplung des BZR mit Signal-weiterleitenden intrazellulären Molekülen von entscheidender Bedeutung sind. Ein BZR, dem diese zytoplasmatischen

Anteile von Ig- α und Ig- β fehlen oder der eine Mutation in diesen Anteilen trägt, ist in seiner Signalleitung defekt.

Der Zusammenbau des BZR aus seinen Bestandteilen geschieht in einem inneren Membrankompartiment der Zelle, dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Im ER werden alle löslichen oder Membran-gebundenen Proteine, die nach außen exportiert werden, gebildet. Der Export von Proteinketten aus dem ER unterliegt dabei einer strengen Qualitätskontrolle. Diese Kontrolle stellt sicher, daß nur der komplette Rezeptor exportiert wird, während seine Einzelkomponenten in der ER-Membran verbleiben. So kann ein mIg-Molekül in der Regel nicht alleine (ohne das Ig- α /Ig- β Heterodimer) auf der Zelloberfläche erscheinen. Die Funktionsweise und die Bestandteile dieser Qualitäts- und Exportkontrolle sind Gegenstand aktueller zellbiologischer Forschung.

Bei einer Suche nach weiteren Komponenten des BZR wurden von uns zwei neuartige BZR-assoziierte Proteine (BAP29 und BAP31) gereinigt. Über erhaltene Peptidsequenzen gelang die Klonierung der cDNA und der Gene dieser Proteine. Die Sequenz- und Struktur-Analyse zeigte, daß BAP29 und BAP31 Membran-

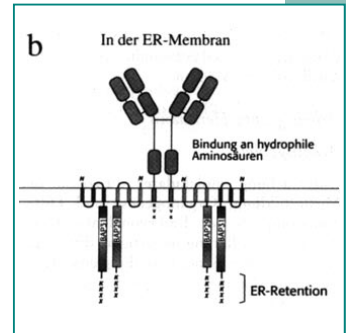


Abbildung 2

proteine sind, die in ihrem N-terminalen Teil drei Transmembran- (TM) Domänen besitzen und im C-terminalen Teil a-helikale Strukturen aufweisen (Abb. 2). Diese Proteine werden ubiquitär exprimiert und sind zudem evolutionär stark konserviert, sodaß sich ähnliche Proteine auch in der Hefe vorfinden. Die BAPs sind daher wesentlich „ältere“ Proteine als die Immunglobuline, die erst während der Evolution der Vertebraten auftauchen. Weitere Untersuchungen zeigten, daß die BAPs fast ausschließlich nur in der ER-Membran vorkommen und nicht auf die Zelloberfläche transportiert werden (Abb. 3). Beide BAP-Proteine besitzen in ihrem C-terminalen Ende ein Aminosäure-Motiv, bestehend aus zwei positiv geladenen, gefolgt von zwei beliebigen Aminosäuren (KKXX). Dieses Sequenzmotiv wird in einer Reihe von Proteinen gefunden, die im ER verbleiben. Neuere Arbeiten zeigen, daß intrazelluläre Transportproteine (COPs) an dieses Motiv binden und alle Membranproteine, die über einen solchen C-Terminus verfügen, vom Cis-Golgi zum ER zurücktransportieren.

Wie funktioniert nun die Exportkontrolle der Membranproteine im ER? Membranproteine sind mittels einer oder mehrerer TM-Regionen in der Membran verankert. Eine typische TM-Region

besteht in der Regel aus 19- bis 25-hydrophoben Aminosäuren, die mit den Lipidmolekülen in der Membran interagieren können. Die Bestandteile komplex aufgebauter Rezeptoren, wie die des Antigenrezeptors, tragen in ihrer TM-Region jedoch nicht nur hydrophobe, sondern auch geladene oder polare Aminosäuren. Es sind anscheinend diese hydrophilen Aminosäuren, die in der hydrophoben Umgebung der Membran von den Elementen der Exportkontrolle erkannt werden. Mutiert man z. B. die fünf hydrophilen Aminosäuren in der TM-Region des mlgD-Moleküls zu hydrophoben Aminosäuren, so kann mlgD alleine auf die Zelloberfläche gelangen, ohne der Exportkontrolle zu unterliegen.

Eine biochemische Analyse zeigt nun, daß die so mutierten mlgD-Moleküle auch nicht mehr von den BAP-Proteinen gebunden werden. Dieses Experiment legt nahe, daß die BAP-Proteine Teil der Qualitätskontrolle in der ER-Membran sind. Sie scheinen wie Spürhunde hydrophile Strukturen in der Membran zu suchen und alle Moleküle, die diese aufweisen, solange in der ER-Membran festzuhalten, bis sie sich zu einem vollständigen Rezeptor-Komplex zusammengelagert haben. In diesem

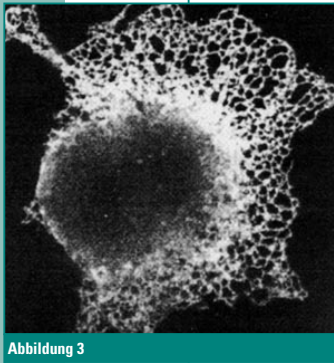


Abbildung 3

Komplex scheinen sich die hydrophilen Aminosäuren gegenseitig abzusättigen, sodaß der Komplex nach außen hin in der Membran nur hydrophobe Aminosäuren trägt und nicht mehr durch die Exportkontrolle in seinem Transport auf die Zelloberfläche behindert wird.

Die Vermutung, daß die BAP-Proteine wesentliche Elemente der Exportkontrolle in der ER-Membran sind, soll nun durch eine genetische Analyse bestätigt werden. Hierbei sollen die Gene für die BAP-Proteine im Mausgenom deletiert oder mutiert werden. Da die BAP-Proteine evolutionär stark konserviert sind, ist es unwahrscheinlich das Mäuse ohne BAP-Gene lebensfähig sind. Wir haben daher eine neuartige Methode entwickelt, um Gene in induzierbarer Weise nur in bestimmten Geweben zu deletieren. Grundlage dieser Methode ist die Cre-Rekombinase eines Bakteriophagen. Dieses Enzym bindet über Erkennungssequenzen (LoxP-Stellen) an die DNS und kann die Genbereiche zwischen diesen Stellen deletieren oder invertieren. Um die Aktivität von Cre zu regulieren, haben wir einen Expressionsvektor hergestellt, welcher für ein Cre-Fusionsprotein (TBD-Cre-TBD) kodiert, das auf beiden Seiten durch eine hormonbindende Domäne (TBD) flankiert wird (Abb. 4). In Abwesenheit des Hormon-Analogen Tamoxifen wird dieses Cre-

Fusionsprotein von dem „heat-shock-Protein“ HSP90 gebunden und das Enzym in seiner inaktiven Form im Zytoplasma zurückgehalten. Die Applikation von Tamoxifen führt zur Freisetzung des TBD-Cre-TBD-Fusionsproteins und zu seiner Translokation in den Zellkern. Hier erkennt die Cre-Rekombinase bestimmte DNS-Bereiche (LoxP-Stellen), welche von ihr rekombiniert werden. Über eine solche Rekombination können Genbereiche (z.B. Exon 2 von BAP29) deletiert oder bestimmte Gene aktiviert werden. Solche induzierbaren Deletionen oder Mutationen von DNS-Bereichen könnten ein wichtiges genetisches Hilfsmittel zur Untersuchung der Funktion von Genen der Maus werden.

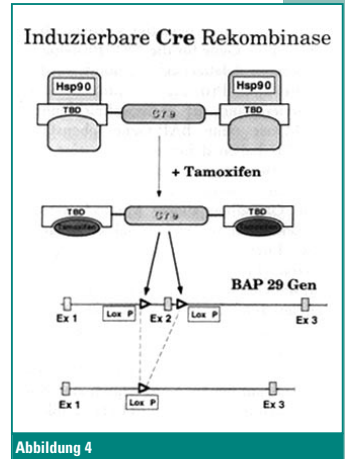


Abbildung 4

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des B Zell-Antigenrezeptors, bestehend aus dem mlg Molekül und den Ig- α /Ig- β -Heterodimeren. Y = Tyrosine in der Sequenz von Ig- α und Ig- β , die bei der Kopplung des BZR an intrazelluläre Signalmoleküle eine Rolle spielen. Der Balken stellt die Plasmamembran dar.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung zwischen dem mlg Molekül und den BAP-Proteinen in der ER-Membran. Die C-Termini der BAP-Proteine besitzen ein KKXX-Motif, das für die ER-Retention des Komplexes verantwortlich ist.

Abbildung 3: Vorkommen des BAP31 Proteins in dem netzförmigen ER-Kompartiment einer COS-Zelle. Die Färbung wurde mittels eines FITC-gekoppelten anti-BAP31 Antikörpers durchgeführt.

Abbildung 4: Strategie zur induzierbaren Deletion des Exon 2 (Ex 2) des BAP29-Genes. Die Cre-Rekombinase wurde durch die Flankierung mit Tamoxifen-Bindungsdomänen (TBD) induzierbar gemacht. HSP90 = „90 kDa heat-shock-Protein“. Lox P = Erkennungsstellen der Cre-Rekombinase in der DNS.

Nachwuchsgruppe Hammerschmidt



Nachwuchsgruppe
Hammerschmidt

Dr. Matthias Hammerschmidt

Dorsoventrale Musterbildung im Embryo des Zebrafisches

Im Folgenden soll auf das erste der oben genannten Arbeitsgebiete näher eingegangen werden, die genetische Kontrolle frühembryonaler Musterbildungsprozesse im Zebrafisch. Die Entwicklung des Zebrafisch-Embryos beginnt mit einer einzelnen Zelle, der befruchteten Eizelle, auch Zygote genannt. Der Embryo durchläuft rasche Zellteilungen, Zellspezifizierungen und Gestaltveränderungen, die zeitlich und räumlich genau koordiniert sind und innerhalb von zwei Tagen zu einer Larve führen, die dem adulten Fisch bereits sehr ähnlich ist. Entscheidende Gestaltveränderungen finden während der Gastrulation statt, während der sich die drei Keimblätter, Ektoderm, Entoderm und Mesoderm ausbilden. Aus dem Ektoderm gehen das Nervensystem und epidermale Strukturen wie Haut und Flossen hervor, aus dem Entoderm der Darm und seine Abkömmlinge, und aus dem Mesoderm u.a. Muskeln, der Urogenitaltrakt, das Gefäßsystem und das Blut. Vor der Gastrulation ist der Embryo sehr einfach aufgebaut und erscheint radial symmetrisch. Dennoch bilden sich bereits in diesen frühen Stadien entlang der zukünftigen dorsoventralen Körperachse spezifische räumliche Expressionsmuster bestimmter Kontrollgene aus, die die gesamte Organisation des späteren Embryos festlegen.

Solche frühen dorsoventralen Musterungsvorgänge sind in der Vergangenheit vorwiegend an Amphibien untersucht worden. Unter dem Einfluß maternaler Faktoren, die vom Muttertier gebildet und in der Eizelle deponiert werden, wird anfänglich ein sehr grobes dorsoventrales Muster in dem sich bildenden Mesoderm angelegt: in einem sehr breiten Streifen entlang der zukünftigen dorsoventralen Achse des Embryos entsteht ventrales Mesoderm, aus dem vorwiegend Blut hervorgehen würde. Diesem steht ein vergleichsweise kleiner Abschnitt dorsalen Mesoderms gegenüber (*Abb. 1A*). Ventrales und dorsales Mesoderm selbst produzieren Signalsubstanzen, die dieses grobe anfängliche dorsoventrale Muster weiter verfeinern (*Abb. 1B*). Das dorsale Mesoderm, auch der Spemann'sche Organisator genannt, produziert „dorsalisierende“ Signale, die

zwei Aufgaben erfüllen: die Induktion dorsolateraler Spezifizierung im benachbarten, ursprünglich ventral angelegten Mesoderm, so daß dort beispielsweise statt Blut Muskelgewebe entsteht, und die Induktion von Nervengewebe im Ektoderm, das sich ohne diese dorsalisierenden Signale zu Epidermis entwickeln würde. Diesen dorsalisierenden Signalen des Spemann'schen Organisators stehen „ventralisierende“ Signale gegenüber, die vom ventralen Mesoderm produziert werden. Mit verschiedenen Methoden konnten mehrere Kandidaten für die beiden antagonistischen Signale identifiziert werden, die dorsalisierenden Signalproteine Chordin, Follistatin und Noggin, und die ventralisierenden Signalproteine Bmp2 und Bmp4 („bone morphogenetic protein“), Mitglieder der Familie der TGF β Wachstumsfaktoren. Biochemische Analysen deuten darauf hin, daß die drei dorsalisierenden Signalmoleküle keine eigenen Rezeptoren besitzen, sondern im Extrazellularraum die ventralisierenden Bmps „abfangen“, d.h. mit sehr hoher Affinität binden, so daß diese nicht an ihre Rezeptoren binden können. Diese Beobachtungen haben zu einem Modell geführt, nach dem dorsale Spezifizierung konstitutiv stattfindet, sofern die Bmp-vermittelte Ventralisierung verhindert werden kann.

Der letztendliche Beweis, daß frühe dorsoventrale Musterungsvorgänge tatsächlich nach diesem Mechanismus ablaufen, und die Identifizierung der hierzu benötigten Gene, verlangt genetische Untersuchungen mithilfe von mutanten Embryonen, in denen die Aktivität der betreffenden Gene reduziert (hypomorphe Mutationen) oder vollständig ausgeschaltet (amorphe Mutationen) ist. In den Jahren 1992 und 1993 wurde in den Laboratorien von Prof. Dr. Christiane Nüsslein-Volhard in Tübingen und Prof. Dr. Wolfgang Driever in Boston/USA eine großangelegte Suche nach Mutanten mit spezifischen Defekten in verschiedenen Entwicklungsvorgängen durchgeführt. Nach Induktion der Mutationen mittels chemischer Mutagenese wurden in klassischen Inzucht Kreuzungen homozygote Embryonen erzeugt. Auf diese Weise wurden mehrere tausend rezessiv letale Mutanten isoliert, die sich mehreren hundert Komplementationsgruppen zuordnen lassen. Jede Komplementationsgruppe entspricht einem Gen, das zygotisch für die normale Embryonalentwicklung des Zebrafisches benötigt wird. Die auf diese Weise identifizierten Gene werden über das Erscheinungsbild, den Phänotyp, der Mutante definiert; ihre molekulare Natur ist vorerst unbekannt.

Unter den so isolierten Mutanten befinden sich auch solche mit spezifischen dorsoventralen Musterungsdefekten; ventralisierte Mutanten (2 Kom-

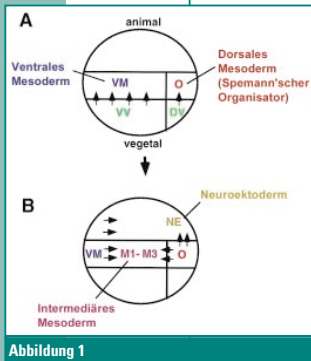


Abbildung 1

plementationsgruppen), deren Phänotyp von einer Fehlfunktion dorsalisierender Aktivitäten herührt, und dorsalisierte Mutanten (6 Komplementationsgruppen), die auf eine Fehlfunktion ventralisierender Aktivitäten zurückzuführen sind.

Unsere bisherige Arbeit konzentrierte sich vorwiegend auf die zwei stärksten Vertreter der beiden Mutantenklassen, die ventralisierte Mutante *dino*, die weniger Neuroektoderm besitzt und in deren Mesoderm ventrale Abkömmlinge (z.B. Blut) auf Kosten dorsolateraler Abkömmlinge (z.

B. Muskelgewebe) vergrößert sind, sowie die dorsalisierte Mutante *swirl*, die den gegenteiligen Phänotyp besitzt. In einer Kollaboration mit Dr. Stefan Schulte-Merker vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen konnten wir mittels Segregations-Verknüpfungsanalysen und Klonieren der entsprechenden cDNAs aus mutanten Embryonen zeigen, daß der *swirl*- und der *dino*-Phänotyp auf sogenannten „loss-of-function“ Mutationen im Zebrafisch *bmp2*- bzw. *chordin*-Gen beruht, Genen also, die wie oben beschrieben bereits aufgrund ihrer Eigenschaften in Amphibien als Kandidaten für den Ventralisierer und den Dorsalisierer des Spemann'schen Organisators angesehen werden konnten. Studien mit mutanten Embryonen erlaubten es uns, die Funktion der beiden Gene während früher dorsoventraler Musterungsvorgänge näher zu untersuchen.

Über die Analyse von *swirl-dino* Doppelmutanten konnte gezeigt werden, daß Chordin tatsächlich kein aktiver Dorsalisierer ist, sondern indirekt über eine Hemmung von Bmp2 wirkt: Embryonen, die sowohl für Chordin als auch für Bmp2 mutant sind, zeigen einen dorsalisierten Phänotyp wie Embryonen mit defektem Bmp2, aber intaktem Chordin, was zeigt, daß der Verlust von Chordin keine Auswirkungen hat, wenn gleichzeitig Bmp2 fehlt, Chordin also ausschließlich über die Hemmung von Bmp2 wirkt.

Dies deutet darauf hin, daß Bmp2 der eigentliche Faktor ist, der in einer konzentrationsabhängigen Weise das Schicksal individueller Zellen entlang der zukünftigen dorsoventralen Körperachse festlegt. Einen solchen Faktor bezeichnet man als „Morphogen“. Entsprechend konnte gezeigt werden, daß hohe Konzentrationen von Bmp2 beispielsweise zur Ausbildung von Blut und Epidermis führen, niedrigere Konzentrationen hingegen zur Bildung von Muskel- und Nervengewebe. Tatsächlich liegen zu Beginn der Gastrulation, wenn das Schicksal der Zellen entlang der dorsoventralen Achse bestimmt wird, die Transkripte von *bmp2* und *bmp4* in Form eines dorsoven-

tralen Gradienten vor (Abb. 2D). Chordin wird benötigt, um diesen Gradienten aufzubauen. Ursprünglich wird *bmp2* nämlich gemäß dem maternal induzierten, groben dorsoventralen Muster gleichmäßig im gesamten Embryo mit Ausnahme des Spemann'schen Organisators selbst exprimiert (Abb. 2A,B). In *chordin*-Mutanten bleibt diese breite, uniforme Expression erhalten (Abb. 2E), wohingegen in *bmp2*-Mutanten die *bmp2*-Expression im gesamten Embryo sukzessive verlorengeht (Abb. 2F). Dies zeigt, daß während der Normalentwicklung Bmp2 Protein als Autoregulator positiv die Expression des eigenen Gens beeinflusst, während Chordin, ausgehend vom Spemann'schen Organisator (Abb. 2C), Bmp2 Protein inaktiviert, dadurch die positive Autoregulation der *bmp2*-Expression unterbindet, und zu dem *bmp2*- (und *bmp4*-) mRNA Gradienten führt, mit höchsten Konzentrationen auf der ventralen und niedrigsten Konzentrationen auf der dorsalen Seite. Bei der Etablierung dieses Gradienten entfaltet Chordin Protein eine sehr weitreichende Wirkung und beeinflusst selbst Bereiche, die weit in der ventralen Hälfte des Embryos liegen. Dieser weitreichende Effekt konnte besonders gut in chimären Embryonen aus *chordin* mutanten und normalen (Wildtyp-) Zellen aufgezeigt werden: wenn 20-30 Wildtyp-Zellen zu Beginn der Gastrulation direkt in den Spemann'schen Organisator einer *chordin*-Mutanten transplantiert werden, zeigt der Embryo schon nach wenigen Stunden eine signifikante Dorsalisierung lateraler Bereiche, was der Situation im Wildtyp-Embryo sehr nahe kommt (Abb. 2G-I). Die auf diese Weise geretteten Regionen liegen viele Zeldurchmesser von den transplantierten Wildtyp-Zellen entfernt, was zeigt, daß Chordin-Signale innerhalb von zwei Stunden zirka ein Drittel des gesamten Embryos überbrückt haben. Eine solch weitreichende Wirkung ist nicht selbstverständlich. Für Bmps beispielsweise wurde berichtet, daß ihr Wirkungsbereich lediglich ein bis zwei Zeldurchmesser umfaßt.

Gegenwärtige Arbeiten unseres Laboratoriums beschäftigen sich mit weiteren Mutationen und Genen, die an frühen dorsoventralen Musterungsprozessen beteiligt sind. Wie vorn dargestellt, produziert der Spemann'sche Organisator in Amphibien neben Chordin zwei weitere Signalproteine, Follistatin und Noggin. Wir haben die Zebrafisch-Homologen der beiden Gene untersucht und festgestellt, daß sie im Gegensatz zu den Amphibiengenomen nicht im Organisator exprimiert sind, was daraufhindeutet, daß viele, aber nicht alle Aspekte dorsoventraler Musterbildung zwischen den verschiedenen Wirbeltierspezies konserviert sind.

Desweiteren untersuchen wir, wie der morphogene Bmp2-Gradient von den jeweiligen Zielzellen entlang der dorsoventralen Achse gelesen und interpretiert wird. Hierzu haben wir verschiedene Proteine isoliert, die in anderen Systemen als intrazelluläre Vermittler von Bmp Signalen beschrieben sind, wie das Zinkfinger-Protein Schnurri, und verschiedene Vertreter der Smad Familie, einer anderen Klasse von Transkriptionsfaktoren. Wir konnten zeigen, daß der Phänotyp der dorsalisierte Mutante *somitabun* auf Mutationen in einem *smad* Gen, *smad5*, beruht. Injektions- und Transplantationsversuche deuten darauf hin, daß *smad5*, für das sowohl maternale als auch vom Embryo selbst erzeugte Transkripte vorliegen, lediglich für die sehr frühe Vermittlung von Bmp Signalen zur Aufrechterhaltung der *bmp*-Expression benötigt wird. Bmp Signale zur eigentlichen Festlegung des jeweiligen Schicksals individueller Zellen hingegen, die etwas später stattfindet, werden unabhängig von *smad5* transduziert. Dies zeigt, daß während der Frühentwicklung offensichtlich verschiedene Transduktionsketten zur Vermittlung von Bmp Signalen eingesetzt werden.

Zur Identifizierung der eigentlichen Bmp2 Zielgene, deren Transkription durch Bmp2 und die nachgeschalteten Smad Proteine aktiviert wird, haben wir einen differentiellen Ansatz gewählt. Hierzu wurde die gesamte Boten RNA (mRNA) von normalen und *bmp2* mutanten Embryonen eines späten Gastrulationsstadiums präpariert und voneinander subtrahiert, was zur Anreicherung solcher mRNAs führen sollte, die in *bmp2* Mutanten fehlen, da ihre Synthese von Bmp2 abhängt. In Vorversuchen konnten auf diese Weise aus 50 untersuchten Klonen zwei Bmp2 Zielgene isoliert werden, die spezifisch auf der ventralen Seite exprimiert sind, nämlich *bmp4* und ein neues, für ein Zinkfingerprotein kodierendes Gen, dessen Expression in Blutvorläuferzellen erhalten bleibt und das den bisher frühesten Marker für diese Zelllinie darstellt.

Desweiteren haben wir begonnen, transkriptionsregulierende cis-Elemente dieser und anderer

ventral- und dorsalspezifischer Gene zu charakterisieren. Dies geschieht in transgenen Zebrafischen mithilfe von GFP („green fluorescent protein“) als Reportergen, sowie in animalen Kappen von *Xenopus*-Embryonen. Gemäß dem oben beschriebenen Modell mit Bmp2 als eigentlichem Morphogen sollten sowohl ventrale als auch dorsale Gene Bindungsstellen für Smad Proteine oder andere

Bmp regulierte Transkriptionsfaktoren besitzen. Bindung dieser Transkriptionsfaktoren sollte bei

ventralen Genen eine Aktivierung, bei dorsalen Genen hingegen eine Repression der Transkription bedingen. Desweiteren sollten ventrale Gene mit einer vergleichsweise weit nach dorsal reichenden Expressionsdomäne eine höhere Affinität zu den Bmp-abhängigen Transkriptionsfaktoren besitzen als Gene mit einer auf ventralste Bereiche beschränkten Expression, da die Transkription von ersteren auch durch vergleichsweise niedrigere Bmp Konzentrationen aktiviert werden sollte. Auf diese Weise soll der letztendliche Beweis für den morphogenen Charakter von Bmp2 erbracht werden.

Ein weiterer Aspekt unserer Arbeit befaßt sich mit der Isolierung neuer dorsoventraler Zebrafisch-Mutanten in sogenannten „enhancer und suppressor screens“. Hierzu werden die Nachkommen von mutagenisierten Fischen, die heterozygot für neu induzierte Mutationen sind, mit Trägerfischen bereits bekannter dorsoventraler Mutationen gekreuzt, und die entstehenden Embryonen auf eine Verstärkung oder Abschwächung der dorsoventralen Defekte hin untersucht. Dabei sollten Gene identifiziert werden, die mit den in den Testerfischen mutierten Genen interagieren. Während beispielsweise *bmp2* oder *smad5* heterozygote Embryonen nur sehr schwach dorsalisiert sind, zeigen doppelheterozygote Embryonen, denen jeweils eine normale Kopie des *bmp2* und des *smad5* Gens fehlt, eine sehr starke Dorsalisierung, die nur wenig schwächer ist als die von *bmp2* oder *smad5* homozygot mutanten Embryonen. Solche „Interaktionsscreens“ sind in der Taufliege *Drosophila melanogaster* sehr erfolgreich angewendet worden, um weitere Gene zu identifizieren, die in den ursprünglichen Mutantensuchen nicht entdeckt worden waren. Darüber hinaus haben sie den Vorteil, daß mutante Phänotypen bereits in der F2-Generation und nicht wie bei üblichen Screens in der F3-Generation sichtbar sind. Außerdem können interagierende Gene isoliert werden, die selbst nicht zu einem sichtbaren Phänotyp mutiert werden können.

Die nähere Charakterisierung dieser und der bereits bekannten Mutanten, die Identifizierung der jeweils betroffenen Gene mittels Überprüfen von Kandidaten oder positionellen Klonieren, und die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Genen, ähnlich wie bereits für *bmp2*, *chordin* und *smad5* beschrieben, sollte es uns ermöglichen zu ergründen, wie aus dem einfach strukturierten Zebrafisch-Embryo früher Entwicklungsstadien das kompliziert aufgebaute „Fischchen“ späterer Entwicklungsstadien entstehen kann.

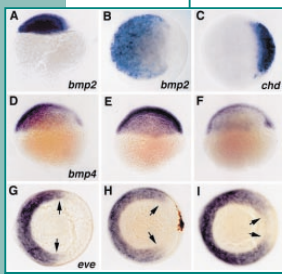


Abbildung 2

Abbildung 1: (A) In der Randzone des Embryos (Mitte) wird durch maternal bereitgestellte Signalproteine aus der vegetalen Zone des Embryos (unten) Mesoderm induziert. Signale aus der ventralen vegetalen Zone (VV) induzieren ventrales Mesoderm (VM) in einem breiten Streifen, während Signale aus der dorsalen vegetalen Zone (DV) dorsales Mesoderm (O) in einem relativ kleinen dorsalen Bereich der Randzone induzieren. Das dorsale Mesoderm wird auch Spemann'scher Organisator genannt.

(B) Vom Embryo selbst gebildete, zygotische Signale aus dem Spemann'schen Organisator (O) induzieren die Bildung von Neuroektoderm (NE) in dorsalen animalen Regionen des Embryos, und die Umwandlung des ursprünglich ventral angelegten Mesoderms (VM) der Randzone in ein ganzes Spektrum intermediärer mesodermaler Schicksale (M1-M3). Bei beiden Induktionen wirken ventrale Signale den Signalen des Spemann'schen Organisators entgegen. VM ergibt Blut, M3 beispielsweise Muskelgewebe des vorderen Rumpfbereichs.

Abbildung 2: (A-F) Verteilung verschiedener mRNAs, nachgewiesen über in situ Hybridisierung; ventral ist stets links, dorsal rechts. (A-C) Ursprüngliches Expressionsmuster von *bmp2* (A, laterale Ansicht; B, animale Ansicht) und *chordin* (*chd*, C, animale Ansicht) in Wildtyp-Embryonen zwei Stunden vor Beginn der Gastrulation; *bmp2* ist gleichmäßig überall im Embryo exprimiert, mit Ausnahme des zukünftigen Spemann'schen Organisators, der Expression von *chordin* zeigt.

(D-F) Expressionsmuster von *bmp4* zu Beginn der Gastrulation, laterale Ansicht. In Wildtyp-Embryonen (G) hat sich die *bmp4* Expression in ventrolaterale Regionen zurückgezogen, während *dino/chordin* mutante Embryonen Mutanten eine gleichbleibend starke *bmp4* Expression auch in den dorsolateralen Bereichen des Embryos zeigen, und in *swirl/bmp2* mutanten Embryonen selbst die ventrolaterale *bmp4* Expression sukzessive verlorengelht. Das Expressionsmuster von *bmp2* verhält sich sehr ähnlich wie das von *bmp4*.

(G-I) Weitreichende Wirkung von Chordin Signalen. (G) Wildtyp-Kontrolle, (I) *chordin/dino* Kontrolle, (H) *chordin* Mutante mit wenigen Wildtyp-Zellen (braun markiert) im Bereich des Spemann'schen Organisators. Mitte der Gastrulation, 2 Stunden nach Transplantation der Wildtyp-Zellen; vegetale Ansicht; Expressionsmuster des ventralen Markergens *eve*. Die dorsale Grenze der Expressionsdomäne ist mit Pfeilen markiert. *eve* besitzt in *chordin* Mutanten eine stark nach dorsal ausgedehnte Expressionsdomäne. Transplantation von Wildtyp-Zellen auf die dorsale Seite der Mutante bedingt jedoch eine Verschiebung der *eve1* Expressionsdomäne zurück auf die ventrale Seite. Dieser Effekt reicht über viele Zeldurchmesser hinweg weit in laterale Bereiche hinein, was darauf hindeutet, daß der von den Wildtyp-Zellen gebildete Stoff eine weitreichende Wirkung besitzt.

Entwicklungs- biologie



Abteilung
„Entwicklungsbiologie“

Prof. Dr. Davor Solter

Autor: Dr. Heinrich Schrewe

Aktivine und Aktivinrezeptoren in der Mausentwicklung

Aktivine wurden ursprünglich aus Ovarfollikelflüssigkeit isoliert. Sie können die Freisetzung von Follikel-stimulierendem-Hormon (FSH) in Zellen des vorderen Hypophysenlappens induzieren. Außerdem regulieren sie Wachstum, Proliferation und Differenzierung vieler verschiedener Zelltypen. Anfang der neunziger Jahre wurden Aktivine auch von den Entwicklungsbiologen „entdeckt“, die Aktivin als einen Mesoderm-induzierenden Faktor in Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* beschrieben. Behandelt man den animalen Pol einer *Xenopus laevis* Blastula mit Aktivin so findet man mesodermale Zelltypen, die sich in Kontrollexperimente ohne Aktivin nicht bilden.

Aktivine sind Mitglieder der Transforming Growth Factor- β - (TGF- β) Superfamilie. Sie sind Dimere aus zwei β -Untereinheiten. In der Maus sind bis heute vier verschiedene β -Untereinheiten beschrieben (β_A , β_B , β_C , β_E). Die klassischen Aktivin-Untereinheiten (β_A , β_B) sind während der frühen Embryonalentwicklung von Vertebraten exprimiert und bilden drei Formen von Aktivin-Dimeren: Aktivin A (β_A , β_A), Aktivin B (β_B , β_B) und Aktivin AB (β_A , β_B). Die Signaltransduktion der Aktivine erfolgt über Transmembranrezeptoren. Diese besitzen intrazellulär eine Kinasedomäne mit Serin/Threonin-Spezifität. Die vier bisher beschriebenen Aktivinrezeptoren (ActR) können in zwei Klassen, Typ I (ActRIA, ActRIB) und Typ-II (ActRIIA, ActRIIB), unterteilt werden. *Abbildung 1* faßt modellhaft die heutige Vorstellung der Weiterleitung von Aktivinsignalen zusammen. Aktivin bindet zuerst an einen Typ II-Rezeptor. Nach Rekrutierung eines Typ I-Rezeptors bildet sich ein Komplex aus Typ II- und Typ I-Rezeptor. Der Typ I-Rezeptor wird daraufhin intrazellulär durch den Typ II-Rezeptor phosphoryliert. Dieser aktivierte Rezeptorkomplex phosphoryliert sogenannte Smad-Proteine, die dann im Kern als Transkriptionsfaktoren Effektorgene regulieren.

Bei der Maus entstehen die ersten mesodermalen Zellen zwischen Tag 6 und 6,5 der Embryonalentwicklung. Zellen des embryonalen Ektoderm wandern zwischen embryonales Ektoderm

und viszerales Endoderm, wo sie das Mesoderm bilden. Die oben beschriebenen Experimente an Embryonen von *Xenopus laevis* lassen vermuten, daß Aktivine und Aktivinrezeptoren auch in Säugetieren an der Mesoderminduktion beteiligt sind. Diese Frage wurde in unserem und anderen Laboratorien an Mäusen untersucht, die spezifische Mutationen in Aktivinen oder Aktivinrezeptoren tragen. Mäuse, die keine funktionsfähige Aktivin β_B -Untereinheit besitzen, zeigen keine Beeinträchtigung der Mesodermbildung und sind homozygot lebensfähig. Ebenso hat die Inaktivierung des Gens für die β_A -Untereinheit keinen Einfluß auf die Mesoderminduktion. Homozygote Mäuse sterben

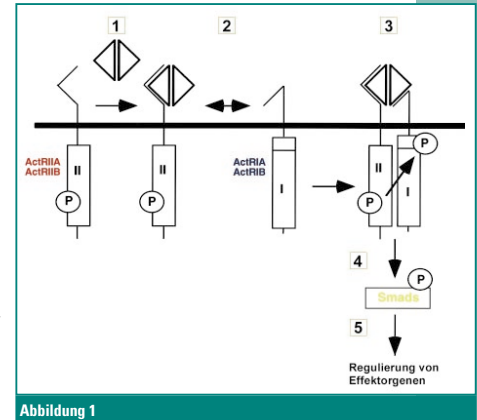


Abbildung 1

aber in den ersten 24 Stunden nach der Geburt, da die Tiere einen offenen Gaumen haben. Überraschenderweise zeigen selbst Mäuse, denen sowohl die β_A - als auch die β_B -Untereinheit fehlen, keinen Mesodermdefekt. Ihr Phänotyp ist lediglich eine Addition der Phänotypen der Einzelmutationen. Aktivin A, B und AB sind also nicht essentiell für die Mesoderminduktion in der Maus.

Um zu klären, ob bei Säugern generell die Signaltransduktion über die Aktivinrezeptoren für die Mesodermbildung benötigt wird, wurden in unserer und Dr. En Li's Arbeitsgruppe (Massachusetts General Hospital, Charlestown, USA) die Liganden-bindenden Rezeptoren, Typ IIA (ActRIIA) und Typ IIB (ActRIIB) in Mäusen mutiert. Mäuse ohne ActRIIA sind lebensfähig, zeigen aber mit geringer Penetranz Defekte im männlichen und weiblichen Reproduktionsapparat, im Schädelbereich und an der Wirbelsäule. Die Mesoderminduktion ist auch in diesen Tieren normal. Mäuse ohne ActRIIB sind ebenfalls in der Lage Mesoderm zu bilden und sind lebensfähig. Sie zeigen verschiedene Organdefekte (Herz, Lunge, Niere). Homozygote Doppelmutanten, d. h. Embryonen, die weder ActRIIA noch ActRIIB besitzen, sterben jedoch spätestens am Tag 8 der Embryonalentwicklung. Mesodermale Zellen sind in diesen Embryonen nicht nachweisbar (*Abbildung 2*). Die Signaltransduktion über die Typ II-Aktivinrezeptoren ist demnach essentiell für die Mesoderminduktion in der Maus. Der induzierende Faktor ist bisher noch nicht identifiziert worden. Ebenso wenig ist bekannt, ob es sich dabei um ein Aktivin-ähnliches Protein, oder ein

anderes Mitglied der TGF- β -Superfamilie handelt. Um andere potentielle Liganden für die Type II-Aktivinrezeptoren zu finden, wurde eine Suche durchgeführt, die es ermöglichen sollte, neue Aktivin-ähnliche Mitglieder der TGF- β -Superfamilie zu identifizieren. Dieser Ansatz führte zur Klonierung von zwei neuen Genen, deren Genprodukte als β_C - bzw. β_E -Untereinheit bezeichnet werden. Die Expressionmuster dieser beiden Gene ähneln sich sehr, unterscheiden sich aber stark dem der klassischen Aktivinuntereinheiten (β_A und β_B). Beide Gene sind fast

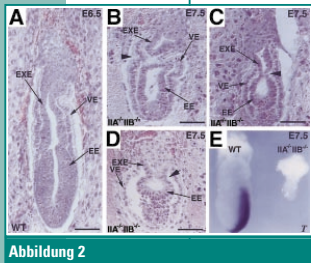


Abbildung 2

ausschließlich in Leber und Pankreas exprimiert. Über ihr Vorkommen als Homo- oder Heterodimer ist bisher nichts bekannt. Die β_C -Untereinheit ist in der intakten Leber stark exprimiert, ihre Expression nimmt aber schon 12 Stunden nach partieller Hepatektomie dramatisch ab. Erst zum Ende Regenerationphase nimmt die

Expression wieder zu. Diese Beobachtung macht die β_C -Untereinheit zu einem Kandidaten für ein Leber-Chalon, einem Molekül, welches die Lebergröße kontrolliert. Tatsächlich konnten wir in primären Leber- und Pankreaszellen nachweisen, daß sowohl die β_C - als auch die β_E -Untereinheit die Zellproliferation hemmen kann. Die Rolle dieser neuen Aktivinuntereinheiten soll nun in β_C -, β_E - und β_C/β_E -doppeldefizienten Mäusen untersucht werden.

Abbildung 1: Modell der Signaltransduktion der Aktivine. Aktivin bindet an die extrazellulär Domäne eines Typ II-Rezeptors (1). Nach Rekrutierung eines Typ I-Rezeptors (2) kommt es zur Bildung eines Komplexes aus Typ II- und Typ I-Rezeptor. Der Typ I-Rezeptor wird dann intrazellulär durch den Typ II-Rezeptor phosphoryliert (3). Dieser aktivierte Rezeptorkomplex phosphoryliert Smad-Proteine (4), die dann im Kern Effektorgene regulieren.

Abbildung 2: Inhibition der Mesoderminduktion in homozygoten Aktivinrezeptor Typ II-Doppelmutanten.

(A – D): Sagittalschnitte eines Wildtyp-Embryos 6,5 Tage nach der Befruchtung (A) und drei Mutanten (B – D) 7,5 Tage nach der Befruchtung. Die mutanten Embryonen sind viel kleiner und das embryonale Ektoderm hat sich vom viszeralen Endoderm abgelöst. (E): In-situ-Hybridisierung mit einer Brachyury T-spezifischen Sonde, einem frühen mesodermalen Markergen, am Tage 7,5 nach der Befruchtung. T-Expression (blau) im Primitivstreifen eines Wildtyp-Embryos (links), keine T-Expression in der Mutante (rechts). Abkürzungen: EE, embryonales Ektoderm; EXE, extraembryonales Ektoderm; VE: viszerales Endoderm.

Nachwuchsgruppe Klingmüller

Dr. Ursula Klingmüller

Identifizierung und Visualisierung von Signaltransduktionskaskaden in der Erythropoese

Bedingt durch die relativ kurze Lebensdauer von Erythrozyten findet eine kontinuierliche Neubildung mit dem Ziel statt, die Anzahl der Erythrozyten im Kreislaufsystem konstant zu halten, gleichzeitig aber auch eine rasche Anpassung an veränderte Sauerstoffbedingungen zu ermöglichen. Dieser vielfältig kontrollierte Prozeß wird als Erythropoese bezeichnet. Schlüssel-

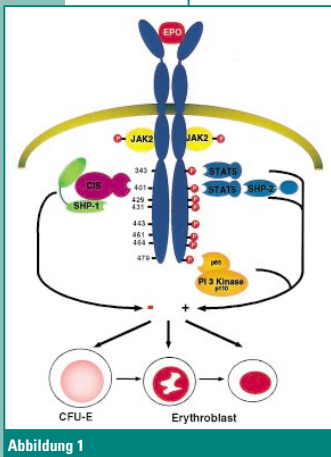


Abbildung 1

element der Erythropoese ist das Hormon Erythropoietin (Epo), das an den Erythropoietin Rezeptor (EpoR) bindet, der an der Oberfläche erythroider Vorläuferzellen exprimiert ist. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor ist essentiell für Zellwachstum, terminale Zelldifferenzierung und Zellüberleben erythroider Vorläuferzellen. Es stellt sich die prinzipielle Frage, wie ein extrazelluläres Signal in Form eines Hormons in einen intrazellulären Stimulus umgeschaltet wird, der drei verschiedenen Reaktionen in der

Zelle unterstützt. Zentrales Signalumschalt-element sind Rezeptoren, die mit ihrer extrazellulären Domäne Botenstoffe (Liganden) binden und mit ihrer zytoplasmatischen Domäne signalweiterleitende Moleküle rekrutieren. Der EpoR gehört zur Familie der hämatopoietischen Zytokinrezeptoren. Diesen Rezeptoren gemeinsam ist das Fehlen einer katalytischen Aktivität in der zytoplasmatischen Domäne. Eine der frühesten meßbaren Veränderungen in Folge der Ligandenbindung an Zytokinrezeptoren ist eine transiente Zunahme der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine. Da die Tyrosinphosphorylierung relative kurze Zeit nach dem Stimulus wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrt, wird davon ausgegangen, daß sowohl aktivierende als auch terminierende Signale von den Rezeptoren stimuliert werden.

Am Beispiel des EpoR wollen wir klären, welche primär positiv bzw. negativ regulierenden Signalübertragungswege aktiviert werden. Welche

in Zell-Linien charakterisierten Signalübertragungskaskaden sind in primären erythroiden Vorläuferzellen relevant bzw. gibt es spezifische Signalübertragungskaskaden in erythroiden Vorläuferzellen? Ist die Bindung von Signalübertragungsmolekülen an den EpoR zeitlich und räumlich reguliert?

Ligandenbindung an den EpoR induziert die Aktivierung der rezeptorgebundenen Tyrosinkinase JAK2. Die sich daraus ergebende Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des EpoR generiert Bindungsstellen für signalübertragende Moleküle, die Src Homology 2 (SH2) Domänen besitzen. SH2-Domänen vermitteln die Bindung an Phosphotyrosine innerhalb bestimmter Konsensussequenzen. Da sich SH2-Domänen bezüglich der erkannten Konsensussequenzen unterscheiden, binden signaltransduzierende Moleküle vermittelt durch ihre SH2-Domäne an spezifische Phosphotyrosine des Interaktionspartners. Eine Zusammenfassung der bisher charakterisierten Bindungspartner des EpoR ist in *Abb. 1* schematisch dargestellt. Insgesamt wissen wir, daß sowohl stimulierende als auch abschaltende Signale vom EpoR ausgehen. Eine genaue Abstimmung der bisher bekannten und der noch zu identifizierenden Signaltransduktionskaskaden ist notwendig, um es erythroiden Vorläuferzellen zu ermöglichen sich vom Stadium der CFU-E (Colony-Forming-Unit-Erythroid) zur reifen Erythrozyte zu entwickeln.

Ein erst kürzlich identifizierter Negativregulator der Signalweiterleitung durch den EpoR ist das Adapterprotein CIS (Cytokine inducible SH2-domain containing). CIS ist ein kleines zytoplasmatisches Protein, das selbst keine enzymatische Aktivität besitzt. Wir konnten durch biochemische Experimente zeigen, daß CIS vermittelt durch seine SH2-Domäne spezifisch an ein (Phospho-) Tyrosin der acht zytoplasmatischen Tyrosine des EpoR bindet (Tyrosin 401). Die Bindung erfolgt direkt und beruht nicht auf einer Vermittlung durch andere signaltransduzierende Moleküle. Durch Inaktivierung der CIS SH2-Domäne konnten wir weiterhin zeigen, daß die Rezeptorrekrutierung vermittelt durch die SH2-Domäne eine zentrale Funktion für die Zellwachstum inhibierende Rolle des kleinen Adapterproteins CIS besitzt. Die bisher beschriebenen Ergebnisse wurden durch Experimente in Modell Zell-Linien erhalten. Es stellte sich daher die Frage, ob CIS auch in primären erythroiden Vor-

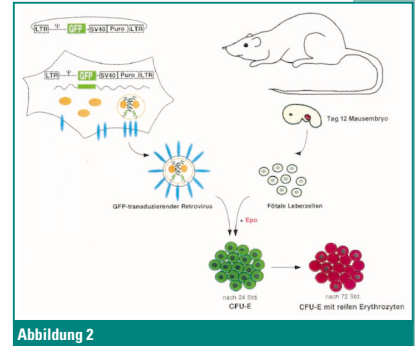


Abbildung 2

läuferzellen das Zellwachstum inhibiert und ob CIS möglicherweise auch die Zelldifferenzierung beeinflusst. Um dieser Frage nachzugehen, mußten zunächst gängige retrovirale Vektoren dahingehend verbessert werden, daß die Expression des transduzierten Fremdgens (z.B. CIS)

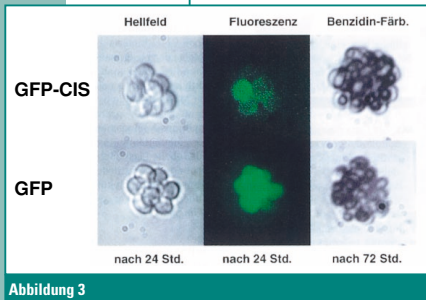


Abbildung 3

in erythroiden Vorläuferzellen gesteigert wurde und routinemäßig eine Transduktionseffizienz von 90% erreicht wurde. CIS wurde als Fusion mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) in unseren verbesserten retroviralen Vektor integriert und in primäre erythroide Vorläuferzellen, die aus Tag 12 alten Mausembryonen präpariert wurden, eingeschleust (transduziert). Die Vorgehensweise ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Durch die Fusion mit GFP konnte die Expression von CIS in erythroiden Vorläuferzellen kontinuierlich im Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. In diesen Experimenten wurde die Fähigkeit erythroider Vorläuferzellen bestimmt CFU-E Kolonien zu bilden, in denen nach circa 72 Stunden reife Erythrozyten nachgewiesen werden können (Abb. 3). Diese Experimente erbrachten, daß CIS auch in primären erythroiden Vorläuferzellen ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert ist und spezifisch das Zellwachstum und nicht die Zelldifferenzierung negativ reguliert. Auf welche Weise die Rekrutierung eines kleinen Adapterproteins, das vermittelt durch die SH2-Domäne an ein spezifisches (Phospho-)Tyrosin in der zytoplasmatischen Domäne des EpoRs bindet, die Signaltransduktion durch den gesamten Rezeptor negativ beeinflussen kann, ist noch ungeklärt. Entweder behindert CIS sterisch durch seine Rezeptorbindung die Rekrutierung anderer signaltransduzierender Moleküle oder es blockiert die Aktivität eines für das Zellwachstum essentiellen Moleküls. Wir sind daher dabei mit verschiedenen Methoden weitere Interaktionspartner für CIS zu identifizieren.

Kenntnisse über Signaltransduktionsvorgänge beruhen bisher ausschließlich auf biochemischen Experimenten, die zwar einen Rückschluß auf mögliche Interaktionen zulassen, aber keine Information über zeitliche und räumliche Anordnung der Signaltransduktionskaskaden in lebenden Zellen liefern. Unser Ziel ist es daher am Beispiel des EpoRs Signaltransduktionsvorgänge in vivo sichtbarzumachen. Die Experimente mit GFP-CIS belegen, daß Signaltransduktionsmoleküle durch die Fusion mit GFP in ihrer biologischen Funktion nicht beeinträchtigt werden. Durch diese Fusion werden Signaltrans-

duktionsmoleküle erhalten, deren Lokalisation kontinuierlich in der lebenden Zelle beobachtet werden kann. Unser Ziel ist es die an der Signaltransduktion durch den EpoR beteiligten Moleküle mit GFP verschiedener Farben zu markieren und z. B. mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) die ligandeninduzierte Komplexbildung in vivo zu messen (Abb.4). FRET beruht darauf, daß bei einer Annäherung von weniger als 100 Å die Lichtemission des einen fluoreszierenden Moleküls z. B. GFP-Cyan das andere fluoreszierende Molekül z. B. GFP-Topaz anzuregen vermag. Um einen möglichst sensitiven Nachweis der zellulären Vorgänge zu erhalten, haben wir damit begonnen die Faltungseigenschaften des GFP bei 37 °C zu verbessern und eine mögliche Dimerbildung zu untersuchen. Auf diese Weise haben wir ein deutlich effizienteres GFP erhalten und haben in diesen Hintergrund die entsprechenden Aminosäureaustausche eingeführt, die für das GFP-Cyan und das GFP-

Topaz nötig sind. Außerdem ist es uns gelungen, EpoR-GFP Chimäre herzustellen, die in der Lage sind, in Folge der Ligandenbindung die Signaltransduktion zu aktivieren. Eine genaue Analyse dieser Moleküle sollte in nächster Zukunft Auskunft darüber geben, ob Signaltransduktionsmoleküle präassembliert Komplexe bilden oder ob die Ligandenbindung die Rekrutierung verschiedener Signaltransduktionsmoleküle in genau regulierter zeitlicher Abfolge ermöglicht.

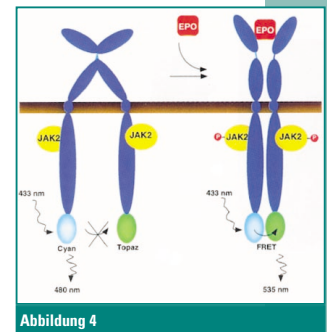


Abbildung 4

Abbildung 1: Stark vereinfachte, schematische Darstellung der Signaltransduktion durch den Erythropoietin-Rezeptor (EpoR; blau). Die Bindung des Hormons Erythropoietin (Epo; rot) induziert die Homodimerisierung des Rezeptors und initiiert die Signaltransduktion. In der zytoplasmatischen Domäne des EpoR sind die acht Tyrosine, die in ihrer phosphorylierten Form (P) signaltransduzierende Moleküle mit SH2-Domänen binden, gemäß ihrer Aminosäureposition innerhalb des EpoRs eingezeichnet. Bisher identifiziert sind die Bindungsstellen für die Lipidkinase PI3-Kinase, die Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 und für STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5). Positiv und negativ wirkende Signaltransduktionskaskaden werden in erythroiden Vorläuferzellen integriert und ermöglichen es den Zellen sich vom CFU-E Stadium zu Erythroblasten zu entwickeln.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Transduktion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in erythroide Vorläuferzellen. Das GFP wurde in einen retroviralen Expressionsvektor integriert, von dem nach der Transfektion in eine retrovirale Verpackungszell-Linie eine

RNA transkribiert wird, die das Verpackungssignal Ψ enthält. Die Verpackungszell-Linie stellt retrovirale Strukturproteine für die Bildung von Virionen zur Verfügung, in die die RNA vermittelt durch das Verpackungssignal eingebaut wird. 48 Stunden nach der Transfektion werden die Überstände geerntet und mit fötalen Leberzellen, die von Tag 12 alten Mausembryonen präpariert werden, inkubiert. Die Expression des GFP wird 24 Stunden nach der Infektion und Plattierung in Epo-haltiger Methylcellulose mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Nach circa 72 Stunden wird die Bildung hämoglobinisierter Zellen durch Benzidin-Färbung nachgewiesen. Zellen ohne Zellkern symbolisieren reife Erythrozyten.

Abbildung 3: Bildung GFP oder GFP-CIS exprimierender erythroider Kolonien. Mittels retroviraler Transduktion wurde GFP oder GFP-CIS in fötaler Leberzellen eingeführt und das Koloniebildungsverhalten in Methylcellulose in Gegenwart von Epo (0,3 units Epo/ml) beobachtet. Nach circa 72 Stunden wurde durch Benzidin-Färbung die Hämoglobinisierung der Zellen, d. h. der Differenzierungsgrad, nachgewiesen.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Analyse von Signaltransduktionsvorgängen durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Das mit dem EpoR fusionierte GFP-Cyan wird durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 433 nm maximal angeregt. Wird durch Ligandenbindung an den EpoR GFP-Topaz, das ebenfalls mit der zytoplasmatischen Domäne des EpoRs fusioniert ist, in nächste Nähe gebracht, regt das von GFP-Cyan emittierte Licht GFP-Topaz an und die Aussendung von Licht der Wellenlänge 535 nm wird nachweisbar. Auf diese Weise erhält man die Möglichkeit dynamische Prozesse in der lebenden Zelle zu beobachten.

Zelluläre Immunologie



Abteilung „Zelluläre Immunologie“

Prof. Dr. Klaus Eichmann
Autor: Dr. Manuel Modolell

Immunologische Steuerung des Arginin-metabolismus in Makrophagen

Makrophagen gehören zusammen mit Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen zur zellulären Komponente der angeborenen Immunität. Diese ermöglicht die sofortige Bekämpfung eines in den Organismus eingedrungenen Pathogens durch Phagozytose der fremden Strukturen und Sezernierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen sowie diverser Enzyme. Je nach „Angreifer“ verändert sich der Stoffwechsel, die Funktion und die Morphologie des Makrophagen, ein Prozess, der im allgemeinen Aktivierung genannt wird. Makrophagen sind vor allem auch eine zentrale zelluläre Komponente im komplexen Zytokin-Netzwerk des Organismus: Sie sind nicht nur wichtige Zielzellen verschiedener Zytokine (z.B. IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13), sondern sezernieren auch selbst ein breites Spektrum dieser interzellulären Botenstoffe. Neben proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-15, IL-18) sezernieren sie antiinflammatorische Zytokine (IL-10, TGF- β), hämatopoetische Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) sowie Chemokine und das antivirale IFN- α .

Im Makrophagen werden die phagozytierten Pathogene abgebaut. Dadurch gelangen deren Antigene auf die Zelloberfläche des Makrophagen (Antigen-Präsentation). In diesem Prozess erkennen die T-Lymphozyten die fremden Strukturen auf der Makrophagenmembran und lösen eine spezifische Immunantwort aus. Die T-Lymphozyten werden dabei aktiviert und sezernieren Zytokine, die wiederum andere Zellen, auch Makrophagen, aktivieren. Dadurch beeinflussen sie Qualität und Ausmaß der Abwehrreaktion im Organismus. Die Immunantwort kann anhand der ausgelösten Abwehrreaktionen und der daran beteiligten T-Lymphozyten bzw. deren charakteristischen Zytokinen in zwei Typen, T1 oder T2 klassifiziert werden. An einer T1-Immunantwort beteiligen sich T-Helfer-Lymphozyten vom Typ 1 (Th1), die IL-2, IFN- γ und TNF- α sezernieren und vorwiegend zytotoxische bzw. inflammatorische Reaktionen hervorrufen. Für die T2-Antwort sind T-Helfer-Lymphozyten vom Typ 2 (Th2) ver-

antwortlich. Sie synthetisieren folgende Zytokine: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Antikörpersynthese, Eosinophilie und allergische Reaktionen sind charakteristische Parameter dieser Antwort.

Murine Makrophagen metabolisieren L-Arginin nach Wechselwirkung mit Endotoxin (Lipopolysacchariden, LPS) oder anderen bakteriellen Strukturen über zwei Stoffwechselwege: zum einen über das Enzym iNOS (Stickstoffoxid-Synthetase) zu den Produkten Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin, zum anderen über das Enzym Arginase zu den Produkten Harnstoff und L-Ornithin (Abb. 1).

Untersuchungen mit verschiedenen LPS und deren Derivaten haben gezeigt, dass diese Stoffwechselwege getrennt induziert werden können. Während alle toxischen LPS beide Enzyme auslösen, induzieren nicht toxische oder chemisch detoxifizierte LPS nur die Arginase. Ausgehend von der Hypothese, dass Arginase die Synthese von NO durch Eliminierung des Substrats hemmen kann, sind die als iNOS-Suppressoren bekannten Typ2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 untersucht und als spezifische Induktoren der Arginase in Makrophagen charakterisiert worden. Im Gegensatz dazu induziert der proinflammatorische Typ1-IFN- γ nur iNOS. Analog zu dem Synergismus zwischen Th1-Zytokinen bei der iNOS-Induktion ist eine starke synergistische Kooperation der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 bzw. IL-13 und IL-10 hinsichtlich der Induktion von Arginase zu beobachten.

Auch hemmen sich beide Stoffwechselwege gegenseitig auf verschiedenen Ebenen. Die Th2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 inhibieren die Expression von iNOS. Als Gegenpart dazu hemmen IFN- γ und TNF- α die Expression der Arginase. Auch Arginase inhibiert die Aktivität der iNOS durch Hydrolyse des gemeinsamen Substrats Arginin. Die Produkte beider Enzyme sind auch gegenseitige Inhibitoren. Ornithin bzw. die durch weitere Metabolisierung in Makrophagen entstehenden Polyamine hemmen die iNOS. Andererseits ist Hydroxyarginin, das Zwischenprodukt der Oxidation des Arginins durch die iNOS, der aktivste physiologische Hemmstoff der Arginase. Der differenzielle Nachweis beider im Säugetier exprimierten Arginase-Isoenzyme hat ergeben, dass Th2-Zytokine spezifisch zu einer Induktion der hepatischen Arginase I führen, während die extrahepatische Arginase II konstitutiv exprimiert wird und offenbar für die geringe Arginase-Aktivität unstimulierter Makrophagen verantwortlich ist.

Nachdem die dichotome Regulation des Arginin-Metabolismus auf Zytokin-Ebene feststand, sind zelluläre Kokultivations-Experimente durch

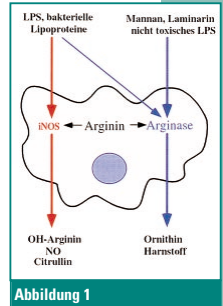


Abbildung 1

Abbildung 1

geführt worden, in denen Makrophagen als antigen-präsentierende Zellen und etablierte Th1- bzw. Th2-Klone interagierten. Wiederum führen die Th1-Zellen ausschließlich zu einer Induktion von iNOS, während die Th2-Zellen antigenabhängig das alternative Enzym Arginase induzieren. Es zeigt sich, dass die sehr hohen Th2-Zell-induzierten Arginase-Aktivitäten der Makrophagen durch synergistische Kooperation der sezernierten Zytokine hervorgerufen werden und eine Interaktion membranständiger Strukturen für die Induktion der Arginase nicht notwendig ist.

Durch Differenzierung naiver TCR transgener T-Zellen *in vitro* zu Th1- oder Th2-Lymphozyten und deren Verwendung im Antigen-Präsentationsmodell zeigt sich, dass die T-Zell-induzierte Dichotomie des Arginin-Metabolismus in Makrophagen schon früh im Verlauf einer sich polarisierenden Immunantwort ausgebildet wird. *In-vivo*-Untersuchungen an pathogeninduzierten Granulomen mit bekanntem T1- oder T2-Typ der Immunantwort zeigen eine gleiche Dichotomie.

Die außerordentliche Bedeutung von iNOS im Immunsystem und ihre Rolle in der Abwehr von Pathogenen, entzündlichen Prozessen und anderem ist gut dokumentiert. Andererseits ist die Funktion der Arginase in Makrophagen weitgehend unbekannt, wobei ihre Beteiligung an Regenerationsprozessen wie Wundheilung, Kollagensynthese oder Kontrolle der Zellproliferation als sehr wahrscheinlich erscheint (Abb. 2).

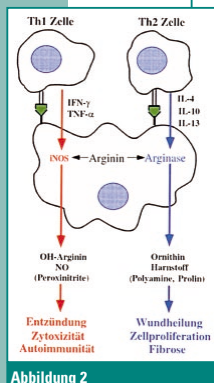


Abbildung 2

Abbildung 1: Endotoxin (LPS) aus gram-negativen Bakterien oder bakteriellen Lipoproteinen aktiviert den Arginin-Stoffwechsel von Maus-Makrophagen durch Induktion von zwei Enzymen. Die iNOS oxidiert das Arginin zu OH-Arginin, NO und Citrullin. Die Arginase hydrolysiert das Arginin zu Ornithin und Harnstoff. Nicht toxisches LPS (entweder chemisch detoxifiziert oder aus Mikroorganismen wie *Rhodobacter capsulatus*) sowie die Polysaccharide Manan und Laminarin induzieren nur die Arginase.

Abbildung 2: Aktivierung des Arginin-Stoffwechsels in Makrophagen während der Immunantwort. Die Th1-Lymphozyten sezernieren IFN- γ und TNF- α nach Erkennung des von den Makrophagen präsentierten Antigens und führen zur Induktion der iNOS und Sekretion des Radikals NO. Ein ähnlicher Prozess findet bei der Antigenpräsentation zu den TH2-Lymphozyten statt. Dabei werden IL-4, IL-10 und IL-13 sezerniert, die die Arginase-Expression auslösen. Das entstandene Ornithin wird weiter entweder zu Polyaminen oder zu Prolin metabolisiert, da der Makrophage die dazu notwendigen Enzyme exprimiert.

Nachwuchsgruppe Steimle

Dr. Viktor Steimle

Regulation der Klasse II Gene des Haupt-histokompatibilitätskomplexes: Struktur/ Funktionsanalyse des Hauptregulators CIITA („class II transactivator“)

T-Lymphozyten sind die Effektorzellen der zellulären Immunantwort. Sie werden aktiviert durch Fremdstoffe, genannt Antigene, die von Pathogenen wie Viren oder Bakterien stammen. T-Zellen erkennen durch ihren T-Zellrezeptor Antigene nur in Form von Komplexen aus kurzen Antigen-Peptiden und körpereigenen Antigenpräsentationsmolekülen auf der Oberfläche anderer Körperzellen. Diese Antigenpräsentationsmoleküle sind die Klasse I- und Klasse II-Moleküle des Haupt-histokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex, MHC*; der humane MHC wird als *HLA* für *human leucocyte antigen* bezeichnet). Wie bei den MHC-Molekülen lassen sich auch bei den T-Zellen zwei Hauptgruppen unterscheiden. Die Funktion der zytotoxischen oder „Killer“-T-Zellen (*CTL, cytotoxic T lymphocytes*) ist es, z.B. von Viren infizierte Zellen zu eliminieren. „Helfer“-T-Zellen (*Th, helper T cells*) üben wichtige regulatorische Funktionen durch das Ausschütten von Zytokinen aus. So sind z.B. die meisten durch Antikörper vermittelten Immunantworten streng von dieser T-Zellhilfe abhängig. Die beiden Untergruppen von T-Zellen unterscheiden sich durch das Vorhandensein der CD4- bzw. CD8-Co-Rezeptoren, die die Bindung an die MHC-

Moleküle verstärken. Zytotoxische T-Zellen tragen das CD8-Molekül und erkennen Antigen/MHC Klasse I-Komplexe, während Helferzellen positiv für CD4 sind, und von MHC Klasse II-Molekülen präsentierte Antigene erkennen. Die Antigenerkennung

durch T-Zellen ist schematisch in *Abbildung 1* dargestellt.

Die Dichotomie der Funktion der MHC-Moleküle spiegelt sich auch in deren Expressionsmuster wider. Da z.B. Viren prinzipiell alle Körperzellen befallen können, die dann von zytotoxischen T-Zellen eliminiert werden müssen, findet man MHC Klasse I-Moleküle auf praktisch

allen kernhaltigen Zelltypen. Die Situation ist völlig anders für MHC Klasse II-Moleküle. Diese werden dauernd, also konstitutiv, nur auf so genannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie B Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen vorgefunden. Daneben gibt es zahlreiche Stimuli, die die Expression der MHC Klasse II-Moleküle in vielen verschiedenen Zelltypen positiv oder negativ beeinflussen können. IFN- γ ist dabei das am besten bekannte induzierende Agens der MHC Klasse II-Expression. Durch den direkten Zusammenhang der MHC Klasse II-Expression und der T-Zellaktivierung und damit der CD4 T-Zell-vermittelten Immunantwort kommt der Regulation der MHC Klasse II-Expression eine wichtige Rolle für die Funktion der spezifischen Immunantwort zu. Die molekularen Mechanismen, die die Expression der MHC Klasse II-Moleküle und -Gene regulieren, sind Gegenstand unseres Interesses.

Die Regulation der Expression findet hauptsächlich auf der Ebene der Transkription der MHC Klasse II-Gene statt, wobei vor allem drei hochkonservierte DNA-Elemente innerhalb der proximalen MHC Klasse II-Promotoren als notwendig und ausreichend zur Reproduktion der zelltypspezifisch konstitutiven und der induzierbaren Expression identifiziert wurden. Diese werden als X-, X2- und Y-Elemente (*box*) bezeichnet (*Abb. 2*). Eine wichtige Rolle bei der Identifizierung der für die MHC Klasse

II-Expression verantwortlichen Regulationsfaktoren spielte die Existenz einer seltenen angeborenen Immunschwäche, die durch das völlige Fehlen der MHC Klasse II-Expression verursacht wird. Diese normalerweise tödlich verlaufende HLA Klasse II-Defizienz wird auch als Syndrom der nackten Lymphozyten (*bare lymphocyte syndrome, BLS*) bezeichnet. Beim BLS handelt es sich um einen genetisch heterogenen Defekt der MHC Klasse II-Genregulation, bei dem Mutationen in mindestens vier verschiedenen Regulationsfaktorgenen zu einem fast identischen Phänotyp führen. In den drei BLS-Komplementationsgruppen B, C und D sind Unter-einheiten des an die X-Box bindenden Faktors RFX betroffen (RFXANK, RFX5, bzw. RFXAP). Das historisch erste BLS-Gen CIITA (*class II transactivator*) ist defekt in BLS-Gruppe A.

Die BLS-Komplementationsgruppen und die an die X2-, bzw. Y-Box bindenden Faktoren X2BP und NF-Y sind in *Abbildung 2* dargestellt. CIITA hat sich seit seiner Identifizierung als der Hauptregulator der MHC Klasse II-Genexpression erwiesen. Während RFX, X2BP und NF-Y

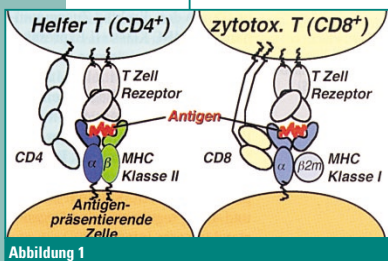


Abbildung 1

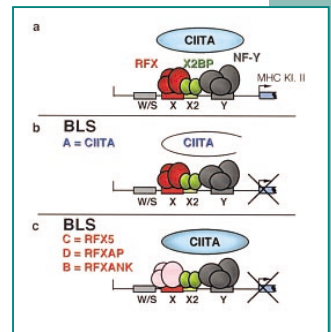


Abbildung 2

unabhängig vom MHC Klasse II-Expressionsstatus ubiquitär in allen Zelltypen vorhanden sind, weist CIITA selbst ein differenzielles Expressionsmuster auf, und kann nur in MHC Klasse II positiven Zellen nachgewiesen werden. Wir konnten zeigen, dass die durch IFN- γ induzierte MHC Klasse II-Expression durch die obligatorische Induktion von CIITA vermittelt wird. In zahlreichen Zelllinien und transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass CIITA nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend zur Aktivierung der MHC Klasse II-Genexpression ist. CIITA reguliert die MHC Klasse II-Expression nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ. Wir konnten zeigen, dass über weite Bereiche ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen CIITA und MHC Klasse II-mRNA-Expressionsniveau besteht. Durch den oben erwähnten quantitativen Zusammenhang mit der T-Zellaktivierung wird somit CIITA zu einem Schlüsselfaktor der zellulären Immunantwort. Die differenzielle Expression der MHC Klasse II-Gene wird also zum Großteil durch die differenzielle Expression von CIITA vermittelt.

Bei CIITA handelt es sich um ein großes Protein von über 1.100 Aminosäuren, das wenig Homologien zu bekannten Proteinen aufweist. Die fehlende DNA-Bindungsaktivität bei gleichzeitiger Anwesenheit einer N-terminalen Aktivierungsdomäne veranlasste uns bereits frühzeitig zu der Vermutung, dass CIITA als so genannter Co-Aktivatoren durch Protein-Proteinwechselwirkungen eine Verbindung zwischen den Faktoren, die den MHC Klasse II-Promotor binden, und der basalen Transkriptionsmaschinerie herstellen könnte. Unser derzeitiges Hauptinteresse gilt der Struktur/Funktionsanalyse von CIITA. Im C-terminalen Bereich von CIITA konnten wir vier Bereiche identifizieren, die Homologien zu so genannten Leucin-reichen Repetitionen (*leucine rich repeats*; LRRs) aufweisen. LRRs sind Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen, die in vielen verschiedenen Klassen von Proteinen vorkommen. Durch eine Analyse der Interaktion des LRR-Proteins RNase-Inhibitor und seinem Substrat RNase A (Kobe und Deisenhofer, 1995) konnten wir einen Konsensus für potenzielle Substratbindungsstellen innerhalb von LRRs erstellen und die entsprechenden Positionen in CIITA durch Alaninmutagenese funktionell testen. Auf diese Weise gelang es, neun multiple und sieben Einzelalaninmutanten von CIITA zu gewinnen, die das MHC Klasse II-Aktivierungspotenzial vollständig eliminieren.

Durch Co-Immunpräzipitation konnten wir direkte Proteinwechselwirkungen von CIITA mit je zwei der Untereinheiten von RFX und NF-Y

nachweisen (RFX5, RFXANK, NF-YB, NF-YC). Erstaunlicherweise wurden diese Interaktionen nicht durch die LRR-Mutagenese beeinflusst. Andererseits konnten wir durch Chromatin-Immunpräzipitation zeigen, dass CIITA *in vivo* mit dem an den MHC Klasse II-Promotor bindenden Komplex in Wechselwirkung tritt und dass diese Interaktion von der Integrität der CIITA-LRR abhängig ist. Die so entstandene Diskrepanz konnte durch die Beobachtung erklärt werden, dass die CIITA-LRR-Mutanten nicht mehr in den Zellkern gelangen können (Abb. 3). Eine der Hauptfunktionen der CIITA-LRR liegt also im nukleo-zytoplasmatischen Transport von

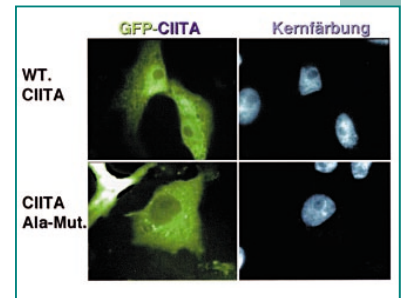


Abbildung 3

CIITA. In der Abbildung 4 sind die hier vorgestellten Erkenntnisse zur Aktivierung der MHC Klasse II-Genexpression zusammengefasst. Von der Arbeitsgruppe J. Ting (Chapel Hill, NC, USA) wurden noch zwei andere Sequenzmotive in CIITA identifiziert, die ebenfalls für die Kernlokalisation notwendig sind. Wir haben es hier also mit einem hochkomplexen, noch weitgehend unbekanntem Mechanismus zu tun. In Zukunft wollen wir die Funktion der CIITA-LRR und die Mechanismen des intrazellulären Transports von CIITA verstehen lernen. Wir haben erste Hinweise auf einen Interaktionspartner der CIITA-LRR und versuchen diesen zu isolieren. Die hier gewonnenen Erkenntnisse eröffnen nun auch neue Möglichkeiten zur experimentellen Manipulation der Funktion von CIITA und damit der CD4-T-zellvermittelten Immunantwort. Die von uns identifizierten LRR-Alaninmutationen bieten ganz präzise Angriffstellen, an denen die CIITA-Funktion z.B. durch Peptide und später durch „small molecules“ inhibiert werden könnte. Solche immunsuppressiven Inhibitoren könnten z.B. im Bereich von Autoimmunerkrankungen von Interesse sein, bei deren Pathogenese CD4-T-Zellen oft von großer Bedeutung sind. Einen weiteren Ansatzpunkt in der gleichen Richtung bieten die von uns identifizierten Interaktionen von CIITA mit den an den MHC Klasse II-Promotor bindenden Faktoren.

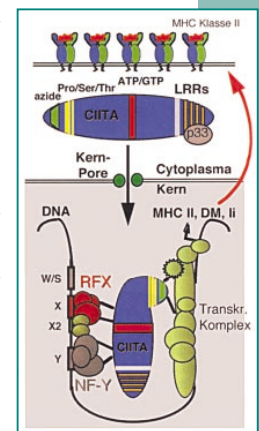


Abbildung 4

Worin liegt nun der biologische Sinn dieser so komplexen Regulationsmaschinerie? Wahrscheinlich ist, dass auf diese Weise eine möglichst präzise Feinregulation der MHC Klasse II-Expression in vielen verschiedenen Zelltypen, Geweben und biologischen Situationen ermöglicht werden soll,

weil dies für die korrekte Funktion der MHC Klasse II-Moleküle essenziell ist. In diesem Zusammenhang ist es dann nicht verwunderlich, dass wir für das CIITA-Protein eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten feststellen konnten. Wir konnten Protein-destabilisierende Sequenzen in CIITA identifizieren, die einen durch Proteasomen vermittelten Abbau induzieren. Die Eliminierung solcher Sequenzen könnte zu einer Stabilisierung des Proteins „Super-CIITA“ führen, das z.B. zur Immunstimulation bei der DNA-Immunisierung eingesetzt werden könnte.

Abbildung 1: Antigenerkennung durch T-Zellen

Abbildung 2: a) Cis- und trans-agierende Elemente der MHC Klasse II-Promotoren. Die konservierten cis-agierenden DNA-Elemente W/S, X, X2 und Y binden die ubiquitär vorkommenden Proteinkomplexe RFX, X2BP und NF-Y. Diese stabilisieren sich gegenseitig durch kooperative Wechselwirkungen und bilden eine funktionelle Einheit. CIITA bindet nicht direkt an die DNA, stellt also keinen klassischen Transkriptionsfaktor dar.

b, c) Genetische Ursachen der HLA Klasse II-Defizienz (bare lymphocyte syndrome, BLS).

Abbildung 3: LRR-Alaninmutanten von CIITA werden vom Zellkern ausgeschlossen. Für dieses Experiment wurde ein Fusionsprotein von CIITA mit GFP (green fluorescent protein) eingesetzt. In der linken Spalte ist die grüne Fluoreszenz von GFP-CIITA zu sehen, rechts wurden die Zellkerne durch Hoechst-Färbung sichtbar gemacht. Bei der dunklen Struktur innerhalb des Kerns handelt es sich um den Nukleolus.

Abbildung 4: Modell der MHC Klasse II-Genaktivierung durch CIITA.

Entwicklung des Immunsystems

Prof. Dr. Thomas Boehm

Autoren: Dr. T. Neil Dear, Dr. Rita Carsetti

Die Funktion der Milz bei der Immunabwehr

Unter den Organen des lymphatischen Systems nimmt die Milz eine Sonderstellung ein. Gemeinhin als sekundäres lymphatisches Organ betrachtet, vereint die Milz diesen Aspekt mit Funktionen eines primären lymphatischen Organs, in dem die letzten Schritte der B-Zell-Reifung stattfinden. Die Milz ist für eine intakte Immunabwehr bedeutsam, da Patienten mit kongenitaler Asplenie und splenektomierte Patienten oft an Infektionen mit bestimmten bakteriellen Erregern versterben. In den letzten Jahren konnten wesentliche neue Erkenntnisse zur Entwicklung und Funktion dieses Organs erarbeitet werden.

Die Milz entwickelt sich aus dem in der Nähe des Pankreas gelegenen Mesenchym, das durch Expression des Hox11-Transkriptionsfaktors gekennzeichnet ist. Wird das für den Hox11-Transkriptionsfaktor kodierende Gen inaktiviert, kommt es zwar zur initialen Bildung der Milz, die Organentwicklung kommt jedoch ab dem 14. Tag der Embryonalentwicklung ins Stocken. Funktionell macht sich dieser Entwicklungsdefekt darin bemerkbar, daß die Milzanlage nicht von Zellen aus dem blutbildenden System besiedelt wird. Um zu untersuchen, ob der durch die Inaktivierung des Hox11-Gens ausgelöste Differenzierungsblock durch normale Zellen des gleichen Gewebes aufgehoben werden kann, wurden chimäre Mäuse hergestellt und untersucht. Dabei werden embryonale Stammzellen mit auf beiden Allelen inaktiviertem Hox11-Gen (Hox11^{-/-}-Zellen) mit frühen Embryonalstadien normaler Mäuse (sogenannten Morulas) aggregiert. Die entstandenen chimären Mäuse bestehen somit aus normalen und mutanten Zellen; da sich die mutanten Zellen in diesem Experiment durch eine bestimmte genetische Veränderung in diesem Experiment mit Hilfe eines enzymatischen Tests im Gewebe blau anfärben lassen, kann deren Verteilung im Embryo genau bestimmt werden. Es zeigte sich, daß mutante Zellen bei der Bildung der Milz von den normalen Zellen aus dem Organ verdrängt werden, gleichzeitig ändern die mutanten Zellen ihre Position und verschmel-

zen mit der Organanlage des Pankreas. Diese Studien zeigen, daß Hox11 eine zellautonome Eigenschaft mesenchymaler Zellen der gemeinsamen Anlage von Pankreas und Milz vermittelt. In Abwesenheit eines funktionellen Hox11-Proteins kommt die Milzentwicklung zum Stillstand, während die des Pankreas ungestört weitergehen kann. Eine durch Hox11 gesteuerte selektive Zellaffinität könnte erklären, warum mutante Zellen in der Milzanlage keine korrekte Organstruktur ausbilden und stattdessen mit benachbarten Organanlagen fusionieren.

Nach der Geburt übernimmt die Milz die schon oben erwähnten Funktionen eines primären und sekundären lymphatischen Organs. Aus dem Knochenmark wandern sogenannte T1 (transitionale) B-Zellen in die Milz ein und differenzieren sich dort über das T2-Stadium zu reifen B-Zellen. B-Zellen unterscheidet man gemeinhin in klassische, sogenannte B2-Zellen, und sogenannte B1-Zellen. B2-Zellen produzieren antigenspezifische Antikörper im Verlaufe einer Immunantwort erst einige Zeit nach Antigenexposition. Bei einer Infektion können diese Antikörper deshalb nicht sofort zur Bekämpfung von Erregern wirksam werden. Im Gegensatz dazu spricht man B1-Zellen als Produzenten sogenannter natürlicher Antikörper ohne vorherigen Antigenkontakt eine Rolle bei der raschen Abwehr von Bakterien und Viren zu. In dieser Weise fungieren B1-Zellen als Partner des angeborenen Immunsystems. Bislang war nicht bekannt, welche Voraussetzungen zu ihrer Bildung gegeben sein müssen.

In Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, daß nur durch Transplantation fötaler Leberzellen (nicht aber durch solche des adulten Knochenmarks) in immundefizienten Mäusen B1-Zellen generiert werden können. Bei der Untersuchung von Hox11^{-/-}-Mäusen, die keine Milz ausbilden können, zeigte sich nun, daß eine als B1a-Zelle bezeichnete Subpopulation der B1-Zellen nicht nachweisbar war. Ebenso wurde beobachtet, daß die Entfernung der Milz bei normalen Mäusen zu einer lang andauernden drastischen Reduktion der B1a-Zellen führte. Diese Befunde legen nahe, daß die Milz nicht nur bei der Reifung von B2-Zellen eine Rolle spielt, sondern auch für das Überleben eines Teils der B1-Zellen notwendig ist. Die Bedeutung der B1-Zellen liegt in der Fähigkeit zur schnellen Reaktion gegen bestimmte Antigene der Bakterienwand. In Übereinstimmung mit dieser Funktion konnten keine Antikörper vom IgM-Typ nach Immunisierung mit Polysacchariden aus *Streptococcus pneumoniae* bei Hox11^{-/-} und splenektomierten Mäusen festgestellt werden.

Obige Befunde unterstreichen die Bedeutung der Milz für die Bildung verschiedener Arten von B-Zellen und zeigen, welche dramatischen Immundefekte durch angeborene Fehlbildung oder späteren Verlust der Milz entstehen können. Diese Erkenntnisse liefern so neue Anhaltspunkte für die Untersuchung von Menschen mit gleichen Krankheitserscheinungen.

Impressum

Herausgeber

Max-Planck-Institut für Immunbiologie

Stübeweg 51
79108 Freiburg
Telefon 07 61/51 08-345
Telefax 07 61/51 08-220

Öffentlichkeitsarbeit
Dipl. Vw. Thomas Tritschler

E-Mail: tritschler@immunbio.mpg.de
<http://www.immunbio.mpg.de>

Design, Produktion

Hans-J. Schwarzer

Projektagentur für Werbung, Design
und digitale Medien

Hans-Sachs-Gasse 9
79098 Freiburg
Telefon 07 61/5 59 26-0
Telefax 07 61/5 59 26-25
E-Mail: info@projektagentur-schwarzer.de
<http://www.projektagentur-schwarzer.de>