Die Rolle der Raf-Kinasen bei der B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Samantha Feicht
aus Bogotá
5. Oktober 2011

Angefertigt am Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Berit Jungnickel

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 29.02.2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde von März 2008 bis Oktober 2011 am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik (später Abteilung für Genvektoren) des Helmholtz Zentrums München in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ursula Zimber-Strobl erstellt und von Prof. Dr. Berit Jungnickel betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Samantha Feicht, geboren am 16. Juni 1983 in Bogotá, Kolumbien, ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, sofern nicht explizit auf Dritte verwiesen wird.

Diese Dissertation hat weder in gleicher oder ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe weder bereits früher Doktorgrade erworben noch versucht zu erwerben.

München, den 5.10.2011 Samantha Feicht

So much to do, so little done...

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

B-Raf and Raf-1 act partially redundant in B-cell development. Feicht S, Marschall-Schröter G, Lehmann FM, Jesenberger V, Chen A, Hobeika E, Bornkamm GW and Zimber-Strobl U; AG Strobl, Department of Gene Vectors, Helmholtz-Zentrum München, München, Germany. (Manuskript in Vorbereitung)

The expansion of chronically activated B cells is strictly dependent on a functional BCR and its coreceptor CD19. Hojer C, Hampel F, Feicht S, Strobl LJ, Uytterspot N, Hömig-Hölzel C, Ferch U, Ruland J, Rajewsky K, Zimber-Strobl U; AG Strobl, Department of Gene Vectors, Helmholtz-Zentrum München, München, Germany. (Manuskript in Vorbereitung)

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

7th B cell Forum, Salzburg 2009 (Poster)

9th B cell Forum, Bad Sooden 2011 (Poster)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1. Das Immunsystem 1

1.2. Die B-Zell-Entwicklung 1

1.3. Die B-Zell-Aktivierung 5

1.4. Signalwege in der B-Zell-Aktivierung und Lymphomentstehung 8

1.4.1. Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg 8

1.4.2. Der CD40-Rezeptor-Signalweg 11

1.5. Raf-Kinasen und ihre Funktionen 13

1.5.1. Die Familie der Raf-Kinasen 13

1.5.2. Raf-defiziente Mäuse 15

1.5.3. Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg 16

1.5.4. Die Rolle von Raf in B-Lymphozyten 18

1.6. Modellsysteme 19

1.6.1. Die konditionalen Raf-1- und B-Raf -defizienten Mausstämme 19

1.6.2. Der LMP1/CD40-transgene Mausstamm 20

2 Fragestellung 21

3 Ergebnisse 22

3.1. Die Rolle der Raf-Kinasen bei der B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung 22

3.1.1. Murine B-Zellen exprimieren A-Raf, B-Raf und Raf-1 22

3.1.2. B-Zell-spezifische Deletion von B-Raf und Raf-1 23

3.1.3. Die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark ist in Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen verändert 25

3.1.4. Die Deletion von B-Raf und Raf-1 verursacht reduziertes Milzgewicht und verminderte B-Zellzahlen 29

3.1.5. Raf-Knockout-Mäuse haben weniger transitionelle B-Zellen 30
3.1.6. Follikuläre B-Zellen sind in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen stark reduziert 32
3.1.7. Die Follikelstruktur in der Milz von Raf-Knockout-Mäusen bleibt erhalten 35
3.1.8. B-Zellzahlen im Lymphknoten von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sind nur leicht vermindert 35
3.1.9. In B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sind die B1a-Zellen in der Peritonealhöhle stark reduziert 36
3.1.10. Das Überleben von Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen ist in vitro leicht vermindert 38
3.1.11. Raf-defiziente B-Zellen lassen sich in vitro zur Proliferation anregen 39
3.1.12. Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse haben einen verminderten Influx von B-Zellen in die Peripherie 40
3.2. Der Erk-Signalweg in B-Zellen aus Raf-Knockout-Mäusen 42
3.2.1. Die Erk-Phosphorylierung in B-Zellen kann durch einen B-Raf-Inhibitor gehemmt werden 42
3.2.2. Der Erk-Signalweg lässt sich in Raf-defizienten B-Zellen aktivieren 44
3.2.3. MEKK1 wird in Raf-defizienten B-Zellen nach BCR-Stimulation aktiviert 46
3.2.4. A-Raf ist möglicherweise an der Aktivierung von Erk in B-Zellen beteiligt 47
3.3. Die Rolle von B-Raf und Raf-1 bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort 50
3.3.1. Die Abwesenheit von Raf-1 und B-Raf führt zu Veränderungen der Immunglobulintiter 50
3.3.2. Raf-Knockout-Mäuse bilden Keimzentren 51
3.3.3. Antigen-spezifische Antikörpertiter und die Affinitätsreifung sind in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen reduziert 53
3.4. Die Rolle der Raf-Kinasen in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Aktivierung und -Expansion 55
3.4.1. Prämaligne LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen haben veränderte Raf-Kinase Aktivierungsmuster 56
3.4.2. Die LMP1/CD40-vermittelte Aktivierung des Erk-Signalwegs lässt sich durch Raf-Kinase Inhibitoren hemmen 57
3.4.3. B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende Mäuse zeigen Splenomegalie und

erhöhte B-Zellzahlen 58
3.4.4. B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende Mäuse haben eine expandierte Marginalzonen-B-Zellpopulation 60
3.4.5. B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zeigen eine konstitutive Aktivierung des Erk-Signalwegs 61

4 Diskussion 63

4.1. Die Rolle von Raf bei der normalen B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung 63
4.1.1. Die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark ist Raf-1-abhängig 64
4.1.2. B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigen eine starke Abnahme der follikulären B-Zellen 65
4.1.3. Transitionelle B-Zellen sind in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen stark reduziert 67
4.1.4. Die B1-Zell-Entwicklung ist in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen gestört 68
4.1.5. Der Erk-Signalweg kann in Raf-defizienten B-Zellen aktiviert werden 70
4.1.6. Veränderte Immunglobulin-Titer und –Affinitätsreifung in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen 72
4.2. Raf-Kinasen in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Aktivierung und -Expansion 75
4.3. Die Aktivierung von Erk und Akt in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen 77

5 Zusammenfassung 79

6 Summary 81

7 Material und Methoden 83

7.1. Material 83
Mausstämme 83
Oligonukleotide 84
Enzyme 84
Inhibitoren 84
Antikörper für Western-Blotting 85

Zweitantikörper 86
Antikörper für Immunhistochemie 86
Verbrauchsmaterial 86
Software 87
Geräte 87
7.2. Methoden 88
7.2.1. Analyse von transgenen Mäusen 88
7.2.1.1. Maus-Verpaarungen 88
7.2.1.2. Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus 89
7.2.1.3. Isolierung reifer B-Zellen aus der Maus 90
7.2.1.4. Immunisierung von Mäusen 91
7.2.1.5. Durchflusszytometrie (FACS) 91
7.2.1.6. In vivo 5-Brom-2‘-Desoxyuridin-(BrdU) Test 92
7.2.1.7. Immunhistochemie von Gefrierschnitten 93
7.2.1.8. Präparation von Blutserum aus Mäuseblut 94
7.2.1.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 94
Bestimmung der spezifischen Standard-Immunglobulinspiegel 95
Bestimmung der NP-spezifischen Immunglobulinspiegel 95
7.2.2. Zellkultur 96
7.2.2.1. Allgemeine Zellkulturtechniken 96
7.2.2.2. Bestimmung der Zelldichte 96
7.2.2.3. Kultivierung primärer Lymphozyten 96
7.2.2.4. In vitro Proliferationsassay 97
7.2.3. Molekularbiologische Methoden 97
7.2.3.1. DNA-präparative Techniken 97
DNA Isolierung aus Mausschwanzzellen 97
Ethanol-Präzipitation der DNA 98
Phenol-Extraktion von DNA 98
7.2.3.2. Techniken der DNA-Analyse 99
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 99
Agarose Gelelektrophorese 99
7.2.3.3. Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen 99

Präparation von Proteinen aus Zellen 99
Proteinquantifizierung 100
SDS-PAA-Gelelektrophorese 100
Western-Blotting 101
Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörpern 102
Wiederverwendung eines Western-Blots (stripping) 103

8 Literaturangaben 104

9 Anhang 117

10 Lebenslauf 120

11 Danksagung 122

Abkürzungen

α	anti
AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BAFF(-R)	B cell activating factor (receptor)
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaar (e)
BCR	B-Zell-Rezeptor (B cell receptor)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinder-Serum Albumin (bovine serum albumine)
C	C-Terminus
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy-DNA
CFSE	Carboxy-Fluoreszein Diacetat Succinimidyl-Ester
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
Cre	Protein-Rekombinase vom Phagen P1 (Causes Recombination)
CSR	Class switch recombination (Klassenwechsel)
DMEM	Dulbecco's modification of the eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
Erk	extracellular signal-regulated kinase
et al.	und andere (et alii)
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fo B	follikuläre B-Zelle
g	Gramm
× g	x-fache Erdbeschleunigung
GC	Keimzentrum (germinal center)
h	Stunde
HD	Hodgkin Erkrankung (Hodgkins Disease)
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS-Zellen	Hodgkin Reed Sternberg-Zellen
HRP	Meerrettich Peroxidase
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
Igα, β	Immunoglobulin-assoziierte Signalmoleküle α und β
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
IL	Interleukin
iLN	inguinale Lymphknoten
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif

JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KO / ko	Deletiertes Gen (Knockout)
L	Liter
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	latentes Membran-Protein
loxP	locus of crossing over, x
LR	Lipidflöße oder Lipid-rafts
M	Molar
MACS	Magnetic associated cell sorting
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mb	Megabasenpaare ($1x10^6$ Bp)
mg	Milligramm
MHC	major histocompability
µg	Mikrogramm
µ-Kette	schwere Kette des Immunglobulins
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten RNA (messenger RNA)
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase/ERK-Kinase
MZB Zellen	Marginalzonen-B-Zellen
N	N-Terminus / Amino-Terminus
n.i.	nicht immunisiert
NP-CGG	Hühner-Gammglobulin-konjugiertes Nitrophenylacetyl
NF-κB	Kernfaktor-κB (nuclear factor-κB)
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (posphate buffered saline)
PC	Peritonealhöhle (peritoneal cavity)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PerCP	Perdinin-Chlorophyll-Protein
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
Prä-BCR	Prä-B-Zell-Rezeptor
Raf	rapidly growing fibrosarcoma; schnell wachsendes Fibrosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute; rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
s	Sekunde
SHM	Somatische Hypermutation
SLC	Surrogate light chain (Ersatz-Leichte Kette)
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
T B-Zelle	Transitionelle B-Zelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TD	T-Zell-abhängig; T cell dependent
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA
TI	T-Zell-unabhängig; T cell independent
TNF-R	Tumor-Nekrose Faktor-Rezeptor (TNF-R)
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
ÜN	über Nacht
V	Volt
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
x	mal

1 Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Im Verlauf der Evolution haben mehrzellige Organismen ein Immunsystem entwickelt, um sich vor Pathogenen und eigenen entarteten Zellen zu schützen. Während Pflanzen und Invertebraten ein angeborenes Immunsystem besitzen, hat sich in Wirbeltieren zusätzlich das adaptive Immunsystem entwickelt. Dieses weist eine hohe Variabilität auf, ist vor allem spezifisch gegen Pathogene gerichtet und hat die Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis auszubilden.

Das Immunsystem setzt sich aus mehreren spezialisierten Zelltypen zusammen, die sich wie alle zellulären Komponenten des Blutes aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Diese sind bei ausgewachsenen Säugetieren im Knochenmark zu finden, sind einer stetigen Zellteilung unterworfen und differenzieren entweder zu myeloiden oder lymphatischen Vorläuferzellen. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen Makrophagen, Granulozyten (Basophile, Eosinophile und Neutrophile), Mastzellen und dendritische Zellen sowie Erythrozyten gehören. Aus lymphatischen Vorläuferzellen entstehen T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und B-Lymphozyten. T- und B-Zellen bilden den adaptiven Teil der Immunantwort, der noch weiter in einen humoralen und zellulären Teil gegliedert wird. Die humorale Immunantwort findet mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die von Antigen-aktivierten B-Zellen sezerniert werden, statt. Die zelluläre Immunantwort wird von spezialisierten T-Zellen ausgeführt, indem intrazelluläre Pathogene, wie Viren oder entartete Zellen, beseitigt werden. Ergänzend dazu wirkt eine Reihe von Plasmaproteinen des angeborenen Immunsystems, die das Komplementsystem bilden, und bei der Lyse von Pathogenen eine wichtige Rolle spielen.

1.2. Die B-Zell-Entwicklung

In der Embryogenese beginnt die B-Zell-Entwicklung in der fötalen Leber und wird im adulten Organismus im Knochenmark fortgesetzt. Die B-Zell-Entwicklung setzt sich aus mehreren aufeinander folgenden Differenzierungsschritten zusammen (Abbildung 1), und führt zu der Entstehung von reifen B-Zellen, die einen funktionalen, aber nicht selbstreaktiven B-Zell-Rezeptor (B cell receptor, BCR) tragen.

Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor, CLP) wird vor allem durch die Transkriptionsfaktoren Ikaros (Yoshida et al., 2010) und Pu.1 instruiert (Yoshida et al., 2006). Die Weiterdifferenzierung lymphoider Vorläuferzellen zu B-Zellen ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Pu.1, E2A, Pax5 und EBF. E2A und EBF aktivieren die Immunglobulin-(Ig) Genumordnung und die Expression von B-Zell-spezifischen Genen, wogegen Pax5, das durch Pu.1 induziert werden kann (Decker et al., 2009), die Expression B-Zell-unspezifischer Signalmoleküle hemmt (Nutt et al., 1999, Busslinger, 2004).

Immunglobulingene bestehen aus mehreren Gensegmenten, die im Laufe der frühen B-Zell-Entwicklung mit Hilfe genetischer Rekombination umgelagert werden. In Pro-B-Zellen, dem frühesten Entwicklungsstadium von B-Zellen, induziert die Expression der Enzyme Rag-1 und Rag-2 (Rekombinations aktivierte Gene) die Genumordnung des Ig schwere Ketten- (IgH) Gen-Lokus. Im ersten Rekombinationsschritt wird ein D-(diversity) Segment an ein J-(joining) Segment fusioniert. Am Übergang von der frühen Pro-B-Zelle zur späten Pro-B-Zelle wird an die rekombinierten D-J-Gensegmente ein V- (variable) Gensegment fusioniert. Eine erfolgreiche Rekombination führt zur Expression einer Igμ schweren Kette. Diese bildet zusammen mit der Ersatz-Leichten Kette (surrogate light chain, SLC), die aus VPreB und λ5 besteht, den Prä-BCR, der auf der Oberfläche der Prä-B-Zelle exprimiert wird. Nur wenn es gelingt, einen funktionalen Prä-BCR zu exprimieren, können große Prä-B-Zellen zu kleinen Prä-B-Zellen weiter differenzieren.

Prä-BCR-Signale bewirken eine zweite Rekombination, und zwar die Umordnung der VJ-Elemente der leichten Ig-Kettenloci (IgL), Igκ- oder Igλ. Der Igλ-Lokus wird nur dann umgeordnet, wenn es nach Rekombination im Igκ-Lokus zu keiner produktiven Umordnung gekommen ist. Nach erfolgreicher Umordnung und Expression der leichten Kette kann der reife BCR auf der Oberfläche exprimiert werden. BCR-tragende B-Zellen werden als unreife B-Zellen bezeichnet (Bossy et al., 1991). Dieser schrittweise Prozess der Genumordnung, sowohl der schweren als auch der leichten Ig-Kettengene, der als somatische Rekombination bezeichnet wird, führt zusammen mit dem Einfügen zusätzlicher Nukleotide an den DNA-Bruchstellen durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) zu einer sehr großen Vielfalt an B-Zell-Rezeptorspezifitäten (Gilfillan et al., 1993). Während dieser Vorgänge der Genumordnung kann es auch zu unproduktiven Rekombinationen kommen, die zu einer Leserasterverschiebung oder zum Einfügen eines Stopp-Kodons führen. In

diesem Fall geht der Rekombinationsvorgang weiter. Sobald ein IgH- oder ein IgL-Kettenallel produktiv rekombiniert hat, bewirkt ein Mechanismus, der als allelische Exklusion bekannt ist, dass keine weiteren Allele rekombiniert und exprimiert werden können. Somit exprimiert jede B-Zelle nur Ig-Moleküle einer einzigen Spezifität (Alt, 1984). Um Autoimmunität zu verhindern, werden unreife B-Zellen, die Selbstantigene erkennen, entweder negativ selektioniert, durchlaufen den Prozess der Rezeptoreditierung (receptor editing), um deren Rezeptorspezifität zu verändern (Edry und Melamed, 2004) oder werden anergisch. Anerge B-Zellen, welche von nur kurzer Lebensdauer sind, können in die Peripherie gelangen, dort aber nicht mehr über ihren Rezeptor aktiviert werden.

Täglich entstehen im Knochenmark von Mäusen etwa 2×10^4 unreife B-Zellen. Doch nur etwa 10 % dieser B-Zellen überleben die unterschiedlichen Selektionsprozesse, verlassen das Knochenmark und gelangen über die Blutbahn in die Peripherie. Von dort aus erreichen sie schließlich die Milz, wo sie zu reifen naiven B-Zellen differenzieren. Die späte B-Zell-Entwicklung findet zum größten Teil in der Milz statt. Dieses periphere lymphatische Organ besteht aus zwei Kompartimenten, der roten und weißen Pulpa. Die Lymphozyten der Milz sind zum größten Teil in der weißen Pulpa ansässig.

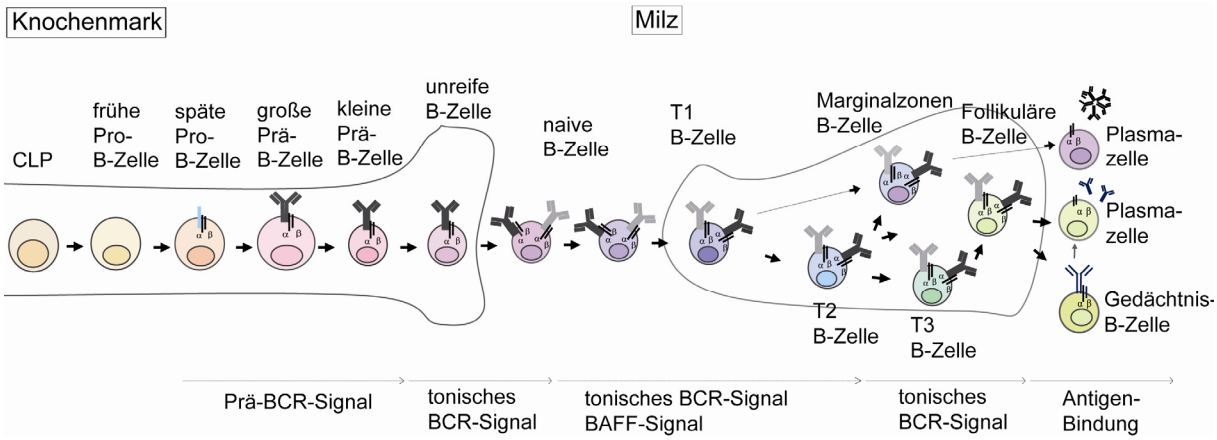


Abbildung 1 Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung (modifiziert nach Benschop und Cambier, 1999). Im Knochenmark differenzieren lymphoide Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor, CLP) zu Pro-B-Zellen, anschließend zu Prä-B-Zellen und dann zu unreifen B-Zellen, die in die Blutbahn wandern. Von dort aus erreichen sie die Milz, wo sie sich über die Stadien der transitionellen B-Zellen (T1, T2 und T3) zu reifen B-Zellen, den follikulären oder Marginalzonen-B-Zellen, und nach Antigenbindung zu Plasma- und Gedächtnis-B-Zellen entwickeln. Die unterschiedlichen B-Zellpopulationen und Differenzierungsschritte im Knochenmark sind abhängig von Signalen des Prä-BCR, wogegen transitionelle B-Zellen von Signalen des BCR und BAFF-Rezeptors abhängig sind und Plasmazellen nur nach Antigenbindung entstehen können.

Diese besteht aus Follikeln, die eine T- und eine B-Zell-Zone besitzen und vom Marginalsinus und der Marginalzone (MZ) umgeben sind (Abbildung 2).

Unreife B-Zellen wandern aus dem Knochenmark über den Blutkreislauf als transitionelle B-Zellen (transitional B cells) in die „periarterielle lymphatische Scheide“ (PALS) der weißen Pulpa ein, in der sich hauptsächlich T-Zellen befinden. Bei den transitionellen B-Zellen, die sich in die Entwicklungsstadien T1, T2 und T3 untergliedern, handelt es sich um eine kurzlebige Übergangsform zwischen unreifen und reifen B-Zellen (Allman et al., 2001). Während der Differenzierung von T1- zu T3-Zellen finden weitere Selektionsprozesse statt. Nur etwa ein Drittel der T1-B-Zellen reift zu T2-B-Zellen oder T3-B-Zellen. Das Überleben und die weitere Entwicklung von T2-Zellen wird über tonische B-Zell-Rezeptorsignale, die Antigen-unabhängig entstehen (Lam et al., 1997, Kraus et al., 2004), und BAFF-Rezeptor- (B cell activating factor receptor) Signale, vermittelt (Moore et al., 1999). Transitionelle B-Zellen entwickeln sich zu reifen B-Zellen weiter, die sich in der Milz in follikuläre (follicular, Fo) und Marginalzonen-B-Zellen (MZB) untergliedern. Fo-B-Zellen, auch B2-Zellen genannt, sind die größte, reife B-Zellpopulation im Erwachsenen. Sie passieren über die Blutzirkulation konstant die peripheren lymphatischen Gewebe und überleben für ein paar Monate im Organismus (Fu und Chaplin, 1999). MZB-Zellen sind viel seltener als Fo-B-Zellen und in Nagern nur in der Milz ansässig. Sie begrenzen zusammen mit spezialisierten metallophilen Makrophagen und Makrophagen der Marginalzone den Marginalsinus an seiner äußersten Schicht und bilden so die Marginalzone, welche auf diese Weise die rote von der weißen Pulpa trennt (Abbildung 2). MZB-Zellen fangen an dieser stark durchbluteten Stelle Pathogene ab, die den Blutstrom erreicht haben.

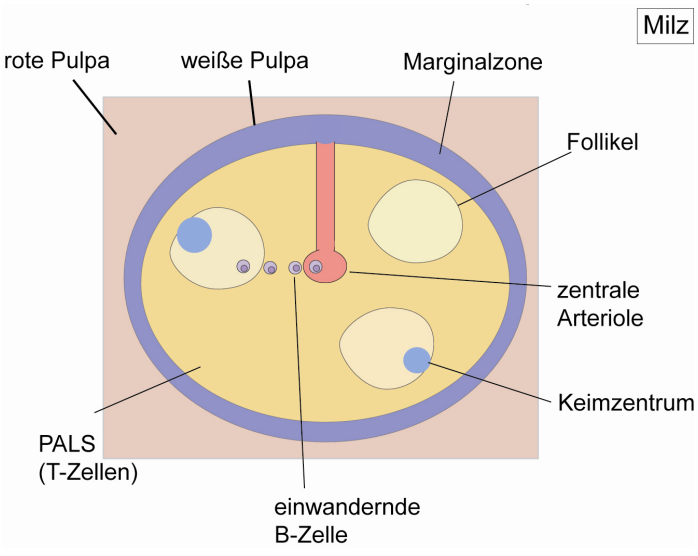


Abbildung 2 Schematische Darstellung der weißen Pulpa in der Milz (modifiziert nach Mebius und Kraal, 2005). Die Milz besteht aus roter und weißer Pulpa. Letztere beherbergt zum größten Teil Lymphozyten und ist in Follikel unterteilt, welche eine T- und eine B-Zellzone aufweisen und vom Marginalsinus und der Marginalzone umgeben sind. In die Milz einwandernde B-Zellen finden ihren Weg über zentrale Arteriolen, die die weiße Pulpa mit Blut versorgen und wandern über die PALS in den Follikel ein, wo sie auf ein Antigen treffen können.

Des Weiteren exprimieren MZB-Zellen Komplementrezeptoren auf ihrer Oberfläche, die zur Beseitigung Komplement-markierter Pathogene dienen. Sie überbrücken somit die Lücke zwischen der sofort einsetzenden Antwort des angeborenen Immunsystems und einer T-Zell-abhängigen Immunreaktion, die erst nach etwa zwei Wochen eintritt, und werden deshalb auch als „angeborene" Lymphozyten („innate-like" lymphocytes) bezeichnet (Lopes-Carvalho und Kearney, 2004). Die Bindung eines Antigens über den BCR und die darauffolgende Aktivierung (Abschnitt 1.3) induziert zudem die Differenzierung dieser B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen.

Neben den B2-Zellen gibt es noch eine weitere Population reifer B-Zellen, die B1-Zellen. Diese B-Zellen sind größer als B2-Zellen und entwickeln sich vor allem aus Stammzellen der fötalen Leber. Sie gehen nicht aus dem oben beschriebenen Differenzierungsprozess hervor, sondern nehmen in der Entwicklung von B-Zellen eine Sonderstellung ein. Es wird angenommen, dass der größte Teil dieser B-Zellen sehr früh in der Ontogenese entsteht, und zwar vor und einige Wochen nach der Geburt. Neuere Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass sich bestimmte B1-Zellen auch aus Stammzellen im Knochenmark von adulten Mäusen entwickeln können (Montecino-Rodriguez et al., 2006). B1-Zellen bilden die vorherrschende B-Zellpopulation in pleuralen Auskleidungen und in der Peritonealhöhle (peritoneal cavity, PC). Diese Zellen teilen sich einige phänotypische und funktionelle Eigenschaften mit den MZB-Zellen; so besitzen beide die Eigenschaft sich selbst zu erneuern (Tarakhovsky, 1997) und exprimieren nur ein beschränktes, primäres Antikörperrepertoire. B1- und MZB-Zellen sind vermutlich die Hauptquelle von natürlichen IgM-Antikörpern und somit wichtiger Teil der angeborenen Immunität (Martin et al., 2001, Martin und Kearney, 2002). B1-Zellen, die sich noch in B1a und B1b unterteilen lassen, sollen neueren Theorien nach die Gewebshomöostase sowie die Erhaltung der Darmflora positiv beeinflussen und Autoimmunität verhindern (Baumgarth, 2011).

1.3. Die B-Zell-Aktivierung

Die Aktivierung ruhender, naiver B-Zellen erfolgt durch spezifische Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor (BCR). Abhängig von der Art des Antigens kann die B-Zell-Aktivierung mit Hilfe von T-Helfer-(T_H) Zellen oder ohne diese stattfinden. Dies wird entsprechend als T-Zell-abhängige (T cell dependent, TD) oder T-Zell-unabhängige (T cell independent, TI) Immunantwort bezeichnet. Die TI-Immunantwort kann von Antigenen des Typs TI-1 oder TI-

2 verursacht werden, die intrinsische B-Zell-aktivierende Eigenschaften besitzen (Lipopolysaccharide) bzw. die durch wiederholte Epitope (multivalente Polysaccharide) die Eigenschaft haben den BCR querzuvernetzen. TD-Immunantworten werden hauptsächlich von Fo-B-Zellen ausgeführt (Rajewsky, 1996). Nach Bindung eines TD-Antigens durch den BCR wird das Antigen durch Endozytose von der Zelle aufgenommen, prozessiert und über MHC-(major histocompatibility complex) Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert. Antigen-spezifische $CD4^+$ T_H-Zellen können über ihren TCR (T-Zell-Rezeptor) das präsentierte Antigen erkennen. Vorab müssen diese allerdings durch das gleiche Antigen, präsentiert von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie den dendritischen Zellen, aktiviert werden. Die $CD4^+$ T_H-Zellen stimulieren die B-Zellen durch die Sekretion stimulatorischer Zytokine sowie durch die Expression des CD40-Liganden (CD40L), der zur Aktivierung des CD40-Rezeptors auf B-Zellen führt. Aktivierte B-Zellen durchlaufen eine klonale Expansion und können entweder an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen oder in extrafollikuläre Foci wandern, wo sie sich zu Plasmazellen entwickeln und niedrigaffine Antikörper sezernieren.

Die Keimzentrums-Bildung erfolgt nur während der TD-Immunantwort. Keimzentren (germinal centers, GC) wurden erstmals 1884 durch Walter Flemming als hochmitotische Areale in Lymphknoten und in der Milz beschrieben (Nieuwenhuis et al., 1981). Sie entstehen aus bis zu zehn aktivierten B-Zellen, die sich mit einer Verdopplungszeit von sechs bis acht Stunden teilen. Keimzentren sind für die Synthese hochaffiner Antikörper und die Ausbildung des immunologischen B-Zell-Gedächtnisses essentiell. Sie spielen somit auch für die Wirksamkeit von Impfungen eine wichtige Rolle. Keimzentren werden in sekundären lymphatischen Geweben wie der Milz, den Lymphknoten, den Tonsillen und den Peyerschen Plaques (Peyer's patches) gebildet. Nach Kontakt mit dem TD-Antigen entwickeln sich aktivierte B-Zellen zuerst zu Zentroblasten und später zu Zentrozyten. Im Keimzentrum durchlaufen die B-Zellen die somatische Hypermutation und die Immunglobulin-Klassenwechsel- (auch Isotypenwechsel-) Rekombination (class switch recombination, CSR), welche zu irreversiblen Veränderungen auf DNA-Ebene führen. Bei diesen Vorgängen spielt das Enzym Aktivierungs-induzierte Cytidin-Desaminase (activation induced cytidine deaminase, AID) eine entscheidende Rolle (Muramatsu et al., 2000, Revy et al., 2000). Der somatischen Hypermutation liegt eine Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch AID zugrunde. Wenn anschließend in diese Stellen durch eine fehlerhafte Reparatur (Bross et al., 2002, Petersen-Mahrt et al., 2002) andere Basen eingesetzt werden, weist das Erbgut

dauerhafte Veränderungen auf. Bei der somatischen Hypermutation wird die variable (V) Region der Immunglobulingene von zufälligen Punktmutationen mit einer Rate von 10^{-3} bis 10^{-4} pro Basenpaar und Generation verändert (Papavasiliou und Schatz, 2002). Dieser Prozess, der während der sekundären und tertiären Immunreaktionen verstärkt wird, erhöht die Antigenspezifität des BCR (Liu et al., 1997). B-Zellen, die nach der somatischen Hypermutation einen hochaffinen BCR tragen, werden positiv selektioniert. Hierfür müssen diese ein Antigen hochaffin binden, welches auf follikulären dendritischen Zellen präsentiert wird, und zeitgleich Überlebenssignale von T_H-Zellen, wie z.B. CD40-Signale, erhalten.

T_H-Zellen sezernieren außerdem Zytokine, die eine Ig-Klassenwechsel-Rekombination in B-Zellen einleiten. Diese besteht darin, dass die μ und δ konstanten Regionen durch andere konstante Regionen wie γ, ε und α ersetzt werden, ohne dabei eine Veränderung im variablen Bereich zu erfahren. Dieser Prozess wird Isotypenwechsel (isotype switching) genannt und führt zur Produktion von IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgE und IgA Antikörpern (Jabara et al., 1990, Hasbold et al., 1998). Die Isotypen besitzen unterschiedliche Effektorfunktionen und wirken an verschiedenen Orten im Organismus. Hauptaufgabe von sezernierten Immunglobulinen ist die Beseitigung von bakteriellen Toxinen sowie die Neutralisierung und Opsonisierung von Pathogenen. Diese können dann durch Makrophagen phagozytiert oder durch das Komplementsystems lysiert werden.

Positiv selektionierte B-Zellen, die ein bestimmtes Antigen mit hoher Affinität binden, verlassen das Keimzentrum als langlebige, Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder als Gedächtnis-B-Zellen (McHeyzer-Williams und Ahmed, 1999). Plasmazellen sind nicht teilungsfähig und können in das Knochenmark einwandern, von wo sie hochaffine Antikörper in die Blutbahn sezernieren. Einige der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen im Knochenmark können ein Leben lang schützende Antikörper abgeben und verleihen somit dem Organismus lebenslangen Schutz vor bestimmten Pathogenen. Gedächtnis-B-Zellen verbleiben in den peripheren lymphatischen Geweben. Ein erneuter Antigenstimulus führt zu einer schnellen und hochspezifischen sekundären Immunantwort. Gedächtnis-B-Zellen ermöglichen somit einen immer wieder abrufbaren immunologischen Schutz.

Die Bindung des BCR durch TI-Antigene, wie bakterielle Polysaccharide, verursacht die Quervernetzung des BCR, welche die Signalweiterleitung im Inneren der Zelle und anschließend die B-Zell-Aktivierung ohne Hilfe von T-Zellen bewirkt. Dies führt zur klonalen Expansion der B-Zellen und der Bildung extrafollikulärer Foci, in denen B-Zellen nach

Differenzierung zu Plasmazellen niedrigaffine IgM- und IgG1-Antikörper sezernieren (Gray et al., 1996, MacLennan et al., 2003). Im Gegensatz zu TD-Antigenen bewirken TI-Antigene weder Affinitätsreifung des BCR noch die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen (memory B cells). Die TI-Immunantwort, die in erster Linie von MZB-Zellen und B1-Zellen vollzogen wird, führt zu einer raschen, jedoch unspezifischen Immunantwort. In den meisten Fällen entwickelt sich gegen das anwesende Pathogen parallel eine TI- und TD-Immunantwort (Baumgarth, 2000).

1.4. Signalwege in der B-Zell-Aktivierung und Lymphomentstehung

1.4.1. Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Der B-Zell-Rezeptor- (BCR) Komplex hat sowohl bei der Bindung und Internalisierung von Antigenen, als auch bei der Signaltransduktion die zur Aktivierung, Proliferation oder Apoptose eines B-Lymphozyten führt, eine entscheidende Funktion. Der BCR besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten der Immunglobuline. Diese sind mit zwei Signal-aktiven Membranproteinen, Igα und Igβ, assoziiert, die Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (immune receptor tyrosine-based activation motifs, ITAM) aufweisen (Abbildung 3). Diese ITAM befinden sich im zytoplasmatischen Teil von Igα und Igβ und geben Signale stromabwärts (downstream) des BCR weiter. Der BCR-Komplex umfasst zudem den B-Zell-Korezeptor CD19, der zusammen mit zwei weiteren Transmembranproteinen, CD21 und CD81, auf der Oberfläche von B-Zellen mit dem BCR assoziiert (Pezzutto et al., 1987, Carter et al., 1991). CD21 bindet an Komplement-überzogene Antigene, die auch vom BCR gebunden werden können. Der Korezeptorkomplex aus CD19, CD81 und CD21 kann die Schwelle zur Aktivierung des BCR verringern.

Nach Antigen-Bindung durch den BCR transloziert dieser in Gangliosid GM_1-angereicherte Lipidflöße (Lipidrafts, LR) (Cheng et al., 1999), die so genannt werden, da sie wie Flöße auf der zweidimensionalen Zellmembran schwimmen. LR sind Cholesterin-reiche Mikrodomänen in der Zellmembran, die zusätzlich mit Sphingolipiden und Glykolipiden angereichert sind und eine Funktion bei der Membranorganisation haben (Simons und Ikonen, 1997). Nach BCR-Translokation in LR werden drei unterschiedliche Gruppen von Proteintyrosinkinasen aktiviert: (I) die Src-Familie mit Lyn, Fyn und Blk, (II) die Tyrosinkinase Syk und (III) Btk (Bruton´s tyrosine kinase). Vorab müssen inhibitorische Phosphorylierungsstellen an den Src-Kinasen durch CD45 (B220), eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, entfernt werden.

Der erste Schritt der BCR-Aktivierung ist die Phosphorylierung der ITAM durch Lyn (Kurosaki, 1999). Dies erlaubt Proteinen, die SH2 Domänen besitzen, wie z.B. Syk, an die ITAM zu binden (Rowley et al., 1995), was wiederum die Rekrutierung einer Reihe von Adaptorproteinen, wie SLP65, BCAP und Vav, sowie deren Phosphorylierung durch Syk ermöglicht (Wienands et al., 1998). Dies bewirkt stromabwärts die Aktivierung von unterschiedlichen Effektorproteinen, wie Lipid-verstoffwechselnden Enzymen (PI3K, PLCγ2), GTP-bindenden Proteinen (Rac, Ras), Ser-Thr-Kinasen (Erk, Akt, Jnk, p38, PKCs) und Phosphatasen (PTEN, SHP), wobei die feinregulierte Signaltransduktion über Rückkopplungsmechanismen schließlich beendet wird (Fu et al., 1998, Kurosaki, 1999, Rolli et al., 2002).

Über Vav wird die Signalkaskade von MEKK/p38/Jnk und über SLP65 der Adaptorkomplex aus Grb2-SOS und somit der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg aktiviert. Ferner ist BCAP an der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs über CD19 beteiligt. Syk aktiviert die Tyrosin-Kinase Btk und infolgedessen PLCγ2 (Phospholipase Cγ2) und PKC, über die der NF-κB-Signalweg aktiviert wird (Ghosh und Karin, 2002).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk (extracellular signal regulated kinase), Jnk (c-Jun N-terminal kinase) und p38 findet über die MAP-Kinase-Kaskade statt, bei der nacheinander MAP3K (MAP-Kinase-Kinase-Kinasen) sowie MAP2K (MAP-Kinase-Kinasen) aktiviert werden. Dies führt letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1, ATF1 bzw. AP-1 (Jun/Fos) im Nukleus, und zur Veränderung der Genexpression (Seger und Krebs, 1995, Pearson et al., 2001). Der NF-κB-Signalweg wird über PKC und den Komplex CARMA10/Bcl10/MALT1 aktiviert, und führt zur Translokation von NF-κB-Homo- und Heterodimeren, wie p50/p65 oder p50/c-Rel in den Zellkern, was ebenfalls die Genexpression modifiziert (Ruland et al., 2001, Ghosh und Karin, 2002, Egawa et al., 2003, Newton und Dixit, 2003). Über die PLCγ2-Aktivierung wird Calcium mobilisiert, was die Aktivierung von Calcium-abhängigen Signalkaskaden und Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK) verursacht. Die Aktivierung der Lipid-Kinase PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase), die hauptsächlich über Lyn und CD19 läuft (Li und Carter, 2000, Anzelon et al., 2003, Vigorito und Turner, 2006), führt zur Aktivierung von Akt, was wiederum die Repression des Transkriptionsfaktors FoxO1, die Hemmung der Apoptose über Bad/Bcl-$_{XL}$ und die Regulation metabolischer Enzyme, wie GSK3 und p70 (Cross et al., 1995, Dennis et al., 2001, Gingras et al., 2001), bewirkt.

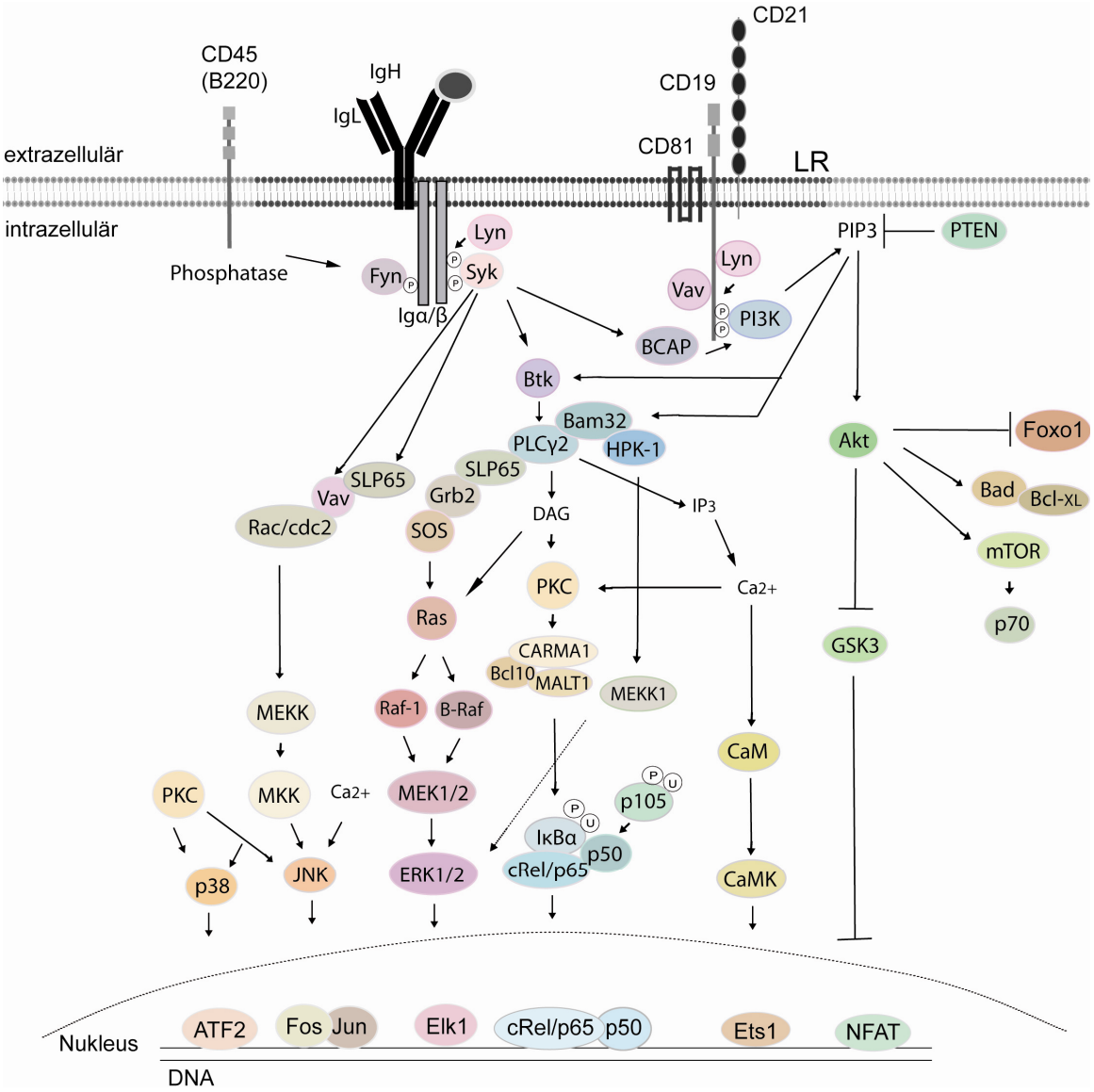


Abbildung 3 Vereinfachte schematische Darstellung des B-Zell-Rezeptors (BCR) und seiner induzierten Signalwege (modifiziert nach Dal Porto et al., 2004). Der BCR besteht aus einem Oberflächenimmunglobulin, das mit den signalweitergebenden Igα- und Igβ-Domänen assoziiert ist. Zudem ist er mit einem Korezeptorkomplex, bestehend aus CD19, CD81 und CD21, verbunden und transloziert nach Antigenbindung in Lipid-rafts (LR). CD45 (B220) dephosphoryliert nach Antigenbindung durch den BCR die Src-Kinasen Fyn und rekrutiertes Lyn. Die Rekrutierung von Lyn wird durch CD19 unterstützt. ITAM werden dann von Lyn phosphoryliert und anschließend wird Syk rekrutiert. Die MAP-Kinasen p38, Jnk und Erk aktivieren Transkriptionsfaktoren und ändern somit die Genexpression. PI3K wird vor allem über CD19 aktiviert und synthetisiert PIP3, was wiederum zur Aktivierung von Akt, Btk und PLCγ2 führt. PLCγ2 erzeugt IP3 und DAG aus PIP3. IP3 verursacht die Freisetzung von Ca2+ aus dem endoplasmatischen Retikulum. DAG und freies Ca2+ aktivieren PKC, letzteres bindet an CaM und bewirkt somit die Aktivierung von CaMK. PKC aktiviert den NF-κB-Weg über Bcl10/CARMA10/MALT1. Bam32 ist ein Adaptorprotein, das PI3K mit PLCγ2 verbindet und HPK-1 aktiviert. Akt aktiviert mTOR, Bcl-xL und hemmt GSK3 und FoxO1. Ig (Immunglobulin), H (schwere Kette), L (leichte Kette), BCAP (B cell adaptor for PI3K), Btk (Bruton's Tyrosinkinase), PIP3 (Phosphatidylinositol-trisphosphat), DAG (Diacylglycerol), IP3 (Inositol-Trisphosphat), PKC (Proteinkinase C), CaM (Calmodulin), CaMK (Calmodulin-abhängige Kinase), GSK3 (Glycogen-Synthase Kinase 3), HPK-1 (hematopoetic progenitor kinase 1), Pten (phosphatase with tensin homology), mTOR (mammalian target of rapamycin), FoxO1 (Forkhead familiy of transcription factors 1), P (Phosphorylierung), U (Ubiquitinierung).

In B-Zellen ist der NF-κB-Signalweg an Signalen der angeborenen sowie der adaptiven Immunantwort und Immunregulation beteiligt. Der PI3K/Akt-Weg ist für Überlebens- sowie Aktivierungssignale in B-Zellen wichtig (Srinivasan et al., 2009). CD19 kann hierbei Signale ausgehend vom BCR verstärken. Neuerdings wurde zudem PI3K als Schlüsselmediator von tonischen BCR-Signalen identifiziert (Srinivasan et al., 2009). Die MAP-Kinasen p38 und JNK sind an der Verarbeitung von Stress- sowie Entzündungssignalen beteiligt. Erk ist vor allem entscheidend für Proliferation und Differenzierung, aber auch für die Aktivierung von B-Zellen. Welche Signalwege in welcher Intensität durch den BCR angeschaltet werden, bestimmt die Qualität und Quantität des Signals, und somit was mit der B-Zelle geschieht (Kurosaki, 1999).

1.4.2. Der CD40-Rezeptor-Signalweg

CD40 ist ein Transmembran-Glykoprotein vom Typ I und Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) Familie. Die Bindung von aktivierten $CD4^+$ T_H-Zellen mittels ihres CD40- Liganden (CD40L, CD154) an den CD40-Rezeptor auf B-Zellen führt zum clustering von CD40 und zur Rekrutierung verschiedener signalaktiver Adaptorproteine (Abbildung 4), der sogenannten TNFR-assoziierten Faktoren (TRAF) (van Kooten und Banchereau, 2000). Die TRAF-Familie weist sechs Mitglieder auf, TRAF1-6, die, abgesehen von TRAF4, die Signale von CD40 an unterschiedliche Signalwege weitergeben. TRAF-Proteine geben durch Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne des CD40-Rezeptors das Signal ans Zellinnere weiter, wobei sie vor allem die Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF-κB-Signalwegs sowie die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, Erk und Jnk und ferner PI3K und PLCγ2 verursachen (Harnett, 2004). Zudem wird die JAK-STAT (Janus-activated kinase- signal transducer and activator of transcription) Signalkaskade auf eine TRAF-unabhängige Weise aktiviert (Hanissian und Geha, 1997). Die Aktivierung des Erk-Signalwegs geschieht vermutlich entweder über einen Ras-abhängigen oder über einen durch TRAF6 vermittelten Ras-unabhängigen Weg (Kashiwada et al., 1998).

Zunächst wurde eine Oberflächenexpression von CD40 auf B-Lymphozyten beschrieben, konnte jedoch inzwischen auch auf Monozyten, dendritischen Zellen, Thrombozyten und sogar auf nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Endothel- oder Epithelzellen, festgestellt werden (van Kooten und Banchereau, 2000, Hassan et al., 2009, Sowa et al., 2009). CD40 hat eine kostimulatorische Funktion während verschiedener Prozesse der B-Zell-Entwicklung und

–Aktivierung (Banchereau et al., 1994, van Kooten und Banchereau, 2000, Elgueta et al., 2009). Die Stimulation von B-Zellen in vitro über den CD40-Rezeptor bewirkt die Proliferation sowie ein verbessertes Überleben und die Expression von Aktivierungsmarkern, wie ICAM, CD80, CD86 und CD95 auf ihrer Oberfläche (Dallman et al., 2003, Harnett, 2004). Des Weiteren bewirkt die CD40-Signaltransduktion in vivo die Reifung von B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen (Hu et al., 1997). In vivo spielt CD40 eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort (TD) (van Kooten und Banchereau, 2000). Dabei ist die Interaktion von CD40 und seinem Liganden von wesentlicher Bedeutung. Dies konnte in der Vergangenheit anhand von Patienten mit dem „X-abhängigen Hyper-IgM-Syndrom“ gezeigt werden.

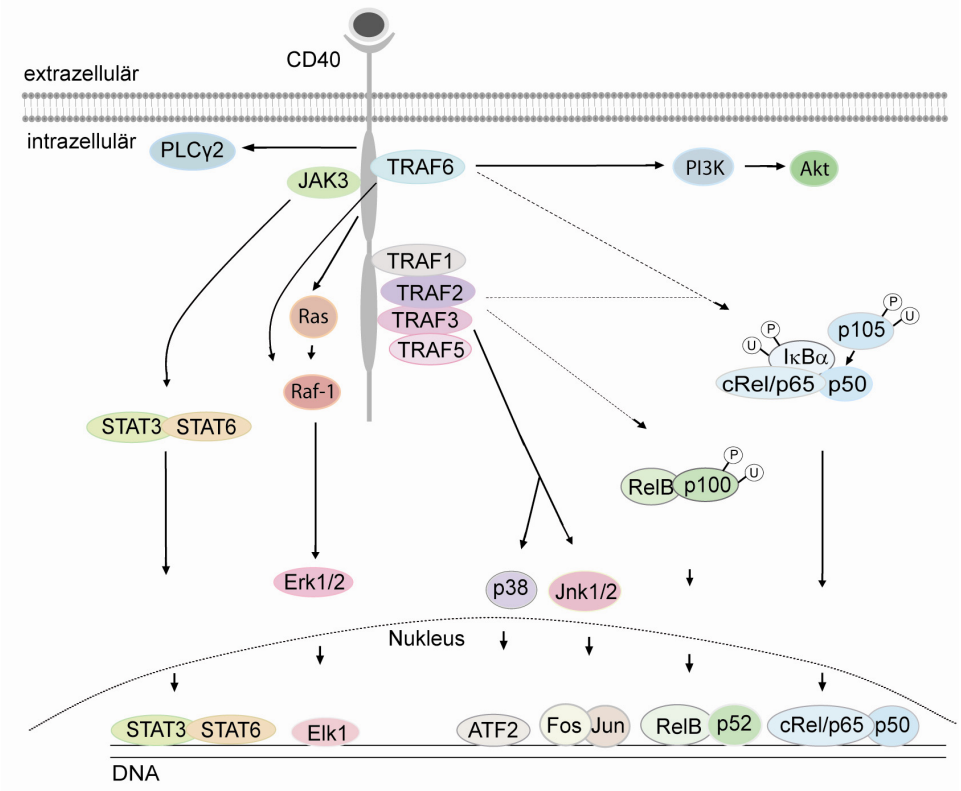


Abbildung 4 Vereinfachte schematische Darstellung des CD40-Rezeptors und seiner induzierten Signalwege (modifiziert nach Kashiwada et al., 1998, van Kooten und Banchereau, 2000, Elgueta et al., 2009). Nach Bindung von CD40 durch seinen Liganden werden die TRAFs 1, 2, 3, 5, 6 und JAK3 an die zytoplasmatische Domäne dieses Rezeptors rekrutiert, was letztendlich zur Aktivierung der MAP-Kinase Signalwege Erk, Jnk und p38 sowie des NF-κB-Wegs, PI3K-, des JAK-STAT- und des PLCγ2-Signalwegs führt. Die Aktivierung des Erk-Signalwegs kann entweder TRAF-unabhängig über Ras oder vermittelt durch TRAF6, Ras-unabhängig, erfolgen; gestrichelte Linien: Signal erfolgt über weitere, hier nicht aufgeführt Signalmediatoren. TRAF (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor), JAK (Janus-Kinase), IκBα (Inhibitor von κBα), Ub (Ubiquitin), P (Phosphorylierung), PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase), PLCγ2 (Phospholipase-Cγ2) STAT (signal transducer and activator of transcription), Jnk (c-Jun N-terminale kinase), Erk (extracellular signal regulated kinase).

Diese Patienten leiden unter einem Mangel an IgG-, IgE- und IgA-Antikörpern sowie reduzierten Gedächtnis B-Zellen und weisen häufig Mutationen im *CD40L*-Gen auf (DiSanto et al., 1993, Korthauer et al., 1993).

1.5. Raf-Kinasen und ihre Funktionen

1.5.1. Die Familie der Raf-Kinasen

Die Familie der Serin/Threonin-Kinasen Raf (rapidly growing fibrosarcoma; schnell wachsendes Fibrosarkom) besteht aus drei Homologen: A-Raf (M_w 68 kDa), B-Raf (M_w 86 kDa) und Raf-1 (M_w 72-74 kDa), auch c-Raf genannt, die von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Identifiziert wurde Raf vor mehr als 20 Jahren als transformierendes zelluläres Onkogen aus Retroviren (Rapp et al., 1983, Jansen et al., 1984, Moelling et al., 1984). Die drei Homologen A-Raf, B-Raf und Raf-1 werden von verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Stärken exprimiert.

B-Raf stellt wahrscheinlich das „ursprünglichere“ *Raf*-Gen in Wirbeltieren dar, da bei dieser Kinase eine höhere Sequenzhomologie zu invertebraten *Raf*-Genen besteht als bei A-Raf und Raf-1 (Brummer et al., 2002). Säugetiere besitzen neben den drei verschiedenen Raf-Paralogen zwei *Raf*-Pseudogene (Hagemann und Rapp, 1999). *Caenorhabditis* und *Drosophila* besitzen dagegen nur ein *Raf*-Gen (Hagemann und Rapp, 1999). Die Paraloge Raf-1 und B-Raf sind vermutlich durch Genduplikation sehr früh in der Evolution der Wirbeltiere entstanden, da bei Vögeln, Amphibien und Knochenfischen bisher nur Orthologe von Raf-1 und B-Raf, jedoch nicht von A-Raf nachgewiesen wurden (Koenen et al., 1988, Calogeraki et al., 1993, Brummer et al., 2002). In Säugetieren wird B-Raf in Geweben, die aus dem Neurektoderm entstehen, hämatopoetischen Zellen sowie den Hoden exprimiert (Eychene et al., 1995); Raf-1 wird hingegen ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Storm et al., 1990). A-Raf konnte in urogenitalem Gewebe, im Darm, im Thymus und in der Milz nachgewiesen werden (Huleihel et al., 1986, Storm et al., 1990, Luckett et al., 2000).

Alle drei Raf-Kinasen besitzen eine sehr ähnliche Struktur, mit drei verschiedenen hochkonservierten Regionen (*highly conserved regions*; CRs) (Abbildung 5). Die N-terminale Region CR1 beinhaltet die Ras-bindende Domäne (RBD), in der die Interaktion zwischen Raf und RasGTP beginnt sowie eine Cystein-reiche Domäne (CRD), die ebenfalls in die Ras-Bindung involviert ist, aber auch die Interaktion mit Phospholipiden vermittelt (Kolch, 2000). CR2 weist potentielle regulatorische Aminosäuren auf, die durch Kinasen phosphoryliert

und/oder von Phosphatasen dephosphoryliert werden können. Die CR3-Domäne beinhaltet die Kinaseregion des Moleküls und somit die katalytische Domäne. Außerdem liegen in CR3 weitere regulatorische Aminosäuren (Chong et al., 2001).

Die Aktivierung der Raf-Kinasen erfolgt schrittweise. Raf-1 weist die höchste Aktivierung nach Phosphorylierung der Aminosäuren S338 und Y341 auf; A-Raf wird an S299 phosphoryliert und somit aktiviert (Baljuls et al., 2007, Baljuls et al., 2008). Im Fall von B-Raf ist die Aminosäure S445, welche Serin 338 in Raf-1 entspricht, konstitutiv phosphoryliert und ein negativ geladener Aspartatrest ist anstelle des Tyrosins 341 in B-Raf zu finden (Mason et al., 1999, Chong et al., 2001). B-Raf wird zudem an Thr598/Ser601 phosphoryliert (Zhang und Guan, 2000).

Für die vollständige Aktivierung von Raf wird die Aktivierung durch RasGTP und Src-Kinasen benötigt, wobei B-Raf lediglich mit Hilfe von RasGTP aktiviert wird (Marais et al., 1995, Marais et al., 1997). Die MAP2K MEK war einige Zeit lang das einzige bekannte Substrat von Raf. A-Raf, B-Raf und Raf-1 aktivieren MEK (Mason et al., 1999, Emuss et al., 2005) und somit den Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg in vitro unterschiedlich stark (Pritchard et al., 1995).

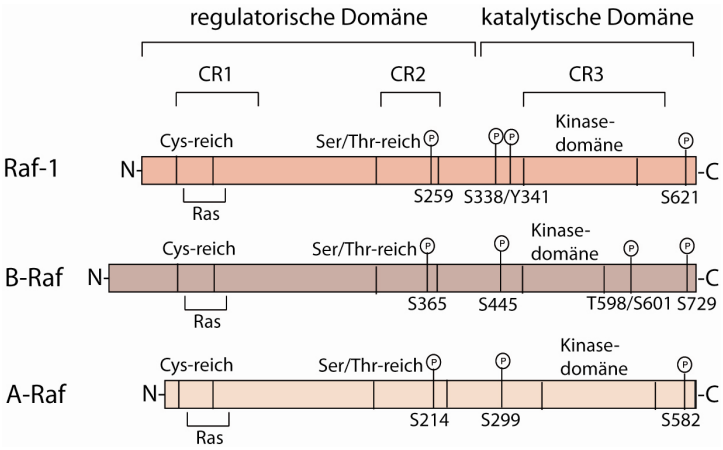


Abbildung 5 Primäre Struktur der Raf-Kinasen (modifiziert nach Kolch, 2005, Roskoski, 2010)**.** Raf-Kinasen weisen drei konservierte Regionen auf: CR1, eine Cystein-reiche Domäne, die die Ras-bindende Domäne enthält und auch mit Membranlipiden interagiert; CR2, eine Serin-Threonin-reiche Domäne, mit inhibitorischen Phosphorylierungsstellen; CR3, die Kinase-Domäne, die MEK binden kann; S338/S445/S299: aktivierende Phosphorylierungsstellen. N: Aminoterminal, C: Carboxyterminal; P: Phosphat.

Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg ist ein hoch konservierter Signalweg, dessen Aktivierung in zahlreichen physiologischen Veränderungen resultiert. Abhängig vom Zelltyp oder Stimulus spielt dieser Signalweg in verschiedenen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Proliferation, Überleben und Apoptose eine Rolle und ist für die Karzinogenese entscheidend (Chong et al., 2003, O'Neill und Kolch, 2004, Wellbrock et al., 2004, McCubrey et al., 2007).

So wurde in nahezu 30 % aller Krebsarten der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg als hyperaktiviert beschrieben (Wan et al., 2004, McCubrey et al., 2007, Weinberg, 2007). In menschlichen Tumoren wurden bisher vor allem Mutationen in *B-Raf* und weniger in *Raf-1* oder *A-Raf* festgestellt. Aktivierende Mutationen von *B-Raf* wurden unter anderem in Kolon-, Schilddrüsen-, Eierstockkrebs und vor allem in Melanomen gefunden (Mercer und Pritchard, 2003, Garnett und Marais, 2004). So konnten in 66 % der bösartigen Melanome aktivierende Mutationen (gain of fuction mutations) im *B-Raf*-Gen nachgewiesen werden (Davies et al., 2002). Aktivierende Mutationen in *Ras* und *B-Raf* konnten auch in Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen identifiziert werden (Radich et al., 1990, Smith et al., 2003, Lee et al., 2004), jedoch ist deren Beitrag zur Tumorentstehung noch unklar. Zusätzlich zu ihrer Rolle als Kinasen im Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg besitzen beispielsweise Raf-1 und B-Raf antiapoptotische Funktionen (Wojnowski et al., 1997, Wojnowski et al., 1998, Wojnowski et al., 2000, Mikula et al., 2001, Yamaguchi et al., 2004).

Raf-Kinasen sind auch als therapeutisches Ziel von großem Interesse. Inzwischen wurden zahlreiche chemische Inhibitoren (small molecules) für Raf-Kinasen entwickelt, die in der Therapie von verschiedenen Krebsarten erfolgreich angewendet werden (Beeram et al., 2003, Sridhar et al., 2005, McCubrey et al., 2009).

1.5.2. Raf-defiziente Mäuse

Ein Hinweis auf die Funktionen der Raf-Kinasen in den unterschiedlichsten Geweben konnte anhand von Raf-defizienten Mäusen gewonnen werden. Obwohl Raf-Kinasen auf den ersten Blick bei in vitro Versuchen möglicherweise redundant wirken (Hagemann und Rapp, 1999), zeigen die unterschiedlichen Phänotypen der einzelnen Raf-Kinase-defizienten Mäuse, dass sie unterschiedliche Funktionen haben. In Raf-1-defizienten Mäusen wurden lethale multiple Organfehlbildungen, wie der Plazenta, der Leber und der hämatopoetischen Organe beschrieben (Huser et al., 2001, Mikula et al., 2001). Diese Studien zeigten auch, dass Raf-1 für die Aktivierung von Erk im frühen Embryo und für die Differenzierung von Erythrozyten zuständig ist (Huser et al., 2001, Mikula et al., 2001). Eine B-Raf-Defizienz verursachte neuronale und vaskuläre Defekte in Mäusen, die noch vor der Geburt zum Tode führten (Wojnowski et al., 1997, Wiese et al., 2001). Massive Einblutungen in verschiedene Körperhöhlen, die durch Apoptose von differenzierten Endothelzellen verursacht wurden, führten zum Tode der Mausembryonen (Wojnowski et al., 1997, Wojnowski et al., 1998,

Wojnowski et al., 2000). Zudem traten in B-Raf defizienten Embryonen massive neuronale Defekte auf (Wiese et al., 2001). B-Raf ist außerdem für die Entwicklung der Plazenta notwendig, und fungiert hier als Hauptaktivator von MEK und Erk (Galabova-Kovacs et al., 2006). A-Raf-defiziente Mäuse starben erst einige Tage nach der Geburt (Pritchard et al., 1996). Dabei litten sie an neuronalen und intestinalen Fehlbildungen. Der Phänotyp von Raf-1/B-Raf-doppelt-defizienten Mausembryonen ist hingegen drastischer als der Phänotyp der einzel-defizienten Mäuse. Diese Tiere entwickelten sich nur bis zum Gastrula-Stadium (Wojnowski et al., 2000). Raf-1/A-Raf-doppelt-defiziente Mausembryonen starben während der Embryonalentwicklung und waren in ihrer Größe stark reduziert (Mercer et al., 2005).
Beim Menschen führen Mutationen in Komponenten des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs zu einer relativ häufigen, klinisch variablen Entwicklungsstörung, die sich beispielsweise durch reduziertes Wachstum nach der Geburt, Herzfehlbildungen und kognitive Defizienzen (Noonan Syndrom, NS) auszeichnet. NS Patienten haben außerdem eine Prädisposition zu hämatologischen bösartigen Veränderungen während der Kindheit. Diese Entwicklungsstörung basiert vor allem auf Mutationen in den *KRAS-, RAF-1-, BRAF-* und *MEK1*-Genen (Aoki et al., 2008, Jorge et al., 2009).

1.5.3. Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg

Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg verbindet Signale von Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression regulieren. Dieser Signalweg ist bei Prozessen wie Differenzierung, Wachstum, Proliferation, Stoffwechsel und Apoptose involviert. Zudem ist die Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade in bestimmten Tumoren durch chromosomale Translokationen, wie BCR-ABL, Mutationen an Zytokin- oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie EGFR (epidermal growth factor receptor), oder eine Überexpression solcher Rezeptoren hyperaktiviert (McCubrey et al., 2007).
Zunächst führt beispielsweise die Bindung eines Wachstumsfaktors, wie EGF (epidermal growth factor), an seinen Rezeptor zur Phosphorylierung und Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die den Rezeptor an intrazellulären Domänen phosphorylieren (Abbildung 6). Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung des Adaptorkomplexes Shc-Grb2-SOS, der als Guanin-Austauschfaktor (guanine exchange factor, GEF) fungiert und bei GDP-gebundenem Ras GDP gegen GTP austauscht. Die meisten Membranrezeptoren aktivieren RasGTPasen, die eine große Familie von membrangebundenen Proteinen darstellen, die zwischen einer

GTP-gebundenen aktiven und einer GDP-gebundenen inaktiven Konformation wechseln (Colicelli, 2004). RasGTP kann über unterschiedliche Wege den Ras-Raf-MEK-Erk- und auch den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren. Aktives Ras initiiert die Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade, indem es Raf-Kinasen aus dem Zytosol an die Zellmembran rekrutiert, wo diese durch Src-Kinasen an Aktivierungsstellen phosphoryliert und an inhibitorischen Phosphorylierungsstellen durch Phosphatasen, wie PP2A, dephosphoryliert werden (Gold, 2000, Dhillon und Kolch, 2002, Chong et al., 2003, Wellbrock et al., 2004).

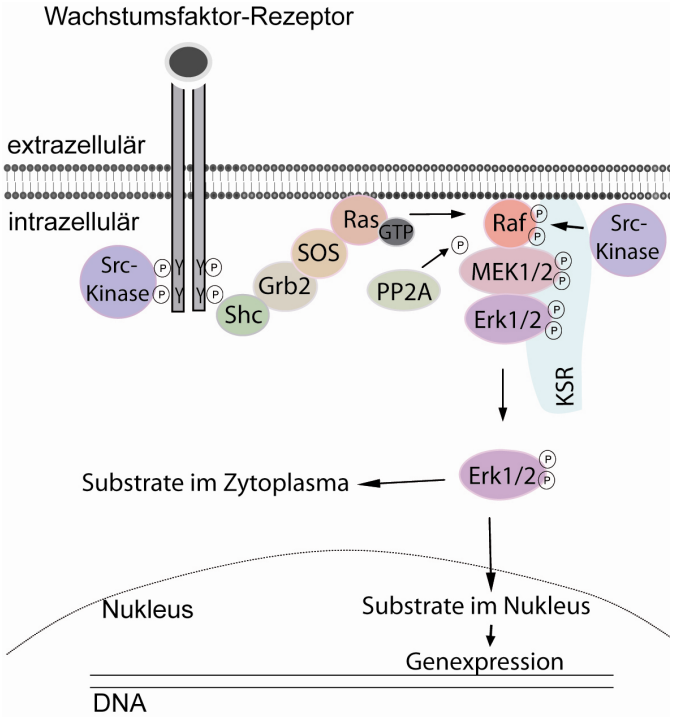


Abbildung 6 Vereinfachte schematische Darstellung des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs (modifiziert nach Kolch, 2000, Leicht et al., 2007, McCubrey et al., 2007). Nach Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor wird die Aktivierung des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs initiiert, indem der Adaptorproteinkomplex Shc/Grb2/SOS inaktives GDP gegen GTP bei Ras austauscht und die Aktivierung von Src-Kinase stattfindet. RasGTP kann anschließend Raf an die Zellmembran rekrutieren, wo es von RasGTP und Src-Kinasen aktiviert wird. Die Familie der Raf-Kinasen besteht aus A-Raf, B-Raf und Raf-1, auch c-Raf genannt. Alle drei Raf-Kinasen werden von Phosphatasen, wie PP2A an inhibitorischen Stellen dephosphoryliert und können Homo- oder Heterodimere bilden, was ebenfalls ihren Aktivierungszustand beeinflussen kann. Aktive Raf-Kinasen phosphorylieren dann MEK1/2, und diese anschließend Erk1/2, die dann im Zellkern Veränderungen der Genexpression bewirken. KSR (kinase suppressor of Ras), ein scaffolding Protein, stellt für die Signalweiterleitung von Raf an Erk ein Gerüst dar. P: Phosphat.

Die Aktivierung der Raf-Kinasen (B-Raf, Raf-1 und A-Raf) findet über eine Serie komplexer Vorgänge statt, wie (I) Rekrutierung an die Plasmamembran über Ras (Yan et al., 1998), (II) Dimerisierung (Luo et al., 1996), (III) Phosphorylierung und Dephosphorylierung an

verschiedenen Domänen (Fabian et al., 1993), (IV) Dissoziierung des Raf-Kinase inhibitorischen Proteins (RKIP) (Yeung et al., 1999, Dhillon und Kolch, 2002) und (V) Assoziierung mit scaffolding Proteinen (Lee und McCubrey, 2002, Chang et al., 2003, Kolch, 2005), wie KSR (Kinase suppressor of Ras).

Raf-Proteine wirken als Homo- und Heterodimere mit unterschiedlicher Kinaseaktivität (Weber et al., 2001, Garnett et al., 2005, Rushworth et al., 2006). Aktiviertes Raf bindet und aktiviert anschließend MEK1/2 (Mitogen aktivierte Protein Kinase/Erk Kinase) (Alessi et al., 1994), die sich in einem Komplex mit Erk1/2, den letzten Gliedern der Kaskade, befinden. Alle drei Familienmitglieder von Raf sind in der Lage MEK1/2 zu aktivieren, jedoch weisen sie sehr unterschiedliche biochemische „Stärken“ auf: B-Raf >> Raf-1 >> A-Raf (Kolch et al., 1990, Alessi et al., 1994). Aktives MEK phosphoryliert anschließend Erk1/2, zwei Serin/Threonin-Kinasen. Erk besitzt eine sehr große Anzahl von Effektormolekülen: mehr als 180 (Gold, 2008). Unter anderem phosphoryliert Erk Bim, Zyklin D3 und drei Transkriptionsfaktoren, c-Myc, CREB und Elk, die wiederum die Expression von anderen Transkriptionsfaktoren verursachen (Gold, 2008). Nach Aktivierung sorgen diese Effektoren in unterschiedlichen Kombinationen für die Abwicklung einer Vielzahl von zellulären Programmen, wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Stoffwechselaktivierung und Wachstum (Niault und Baccarini, 2010).

1.5.4. Die Rolle von Raf in B-Lymphozyten

In B-Zellen wird der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg über den BCR und über CD40 aktiviert (Tordai et al., 1994, Li und Carter, 1998, Purkerson und Parker, 1998) und reguliert Prozesse wie Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten. Über die genaue Funktion von B-Raf, Raf-1 und A-Raf bei der B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung ist jedoch noch nicht viel bekannt.

Mäuse, die B-Zell-spezifisch eine dominant-negative Form von Ras (RasDN) exprimieren, zeigten einen Differenzierungsblock vom Pro- zum Prä-B-Zell-Stadium. Dieser Differenzierungsblock konnte durch das Einkreuzen eines Mausstamms mit einer konstitutiv-aktiven Form von Raf-1 (Raf-1-CA) wieder aufgehoben werden (Iritani et al., 1997), das heißt RasDN, die Raf-1-CA exprimierten, zeigten eine normale B-Zell-Entwicklung. In späteren Studien führte die Expression von Raf-1-CA außerdem zu einer normalen Proliferation und Differenzierung von B-Zellen mit einer Deletion des Prä-BCR (Iritani et al., 1999). Darüber

hinaus konnte nach BCR-Bindung die Phosphorylierung und Aktivierung von Raf-1, eine darauffolgende Erk-Aktivierung und die Transkription der unmittelbar frühen (immediate early) Gene *Egr-1* und *c-Fos* in B-Zellen festgestellt werden (Tordai et al., 1994, Gold, 2000). Das bedeutet, dass Raf-1 bei der BCR-induzierten Erk-Aktivierung möglicherweise involviert ist. Bei DT40-Zellen, einer Lymphomzelllinie aus dem Huhn, konnte zudem beobachtet werden, dass Erk nach gleichzeitiger Deletion von Raf-1 und B-Raf nicht mehr über den BCR aktivierbar war. Interessanterweise ließen sich bei diesen Experimenten Raf-1-defiziente DT40-Zellen vergleichbar wie Kontroll-Zellen, B-Raf-defiziente Zellen dagegen geringfügig schwächer stimulieren (Brummer et al., 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass B-Raf für die Aktivierung von MEK und somit Erk in B-Zellen verantwortlich ist (Li und Carter, 1998, Purkerson und Parker, 1998) und Raf-1 dabei wohl nur eine untergeordnete Rolle spielt (Brummer et al., 2002).

BCR- und CD40-Signale kooperieren bei der B-Zell-Aktivierung, was sich unter anderem in einer stärkeren Aktivierung des Erk-Signalwegs widerspiegelt. Die Signalweiterleitung in B-Zellen ausgehend von CD40 findet sowohl über einen Ras-unabhängigen Weg über TRAF6 und Raf-1, als auch über einen Ras-abhängigen Weg, ebenfalls über Raf-1, statt (Kashiwada et al., 1998). Neuere Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulation von B-Zellen über CD40 die Phosphorylierung von Raf-1 und Erk zur Folge hat, welche nach zusätzlicher BCR-Stimulation noch verstärkt wird (Mizuno und Rothstein, 2005). Die Aktivierung von Erk war bei diesen Experimenten jedoch Raf-1 unabhängig. Welche Rolle A-Raf bei der B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung spielt, ist noch unbekannt.

A-Raf gilt als die schwächste Kinase der Raf-Familie (Kolch et al., 1990, Huser et al., 2001) und es wird deshalb bisher vermutet, dass sie keine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs und somit bei der B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung hat.

1.6. Modellsysteme

1.6.1. Die konditionalen Raf-1- und B-Raf-defizienten Mausstämme

Zur Analyse der Rolle von Raf-1 und B-Raf während der B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung wurde ein Mausstamm (c-raf-$1^{fl/fl}$) verwendet, bei dem das dritte Exon des *Raf-1*-Gens (Ras-bindende Domäne) mit loxP-Stellen (locus of crossing over, x) flankiert ist (Jesenberger et al., 2001) sowie ein weiterer Mausstamm (B-$Raf^{fl/fl}$), bei dem das Exon 12 (Kinase-Domäne) des *B-Raf*-Gens von loxP-Stellen flankiert ist (Chen et al., 2006). Diese Mausstämme wurden

jeweils mit Mb1-cre Mäusen (Hobeika et al., 2006) gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Igα-Lokus (Mb1) exprimieren (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre, Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre, B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre). Auf diese Weise wurde ein B-Zell-spezifischer Knockout dieser Gene ab dem frühen Pro-B-Zell-Stadium erzielt. Die Deletion des Exon 3 im *Raf-1*-Gen und des Exon 12 im *B-Raf*-Gen resultieren jeweils in einer Leserasterverschiebung, die dazu führt, dass Raf-1, B-Raf bzw. beide Kinasen nicht exprimiert werden.

1.6.2. Der LMP1/CD40-transgene Mausstamm

In dieser Arbeit wurde der LMP1/CD40-Mausstamm verwendet, um die Rolle der Raf-Kinasen in einem konstitutiv aktivierten Erk-Signalweg zu untersuchen.

Um die Auswirkungen eines CD40-Signals in B-Zellen zu definieren, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein konditionaler transgener Mausstamm generiert (Homig-Holzel et al., 2008), der die zelltyp-spezifische Expression eines konstitutiv aktiven CD40-Rezeptors erlaubt. Die konstitutive Aktivität von CD40 wurde durch eine Fusion des transmembranen Teils von LMP1 des Epstein-Barr-Virus und des signalaktiven Teils von CD40 erreicht. Das *LMP1/CD40*-Gen wurde in den ubiquitär aktiven *Rosa26*-Lokus inseriert. Um die Expression auf B-Zellen zu beschränken, wurde vor den kodierenden Teil eine mit loxP-Stellen flankierte STOPP-Kassette inseriert. Die B-Zell-spezifische Expression des Transgens wurde durch Einkreuzen von CD19-cre Mäusen erreicht. In dem CD19-cre Mausstamm (Rickert et al., 1997) befindet sich die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD19-Promotors im *Cd19*-Lokus (C57BL/6). Die Cre-Insertion führt zur Zerstörung des *Cd19*-Gens. Folgende Mausstämme wurden analysiert (I) LMP1/CD40//CD19cre$^{+/+}$ Mäuse: Es wird nur LMP1/CD40, aber nicht CD19 exprimiert, da in beiden CD19-Allelen die Rekombinase Cre inseriert ist; (II) LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ Mäuse: Sowohl LMP1/CD40 als auch CD19 werden exprimiert. (III) CD19cre$^{+/-}$ Mäuse: Es wird lediglich die Cre-Rekombinase exprimiert. (IV) CD19cre$^{+/+}$ Mäuse: beide *Cd19*-Allele sind zerstört.

B-Zell-spezifisch LMP1/CD40-exprimierende Mäuse (LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$) weisen eine aberrante B-Zell-Expansion und eine konstitutive Aktivierung von Erk in B-Zellen auf, was später dazu führt, dass sie B-Zell-Lymphome entwickeln.

2 Fragestellung

Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg wird von einer Vielzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktiviert und steuert viele zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Wachstum und Apoptose. Die Deregulation des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs korreliert mit Entwicklungsstörungen und Tumorentstehung. Dabei zeigen 30 % aller menschlichen Tumoren eine Hyperaktivierung der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade. Über die Rolle von Raf bei der Entstehung von B-Zell-Lymphomen oder Leukämien und der normalen B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung ist jedoch nur wenig bekannt.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Funktion von Raf bei der B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung aufzuklären sowie einen Hinweis auf dessen Beitrag bei der B-Zell-Lymphomentstehung zu erhalten.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile:

Im ersten Teil sollte die Funktion von Raf-Kinasen in der normalen B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung in Mäusen untersucht werden. Dazu sollten konditionale Raf-1- und B-Raf-Knockout-Mäuse untersucht werden. Um zu analysieren, ob die beiden Kinasen in B-Zellen redundant wirken, sollten außerdem B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse untersucht werden. Um eine B-Zell-spezifische Deletion von Raf-1, B-Raf oder beiden Kinasen ab dem frühen Pro-B-Zell-Stadium zu erhalten, wurden Raf-$1^{fl/fl}$, B-$Raf^{fl/fl}$ und B-$Raf^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$ mit Mb1-Cre-Mäusen verpaart. In diesen Mäusen sollte die B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung sowie die Proliferation und das Überleben der B-Zellen in vitro und in vivo und die Immunantwort bei Abwesenheit von B-Raf, Raf-1 und B-Raf/Raf-1 untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle von Raf in der LMP1/CD40-vermittelten, konstitutiven Aktivierung des Erk-Signalwegs in B-Zellen analysiert werden, die zu einer B-Zell-Expansion und später zur Lymphomentstehung in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen führt. Es sollte untersucht werden, ob eine der Raf-Kinasen für die aberrante Erk-Aktivierung in LMP1/CD40-Zellen verantwortlich ist. Hierzu sollten zunächst chemische Inhibitoren, die gegen die unterschiedlichen Raf-Paraloge gerichtet sind, Hinweise dafür geben, welche Raf-Kinase für die Signalweiterleitung in diesen B-Zellen verantwortlich ist. Falls einer der Inhibitoren die Aktivierung des Erk-Signalwegs hemmt, sollte das entsprechende Raf-Paralog in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen genetisch inaktiviert werden.

3 Ergebnisse

3.1. Die Rolle der Raf-Kinasen bei der Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen

3.1.1. Murine B-Zellen exprimieren A-Raf, B-Raf und Raf-1

Die Familie der Serin/Threonin-Kinasen Raf besteht aus drei Homologen: B-Raf, Raf-1 und A-Raf. Alle drei Raf-Kinasen werden von Säugetieren exprimiert, jedoch unterscheidet sich deren Expression je nach Gewebe. Bisher wurde die Expression von B-Raf und Raf-1 in DT40-Zellen, einer Lymphom-Zelllinie aus dem Huhn, beschrieben (Brummer et al., 2002). A-Raf wird allgemein von Vögeln nicht exprimiert (Koenen et al., 1988, Calogeraki et al., 1993, Brummer et al., 2002). Um zu untersuchen, welche der Raf-Paraloge in reifen B-Zellen der Maus exprimiert werden, wurden reife B-Zellen aus der Milz von Wildtyp-Mäusen auf die Expression von B-Raf, Raf-1 und A-Raf getestet. Reife B-Zellen ($B220^{+}CD43^{-}$) aus der Milz wurden mittels „Magnetic Assisted Cell Sorting“ (MACS) isoliert und deren Reinheit durchflusszytometrisch überprüft (siehe 7. Material und Methoden). Der Western-Blot in Abbildung 7 zeigt, dass B-Zellen aus der Maus alle drei Raf-Kinasen exprimieren. DT40-Zellen exprimieren nur B-Raf und Raf-1.

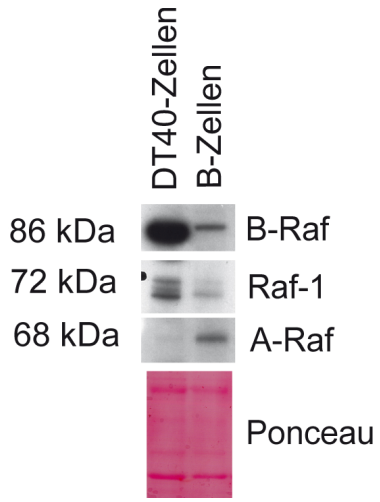


Abbildung 7 Reife B-Zellen aus der Maus exprimieren alle drei Raf-Paraloge: Raf-1, B-Raf und A-Raf. Dargestellt ist ein Western-Blot von Proteinextrakten aus DT40-Zellen und Wildtyp-B-Zellen, der zeigt, dass reife B-Zellen aus der Maus alle drei Raf-Paraloge, B-Raf, Raf-1 und A-Raf, exprimieren, wogegen die B-Zelllinie DT40 aus dem Huhn nur B-Raf und Raf-1 exprimiert. Als Ladekontrolle diente eine Ponceau-Färbung der Membran. Für die Detektion der Raf-Kinasen wurden folgende spezifische Antikörper verwendet: B-Raf C19 (Santa Cruz), Raf-1 (Cell Signaling) und A-Raf (Cell Signaling). Laut Herstellerangaben kreuzreagieren die B-Raf- und Raf-1-spezifischen Antikörper mit den in Vögeln exprimierten B-Raf- und Raf-1-Kinasen. Dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt. Die Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert.

Die hier verwendeten Antikörper waren gegen die humane und murine Form der Raf-Kinasen spezifisch. Der B-Raf-spezifische Antikörper (B-Raf C19, Santa Cruz) reagiert gegen die in Vögeln exprimierte B-Raf-Kinase. Laut persönlicher Mitteilung des Herstellers des Raf-1 spezifischen Antikörpers (Cell Signaling) detektiert dieser ebenfalls die Raf-1-Form der Vögel. Somit konnten die hier verwendeten B-Raf- und Raf-1-spezifischen Antikörper für die Detektion der B-Raf- und Raf-1-Proteine in B-Zellen aus der Maus und DT40-Zellen angewendet werden.

3.1.2. B-Zell-spezifische Deletion von B-Raf und Raf-1

Um den Einfluss von Raf-1 und B-Raf auf die B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung zu untersuchen, wurden B-Raf und Raf-1 B-Zell-spezifisch deletiert. Dazu wurden konditionale B-Raf$^{fl/fl}$-, Raf-1$^{fl/fl}$- und B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$-Mäuse mit Mb1-Cre$^{+/-}$ Mäusen (Hobeika et al., 2006) (im folgenden Mb1-Cre Mäuse genannt) verpaart. In Mb1-Cre Mäusen ist die Cre-Rekombinase in eines der beiden Allele von Igα, einer B-Zell-Rezeptor-Komponente, integriert, was zur Expression der Cre-Rekombinase ab dem frühen Pro-B-Zell-Stadium und dementsprechend zur Deletion der loxP-flankierten Exons der Allele von Raf-1, B-Raf oder von beiden Kinasen in B-Zellen führt. Der Einfachheit halber werden in der folgenden Arbeit B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre-, Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre- oder B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre-Mäuse auch als B-Raf-Knockout-Mäuse, Raf-1-Knockout-Mäuse bzw. B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse (auch Doppelknockout-Mäuse) bezeichnet.

Um zu bestätigen, ob tatsächlich eine Deletion der loxP-flankierten Stellen im Genom der oben genannten Mäuse erfolgt ist, und damit die Expression von Raf-1, B-Raf oder beider Kinasen in B-Zellen nicht mehr stattfindet, wurden Proteinextrakte von diesen Mäusen auf die Anwesenheit von B-Raf und Raf-1 untersucht. Der Western-Blot in Abbildung 8 zeigt, dass in den aus B-Raf- (Abbildung 8 A) und Raf-1-Knockout-Mäusen isolierten B-Zellen (Abbildung 8 B) B-Raf bzw. Raf-1 nicht mehr nachweisbar ist.

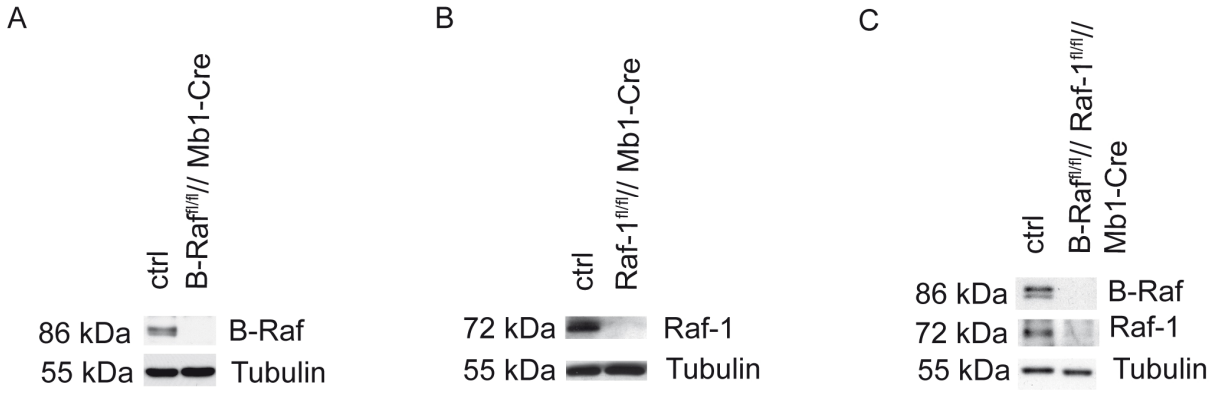


Abbildung 8 B-Raf bzw. Raf-1 sind in den entsprechenden B-Zell-spezifischen Raf-Knockout-Mäusen nicht mehr nachweisbar. Der Western-Blot mit Proteinextrakten aus B220^{+}CD43^{-} B-Zellen aus der Milz von Kontroll- (ctrl), B-Raf-Knockout- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1-Knockout- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) zeigt, **(A)** dass B-Raf in B-Zellen aus B-Raf-Knockout Mäusen nicht exprimiert wird, **(B)** Raf-1 in B-Zellen aus Raf-1-Knockout-Mäusen nicht exprimiert wird und, dass **(C)** in B-Zellen von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen kein B-Raf aber Raf-1 schwach nachweisbar ist. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Für die Detektion der Raf-Kinasen wurden folgende spezifische Antikörper verwendet: B-Raf H145 (N-Term.; Fa. Santa Cruz) und Raf-1 (Cell Signaling). Dieses Ergebnis konnte mindestens für zwölf Mäuse pro Genotyp bestätigt werden.

In B-Zellen aus B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen (Abbildung 8 C) konnte B-Raf nicht mehr nachgewiesen werden. Für Raf-1 ist jedoch ein schwaches Signal sichtbar. Dies lässt die Vermutung zu, dass in den B-Zellen aus den Doppelknockout-Mäusen eine verminderte Deletionseffizienz von Raf-1 stattgefunden hat.

Für die Detektion der B-Raf-Kinase wurde ein spezifischer Antikörper gegen den N-terminalen Teil des Proteins verwendet (H145, Santa Cruz). Für den Nachweis von Raf-1 wurde ein Antikörper gegen die CR2-Region der Kinase verwendet (Cell Signaling). In den Raf-1-Knockout-Mäusen wurde das 3. Exon, das sehr nah am N-Terminus lokalisiert ist, deletiert. In den B-Raf-Knockout-Mäusen wurde das 12. Exon (Kinase-Domäne) entfernt. Laut Literatur findet durch die Koexpression der Cre-Rekombinase eine Leserasterverschiebung statt und somit werden Raf-1 bzw. B-Raf nicht mehr exprimiert (Jesenberger et al., 2001; Chen et al., 2006).

Als Kontroll-Mäuse (ctrl) wurden für die Versuche entweder Mb1-Cre$^{+/-}$, B-Raf$^{fl/fl}$-, Raf-1$^{fl/fl}$- oder B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$-Mäuse verwendet. Wenn nicht anders vermerkt, waren die analysierten Mäuse zwischen acht und neun Wochen alt.

3.1.3. Die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark ist in Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen verändert

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Expression einer dominant negativen Form von Ras (RasDN) einen Block in der frühen B-Zell-Entwicklung im Stadium der Pro-B-Zellen verursacht. Diese Entwicklungsstörung konnte durch die Expression von konstitutiv aktivem Raf-1 (Raf-1 CA) wieder aufgehoben werden (Iritani et al., 1997). Um herauszufinden, welchen Einfluss Raf-1 und B-Raf einzeln oder in Kombination auf die frühe B-Zell-Reifung haben, wurde das Knochenmark von B-Zell-spezifischen Raf-1- (Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre), B-Raf- (B-$Raf^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen (B-$Raf^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) untersucht. Die B-Zell-spezifische Deletion von B-Raf hat sowohl keine signifikante Veränderung in der Anzahl der Gesamtzellen, als auch der B-Zellzahlen (Abbildung 9) verursacht.

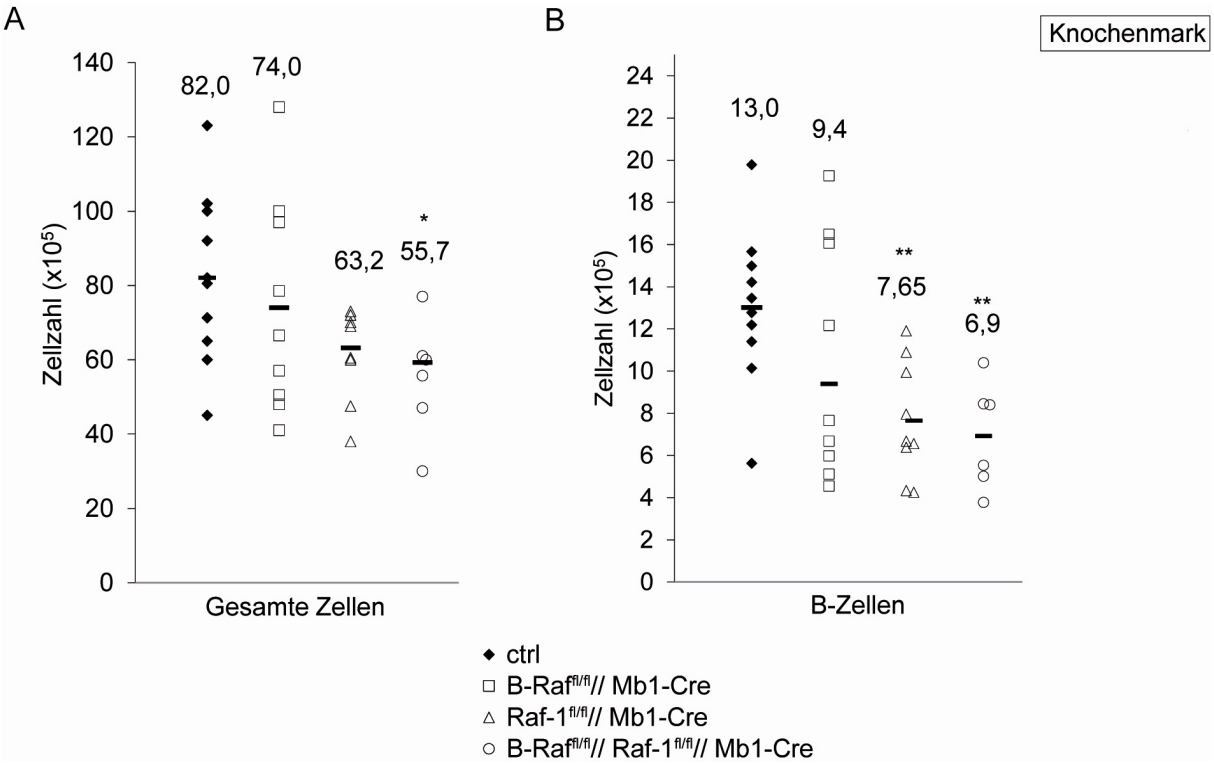


Abbildung 9 Die B-Zell-spezifische Deletion von Raf-1 und B-Raf/Raf-1 führt zu einer Abnahme der B-Zellen im Knochenmark. Dargestellt sind Gesamtzellzahlen **(A)** sowie B-Zellzahlen **(B)** aus Kontroll- (ctrl), B-Raf-Knockout- (B-$Raf^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1-Knockout- (Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen (B-$Raf^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre). Um die Gesamtzellzahlen aus dem Knochenmark zu bestimmen wurde pro Maus jeweils ein Tibia-Knochen präpariert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellzahl bestimmt. Die B-Zellzahlen wurden mit Hilfe des Anteils an B-Zellen ($B220^+$), der durchflusszytometrisch bestimmt wurde, und den Gesamtzellzahlen berechnet. Es wurden jeweils sechs bis elf Mäuse pro Genotyp analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. *p≤0,05; **p≤0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Dagegen hatten Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen tendenziell bzw. signifikant verminderte Gesamtzellzahlen im Knochenmark (Abbildung 9), die höchstwahrscheinlich auf eine Reduktion der B-Zellzahlen in diesem Gewebe zurückzuführen sind (Abbildung 9 B).

Um zu untersuchen, ob die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark partiell blockiert ist, wurden die einzelnen Entwicklungsstadien von B-Zellen analysiert. Durch eine B220- und CD43-Färbung können Pro- und große Prä-B-Zellen ($B220^{+}CD43^{+}$), kleine Prä- und unreife B-Zellen ($B220^{+}CD43^{-}$) und reife, von der Peripherie wieder ins Knochenmark einwandernde, sogenannte rezirkulierende, $B220^{high}CD43^{-}$ B-Zellen voneinander unterschieden werden. In B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen konnten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen leicht erhöhte Prozentsätze von Pro- und großen Prä-B-Zellen ($B220^{+}CD43^{+}$) (Abbildung 10 A) nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hin deuten, dass Pro- und große Prä-B-Zellen bei der Weiterdifferenzierung zu kleinen Prä- und unreifen B-Zellen beeinträchtigt sind. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Pro- und große Prä-B-Zellen ($B220^{+}CD43^{+}$) anhand ihrer Oberflächenmarker CD24 und BP-1 weiter in sogenannte Hardy Fraktionen A ($BP1^{-}CD24^{low}$), Fraktion B ($BP1^{-}CD24^{+}$), Fraktion C ($BP1^{+}CD24^{low}$) und Fraktion C´ ($BP1^{+}CD24^{+}$) eingeteilt (Allman et al., 2001, Hardy und Hayakawa, 2001). Im Vergleich zu Kontroll-Mäusen war in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen der Prozentsatz der Fraktion C ($BP1^{+}CD24^{low}$) zweifach erhöht und der der Fraktion C' ($BP1^{+}CD24^{+}$) leicht vermindert. Die Einzelknockout-Mäuse wiesen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen unveränderte prozentuale Anteile auf (Abbildung 10 B). Dies deutet auf einen partiellen Differenzierungsblock von C nach C´ in Doppelknockout-Mäusen hin. In diesem B-Zell-Stadium sind die Zellen erstmals vom Prä-BCR-Signal abhängig.

Des Weiteren war der Prozentsatz der rezirkulierenden B-Zellen ($B220^{high}CD43^{-}$) in Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen drastisch reduziert (Abbildung 10 A und C) was mit weiteren Färbungen bestätigt werden konnte (nicht gezeigt).

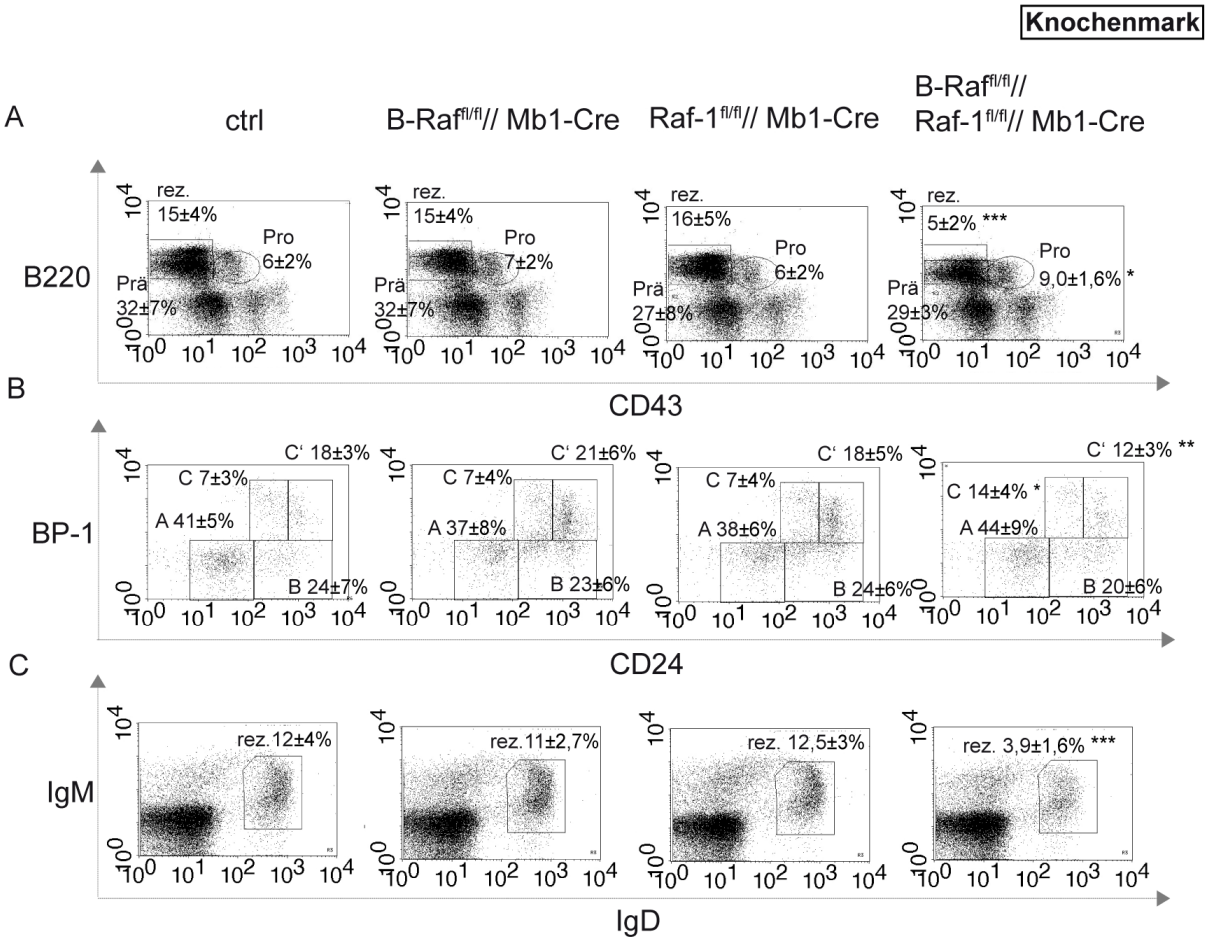


Abbildung 10 Die B-Zell-spezifische Deletion von B-Raf/Raf-1 führt in Doppelknockout-Mäusen zu Veränderungen in der frühen B-Zell-Entwicklung. Durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten aus dem Knochenmark von B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und Kontroll-Mäusen (ctrl). Gezeigt sind die prozentualen Anteile der unterschiedlichen frühen B-Zellpopulationen. Abbildungsteil **(A)** zeigt Pro- und große Prä-B-Zellen (B220^{+}CD43^{+}; Pro), kleine Prä- und unreife B-Zellen (B220^{+}CD43^{-}; Prä) sowie rezirkulierende B-Zellen (B220^{high}CD43^{-}; rez.). Pro- und große Prä-B-Zellen (B220^{+}CD43^{+}) können anhand ihrer Oberflächenmarker CD24 und BP-1 genauer analysiert werden, indem sie in sogenannte Hardy Fraktionen A (BP1^{-}CD24^{low}; A), Fraktion B (BP1^{-}CD24^{+}; B), Fraktion C (BP1^{+}CD24^{low}; C) und Fraktion C´ (BP1^{+}CD24^{+}; C') eingeteilt werden **(B)**. Die Analyse der rezirkulierenden B-Zellen (rez.) ist in **(C)** (IgM^{+}IgD^{+}) gezeigt. Es wurden jeweils zwischen sechs und elf Mäuse pro Genotyp für diese Analyse herangezogen. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen. Prozentuale Anteile beziehen sich auf die Lymphozytenpopulation im Knochenmark. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Berechnung der Zellzahlen der unterschiedlichen B-Zellpopulationen im Knochenmark von Raf-Knockout-Mäusen ergab, dass die Pro- und großen Prä-B-Zellen in Raf-1-Knockout-Mäusen signifikant vermindert sind (Abbildung 11 A). Kleine Prä- und unreife B-Zellzahlen waren in B-Raf/Raf-1- und in den Raf-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen signifikant vermindert, wogegen diese in B-Raf-Knockout-Mäusen unverändert waren (Abbildung 11 B). Die Anzahl der rezirkulierenden B-Zellen war in allen Raf-Knockout-Mäusen

signifikant reduziert (Abbildung 11 C); dieser Phänotyp war in den Doppelknockout-Mäusen besonders stark ausgeprägt.

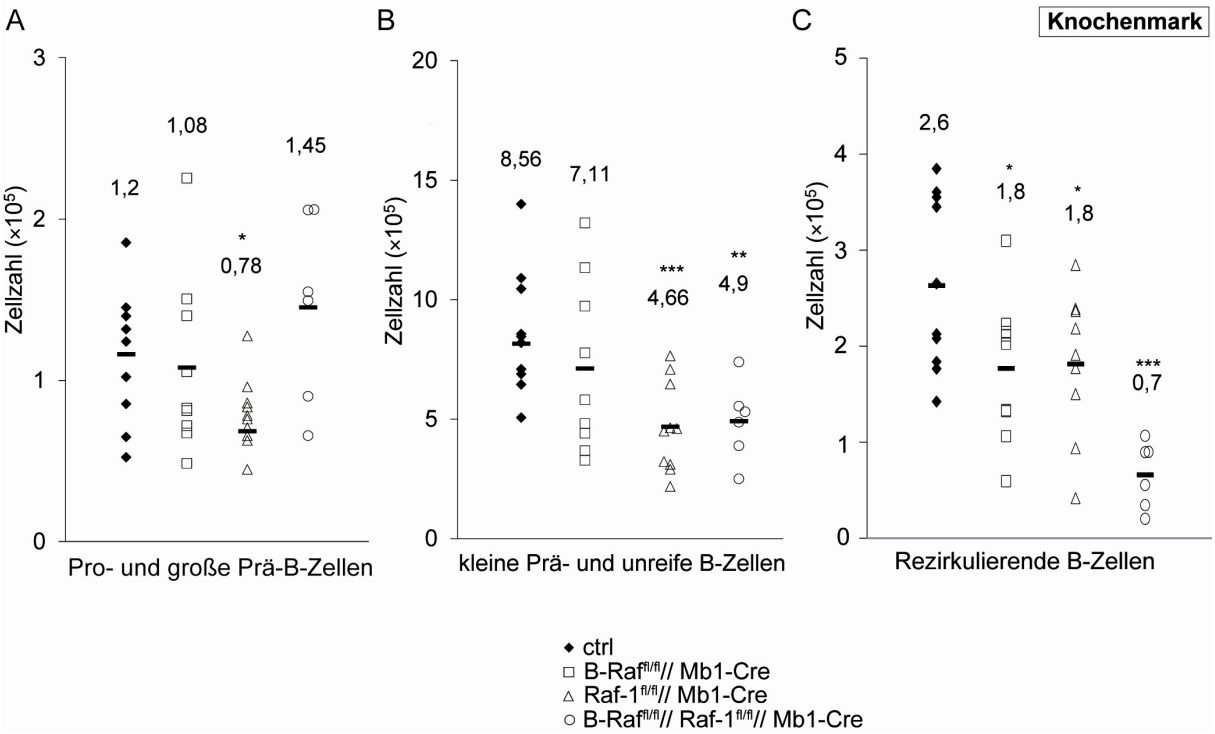


Abbildung 11 Prä- und unreife B-Zellen sind im Knochenmark von Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen reduziert. Die Graphen zeigen Pro- und große Prä-B-Zellzahlen **(A)** sowie kleine Prä- und unreife B-Zellzahlen **(B)** und rezirkulierende B-Zellzahlen **(C)** im Knochenmark von Kontroll- (ctrl), B-Raf-Knockout- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-cre), Raf-1-Knockout- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-cre) und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-cre). Um die Zellzahlen zu ermitteln wurden die Gesamtzellzahlen im Knochenmark mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, und diese mit den Anteilen der Pro- und großen Prä-B-Zellen (B220^{+}CD43^{+}), der kleinen Prä- und unreife B-Zellen (B220^{+}CD43^{-}) und der rezirkulierenden B-Zellen (IgM^{+}IgD^{+}), die durchflusszytometrisch ermittelt wurden, verrechnet. Es wurde jeweils ein Tibia-Knochen von sechs bis elf Mäusen pro Genotyp präpariert und analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Abwesenheit von Raf-1 oder B-Raf/Raf-1 führt somit zu einem partiellen Differenzierungsblock von Pro- und großen Prä-B-Zellen zu kleinen Prä-B-Zellen. Bei Raf-1-Knockout-Mäusen sind die Pro- und großen Prä-B-Zellen von einer Reduktion besonders betroffen, was zeigt, dass insbesondere Raf-1 eine entscheidende Rolle bei der frühen B-Zell-Entwicklung spielt. Die Tatsache, dass die Pro- und großen Prä-B-Zellzahlen in Doppelknockout-Mäusen vergleichbar wie in Kontroll-Mäusen sind, könnte an einer

Akkumulation von B-Raf/Raf-1-defizienten Pro- und großen Prä-B-Zellen liegen, die auf Grund einer Defizienz beider Kinasen nicht weiterdifferenzieren können.

Darüber hinaus scheint die Deletion von B-Raf, Raf-1 und von beiden Kinasen einen negativen Effekt auf die Entwicklung oder Aufrechterhaltung der rezirkulierenden B-Zellen zu haben. Dieser Effekt ist in den Doppelknockout-Mäusen besonders stark ausgeprägt.

3.1.4. Die Deletion von B-Raf und Raf-1 verursacht reduziertes Milzgewicht und verminderte B-Zellzahlen

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von Raf einen Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung in der Peripherie hat, wurde das Milzgewicht und die Lymphozytenpopulationen in der Milz von B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen mit Kontroll-Mäusen verglichen.

Das Milzgewicht der B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) war im Vergleich zu gleichaltrigen Kontroll-Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 12 A und B).

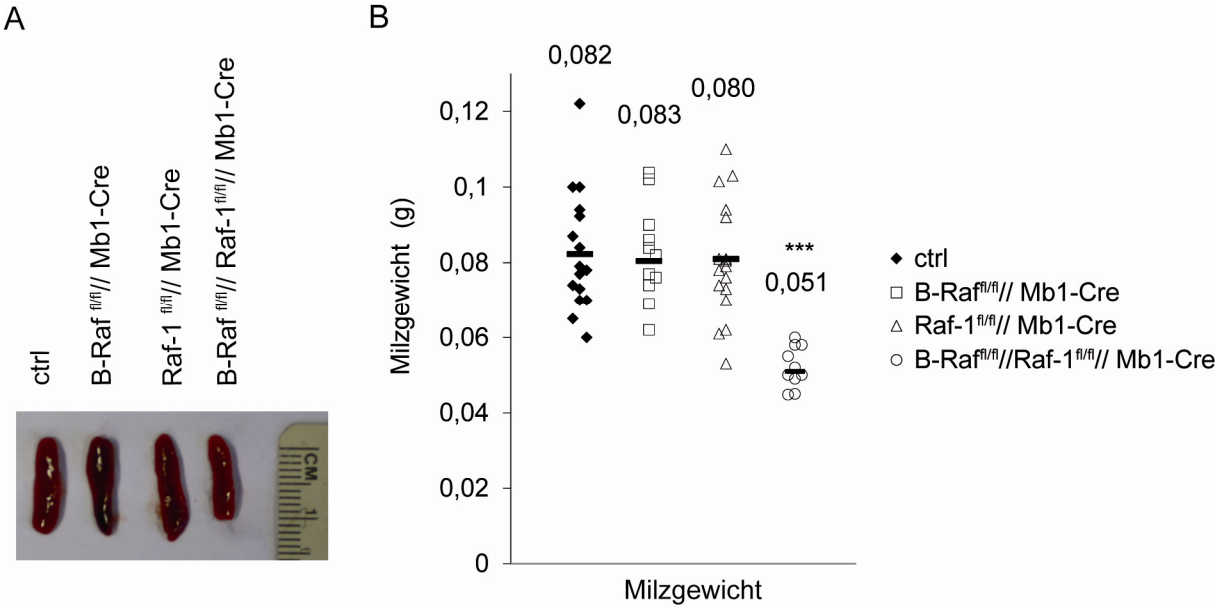


Abbildung 12 Die Deletion von B-Raf und Raf-1 führt in Doppelknockout-Mäusen zu einer Abnahme der Milzgröße und des Milzgewichts. Abbildungsteil **(A)** zeigt Milzorgane von Beispieltieren der Kontrollgruppe (ctrl) und der Genotypen B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre, Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre, B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre. Abbildungsteil **(B)** zeigt das Milzgewicht einzelner Mäuse der oben genannten Genotypen. Es wurden jeweils zwischen sechs und sechzehn Mäuse pro Genotyp im Alter von acht bis neun Wochen für diese Analyse herangezogen. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. ***p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Dagegen waren die Milzgewichte der B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und Raf-1-Knockout-Mäuse (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) im Vergleich zu Kontroll-Mäusen unverändert.

Die Abnahme des Milzgewichts in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen spiegelte sich in einer drastischen Reduktion der Gesamtzellzahlen wider, die auf eine starke Reduktion der B-Zellen und eine tendenzielle, leichte Verminderung der T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen zurückzuführen war (Abbildung 13).

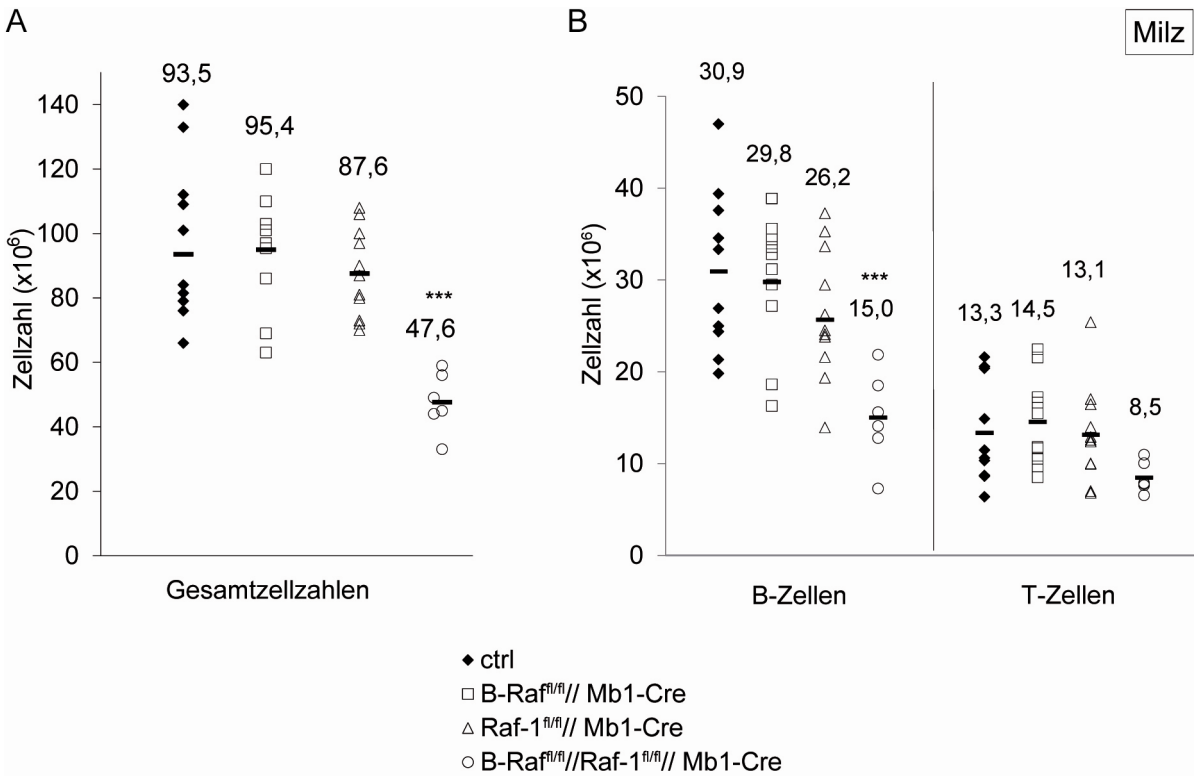


Abbildung 13 B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigen stark reduzierte B- und leicht verminderte T-Zellzahlen in der Milz. Die Gesamtzellzahlen **(A)** wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um die B- und T-Zellzahlen in der Milz **(B)** zu ermitteln, wurden die prozentualen Anteile der B220$^+$ B-Zellen und der CD3$^+$ T-Zellen mittels Durchflusszytometer bestimmt und diese mit den Gesamtzellzahlen verrechnet. Es wurden jeweils zwischen sechs und elf Mäuse im Alter von acht Wochen pro Genotyp für diese Analyse herangezogen. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. ***p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.5. Raf-Knockout-Mäuse haben weniger transitionelle B-Zellen

Transitionelle B-Zellen sind das Bindeglied zwischen unreifen B-Zellen, die sich im Knochenmark befinden, und reifen B-Zellen in der Peripherie. Unreife B-Zellen verlassen über den Blutstrom das Knochenmark, und wandern als Transitionelle 1 (T1) B-Zellen (IgM$^+$CD23$^-$) in die periarterielle lymphatische Scheide (PALS) der Milz ein. Sie bewegen sich dann in die weiße Pulpa, wo sie anschließend zu T2- (IgM^{high}CD23$^+$) und T3- (IgM^{low}CD23$^+$) B-

Zellen differenzieren und sich schließlich zu follikulären B-Zellen (Fo) oder Marginalzonen-B-Zellen (MZB) entwickeln. Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von Raf-1 und B-Raf einen Einfluss auf die Entwicklung oder Aufrechterhaltung transitioneller B-Zellen hat, wurden die prozentuale Anteile und Zellzahlen transitioneller B-Zellen von Raf-1- (Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre), B-Raf- (B-$Raf^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen (B-$Raf^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) im Vergleich zu Kontroll-Mäusen untersucht. Transitionelle B-Zellen sind im Gegensatz zu reifen B-Zellen AA4.1^{+} und können mittels ihrer IgM- und CD23-Expression in ihre Differenzierungsstadien eingeteilt werden.

Die prozentualen Anteile der T2- ($B220^{+}AA4.1^{+}IgM^{high}CD23^{+}$) und T3-B-Zellen ($B220^{+}AA4.1^{+}IgM^{low}CD23^{+}$) von den gesamten $AA4.1^{+}B220^{+}$ Lymphozyten waren in allen Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen signifikant reduziert, wobei diese Abnahme bei den B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen stärker als in den Einzelknockout-Mäusen ausgeprägt war (Abbildung 14).

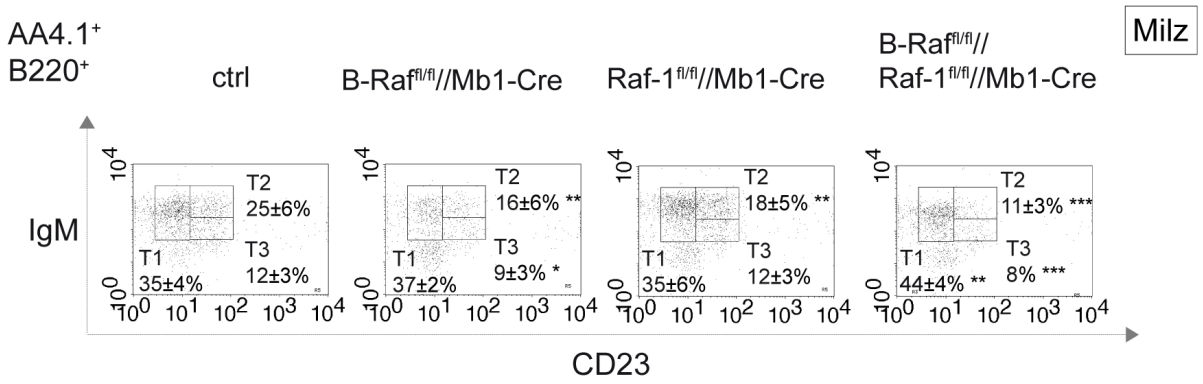


Abbildung 14 B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse haben veränderte transitionelle B-Zellpopulationen. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von $B220^{+}AA4.1^{+}$ Lymphozyten aus der Milz von Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf- (B-$Raf^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1-(B-$Raf^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen. Die Zellen wurden zusätzlich zu α-AA4.1 und α-B220-Antikörpern mit α-IgM- und α-CD23-Antikörpern angefärbt. Untersucht wurden sieben bis zwölf Mäuse pro Genotyp. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen. Prozentuale Anteile beziehen sich auf die $B220^{+}AA4.1^{+}$ Lymphozytenpopulation in der Milz. Es wurde bei allen Genotypen die gleiche Anzahl an Lymphozyten analysiert. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Gesamtzellzahlen der transitionellen B-Zellen waren sowohl in den Einzelknockout- als auch in den Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 15 A). Reduzierte Zellzahlen waren in allen drei Differenzierungsstadien (T1-T3) zu beobachten, wobei die Abnahme der T2- und T3- Zellen im Doppelknockout stärker als in

den Einzelknockouts ausgeprägt war (Abbildung 15 B). Gesamtzellzahlen der T3-Population waren in allen Raf-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen nur leicht reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Raf für die Differenzierung und/oder das Überleben von transitionellen B-Zellen wichtig ist. Ab dem T2-Stadium scheinen B-Raf und Raf-1 zumindest teilweise redundant zu wirken.

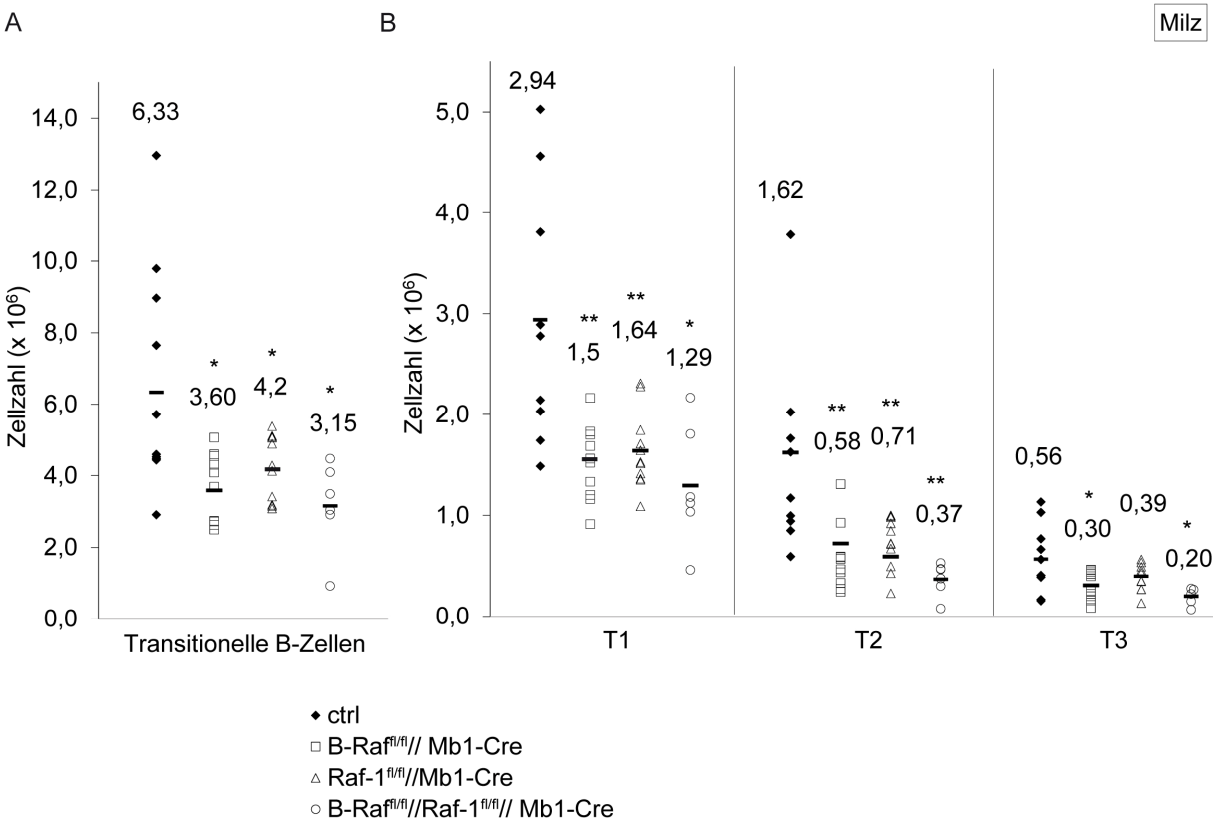


Abbildung 15 Abnahme der Gesamtzellzahlen der Transitionellen B-Zellen in B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen. Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen der Transitionellen **(A)** sowie die Gesamtzellzahlen der einzelnen Subpopulationen: Transitionelle 1 (T1), Transitionelle 2 (T2) und Transitionelle 3 (T3) **(B)** in der Milz. Die Gesamtzellzahlen der Milz wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahlen von Transitionellen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt, indem die Gesamtzellzahlen mit den prozentualen Anteilen der gesamten transitionellen B-Zellen ($AA4.1^+$) bzw. der T1- ($AA4.1^+IgM^+CD23^-$), T2- ($AA4.1^+IgM^{high}CD23^+$) und T3- ($AA4.1^+IgM^{low}CD23^+$) Zellen verrechnet wurden. Es wurde pro Genotyp jeweils zwischen sechs und elf Mäuse im Alter von acht Wochen analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. *p≤0,05; **p≤0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.6. Follikuläre B-Zellen sind in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen stark reduziert

Da die Gesamt-B-Zellzahl in der Milz von Raf-1/B-Raf-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen stark reduziert war (Abschnitt 3.1.4), wurde untersucht, ob die beiden

reifen B-Zellpopulationen, follikuläre (Fo) oder Marginalzonen-B-Zellen (MZB), in diesen Mäusen von der Zellzahl-Abnahme gleichermaßen betroffen sind. Fo und MZB-Zellen können anhand ihrer CD21- und CD23-Oberflächenexpression voneinander unterschieden werden.
Die prozentualen Anteile von Fo-B-Zellen ($CD21^{int}CD23^{+}$) waren in den Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll- und Einzelknockout-Mäusen leicht vermindert. Die Anteile der MZB ($CD21^{high}CD23^{low}$) dagegen waren sowohl in den Einzelknockout-, als auch in den Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen erhöht (Abbildung 16).

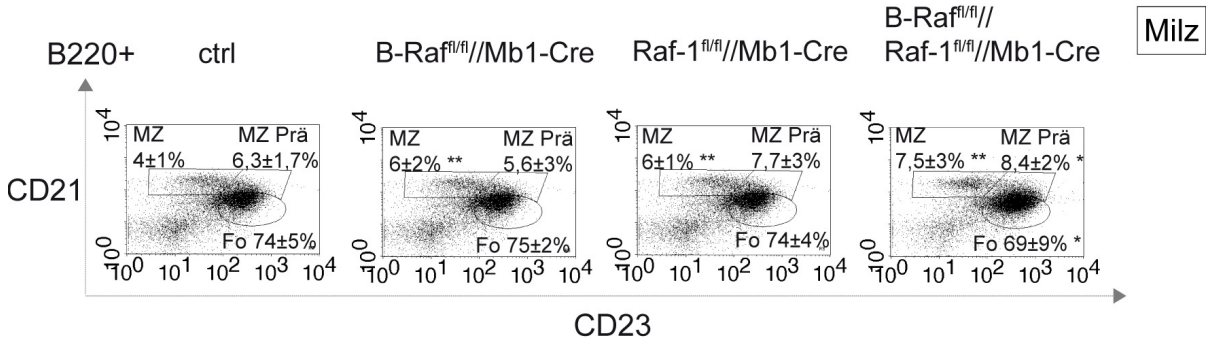


Abbildung 16 B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse haben erhöhte Anteile von Marginalzonen-B-Zellen und ihren Vorläufern und reduzierte Anteile von follikulären B-Zellen. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von $B220^{+}$ Lymphozyten aus Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf- (B-$Raf^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf $^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen. Die Zellen wurden mit α-CD21 und α-CD23-Antikörpern angefärbt. Gezeigt sind prozentuale Anteile von Marginalzonen- ($CD21^{high}CD23^{low}$; MZ) und follikulären B-Zellen ($CD21^{int}CD23^{+}$; Fo) sowie Marginalzonen-B-Zell-Vorläufern ($CD21^{high}CD23^{high}$; MZ Prä). Untersucht wurden sieben bis zwölf Mäuse pro Genotyp. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen. Prozentuale Anteile beziehen sich auf die $B220^{+}$ Lymphozytenpopulation in der Milz. *p≤0,05; **p≤0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Berechnung der Gesamtzellzahlen ergab, dass die Fo-B-Zellen in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll- und Einzelknockout-Mäusen signifikant reduziert waren (Abbildung 17), jedoch waren sie in den Einzelknockouts vergleichbar mit den Kontroll-Mäusen. Zellzahlen von MZB und ihren Vorläufern waren dagegen in den Doppelknockout-Mäusen nicht signifikant reduziert (Abbildung 17).

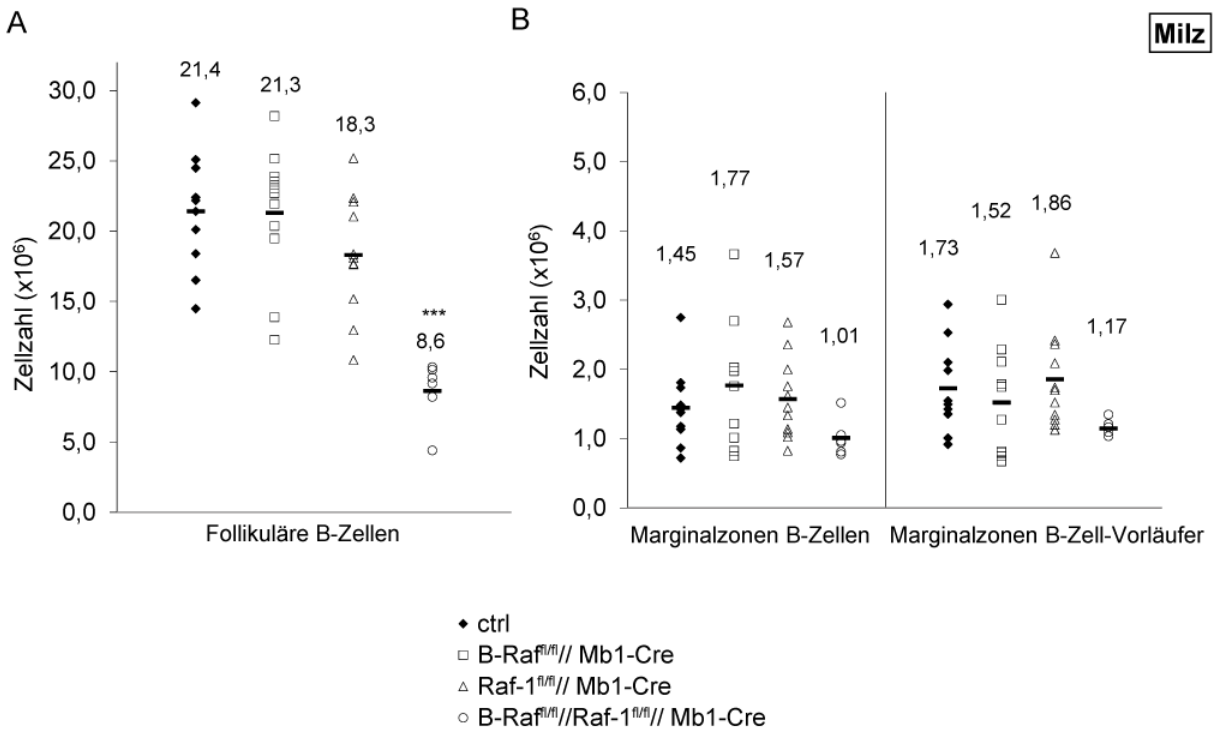


Abbildung 17 B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse weisen reduzierte follikuläre B-Zellzahlen auf. Dargestellt sind die Zellzahlen der follikulären **(A)** und Marginalzonen-B-Zellen und ihrer Vorläufer **(B).** Die Gesamtzellzahlen der Milz wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Fo, MZ und MZ Prä B-Zellzahlen wurden dann mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt, indem die Gesamtzellzahlen aus der Milz mit den prozentualen Anteilen der gesamten Fo- ($CD21^{int}CD23^{+}$), MZ- ($CD21^{high}CD23^{low}$) und MZ-Prä-B-Zellen ($CD21^{high}CD23^{+}$) verrechnet wurden. Untersucht wurden sieben bis zwölf Mäuse pro Genotyp. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. ***p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass möglicherweise die Entwicklung oder die Aufrechterhaltung follikulärer B-Zellen durch die Abwesenheit von Raf-1 und B-Raf in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen beeinträchtigt ist, wogegen Marginalzonen-B-Zellen und ihre Vorläufer ($CD21^{high}CD23^{high}$) lediglich tendenziell in ihrer Entwicklung gestört sind.

3.1.7. Die Follikelstruktur in der Milz von Raf-Knockout-Mäusen bleibt erhalten

Um zu untersuchen, ob die verminderte B-Zellzahl in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen zu einer Veränderung der mikroskopischen Milzstruktur führt, wurden Gefrierschnitte der Milz angefertigt und diese histologisch angefärbt. Auf den Gefrierschnitten wurden B-Zellen mit α-IgM-Antikörpern (rot) und die metallophilen Makrophagen mit α-MOMA-Antikörpern (dunkelblau) sichtbar gemacht. Dabei konnten die Marginalzonen-B-Zellen (roter Ring) an der äußersten Grenze des Marginalsinus (dunkelblau) und die follikulären B-Zellen innerhalb des Follikels (rot) detektiert werden. Kontroll-Mäuse sowie B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigten vergleichbare Follikelstrukturen und Follikelgrößen (Abbildung 18).

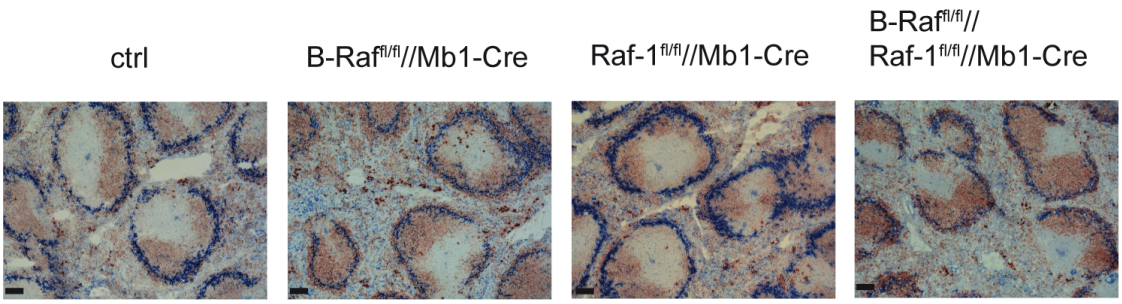


Abbildung 18 Follikelstruktur in der Milz. Gefrierschnitte der Milz von Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-cre) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen wurden mit α-IgM-Antikörpern (B-Zellen; rot) und α-MOMA-Antikörpern (metallophile Makrophagen im Marginalsinus; dunkelblau) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Beispiele der Analyse von je drei Mäusen pro Genotyp, die für die Färbungen herangezogen wurden. Maßstab 100 µm; 10 × Vergrößerung.

3.1.8. B-Zellzahlen im Lymphknoten von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sind nur leicht vermindert

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von Raf-1 und B-Raf lediglich zu einer Reduktion der B-Zellzahlen in der Milz führt, oder ob diese auch in anderen sekundären lymphoiden Organen vermindert sind, wurden die B-Zellzahlen in den inguinalen Lymphknoten ermittelt. Abbildung 19 zeigt, dass die Lymphozyten- sowie die B-Zellzahlen von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll- und Einzelknockout-Mäusen in den Lymphknoten nicht signifikant reduziert sind.

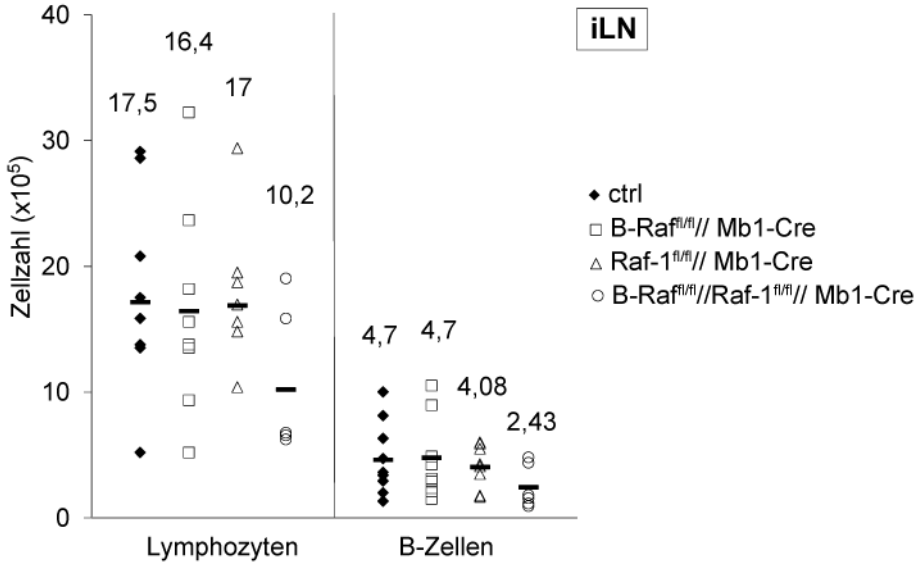


Abbildung 19 B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigen im Lymphknoten leicht reduzierte Lymphozyten- und B-Zellzahlen. Die Abbildung zeigt die Lymphozyten- und B-Zellzahlen aus inguinalen Lymphknoten (iLN) von Kontroll- (ctrl), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-cre) und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-cre). Die Gesamtzellzahlen der iLN wurden mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Lymphozyten- und B-Zellzahlen wurden dann mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt, indem die Gesamtzellzahlen mit den prozentualen Anteilen der Lymphozyten und der B220^{+} B-Zellen verrechnet wurden. Es wurden fünf bis acht Mäuse pro Genotyp im Alter von acht Wochen analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

3.1.9. In B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sind die B1a-Zellen in der Peritonealhöhle stark reduziert

B1-Zellen sind die überwiegende B-Zellpopulation im Peritoneum, wobei auch sehr wenige in der Milz vorhanden sind (Martin et al., 2001). Sie haben selbsterneuernde Fähigkeiten, exprimieren IgM auf ihrer Oberfläche und können anhand ihrer CD5-Expression in B1a- und B1b-Zellen unterteilt werden (Baumgarth, 2011).

Um zu untersuchen, ob die B-Zell-spezifische Deletion von B-Raf, Raf-1 und B-Raf/Raf-1 einen Einfluss auf die Reifung oder Aufrechterhaltung von B1- und B2-Zellen im Peritoneum der Maus hat, wurden Zellen aus der Peritonealhöhle von B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen isoliert und anhand ihrer CD43-, B220- und CD23-Expression auf die prozentualen Verhältnisse von B1- und B2-Zellen analysiert. Im Vergleich zu den Kontroll- und Einzelknockout-Mäusen wurde in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen eine signifikante Reduktion der B1-Zellen (CD43^{+}CD23^{-}) im Vergleich zu B2-Zellen (CD43^{-}CD23^{+}) beobachtet (Abbildung 20).

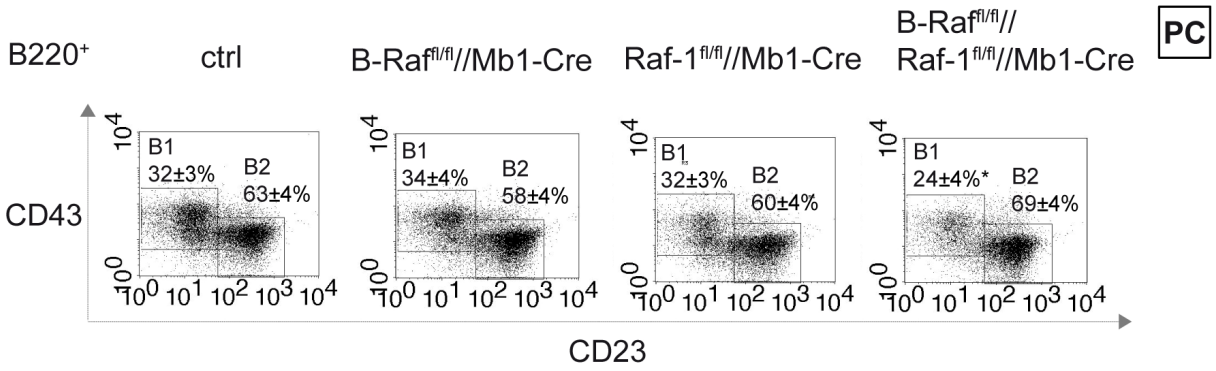


Abbildung 20 B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigen eine Reduktion der B1-Zellpopulation im Peritoneum. Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse von $B220^+$ Zellen (B-Zellen) aus der Peritonealhöhle (PC) von Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf- (B-$Raf^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-$Raf^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen. Die Zellen wurden mit α-B220-, α-CD43- und α-CD23-Antikörpern angefärbt. Dabei sind B1-Zellen $CD43^+CD23^-$ und B2-Zellen $CD43^-CD23^+$. Untersucht wurden vier bis acht Mäuse pro Genotyp. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen. Prozentuale Anteile beziehen sich auf die $B220^+$ Zellpopulation im Peritoneum. *p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Um zu untersuchen, ob B1a- oder B1b-Zellen in den Doppelknockout-Mäusen vermindert sind, wurden Zellen aus der Peritonealhöhle anhand ihrer B220-, CD5- und IgM-Expression analysiert. Raf-1/B-Raf-Knockout-Mäuse zeigten eine selektive Reduktion der prozentualen Anteile von B1a-Zellen ($B220^{low}CD5^+$), wogegen die prozentualen Anteile der B1b-($B220^{low}CD5^-$) und B2-Zellen ($B220^+CD5^-$) unverändert im Vergleich zu denen der Kontroll-Mäuse waren (Abbildung 21).

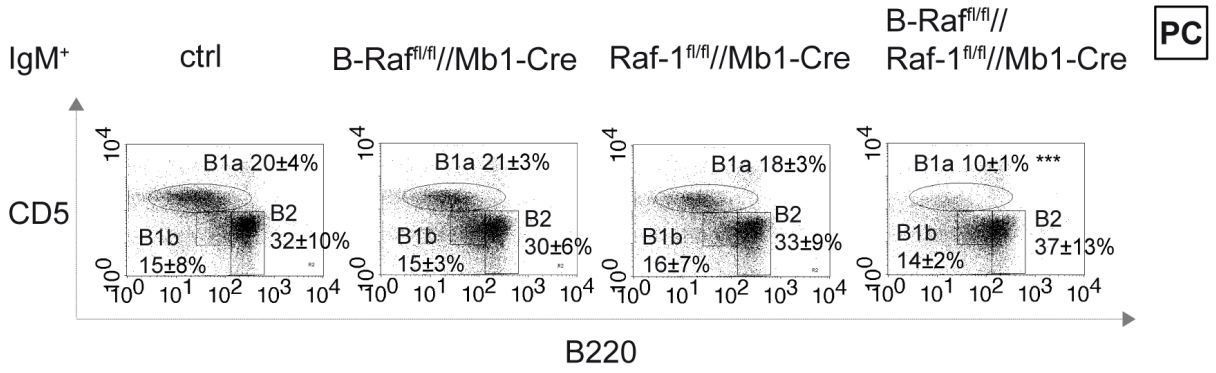


Abbildung 21 B-Raf/Raf-1-Defizienz führt zu einer selektiven Abnahme der B1a-Zellen im Peritoneum. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von IgM^+ Zellen aus der Peritonealhöhle (PC) von Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf- (B-$Raf^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-$Raf^{fl/fl}$//Raf-$1^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen. Die Zellen wurden mit α-B220-, α-CD5- und α-IgM-Antikörpern angefärbt. Dabei sind B1a-Zellen $B220^{low}CD5^+$, B1b-Zellen $B220^{low}CD5^-$ und B2-Zellen $B220^+CD5^-$. Es wurden sechs bis dreizehn Mäuse pro Genotyp untersucht. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen. Prozentuale Anteile beziehen sich auf die IgM^+ Zellpopulation im Peritoneum. *** p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Die prozentualen Anteile der B1a-Zellpopulationen der Einzelknockout-Mäuse waren hingegen mit denen von Kontroll-Mäusen vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Raf-Kinasen, B-Raf und Raf-1, für die Aufrechterhaltung und/oder Entwicklung von B1a-Zellen entscheidend sind.

3.1.10. Das Überleben von Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen ist in vitro leicht vermindert

Da die Peripherie von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen verminderte B-Zellzahlen aufwies, sollte untersucht werden, ob dies durch ein geringeres Überleben der B-Zellen, eine reduzierte Proliferation (Abschnitt 3.1.11) und/oder durch einen verminderten Influx von B-Zellen aus dem Knochenmark verursacht wird (Abschnitt 3.1.12). Um herauszufinden, ob das Überleben von Raf-defizienten B-Zellen in vitro gestört ist, wurden B-Zellen der B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse und Kontroll-Mäuse in vitro über 5 Tage in Kultur gehalten und deren Überleben und Zellzahl mittels TOPRO-3 ermittelt (Abbildung 22).

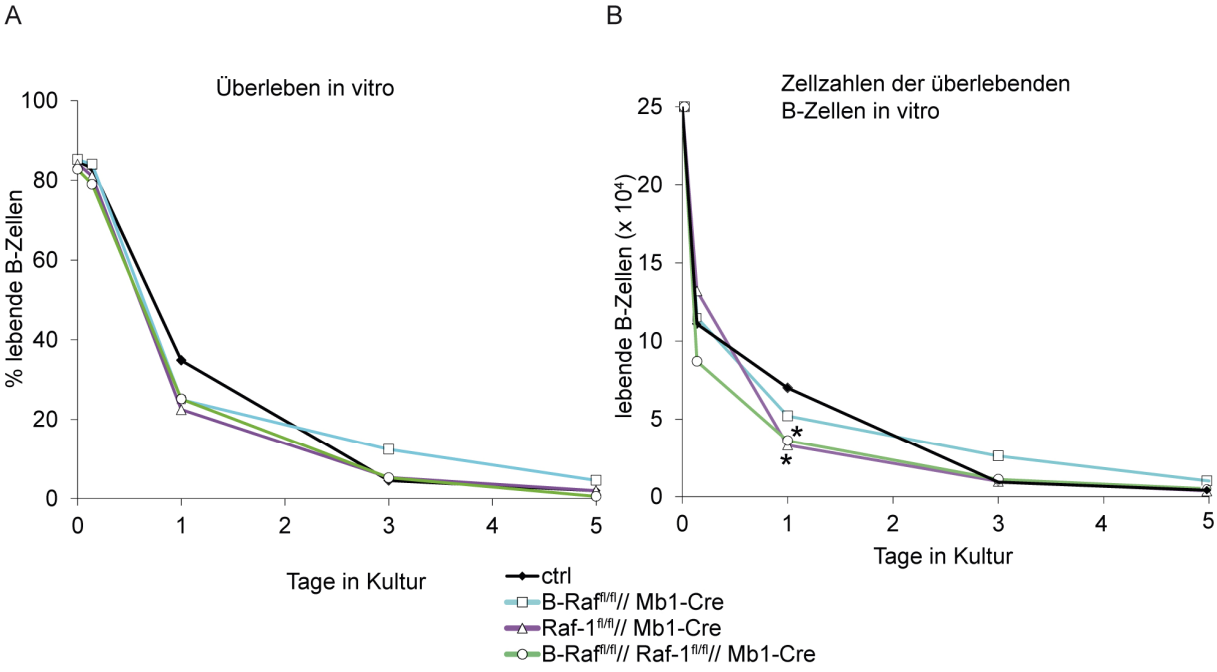


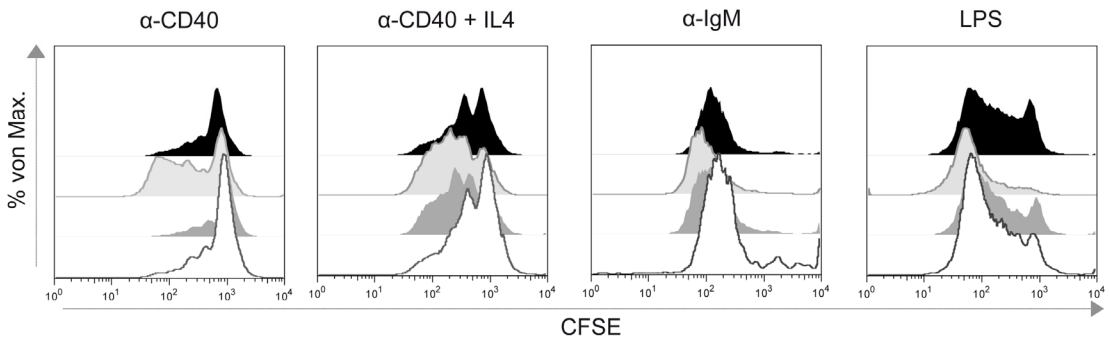
Abbildung 22 Leicht reduziertes Überleben von Raf-defizienten B-Zellen in vitro. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil **(A)** und die Gesamtzellzahlen **(B)** der überlebenden B-Zellen aus Kontroll-Mäusen (ctrl; schwarze Linie), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre; blaue Linie), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre; lila Linie) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre; grüne Linie) Knockout-Mäusen in einer in vitro Kultur. Vor dem Start der Kultur, 3 Stunden später sowie an den Tagen 1, 3 und 5 wurden die B-Zellen mit TOPRO-3 angefärbt und durchflusszytometrisch die lebenden Zellen (TOPRO-3 negative) bestimmt. Gezeigt sind durchschnittliche Werte aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils Duplikaten. *p≤0,05: Raf-1 und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle.

Der zeitliche Verlauf der Überlebenskurven zeigt, dass nach einem Tag in Kultur Raf-defiziente B-Zellen in vitro tendenziell schlechter als Kontroll-B-Zellen überlebten. Die Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen waren, was die lebenden Zellzahlen an Tag 1 betrifft, von einer leichten Reduktion betroffen. Ferner war der prozentuale Anteil der überlebenden (TOPRO-3-negative) B-Zellen an Tag 1 bei allen Raf-defizienten B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle tendenziell vermindert, was aber nicht signifikant war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defiziente B-Zellen ein geringeres Überleben in vitro aufweisen könnten.

3.1.11. Raf-defiziente B-Zellen lassen sich in vitro zur Proliferation anregen

Da der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg an Prozessen wie der Proliferation von Zellen beteiligt ist, sollte zusätzlich zum Überleben auch die Proliferation der Raf-defizienten B-Zellen in vitro untersucht werden. Dafür wurden B-Zellen aus Raf-Knockout-Mäusen mit CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester) angefärbt und mit Zusatz von verschiedenen Stimulanzien (α-CD40-Antikörpern, α-CD40-Antikörpern und IL-4, α-IgM-Antikörpern und LPS) oder nur in Medium, in Kultur genommen. An Tag 1, 3 und 5 wurde die Fluoreszenz der B-Zellen bestimmt. Bei CFSE handelt es sich um eine fluoreszierende Verbindung, die aus CFDA in der Zelle enzymatisch gespalten wird und von Proteinen der inneren Zellmembran gebunden wird (Quah et al., 2007). Bei Zellteilung wird CFSE gleichmäßig mit den Proteinen an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch diese dann nur noch halb so stark fluoreszieren.

Nach Stimulierung in vitro mit α-CD40-Antikörpern proliferierten B-Raf-defiziente B-Zellen signifikant stärker als Kontroll-B-Zellen, wogegen sie sich nach Inkubation mit α-CD40-Antikörpern und IL-4, α-IgM-Antikörpern und LPS ähnlich wie Kontroll-B-Zellen teilten. Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defiziente B-Zellen proliferierten dagegen nach Stimulation vergleichbar wie Kontroll-B-Zellen (Abbildung 23).



	% geteilt	% geteilt	% geteilt	% geteilt
ctrl	11	40	71	64
B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre	**28** *	49	80	70
Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre	13	45	65	67
B-Raf$^{fl/fl}$// Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre	11	32	74	69

Abbildung 23 Raf-defiziente B-Zellen proliferieren in vitro vergleichbar wie Kontroll-B-Zellen. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von CFSE-gefärbten lebenden B-Zellen aus Kontroll-Mäusen (ctrl, schwarzes Histogramm), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre, hellgraues Histogramm), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre, dunkelgraues Histogramm) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre, weißes Histogramm mit schwarzer Linie) Knockout-Mäusen, die mit verschiedenen Stimulanzien (α-CD40, α-CD40 + IL4, α-IgM und LPS) über 5 Tage in Kultur gehalten wurden. CFSE-gefärbte Zellen geben den Farbstoff bei ihrer Teilung an beide Tochterzellen weiter, so dass die Zellteilung anhand einer Abnahme der CFSE-Intensität der Zellen im Durchflusszytometer festgestellt werden kann. Prozentuale Anteile der lebenden B-Zellen (TOPRO-3 negative), die sich geteilt haben, sind als Tabelle dargestellt. Gezeigt sind durchschnittliche Werte aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils Duplikaten. * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

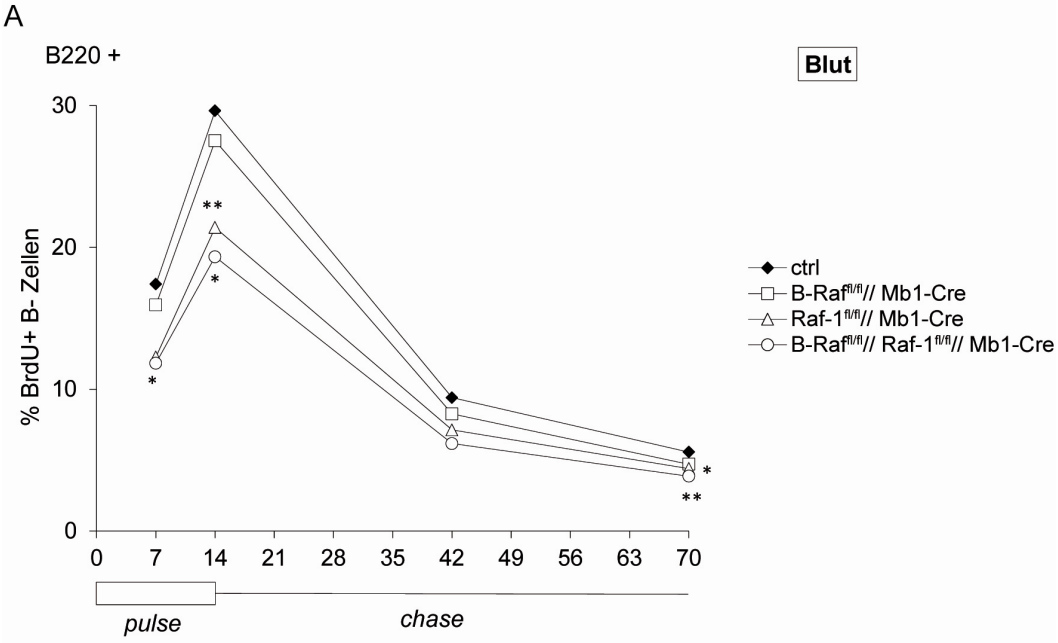
3.1.12. Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse haben einen verminderten Influx von B-Zellen in die Peripherie

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob die reduzierten B-Zellzahlen in der Peripherie von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen durch einen verminderten Influx von neu differenzierten B-Zellen aus dem Knochenmark verursacht werden oder die Lebensspanne der B-Zellen außerhalb des Knochenmarks vermindert ist, wurde ein BrdU pulse-chase-Experiment durchgeführt. BrdU (Bromdesoxyuridin) ist ein Thymidinanalogon, das während der DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus von Zellen in ihre DNA eingebaut wird (pulse); nach der Markierung können anschließend die neu entstandenen Zellen über längere Zeit (chase) verfolgt werden und so kann deren Überleben untersucht werden. Da sich reife B-Zellen in der Peripherie nicht teilen, sind BrdU^{+} B-Zellen außerhalb des Knochenmarks aus transitionellen B-Zellen, die wiederum aus frühen B-Zell-Vorläufern aus dem Knochenmark differenzieren, entstanden. So kann während der pulse-Phase analysiert

werden, wie viel Prozent der B-Zellen sich gerade in der S-Phase befinden und während der chase-Phase, wie gut diese Zellen im Anschluss überleben.

Im Vergleich zu Kontroll- und B-Raf-Knockout-Mäusen hatten Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse an den Tagen 7, 14 und 70 signifikant weniger $BrdU^+$ B-Zellen im Blut (Abbildung 24).

A



B

Tag	ctrl	B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre	Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre	B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre
7	17±1	16±2	12*	11±3
14	30±2	27±3	21±1**	19±4*
42	9±2	8±1	7	6±1
70	5,6±0,4	4,7±1	4,4±0,1*	3,8±0,5**

Abbildung 24 Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse bilden weniger B-Zellen im Knochenmark. Dargestellt ist die Auswertung eines BrdU pulse-chase Experiments mit Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen. **(A)** Graphische Darstellung der prozentualen Anteile der $BrdU^+$ B-Zellen im Blut der Mäuse an unterschiedlichen Zeitpunkten. Teil **(B)** zeigt die prozentualen Werte mit Standardabweichung in Zahlen. Es wurden drei Mäuse pro Genotyp analysiert. * p≤0,05; **p≤0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Die signifikant reduzierten Prozentsätze von $BrdU^+$ B-Zellen an Tag 7 und 14 stammen vermutlich daher, dass die B-Zellreifung im Knochenmark in diesen Mäusen gestört ist und

deshalb weniger $BrdU^+$ B-Zellen in die Peripherie gelangen (Abbildung 24). Da jedoch das Überleben der $BrdU^+$ B-Zellen in der Peripherie in allen Mäusen sehr ähnlich ist (prozentuale Anteile an Tag 42 und 70), könnte dies bedeuten, dass bei geringerem Influx von B-Zellen aus dem Knochenmark (pulse) in Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen ein größerer Anteil von Zellen zu langlebigen B-Zellen wird (chase).

3.2. Der Erk-Signalweg in B-Zellen aus Raf-Knockout-Mäusen

Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg stellt die kanonische MAP-Kinase-Kaskade (MAPK-Kaskade) dar. Raf-Kinasen spielen eine essentielle Rolle bei der Aktivierung dieses Signalweges. Die Stimulierung von B-Zellen über den B-Zell-Rezeptor (BCR) führt unter anderem auch zu einer Erk-Phosphorylierung (Tordai et al., 1994); es ist jedoch noch nicht klar, welche Rolle die Raf-Kinasen bei der Aktivierung von Erk in B-Zellen spielen. BCR-Stimulierungen von DT40-Zellen, eine Hühner-Lymphom-Linie, deuten darauf hin, dass bei der BCR-vermittelte Erk-Aktivierung Raf-1 und B-Raf eine redundante Funktion haben. Dabei haben Raf-1-defiziente DT40-Zellen nach Stimulation diesen Signalweg unverändert aktivieren können, wobei B-Raf-defiziente DT40-Zellen geringfügig weniger aktiviert werden konnten (Brummer et al., 2002). In B-Raf/Raf-1-defizienten DT40-Zellen ließ sich hingegen der Erk-Signalweg nach BCR-Stimulation nicht aktivieren (Brummer et al., 2002).

3.2.1. Die Erk-Phosphorylierung in B-Zellen kann durch einen B-Raf-Inhibitor gehemmt werden

Um zu überprüfen, ob in murinen B-Zellen Raf-Kinasen in die BCR-vermittelte Aktivierung des Erk-Signalwegs involviert sind, wurden B-Zellen aus Wildtyp-Mäusen mit verschiedenen Raf-Kinase-Inhibitoren inkubiert, anschließend über den BCR stimuliert und dann deren Erk-Aktivierung untersucht.

Es wurden folgende Inhibitoren in dem Experiment verwendet: (I) Sorafenib: ein Raf-1/B-Raf-Inhibitor, der Raf-1 stärker als B-Raf hemmt (Strumberg, 2005) (II) SB-590885, ein B-Raf-Inhibitor, der hauptsächlich die mutierte Form von B-Raf (V600E) hemmt, in höheren Konzentrationen jedoch auch einen Effekt auf die unmutierte B-Raf-Form hat (King et al., 2006, Takle et al., 2006) (III) UO126: ein MEK1/2-Inhibitor (Vlahos et al., 1994), der im Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg unterhalb von Raf wirkt, und somit als Positiv-Kontrolle eingesetzt wurde. Außerdem wurde ein Tpl2/Cot-Inhibitor (Gavrin et al., 2005) verwendet, da über

Tpl2/Cot, eine Serin/Threonin-Kinase, ein alternativer Weg, der ebenfalls zur Erk-Phosphorylierung führt, angeschaltet werden kann (Eliopoulos et al., 2003). Bei allen in diesem Versuch verwendeten Inhibitoren handelt es sich um Proteinkinase-Inhibitoren, die an die ATP-bindende Tasche des Enzyms irreversibel binden und es somit in seiner Kinasefunktion hemmen.

Der in Abbildung 25 abgebildete Western-Blot zeigt, dass die BCR-vermittelte Erk-Aktivierung mit Hilfe des B-Raf-Inhibitors SB-590885 gehemmt wurde und diese Inhibition ähnlich stark wie nach Behandlung der B-Zellen mit dem MEK-Inhibitor UO126 (Positivkontrolle) ist. Die Inkubation der B-Zellen mit Sorafenib (Raf-1 > B-Raf) und mit dem Tpl2-Inhibitor hatte keine hemmende Wirkung auf die Erk-Aktivierung.

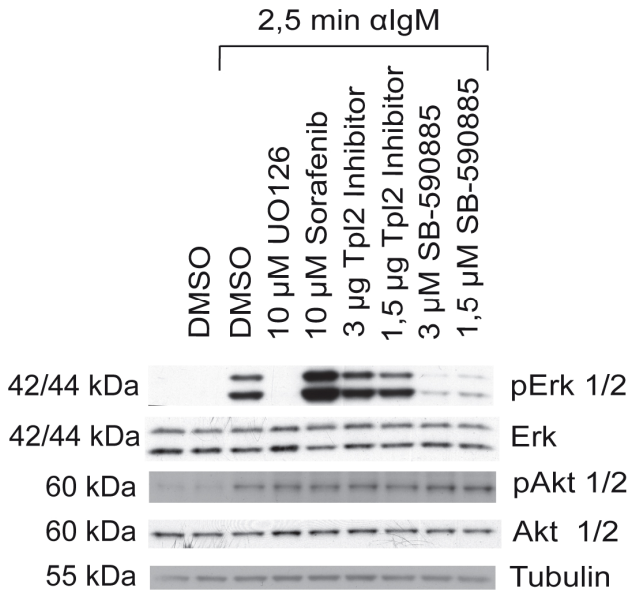


Abbildung 25 Die Aktivierung von Erk in B-Zellen wird durch Behandlung mit Raf-Kinase-Inhibitoren verändert. Dargestellt ist ein Western-Blot mit Proteinextrakten aus unbehandelten reifen Wildtyp-B-Zellen oder welchen, die mit DMSO oder mit unterschiedlichen Inhibitoren inkubiert und anschließend unstimuliert oder mit αIgM-Antikörpern (2,5 min) stimuliert wurden. Die Blot-Membranen wurden jeweils mit phosphospezifischen Antikörpern für pAkt1/2 (Ser473) und pErk1/2 (Thr202/Tyr204) und Antikörpern, die das Gesamtprotein von Akt1/2 und Erk1/2 erkennen, inkubiert. DMSO: Dimethylsulfoxid, Lösemittel für alle Inhibitoren; UO126: MEK1/2-Inhibitor als Positivkontrolle; Sorafenib (Nexavar): Raf-1>B-Raf-Inhibitor; SB-590885: B-Raf (V600E) und B-Raf-Inhibitor. Die untereinander aufgeführten Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert. Zwischen dem Nachweis der phosphorylierten Kinasen und der Detektion der unphosphorylierten Formen der Proteine wurde die Western-Blot Membran mittels stripping von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Die Akt-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation blieb in diesem Versuch unverändert, was zeigt, dass die in diesem Experiment eingesetzten Inhibitoren keinen unspezifischen oder toxischen Effekt auf die Zellen haben.

Die Inhibition der Erk-Phosphorylierung durch den B-Raf-Inhibitor-SB-590885 deutet darauf hin, dass B-Raf für die Signalweiterleitung vom BCR stromabwärts an MEK und Erk verantwortlich ist.

3.2.2. Der Erk-Signalweg lässt sich in Raf-defizienten B-Zellen aktivieren

Um dieses Ergebnis in B-Zellen aus konditionalen Raf-Knockout-Mäusen zu bestätigen, wurden B-Zellen aus B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sowie aus Kontroll-Mäusen mit α-IgM-Antikörpern für die angegebenen Zeiten stimuliert und anschließend mittels Western-Blot auf die Aktivierung (Phosphorylierung) von MEK und Erk (Abbildung 26) sowie B-Raf, Raf-1 und A-Raf untersucht (Abbildung 27).

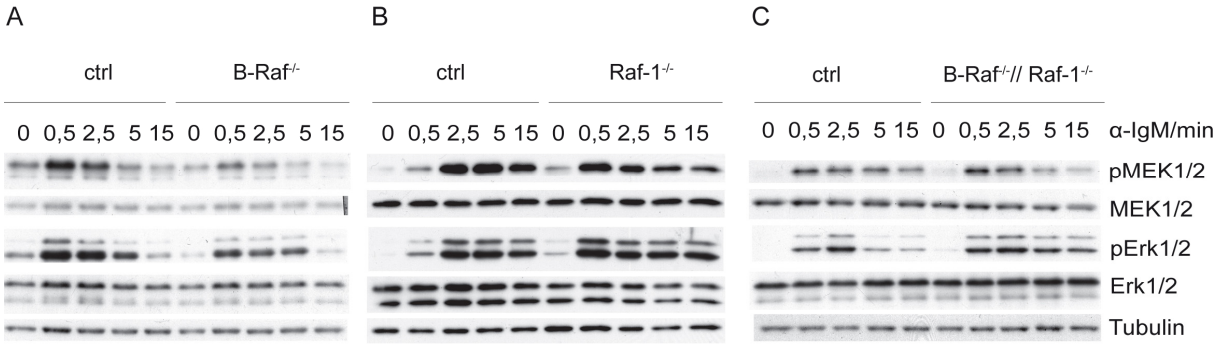


Abbildung 26 Der Erk-Signalweg lässt sich in B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen aktivieren. Dargestellt sind drei Western-Blots, die den zeitlichen Aktivierungsverlauf von MEK und Erk in Kontroll-B-Zellen (ctrl), B-Raf- **(A)**, Raf-1- **(B)** und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen **(C)**, die mit α-IgM-Antikörpern über die angegebene Zeit (min) inkubiert wurden, zeigen. Die verwendeten B-Zellen waren reife $CD43^{-}B220^{+}$ B-Zellen aus der Milz. Die Western-Blot-Membranen wurden jeweils mit phosphospezifischen Antikörpern für pMEK1/2 (Ser217/221) und pErk1/2 (Thr202/Tyr204) und Antikörpern spezifisch für das Gesamtprotein von MEK1/2 und Erk1/2 inkubiert, so dass die phosphorylierten (aktiven) Formen sowie die basale Expression der Kinasen untersucht werden konnte. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Die untereinander aufgeführten Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert. Zwischen dem Nachweis der phosphorylierten Formen und der Detektion der unphosphorylierten Formen der Proteine wurden die Western-Blot Membranen mittels stripping von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit. Die einzelnen Versuche wurden drei bis sechs Mal durchgeführt.

Erk und MEK wurden sowohl in B-Raf- als auch in Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen nach BCR-Stimulation aktiviert. Dabei war die phosphorylierte Form von Erk in Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zum gleichen Zeitpunkt (0,5 min) stärker nachweisbar, was mit Hilfe von mindestens drei weiteren Experimenten bestätigt werden konnte.

Eine mögliche schwächere Aktivierung des Erk-Signalwegs in B-Raf-defizienten B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen konnte in nur zwei von vier Versuchen beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit von B-Raf, Raf-1 oder von beiden Kinasen durch die übermäßige Expression oder Phosphorylierung von dem jeweiligen, noch vorhandenen Raf ausgeglichen wird, wurde ebenfalls die Phosphorylierung der einzelnen Raf-Kinasen analysiert. Nach BCR-Stimulation werden in B-Zellen die Raf-Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert. Dabei soll die Menge an phosphoryliertem B-Raf (S445) nur gering ansteigen, während Raf-1 an S338 phosphoryliert und an S259 dephosphoryliert wird (Marais et al., 1997, Mason et al., 1999, Brummer et al., 2002, Mercer et al., 2005). B-Raf kann, laut Literatur, zudem noch an seinen aktivierenden Stellen Thr598 und Ser601 phosphoryliert werden (Zhang und Guan, 2000). Für A-Raf ist die aktivierende Phosphorylierungsstelle S299 beschrieben worden (Baljuls et al., 2007, Baljuls et al., 2008).

Das Ergebnis in Abbildung 27 zeigt, dass die BCR-Stimulation von Kontroll-B-Zellen eine leichte Zunahme der Phosphorylierung von B-Raf (S445), die starke Zunahme von pRaf-1, phosphoryliert an seiner aktivierenden Stelle (S338), und ebenfalls eine leichte Zunahme der phosphorylierten, aktiven Form von A-Raf (S299) verursachte. Eine Phosphorylierung von B-Raf an Thr598/Ser601 konnte bei den in dieser Arbeit angefertigten Stimulationen nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Bei den hier abgebildeten Stimulationskinetiken von B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen konnte beobachtet werden, dass es während der Aktivierung nicht zu einer übermäßigen Phosphorylierung der noch vorhandenen Raf-Kinase(n) oder eine Erhöhung der Raf-Kinase-Expression kam (Abbildung 27). Interessanterweise war in den B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen ebenfalls keine Zunahme der phosphorylierten Form oder der gesamten Proteinexpression von A-Raf zu beobachten (Abbildung 27).

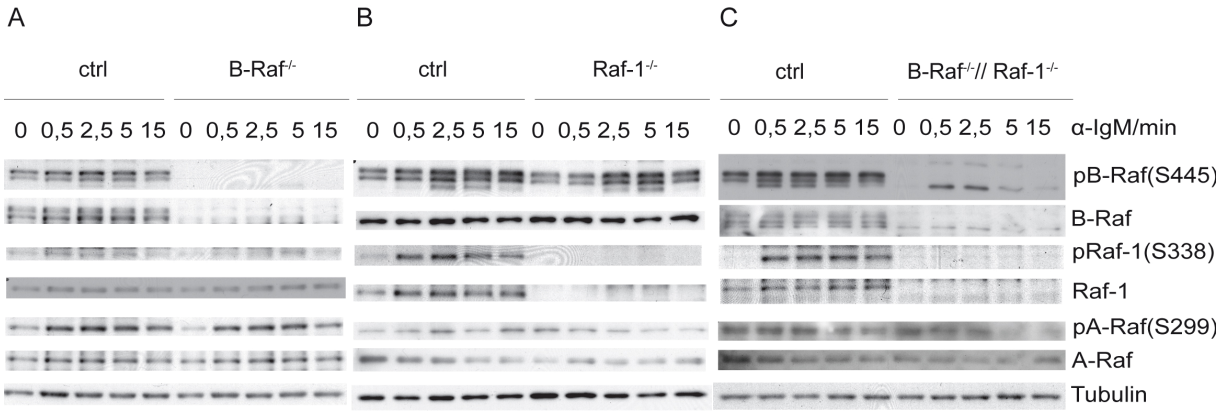


Abbildung 27 Raf-Kinasen werden nach BCR-Stimulation an aktivierenden Stellen phosphoryliert. Dargestellt sind Western-Blots, die den zeitlichen Aktivierungsverlauf von B-Raf, Raf-1 und A-Raf in Kontroll-B-Zellen (ctrl), B-Raf- **(A)**, Raf-1- **(B)** und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen **(C)**, die mit α-IgM-Antikörpern über die angegebene Zeit (min) inkubiert wurden, zeigen. Die verwendeten B-Zellen waren reife $CD43^{-}B220^{+}$ B-Zellen aus der Milz. Die Blot-Membranen wurden jeweils mit phosphospezifischen Antikörpern für pB-Raf (S445), pRaf-1 (S338) und pA-Raf (S299) und mit Antikörpern gegen alle Formen von B-Raf (N-terminal), Raf-1 und A-Raf inkubiert. Die untereinander aufgeführten Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert. Zwischen dem Nachweis der phosphorylierten Formen und der Detektion der unphosphorylierten Formen der Proteine wurden die Western-Blot Membranen mittels stripping von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Die einzelnen Versuche (A, B und C) wurden drei bis sechs Mal durchgeführt.

Da der Erk-Signalweg in B-Zellen nicht nur nach Stimulation des BCR, sondern auch nach Bindung von CD40L an CD40 aktiviert wird, wurden B-Zellen aus B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten und Kontroll-B-Zellen isoliert, mit α-CD40-Antikörpern stimuliert und auf die Phosphorylierung von MEK und Erk mittels Western-Blot getestet. Dieser Versuch hat gezeigt, dass die Aktivierung des Erk-Signalwegs über CD40 in Raf-defizienten B-Zellen mit der von Kontroll-B-Zellen vergleichbar ist (Abbildung 41, Anhang).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich der Erk-Signalweg in B-Zellen aus den Raf-Knockout-Mäusen, trotz einer B-Raf-, Raf-1- oder B-Raf/Raf-1-Deletion, über den BCR und CD40 stimulieren lässt.

3.2.3. MEKK1 wird in Raf-defizienten B-Zellen nach BCR-Stimulation aktiviert

Da Raf-defiziente B-Zellen nach BCR-Stimulation den Erk-Signalweg aktivieren und keine übermäßige Expression oder Phosphorylierung der jeweils noch vorhandenen Raf-Kinase beobachtet werden konnte, kamen noch weitere Kinasen neben Raf als potentielle

Signaltransduktoren im BCR-Signalweg in Frage. Raf-Kinasen, die zur Familie der MAPKKK (MAP3-Kinasen) gehören, phosphorylieren und aktivieren MEK, eine MAPKK; es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass MEK nicht allein durch Raf, sondern auch von anderen MAPKKK, wie MEKK1, phosphoryliert und somit aktiviert werden kann (Gardner et al., 1994, Yan und Templeton, 1994, Xu et al., 1995). Um herauszufinden, ob andere MAPKKK wie MEKK1 für die Phosphorylierung und Aktivierung von MEK nach BCR-Stimulation in B-Zellen in Frage kommen, wurde im Western-Blot die Phosphorylierung von MEKK1 untersucht. Abbildung 28 zeigt, dass MEKK1 nach BCR-Stimulation phosphoryliert und somit aktiviert wird. Jedoch ist die Phosphorylierung und somit Aktivierung von MEKK1 in den B-Raf-, Raf-1, aber vor allem in B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-B-Zellen nicht erhöht, sondern geringer, was die Vermutung zulässt, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass MEKK1 für die Signaltransduktion nach BCR-Stimulation verantwortlich ist.

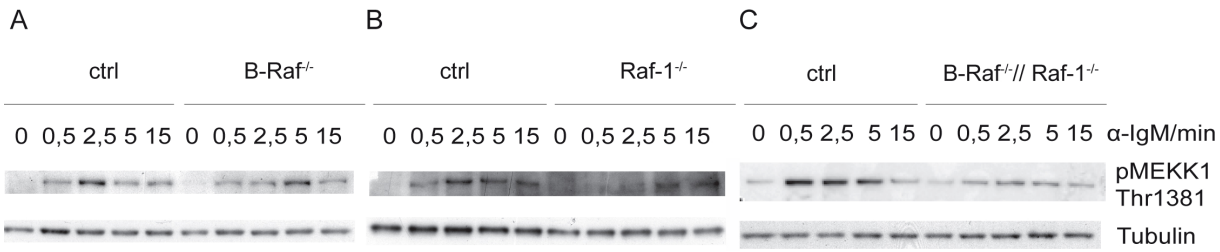


Abbildung 28 Die MAPKKK MEKK1 wird in B-Zellen nach BCR-Stimulation phosphoryliert. Die Western-Blots zeigen den zeitlichen Aktivierungsverlauf von MEKK1 in Kontroll-B-Zellen (ctrl), B-Raf- **(A)**, Raf-1- **(B)** und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen **(C)**, die mit α-IgM-Antikörpern über die angegebene Zeit (min) inkubiert wurden. Die verwendeten B-Zellen waren reife $CD43^{-}B220^{+}$ B-Zellen aus der Milz. Die Blot-Membranen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern für pMEKK1(Thr1381) inkubiert. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Die Versuche wurden drei Mal durchgeführt.

3.2.4. A-Raf ist möglicherweise an der Aktivierung von Erk in B-Zellen beteiligt

Um die Frage zu beantworten, ob A-Raf für die Phosphorylierung von MEK und somit für die Signalweiterleitung an Erk in B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen verantwortlich ist, wurden diese B-Zellen mit einem A-Raf-Inhibitor behandelt, der in einem geringen Maße auch Raf-1 hemmt (A-Raf>Raf-1). Zusätzlich wurde die Rolle von PI3K in der Signalweiterleitung vom BCR an MEK und Erk in B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen untersucht, da frühere Studien

gezeigt haben, dass BCR-Signale über einen PI3K-abhängigen Signalweg laufen können (Jacob et al., 2002, Guo und Rothstein, 2005).

Dazu wurden B-Zellen aus Kontroll- sowie aus B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen mit einem PI3K-Inhibitor (Vlahos et al., 1994) und zwei Raf-Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden eine BCR-Stimulation und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich um Proteinkinase-Inhibitoren, die an die ATP-bindende Tasche des Enzyms irreversibel binden und es somit in seiner Kinasefunktion hemmen. Als Kontrollen wurden stimulierte und unstimulierte B-Zellen analysiert.

Abbildung 29 zeigt, dass nach Stimulation der B-Zellen die Erk- und MEK-Phosphorylierung stark ansteigt, wogegen sie nach Stimulation und vorheriger Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 gehemmt werden konnte. Die Behandlung der B-Zellen mit dem Raf-1/B-Raf-Inhibitor Sorafenib (Raf-1>B-Raf) hatte auf die Aktivierung des Erk-Signalwegs eher einen verstärkenden Effekt. Die Inkubation der B-Zellen mit dem A-Raf>Raf-1-Inhibitor L779,450 (Shelton et al., 2003, White, 2003) führte nach BCR-Stimulation zu einer starken Hemmung der Erk-Phosphorylierung und zu einer starken Phosphorylierung von A-Raf. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die basale Erk-Phosphorylierung in den unstimulierten B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen höher war als in den unstimulierten Kontroll-B-Zellen. Dies konnte in mehreren Versuchen für die B-Raf/Raf-1-defizienten und auch für die Raf-1-defizienten B-Zellen beobachtet werden (Abbildung 42, Anhang).

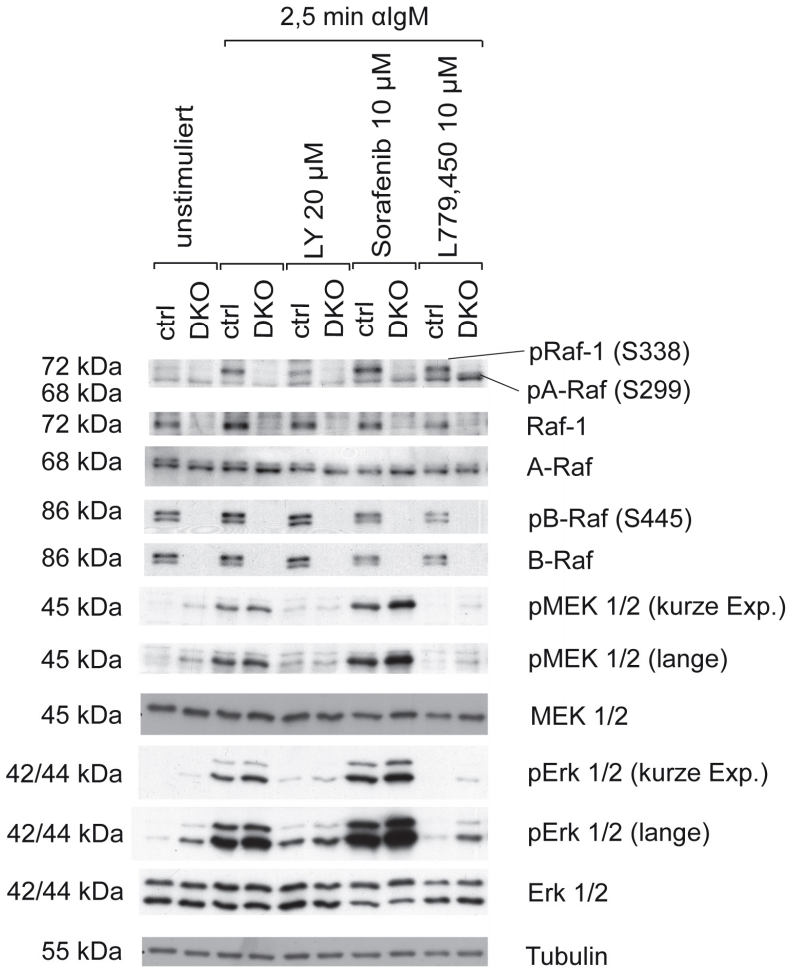


Abbildung 29 Die Aktivierung von Erk nach BCR-Stimulation kann mit einem A-Raf/Raf-1-Inhibitor gehemmt werden. Dargestellt ist ein Western-Blot mit Proteinextrakten aus Kontroll- (ctrl) sowie B-Raf/Raf-1-defizienten (Doppelknockout, DKO) B-Zellen, die für eine Stunde unbehandelt oder mit unterschiedlichen Inhibitoren inkubiert und anschließend unstimuliert oder mit αIgM-Antikörper (2,5 min) stimuliert wurden. Die verwendeten B-Zellen waren reife $CD43^{-}B220^{+}$ B-Zellen aus der Milz. Die Western-Blot-Membran wurde für die Untersuchung mit phosphospezifischen Antikörpern für pRaf-1, pB-Raf, pA-Raf, pMEK und pErk und mit Antikörpern gegen die unphosphorylierten Formen dieser Kinasen inkubiert. LY: PI3K-Inhibitor (LY294002), Sorafenib (Nexavar): Raf-1>B-Raf-Inhibitor, L779,450: A-Raf>Raf-1-Inhibitor; kurze Exp: kurze Belichtungszeit; lange: lange Belichtungszeit. Die untereinander aufgeführten Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert. Zwischen dem Nachweis der phosphorylierten Kinasen und der Detektion der unphosphorylierten Formen der Kinasen wurde die Western-Blot Membran mittels stripping von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Dieses Experiment wurde zwei Mal durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche (Abschnitte 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 und 3.2.4), (I) dass die Aktivierung von Erk nach BCR-Stimulation durch einen B-Raf-Inhibitor gehemmt werden kann, dennoch in B-Raf-defizienten B-Zellen stattfindet. Dies deutet darauf hin, dass der B-Raf-Inhibitor SB-590885 weitere Kinasen, die an diesem Prozess beteiligt sind, hemmt. (II) Sowohl in Raf-1- als auch in B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen wird Erk nach BCR-Stimulation

stärker als in Kontroll-B-Zellen aktiviert. Diese verstärkte Erk-Phosphorylierung konnte ebenso nach Verwendung von Sorafenib, einem Raf-1/B-Raf-Inhibitor, und anschließender BCR-Stimulation von Wildtyp B-Zellen beobachtet werden. (III) Die basale Erk-Phosphorylierung war in unstimulierten B-Raf/Raf-1- und Raf-1-defizienten B-Zellen höher. (IV) Nach Behandlung der Raf-1/B-Raf-defizienten Zellen mit dem A-Raf>Raf-1-spezifischen Inhibitor L779,450 und Stimulation über den BCR konnte die Erk-Aktivierung gehemmt werden. (V) Zudem konnte bestätigt werden, dass die Aktivierung von Erk nach BCR-Stimulation in B-Zellen PI3K-abhängig stattfindet.

Da diese Ergebnisse zeigen, dass B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defiziente B-Zellen über BCR- und CD40-Stimulation aktiviert werden können, kam die Frage auf, ob die Raf-Knockout-Mäuse eine normale Immunantwort in vivo aufweisen.

3.3. Die Rolle von B-Raf und Raf-1 bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort

Um zu untersuchen, ob sich die Abwesenheit von B-Raf, Raf-1 oder von beiden Kinasen auf die Immunantwort in vivo auswirkt, wurden die allgemeinen Immunglobulintiter im Serum und die Immunantwort der Raf-Knockout-Mäuse nach Immunisierung mit einem T-Zell-abhängigen Antigen analysiert.

3.3.1. Die Abwesenheit von Raf-1 und B-Raf führt zu Veränderungen der Immunglobulintiter

Um zu untersuchen, ob die verminderten B-Zellzahlen in der Milz (Abschnitt 3.1.4) und die Abnahme der B1-Zellen (Abschnitt 3.1.9), der natürlichen Antikörper-sezernierenden Zellen, in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen einen Einfluss auf die allgemeinen Immunglobulintiter haben, wurden das Serum von B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sowie von Kontroll-Mäusen auf Immunglobuline untersucht. Hierfür wurden die Konzentrationen der allgemeinen Immunglobulin-Isotypen IgM-, IgG1-, IgG3-, IgG2a-, IgG2b- und IgA bestimmt. Natürliche Antikörper werden in unimmunisierten Mäusen von B1- und Marginalzonen-B-Zellen sezerniert (Boes et al., 1998, Ochsenbein et al., 1999, Martin et al., 2001). Dabei sind B1-Zellen dafür bekannt besonders natürliche Antikörper der Isotypen IgM und IgG3 zu sezernieren (Sidman et al., 1986). Bei reduzierten B1-Zellen sind vor allem die IgM-Titer in Mäusen reduziert. Das Ergebnis zeigt allerdings, dass die IgG2a- und IgG2b-Titer in den B-

Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen signifikant erhöht sind, wobei die IgM- und IgG3-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle unverändert blieben (Abbildung 30). Die B-Raf- und Raf-1-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen keine Veränderungen ihrer Immunglobulintiter.

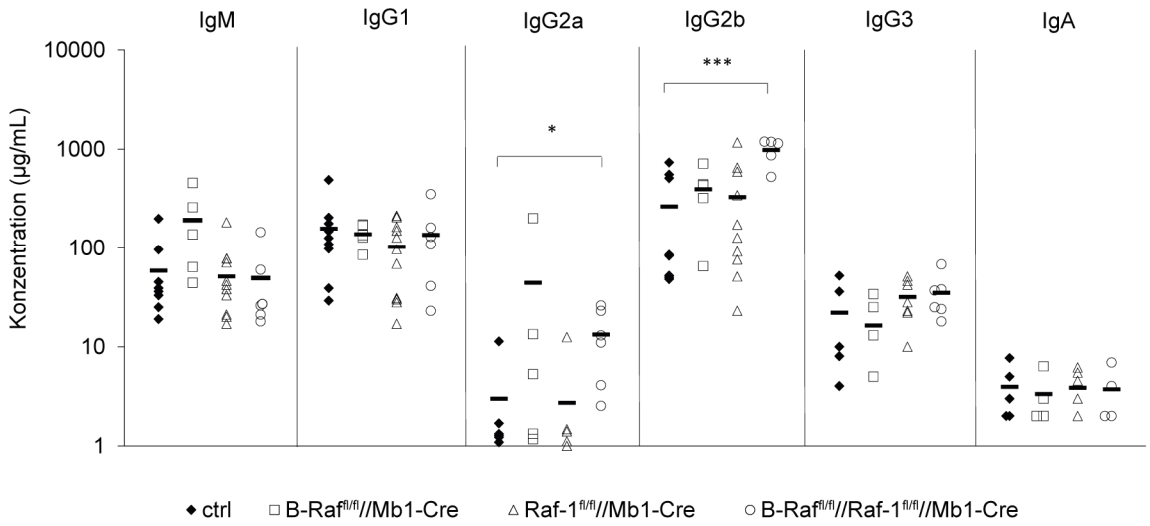


Abbildung 30 Selektiv erhöhte Immunglobulintiter in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen. Der Graph zeigt die Konzentration (µg/mL; logarithmische Skalierung) der allgemeinen Immunglobulintiter IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgA im Serum von Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen. Die Titer wurden mittels ELISA bestimmt. Mindestens fünf Mäuse pro Genotyp wurden analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. *p≤0,05; ***p≤0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.2. Raf-Knockout-Mäuse bilden Keimzentren

Um zu untersuchen, ob die B-Zell-spezifische Abwesenheit von B-Raf, Raf-1 und B-Raf/Raf-1 zu einer veränderten Keimzentrumsreaktion führt, wurden B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse mit Hühner-Gammaglobulin-konjugiertem Nitrophenylacetyl (NP-CGG), welches eine T-Zell-abhängige (TD) Immunantwort auslöst, immunisiert. Nach 14 Tagen wurden der Anteil sowie die Gesamtzellzahl von Keimzentrums-B-Zellen (PNA^{high}CD95^{+}) der Milz ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die B-Raf- und Raf-1-Knockout- als auch die Doppelknockout-Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Mäusen vergleichbare prozentuale Anteile von PNA^{high}CD95^{+} B-Zellen nach Immunisierung bildeten (Abbildung 31 A).

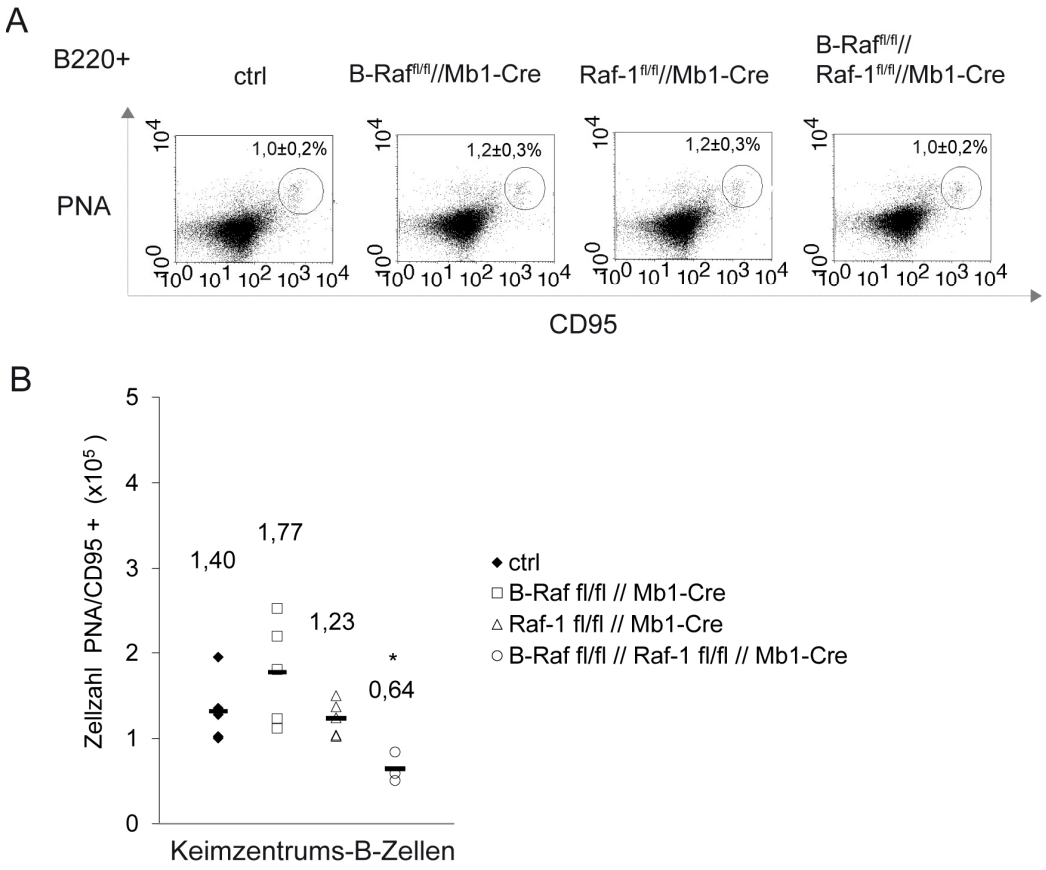


Abbildung 31 B-Zell-spezifische Raf-Knockout-Mäuse bilden Keimzentren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung. Kontroll-Mäuse (ctrl), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäuse wurden mit NP-CGG T-Zell-abhängig immunisiert und 14 Tage danach auf Keimzentren untersucht. Abbildungsteil **(A)** zeigt die durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten aus der Milz, die mit α-B220-, α-CD95-Antikörpern und PNA (peanut agglutinin, Erdnussagglutinin) angefärbt wurden. Keimzentrums-B-Zellen sind PNA^{high}CD95^{+}. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen prozentualer Anteile dieser Zellen von der B220^{+} Lymphozytenpopulation. Abbildungsteil **(B)** zeigt die Gesamtzellzahlen an Keimzentrums-B-Zellen. Es wurden drei bis fünf Mäuse pro Genotyp analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. *p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Berechnung der Gesamtzellzahlen von PNA^{high}CD95^{+} ergab, dass die B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse um ca. die Hälfte reduzierte Keimzentrums-B-Zellzahlen im Vergleich zu den Einzelknockout- sowie zu den Kontroll-Mäusen aufwiesen (Abbildung 31 B).

Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass die B-Zellzahl in der Milz und demzufolge Milzgröße und Milzgewicht in diesen Mäusen stark vermindert sind (Abschnitt 3.1.4).

Außerdem wurden die Keimzentrumsbildung und -struktur in der Milz immunhistologisch analysiert. Hierfür wurden Keimzentren in Gefrierschnitten mit PNA (peanut agglutinin), einem Keimzentrumsmarker, gefärbt und somit sichtbar gemacht (Rose et al., 1980, Rose

und Malchiodi, 1981). Die Keimzentren waren sowohl bei den Einzel- als auch bei den Doppelknockout-Mäusen mit denen von Kontroll-Mäusen vergleichbar (Abbildung 32).

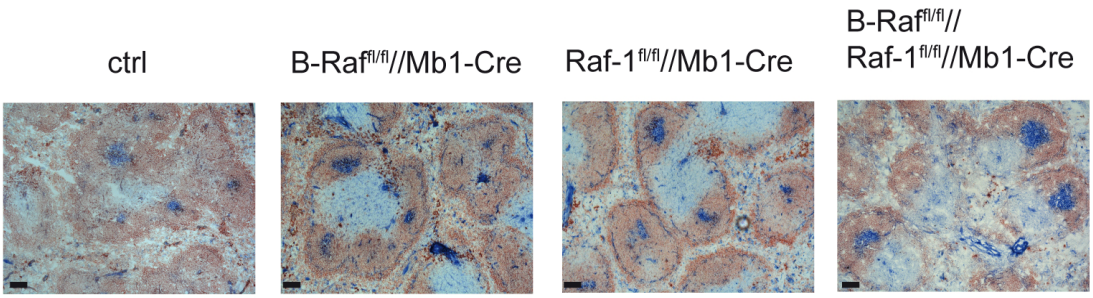


Abbildung 32 Raf-Knockout-Mäuse bilden Keimzentren. Kontroll-Mäuse (ctrl), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäuse wurden mit NP-CGG T-Zell-abhängig immunisiert und 14 Tage danach auf Keimzentren untersucht. Die Abbildung zeigt immunhistologisch angefärbte Gefrierschnitte von Milzorganen dieser Mäuse, die mit PNA (Keimzentren, blau) und mit α-IgM-Antikörpern (B-Zellen, rot) angefärbt wurden. Diese Untersuchung wurde mit zwei Mäusen pro Genotyp durchgeführt. Maßstab 100 µm; 10 × Vergrößerung.

3.3.3. Antigen-spezifische Antikörpertiter und die Affinitätsreifung sind in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen reduziert

Um zu untersuchen, ob die Antigen-spezifischen (NP-) Antikörpertiter und die Affinitätsreifung der Antigen-spezifischen Antikörper in B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen nach Immunisierung normal sind, wurden die Titer der NP_3- (hochaffinen) und NP_{17}-(niedrig- und hochaffinen) spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper bestimmt. Diese Untersuchung ergab, dass die Konzentration sowohl von NP-spezifischen IgM- als auch IgG1-Antikörpern im Serum von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen signifikant vermindert war, wogegen die NP-spezifischen Antikörpertiter in B-Raf- und Raf-1-Knockout-Mäusen vergleichbar mit denen der Kontroll-Mäuse waren (Abbildung 33).

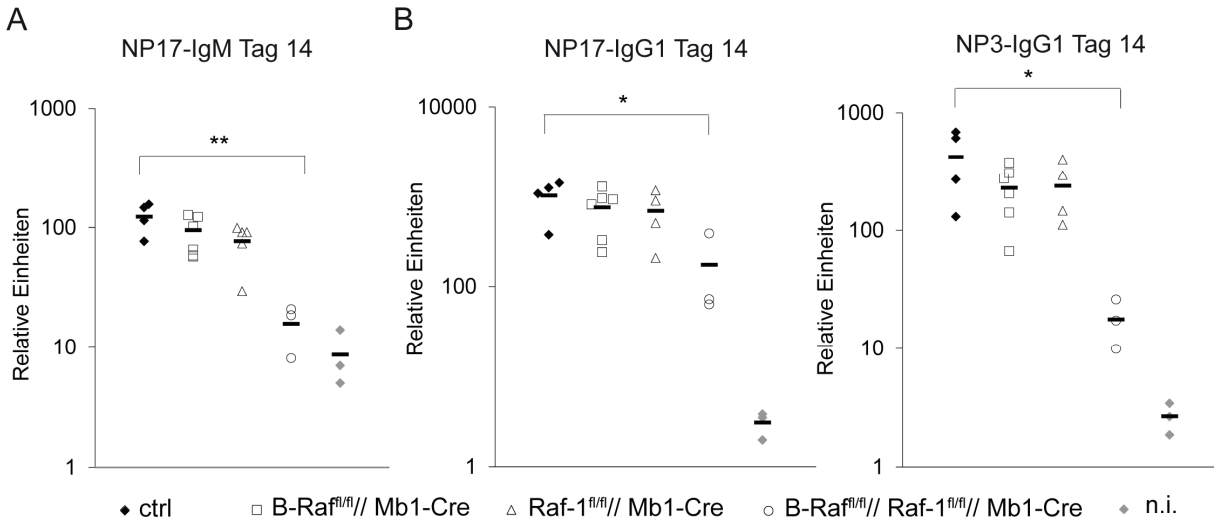


Abbildung 33 B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigen nach Immunisierung reduzierte Antigen-spezifische IgM- und IgG1-Antikörpertiter. Abbildungsteil **(A)** zeigt den relativen Gehalt an niedrig- und hochaffinen (NP17) Antigen-spezifischen IgM-Antikörpern im Serum von Kontroll-Mäusen (ctrl), B-Raf- (B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre), Raf-1- (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) und B-Raf/Raf-1- (B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre) Knockout-Mäusen, die 14 Tage zuvor immunisiert wurden und von unimmunisierten Kontroll-Mäusen (n.i.). Abbildungsteil **(B)** zeigt den relativen Gehalt an niedrig- und hochaffinen (NP17) und hochaffinen (NP3) Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern ebenfalls 14 Tage nach Immunisierung im Serum dieser Mäuse. Es wurden drei bis sechs Mäuse pro Genotyp analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. *p≤0,05, **p≤0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Der Grad an Affinitätsreifung kann bei Antikörpern anhand eines Quotienten aus den relativen Einheiten von NP_3- (hochaffinen) und NP_{17}- (niedrig- und hochaffinen) Antikörpern ermittelt werden. Je kleiner der Quotient, desto kleiner ist der Anteil hochaffiner NP-spezifischer Antikörper an den gesamten NP-spezifischen Antikörpern. B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse wiesen in ihrem Serum signifikant weniger NP_3-spezifische Antikörper des IgG1-Isotyps im Vergleich zu Kontroll-Mäusen auf; die Affinitätsreifung von Antikörpern des IgG1-Isotyps war demnach bei diesen Mäusen im Vergleich zu den anderen Genotypen signifikant beeinträchtigt (Abbildung 34). Die B-Raf- und Raf-1-Knockout-Mäuse haben dagegen lediglich eine sehr leichte, aber nicht signifikante Reduktion in der Affinitätsreifung im Vergleich zur Kontrolle gezeigt.

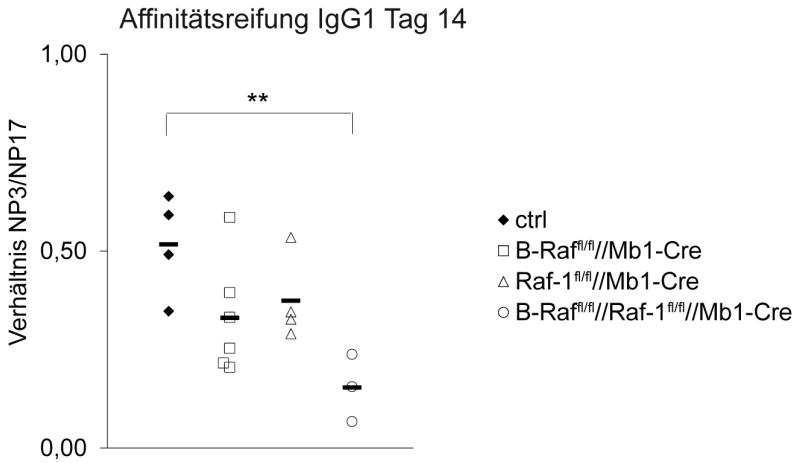


Abbildung 34 Die Affinitätsreifung von Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern ist in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen stark beeinträchtigt. Gezeigt sind die Quotienten aus dem Gehalt an niedrig- und hochaffinen (NP3) und hochaffinen (NP17) IgG1-Antikörpern (NP3/NP17 IgG1) an Tag 14 nach TD-Immunisierung von Kontroll- (ctrl), B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre-, Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre- und B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre-Mäusen. Der Quotient aus NP3/NP17 ist ein Indikator für den Grad an Affinitätsreifung. Je höher der Quotient aus NP3/NP17 ist, desto besser ist die Affinitätsreifung der untersuchten Antikörper. Es wurden drei bis sechs Mäuse pro Genotyp analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. **p≤0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

3.4. Die Rolle der Raf-Kinasen in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Aktivierung und -Expansion

Der in unserer Arbeitsgruppe generierte LMP1/CD40-Mausstamm (Abschnitt 1.6.2) exprimiert das Fusionsprotein LMP1/CD40 nach Verkreuzung mit CD19cre-Mäusen B-Zell-spezifisch. Diese LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ Mäuse weisen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen (CD19cre$^{+/-}$) eine B-Zell-Expansion auf, die zu einer Splenomegalie und zu vergrößerten Lymphknoten führt. LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ (LMP1/CD40-exprimierende) Mäuse zeigen deutlich erhöhte B- und T-Zellzahlen in diesen Organen, wobei deren B-Zellen einen aktivierten Phänotyp aufweisen. 50 % der LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse, die älter als ein Jahr sind, entwickeln B-Zell-Lymphome (Homig-Holzel et al., 2008). Caroline Hojer zeigte im Rahmen ihrer Doktorarbeit, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Lymphozyten der nicht-kanonische NF-κB-Weg sowie die MAP-Kinasen Jnk und Erk selektiv aktiviert sind. Die konstitutive Erk-Phosphorylierung scheint dabei eine entscheidende Rolle für das verbesserte Überleben LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen in vitro zu spielen (Homig-Holzel et al., 2008).

Da ein deregulierter Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg an der Entstehung vieler Tumoren beteiligt ist (Wan et al., 2004, McCubrey et al., 2007, Weinberg, 2007), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit die Raf-Kinasen bei der konstitutiven Aktivierung von Erk in LMP1/CD40-Zellen involviert sind und somit zur Lymphomentstehung beitragen könnten.

3.4.1. Prämaligne LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen haben veränderte Raf-Kinase Aktivierungsmuster

Um zu untersuchen, ob Raf stromaufwärts von MEK und Erk in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ebenfalls konstitutiv aktiv ist, wurden B-Zellen aus der Milz von 16 Wochen alten Mäusen, die entweder LMP1/CD40 exprimieren (LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$) oder Kontroll-B-Zellen (CD19cre$^{+/-}$; ctrl) mittels Western-Blot auf die Expression von Erk, Raf-1 und B-Raf und deren aktive, phosphorylierte Formen getestet (Abbildung 35 A). Die erhöhte Phosphorylierung von Erk konnte in den prämalignen LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen (L/C) im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen (ctrl) bestätigt werden. Raf-1 war in den Extrakten aus LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen verstärkt an seiner aktivierenden Stelle S338 phosphoryliert, wogegen B-Raf in allen Proben vergleichbar phosphoryliert war.

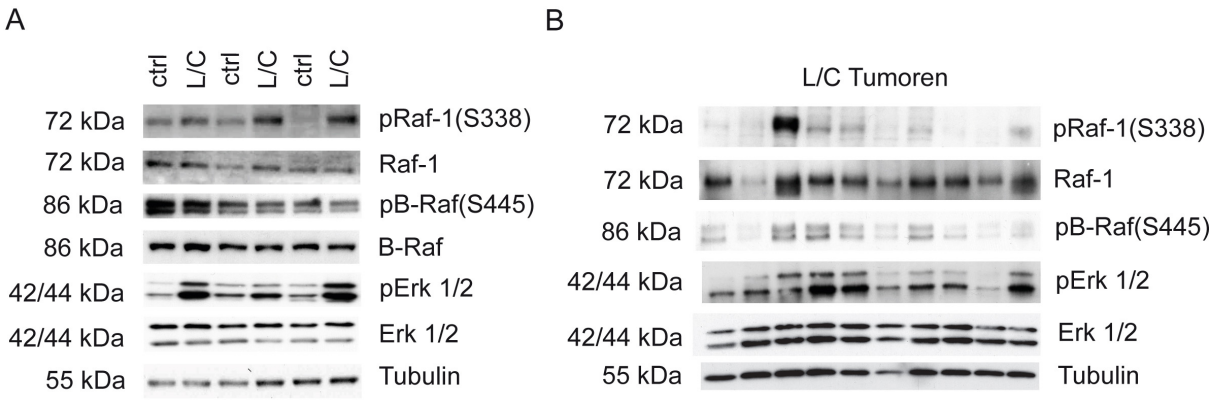


Abbildung 35 Raf-Kinasen sind in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen und Lymphomen unterschiedlich aktiviert. Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus prämalignen, MACS-isolierten B-Zellen (CD43^{-}B220^{+}) aus 16 Wochen alten LMP1/CD40-Mäusen (L/C) und Kontroll-Mäusen (ctrl) **(A)** und aus zehn unterschiedlichen Lymphomen von LMP1/CD40-Mäusen (L/C Tumoren) **(B)**. Analysiert wurde die Phosphorylierung von Raf-1, B-Raf und Erk sowie die basale Expression dieser Kinasen. Die untereinander aufgeführten Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert. Zwischen dem Nachweis der phosphorylierten Formen und der Detektion der unphosphorylierten Formen der Proteine wurden die Western-Blot Membranen mittels stripping von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

Da auch Proteinexpressionsprofile von Tumoren Aufschluss darüber geben können, welche Signalwege insbesondere für die Erhaltung der Tumorzellen essentiell sind, wurden Proteinextrakte von malignen B-Zellen aus LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ Mäusen, die ein B-Zell-Lymphom entwickelt hatten (L/C Tumoren), ebenfalls auf die Expression und Aktivierung der Raf-Kinasen untersucht (Abbildung 35 B). In den Tumorproben konnte kein konsistentes Expressions- und Aktivierungsprofil von Erk, Raf-1 und B-Raf nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Raf-1 möglicherweise bei der aberranten Aktivierung von Erk in prämalignen LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen beteiligt ist, aber keine essentielle Rolle bei der Erk-Aktivierung in Tumorzellen zu spielen scheint.

3.4.2. Die LMP1/CD40-vermittelte Aktivierung des Erk-Signalwegs lässt sich durch Raf-Kinase Inhibitoren hemmen

Um herauszufinden, ob Raf-Kinasen bei der Signaltransduktion LMP1/CD40-exprimierender B-Zellen eine Rolle spielen, wurden diese B-Zellen mit spezifischen Kinase-Inhibitoren behandelt und die Aktivität des Erk-Signalwegs untersucht. Der Western-Blot in Abbildung 36 zeigt, dass unbehandelte LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von MEK und Erk im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-B-Zellen aufweisen. Als Positiv-Kontrolle für die Inhibition der Erk-Aktivierung wurde der PI3K-Inhibitor LY294002 und der MEK-Inhibitor UO126 verwendet. Für diese beiden Inhibitoren konnte in unserer Arbeitsgruppe schon gezeigt werden, dass sie die Phosphorylierung von Erk in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hemmen.

Die Inkubation der L/C-Zellen mit spezifischen Raf-Kinase-Inhibitoren ergab, dass Sorafenib (Raf-1>B-Raf), GW5074 (Raf-1) und Geldanamycin (Raf-1) keinen Einfluss auf die Erk-Phosphorylierung haben (Abbildung 36). Dagegen bewirkte die Behandlung der Zellen mit dem B-Raf-Inhibitor SB-590885 einen starken Rückgang der Erk-Phosphorylierung. Dies war ein erster Hinweis, dass die Phosphorylierung von Erk in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in erster Linie abhängig von B-Raf ist und nach Hemmung von Raf-1 nicht reduziert werden kann.

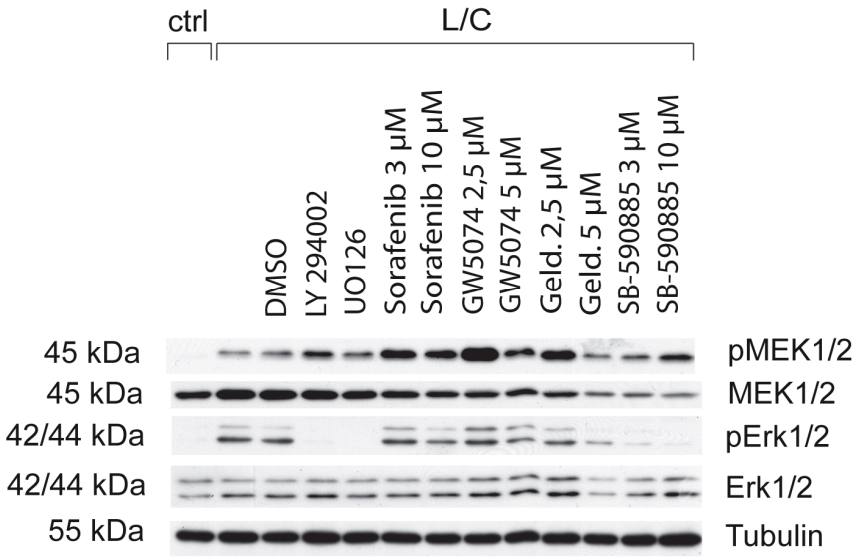


Abbildung 36 Die Phosphorylierung von Erk in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen wird durch Raf-Kinase-Inhibitoren reduziert. Proteinextrakte aus unstimulierten Kontroll- (CD19cre +/-; ctrl) und LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen (L/C), die unbehandelt, nur mit DMSO oder mit LY294002 (PI3K-Inhibitor), UO126 (MEK-Inhibitor), Sorafenib (Raf-1 > B-Raf), GW5074 (Raf-1-Inhibitor), Geldanamycin (Raf-1-Inhibitor) und SB-590885 (B-Raf-Inhibitor) inkubiert wurden. Anschließend wurde mittels Western-Blot die Expression und Phosphorylierung von MEK und Erk untersucht. Die untereinander aufgeführten Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert. Zwischen dem Nachweis der phosphorylierten Formen und der Detektion der unphosphorylierten Formen der Proteine wurde die Western-Blot Membran mittels stripping von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Der Versuch wurde vier Mal durchgeführt.

3.4.3. B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende Mäuse zeigen Splenomegalie und erhöhte B-Zellzahlen

Um herauszufinden, ob B-Raf tatsächlich für die Signalweiterleitung von LMP1/CD40 an Erk, die stromaufwärts über CD19 und PI3K stattfindet, verantwortlich ist, wurden Mäuse untersucht, die B-Zell-spezifisch defizient für B-Raf und profizient für LMP1/CD40 sind (B-Raf$^{fl/fl}$//LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$). Die in den B-Zellen dieser Mäuse exprimierte Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD19-Promotors sorgt dafür, dass B-Zell-spezifisch die STOPP-Kassette vor der Sequenz von LMP1/CD40 entfernt wird (Abschnitt 1.6.2) und die Sequenz zwischen den loxP-flankierten Stellen in beiden B-Raf-Allelen deletiert wird (Abschnitt 1.6.1). Somit wird B-Zell-spezifisch die Expression von LMP1/CD40 angeschaltet bzw. B-Raf nicht mehr exprimiert. B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende Mäuse (B-Raf$^{fl/fl}$//LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$) wurden zusammen mit B-Raf-profizienten LMP1/CD40-exprimierenden (LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$), B-Raf-defizienten- (B-Raf$^{fl/fl}$//CD19cre$^{+/-}$) und

Kontroll-Mäusen (CD19cre$^{+/-}$; ctrl) in Hinblick auf Milzgröße, Milzgewicht und B-Zellzahlen in diesem Organ untersucht. Abbildung 37 A und B zeigen, dass LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ und B-Raf$^{fl/fl}$//LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ Mäuse eine ähnlich vergrößerte Milz im Vergleich zu CD19cre$^{+/-}$ (ctrl) und B-Raf$^{fl/fl}$//CD19cre$^{+/-}$ Mäusen haben. Die Splenomegalie der LMP1/CD40-exprimierenden B-Raf-profizienten und -defizienten Mäuse wird durch eine B-Zell-Expansion verursacht, was an den dreifach erhöhten B-Zellzahlen in der Milz zu erkennen ist (Abbildung 37 C). Die B-Zellzahlen der B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse sind im Vergleich zu den B-Raf-profizienten LMP1/CD40-exprimierenden Tiere lediglich tendenziell vermindert. Dies deutet darauf hin, dass B-Raf höchstwahrscheinlich nicht allein für die Weiterleitung der Signale von LMP1/CD40 über CD19 an Erk und somit nur zum Teil für die aberrante Aktivierung dieses Signalwegs und die B-Zell-Expansion in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen verantwortlich ist.

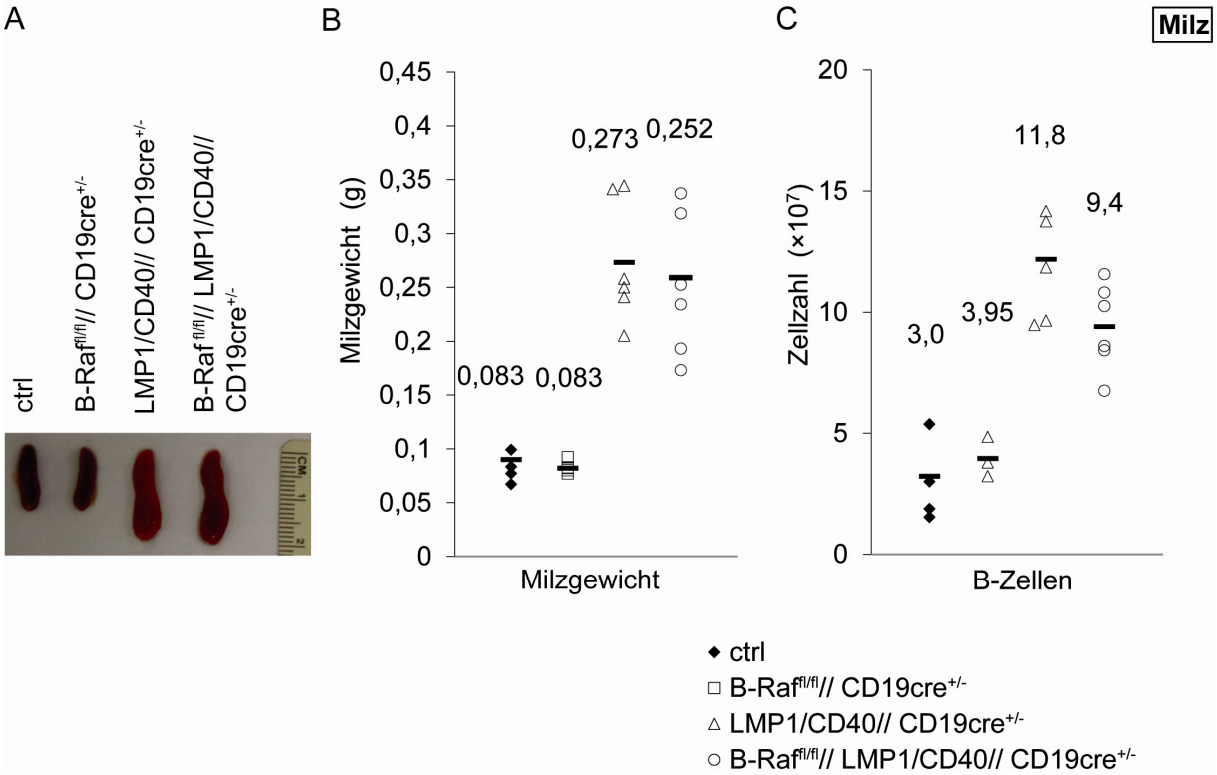


Abbildung 37 LMP1/CD40-exprimierende B-Raf-defiziente Mäuse weisen eine Splenomegalie und erhöhte B-Zellzahlen auf. Abbildungsteil **(A)** zeigt ein Bild der Milzorgane von CD19cre$^{+/-}$ (ctrl), B-Raf$^{fl/fl}$//CD19cre$^{+/-}$, LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ und B-Raf$^{fl/fl}$//LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ Mäusen. Teil **(B)** zeigt die Milzgewichte und Teil **(C)** zeigt die B-Zellzahlen dieser Mäuse. Es wurden sechs Mäuse für LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ und B-Raf$^{fl/fl}$//LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ und vier bzw. drei für CD19cre$^{+/-}$ und B-Raf$^{fl/fl}$//CD19cre$^{+/-}$ analysiert. Durchschnittswerte sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

3.4.4. B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende Mäuse haben eine expandierte Marginalzonen-B-Zellpopulation

LMP1/CD40-exprimierende Mäuse besitzen eine aberrante, Marginalzonen-B-Zell-ähnliche Population ($CD21^{high}CD23^{mid}$), deren CD23-Expression niedrig ist. Um zu untersuchen, ob eine B-Raf-Inaktivierung in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen eine Verschiebung der reifen B-Zellpopulationen verursacht, wurden B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende ($B\text{-}Raf^{fl/fl}$//LMP1/CD40//$CD19cre^{+/-}$) Mäuse im Vergleich zu LMP1/CD40-exprimierenden (LMP1/CD40//$CD19cre^{+/-}$), B-Raf-defizienten ($B\text{-}Raf^{fl/fl}$//$CD19cre^{+/-}$) und $CD19cre^{+/-}$ Mäusen auf Marginalzonen- (MZB) und follikuläre (Fo) B-Zellen untersucht.

Abbildung 38 zeigt, dass B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende Mäuse, ähnlich wie B-Raf-profiziente LMP1/CD40-Mäuse, eine aberrante $CD21^{high}CD23^{mid}$ Population im Vergleich zu B-Raf-defizienten und $CD19cre^{+/-}$ Mäusen aufweisen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine B-Raf-Defizienz in den LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen das Auftreten der MZB-ähnlichen Population nicht beeinflusst.

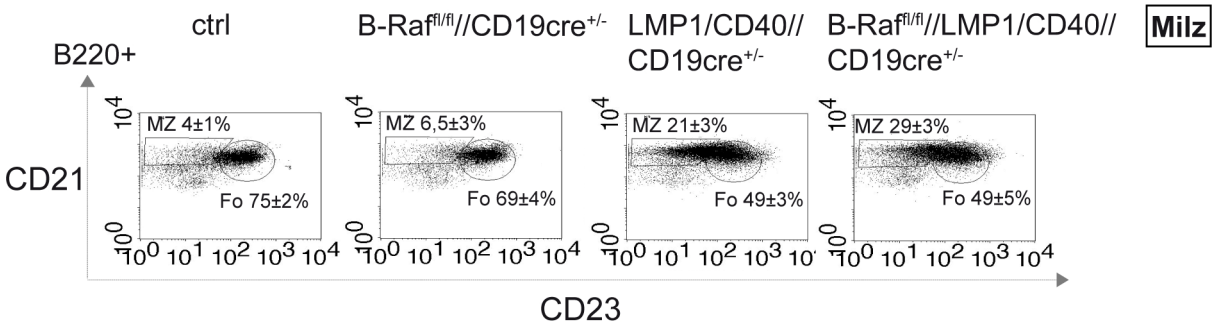


Abbildung 38 Die B-Raf-Deletion in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen hat keinen Einfluss auf die Expansion der Marginalzonen-B-Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse von $B220^{+}$ Lymphozyten zeigt die prozentualen Anteile der Marginalzonen-B-Zellen (MZ, $CD21^{high}CD23^{low}$) und der follikulären B-Zellen (Fo, $CD21^{+}CD23^{+}$) von Kontroll- (ctrl; $CD19cre^{+/-}$), B-Zell-spezifischen B-Raf-defizienten Mäusen ($B\text{-}Raf^{fl/fl}$//$CD19cre^{+/-}$) sowie LMP1/CD40-exprimierenden (LMP1/CD40//$CD19cre^{+/-}$) und B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden ($B\text{-}Raf^{fl/fl}$//LMP1/CD40//$CD19cre^{+/-}$) Mäusen. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen. Prozentuale Anteile beziehen sich auf $B220^{+}$ Lymphozyten.

3.4.5. B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zeigen eine konstitutive Aktivierung des Erk-Signalwegs

Da das Milzgewicht und die Milzgröße sowie das Ausmaß der B-Zell-Expansion in B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen dem Phänotyp von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen glich, wurde untersucht, ob Erk in den B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen immer noch konstitutiv aktiviert vorliegt. Als Kontrolle wurden B-Zellen aus CD19cre$^{+/-}$ und B-Raf$^{fl/fl}$//CD19cre$^{+/-}$ in diesem Versuch mitgeführt. Abbildung 39 A zeigt, dass sowohl in den B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen als auch in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen, verglichen mit den B-Raf-defizienten- und CD19$^{+/-}$ B-Zellen, Erk und MEK in höherem Maße phosphoryliert vorliegen.

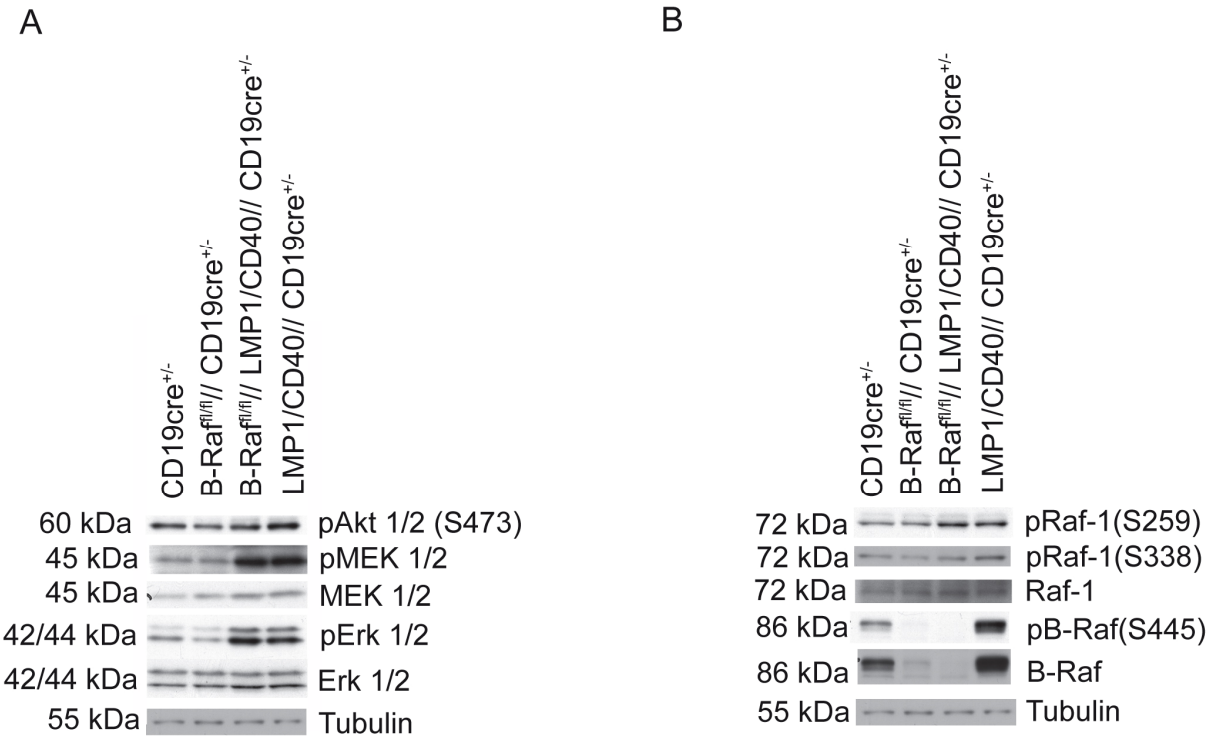


Abbildung 39 B-Raf-defiziente LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zeigen eine konstitutive Aktivierung des Erk-Signalwegs. Proteinextrakte aus isolierten Kontroll- (ctrl) und B-Raf-defizienten B-Zellen (B-Raf$^{fl/fl}$//CD19cre$^{+/-}$) sowie aus LMP1/CD40-exprimierenden B-Raf-defizienten und B-Raf-profizienten B-Zellen wurden mittels Western-Blot auf die Phosphorylierung von MEK und Erk **(A)** und Raf-1 und B-Raf **(B)** untersucht. Die untereinander aufgeführten Proteine wurden auf einer einzigen Membran detektiert. Zwischen dem Nachweis der phosphorylierten Formen und der Detektion der unphosphorylierten Formen der Proteine wurde die Western-Blot Membran mittels stripping von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

Zudem konnte ich zeigen, dass neben Erk auch Akt (Abbildung 39 A) und die Akt-Zielproteine mTOR (mammalian target of rapamycin), p70 (S6-Kinase) und GSK3 (Glykogen Synthase Kinase-3), in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hyperphosphoryliert vorliegen (Abbildung 43, Anhang). Ein hyperaktivierter Akt/mTOR-Signalweg ist für die Entwicklung und das Fortschreiten einer Vielzahl von Tumoren verantwortlich, darunter auch hämatologische Neoplasien (Kawauchi et al., 2009). Da bekannt ist, dass Akt Raf-1 an der inhibitorischen Stelle Ser259 phosphoryliert, wurde untersucht ob Raf-1 nicht nur an einer aktivierenden, sondern auch an einer inhibitorischen Stelle phosphoryliert ist. Abbildung 39 B zeigt, dass Raf-1 sowohl in den B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden als auch in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen an seiner inhibitorischen Stelle S259 phosphoryliert ist. Zudem ist in Abbildung 39 B zu sehen, dass B-Raf in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in höherem Maße an S445 phosphoryliert ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass trotz einer B-Raf-Deletion in den B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen der Erk- und der Akt-Signalweg, ähnlich wie in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen, konstitutiv aktiv ist. Des Weiteren ist Raf-1 sowohl an einer aktivierenden als auch inhibitorischen Stelle phosphoryliert, obwohl die Hyperphosphorylierung in diesem Experiment nicht so deutlich wie in einem vorhergehenden Experiment zu sehen war (Abbildung 35 A). B-Raf liegt dagegen in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hyperphosphoryliert vor, was bedeuten könnte, dass die Signalweiterleitung von LMP1/CD40 zu Erk über B-Raf stattfindet. Dies wird durch die Ergebnisse der Inhibitorexperimente unterstützt (Abbildung 36). Allerdings scheint B-Raf allein nicht für die Signalweiterleitung zuständig zu sein, da der Phänotyp von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen durch eine B-Raf-Inaktivierung nicht revertiert werden kann. (Hein et al., 1998, Xu et al., 2000)

4 Diskussion

B-Zellen sind während ihrer Reifung und Aktivierung von vielen Signalen, die u.a. vom BCR (Benschop und Cambier, 1999, King und Monroe, 2000, Niiro und Clark, 2002) und weiteren B-Zell-spezifischen Rezeptoren wie CD19 (Rickert et al., 1995, Sato et al., 1995, Rickert et al., 1997, Sato et al., 1997, Otero et al., 2001) sowie von CD40 ausgehen, abhängig (Banchereau et al., 1994, van Kooten und Banchereau, 2000). Stimulierung dieser Rezeptoren führt zur Aktivierung vieler Signalwege, deren Aktivität einer strengen und sehr feinabgestimmten Regulation unterworfen ist. Störungen in diesen feinabgestimmten Netzwerken können zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder zur Entstehung von B-Zell-Tumoren führen. Sowohl BCR- als auch CD40-Signale führen zur Aktivierung des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs. Dieser Signalweg ist in vielen Tumorarten, einschließlich Leukämien und Lymphomen, hyperaktiv (Radich et al., 1990, Smith et al., 2003, Zheng et al., 2003, Ricciardi et al., 2005) und stellt daher einen pharmakologischen Angriffspunkt in der Therapie vieler Krebserkrankungen dar (Beeram et al., 2003, Sridhar et al., 2005, McCubrey et al., 2009).
Über die Rolle des Ras-Raf-Mek-Erk-Signalwegs in B-Zellen sowie in der B-Zell-Lymphomentstehung ist allerdings noch wenig bekannt. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Auswirkung die Inaktivierung von Raf-1 und B-Raf auf die Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen sowie bei der LMP1/CD40-induzierten aberranten Aktivierung von B-Zellen hat.

4.1. Die Rolle von Raf bei der normalen B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung

Säugetiere exprimieren alle drei Raf-Kinasen, A-Raf, B-Raf und Raf-1; jedoch ist deren Expression gewebsspezifisch. In Lymphozyten wurde bisher lediglich die Expression von B-Raf und Raf-1 beschrieben (Brummer et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass murine B-Zellen neben B-Raf und Raf-1 auch A-Raf exprimieren. Um die Rolle von B-Raf und Raf-1 in der B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung in Mäusen zu untersuchen, wurden B-Raf$^{fl/fl}$-, Raf-1$^{fl/fl}$- und B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$-Mäuse mit Mb1-Cre$^{+/-}$ (im folgenden Mb1-Cre) verpaart. Die Nachkommen exprimierten B-Zell-spezifisch die Cre-Rekombinase, was zur Deletion des loxP-flankierten Bereichs im jeweiligen *Raf*-Lokus ab dem frühen Pro-B-Zell-Stadium führte.

4.1.1. Die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark ist Raf-1-abhängig

Die Inaktivierung von Raf-1- und B-Raf/Raf-1 führte zu einer verminderten B-Zell-Entstehung im Knochenmark, wogegen die B-Zell-Entwicklung in B-Raf-Knockout-Mäusen vergleichbar wie in Kontroll-Mäusen ablief. Die erheblich reduzierte Anzahl von kleinen Prä- und unreifen B-Zellen in Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sowie die deutliche Zunahme der Pro- und großen Prä-B-Zellen in den Doppelknockout-Mäusen wiesen darauf hin, dass die B-Zell-Entwicklung im Übergang von Pro-/großen Prä- zu kleinen Prä-/unreifen B-Zellen partiell blockiert ist.

Die B-Zell-Entwicklung findet in aufeinander folgenden Schritten statt, die damit beginnen die V-, D- und J-Gensegmente des Immunglobulin schwere Kette Lokus umzubauen und die Immunglobulin schwere Kette (IgH) zu synthetisieren (Hardy und Hayakawa, 2001). Anschließend wird ein Prä-BCR zusammengebaut und auf der Oberfläche der B-Zelle exprimiert. Dieser Prä-BCR stimuliert den Umbau der leichten Immunglobulinkettengene (IgL) (Meffre et al., 2000). Prä-BCR-Signale vermitteln zudem die Proliferation von großen Prä-B-Zellen und sind in Differenzierungsprozessen von großen zu kleinen Prä-B-Zellen involviert (Kitamura et al., 1992, Burrows et al., 2002, Herzog et al., 2009). Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg bei diesen Proliferations- und Differenzierungsprozessen eine entscheidende Rolle spielt (Fleming und Paige, 2001, Yasuda et al., 2008). Mäuse mit einer B-Zell-spezifischen Defizienz von Erk zeigten einen Differenzierungsblock und einen Proliferationsdefekt im Pro-B-Zell-Stadium (Yasuda et al., 2008). Zudem führt die Expression einer dominant negativen Form von Ras (RasDN) zu einem Block in der B-Zell-Entwicklung im Übergang vom Pro- zum Prä-B-Zellstadium. Dieser Differenzierungsblock kann durch die Expression von konstitutiv aktivem Raf-1 wieder aufgehoben werden (Iritani et al., 1997).

Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass die Deletion von Raf-1 und im verstärkten Maße die gleichzeitige Deletion von B-Raf und Raf-1 zu einem partiellen Block in der B-Zell-Entwicklung im Übergang von großen Prä- zu kleinen Prä-B-Zellen führt. In Mausmutanten von Rag-1 und Rag-2 (Mombaerts et al., 1992, Shinkai et al., 1992) und Igβ (Gong und Nussenzweig, 1996) ist die B-Zell-Entwicklung ebenfalls in diesem Entwicklungsstadium gestört, allerdings liegt in diesen Mäusen ein vollständiger Differenzierungsblock vor. Im Differenzierungsstadium der großen Prä-B-Zellen sind B-Zellen zum ersten Mal von Prä-BCR-Signalen abhängig, die zusammen mit IL-7 die Proliferation dieser B-Zellen bewirken

(Fleming und Paige, 2001, Yasuda et al., 2008). Die Deletion von Raf-1- bzw. B-Raf/Raf-1- führt möglicherweise zu einem abgeschwächten Prä-BCR-Signal. Dies könnte dazu führen, dass die großen Prä-B-Zellen vermindert proliferieren und deshalb die Anzahl der kleinen Prä-B-Zellen und infolgedessen der unreifen B-Zellen geringer sind.

Alternativ könnte der B-Zell-spezifische Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout zu einer verstärkten Apoptose in den frühen B-Zellen führen. Raf-1-defiziente Kardiomyozyten und fötale Leberzellen wurden als apoptotisch beschrieben (Mikula et al., 2001, Yamaguchi et al., 2004). Raf-1 besitzt Funktionen, die mit der Verhinderung von Apoptose in Verbindung stehen, und zwar phosphoryliert diese Kinase Bad an der Mitochondrienmembran, was dazu führt, dass Bad von der Mitochondrienmembran dissoziieren kann und infolgedessen die Apoptose verhindert wird. Ferner bindet Raf-1 an Ask1 und Mst2, so dass diese Proteine nicht mit ihren Zielproteinen interagieren können, was ebenfalls der Apoptose bei Zellstress entgegenwirkt (Mikula et al., 2001, O'Neill et al., 2004, Yamaguchi et al., 2004, McCubrey et al., 2007). Da jedoch der Phänotyp von Raf-1- und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen dem von B-Zell-spezifischen Erk-Knockout- und RasDN-Mäusen sehr ähnlich ist, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Phänotyp auf eine verminderte Erk-Aktivierung über Prä-BCR-Signale zurückzuführen ist.

Die verminderten B-Zellzahlen im Knochenmark von Raf-Knockout-Mäusen sind nicht nur auf eine Störung der B-Zell-Entwicklung, sondern teilweise auch auf eine verminderte Anzahl rezirkulierender B-Zellen in Raf-1- und B-Raf-Knockout-Mäusen sowie in Doppelknockout-Mäusen, in denen dieser Phänotyp sogar stärker ausgeprägt war, zurückzuführen. Bei rezirkulierenden B-Zellen, einer B-Zellpopulation die besonders abhängig von BCR-Signalen ist (Lam et al., 1997, Turner et al., 1997), verursacht die Deletion von lediglich einer der Kinasen, Raf-1 oder B-Raf, bereits eine Abnahme der Zellzahlen. Dies deutet darauf hin, dass bei der Aufrechterhaltung dieser B-Zellen Raf-1 und B-Raf nur teilweise redundant wirken.

4.1.2. B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigen eine starke Abnahme der follikulären B-Zellen

B-Zellen, die sich im Knochenmark entwickeln, wandern über das Blut in die Milz, wo sie zu Marginalzonen- (MZB) oder follikulären (Fo) B-Zellen differenzieren. B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zu Raf-1-, B-Raf- und Kontroll-Mäusen reduzierte B-Zellzahlen in der Milz auf. Die B-Zellzahlen von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen in den Lymphknoten waren

dagegen nur tendenziell geringer. Die reduzierten B-Zellzahlen in der Milz waren hauptsächlich auf eine Reduktion der transitionellen und Fo-B-Zellen und weniger auf eine Reduktion von MZB zurückzuführen. Bei der Differenzierung und Aufrechterhaltung reifer B-Zellen scheinen B-Raf und Raf-1 teilweise redundant zu wirken, da einige ausgeprägte Veränderungen nur in Doppelknockout- und nicht in den Einzelknockout-Mäusen zu sehen waren.

Für die geringere Reduktion von MZB im Vergleich zu Fo-B-Zellen in den Raf-Doppelknockout Mäusen gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg könnte in den Entscheidungsprozess, ob sich MZB oder Fo-B-Zellen bilden, involviert sein. Mehrere in vivo Studien an Mausmutanten wie PI3K, BCAP, Btk, PLCγ2 oder Notch2 weisen darauf hin, dass schwache BCR- und starke Notch-Signale die Entwicklung von MZB begünstigen (Pillai und Cariappa, 2009). Nimmt man an, dass die Deletion von B-Raf und Raf-1 zu einer Abschwächung des tonischen BCR-Signals führt, könnten in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen durch ein generell vermindertes tonisches BCR-Signal vermehrt MZB gebildet werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Überleben von MZB durch deren voraktivierten Phänotyp oder deren Interaktion mit Stromazellen in der Marginalzone weniger von Raf abhängig ist, als das von Fo-B-Zellen (Pillai und Cariappa, 2009).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte B-Zell-Differenzierung im Knochenmark wie ein „Flaschenhals“ für die Reifung von Fo-B-Zellen in der Peripherie wirkt, im Gegensatz zur Reifung der MZB-Zellen (Martin und Kearney, 2002). Dies bedeutet, dass unreife B-Zellen bei geringerem Austritt aus dem Knochenmark bevorzugt erst das MZB-Kompartiment bilden, wie es bei Mausmutanten für Btk (Bruton’s tyrosine kinase) der Fall ist (Rawlings et al., 1993). Diese haben eine stark beeinträchtigte B-Zell-Entwicklung im Knochenmark, verminderte Fo-B-Zellen, aber ein vergrößertes MZB-Kompartiment (Rawlings et al., 1993, Cariappa et al., 2001). Als physiologischer Grund für die bevorzugte Differenzierung von unreifen B-Zellen zu MZB wird angenommen, dass die Aufrechterhaltung einer schnell einsetzenden angeborenen-ähnlichen (innate like) Immunität mittels MZB Vorrang vor einer langwierigeren adaptiven Immunität hat. Diese adaptive Immunität wird bekanntlich vor allem von Fo-B-Zellen ausgeübt. Ferner könnte die höhere Lebensspanne von MZB (Hao und Rajewsky, 2001) oder die Tatsache, dass sie selbsterneuernde Eigenschaften im Gegensatz zu Fo-B-Zellen haben (Tarakhovsky, 1997), den Phänotyp der B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse verursachen.

4.1.3. Transitionelle B-Zellen sind in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen stark reduziert

Die Analyse der transitionellen B-Zellen in Raf-1/B-Raf-Knockout Mäusen legt nahe, dass die Verschiebung der reifen B-Zellpopulation hin zum MZB-Kompartiment wahrscheinlich auf einen verminderten Nachschub neu gebildeter B-Zellen zurückzuführen ist. In allen Raf-Knockout-Mäusen war die Anzahl der transitionellen B-Zellen stark reduziert. Transitionelle B-Zellen sind neu gebildete noch unreife B-Zellen, die vom Knochenmark zur Milz wandern, wo sie, nachdem sie Zugang zu den Milzfollikeln bekommen, zu naiven B-Zellen heranreifen (Chung et al., 2003). Nach unterschiedlichen Reifungsstadien der transitionellen B-Zellen unterscheidet man T1-, T2- und T3-B-Zellen (Allman et al., 2001). Die verminderte Anzahl transitioneller B-Zellen könnte auf einen verminderten Influx aus dem Knochenmark, ein vermindertes Überleben oder einen partiellen Differenzierungsblock zurückzuführen sein. Unsere BrdU-pulse-chase-Experimente haben gezeigt, dass sowohl in Raf-1- als auch in B-Raf/Raf-1-, aber nicht in B-Raf-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen weniger B-Zellen im Knochenmark differenzieren, diese aber in der Peripherie nicht schlechter überleben. Deshalb könnte zumindest in Raf-1- und in B-Raf/Raf-1- ein verminderter Influx aus dem Knochenmark für die reduzierte Anzahl transitioneller B-Zellen verantwortlich sein.

Die Tatsache, dass nicht nur Gesamtzellzahlen, sondern auch prozentuale Verhältnisse von transitionellen B-Zellen in Raf-Knockout-Mäusen verändert sind, zeigt, dass möglicherweise der verminderte Influx allein nicht für diesen Phänotyp verantwortlich sein kann. So konnte ich beobachten, dass bei allen Raf-defizienten Mäusen der prozentuale Anteil der T2-Population im Vergleich zu Kontroll-Mäusen stark reduziert ist. Darüber hinaus ließ sich bei den Doppelknockout-Mäusen eine Zunahme des prozentualen Anteils der T1-Population feststellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Entwicklung oder Aufrechterhaltung der transitionellen B-Zellen in den Raf-Knockout-Mäusen gestört ist. Die tendenzielle Zunahme von T1-Zellen, die vor allem in Doppelknockout-Mäusen nachzuweisen war, und die starke Abnahme der T2-Zellen weist auf einen Differenzierungsblock im Übergang vom T1- zum T2-Stadium hin.

T2-Zellen sind in ihrer Entwicklung abhängig von BCR-Signalen, die tonisch oder ligandenabhängig sein können und u.a. die Aktivierung von Erk verursachen (Petro et al., 2002). Ferner sind T1-B-Zellen im Übergang zum T2-Stadium besonders abhängig von Signalen des BAFF-Rezeptors (BAFF-R), ohne die sie auch nicht überleben können (Moore et al., 1999). Diese Signale sind von der Expressionshöhe des BAFF-R abhängig. Kürzlich wurde

gezeigt, dass die Expressionsstärke des BAFF-R über die Expressionsstärke des BCR und die Stärke des tonischen BCR-Signals reguliert wird (Rowland et al., 2010). Da Defizienzen oder Mutationen des BAFF-R in Mäusen zu einer gestörten Reifung von T1- zu T2-B-Zellen (Schiemann et al., 2001) führen, könnte eine verminderte BAFF-R-Expression einen Einfluss auf das Überleben transitioneller B-Zellen in Raf-defizienten Mäusen haben. In dieser Arbeit konnte jedoch keine reduzierte BAFF-R-Expressionstärke auf transitionellen B-Zellen der Raf-Knockout-Mäusen beobachtet werden (nicht gezeigt).

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Deletion oder Mutation von BCR-Signalwegskomponenten in Mäusen zu unterschiedlichen Störungen in der Differenzierung von transitionellen B-Zellen führt (Chung et al., 2003). So verursachen Mutationen oder Deletionen von proximalen Komponenten des BCR-Signalwegs einen Block im Übergang von T1 zu T2, von distalen Komponenten hingegen einen Block von T2 zu unreifen B-Zellen. Das T2-Stadium wurde vor einigen Jahren als checkpoint in der B-Zell-Entwicklung postuliert. Intakte BCR-Signale besonders in diesem Stadium der Entwicklung sollen für die Differenzierung reifer B-Zellpopulationen essentiell sein (Su und Rawlings, 2002). In Mäusen denen in B-Zellen der zytoplasmatische Teil von Igα fehlt oder die Syk-defizient sind, konnte eine Differenzierungsstörung von T1- zu T2-B-Zellen beobachtet werden (Turner et al., 1997, Loder et al., 1999). Mäuse mit einer loss-of-function Punktmutation im *Btk*-Gen (Bruton´s tyrosine kinase) haben einen Differenzierungsblock im Übergang von T2 zu unreifen B-Zellen (Loder et al., 1999, Su und Rawlings, 2002). Darüber hinaus konnte D. Allman ebenfalls in Mäusen mit einer Btk-Mutation nachweisen, dass diese weiterhin eine Differenzierungsstörung von T2 zu T3 aufweisen (Allman et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass mehrere Faktoren zur Reduktion der transitionellen B-Zellen in Raf-Knockout-Mäusen und insbesondere in Doppelknockout-Mäusen beitragen: Der Influx von B-Zellen aus dem Knochenmark ist sicher vermindert, da dort eine geringere B-Zell-Reifung stattfindet. Des Weiteren scheint vor allem in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen auf Grund eines reduzierten tonischen BCR-Signals eine Differenzierungsstörung im Übergang vom T1- zum T2-Stadium stattgefunden zu haben.

4.1.4. Die B1-Zell-Entwicklung ist in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen gestört

Um die Entwicklung einer weiteren reifen B-Zellpopulation, der B1-Zellen, in den Raf-Knockout-Mäusen zu untersuchen, wurde die Peritonealhöhle dieser Mäuse auf die Anteile

von B1a-, B1b- und B2-Zellen analysiert. B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen eine selektive und starke Abnahme der B1a-Population in der Peritonealhöhle. Raf-1- und B-Raf-Knockout-Mäuse zeigten dagegen vergleichbare prozentuale Anteile an B1a-, B1b- und B2-Zellen wie die Kontroll-Mäuse.

Eine vergleichbare selektive Abnahme der B1a-Population der Raf-Doppelknockout-Mäuse war in der Vergangenheit auch in Mäusen mit einer B-Zell-spezifischen Expression einer dominant-negativen Form von Ras zu beobachten (Iritani et al., 1997). Dies konnte durch Verpaarungen dieser Mäuse mit einem Mausstamm, der eine konstitutiv-aktive Form von Raf-1 exprimierte, wieder aufgehoben werden. Dies hat gezeigt, dass der Ras-Raf-MEK-Erk-Weg für die Erhaltung oder Entwicklung dieser B-Zellpopulation entscheidend ist.

B1-Zellen sind besonders abhängig von BCR-Signalen (Casola et al., 2004). Jedoch ist noch nicht ganz klar, ob diese Signale tonisch oder Antigen-abhängig verursacht werden. Schon bei geringer Abnahme der BCR-Signale, wenn Marginalzonen- und follikuläre B-Zellen sich noch entwickeln können, sind B1-Zellen in ihrer Reifung gestört. So zeigen Mäuse mit Mutationen oder mit einer Deletion für Komponenten des BCR-Signalwegs veränderte B1-Zell-Populationen (Berland und Wortis, 2002). Mutationen von positiven Regulatoren des BCR-Signalwegs, wie Btk (Khan et al., 1995, Hendriks et al., 1996), PI3K (Fruman et al., 1999, Suzuki et al., 1999) und CD19 (Engel et al., 1995, Rickert et al., 1995) verursachen eine Abnahme der B1-Zellen und Mutationen von negativen Regulatoren, wie CD22 (Otipoby et al., 1996, Nitschke et al., 1997) und Lyn (Chan et al., 1997) erhöhen die Anzahl an B1-Zellen (Berland und Wortis, 2002).

Die selektive Abnahme der B1a-Zellen in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen weist darauf hin, dass die Entwicklung oder Aufrechterhaltung insbesondere dieser B-Zellpopulation abhängig von B-Raf und Raf-1 ist. Der Verlust der B1a-Zellen könnte auf ein vermindertes BCR-Signal, tonisch oder Antigen-abhängig, in den B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen zurückzuführen sein. B1a-Zellen entwickeln sich sehr früh in der Ontogenese und haben im adulten Organismus selbsterneuernde Eigenschaften; sie sind für die Produktion von „natürlichen“ Antikörpern gegen (Selbst)-Antigene verantwortlich (Fagarasan et al., 2000, Haas et al., 2005). B1b-Zellen, die in den B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen unverändert sind, entwickeln sich dagegen im Erwachsenen aus Stammzellen im Knochenmark (Montecino-Rodriguez et al., 2006, Tung et al., 2006) und sind für die induzierbare und lang-anhaltende Produktion von Antikörpern gegen Bakterien verantwortlich (Alugupalli et al., 2004). Die Tatsache, dass B-Raf/Raf-1-

Knockout-Mäuse stark reduzierte B1a-Zellen aufweisen, lässt die Vermutung zu, dass selbsterneuernde B1a-Zellen besonders stark entweder in ihrer Generierung oder Aufrechterhaltung von Raf abhängig sind. Die fehlende Raf-Expression könnte einen Einfluss auf die positive Selektion über Selbst-Antigene oder die Selbsterneuerung von B1a-Zellen haben.

4.1.5. Der Erk-Signalweg kann in Raf-defizienten B-Zellen aktiviert werden

Die Bindung eines Antigens an den BCR hat die Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinasen Lyn, Syk und Btk und anschließend unter anderem die Aktivierung des Erk-Signalwegs zur Folge (Gold, 2000). Die BCR-Stimulation führt somit zu einer sehr schnellen und starken Erk-Aktivierung (Shirakata et al., 1999).

Raf-Kinasen wurden als essentielle Mediatoren der Erk-Phosphorylierung nach BCR-Aktivierung beschrieben (Tordai et al., 1994, Iritani et al., 1997, Iritani et al., 1999, Brummer et al., 2002). Deshalb war es erstaunlich, dass B-Raf-, Raf-1- und insbesondere B-Raf/Raf-1-defiziente B-Zellen nach BCR-crosslinking in vitro normal stimulierbar waren. Die Aktivierbarkeit von Raf-1-defizienten B-Zellen erschien sogar stärker als die von Wildtypzellen. In Stimulationskinetiken wurde im Vergleich zur Kontrolle die maximale Erk-Aktivierung bei Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen eher erreicht. Außerdem war die basale Erk-Phosphorylierung in B-Raf/Raf-1- und Raf-1-defizienten B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen leicht erhöht. Es wurde bereits beschrieben, dass Raf-1-defiziente Fibroblasten nach Stimulation mit EGF (endothelial growth factor) eine stärkere Erk-Phosphorylierung als Kontroll-Fibroblasten zeigen (Mikula et al., 2001). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die einzelnen Raf-Kinasen untereinander interagieren und sich dadurch in ihrer Kinase-Aktivität beeinflussen (Weber et al., 2001, Garnett et al., 2005, Rushworth et al., 2006). So könnte in Abwesenheit von Raf-1 oder Raf-1/B-Raf der Signalweg stärker angeschaltet werden. Bisher wurde gezeigt, dass alle drei Raf-Kinasen fähig sind Homo- oder Heterodimere zu bilden (Luo et al., 1996) und Raf-1 als Inhibitor von B-Raf in diesen Heterodimeren fungieren kann (Karreth et al., 2009). Dies wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass Sorafenib, welches vor allem Raf-1 hemmt, in einigen Zellarten sowie in dieser Arbeit in B-Zellen, zu einer erhöhten Erk-Phosphorylierung führt (Kong et al., 2007, Autier et al., 2008, Arnault et al., 2009, Hatzivassiliou et al., 2010).

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass alle drei Raf-Kinasen bei der Stimulation über den BCR phosphoryliert und somit aktiviert werden. So konnte nach BCR-Stimulierung die Phosphorylierung von Raf-1 an S338, von A-Raf an S299 und eine leichte Zunahme des Anteils an S445 phosphoryliertem B-Raf nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle drei Raf-Kinasen bei der Signaltransduktion vom BCR involviert sind, die Abwesenheit von Raf-1 und B-Raf in B-Zellen aber die BCR-vermittelte Stimulation nicht verhindert. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass B-Raf/Raf-1-defiziente DT40-Zellen über den BCR nicht stimulierbar sind und sich B-Raf-defiziente DT40-Zellen schwächer stimulieren lassen (Brummer et al., 2002). Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defiziente murine B-Zellen hingegen lassen sich, wie oben beschrieben, besser als Kontroll-B-Zellen stimulieren, was vermuten lässt, dass B-Raf und Raf-1 für die BCR-Stimulation entbehrlich sind.

Im Gegensatz zu DT40-Zellen, die aus dem Huhn stammen, exprimieren B-Zellen aus der Maus auch A-Raf. Somit ist nicht auszuschließen, dass Signale vom BCR ausgehend in B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen aus der Maus über A-Raf an MEK und Erk weitergegeben werden, obwohl A-Raf für die schwächste Kinase der Raf-Familie gehalten wird. Dafür sprechen unsere Ergebnisse, die zeigen, dass die Behandlung von B-Raf/Raf-1-defizienten murinen B-Zellen mit einem A-Raf/Raf-1-Inhibitor zu einer Verhinderung der Erk-Phosphorylierung nach BCR-Stimulierung führt und zudem A-Raf hyperphosphoryliert vorliegt.

A-Raf wurde bereits als Bindeglied bei der Signalweiterleitung zwischen PI3K und Erk in einer myeloischen Zelllinie beschrieben (Sutor et al., 1999). In B-Zellen gibt es Hinweise, dass nach BCR-Stimulierung die Erk-Aktivierung PI3K-abhängig erfolgen kann (Jacob et al., 2002), was auch eigene unveröffentlichte Ergebnisse zeigen. Meine Daten weisen zudem darauf hin, dass A-Raf in die Erk-Aktivierung involviert ist, was bedeuten könnte, dass der Hauptsignalweg nach BCR-Stimulation von PI3K über A-Raf zu Erk läuft.

So kommen unterschiedliche Möglichkeiten in Frage, wie Signale in B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen vom BCR an Erk weitergeleitet werden: (I) Raf-Kinasen wirken redundant und A-Raf kann die Funktion von B-Raf und Raf-1 übernehmen. Ob diese Hypothese zutrifft kann letztendlich nur mit Hilfe einer B-Zell-spezifischen B-Raf/Raf-1/A-Raf-Trippelknockout-Maus untersucht werden. (II) Signale ausgehend vom BCR gehen in Wildtyp-B-Zellen und in Raf-defizienten B-Zellen lediglich über A-Raf an MEK und Erk. Hiergegen spricht allerdings, dass die Deletion von A-Raf in murinen Fibroblasten die Aktivierung von MEK und Erk nach

Stimulation nicht beeinträchtigt hat (Mercer et al., 2002). (III) BCR-Signale nach Antigenbindung könnten unabhängig von Raf, vielleicht über PI3K, direkt an MEK oder Erk gegeben werden. Kinasen wie Tpl2 und MEKK1 oder upstream Komponenten des NF-κB-Wegs, die bei der BCR-Stimulation ebenfalls aktiviert werden (Eliopoulos et al., 2003, Ruefli-Brasse et al., 2003, Ruland und Mak, 2003, Das et al., 2005, Johannessen et al., 2010, Kloo et al., 2011), könnten in diesem Fall das Bindeglied zwischen BCR, MEK und Erk sein. Aktives MEKK1 phosphoryliert MEK1/2 an denselben Aminosäuren wie Raf-1 (Gardner et al., 1994, Yan und Templeton, 1994, Xu et al., 1995), ist aber im Gegensatz zu MEKK2 und MEKK3 nicht so ein starker Erk-Aktivator (Blank et al., 1996, Ellinger-Ziegelbauer et al., 1997). Da in B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen nach BCR-Stimulation keine erhöhte MEKK1-Phosphorylierung beobachtet werden konnte, ist es eher unwahrscheinlich, dass MEKK1 die Signale vom BCR kommend an MEK und Erk weiterleitet.

4.1.6. Veränderte Immunglobulin-Titer und –Affinitätsreifung in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen

Keimzentren werden durch T-Zell-abhängige (TD) Antigene induziert und sind zeitlich begrenzte Strukturen, in denen die Affinitätsreifung von Antigen-spezifischen Immunglobulinen stattfindet (MacLennan, 1994). Nachdem Antigen-aktivierte B-Zellen die Keimzentrumsreaktion vollzogen haben, differenzieren sie zu Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen; letztere sind für die Sezernierung von hochaffinen Antikörpern zuständig (Anderson et al., 2006, Tarlinton, 2006).

Um die Immunantwort von Raf-Knockout-Mäusen zu untersuchen, wurden B-Raf-, Raf-1 und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse TD immunisiert und deren Keimzentrumsbildung- und Antigen-spezifische Antikörpersezernierung untersucht. Sowohl die Einzelknockout- als auch die Doppelknockout-Mäuse haben nach Immunisierung Keimzentren gebildet, deren Struktur und Größe mit der von Kontroll-Mäusen vergleichbar war. Die Gesamtzellzahlen von Keimzentrums-B-Zellen in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen war entsprechend der reduzierten Milzgröße dieser Tiere geringer, wogegen sie sich bei den Einzelknockout-Mäusen wie bei der Kontrolle verhielt.

Die niedrig- und hochaffinen Antigen-spezifischen Antikörpertiter waren in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll- und Einzelknockout-Mäusen reduziert. Der Vergleich der Verhältnisse von gesamt- (niedrig- und hochaffinen) zu hochaffinen

Antikörpern hat zudem gezeigt, dass die B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse im Gegensatz zu den Einzelknockout-Mäusen eine erhebliche Beeinträchtigung in der Affinitätsreifung aufweisen. B-Raf und Raf-1 werden demnach nicht für die Keimzentrumsbildung an sich benötigt, scheinen aber bei der Differenzierung zu Plasmazellen eine Rolle zu spielen. Vor allem scheinen beide Kinasen für eine korrekte Immunglobulin-Affinitätsreifung notwendig zu sein, wobei sie hier redundant wirken.

Der Phänotyp der B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse ist dem von Keimzentrums-spezifischen Erk1/2-Knockout-Mäusen ähnlich, da diese Tiere ebenfalls in der Lage waren Keimzentren zu bilden. Deren Antigen-spezifische Antikörpertiter nach TD-Immunisierung waren ebenfalls reduziert (Yasuda et al., 2011). Diese Mäuse zeigten zudem eine stark gestörte Plasmazell-Differenzierung, die an einer fehlenden Blimp-1-Expression (B lymphocyte–induced maturation protein 1) liegt. Dieser transkriptionelle Repressor und Hauptregulator der Plasmazell-Reifung ist für die Differenzierung von Plasmazellen und die Antikörpersezernierung essentiell (Shapiro-Shelef et al., 2003) und wird in Abwesenheit von Erk nicht exprimiert (Yasuda et al., 2011). Keimzentrums-B-Zellen, die eine Defizienz für Raf-1 und B-Raf aufweisen, könnten demnach in ihrer Erk-Aktivierung beeinträchtigt sein, was möglicherweise zu einer reduzierten Blimp-1-Expression führt. Dies könnte eine gestörte Plasmazelldifferenzierung und reduzierte Antigen-spezifische Antikörpertiter verursachen.

Plasmazellen können auf zwei unterschiedlichen Wegen in vivo differenzieren: entweder extrafollikulär oder nach Durchlaufen der Keimzentrumsreaktion im Follikel (MacLennan, 1994, MacLennan et al., 2003). Die Entscheidung von B-Zellen extrafollikulär oder im Keimzentrum zu Plasmazellen zu differenzieren hängt von mehreren Faktoren ab: vor allem welcher B-Zellpopulation sie angehören und mit welcher Affinität das Antigen an den BCR bindet (Paus et al., 2006). MZB durchlaufen dabei eher die extrafollikuläre und Fo B-Zellen die Keimzentrumsreaktion im Follikel (Martin und Kearney, 2002, MacLennan et al., 2003, Allman und Pillai, 2008).

Bisher war bekannt, dass extrafollikulär differenzierte kurzlebige Plasmazellen niedrigaffine Antikörper sezernieren; demgegenüber sezernieren langlebige Plasmazellen aus dem Keimzentrum hochaffine Antikörper. Bei den B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen sind die hochaffinen IgG1-Antikörperspiegel deutlich reduziert (um das 40-fache), während die gesamten NP-spezifischen IgG1- und IgM-Titer (um das 6- bzw. 8-fache) weniger stark vermindert sind.

Hochaffine Antikörper können erst nach somatischer Hypermutation (SHM) während der Affinitätsreifung von Immunglobulin-Genen (Ig-Gene), welche durch AID bewerkstelligt wird, entstehen (Delker et al., 2009). Das Enzym AID wird nach B-Zell-Aktivierung für kurze Zeit exprimiert und ist in Antikörper-sezernierenden Plasmazellen nicht mehr nachweisbar. Die Aktivität von AID kann über dessen Expression, Phosphorylierung, Lokalisation in der Zelle oder Bindung an die DNA gesteuert werden.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass besonders die Entwicklung oder Aufrechterhaltung von Plasmazellen, die hochaffine Antikörper sezernieren, in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen oder die Affinitätsreifung an sich beeinträchtigt ist. Dies könnte mehrere Ursachen haben: (I) Die BCR- oder CD40-abhängige Selektion von B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion, also bevor sich die B-Zellen zu hochaffinen Plasmazellen entwickeln, ist durch die Abwesenheit von B-Raf und Raf-1 gestört. Es reifen somit weniger hochaffine Plasmazellen heran. (II) Eine geringere Erk-Aktivierung in B-Raf/Raf-1-defizienten aktivierten Keimzentrums-B-Zellen könnte dazu führen, dass BCL-6, ein Gegenspieler der Plasmazelldifferenzierung, nicht degradiert wird (Niu et al., 1998). Die Keimzentrums-B-Zellen verbleiben dann länger im Keimzentrum und können sich schlechter zu hochaffinen Plasmazellen entwickeln. (III) B-Raf/Raf-1-defiziente B-Zellen durchlaufen vermehrt die extrafollikuläre statt der Keimzentrums-abhängigen Plasmazell-Differenzierung, sodass eher niedrigaffine statt hochaffine Antikörper produziert werden. Hierfür spricht, dass B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse stark reduzierte follikuläre B-Zellen, aber unveränderte MZB aufweisen, und bekanntlich erstere bevorzugt die Keimzentrums-abhängige und letztere die extrafollikuläre Plasmazell-Differenzierung durchlaufen. (IV) Das Überleben von Plasmazellen ist durch die Abwesenheit von B-Raf/Raf-1 beeinträchtigt. Allerdings müsste dann für den Phänotyp der Doppelknockout-Mäuse insbesondere das Überleben von hochaffinen gegenüber niedrigaffinen Plasmazellen beeinträchtigt sein, die nach Einwanderung ins Knochenmark dort Überlebenssignale von der Plasmazellnische bekommen. (V) Keimzentrums-B-Zellen in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen entwickeln sich hauptsächlich zu Gedächtnis-B-Zellen und nicht zu Plasmazellen. Das könnte vor allem dann der Fall sein, wenn Blimp1 durch Erk nach der Keimzentrumsreaktion nicht stark hochreguliert werden kann, was für die Plasmazelldifferenzierung essentiell ist (Shapiro-Shelef et al., 2003, Shapiro-Shelef und Calame, 2005). (VI) Die somatische Hypermutation durch AID ist während der Affinitätsreifung für das Einfügen von Mutationen in den variablen Regionen der

schweren und der leichten Immunglobulinkettengene zuständig und sorgt für eine Erhöhung der Antigenaffinität von Immunglobulinen (Delker et al., 2009). Dieser Prozess könnte in den B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen gestört sein, was ebenfalls zu einer geringeren Affinität der sezernierten Immunglobuline führen könnte.

Weitere Immunisierungen der Mäuse und anschließende gezielte Analysen der Antigen-spezifischen Plasmazellen aus Milz und Knochenmark sollen Aufschluss darüber geben, ob die ausgeprägte Störung der Affinitätsreifung in B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen aus einer gestörten Selektion im Keimzentrum, einer beeinträchtigten Plasmazelldifferenzierung oder aus einem schlechteren Überleben der hochaffinen Plasmazellen resultiert. Des Weiteren sollen Ig-Mutationsanalysen Aufschluss darüber geben, ob die somatische Hypermutation der Ig-Gene während der Affinitätsreifung in den Doppelknockout-Mäusen gestört ist.

4.2. Raf-Kinasen in der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Aktivierung und -Expansion

In vielen B-Zell-Lymphomen, wie dem Hodgkin-Lymphom, wird die aberrante Aktivierung von Erk unter anderem durch aktivierende Mutationen in CD40 oder durch die Überexpression dieses Rezeptors verursacht (Zheng et al., 2003, Kuppers, 2009). Die Aktivierung von Erk, für die nach bisherigen Erkenntnissen Signale über den Ras-Raf-MEK-Signalweg essentiell sind, spielt bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Aktives Erk ermöglicht den Eintritt in den Zellzyklus durch die Expressionsinduktion von Zyklin D und E. Des Weiteren konnten mehrere Forschergruppen zeigen, dass die Expression von aktiviertem B-Raf die Zytokinabhängigkeit von hämatopoetischen Zellen aufheben und zur Transformation dieser Zellen führen kann (McCubrey et al., 1998, Moye et al., 2000, McCubrey et al., 2001). Weil noch unklar ist, welche Funktion Raf bei der Entstehung von B-Zell-Lymphomen und Leukämien hat, sollte die Rolle von Raf bei einer konstitutiven aberranten Aktivierung des Erk-Signalwegs in Mäusen, die LMP1/CD40 B-Zell-spezifisch exprimieren, untersucht werden.

Um zu analysieren, ob die LMP1/CD40-induzierte konstitutive Aktivierung von Erk über Raf-1 und/oder B-Raf vermittelt wird, wurde zunächst analysiert, ob diese Kinasen in prämalignen LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in höherem Maße phosphoryliert und damit aktiviert sind. Wir haben beobachtet, dass Raf-1 in prämalignen LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen an einer seiner aktivierenden Phosphorylierungsstellen

S338 in höherem Maße phosphoryliert ist, wogegen die Expression und Phosphorylierung von B-Raf an S445 im Vergleich zur Kontrolle unverändert war. Da Raf-1 in allen untersuchten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen hyperphosphoryliert war, haben wir durch die Behandlung mit Raf-spezifischen Inhibitoren untersucht, ob in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen die Raf-Kinasen in die Aktivierung der konstitutiven Erk-Phosphorylierung involviert sind. Die konstitutive Phosphorylierung von Erk wurde nach Anwendung des B-Raf-spezifischen Inhibitors SB-590885 abgeschwächt, wogegen die Raf-1-spezifischen Inhibitoren, wie GW5074 und Geldanamycin, keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk hatten. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Signalweiterleitung von LMP1/CD40 zu Erk eher über B-Raf als über Raf-1 läuft. Deshalb wurde anschließend die Aktivierung des Erk-Signalwegs und die B-Zellzahlen in B-Zell-spezifischen B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse untersucht. Diese Mäuse wiesen ebenso wie B-Raf-profiziente LMP1/CD40-Mäuse eine aberrante B-Zell-Expansion und dadurch eine vergrößerte Milz auf. Zudem hatten die Mäuse auch eine aberrante Marginalzonen-ähnliche B-Zellpopulation in der Milz und eine aberrante konstitutive Aktivierung des Erk-Signalwegs in B-Zellen. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass B-Raf nicht essentiell für die konstitutive Erk-Phosphorylierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ist. Dafür gibt es zwei mögliche Ursachen: (I) Raf-Kinasen wirken bei aberranten konstitutiven CD40-Signalen redundant; B-Raf kann von Raf-1 oder A-Raf bei der konstitutiven Signaltransduktion ausgehend von LMP1/CD40 ersetzt werden. So könnte möglicherweise erst eine Deletion von Raf-1 und B-Raf in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen die charakteristische B-Zell-Expansion sowie die Aktivierung von Erk und die Lymphomentstehung verhindern. (II) Die Signaltransduktion ausgehend von LMP1/CD40 geht über einen alternativen Raf-unabhängigen Signalweg, der vielleicht direkt von PI3K und Akt zur Hyperaktivierung von Erk führt. Hierfür gibt es in unserer Arbeitsgruppe schon einige Hinweise.

Um nachzuweisen, dass Raf-Kinasen bei konstitutiven Signalen ausgehend von LMP1/CD40 redundant wirken und das Signal in B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen über Raf-1 geht, sollten B-Zellen von Raf-1/B-Raf-defizienten LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen auf die Aktivierung von Erk untersucht werden. Da der *Raf-1*- und der *Rosa26*-Lokus, in den die Sequenz für das Fusionsprotein LMP1/CD40 inseriert ist, sehr nah beieinander auf Chromosom 6 in der Maus liegen und der Lokus für B-Raf ebenfalls auf diesem Chromosom

liegt, war es bisher nicht möglich eine B-Zell-spezifische B-Raf- und Raf-1-defiziente LMP1/CD40-exprimierende Maus aus den Verpaarungen zu erhalten. Die Wahrscheinlichkeit für ein crossing-over der *Raf-1* und *Rosa26*-Loci beträgt rein rechnerisch 0,5-1,25 %. Um dennoch einen Hinweis auf den Phänotyp einer B-Raf/Raf-1-defizienten LMP1/CD40-Maus zu bekommen, werden in den nächsten Monaten B-Zell-spezifische B-Raf-defiziente Raf-1-heterozygote LMP1/CD40-exprimierende Mäuse bezüglich B-Zellzahlen und konstitutiver Erk-Aktivierung untersucht. Um zudem einen klinischen Bezug herzustellen und Hinweise dafür zu erhalten, welche Rolle Raf-Kinasen bei Leukämien und Lymphomen im Menschen spielen, wollen wir außerdem unterschiedliche Leukämie- und B-Zell-Lymphom-Zelllinien auf Raf-Kinasen und deren Phosphorylierungen sowie die Aktivierung von Erk untersuchen.

4.3. Die Aktivierung von Erk und Akt in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen

Raf-1 war in prämalignen LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen sowohl an seiner aktivierenden (S338) als auch an seiner inhibitorischen (S259) Phosphorylierungsstelle in höherem Maße phosphoryliert. Diese letzte Phosphorylierungsstelle wird von Akt phosphoryliert und wirkt hemmend auf die Raf-1-Aktivität (Kolch, 2000). Raf-1, das an S259 phosphoryliert vorliegt, bindet an das Protein 14-3-3 (Tzivion et al., 1998); dies verhindert die Rekrutierung an die Plasmamembran und somit eine anschließende Aktivierung durch Src-Kinasen und RasGTP. Akt selbst wird mittels PI3K, einer Lipid-Kinase, die durch CD19 aktiviert wird, aktiviert und spielt vor allem bei der Vermittlung von Überlebenssignalen in B-Zellen eine Rolle (Srinivasan et al., 2009). Da wir gesehen haben, dass Raf-1 an seiner inhibitorischen Stelle S259 phosphoryliert ist, habe ich untersucht, ob die Akt-Phosphorylierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen verstärkt ist.

Wir konnten nachweisen, dass in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen sowohl Akt als auch die Akt-Zielproteine mTOR und GSK3 in höherem Maße aktiviert sind. Das Protoonkogen TCL1B, dass an der Aktivierung von Akt beteiligt ist und eine Rolle bei der Entstehung von Leukämien spielt (Roos et al., 2001), wurde ebenfalls in höherem Maße exprimiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen aberrant aktiviert ist.

Ein aberrant aktivierter PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist hauptverantwortlich für die Entwicklung und das Fortschreiten einer Vielzahl von Tumoren, darunter auch hämatologische Neoplasien (Kawauchi et al., 2009). Die Aktivierung von mTOR führt

wahrscheinlich zur Erhöhung der Proteinsynthese, zum Zellwachstum und infolgedessen zur Zellteilung von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen. Die Aktivität dieses Signalweges könnte somit einen entscheidenden Weg bei der Tumorentstehung in LMP1/CD40-Mäusen spielen.

Die Tatsache, dass Raf-1 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen von aktivem Akt gehemmt wird, deutet darauf hin, dass die Aktivierung von Raf-1 möglicherweise der Signaltransduktion über Akt entgegenwirkt. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine Aktivierung von Erk in diesen B-Zellen durch Akt über einen Raf-unabhängigen Weg stattfindet.

Wahrscheinlich ist sowohl die konstitutive Erk- als auch die Akt-Phosphorylierung für das Überleben und die verbesserte Proliferation der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen entscheidend. Dabei ist es sehr wichtig zu verstehen, wie diese beiden Signalwege interagieren und welche Rolle die unterschiedlichen Raf-Kinasen in diesem Aktivierungsprozess spielen. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob die unterschiedlichen Raf-Paraloge zum Teil aktivierend oder teilweise sogar regulativ und deshalb inhibitorisch in diese Signalwege eingreifen. Dies ist besonders in Bezug auf Lymphome mit einem aktivierten Phänotyp, wie beispielsweise Hodgkin-Lymphom (HL) oder diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), relevant. Eventuell sind dort ähnliche Signalwege wie in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen aktiv. Die genaue Kenntnis dieser Signalwege und deren Wechselwirkungen könnten zu einem verbesserten Therapieschema bei der Behandlung dieser Tumoren beitragen.

5 Zusammenfassung

Da in 30 % aller Krebsarten der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg aberrant aktiviert vorliegt und dies für die Entstehung dieser Tumoren entscheidend ist, sind Raf-Kinasen als therapeutisches Ziel bei diesen Erkrankungen von großer Bedeutung. Bisher konnten mehrere Raf-Kinase-Inhibitoren entwickelt und in klinischen Studien erfolgreich erprobt werden, sodass sie heute bereits in der Krebstherapie angewendet werden. Die Familie der Raf-Kinasen besteht aus drei Homologen: Raf-1 (auch c-Raf genannt), B-Raf und A-Raf, die sich durch ihre unterschiedlichen Kinasestärken in vitro unterscheiden (B-Raf >> Raf-1 >> A-Raf). Über die Rolle von B-Raf und Raf-1 bei der normalen B-Zell-Entwicklung sowie bei der Entstehung von B-Zell-Lymphomen oder Leukämien ist jedoch nur sehr wenig bekannt.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von B-Raf und Raf-1 bei der normalen B-Zell-Entwicklung und –Aktivierung in Mäusen. Mit Hilfe von B-Zell-spezifischen konditionalen Knockout-Mäusen für Raf-1, B-Raf und für beide Kinasen konnte gezeigt werden, dass die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark vor allem von Raf-1 abhängig ist. Dies konnte anhand von signifikant reduzierten B-Zellzahlen sowie einem Block in der Entwicklung von großen Prä- zu kleinen Prä-B-Zellen nachgewiesen werden. Die B-Zell-spezifischen Knockout-Mäuse für Raf-1 und B-Raf wiesen verminderte Zahlen von transitionellen B-Zellen, einer Vorstufe reifer B-Zellen sowie reduzierte follikuläre B-Zellen, eine reife B-Zellpopulation in der Milz, auf. Dieser Effekt war in den B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen noch stärker, was darauf hin deutet, dass Raf-1 und B-Raf in reifen B-Zellen teilweise redundant wirken. In den Doppelknockout-Mäusen konnte zudem eine reduzierte Milzgröße und ein reduziertes Milzgewicht beobachtet werden.

In allen untersuchten Raf-Knockout-Mäusen konnte sowohl nach CD40 als auch nach BCR-Stimulation eine normale Aktivierung des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs nachgewiesen werden. Dies war insofern erstaunlich, da Raf-Kinasen als Hauptmediatoren dieses Signalweges beschrieben wurden. Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass in murinen B-Zellen neben Raf-1 und B-Raf auch A-Raf exprimiert wird. Weitere Versuche deuteten darauf hin, dass A-Raf B-Raf und Raf-1 bei der in vitro Stimulation vollkommen ersetzen kann. Nach T-Zell-abhängiger Immunisierung bildeten B-Raf-, Raf-1 und B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäuse Keimzentren aus. Jedoch waren die Antigen-spezifischen Immunglobulintiter im Serum von B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen deutlich reduziert. Des Weiteren war die Affinitätsreifung Antigen-spezifischer Antikörper bei B-Raf/Raf-1-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-

Mäusen beeinträchtigt, wohingegen Raf-Einzelknockout-Mäuse eine ähnliche Affinitätsreifung wie Kontroll-Mäuse aufwiesen. Dies deutet auf eine redundante Funktion von Raf-1 und B-Raf bei der Bildung von hochaffinen Antikörpern hin.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Mäusen, die ein LMP1/CD40-Fusionsprotein B-Zell-spezifisch exprimieren, die Bedeutung von Raf-1 und B-Raf bei der LMP1/CD40-induzierten B-Zell-Lymphomentstehung untersucht. LMP1/CD40, welches aus dem Epstein-Barr-Virus exprimierten LMP1 und dem intrazellulären Teil von CD40 besteht, verursacht in B-Zellen von Mäusen eine konstitutive Aktivierung des Erk-Signalwegs, was mit einer B-Zellexpansion und einer späteren Lymphomentstehung einhergeht. LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zeigten erhöhte Anteile von aktiviertem Raf-1. Allerdings konnte die konstitutive Aktivierung von Erk nur nach Anwendung eines B-Raf-Inhibitors und nicht nach Behandlung mit einem Raf-1/B-Raf-Hemmer (Raf-1>B-Raf) reduziert werden. Trotz dieser Ergebnisse zeigte eine Deletion von B-Raf in den LMP1/CD40-Mäusen, die durch Verpaarung mit einem B-Raf-defizienten Mausstamm erreicht wurde, dass B-Raf für die LMP1/CD40-induzierte B-Zell-Expansion und Erk-Aktivierung nicht essentiell ist.

6 Summary

The Ras-Raf-MEK-Erk signaling pathway has been described to be aberrantly activated in 30 % of all tumors. Since this hyperactivation is thought to be responsible for tumor development, Raf kinases are often used as therapeutic target in the treatment of various cancers. To date several Raf inhibitors have been developed, approved in clinical studies and are currently used in cancer therapy. The Raf family of kinases consists of three members: B-Raf, A-Raf and Raf-1, also named c-Raf, which display different kinase strengths in vitro (B-Raf >> Raf-1 >> A-Raf). In B cells, the expression of Raf-1 and B-Raf has been described. Although aberrantly activated Raf kinases have been suspected to be involved in lymphoma- and leukemogenesis, the role of B-Raf and Raf-1 during normal B-cell development and the generation of B-cell lymphomas and leukemia are not well understood. Therefore, the main goals of this thesis were to unravel the function of Raf-1 and B-Raf during normal B-cell development and activation as well as to study the contribution of the two kinases to lymphoma development.

To this end in the first part of the thesis, conditional mouse strains carrying a B-cell specific deletion of B-Raf, Raf-1 or B-Raf/Raf-1 were analyzed. In the bone marrow of Raf-1 and B-Raf/Raf-1 double-deficient mice, B-cell numbers were significantly reduced, most likely due to a partial block of B-cell development in the transition from the large pre B to the small pre B-cell stage. These data indicate that early B-cell development in the bone marrow is mainly dependent on Raf-1. In the periphery, single and double knockout mice for Raf-1 and B-Raf had reduced transitional B cell numbers. The phenotype was more pronounced in double than in single knockout mice, suggesting that Raf-1 and B-Raf are acting redundantly in the generation and/or maintenance of transitional B cells. In addition, double knockout mice showed a reduced splenic size and splenic weight and lower B-cell numbers in this organ. Particularly, follicular B cells, which constitute the main mature B-cell population in the spleen, were strongly reduced in B-Raf/Raf-1 double-deficient mice. This indicates that B-Raf and Raf-1 act to some extent redundantly during the development and maintenance of mature B cells.

Despite the absence of B-Raf or Raf-1 or both kinases in B cells, activation of the Ras-Raf-MEK-Erk pathway via CD40 and BCR stimulation occurred normally, suggesting that B-cell activation through this signaling pathway is independent of B-Raf and Raf-1. Interestingly, the activation of Erk was shown to be even higher or earlier in Raf-1 and B-Raf/Raf-1

deficient B cells. Further experiments suggested that A-Raf is expressed in murine B cells and can replace B-Raf and Raf-1 during in vitro BCR-stimulation.

After T-cell dependent immunization, B-Raf, Raf-1 and B-Raf/Raf-1 knockout mice were able to form germinal centers, which were comparable in size and numbers to the germinal centers of immunized control mice. However, in comparison to controls, antigen-specific antibody titers, in particular high affinity antibodies, were strongly reduced in double-deficient mice, suggesting that B-Raf and Raf-1 have a redundant function in the production of high affinity antibodies.

The second part of this work was designed to clarify the role of Raf kinases during LMP1/CD40-induced lymphomagenesis. For this purpose, we made use of mice which express LMP1/CD40 in a B-cell-specific manner. LMP1/CD40, which is a fusion protein composed of the membrane part of Epstein-Barr virus protein LMP1 and the intracellular part of its cellular counterpart CD40, induces a constitutive activation of the Erk pathway in B cells. This leads to a B-cell expansion and later on from 12 months onward to the development of B-cell lymphomas. Premalignant LMP1/CD40-expressing B cells showed besides activated Erk higher activation of Raf-1. Surprisingly, the activation of Erk could be reduced after treatment of these cells with a B-Raf-specific inhibitor, while treating LMP1/CD40-expressing B cells with a Raf-1/B-Raf inhibitor (Raf-1>B-Raf) could even strengthen the activation of Erk. However, deletion of B-Raf in LMP1/CD40-expressing B cells was not able to eliminate aberrant Erk activation and B-cell expansion. This suggests that B-Raf is not essential for constitutive Erk activation in LMP1/CD40-expressing B cells.

7 Material und Methoden

7.1. Material

Mausstämme

(I) C57/BL6 (Charles River Laboratories): Dieser Mausstamm wurde für die Erhaltungszuchten der transgenen Mäuse desselben genetischen Hintergrunds verwendet.

(II) CD19-cre, auch CD19cre (Rickert et al., 1997): Der C57BL/6 Mausstamm hat die Sequenz für die Cre-Rekombinase in den *Cd19*-Lokus inseriert, was die Zerstörung des *Cd19*-Gens verursacht. Die Expression der Cre-Rekombinase ist somit abhängig vom CD19-Promotor.

(III) c-Raf-1$^{flox/flox}$, auch Raf-1$^{fl/fl}$ (Jesenberger et al., 2001): In diesem C57BL/6 Mausstamm ist das *Raf-1*-Gen mit loxP-Sequenzen 3' und 5' vom Exon 3 (Ras-bindende Domäne) flankiert, sodass dies in Kombination mit der Cre-Rekombinase zu einer Exzision von Exon 3 und zum Verlust vom Raf-1-Protein führt (Jesenberger et al., 2001).

(IV) B-Raf$^{flox/flox}$, auch B-Raf$^{fl/fl}$ (Chen et al., 2006): In diesem C57BL/6 Mausstamm ist das *B-Raf*-Gen mit loxP-Sequenzen 3' und 5' vom Exon 12 (Kinasedomäne) flankiert, sodass dies in Kombination mit der Cre-Rekombinase zu einer Exzision von Exon 12 und ebenfalls, laut Literatur, zum Verlust der B-Raf-Proteinexpression durch eine Leserasterverschiebung führt (Chen et al., 2006).

(V) LMP1/CD40flSTOPP (Homig-Holzel et al., 2008): Dieser Balb/c Mausstamm ist konditional transgen für das chimäre Protein LMP1/CD40, das in den *Rosa26*-Lokus inseriert wurde. Eine mit loxP-Sequenzen flankierte STOPP-Kassette stromaufwärts von der Sequenz für LMP1/CD40 verhindert die Expression des Transgens und wird in Anwesenheit von der Cre-Rekombinase entfernt. Nach Exzision der STOPP-Kassette wird LMP1/CD40 unter dem endogenen *Rosa26*-Promotor exprimiert.

(VI) Mb1-Cre (Hobeika et al., 2006): Dieser von uns in den C57BL/6 Hintergrund gekreuzte Mausstamm hat die Sequenz für die Cre-Rekombinase in den *Igα*-Lokus (*mb1*-Lokus) inseriert, was zu einer Zerstörung des *Igα*-Gens führt.

Oligonukleotide

Tabelle 1 Primer für die Genotypisierung der Mäuse

Primer Name	Primer Sequenz 5'-3'
CD19c	AACCAGTCAACACCCTTCC
CD19d	CCAGACTAGATACAGACCAG
CD40 PCR3	CTGAGATGCGACTCTCTTTGCCAT
Cre 7	TCAGCTACACCAGAGACGG
Ex1Fw1LMP1	AGGAGCCCTCCTTGTCCTCTA
Mb1-Cre P54	GGAGATGTCCTTCACTCTGATTCT
Mb1-Cre P55	ACCTCTGATGAAGTCAGGAAG AAC
Rosa fw 1(60)	CTCTCCCAAAGTCGCTCTG
Rosa rev2 (62)	TACTCCGAGGCGGATCACAAGC
Raf-1 US-Lox	TGGCTGTGCCCTTGG AACCTCAGCACC
Raf-1 DS-Lox	AACATGAAGTGGTGTTCTCCGGGCGCC
Raf-1 CT-U	ATGCACTGAAATGAAAACGTGAAGACGACG
B-Raf 9	GCATAGCGCATATGCTCACA
B-Raf 11	CCATGCTCTAACTAGTGCTG
B-Raf 17	GTTGACCTTGAACTTTCTCC

Enzyme

Taq- (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase wurde von Invitrogen Life Technologies verwendet. Proteinase K wurde von Sigma bezogen.

Inhibitoren

Tabelle 2 Kinase-Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Spezifität
UO126	Cell Signaling	MEK1/2
LY294002	Cell Signaling	PI3K
Sorafenib (Nexavar)	Bayer HealthCare	Raf-1 > B-Raf
GW5074	Sigma Aldrich	Raf-1
Geldanamycin	Sigma Aldrich	Raf-1
L779,450	Merck	A-Raf; Raf-1 in hoher Konzentration
SB-590885	Symansis	B-Raf (V600E) > B-Raf
Tpl2/Cot-Inhibitor	Merck	Tpl2/Cot-Kinase

Antikörper für Western-Blotting

Tabelle 3 Erstantikörper für Western-Blotting

Antigen	Hersteller	Quelle	kDa	Verdünnungs-faktor	Verdünnungslösung 4ml
pA-Raf Ser299	Cell Signaling	Kaninchen	68	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
A-Raf	Cell Signaling	Kaninchen	68	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
Akt	Cell Signaling	Kaninchen	60	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
B-Raf N-term.	Santa Cruz	Kaninchen	86	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pB-Raf Ser445	Cell Signaling	Kaninchen	86	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
B-Raf C-term.	Santa Cruz	Kaninchen	86	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
Erk1/2	Cell Signaling	Kaninchen	44,42	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
FoxO1	Cell signaling	Kaninchen	78 -82	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
GSK3	Cell signalling	Kaninchen	46 - 51	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
MEK1,2	Cell Signaling	Kaninchen	45	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
p70	Cell signaling	Kaninchen	70 - 85	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pAkt Ser273	Cell Signaling	Kaninchen	60	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pErk1/2	Cell Signaling	Kaninchen	44, 42	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pGSK3	Cell signaling	Kaninchen	46 - 51	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pMEK1/2	Cell Signaling	Kaninchen	45	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pmTOR	Cell signalling	Kaninchen	289	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
mTOR	Cell Signaling	Kaninchen	289	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pp70	Cell signalling	Kaninchen	70 - 85	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pRaf-1 S338	Cell Signaling	Kaninchen	72	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
PTEN	Cell signaling	Kaninchen	54	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pRaf-1 S259	Cell signaling	Kaninchen	72	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
TCL1B 1/5	Santa Cruz	Ziege	14	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
Tubulin	Cell Signaling	Kaninchen	55	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
pMEKK1 Thr1381	Santa Cruz	Kaninchen	195	1:1000	TBST, 5% (w/v) BSA
B-Raf Thr598/ Ser601	Santa Cruz	Kaninchen	86	1:1000-1:500	TBST, 5% (w/v) BSA

Zweitantikörper

Tabelle 4 Zweitantikörper für Western-Blotting

Spezifität	Hersteller	Verdünnungsfaktor	Verdünnungslösung 4 mL
Kaninchen	Cell Signaling	1:2000	TBST, 5% (w/v) Milchpulver
Maus	Cell Signaling	1:2000	TBST, 5% (w/v) Milchpulver
Ziege	Kulturüberstand	1:20000	TBST, 5% (w/v) Milchpulver

Alle verwendeten Zweitantikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase (Horse-raddish peroxidase) gekoppelt.

Antikörper für Immunhistochemie

Tabelle 5 Antikörper für Immunhistochemie

Antigen	Quelle	Gekoppelt an	Verdünnungsfaktor	Hersteller
Maus IgM	Ziege	Peroxidase	1:100	Sigma
Maus MOMA-1	Ratte		1:100	Biomedicals
PNA	Ratte	Biotin	1:2000	Vector
Ratten IgG2	Maus	Biotin	1:250	Jackson Laboratories

Verbrauchsmaterial

Wenn nicht anders angemerkt, wurden die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Becton-Dickinson, BioRad, Calbiochem, Corning, Eppendorf, GE-Healthcare, Greiner, Fermentas, Invitrogen, Merck, Millipore, Miltenyi Biotec, New England Biolabs, Neolab, Nunc, PAA, Pan Biotech, Promega, Qiagen, Roche, Sartorius, Sigma-Aldrich und Stratagene bezogen.

Statistik

Die Berechnung der Signifikanzen (*p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001) wurde mit Hilfe des zweiseitigen T-Tests (two-tailed student´s t-test) in Microsoft Excel durchgeführt.

Software

Adobe Illustrator CS3
Adobe Photoshop CS3
Microsoft Word
Endnote 9
FlowJo
Epson Scanner program
Microsoft Excel
CELLQuest Beckton Dickinson
OpenLab von Improvision

Geräte

Brutschrank (Heraeus, ThermoForma, Binder)

Cryostat CM1900 UV (Leica)

Elektrophoresekammer (Biometra, BioRad)

ELISA-Reader (Tecan-Sunrise)

FACS Calibur (Becton-Dickinson)

Falcon Roller (Coulter Electronics Limited)

Gefrierschrank -80°C (Colora)

Gefrierschrank -20°C (Liebherr)

Konfokalmikroskop (Zeiss)

Kühlschrank (Liebherr)

Lichtmikroskop (Zeiss)

Millipore-Anlage (Millipore)

Netzgerät (BioRad)

Neubauer-Zählkammer (GLW)

PCR-Thermozykler (Perkin Elmer, Biometra)

pH-Messgerät (Knick)

Pipetten (Eppendorf)

Pipettierhilfe (Integra)

Spektrophotometer (Eppendorf)

Sterilbank (Bio Flow Technik)

UV-Transilluminator (UVP-Inc.)

Vortexer Genie (Bender & Hobein)

Western-Blot-Apparatur (BioRad)

Zentrifugen (Eppendorf, Sorvall, Beckman, Hettich)

7.2. Methoden

7.2.1. Analyse von transgenen Mäusen

7.2.1.1. Maus-Verpaarungen

Raf-1$^{fl/fl}$- (Jesenberger et al., 2001) oder B-Raf$^{fl/fl}$- (Chen et al., 2006) Mäuse wurden mit dem Mb1-Cre-Mausstamm (Hobeika et al., 2006) gekreuzt (alle C57BL/6 Hintergrund), um einen B-Zell-spezifischen Knockout dieser Gene ab dem frühen Pro-B-Zellstadium im Knochenmark zu erreichen (Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{+/-}$ und B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{+/-}$). Um Doppelknockout Mäuse sowohl für Raf-1 als auch für B-Raf zu erhalten, wurden Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{-/-}$ mit B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{+/-}$ verpaart und die Nachkommen Raf-1$^{fl/wt}$//B-Raf$^{fl/wt}$//Mb1-Cre$^{+/-}$ erneut mit Raf-1$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{-/-}$ verpaart. Da *Raf-1* und *B-Raf* in der Maus von Chromosom 6 kodiert werden, musste bei dieser Verpaarung auf ein crossing-over der Allele gewartet werden, das an dem Genotyp Raf-1$^{fl/fl}$//B-Raf$^{fl/wt}$//Mb1-Cre$^{+/-}$ oder Raf-1$^{fl/fl}$//B-Raf$^{fl/wt}$//Mb1-Cre$^{-/-}$ der Nachkommen festgestellt werden konnte. Nach Erhalt solcher Mäuse konnten dann diese untereinander verpaart werden (Raf-1$^{fl/fl}$//B-Raf$^{fl/wt}$//Mb1-Cre$^{+/-}$ x Raf-1$^{fl/fl}$//B-Raf$^{fl/wt}$//Mb1-Cre$^{-/-}$), sodass mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/8 Mäuse mit dem Genotyp Raf-1$^{fl/fl}$//B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{+/-}$, also Doppelknockout-Mäuse für Raf-1 und B-Raf, geboren wurden. Anschließend wurden Verpaarungen aus Raf-1$^{fl/fl}$//B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{+/-}$ und Raf-1$^{fl/fl}$//B-Raf$^{fl/fl}$//Mb1-Cre$^{-/-}$ angesetzt, sodass Doppelknockout-Mäuse mit einer Wahrscheinlichkeit von ½ geboren wurden. Als Kontroll-Mäuse (ctrl) wurden für die Versuche im ersten Teil dieser Arbeit entweder Mb1-Cre$^{+/-}$, B-Raf$^{fl/fl}$-, Raf-1$^{fl/fl}$- oder B-Raf$^{fl/fl}$//Raf-1$^{fl/fl}$-Mäuse verwendet und, wenn nicht anders vermerkt, waren die analysierten Mäuse zwischen acht und neun Wochen alt.

LMP1/CD40flSTOP//CD19cre Mäuse wurden aus der Verkreuzung von LMP1/CD40flSTOP Mäusen (Homig-Holzel et al., 2008) und CD19cre Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) (Rickert et al., 1997) erhalten (hier als LMP1/CD40//CD19cre bezeichnet). LMP1/CD40flSTOP sind transgen für das chimäre *LMP1/CD40*-Gen, das hinter den *Rosa26*-Lokus geschaltet ist. Eine loxP-flankierte STOPP-Kassette stromaufwärts verhindert die Genexpression nur dann, wenn keine Cre-Rekombinase vorhanden ist. Ansonsten kommt es zur Deletion der STOPP-Kassette.

Bei dem CD19cre Mausstamm befindet sich die Cre-Rekombinase im *Cd19*-Lokus (C57BL/6), wobei dessen Expression durch den Promotor des *Cd19*-Gens reguliert wird und es zur gleichen Zeit zur Zerstörung des *Cd19*-Gens kommt.

Um einen B-Raf defizienten LMP1/CD40//CD19cre Mausstamm zu generieren, wurden B-Raf$^{fl/fl}$ Mäuse mit LMP1/CD40//CD19cre verpaart. Da der *Rosa26*-Lokus, in den das Transgen LMP1/CD40 inseriert wurde, ebenfalls auf Chromosom 6 liegt, musste erneut ein crossing-over zwischen dem *Rosa26*-Lokus und *B-Raf*-Lokus abgewartet werden. B-Raf$^{fl/fl}$//LMP1/CD40//CD19cre Mäuse erhielten wir aus der Verpaarung von B-Raf $^{fl/wt}$//LMP1/CD40//CD19cre$^{-/-}$ und LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ oder LMP1/CD40//CD19cre$^{+/+}$ Mäuse. Da der *Raf-1*-Lokus auf Chromosom 6 ca. 2 Mb vom *Rosa26*-Lokus entfernt ist, und somit die Wahrscheinlichkeit für ein crossing-over zwischen dem für LMP1/CD40 kodierenden Chromosomenabschnitt und dem *Raf-1*-Lokus sehr gering ist, konnte leider kein LMP1/CD40//CD19cre Mausstamm generiert werden, der sowohl für Raf-1 als auch für B-Raf defizient ist.

Wenn nicht anders angemerkt, wurden Mäuse im Alter von 8 bis 9 Wochen analysiert. Alle Mäuse wurden unter speziellen Pathogen freien Bedingungen gehalten und gezüchtet. Alle Experimente wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt und vorab durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

7.2.1.2. Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus

Die Mäuse wurden zunächst durch 8-minütige CO_2-Begasung in einem geschlossenen Behälter euthanasiert und anschließend direkt präpariert. Die Milz und die Lymphknoten wurden als ganze Organe entnommen und in B-Zell-Präparationsmedium (RPMI 1640 (Gibco), 5 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (Biochrom KG), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (Pen/Strep Gemisch), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 x nicht-essenzielle Aminosäuren, alle von Gibco) gehalten, bis sie weiterverwendet wurden. Um die lymphatischen Zellen aus dem Gewebeverbund zu lösen, wurde das Gewebe durch ein feines Sieb (70 µM, Beckton Dickinson) gedrückt. Die Zellen der Peritonealhöhle wurden durch Ausspülen des Bauchraums mit B-Zell-Präparationsmedium gewonnen. Für die Präparation des Knochenmarks wurde der Schienbeinknochen (Tibia) präpariert und mit B-Zell-Präparationsmedium mittels einer feinen Kanüle und einer Spritze ausgespült.

Bei blutreichen Geweben wie der Milz und dem Knochenmark wurde eine Lyse der Erythrozyten vorgenommen. Dazu wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten bei 4°C und 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einem hypotonischen Erythrozyten–Lysepuffer (Eryhtrocytic Lysis Buffer, eBioscience) aufgenommen. Die Lyse wurde nach 3 Minuten mit Medium gestoppt und die Zellen nach erneutem Zentrifugieren (300 x g; 4°C; 10 Min.) in 1 ml B-Zell-Präparationsmedium aufgenommen. Während der gesamten Präparation und der späteren Analyse wurden die Zellen auf Eis gehalten. Die Gewinnung reifer B-Zellen aus der Milz wurde mittels magnetischer Zellseparation durchgeführt (Abschnitt 7.2.1.3).

7.2.1.3. Isolierung reifer B-Zellen aus der Maus

Nach Entnahme der Milz aus den Mäusen (Abschnitt 7.2.1.2) wurden anschließend reife B2-Zellen durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) isoliert. Dabei binden die Zellen an spezifische Antikörper-gekoppelte magnetische Beads, die anschließend auf eine Säule geladen werden, die an einem starken Magneten befestigt ist und sich somit in einem starken magnetischen Feld befindet. Die von den Antikörper-gekoppelten Beads gebundenen Zellen werden durch das Magnetfeld angezogen und bleiben in der Säule, während die ungebundenen Zellen die Säule beim Spülen passieren können.

Die Gewinnung von reifen B-Zellen wurde durch Depletion von $CD43^+$ Nicht-B-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS) durchgeführt (Hein et al., 1998, Xu et al., 2000), indem α-CD43-Beads und LS Säulen nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec) verwendet wurden. CD43 wird auf nahezu allen Leukozyten (auch T-Zellen) exprimiert, außer von reifen B2-Zellen und einem Teil unreifer B-Zellen. Auch B1-Zellen aus dem Peritoneum exprimieren CD43. Die Reinheit der aus der Milz isolierten B2-Zell-Population wurde durchflusszytometrisch mittels einer B220/CD43-Färbung überprüft (Abbildung 40). Die isolierten Zellen waren zu 88 bis 97 % reife B2-Zellen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die B-Zellen nicht von Antikörpern gebunden werden und somit deren mögliche Aktivierung verhindert wird. Für Western-Blot Analysen wurden die Zellen von Anfang an in B-Zellmedium mit nur 1 % (v/v) FKS gehalten.

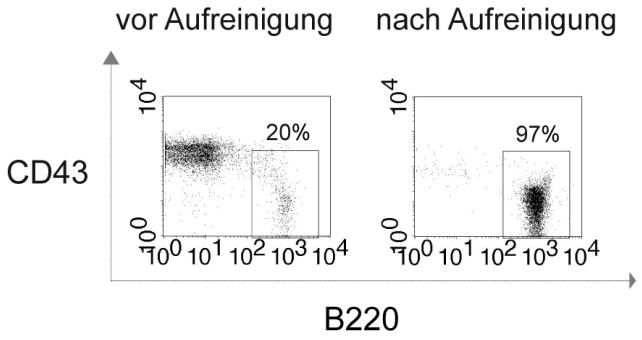


Abbildung 40 Analyse der Reinheit nach Isolierung von B-Zellen mit CD43-Beads. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen vor MACS-Isolierung mit CD43-Beads (links) und nach Aufreinigung (rechts). Nach Aufreinigung lag in diesem Fall eine Reinheit von 97% von $CD43^-B220^+$ Zellen (reife B2-Zellen) aus der Milz vor. Vor Isolierung lag der reife B-Zell-Anteil bei ca. 20%.

7.2.1.4. Immunisierung von Mäusen

Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen wurden mit 100 µg NP-Hühner-Gammaglobulin (NP-CGG, ein 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl Hapten, Biosearch Technologies) immunisiert. Um die Immunreaktion der Mäuse zu verbessern wurde NP-CGG mit Kaliumaluminiumsulfat vor Immunisierung gefällt. Für die Präzipitation wurde ein Volumen des Antigens mit einem Volumen $KAl(SO_4)_2$–Lösung (10 %) gemischt und mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Antigen für 10 Minuten bei 1600 x g (4200 rpm, Minifuge Sigma) zentrifugiert und dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Schließlich wurden 50 µg jedes Antigens in 200 µl sterilem PBS resuspendiert und den Mäusen intraperitoneal gespritzt. Mäuse wurden 14 Tage nach Immunisierung getötet und analysiert.

7.2.1.5. Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Analyse lymphoider Zellen mittels Durchflusszytometrie müssen die Zellen als Einzelzellen vorliegen, was durch das unter 7.2.1.2 beschriebene Verfahren erreicht wird. Die Zellen wurden zuerst mit FACS-Puffer (PBS; 1% BSA) gewaschen, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden sie mit einer Kombination von FITC-, PE-, PerCP- und APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die in FACS-Puffer verdünnt waren. Es wurde jeweils $5x10^5$ bis $1x10^6$ Zellen für 20 Minuten gefärbt und dann nochmals in FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer für die Analyse aufgenommen. Bei Färbungen mit FITC, PE und PerCP wurde, falls erforderlich, zusätzlich TOPRO-3 bei einer Endverdünnung von 1:40.000 (Molecular Probes) zugegeben, um die toten Zellen anzufärben. TOPRO-3 wurde 1:200 vorverdünnt und

anschließend für den Gebrauch nochmals 1:200 verdünnt. Mit Hilfe von TOPRO-3 können tote Zellen (TOPRO-3 positiv) aus einer Zellpopulation ausgeschlossen werden.
Alle Analysen wurden mit einem FACSCalibur™ (BD Bioscience) durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuest™ Software ausgewertet. Es wurden je nach Färbung zwischen $3x10^4$ und $5x10^5$ lebende Zellen aufgenommen, die sich innerhalb des „Lymphozyten-Fensters“, welches durch eine bestimmte Größe der Zellen und die lichtbrechenden Eigenschaften dieser definiert ist, befanden. Bei der Analyse des Peritoneums wurde auf das Lymphozyten-Fenster verzichtet, da B1-Zellen größer sind und sich außerhalb dieses Fensters befinden.

Antikörper für durchflusszytometrische Färbungen

Fluorochrom gekoppelte Antikörper spezifisch für AA4.1-PE (Nr. 12-5892-82), B220-FITC (Nr. 553087), B220-PE (Klon M072288), B220-PerCP (Nr. 553093), B220-APC (Nr. 553092), CD3-PE (Klon 01082D), CD5-APC (Klon 53-7.3), CD19-FITC (BD Bioscience), CD21-PE (Klon 7G6), CD21-FITC (Klon 7G6), CD23-Bio (Klon B3B4), CD24-FITC (Klon M1/69), BP-1-PE (Klon 6C3/BP-1), CD43-FITC (Klon S7), CD95-PE (Klon Jo2), PNA-FITC (Nr. FL-1071), NP7-PE (BD Bioscience), IgD-FITC (Klon 11-26c.2a), IgG1-PE (Klon A85-1) und IgM-PE (Klon R6-60.2), IgM-FITC (Klon R6-60.2), SA-PerCP (Nr. 554064) und SA-FITC (Nr. A-2901) wurden entweder von BD Bioscience oder eBioscience bezogen.

7.2.1.6. In vivo 5-Brom-2‘-Desoxyuridin-(BrdU) Test

Diese Methode wurde verwendet, um den Influx von neu differenzierten B-Zellen aus dem Knochenmark in die Peripherie zu untersuchen. BrdU (Bromdesoxyuridin) ist ein Thymidinanalogon, das bei der DNA-Synthese in die DNA eingebaut wird (pulse); nach der Markierung können anschließend die neu entstandenen Zellen über längere Zeit (chase) untersucht werden.
Die Mäuse wurden 14 Tage lang mit 0,8 mg/mL BrdU im Trinkwasser gefüttert, wobei das Wasser alle drei Tage ausgetauscht wurde. Die Tiere wurden bis zu Tag 70 gehalten und an den Tagen 7, 14, 42, und 70 wurde ihnen Blut für den BrdU-Test über die Schwanzvene abgenommen. Um den BrdU-Einbau in die DNA von B-Lymphozyten im Blut durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurde das Blut zweimal einer Erythrozyten-Lyse unterzogen (siehe oben), anschließend einmal mit FACS-Puffer gewaschen und dann direkt

für die Färbung der Oberflächenmarker (siehe oben) und schließlich für die Färbung der eingebauten BrdU-Moleküle verwendet. Dazu wurde der APC BrdU Flow Kit (BD Bioscience) nach Herstellerangaben verwendet.

7.2.1.7. Immunhistochemie von Gefrierschnitten

Um gute Gefrierschnitte der Milzen zu erhalten, wurden diese möglichst innerhalb kurzer Zeit nach Präparation in O.C.T. Tissue Tek (Sakura) eingelegt und zum Gefrieren auf Trockeneis gestellt. Anschließend wurden die eingebetteten Organe bei -80 °C gelagert. Für die Färbungen wurden 4-8 µm dicke Schnitte mit einem Kryotom (Leica Microsystems) angefertigt, diese danach über Nacht luftgetrocknet und für 10 Minuten in 100 % Aceton fixiert. Danach wurden die Schnitte erneut für 20 Minuten getrocknet und bei -20°C bis zur Färbung aufbewahrt. Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte bei RT für 30 Minuten aufgetaut, kurz in PBS gewaschen und dann 20 Minuten mit Blocklösung (10 % (v/v) Ziegenserum, 0,1 % (v/v) H_2O_2, 1 % (w/v) BSA in PBS) bei RT inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Biotin- oder Avidin-Bindestellen nochmals mit zwei verschiedenen Blocklösungen (Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Laboratories) je 15 Minuten inkubiert, und zwischen beiden Vorgängen dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die verschiedenen Antikörper je eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C, inkubiert. Zwischen den verschiedenen Antikörper-Inkubationsschritten wurde jeweils drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Präparate noch mit Streptavidin gekoppelter Phosphatase (Sigma), verdünnt bei 1:400 in PBS, für 30 Minuten inkubiert und nochmals gewaschen.

Streptavidin-gekoppelte Antikörper wurden mit Hilfe des Alkalische Phosphatase Substrat-Kit III (Vector Laboratories) in Blau und Peroxidase-gekoppelte Antikörper durch eine Reaktion mit 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories) in Rot angefärbt. Die Farbreaktionen wurden durch Waschen der Schnitte in PBS gestoppt, die gefärbten Präparate danach getrocknet, anschließend mit Gelatine (Kaisers Gelatine, Merck) eingebettet bevor sie mit einem Deckgläschen versehen wurden. Alle Inkubationsschritte wurden bei einer Temperatur von 22°C in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die Aufnahmen der Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) untersucht, mit einer Digitalkamera (RS Photometrics) aufgenommen und im Programm Openlab von Improvision und Adobe Photoshop Software gesichert.

Nachweis der Follikelstruktur und des umgebenden Marginalsinus

Für die Sichtbarmachung der Follikelstruktur und des Marginalsinus in der Milz wurden folgende Reagenzien angewendet: Peroxidase-konjugierter α-Maus IgM (Sigma), Ratte α-Maus MOMA1 (Biomedicals AG) und biotinylierter α-Ratte IgG1 (Jackson Laboratories), um den α-MOMA-Antikörper zu detektieren. Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase (Sigma) bindet an den biotinylierten α-Ratte-IgG1.

Nachweis der Keimzentren und der follikulären Struktur

Für die Detektion der Keimzentren und der follikulären Struktur wurden folgende Reagenzien verwendet: Peroxidase konjugierter α-Maus-IgM (Sigma), biotinyliertes Erdnuss-(peanut) Agglutinin (PNA) (Vector Laboratories). Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase (Sigma) bindet an das biotinylierte Erdnuss-Agglutinin.

7.2.1.8. Präparation von Blutserum aus Mäuseblut

Für die Gewinnung von Seren wurde den Mäusen vor und 7 Tagen nach der Immunisierung Blut von der Schwanzvene mittels einer Glaskapillare abgenommen. Bei der Präparation der Mäuse 14 Tage nach Immunisierung oder auch bei der Analyse unimmunisierter Tiere, wurde das Blut direkt aus dem Herzen entnommen. Dieses wurde für mindestens drei Stunden zum Gerinnen auf Eis inkubiert und anschließend bei 15.000 x g (13.000 rpm) in einer auf 4°C gekühlten Minifuge für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, also das Serum, abgenommen und der Blutkuchen verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um ein möglichst blutfreies Serum zu gewährleisten.

7.2.1.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

An Hand dieser Methode kann die Serumkonzentration von sezernierten Antikörpern mit einer bestimmten Antigenspezifität und/oder einem bestimmten Immunglobulin-Isotyp bestimmt werden. Dazu werden die entsprechenden Antigene, bzw. Isotyp-spezifischen

Antikörper an eine 96-Lochplatte gekoppelt. Anschließend werden die Platten mit den zu untersuchenden Seren in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Die spezifisch gebundenen Antikörper können dann mit Hilfe von biotinylierten Immunglobulin-Isotyp-spezifischen Antikörpern und einer Streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase in einer enzymatischen Farbreaktion quantifiziert werden.

Bestimmung der spezifischen Standard-Immunglobulinspiegel

96-Lochplatten (Maxisorb, Nunc) wurden mit 5 µg/ml der Ig-Isotyp-spezifischen Ratte-anti-Maus-Antikörper (je nach Isotyp: IgM, II/41; IgG1, A85-3; IgG2a, R11-8; IgG2b, R9-91; IgG3, R2-38; IgA, C11-3 von BD Bioscience) in 0,1 M $NaHCO_3$ Puffer (pH 9,2; 1:2000) beschichtet. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer (PBS-M; 1 % (w/v) Milch in Phosphat-gepufferter Salzlösung) durch Inkubation für 30 Minuten bei RT abgesättigt. Im Anschluss wurden die Seren in Verdünnungen von 1:50 bis 1:10.240 in PBS-M aufgetragen. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei RT und anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS wurde je nach Isotyp der biotinylierte sekundäre Antikörper (IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1; IgG2a-Bio, R19-15; IgG2b-Bio, R12-3; IgG3-Bio, R40-82; IgA-Bio, C10-1, alle von BD Bioscience) zugegeben. Eine Stunde später, nach Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen der Platten mit PBS, wurde Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase (SA-AP) verdünnt 1:2000 in 0,1 M $NaHCO_3$ Puffer (pH 9,2) auf die Platten gegeben. Nach 30 Minuten wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Anwesenheit der Phosphatase durch Zugabe von O-Phenyldimine (Sigma) in 0,1 M Zitronensäure-Puffer mit 0,015 % (v/v) H_2O_2 als Substrat nachgewiesen. Die auftretende Farbreaktion wurde bei 405 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesers (Photometer Sunrise RC, Tecan) gemessen. Um die Immunglobulin-Mengen zu quantifizieren wurden auf jeder Platte Ig-spezifische Standards mit bekannter Menge ebenfalls in den verschiedenen Verdünnungen aufgetragen (IgM, G155-228; IgG1, MOPC-31-C; IgG2a, G155-178; IgG2b, MPC-11; IgG3, A112-3; IgA, M18-254).

Bestimmung der NP-spezifischen Immunglobulinspiegel

Für den Nachweis NP-spezifischer Antikörper (niedrig- und hochaffine) wurden die 96-Lochplatten (Maxisorb, Nunc) mit 5 µg/ml NP_{17}-BSA (Biosearch Technologies) und für den

Nachweis hochaffiner Antikörper mit 5 µg/ml NP_3-BSA (Biosearch Technologies) beschichtet. Die Zugabe der Seren sowie die späteren Schritte erfolgten wie beim Nachweis der spezifischen Antikörper. In dieser Arbeit wurden NP-spezifische Antikörper mit den Isotypen IgM und IgG1 bestimmt. Zur Quantifizierung der α-NP-IgM- und IgG1-Antikörper wurden folgende Standards verwendet: IgM1, 267.7; IgMb B1-8; IgG1a, 18-1-16; IgG1b, N1G9.

7.2.2. Zellkultur

7.2.2.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Pipetten unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus, Düsseldorf) durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei 300 x g (1200 rpm) für 10 Minuten zentrifugiert. Für die Waschschritte wurde steriles PBS (Dulbecco, PAA Laboratories, Linz) verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C mit 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verschiedenen Zelltypen wurden mit speziell angepassten Medien kultiviert.

7.2.2.2. Bestimmung der Zelldichte

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer konnte die Anzahl der Zellen im Medium lichtmikroskopisch bestimmt werden. Dazu wurden die Zellsuspensionen vorverdünnt und 10 µL in die Kammer pipettiert. Anschließend wurden 2-4 Großquadrate ausgezählt und die Zelldichte berechnet.

7.2.2.3. Kultivierung primärer Lymphozyten

Die aus der Milz von Mäusen isolierten Zellen (Abschnitt 7.2.1.2) wurden entweder direkt in Kulturmedium aufgenommen oder nach Anreicherung der B-Zellen (Abschnitt 7.2.1.3) in Kultur genommen. Für die Kultivierung wurden in 96-Loch-Platten je Loch $5x10^5$ Zellen in 200 µl B-Zell-Medium mit 10 % (v/v) FKS kultiviert. Je nach Versuch wurden einige der Zellen mit agonistischen α-CD40-Antikörpern (2,5 µg/ml; eBioscience (HM40-3)), α-IgM Antikörpern (15 µg/mL; AffiniPure F(ab')2 goat α-mouse IgM, µ-chain, Dianova), Interleukin 4 (IL-4; 1 ng/ml; rekombinant aus der Maus; Sigma), Lipopolysacchariden (LPS; 0,1 mg/mL; *E. coli* 055:B5, Sigma) oder Kombinationen dieser Stimulanzien, α-CD40 + IL4, kultiviert. Die Zellen wurden

bis zu fünf Tage in Kultur gehalten, zu verschiedenen Zeitpunkten mit Antikörpern deren Oberflächenmarker gefärbt und mittels FACSCalibur™ analysiert. Der Prozentsatz lebender Zellen wurde über eine Färbung mit DNA-bindendem TOPRO-3 durchgeführt, wobei tote Zellen den Farbstoff in ihren Zellkern aufnehmen und lebende Zellen ungefärbt verbleiben.

7.2.2.4. In vitro Proliferationsassay

Die Proliferationsrate von B-Zellen aus der Milz konnte durch die Markierung von isolierten B-Zellen (Abschnitt 7.2.1.3) mit 5-(und 6)-Carboxy-Fluoreszein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE, Molecular Probes) über mehrere Tage verfolgt werden. Bei CFSE handelt es sich um einen N-Succidimylester, der bei Bindung an Proteine der inneren Zellmembran zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird. Bei Zellteilung wird er gleichmäßig mit den Proteinen an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch diese dann nur noch halb so stark fluoreszieren wie die Mutterzelle (Quah et al., 2007).

Für die Markierung mit CFSE wurden zunächst $5x10^5$ Zellen pro Loch (96-Loch Platte) zweimal mit RPMI ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 37°C warmem RPMI mit 5 µM CFSE (gelöst in Wasser) aufgenommen und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das fünffache Volumen von kaltem B-Zell Medium auf die Zellsuspension gegeben und diese anschließend für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen dann in B-Zell-Medium aufgenommen und, wie unter 7.2.2.3 beschrieben, mit verschiedenen Zusätzen kultiviert. In den darauffolgenden fünf Tagen wurde die Fluoreszenz und Anzahl der Zellen mittels FACSCalibur™ analysiert und mit FlowJo ausgewertet.

7.2.3. Molekularbiologische Methoden

7.2.3.1. DNA-präparative Techniken

DNA Isolierung aus Mausschwanzzellen

Diese Methode ist abgewandelt nach Laird (Laird et al., 1991). Den Mäusen wurde ein etwa 0,3 cm langes Schwanzstück abgeschnitten und über Nacht schüttelnd in 500 µl Lysepuffer (Tris/HCl pH 8, (100 mM); EDTA (5 mM); SDS (0,2 %); NaCl (200 mM); 100 µg/ml Proteinase K) bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden Knochen und Haare durch 10-minütiges

Zentrifugieren bei 10.000 x g sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Proteinfällung wurde 1/3 des Lysatvolumens an 5 M NaCl-Lösung zugegeben, mehrmals invertiert und nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die genomische DNA im Reaktionsansatz zu fällen wurde anschließend 1 ml 100 % Isopropanol zugesetzt, invertiert und wie oben erneut zentrifugiert. Danach wurde mit 70 % Ethanol die DNA gewaschen und, wie vorher beschrieben, zentrifugiert. Im Anschluss wurde die DNA luftgetrocknet und anschließend in 100 µl Tris/HCl (pH 7,2) gelöst, indem sie für mehrere Stunden bei 37°C geschüttelt wurde.

Ethanol-Präzipitation der DNA

Diese Methode kann dazu verwendet werden, DNA aus einer Lösung zu fällen und anschließend in einem geringeren Volumen zu lösen.
Der gelösten DNA wurde zunächst 1/10-Volumen 3 M NaAc und 2 ½ Volumen 100 % EtOH zugesetzt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach mit 9.000 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen und die DNA mit 3 Volumen 70 % EtOH gewaschen. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurde dann erneut bei 9.000 x g zentrifugiert, das Pellet getrocknet, anschließend in 10 mM Tris-Puffer (HCl) pH 7 aufgenommen und bei 37°C für mehrere Stunden geschüttelt.

Phenol-Extraktion von DNA

Mit dieser Methode können Proteinkontaminationen aus einer DNA-Lösung entfernt werden. Die DNA-Lösung wurde auf ein Minimalvolumen von 200 µl gebracht und anschließend mit einem Volumen TE-gesättigtem Phenol (pH 8,0) versetzt. Nach dem Vermischen der Lösungen durch zweiminütiges starkes Schütteln wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 9.000 x g für zwei Minuten erzielt. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 x Volumen Chloroform versetzt. Durch zweiminütiges starkes Schütteln wurden die Lösungen vermischt und erneut wie oben zentrifugiert. Die DNA, in der oberen wässrigen Phase, wurde anschließend durch Ethanol-Präzipitation gefällt.

7.2.3.2. Techniken der DNA-Analyse

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985, Saiki et al., 1988) wurde für die Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendet. Hierzu wurde genomische DNA verwendet, die, wie oben beschrieben, aus Schwanzzellen der Mäuse isoliert wurde. Die Magnesium-Konzentration der Reaktionsansätze sowie das PCR-Programm wurden je nach Primer-Paar gewählt.

Reaktionsansatz *Taq*-Polymerase:

DNA: 5-10 ng	
Primer (100 µM)	0,25 µL
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µL
$MgCl_2$ (50 mM)	1 µL
Taq-Polymerase (5 U/µL)	0,15 µL
Puffer (10 X)	2,5 µL
Wasser	ad 25 µL

PCR-Programm *Taq*-Polymerase:

Starttemperatur	95°C	2.5 Min.
zyklische Denaturierung	95°C	45 Sek.
zykl. Hybridisierung	56°C –62°C	45 Sek.
zyklische Verlängerung	72°C	1-2 Min.
Finale Verlängerung	72°C	10 Min.
Anzahl der Zyklen	28-30	

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese wurde nach Sambrook (Sambrook und Russell, 2006) durchgeführt, um PCR-Produkte aufzutrennen und sichtbar zu machen oder um den DNA-Gehalt einer Probe festzustellen. Agarosegele enthielten 1 x TAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,5), 5 µg/ml Ethidiumbromid und 1 bis 2 % (w/v) Agarose. Die Elektrophorese wurde in einer Gelelektrophorese-Kammer (Peqlab) mit 1 x TAE Puffer bei 80 bis 100 V für 1 bis 2 Stunden durchgeführt.

7.2.3.3. Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen

Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung der Zellproteine wurden $3x10^6$ einer Zellkultur oder $5x10^6$ primäre B-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 20 µl 2-

fachem NP40-Extraktionspuffer (100 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 4 mM EDTA, 2 % (v/v) NP40) aufgenommen. Um die Zellen zu lysieren wurde der Ansatz 5 x abwechselnd auf Eis inkubiert und ein paar Sekunden auf höchster Stufe mehrmals für ein paar Sekunden gevortext. Um die Degradation durch Proteasen und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen der Proteine zu minimieren, wurden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zu einer einfachen Endkonzentration zugegeben (Mini Complete Tabletten, Roche Diagnostics; und Halt Phosphatase-Inhibitor Cocktail, Pierce). Anschließend wurde der Proteinextrakt von den Zelltrümmern und DNA getrennt indem das Lysat bei maximaler Umdrehungszahl für 15 Minuten zentrifugiert (4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach der Proteinquantifizierung wurde eine bestimmte Menge Extrakt (meist 15-25 µg Protein) mit 5 x Laemmli Probenpuffer (300 mM Tris pH 6,8 , 7,5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt (Endkonzentration 1 x), bei 70°C für 10 Minuten erhitzt und somit denaturiert. Die Extrakte wurden meistens direkt am Tag der Präparation weiterverwendet oder für weitere Experimente bei –80°C eingefroren.

Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad und wurde nach Firmenprotokoll durchgeführt.

Das Prinzip dieser Methode nach Bradford (Bradford, 1976) basiert auf der farblichen Verschiebung von rot (Absorptionsmaximum 470 nm) nach blau (Absorptionsmaximum 595), die bei Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 an Proteine geschieht. Nach Zugabe von 1 µL Proteinextrakt zu 799 µL dH2O und 200 µL Bio-Rad Reagenz wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde parallel zu den Proben eine Eichgerade mit bovinem Serumalbumin angefertigt.

SDS-PAA-Gelelektrophorese

Bei dieser Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetrennt, das 0,1 % SDS enthält. Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel (5 % (v/v) Acrylamid, 0,625 mM Tris pH 6,8 , 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,006 % (w/v) TEMED), das der Fokussierung der negativ geladenen Proteine

dient und einem Trenngel (10 to 12 % (v/v) Acrylamid, 3,75 mM Tris pH 6,8 , 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,004 % (w/v) TEMED), das die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse ermöglicht.

Zur Vorbereitung der Proteinextrakte, die, wie oben beschrieben isoliert wurden, wurde ein bestimmtes Extraktvolumen (Proteingehalt 15-25 µg) mit 5 x Laemmli Probenpuffer (300 mM Tris pH 6,8 , 7,5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt (Endkonzentration 1 x), bei 70°C für 10 Minuten erhitzt und gleich danach auf das mit 1 x Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris, 0,2 M Glyzin, 0,1 % (v/v) SDS) beschichtete PAA-Gel aufgetragen. Durch das Aufkochen wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und die erneute Faltung durch das Detergens SDS verhindert, welches die Eigenladung der Proteine überlagert, so dass alle Proteine negativ geladen sind. Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten wurden durch β-Mercaptoethanol reduziert.

Die verwendeten 10 % und 12 % Trenngele ermöglichten eine Auftrennung von Proteinen im Bereich zwischen 15- und 180 kDa.

Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard (Prestained Protein Ladder, Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde in einer Bio-Rad Vorrichtung bei 250 V und 20 mA (konstant) für das Sammelgel und 40 mA (konstant) für das Trenngel durchgeführt.

Western-Blotting

Bei der Western-Blot-Analyse (Towbin et al., 1979) können die im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine durch elektrischen Transfer auf eine Protein-bindende Membran übertragen werden. Da das elektrische Feld dabei senkrecht zur vorherigen Trennrichtung angelegt wird, bleibt das Muster der getrennten Proteine auf der Membran erhalten. Es wurde ein sogenannter „Nass-Blot“ in einer Bio-Rad-Apparatur durchgeführt, bei dem die gesamte Blotvorrichtung mit Blotpuffer (25 mM Tris Base, 0,2 M Glyzin, 20 % (v/v) Methanol) überdeckt ist. Die Proteine wurden mittels elektrischen Stroms auf eine Polyvinyliden-Fluorid (PVDF) Membran (Immobilon™ P Membran, Millipore) bei 40 mA (konstant) und 300 V über Nacht im Kühlraum oder bei 250 mA (konstant) und 300 V ebenfalls bei 4°C übertragen. Vor dem Blotvorgang wurde die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert, mit Reinstwasser gewaschen und anschließend mit Blotpuffer für den anschließenden Proteintransfer 5 Minuten lang äquilibriert. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls fünf Minuten in Blotpuffer äquilibriert und dann auf drei mit Blotpuffer getränkte

Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurde die PVDF-Membran gelegt und auf diese drei zusätzliche in Blotpuffer getränkte Filterpapiere. Anschließend wurde der Blot zwischen Anode und Kathode der Kammer so angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Membran wanderten. Nach dem Transfer wurde die Membran für fünf Minuten in unverdünntes Ponceau S (Ponceau S Lösung, Sigma) gelegt, und somit die zuvor übertragenen Proteine unspezifisch gefärbt. Mit dieser Methode konnte der Transfer der Proteine und die gleichmäßige Ladung der Spuren unmittelbar nach dem Transfer überprüft werden.

Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörpern

Bestimmte Proteine können mittels spezifischer Antikörper auf der Western-Blot-Membran nachgewiesen werden. Der Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe zweier Antikörper. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein und mit Hilfe des Zweitantikörpers, der den Erstantikörper spezifisch bindet, kann das Protein mittels einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Der Zweitantikörper ist an die Meerrettich (horseradish)-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol katalysiert. Das oxidierte Luminol emittiert Licht, das durch die Exposition eines lichtsensitiven Films (CEA RP new) nachgewiesen werden kann und dessen Entwicklung mit Hilfe eines Cawomat 2000 IR processor (beide von Ernst Christiansen) durchgeführt wurde. Die Chemolumineszenz wird verstärkt, indem die Oxidation von Luminol durch HRP in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers wie Phenol durchgeführt wird.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Western-Blot Membranen zunächst in TBST (0,1 M Tris/HCl pH 7,5 , 0,1 M NaCl, 0,02 % (v/v) Tween) mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) für 1 Stunde bei RT oder für qualitativ schlechtere Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der in TBST mit 5 % BSA verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper, der in einer 5 % Milchpulver-TBST-Lösung (w/v) verdünnt wurde, für 1 bis 3 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran ebenfalls dreimal für 5 Minuten in TBST gewaschen und somit von überschüssigen Antikörpern befreit.

Anschließend wurden mit dem ECL-Detektionsreagenz (Enhanced Chemiluminescence ECL™ von GE Healthcare) die gesuchten Proteine sichtbar gemacht.

Wiederverwendung eines Western-Blots (stripping)

Nach dem Nachweis einiger Proteine mittels Antikörper können diese entfernt werden, so dass die Membran mehrmals auf unterschiedliche Proteine untersucht werden kann. Wenn nicht anders angemerkt, wurden die Proteine, die in einer Abbildung untereinander aufgeführt sind, auf einer einzigen Membran nachgewiesen. Wenn mehrere Proteine auf einer Membran detektiert werden sollten, wurde die Membran grundsätzlich erst mit den phosphospezifischen Antikörpern und anschließend mit den Antikörpern gegen das gesamte Protein inkubiert. Dazwischen mussten die phosphospezifischen Antikörper mittels stripping entfernt werden. Somit wurde die Western-Membran z.B. in folgender Reihenfolge mit Antikörpern inkubiert: p-Raf-1-, p-B-Raf- und p-Erk-Antikörpern; dann stripping und anschließend mit Raf-1-, B-Raf-, pMEK- und Tubulin-Antikörpern; dann stripping der Membran und Inkubation mit dem Erk-spezifischen Antikörper. Erneutes stripping der Membran und schließlich Inkubation der Membran mit einem MEK-spezifischen Antikörper. Eine Western-Blot Membran kann bis zu vier Mal einem stripping unterzogen werden.
Um die Antikörper von der Membran zu lösen, wurden die Membranen für 30 Minuten bei 56°C und leichtem Schütteln in einer Waschlösung (62,5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x mit TBST gewaschen und anschließend mit TBST mit 5 % Rinderserumalbumin für mindestens 1 h geschüttelt und somit unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Schließlich wurde die Membran erneut mit einem Erstantikörper ÜN auf dem Roller inkubiert und am nächsten Tag wie oben beschrieben fortgefahren.

8 Literaturangaben

Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J. & Cowley, S. 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J,* 13**,** 1610-9.

Allman, D., Lindsley, R. C., Demuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A. & Hardy, R. R. 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol,* 167**,** 6834-40.

Allman, D. & Pillai, S. 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol,* 20**,** 149-57.

Alt, F. W. 1984. Exclusive immunoglobulin genes. *Nature,* 312**,** 502-3.

Alugupalli, K. R., Leong, J. M., Woodland, R. T., Muramatsu, M., Honjo, T. & Gerstein, R. M. 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity,* 21**,** 379-90.

Anderson, S. M., Tomayko, M. M. & Shlomchik, M. J. 2006. Intrinsic properties of human and murine memory B cells. *Immunol Rev,* 211**,** 280-94.

Anzelon, A. N., Wu, H. & Rickert, R. C. 2003. Pten inactivation alters peripheral B lymphocyte fate and reconstitutes CD19 function. *Nat Immunol,* 4**,** 287-94.

Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S. & Matsubara, Y. 2008. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat,* 29**,** 992-1006.

Arnault, J. P., Wechsler, J., Escudier, B., Spatz, A., Tomasic, G., Sibaud, V., Aractingi, S., Grange, J. D., Poirier-Colame, V., Malka, D., Soria, J. C., Mateus, C. & Robert, C. 2009. Keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in patients receiving sorafenib. *J Clin Oncol,* 27**,** e59-61.

Autier, J., Escudier, B., Wechsler, J., Spatz, A. & Robert, C. 2008. Prospective study of the cutaneous adverse effects of sorafenib, a novel multikinase inhibitor. *Arch Dermatol,* 144**,** 886-92.

Baljuls, A., Mueller, T., Drexler, H. C., Hekman, M. & Rapp, U. R. 2007. Unique N-region determines low basal activity and limited inducibility of A-RAF kinase: the role of N-region in the evolutionary divergence of RAF kinase function in vertebrates. *J Biol Chem,* 282**,** 26575-90.

Baljuls, A., Schmitz, W., Mueller, T., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Hekman, M. & Rapp, U. R. 2008. Positive regulation of A-RAF by phosphorylation of isoform-specific hinge segment and identification of novel phosphorylation sites. *J Biol Chem,* 283**,** 27239-54.

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., Van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F. & Saeland, S. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol,* 12**,** 881-922.

Baumgarth, N. 2000. A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev,* 176**,** 171-80.

Baumgarth, N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol,* 11**,** 34-46.

Beeram, M., Patnaik, A. & Rowinsky, E. K. 2003. Regulation of c-Raf-1: therapeutic implications. *Clin Adv Hematol Oncol,* 1**,** 476-81.

Benschop, R. J. & Cambier, J. C. 1999. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol,* 11**,** 143-51.

Berland, R. & Wortis, H. H. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol,* 20**,** 253-300.

Blank, J. L., Gerwins, P., Elliott, E. M., Sather, S. & Johnson, G. L. 1996. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *J Biol Chem,* 271**,** 5361-8.

Boes, M., Prodeus, A. P., Schmidt, T., Carroll, M. C. & Chen, J. 1998. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med,* 188**,** 2381-6.

Bossy, D., Milili, M., Zucman, J., Thomas, G., Fougereau, M. & Schiff, C. 1991. Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol,* 3**,** 1081-90.

Bross, L., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Honjo, T. & Jacobs, H. 2002. DNA double-strand breaks: prior to but not sufficient in targeting hypermutation. *J Exp Med,* 195**,** 1187-92.

Brummer, T., Shaw, P. E., Reth, M. & Misawa, Y. 2002. Inducible gene deletion reveals different roles for B-Raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signalling. *EMBO J,* 21**,** 5611-22.

Burrows, P. D., Stephan, R. P., Wang, Y. H., Lassoued, K., Zhang, Z. & Cooper, M. D. 2002. The transient expression of pre-B cell receptors governs B cell development. *Semin Immunol,* 14**,** 343-9.

Busslinger, M. 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol,* 22**,** 55-79.

Calogeraki, I., Barnier, J. V., Eychene, A., Felder, M. P., Calothy, G. & Marx, M. 1993. Genomic organization and nucleotide sequence of the coding region of the chicken c-Rmil(B-raf-1) proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun,* 193**,** 1324-31.

Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K. & Pillai, S. 2001. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity,* 14**,** 603-15.

Carter, R. H., Tuveson, D. A., Park, D. J., Rhee, S. G. & Fearon, D. T. 1991. The CD19 complex of B lymphocytes. Activation of phospholipase C by a protein tyrosine kinase-dependent pathway that can be enhanced by the membrane IgM complex. *J Immunol,* 147**,** 3663-71.

Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C. & Rajewsky, K. 2004. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol,* 5**,** 317-27.

Chan, V. W., Meng, F., Soriano, P., Defranco, A. L. & Lowell, C. A. 1997. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity,* 7**,** 69-81.

Chang, F., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Lee, J. T., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. & Mccubrey, J. A. 2003. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol,* 22**,** 469-80.

Chen, A. P., Ohno, M., Giese, K. P., Kuhn, R., Chen, R. L. & Silva, A. J. 2006. Forebrain-specific knockout of B-raf kinase leads to deficits in hippocampal long-term potentiation, learning, and memory. *J Neurosci Res,* 83**,** 28-38.

Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N. & Pierce, S. K. 1999. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med,* 190**,** 1549-60.

Chong, H., Lee, J. & Guan, K. L. 2001. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J,* 20**,** 3716-27.

Chong, H., Vikis, H. G. & Guan, K. L. 2003. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal,* 15**,** 463-9.

Chung, J. B., Silverman, M. & Monroe, J. G. 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol,* 24**,** 343-9.

Colicelli, J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE,* 2004**,** RE13.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature,* 378**,** 785-9.

Dal Porto, J. M., Gauld, S. B., Merrell, K. T., Mills, D., Pugh-Bernard, A. E. & Cambier, J. 2004. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol,* 41**,** 599-613.

Dallman, C., Johnson, P. W. & Packham, G. 2003. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis,* 8**,** 45-53.

Das, S., Cho, J., Lambertz, I., Kelliher, M. A., Eliopoulos, A. G., Du, K. & Tsichlis, P. N. 2005. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem,* 280**,** 23748-57.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F.,

Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R. & Futreal, P. A. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature,* 417**,** 949-54.

Decker, T., Pasca Di Magliano, M., Mcmanus, S., Sun, Q., Bonifer, C., Tagoh, H. & Busslinger, M. 2009. Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity,* 30**,** 508-20.

Delker, R. K., Fugmann, S. D. & Papavasiliou, F. N. 2009. A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nat Immunol,* 10**,** 1147-53.

Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C. & Thomas, G. 2001. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science,* 294**,** 1102-5.

Dhillon, A. S. & Kolch, W. 2002. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys,* 404**,** 3-9.

Disanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A. & De Saint Basile, G. 1993. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature,* 361**,** 541-3.

Edry, E. & Melamed, D. 2004. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol,* 173**,** 4265-71.

Egawa, T., Albrecht, B., Favier, B., Sunshine, M. J., Mirchandani, K., O'brien, W., Thome, M. & Littman, D. R. 2003. Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappa B activation and lymphocyte proliferation. *Curr Biol,* 13**,** 1252-8.

Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. & Noelle, R. J. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev,* 229**,** 152-72.

Eliopoulos, A. G., Wang, C. C., Dumitru, C. D. & Tsichlis, P. N. 2003. Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *EMBO J,* 22**,** 3855-64.

Ellinger-Ziegelbauer, H., Brown, K., Kelly, K. & Siebenlist, U. 1997. Direct activation of the stress-activated protein kinase (SAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathways by an inducible mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase 3 (MEKK) derivative. *J Biol Chem,* 272**,** 2668-74.

Emuss, V., Garnett, M., Mason, C. & Marais, R. 2005. Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res,* 65**,** 9719-26.

Engel, P., Zhou, L. J., Ord, D. C., Sato, S., Koller, B. & Tedder, T. F. 1995. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity,* 3**,** 39-50.

Eychene, A., Dusanter-Fourt, I., Barnier, J. V., Papin, C., Charon, M., Gisselbrecht, S. & Calothy, G. 1995. Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene,* 10**,** 1159-65.

Fabian, J. R., Daar, I. O. & Morrison, D. K. 1993. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol,* 13**,** 7170-9.

Fagarasan, S., Watanabe, N. & Honjo, T. 2000. Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev,* 176**,** 205-15.

Fleming, H. E. & Paige, C. J. 2001. Pre-B cell receptor signaling mediates selective response to IL-7 at the pro-B to pre-B cell transition via an ERK/MAP kinase-dependent pathway. *Immunity,* 15**,** 521-31.

Fruman, D. A., Snapper, S. B., Yballe, C. M., Davidson, L., Yu, J. Y., Alt, F. W. & Cantley, L. C. 1999. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science,* 283**,** 393-7.

Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T. & Chan, A. C. 1998. BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity,* 9**,** 93-103.

Fu, Y. X. & Chaplin, D. D. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol,* 17**,** 399-433.

Galabova-Kovacs, G., Matzen, D., Piazzolla, D., Meissl, K., Plyushch, T., Chen, A. P., Silva, A. & Baccarini, M. 2006. Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103**,** 1325-30.

Gardner, A. M., Vaillancourt, R. R., Lange-Carter, C. A. & Johnson, G. L. 1994. MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell,* 5**,** 193-201.

Garnett, M. J. & Marais, R. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell,* 6**,** 313-9.

Garnett, M. J., Rana, S., Paterson, H., Barford, D. & Marais, R. 2005. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell,* 20**,** 963-9.

Gavrin, L. K., Green, N., Hu, Y., Janz, K., Kaila, N., Li, H. Q., Tam, S. Y., Thomason, J. R., Gopalsamy, A., Ciszewski, G., Cuozzo, J. W., Hall, J. P., Hsu, S., Telliez, J. B. & Lin, L. L. 2005. Inhibition of Tpl2 kinase and TNF-alpha production with 1,7-naphthyridine-3-carbonitriles: synthesis and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett,* 15**,** 5288-92.

Ghosh, S. & Karin, M. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell,* 109 Suppl**,** S81-96.

Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. & Mathis, D. 1993. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science,* 261**,** 1175-8.

Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. 2001. Control of translation by the target of rapamycin proteins. *Prog Mol Subcell Biol,* 27**,** 143-74.

Gold, M. R. 2000. Intermediary signaling effectors coupling the B-cell receptor to the nucleus. *Curr Top Microbiol Immunol,* 245**,** 77-134.

Gold, M. R. 2008. B cell development: important work for ERK. *Immunity,* 28**,** 488-90.

Gong, S. & Nussenzweig, M. C. 1996. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science,* 272**,** 411-4.

Gray, D., Siepmann, K., Van Essen, D., Poudrier, J., Wykes, M., Jainandunsing, S., Bergthorsdottir, S. & Dullforce, P. 1996. B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *Immunol Rev,* 150**,** 45-61.

Guo, B. & Rothstein, T. L. 2005. B cell receptor (BCR) cross-talk: IL-4 creates an alternate pathway for BCR-induced ERK activation that is phosphatidylinositol 3-kinase independent. *J Immunol,* 174**,** 5375-81.

Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A. & Tedder, T. F. 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae. *Immunity,* 23**,** 7-18.

Hagemann, C. & Rapp, U. R. 1999. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res,* 253**,** 34-46.

Hanissian, S. H. & Geha, R. S. 1997. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity,* 6**,** 379-87.

Hao, Z. & Rajewsky, K. 2001. Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow. *J Exp Med,* 194**,** 1151-64.

Hardy, R. R. & Hayakawa, K. 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol,* 19**,** 595-621.

Harnett, M. M. 2004. CD40: a growing cytoplasmic tale. *Sci STKE,* 2004**,** pe25.

Hasbold, J., Lyons, A. B., Kehry, M. R. & Hodgkin, P. D. 1998. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol,* 28**,** 1040-51.

Hassan, G. S., Merhi, Y. & Mourad, W. M. 2009. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol,* 30**,** 165-72.

Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B. J., Anderson, D. J., Alvarado, R., Ludlam, M. J., Stokoe, D., Gloor, S. L., Vigers, G., Morales, T., Aliagas, I., Liu, B., Sideris, S., Hoeflich, K. P., Jaiswal, B. S., Seshagiri, S., Koeppen, H., Belvin, M., Friedman, L. S. & Malek, S. 2010. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature,* 464**,** 431-5.

Hein, K., Lorenz, M. G., Siebenkotten, G., Petry, K., Christine, R. & Radbruch, A. 1998. Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J Exp Med,* 188**,** 2369-74.

Hendriks, R. W., De Bruijn, M. F., Maas, A., Dingjan, G. M., Karis, A. & Grosveld, F. 1996. Inactivation of Btk by insertion of lacZ reveals defects in B cell development only past the pre-B cell stage. *EMBO J,* 15**,** 4862-72.

Herzog, S., Reth, M. & Jumaa, H. 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol,* 9**,** 195-205.

Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., Pelanda, R. & Reth, M. 2006. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103**,** 13789-94.

Homig-Holzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L. J., Muller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K. & Zimber-Strobl, U. 2008. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med,* 205**,** 1317-29.

Hu, B. T., Lee, S. C., Marin, E., Ryan, D. H. & Insel, R. A. 1997. Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *J Immunol,* 159**,** 1068-71.

Huleihel, M., Goldsborough, M., Cleveland, J., Gunnell, M., Bonner, T. & Rapp, U. R. 1986. Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Mol Cell Biol,* 6**,** 2655-62.

Huser, M., Luckett, J., Chiloeches, A., Mercer, K., Iwobi, M., Giblett, S., Sun, X. M., Brown, J., Marais, R. & Pritchard, C. 2001. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J,* 20**,** 1940-51.

Iritani, B. M., Alberola-Ila, J., Forbush, K. A. & Perimutter, R. M. 1999. Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors. *Immunity,* 10**,** 713-22.

Iritani, B. M., Forbush, K. A., Farrar, M. A. & Perlmutter, R. M. 1997. Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf. *EMBO J,* 16**,** 7019-31.

Jabara, H. H., Fu, S. M., Geha, R. S. & Vercelli, D. 1990. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J Exp Med,* 172**,** 1861-4.

Jacob, A., Cooney, D., Pradhan, M. & Coggeshall, K. M. 2002. Convergence of signaling pathways on the activation of ERK in B cells. *J Biol Chem,* 277**,** 23420-6.

Jansen, H. W., Lurz, R., Bister, K., Bonner, T. I., Mark, G. E. & Rapp, U. R. 1984. Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. *Nature,* 307**,** 281-4.

Jesenberger, V., Procyk, K. J., Ruth, J., Schreiber, M., Theussl, H. C., Wagner, E. F. & Baccarini, M. 2001. Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. *J Exp Med,* 193**,** 353-64.

Johannessen, C. M., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Thomas, S. R., Wardwell, L., Johnson, L. A., Emery, C. M., Stransky, N., Cogdill, A. P., Barretina, J., Caponigro, G., Hieronymus, H., Murray, R. R., Salehi-Ashtiani, K., Hill, D. E., Vidal, M., Zhao, J. J., Yang, X., Alkan, O., Kim, S., Harris, J. L., Wilson, C. J., Myer, V. E., Finan, P. M., Root, D. E., Roberts, T. M., Golub, T., Flaherty, K. T., Dummer, R., Weber, B. L., Sellers, W. R., Schlegel, R., Wargo, J. A., Hahn, W. C. & Garraway, L. A. 2010. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature,* 468**,** 968-72.

Jorge, A. A., Malaquias, A. C., Arnhold, I. J. & Mendonca, B. B. 2009. Noonan syndrome and related disorders: a review of clinical features and mutations in genes of the RAS/MAPK pathway. *Horm Res,* 71**,** 185-93.

Karreth, F. A., Denicola, G. M., Winter, S. P. & Tuveson, D. A. 2009. C-Raf inhibits MAPK activation and transformation by B-Raf(V600E). *Mol Cell,* 36**,** 477-86.

Kashiwada, M., Shirakata, Y., Inoue, J. I., Nakano, H., Okazaki, K., Okumura, K., Yamamoto, T., Nagaoka, H. & Takemori, T. 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J Exp Med,* 187**,** 237-44.

Kawauchi, K., Ogasawara, T., Yasuyama, M., Otsuka, K. & Yamada, O. 2009. Regulation and importance of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hematologic malignancies. *Anticancer Agents Med Chem,* 9**,** 1024-38.

Khan, W. N., Alt, F. W., Gerstein, R. M., Malynn, B. A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A. B., Herzenberg, L. A. & Et Al. 1995. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity,* 3**,** 283-99.

King, A. J., Patrick, D. R., Batorsky, R. S., Ho, M. L., Do, H. T., Zhang, S. Y., Kumar, R., Rusnak, D. W., Takle, A. K., Wilson, D. M., Hugger, E., Wang, L., Karreth, F., Lougheed, J. C., Lee, J., Chau, D., Stout, T. J., May, E. W., Rominger, C. M., Schaber, M. D., Luo, L., Lakdawala, A. S., Adams, J. L., Contractor, R. G., Smalley, K. S., Herlyn, M., Morrissey, M. M., Tuveson, D. A. & Huang, P. S. 2006. Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res,* 66**,** 11100-5.

King, L. B. & Monroe, J. G. 2000. Immunobiology of the immature B cell: plasticity in the B-cell antigen receptor-induced response fine tunes negative selection. *Immunol Rev,* 176**,** 86-104.

Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F. & Rajewsky, K. 1992. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell,* 69**,** 823-31.

Kloo, B., Nagel, D., Pfeifer, M., Grau, M., Duwel, M., Vincendeau, M., Dorken, B., Lenz, P., Lenz, G. & Krappmann, D. 2011. Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 272-7.

Koenen, M., Sippel, A. E., Trachmann, C. & Bister, K. 1988. Primary structure of the chicken c-mil protein:identification of domains shared with or absent from the retroviral v-mil protein. *Oncogene,* 2**,** 179-85.

Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J,* 351 Pt 2**,** 289-305.

Kolch, W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 6**,** 827-37.

Kolch, W., Weissinger, E., Mischak, H., Troppmair, J., Showalter, S. D., Lloyd, P., Heidecker, G. & Rapp, U. R. 1990. Probing structure and function of the raf protein kinase domain with monoclonal antibodies. *Oncogene,* 5**,** 713-20.

Kong, H. H., Cowen, E. W., Azad, N. S., Dahut, W., Gutierrez, M. & Turner, M. L. 2007. Keratoacanthomas associated with sorafenib therapy. *J Am Acad Dermatol,* 56**,** 171-2.

Korthauer, U., Graf, D., Mages, H. W., Briere, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A. G., Notarangelo, L. D., Levinsky, R. J. & Kroczek, R. A. 1993. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature,* 361**,** 539-41.

Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N. & Rajewsky, K. 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell,* 117**,** 787-800.

Kuppers, R. 2009. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer,* 9**,** 15-27.

Kurosaki, T. 1999. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol,* 17**,** 555-92.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* 227**,** 680-5.

Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. & Berns, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res,* 19**,** 4293.

Lam, K. P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell,* 90**,** 1073-83.

Lee, J. T., Jr. & Mccubrey, J. A. 2002. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia,* 16**,** 486-507.

Lee, J. W., Soung, Y. H., Park, W. S., Kim, S. Y., Nam, S. W., Min, W. S., Lee, J. Y., Yoo, N. J. & Lee, S. H. 2004. BRAF mutations in acute leukemias. *Leukemia,* 18**,** 170-2.

Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M. & Tzivion, G. 2007. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta,* 1773**,** 1196-212.

Li, X. & Carter, R. H. 1998. Convergence of CD19 and B cell antigen receptor signals at MEK1 in the ERK2 activation cascade. *J Immunol,* 161**,** 5901-8.

Li, X. & Carter, R. H. 2000. CD19 signal transduction in normal human B cells: linkage to downstream pathways requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C and Ca2+. *Eur J Immunol,* 30**,** 1576-86.

Liu, Y. J., De Bouteiller, O. & Fugier-Vivier, I. 1997. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol,* 9**,** 256-62.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. & Carsetti, R. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med,* 190**,** 75-89.

Lopes-Carvalho, T. & Kearney, J. F. 2004. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev,* 197**,** 192-205.

Luckett, J. C., Huser, M. B., Giagtzoglou, N., Brown, J. E. & Pritchard, C. A. 2000. Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ,* 11**,** 163-71.

Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M. & Avruch, J. 1996. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature,* 383**,** 181-5.

Maclennan, I. C. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol,* 12**,** 117-39.

Maclennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C. & Vinuesa, C. G. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev,* 194**,** 8-18.

Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. 1995. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J,* 14**,** 3136-45.

Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S. & Marshall, C. J. 1997. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem,* 272**,** 4378-83.

Martin, F. & Kearney, J. F. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol,* 2**,** 323-35.

Martin, F., Oliver, A. M. & Kearney, J. F. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity,* 14**,** 617-29.

Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J. & Marais, R. 1999. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J,* 18**,** 2137-48.

Mccubrey, J. A., Lee, J. T., Steelman, L. S., Blalock, W. L., Moye, P. W., Chang, F., Pearce, M., Shelton, J. G., White, M. K., Franklin, R. A. & Pohnert, S. C. 2001. Interactions between the PI3K and Raf signaling pathways can result in the transformation of hematopoietic cells. *Cancer Detect Prev,* 25**,** 375-93.

Mccubrey, J. A., Steelman, L. S., Abrams, S. L., Chappell, W. H., Russo, S., Ove, R., Milella, M., Tafuri, A., Lunghi, P., Bonati, A., Stivala, F., Nicoletti, F., Libra, M., Martelli, A. M., Montalto, G. & Cervello, M. 2009. Emerging Raf inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs,* 14**,** 633-48.

Mccubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M. & Franklin, R. A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta,* 1773**,** 1263-84.

Mccubrey, J. A., Steelman, L. S., Hoyle, P. E., Blalock, W. L., Weinstein-Oppenheimer, C., Franklin, R. A., Cherwinski, H., Bosch, E. & Mcmahon, M. 1998. Differential abilities of activated Raf oncoproteins to abrogate cytokine dependency, prevent apoptosis and induce autocrine growth factor synthesis in human hematopoietic cells. *Leukemia,* 12**,** 1903-29.

Mcheyzer-Williams, M. G. & Ahmed, R. 1999. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol,* 11**,** 172-9.

Mebius, R. E. & Kraal, G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol,* 5**,** 606-16.

Meffre, E., Casellas, R. & Nussenzweig, M. C. 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol,* 1**,** 379-85.

Mercer, K., Chiloeches, A., Huser, M., Kiernan, M., Marais, R. & Pritchard, C. 2002. ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene,* 21**,** 347-55.

Mercer, K., Giblett, S., Oakden, A., Brown, J., Marais, R. & Pritchard, C. 2005. A-Raf and Raf-1 work together to influence transient ERK phosphorylation and Gl/S cell cycle progression. *Oncogene,* 24**,** 5207-17.

Mercer, K. E. & Pritchard, C. A. 2003. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta,* 1653**,** 25-40.

Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F. & Baccarini, M. 2001. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J,* 20**,** 1952-62.

Mizuno, T. & Rothstein, T. L. 2005. B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement enhances BCR-induced ERK activation. *J Immunol,* 174**,** 3369-76.

Moelling, K., Heimann, B., Beimling, P., Rapp, U. R. & Sander, T. 1984. Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature,* 312**,** 558-61.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. & Papaioannou, V. E. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell,* 68**,** 869-77.

Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. & Dorshkind, K. 2006. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol,* 7**,** 293-301.

Moore, P. A., Belvedere, O., Orr, A., Pieri, K., Lafleur, D. W., Feng, P., Soppet, D., Charters, M., Gentz, R., Parmelee, D., Li, Y., Galperina, O., Giri, J., Roschke, V., Nardelli, B., Carrell, J., Sosnovtseva, S., Greenfield, W., Ruben, S. M., Olsen, H. S., Fikes, J. & Hilbert, D. M. 1999. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science,* 285**,** 260-3.

Moye, P. W., Blalock, W. L., Hoyle, P. E., Chang, F., Franklin, R. A., Weinstein-Oppenheimer, C., Pearce, M., Steelman, L., Mcmahon, M. & Mccubrey, J. A. 2000. Synergy between Raf and BCL2 in abrogating the cytokine dependency of hematopoietic cells. *Leukemia,* 14**,** 1060-79.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. & Honjo, T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell,* 102**,** 553-63.

Newton, K. & Dixit, V. M. 2003. Mice lacking the CARD of CARMA1 exhibit defective B lymphocyte development and impaired proliferation of their B and T lymphocytes. *Curr Biol,* 13**,** 1247-51.

Niault, T. S. & Baccarini, M. 2010. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis,* 31**,** 1165-74.

Nieuwenhuis, P., Gastkemper, N. A. & Opstelten, D. 1981. Histophysiology of follicular structures and germinal centres in relation to B cell differentiation. *Ciba Found Symp,* 84**,** 246-64.

Niiro, H. & Clark, E. A. 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol,* 2**,** 945-56.

Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Kohler, G. & Lamers, M. C. 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol,* 7**,** 133-43.

Niu, H., Ye, B. H. & Dalla-Favera, R. 1998. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev,* 12**,** 1953-61.

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. & Busslinger, M. 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature,* 401**,** 556-62.

O'neill, E. & Kolch, W. 2004. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer,* 90**,** 283-8.

O'neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M. & Kolch, W. 2004. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science,* 306**,** 2267-70.

Ochsenbein, A. F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science,* 286**,** 2156-9.

Otero, D. C., Omori, S. A. & Rickert, R. C. 2001. Cd19-dependent activation of Akt kinase in B-lymphocytes. *J Biol Chem,* 276**,** 1474-8.

Otipoby, K. L., Andersson, K. B., Draves, K. E., Klaus, S. J., Farr, A. G., Kerner, J. D., Perlmutter, R. M., Law, C. L. & Clark, E. A. 1996. CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. *Nature,* 384**,** 634-7.

Papavasiliou, F. N. & Schatz, D. G. 2002. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell,* 109 Suppl**,** S35-44.

Paus, D., Phan, T. G., Chan, T. D., Gardam, S., Basten, A. & Brink, R. 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med,* 203**,** 1081-91.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev,* 22**,** 153-83.

Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S. & Neuberger, M. S. 2002. AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature,* 418**,** 99-103.

Petro, J. B., Gerstein, R. M., Lowe, J., Carter, R. S., Shinners, N. & Khan, W. N. 2002. Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J Biol Chem,* 277**,** 48009-19.

Pezzutto, A., Dorken, B., Rabinovitch, P. S., Ledbetter, J. A., Moldenhauer, G. & Clark, E. A. 1987. CD19 monoclonal antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. *J Immunol,* 138**,** 2793-9.

Pillai, S. & Cariappa, A. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol,* 9**,** 767-77.

Pritchard, C. A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R. & Mcmahon, M. 1996. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol,* 6**,** 614-7.

Pritchard, C. A., Samuels, M. L., Bosch, E. & Mcmahon, M. 1995. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol,* 15**,** 6430-42.

Purkerson, J. M. & Parker, D. C. 1998. Differential coupling of membrane Ig and CD40 to the extracellularly regulated kinase signaling pathway. *J Immunol,* 160**,** 2121-9.

Quah, B. J., Warren, H. S. & Parish, C. R. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc,* 2**,** 2049-56.

Radich, J. P., Kopecky, K. J., Willman, C. L., Weick, J., Head, D., Appelbaum, F. & Collins, S. J. 1990. N-ras mutations in adult de novo acute myelogenous leukemia: prevalence and clinical significance. *Blood,* 76**,** 801-7.

Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature,* 381**,** 751-8.

Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H., Jr. & Stephenson, J. R. 1983. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 80**,** 4218-22.

Rawlings, D. J., Saffran, D. C., Tsukada, S., Largaespada, D. A., Grimaldi, J. C., Cohen, L., Mohr, R. N., Bazan, J. F., Howard, M., Copeland, N. G. & Et Al. 1993. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science,* 261**,** 358-61.

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. & Durandy, A. 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell,* 102**,** 565-75.

Ricciardi, M. R., Mcqueen, T., Chism, D., Milella, M., Estey, E., Kaldjian, E., Sebolt-Leopold, J., Konopleva, M. & Andreeff, M. 2005. Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia,* 19**,** 1543-9.

Rickert, R. C., Rajewsky, K. & Roes, J. 1995. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature,* 376**,** 352-5.

Rickert, R. C., Roes, J. & Rajewsky, K. 1997. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res,* 25**,** 1317-8.

Rolli, V., Gallwitz, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W. W., Zurn, C. & Reth, M. 2002. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell,* 10**,** 1057-69.

Roos, J., Hennig, I., Schwaller, J., Zbaren, J., Dummer, R., Burg, G., Tobler, A., Virgilio, L., Croce, C. M., Fey, M. F. & Borisch, B. 2001. Expression of TCL1 in hematologic disorders. *Pathobiology,* 69**,** 59-66.

Rose, M. L., Birbeck, M. S., Wallis, V. J., Forrester, J. A. & Davies, A. J. 1980. Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature,* 284**,** 364-6.

Rose, M. L. & Malchiodi, F. 1981. Binding of peanut lectin to thymic cortex and germinal centres of lymphoid tissue. *Immunology,* 42**,** 583-91.

Roskoski, R., Jr. 2010. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun,* 399**,** 313-7.

Rowland, S. L., Leahy, K. F., Halverson, R., Torres, R. M. & Pelanda, R. 2010. BAFF receptor signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling. *J Immunol,* 185**,** 4570-81.

Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R. & Bolen, J. B. 1995. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem,* 270**,** 11590-4.

Ruefli-Brasse, A. A., French, D. M. & Dixit, V. M. 2003. Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science,* 302**,** 1581-4.

Ruland, J., Duncan, G. S., Elia, A., Del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D. G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P. S. & Mak, T. W. 2001. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell,* 104**,** 33-42.

Ruland, J. & Mak, T. W. 2003. From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB. *Semin Immunol,* 15**,** 177-83.

Rushworth, L. K., Hindley, A. D., O'neill, E. & Kolch, W. 2006. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol,* 26**,** 2262-72.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science,* 239**,** 487-91.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science,* 230**,** 1350-4.

Sambrook, J. & Russell, D. W. 2006. *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual,* Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sato, S., Miller, A. S., Howard, M. C. & Tedder, T. F. 1997. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J Immunol,* 159**,** 3278-87.

Sato, S., Steeber, D. A. & Tedder, T. F. 1995. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 92**,** 11558-62.

Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. & Scott, M. L. 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science,* 293**,** 2111-4.

Seger, R. & Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J,* 9**,** 726-35.

Shapiro-Shelef, M. & Calame, K. 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol,* 5**,** 230-42.

Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., Mcheyzer-Williams, L. J., Liao, J., Mcheyzer-Williams, M. G. & Calame, K. 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity,* 19**,** 607-20.

Shelton, J. G., Moye, P. W., Steelman, L. S., Blalock, W. L., Lee, J. T., Franklin, R. A., Mcmahon, M. & Mccubrey, J. A. 2003. Differential effects of kinase cascade inhibitors on neoplastic and cytokine-mediated cell proliferation. *Leukemia,* 17**,** 1765-82.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. & Et Al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell,* 68**,** 855-67.

Shirakata, Y., Ishii, K., Yagita, H., Okumura, K., Taniguchi, M. & Takemori, T. 1999. Distinct subcellular localization and substrate specificity of extracellular signal-regulated kinase in B cells upon stimulation with IgM and CD40. *J Immunol,* 163**,** 6589-97.

Sidman, C. L., Shultz, L. D., Hardy, R. R., Hayakawa, K. & Herzenberg, L. A. 1986. Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science,* 232**,** 1423-5.

Simons, K. & Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature,* 387**,** 569-72.

Smith, M. L., Snaddon, J., Neat, M., Cambal-Parrales, M., Arch, R., Lister, T. A. & Fitzgibbon, J. 2003. Mutation of BRAF is uncommon in AML FAB type M1 and M2. *Leukemia,* 17**,** 274-5.

Sowa, J. M., Crist, S. A., Ratliff, T. L. & Elzey, B. D. 2009. Platelet influence on T- and B-cell responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz),* 57**,** 235-41.

Sridhar, S. S., Hedley, D. & Siu, L. L. 2005. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther,* 4**,** 677-85.

Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., Depinho, R. A., Kutok, J. L., Kearney, J. F., Otipoby, K. L. & Rajewsky, K. 2009. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell,* 139**,** 573-86.

Storm, S. M., Cleveland, J. L. & Rapp, U. R. 1990. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene,* 5**,** 345-51.

Strumberg, D. 2005. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc),* 41**,** 773-84.

Su, T. T. & Rawlings, D. J. 2002. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol,* 168**,** 2101-10.

Sutor, S. L., Vroman, B. T., Armstrong, E. A., Abraham, R. T. & Karnitz, L. M. 1999. A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulates c-Raf and A-Raf. *J Biol Chem,* 274**,** 7002-10.

Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Aizawa, S., Yazaki, Y., Kadowaki, T. & Koyasu, S. 1999. Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science,* 283**,** 390-2.

Takle, A. K., Brown, M. J., Davies, S., Dean, D. K., Francis, G., Gaiba, A., Hird, A. W., King, F. D., Lovell, P. J., Naylor, A., Reith, A. D., Steadman, J. G. & Wilson, D. M. 2006. The identification of potent and selective imidazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg Med Chem Lett,* 16**,** 378-81.

Tarakhovsky, A. 1997. Bar Mitzvah for B-1 cells: how will they grow up? *J Exp Med,* 185**,** 981-4.

Tarlinton, D. 2006. B-cell memory: are subsets necessary? *Nat Rev Immunol,* 6**,** 785-90.

Tordai, A., Franklin, R. A., Patel, H., Gardner, A. M., Johnson, G. L. & Gelfand, E. W. 1994. Cross-linking of surface IgM stimulates the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human B lymphocytes. *J Biol Chem,* 269**,** 7538-43.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 76**,** 4350-4.

Tung, J. W., Mrazek, M. D., Yang, Y. & Herzenberg, L. A. 2006. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103**,** 6293-8.

Turner, M., Gulbranson-Judge, A., Quinn, M. E., Walters, A. E., Maclennan, I. C. & Tybulewicz, V. L. 1997. Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J Exp Med,* 186**,** 2013-21.

Tzivion, G., Luo, Z. & Avruch, J. 1998. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature,* 394**,** 88-92.

Van Kooten, C. & Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol,* 67**,** 2-17.

Vigorito, E. & Turner, M. 2006. Differential requirements of PI3K subunits for BCR or BCR/CD19-induced ERK activation. *Adv Exp Med Biol,* 584**,** 43-52.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. & Brown, R. F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem,* 269**,** 5241-8.

Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D. & Marais, R. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell,* 116**,** 855-67.

Weber, C. K., Slupsky, J. R., Kalmes, H. A. & Rapp, U. R. 2001. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res,* 61**,** 3595-8.

Weinberg, R. A. 2007. *The biology of cancer,* New York, Garland Science.

Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 5**,** 875-85.

White, M. K. 2003. Small-molecule inhibitors of signal transduction pathways in leukemia therapeutics: how to assess selectivity for malignant signals. *Leukemia,* 17**,** 1759-61.

Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J. & Reth, M. 1998. SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med,* 188**,** 791-5.

Wiese, S., Pei, G., Karch, C., Troppmair, J., Holtmann, B., Rapp, U. R. & Sendtner, M. 2001. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat Neurosci,* 4**,** 137-42.

Wojnowski, L., Stancato, L. F., Larner, A. C., Rapp, U. R. & Zimmer, A. 2000. Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev,* 91**,** 97-104.

Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Larner, A. C., Rapp, U. R. & Zimmer, A. 1998. Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev,* 76**,** 141-9.

Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R. & Zimmer, A. 1997. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet,* 16**,** 293-7.

Xu, S., Robbins, D., Frost, J., Dang, A., Lange-Carter, C. & Cobb, M. H. 1995. MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 92**,** 6808-12.

Xu, S., Tan, J. E., Wong, E. P., Manickam, A., Ponniah, S. & Lam, K. P. 2000. B cell development and activation defects resulting in xid-like immunodeficiency in BLNK/SLP-65-deficient mice. *Int Immunol,* 12**,** 397-404.

Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotani, S., Asahi, M., Taniike, M., Nakai, A., Tsujimoto, I., Matsumura, Y., Miyazaki, J., Chien, K. R., Matsuzawa, A., Sadamitsu, C., Ichijo, H., Baccarini, M., Hori, M. & Otsu, K. 2004. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest,* 114**,** 937-43.

Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A. & Hancock, J. F. 1998. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem,* 273**,** 24052-6.

Yan, M. & Templeton, D. J. 1994. Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase. *J Biol Chem,* 269**,** 19067-73.

Yasuda, T., Kometani, K., Takahashi, N., Imai, Y., Aiba, Y. & Kurosaki, T. 2011. ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation. *Sci Signal,* 4**,** ra25.

Yasuda, T., Sanjo, H., Pages, G., Kawano, Y., Karasuyama, H., Pouyssegur, J., Ogata, M. & Kurosaki, T. 2008. Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity,* 28**,** 499-508.

Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., Mcferran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M. & Kolch, W. 1999. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature,* 401**,** 173-7.

Yoshida, T., Ng, S. Y. & Georgopoulos, K. 2010. Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Curr Opin Immunol,* 22**,** 154-60.

Yoshida, T., Ng, S. Y., Zuniga-Pflucker, J. C. & Georgopoulos, K. 2006. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol,* 7**,** 382-91.

Zhang, B. H. & Guan, K. L. 2000. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J,* 19**,** 5429-39.

Zheng, B., Fiumara, P., Li, Y. V., Georgakis, G., Snell, V., Younes, M., Vauthey, J. N., Carbone, A. & Younes, A. 2003. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood,* 102**,** 1019-27.

9 Anhang

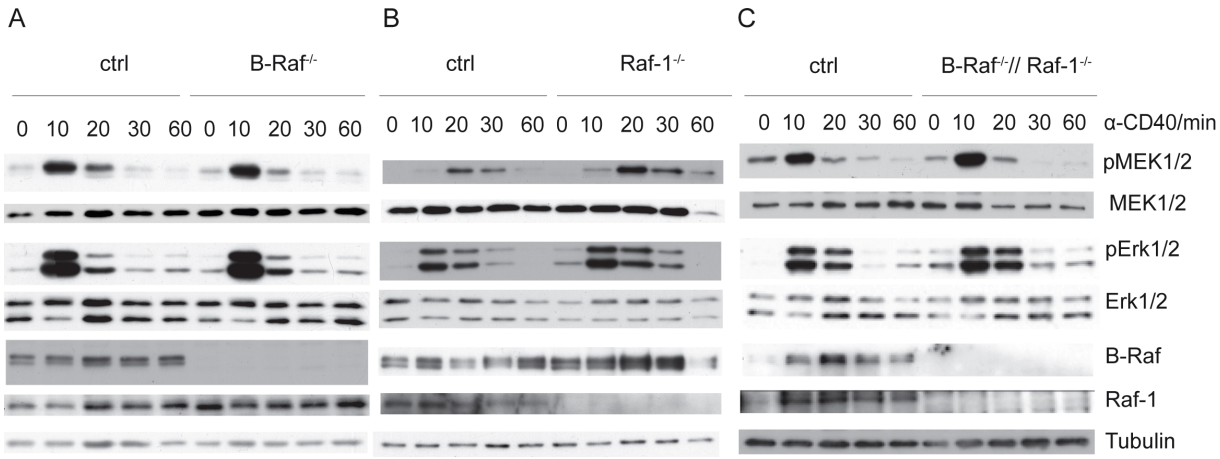


Abbildung 41 Der Erk-Signalweg lässt sich in B-Raf-, Raf-1- und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen über CD40 aktivieren. Dargestellt sind drei Western-Blots, die den zeitlichen Aktivierungsverlauf von MEK und Erk in Kontroll-B-Zellen (ctrl), B-Raf- **(A)**, Raf-1- **(B)** und B-Raf/Raf-1-defizienten B-Zellen **(C)** die mit α-CD40-Antikörpern über die angegebene Zeit (min) inkubiert wurden, zeigen. Die $B220^{+}CD43^{-}$ reifen B2-Zellen wurden aus der Milz mittels MACS-Methode isoliert. Die Blot-Membranen wurden jeweils mit phosphospezifischen Antikörpern für pMEK1/2 (Ser217/221) und pErk1/2 (Thr202/Tyr204) und Antikörpern spezifisch für alle Formen von MEK1/2 und Erk1/2 inkubiert, so dass die phosphorylierten (aktiven) Formen sowie die basale Expression von Raf-1, B-Raf, MEK1/2 und Erk1/2 untersucht werden konnte. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Die Versuche wurden drei bis sechs Mal durchgeführt.

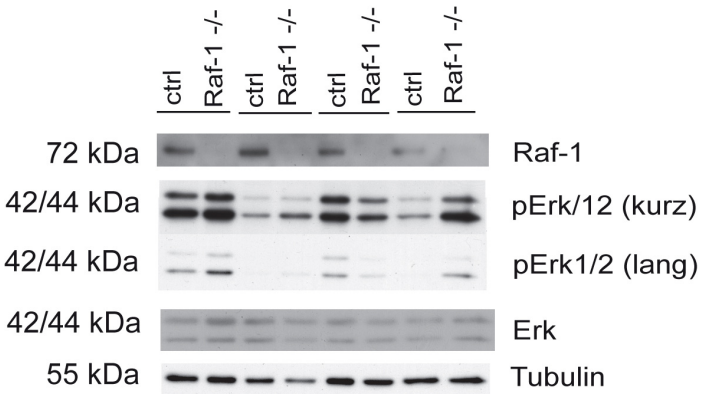


Abbildung 42 Die basale Aktivierung von Erk ist in Raf-1-defizienten B-Zellen erhöht. Die Abbildung zeigt eine Western-Blot-Analyse von je vier Proteinextrakten aus Kontroll- (ctrl) sowie aus Raf-1-defizienten B-Zellen, die auf die Phosphorylierung von Erk1/2, auf den Gesamtgehalt von Erk1/2 und auf Raf-1 untersucht wurden. Die $B220^{+}CD43^{-}$ reifen B2-Zellen wurden aus der Milz mittels MACS-Methode isoliert; kurz: kurze Belichtungszeit; lang: lange Belichtungszeit. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

I. Die Aktivierung von Akt und seiner Zielproteine in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen

Da die konstitutive Aktivierung von Erk und die damit verbundene B-Zell-Expansion und spätere Lymphomentstehung in unserer Arbeitsgruppe als abhängig von CD19 und PI3K beschrieben werden konnte, sollte zudem ferner in einem Nebenprojekt die Frage beantwortet werden, ob die Aktivierung von Akt und seiner Zielproteine in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ebenso abhängig von CD19 stattfindet.

Die Serin/Threonin-Kinase Akt spielt eine Rolle bei den Überlebenssignalen von B-Zellen, die ausgehend vom BCR Liganden-unabhängig stattfinden, und stromaufwärts über CD19 an PI3K und im Anschluss an Akt weitergegeben werden (Otero et al., 2001, Srinivasan et al., 2009). Der Western-Blot in Abbildung 43 A zeigt, dass Akt an S473 in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen phosphoryliert und somit aktiviert vorliegt.

Die Aktivierung von Akt und einiger seiner Zielproteine, wie mTOR, p70, FoxO1 (Forkhead familiy of transcription factors 1) und TCL1B (T cell leukemia 1 B) u.a. ist in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen CD19 abhängig (Abbildung 43 B). PTEN, ein negativer Regulator von PI3K und stromaufwärts von Akt, ist in LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ Mäusen in höherem Maße als in CD19cre$^{+/-}$ Kontroll-Mäusen vorhanden. FoxO1, ein Transkriptionsfaktor der über pAkt negativ reguliert wird, als Tumorsuppressor wirkt und bei der Entstehung von akuter Leukämie ein Rolle spielt, wurde in B-Zellen aus LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ Mäusen geringer exprimiert. Diese Reduktion war CD19-abhängig. TCL1B ist ein Protoonkogen, das an der Aktivierung von Akt während der Embryonalentwicklung und der Entstehung von B-Zell-Lymphomen beteiligt ist. Die Expressionshöhe von TCL1B war in LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ im Vergleich zu den drei anderen Extrakten erhöht.

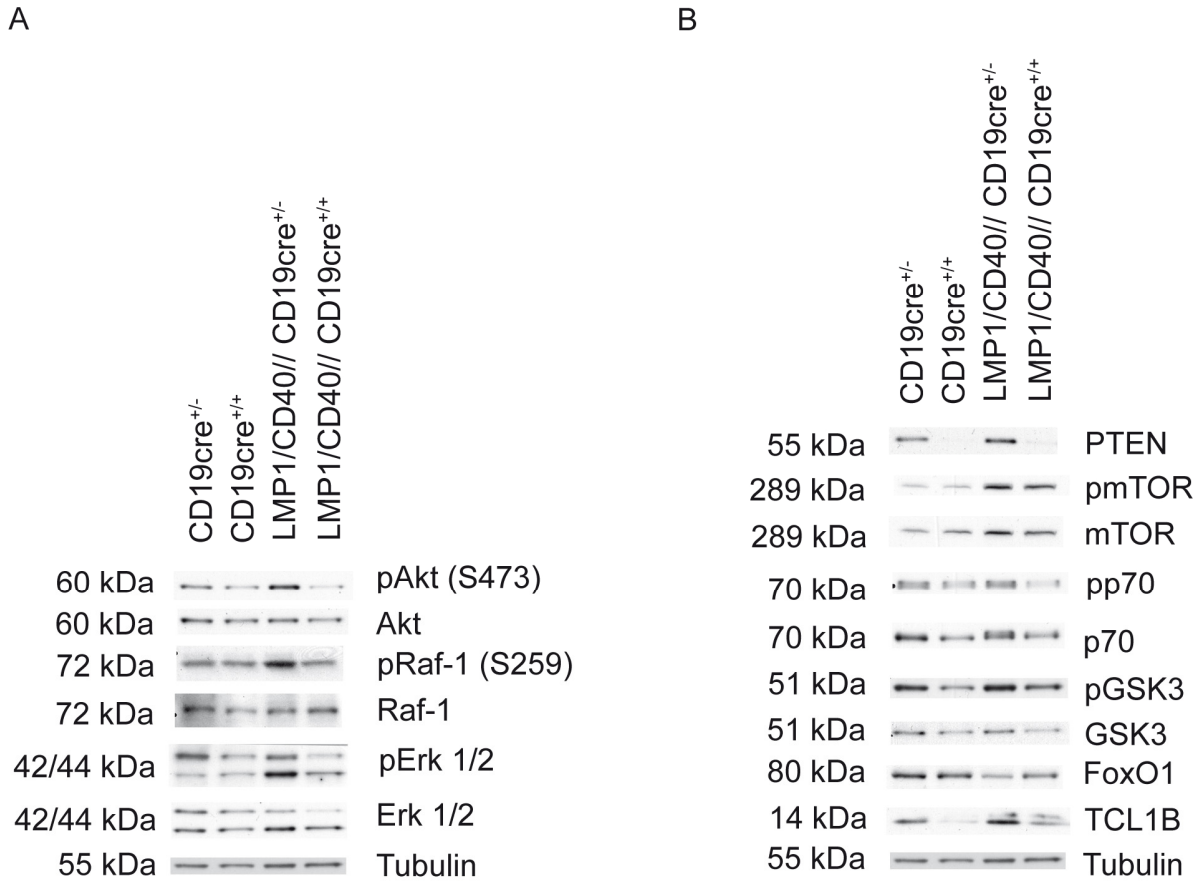


Abbildung 43 Die Aktivierung von Akt und seiner Zielproteine in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen. Die Abbildung zeigt eine Western-Blot-Analyse mit Proteinextrakten aus isolierten reifen B2-Zellen von CD19cre$^{+/-}$, CD19cre$^{+/+}$, LMP1/CD40//CD19cre$^{+/-}$ und LMP1/CD40//CD19cre$^{+/+}$ Mäusen. Abbildungsteil **(A)** zeigt die Expressionsstärke bzw. Phosphorylierung von Akt, Raf-1 und Erk und Teil **(B)** die Expressionsstärke bzw. Phosphorylierung von PTEN (phosphatase with tensin homology), mTOR (mammalian target of rapamycin), p70 (S6 Kinase), GSK3 (Glykogen Synthase Kinase-3), FoxO1 (Forkhead familiy of transcription factors 1) und TCL1B (T cell leukemia 1 B). Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Dieses Experiment wurde drei Mal durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass neben Akt auch einige seiner Zielproteine, wie GSK3, mTOR und TCL1B in ihrer Expression oder Phosphorylierung in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen verändert vorliegen, was vermuten lässt, dass diese von Akt regulierten Proteine sowohl bei der B-Zell-Expansion als auch bei der späteren Lymphomentstehung in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen eine Rolle spielen. Darüber hinaus ist die Aktivierung von Akt und seiner Zielproteine, wie im Falle von Erk, CD19-abhängig. Diese Ergebnisse zusammen mit denen unserer Arbeitsgruppe unterstreichen die Rolle von CD19 bei der LMP1/CD40-induzierten konstitutiven B-Zell-Aktivierung und –Expansion (Publikation in Vorbereitung).

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Samantha Feicht

Geburtsdatum und –ort: 16.06.1983 in Bogotá, Kolumbien

Nationalität: deutsch/kolumbianisch

Ausbildung

2008-2012: Anfertigung der Dissertation am Helmholtz-Zentrum München; Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München;

2003-2008: Studium der molekularen Biotechnologie (Diplom) an der Universität Bielefeld (Abschlussnote 1,3).
Diplomarbeit am Lehrstuhl für zelluläre Genetik der Technischen Fakultät zu dem Thema „Versuche zur Lokalisation eines humanen Serinprotease-Inhibitors SerpinE3“
Hauptfächer: Mol. Medizin, Zellkulturtechnik, Genetik, Entwicklungsbiologie und Zytogenetik;

2002-2003: Studium der Mikrobiologie (2 Semester) an der Universidad de Los Andes in Bogotá, Kolumbien; Hauptfach: Bakteriologie;

2002: Abitur an der Deutschen Schule Colegio Andino in Bogotá, Kolumbien (Abschlussnote 1,7; Jahrgangsbeste);

Praktika

2007: Kolumbianisches Institut für Immunologie, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC); AG Lozano
Bogotá, Kolumbien

2006: Herz- und Diabeteszentrum NRW, Erich und Hanna Klessmann Institut für kardiovaskuläre Forschung und Entwicklung, AG Milting
Bad Oeynhausen, Deutschland

Publikationen in Vorbereitung

B-Raf and Raf-1 act partially redundant in B-cell development. Feicht S, Marschall-Schröter G, Lehmann FM, Jesenberger V, Chen A, Hobeika E, Bornkamm GW and Zimber-Strobl U; AG Strobl, Department of Gene Vectors, Helmholtz-Zentrum München, München, Germany. (Manuskript in Vorbereitung)

The expansion of chronically activated B cells is strictly dependent on a functional BCR and its coreceptor CD19. Hojer C, Hampel F, Feicht S, Strobl J, Uytterspot N, Hömig-Hölzel C, Ferch U, Ruland J, Rajewsky K, Zimber-Strobl U; AG Strobl, Department of Gene Vectors, Helmholtz-Zentrum München, München, Germany. (Manuskript in Vorbereitung)

Publikation

Genomic profiling of developing cardiomyocytes from recombinant murine embryonic stem cells reveals regulation of transcription factor clusters. Seewald MJ, Ellinghaus P, Kassner A, Stork I, Barg M, Niebrügge S, Golz S, Summer H, Zweigerdt R, Schräder EM, Feicht S, Jaquet K, Reis S, Körfer R, Milting H.; Department of Target Discovery, Bayer Healthcare AG, Wuppertal, Germany. *Physiol. Genomics* (2009).

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und so die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg W. Bornkamm für die Möglichkeit an seinem Institut meine Doktorarbeit anzufertigen und für die Bereitstellung dieses interessanten Themas.

Ebenfalls gilt ein ganz besonderer Dank PD Dr. Ursula Zimber-Strobl für die erstklassige fachliche sowie experimentelle Betreuung, das stetige Interesse, die vielen Diskussionen und das exzellente Arbeitsklima. Ich möchte mich auch für die Möglichkeit bedanken sehr unabhängig zu arbeiten, was mich nicht nur beruflich, sondern auch persönlich weiter gebracht hat. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Berit Jungnickel möchte ich mich für die zahlreichen Gespräche, die Erstbegutachtung und Vertretung meiner Arbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken.

Ich möchte mich ebenfalls bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt und der ganzen Abteilung Genvektoren für das angenehme Arbeitsklima und die konstruktiven Diskussionen während der Seminare.

Ganz besonders möchte ich auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, meinen Labormädels Petra, Sabine, Franzi, Kristina, Anne, Steffi und Anna, danken. Danke für die tolle Atmosphäre im Labor und die stetige Unterstützung bei zahlreichen Problemen. Ein besonderer Dank gilt Kristina Djermanovic, für den Spaß im Labor und dafür, dass sie für meine Probleme in jeder Situation immer ein offenes Ohr hatte. *Mil Gracias*! Auch Petra Fiedler möchte ich danken, da sie mich ebenfalls fachlich und moralisch unterstützt hat.

Auch ein ehemaliges Mitglied, Franziska Hampel, hat mir stets geholfen und mich immer ermutigt, vielen Dank dafür.
Vielen Dank auch an Gabriele Marschall-Schröter für die exzellente technische und moralische Unterstützung. Herzlichen Dank auch an Dr. Lothar Strobl für die Suche zahlreicher interessanter Publikationen und für die vielen Datenbank-Recherchen.

Ebenfalls möchte ich Camilla Ladinig für die experimentelle Hilfe während der letzten Monate meiner Arbeit danken. Auch Cornelia Kuklik-Roos möchte ich ein Dankeschön aussprechen, für die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Vielen Dank an die Tierhaltung des Hämatologikums, insbesondere Martina Möschter und Jasmin Teutsch, für die erstklassige Betreuung meiner Mäuse. Auch vielen Dank an Michael Hagemann für die Koordinierung jeglicher Maustransporte und für die Hilfsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei Frau Sylvia Mangelkammer und Roswitha Neumann für die Unterstützung bei sämtlichen administrativen Angelegenheiten.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und auch diese Arbeit ermöglicht haben. Vielen Dank für die moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Frank, der mir immer zur Seite stand und mich nicht nur experimentell, sondern auch moralisch unterstützt hat. Ich liebe dich und freue mich auf ein gemeinsames Leben und eine erfolgreiche Zukunft!