

**Analyse von Funktionen des prä-B-Zell-Rezeptors
anhand induzierbarer Expression von
Immunglobulin-Schweren-Ketten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Mario Zierden
aus Prüm

Köln 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Rajewsky
Priv. Doz. Dr. Peter Dröge

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2001

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Entstehung der Antikörper-Vielfalt.....	1
1.2	Stadien der B-Zellentwicklung.....	4
1.3	Die Bedeutung des präBCR-Komplexes für die B-Zellentwicklung.....	9
1.4	Die Funktion des präBCR-Komplexes in der Differenzierung von B-Zellvorläufern..	11
1.5	Ziele der Arbeit.....	15
2.	Material und Methoden.....	17
2.1	Chemikalien und Lösungen.....	17
2.2	Mäuse.....	17
2.3	Monoklonale Antikörper und Antiseren.....	17
2.4	Immunfluoreszenz und Zellsortierung.....	18
2.4.1	Intrazelluläre μ HC-Färbung.....	18
2.4.2	Magnetische Zellsortierung.....	18
2.5	Retrovirale Transfektion von 38B9 pro-B-Zellen mit dem μ HC-Expressionsvektor pELCV.....	19
2.6	Metabolische [³⁵ S]-Markierung und Immunpräzipitationen.....	21
2.7	Amplifikation von IgH μ -Transkripten.....	21
2.8	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben.....	22
2.9	PCR zur Bestimmung des Genotyps von Mäusen.....	22
2.10	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	23
2.11	Datenbankvergleich der IgH-Genkomplexe.....	23
2.12	Kultivierung von B-Zelllinien.....	23
2.13	Etablierung und Kultivierung von pro-B-Zelllinien der fötalen Leber.....	23
2.14	Kultivierung von pro-B-Zellen des Knochenmarks.....	24
3.	Ergebnisse.....	25
3.1	B-Zellentwicklung in VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen.....	25
3.2	Das V _H D _H J _H -Segment von VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen erlaubt vermutlich die Ausprägung einer μ HC in einem präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche von transfizierten pro-B-Zelllinien.....	33
3.3	Das ED-cre System erlaubt die induzierbare μ HC-Expression in IL-7-abhängigen pro-B-Zelllinien von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen.....	40
3.4	Zwar differenzieren pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen in Folge der präBCR-Expression in vitro zu prä-B-Zellen und proliferieren unabhängig von Stromazellen oder zugesetzten Zytokinen, doch scheint die präBCR-vermittelte Differenzierung von B-Zellvorläufern abhängig vom Kontext des Knochenmarks zu sein.....	43
3.5	Pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen differenzieren in vitro zu prä-B-Zellen.....	57
3.5.1	Die überwiegende Mehrheit der prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen und der in vitro aus VPE/JHT-pro-B-Zellen differenzierten prä-B-Zellen exprimieren nicht durch V _H -Gen replacement Rekombinationen entstandene fremde μ HC's, sondern die vom VPE-Allel kodierte μ HC.....	62

4.	DISKUSSION.....	67
4.1	Stellen pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen ein geeignetes experimentelles System zur Analyse von Auswirkungen der präBCR de novo Synthese auf B-Zellvorläufer dar?.....	67
4.1.1	Das ED-cre System erlaubt die induzierbare μ HC de novo Expression in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen.....	67
4.1.2	Die vom VPE-Allel kodierte μ HC kann in einem funktionellen präBCR-Komplex ausgeprägt werden.....	68
4.1.2.1	Das $V_H D_H J_H$ -Segment von VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen erlaubt vermutlich die Ausprägung einer μ HC in einem präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche von transfizierten pro-B-Zelllinien.....	70
4.1.2.2	Die vom VPE-Allel ausgeprägte μ HC erlaubt die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und deren proliferative Expansion.....	72
4.1.3	Die Ursache für das unterschiedliche Expressionsniveau differentiell ausgeprägter Oberflächenmarker während der B-Zellentwicklung in VPE/JHT-Mäusen im Vergleich zu Wt-Mäusen ist unklar.....	74
4.2	V_H -Gen replacement Rekombinationen in VPE/JHT-Mäusen werden wahrscheinlich durch nicht allel exkludierte $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen ausgelöst	76
4.3	Der präBCR vermittelt die proliferative Expansion der prä-B-Zellen unabhängig von IL-7 oder erlaubt deren Proliferation bei geringer IL-7-Konzentration.....	80
4.4	Die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen scheint vom Kontext des Knochenmarks abhängig zu sein.....	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
5.1	ABSTRACT.....	94
6.	LITERATUR.....	95
7.	ANHANG.....	114

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BCR	B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bright	„hell“, Fluoreszenzfärbung mit starker Intensität
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region
c μ HC	im Zytoplasma ausgeprägte μ HC
CyC	Cy-Chrome
D _H	„Diversity“-Gensegment der Ig schweren Kette
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dull	„matt, trüb“, Fluoreszenzfärbung mit schwacher Intensität
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
FITC	Fluorescein-Isothyocyanat
FR	„Framework“-Region (Gerüstbereiche)
h	Stunde
HSA	„heat stable antigen“
Ig	Immunglobulin
IgA	Ig der Klasse A
IgE	Ig der Klasse E
IgD	Ig der Klasse D
IgG	Ig der Klasse G
IgM	Ig der Klasse M
IgH	Ig schwere Kette
Ig κ	IgL des κ -Isotyps
Ig λ	IgL des λ -Isotyps
IgL	Ig leichte Kette
IL-7	Interleukin-7
IMDM	Iscove´s modifiziertes Dulbecco´s Medium
J _H	„Joining“-Gensegment der Ig schweren Kette
J _{κ}	„Joining“-Gensegment der Ig κ leichten Kette
J _{λ}	„Joining“-Gensegment der Ig λ leichten Kette
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KM	Knochenmark
MACS	Magnetische Zellsortierung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

M	Molar
min	Minute(n)
mM	Millimolar
μ HC	Schwere Immunglobulinkette der Klasse IgM
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
pM	Pikomolar
präBCR	Prä-B-Zell-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
slg	auf der Zelloberfläche ausgeprägtes Immunglobulin
SLC	Surrogate leichte Kette
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V _H	Variable Region der Ig schweren Kette
V _L	Variable Region der Ig leichten Kette
u	unit
Wt	Wildtyp

1. EINLEITUNG

Vertebraten haben im Gegensatz zu Invertebraten zwei Abwehrsysteme gegen pathogene Mikroorganismen und Fremdstoffe entwickelt:

Das angeborene, unspezifische Abwehrsystem, das auch viele Invertebraten aufweisen, besteht aus einem System von phagozytischen Zellen, die Pathogene aufnehmen und zerstören können.

Darüber hinaus haben Vertebraten ein spezifisches Immunsystem entwickelt, das erst durch eindringende Fremdstoffe (Antigene) aktiviert wird.

Das spezifische, adaptive Immunsystem kann Antigene durch eine humorale und eine zelluläre Immunantwort unschädlich machen.

Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Lymphozyten (welche im Thymus heranreifen) vermittelt, die mittels T-Zell-Rezeptor (TCR) bereits prozessierte Antigene als Peptide auf der Oberfläche von körpereigenen Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) in Assoziation mit MHC-Komplexen (engl.: „major histocompatibility complex“, MHC) erkennen und beispielsweise infizierte Zellen zerstören können.

Die humorale Immunantwort basiert auf B-Lymphozyten, die zur Erkennung und Bindung von Antigenen membrangebundene B-Zell-Rezeptoren (BCR) ausprägen. Antigen-spezifische B-Lymphozyten können durch Bindung von Antigenen zur Proliferation angeregt werden („Klonale Selektionstheorie“; Burnet, 1959), und Antikörper in Blut und Lymphe sezernieren. B-Zellen werden während der Ontogenese u.a. in der fötalen Leber gebildet, während die B-Zellentwicklung der adulten Maus im Knochenmark stattfindet (Osmond, 1986; Kincade, 1987).

Die Struktur von Antikörpern, welche synonym als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden, muß zur Erkennung einer Fülle von verschiedensten Antigenen eine genügend große Variabilität bieten. Zugleich müssen Antikörper zur Erfüllung ihrer Effektorfunktionen, wie die Aktivierung des Komplementsystems, auch konstante Strukturdomänen aufweisen. Diese Aufgaben spiegeln sich im Aufbau der Immunglobuline wieder.

1.1 Die Entstehung der Antikörper-Vielfalt

Immunglobuline bestehen aus vier Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Jeweils zwei identische schwere Ketten (IgH-Ketten) und leichte Ketten (IgL-Ketten) weisen eine N-terminale variable und C-terminale konstante Domäne auf. Die variablen Domänen der IgH- und IgL-Ketten bestehen aus vier Gerüstregionen (FR 1-4, engl.: „frame-work regions“), die in ihrer Sequenz wenig variabel sind und die Struktur der Domäne bestimmen, sowie drei hypervariablen Regionen (CDR 1-3, engl.: „complementarity determining regions“), welche die Antigen-Bindungsstelle formen.

B-Zellen prägen zuerst Antikörper mit der konstanten Region des IgM-Isotyps aus, in späteren Entwicklungsstadien auch zusammen mit IgD. Eine Änderung der Effektorfunktion unter Erhaltung der Antikörperspezifität kann durch Klassenwechsel-Rekombination erfolgen (zur Übersicht: Stavnezer, 2000). Man unterscheidet in der Maus zwischen 5 Isotyp-Hauptklassen: IgM, IgD, IgG (4 Unterklassen: IgG 1, IgG 2a, IgG 2b und IgG 3), IgE und IgA.

Die schweren Ketten der Antikörper werden durch die Gene des IgH-Locus kodiert, während die leichten Ketten von den Ig κ - oder Ig λ -Loci ausgeprägt werden.

Der grundlegende Mechanismus zur Entstehung der Antikörpervielfalt ist die Lymphozyten-spezifische somatische Rekombination, durch die in B-Vorläuferzellen verschiedene Keimbahn-Gensegmente miteinander verknüpft werden, welche die variablen Domänen von IgH- und IgL-Ketten kodieren. (Tonegawa, 1983; Alt et al., 1986, 1987). Gene, die die variable Region der IgH-Ketten kodieren, entstehen dabei durch Verknüpfung von V_H-, D_H-, und J_H-Gensegmenten. Im Genom der Maus sind zur Zeit ca. 100-200 V_H-Gene (Kofler et al., 1992; Mainville et al., 1996; persönliche Mitteilung Roy J. Riblet), 15 D_H-Elemente (Chang et al., 1992) und 4 J_H-Elemente (Sakano et al., 1980; Alt et al., 1986) bekannt, die in voneinander getrenntliegenden Clustern organisiert sind.

V_H-Gene werden basierend auf DNA-Sequenzhomologien in 15 Familien eingeteilt (Tutter et al., 1991; Kofler et al., 1992; Mainville et al., 1996), wobei V_H-Gene mit einer Sequenzhomologie von mehr als 80% einer V_H-Genfamilie angehören (Brodeur & Riblet, 1984; Kofler et al., 1992).

Die 15 D_H-Elemente werden aufgrund von DNA-Sequenzhomologien in die drei Familien DFL 16, DSP und DQ 52 eingeteilt (Ichihara et al., 1989; Chang et al., 1992).

Gene, die die variable Region der IgL-Ketten kodieren, werden im Gegensatz zu denen der IgH-Ketten nur aus einem V_L- und einem J_L-Genelement zusammengefügt (Tonegawa, 1983). Es sind 93 V _{κ} -Gene und 4 funktionelle J _{κ} -Elemente im Ig κ -Locus bekannt (Thiebe et al., 1999), während der Ig λ -Locus 3 V _{λ} - und 3 J _{λ} -Genelemente aufweist (Eisen & Reilly, 1985; Dildrop et al., 1987).

Die V_HD_HJ_H-Rekombination erfolgt unter Deletion der zwischen den rekombinierten Genelementen liegenden Keimbahnsequenzen (Alt et al., 1986, 1987). Da ca. 40% der V _{κ} -Gene in umgekehrter Transkriptionsrichtung zu den J _{κ} -Genelementen und dem die konstante Domäne C _{κ} kodierenden Gen vorliegen, werden diese unter Inversion der dazwischenliegenden DNA-Bereiche zum V _{κ} J _{κ} -Rearrangement rekombiniert (Shapiro & Weigert, 1987).

Die somatische Rekombination zwischen den Gensegmenten wird durch flankierende, konservierte Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) vermittelt, die aus einer konservierten palindromischen Heptamer- und einer AT-reichen Nonamer-Sequenz bestehen, welche durch eine wenig konservierte spacer-Sequenz von entweder 12 oder 23 bp Länge getrennt sind (zur Übersicht: Tonegawa, 1983; Alt et al., 1986). Nach der 12/23-Regel werden nur RSS mit einer unterschiedlich langen spacer-Sequenz miteinander rekombiniert (Sakano et al., 1980; Tonegawa, 1983). Auf diese Weise werden beispielsweise V_H=>J_H-Rekombinationen verhindert, die zu einem nicht funktionellen IgH-Rearrangement führen würden. Allerdings wurden Rekombinationen zwischen einer RSS und unvollständigen, kryptischen RSS-ähnlichen Sequenzen beobachtet (Kleinfeld et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995; Taki et al., 1995; Cascalho et al., 1996; Pewzner-Jung et al., 1998), die wahrscheinlich von dieser Regel abweichen.

Der Rekombinationsprozeß wird von den beiden Lymphozyten-spezifischen Proteinen RAG-1 und RAG-2 initiiert (Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990), die an den beiden RSS zusammen mit den „high mobility group“ (HMG)-Proteinen (Sawchuk et al., 1997; Van Gent et al., 1997) einen Komplex bilden und Doppelstrangbrüche (DSB) an den RSS bewirken (Van

Gent et al., 1995, 1996; McBlane et al., 1995; zur Übersicht: Grawunder et al., 1998). In Übereinstimmung mit diesem Befund, können in Mäusen, in denen das RAG-1- bzw. das RAG-2-kodierende Gen gezielt inaktiviert wurde, keine Ig-Gen-Rearrangements oder TCR-Gen-Rearrangements nachgewiesen werden (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

Durch Einfügen der DSB werden die Enden der kodierenden Gensegmente („coding ends“) und der Signalsequenzen („signal ends“) freigelegt. „Coding ends“ liegen dabei in einer sogenannten Haarnadelschleifen („hairpin“)-Struktur vor, die unter Mitwirkung der Proteine DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), Ku70 und Ku86 aufgelöst werden (Gottlieb et al., 1993; Blunt et al., 1995; Zhu et al., 1996; Nussenzweig et al., 1996; Ouyang et al., 1997; Gu et al., 1997; zur Übersicht: Grawunder et al., 1998). SCID-Mäuse prägen nur ein verkürztes, inaktives DNA-PK-Protein aus, so daß „hairpin“-Strukturen nicht aufgelöst werden können, weshalb sich in diesen Mäusen nur sehr wenige B- und T-Lymphozyten entwickeln (Reichman-Fried et al., 1993; Kirchgessner et al., 1995).

Nach Auflösung der „hairpin“-Strukturen entstehen unter Mitwirkung von DNA Ligase IV (Barnes et al., 1998; Frank et al., 1998) und des XRCC4-Proteins (Grawunder et al., 1997; Critchlow et al., 1997) ein „coding joint“ zwischen den rekombinierten Ig- oder TCR-Genelementen und extrachromosomale, ringförmige DNA, die den „signal joint“ und die ursprünglich zwischen den rekombinierten Genelementen gelegenen DNA-Bereiche enthält (zur Übersicht: Grawunder et al., 1998).

Während des Rekombinationsprozesses können nach Basenverlust durch Exonukleaseaktivität zufällige, nicht in der Keimbahn enthaltene N-Nukleotide durch das Enzym „Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase“ (TdT, Alt & Baltimore, 1982; Desiderio et al., 1984) an den Grenzen der rekombinierten Gensegmente eingebaut werden. In IgH- und TCR-Gen-Rearrangements von TdT-defizienten Mäusen finden sich daher keine oder sehr kurze N-Sequenzen (Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993). Im Gegensatz zu $V_H D_H J_H$ -Rearrangements werden N-Sequenzen nur selten in murine IgL-Rearrangements eingefügt (Yancopoulos et al., 1986; Alt et al., 1987; Milstein et al., 1992; Medina & Teale, 1993; Victor et al., 1994; Schaal, 1996). Weiterhin können während der Auflösung der „hairpin“-Strukturen palindromische Sequenzen („P-Nukleotide“, Lafaille et al., 1989) an den Grenzen der rekombinierten Gensegmente entstehen.

Während die CDR 1- und CDR 2-Region der variablen Domäne von IgH- und IgL-Ketten vollständig vom V_H - bzw. V_L -Gen kodiert wird, wird die CDR 3-Region von der Verbindungsregion des $V_H D_H J_H$ - bzw. des $V_L J_L$ -Rearrangements ausgeprägt. Durch die oben beschriebenen Modifikationen an den Grenzen der rekombinierten Gensegmente wird die Diversität des Antikörper-Repertoires im Bereich der CDR 3-Antigenbindungsstelle zusätzlich erhöht.

Die Diversität des Antikörper-Repertoires beruht allerdings nicht nur auf der somatischen Rekombination der verschiedenen Keimbahn-Gensegmente und auf Modifikationen der Rekombinationsbruchstellen, sondern kann durch die kombinatorische Vielfalt der Assoziation einer IgH- mit verschiedenen IgL-Ketten gesteigert werden. Jedoch sind manche Kombinationen von IgH- und IgL-Ketten wahrscheinlich in Folge sterischer Hinderungen ausgeschlossen (Kwan et al., 1981; Yurovsky & Kelsoe, 1993).

Zusätzlich können im Laufe einer T-Zell-abhängigen Immunantwort Punktmutationen in die rearrangierten V-Region kodierenden Gene eingefügt werden (Somatische Hypermuation, zur Übersicht: Dörner et al., 1999), wodurch die Affinität eines Antikörpers zum entsprechenden Antigen gesteigert werden kann (Affinitätsreifung).

1.2 Stadien der B-Zellentwicklung

Aus pluripotenten haematopoetischen Stammzellen (HSC) entsteht im Knochenmark der adulten Maus wahrscheinlich eine Population gemeinsamer lymphoider Vorläuferzellen (engl.: „Common Lymphoid Progenitors“, CLP) aus denen sich T-, B- und NK-Zellen entwickeln können (Kondo et al., 1997). Im Verlauf der B-Zellentwicklung differenzieren vermutlich aus CLP-Zellen B-Vorläuferzellen (pro-B-Zellen) (Kondo et al., 1997). Die Mechanismen, welche die Differenzierung von HSC's zu pro-B-Zellen steuern, sind weitgehend unbekannt. Unter anderem scheinen die Transkriptionsfaktoren PU.1, Ikaros, E2A, und EBF an der Regulation der Differenzierungsprozesse beteiligt zu sein (zur Übersicht: O' Riordan & Grosschedl, 2000), denn in Mäusen, in denen das Gen für PU.1 oder Ikaros gezielt inaktiviert wurde (Scott et al., 1994; Olson et al., 1995; Wang et al., 1996), entwickeln sich keine pro-B-Zellen. Die Transkriptionsfaktoren E2A und EBF sind essentiell für die Initiierung von Ig-Gen-Rekombinationen, denn in B-Vorläuferzellen von E2A- oder EBF-defizienten Mäusen finden keine $D_H \Rightarrow J_H$ -Rekombinationen statt (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994; Lin & Grosschedl, 1995). Die Ausprägung des vom Pax-5-Gen kodierten Transkriptionsfaktors BSAP ist essentiell für die dauerhafte Zugehörigkeit von B-Vorläuferzellen zur B-Zelllinie, denn pro-B-Zellen von Pax-5-defizienten Mäusen können selbst nach Initiierung von Ig-Rearrangements zu myeloiden Zellen und Zellen der T-Zelllinie differenzieren (Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999).

Alt et al. (1984, 1987) formulierten aufgrund der Analyse des IgH-Rearrangement-Status von pro-B- und prä-B-Zelllinien, die durch das Abelson-Maus-Leukämie-Virus (A-MuLV) transformiert worden waren, das „geordnete Modell“ der Ig-Gen-Rekombination: Während der B-Zellentwicklung wird in pro-B-Zellen durch somatische Rekombination zuerst ein $D_H J_H$ -Rearrangement auf beiden IgH-Allelen gebildet, worauf durch Anlagerung eines V_H -Gens an einen bestehenden $D_H J_H$ -Komplex ein $V_H D_H J_H$ -Rearrangement entsteht. Die Bildung eines $V_H D_H J_H$ -Rearrangements mit offenem Leseraster, d.h. eines produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangements, führt zur Expression einer membrangebundenen schweren μ -Kette (engl.: „ μ Heavy Chain“, μ HC). Die Ausprägung der μ HC soll nach diesem Modell die Inhibition weiterer $V_H \Rightarrow D_H J_H$ -Rearrangements auf dem homologen Chromosom vermitteln (allele Exklusion, Pernis et al., 1965), wodurch sichergestellt wird, daß jede B-Zelle jeweils nur Antikörper einer einzigen Spezifität ausprägen kann. Außerdem sollen durch die Expression der μ HC IgL-Rearrangements initiiert werden (Alt et al., 1984, 1987).

Verschiedene Arbeitsgruppen entwickelten in der Vergangenheit unterschiedliche Systeme zur Klassifizierung der B-Zellentwicklungsstadien im Knochenmark der Maus (zur Übersicht: Löffert et al., 1994; Osmond et al., 1998).

Hardy et al. (1991) unterteilten die Zellen der B-Zelllinie anhand der differentiellen Expression von Oberflächen-Antigenen in 7 Fraktionen (Abb. 1). Zellen, die kein Oberflächen-Immunglobulin, jedoch das B-Zell-spezifische CD45R/B220-Antigen ausprägen, können in CD43⁺ pro-B-Zellen und in CD43⁻ prä-B-Zellen unterteilt werden (Coffman & Weissman, 1983; Hardy et al., 1991). Eine weitere Einteilung der CD43⁺ B-Zellvorläufer erfolgt aufgrund der Oberflächen-Marker HSA und BP-1 in 4 Fraktionen (A, B, C, C') (Hardy et al., 1991).

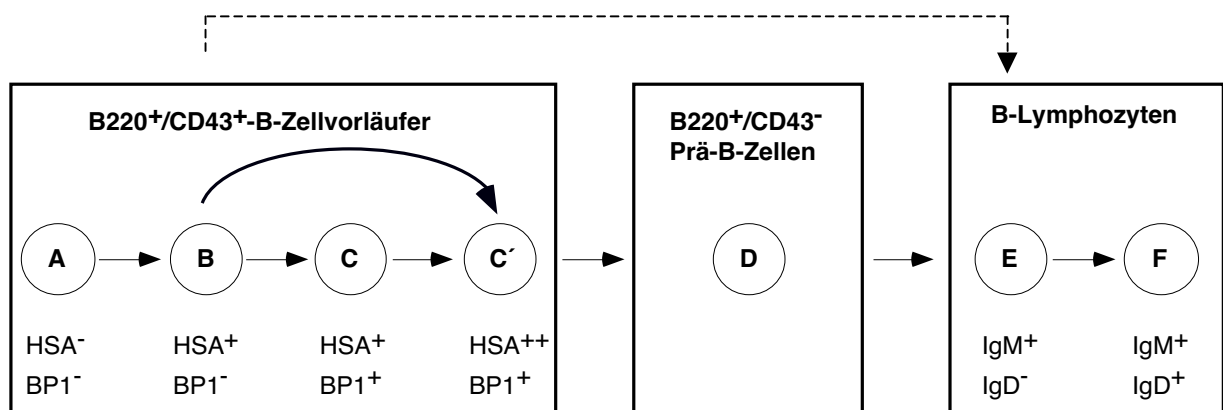


Abb. 1. Klassifizierung der Zellen der B-Zelllinie im Knochenmark der Maus nach dem System von Hardy et al. (1991).

Die Einteilung der Zellen in die Fraktionen A-F erfolgt aufgrund der differentiellen Ausprägung der Oberflächenmarker. Die Abbildung wurde aus Ehlich et al. (1993) entnommen und verändert. Erläuterungen siehe Text.

Den Ig-Gen-Rearrangement-Status der Zellen der verschiedenen Fraktionen bestimmten Ehlich et al. (1993, 1994).

In Fraktion A befinden sich einige frühe B-Zellvorläufer (B220⁺/CD43⁺/HSA⁻/BP-1⁻), die teilweise ein D_HJ_H-Rearrangement tragen, während V_HD_HJ_H- und V_κJ_κ-Rearrangements nicht auftreten (Ehlich et al., 1993). Li et al. (1996) teilten die Zellen der Fraktion A in 3 weitere Fraktionen A₀, A₁ und A₂ auf, wobei Zellen der Fraktion A₂ wahrscheinlich die frühesten identifizierbaren pro-B-Zellen im Knochenmark der Maus repräsentieren (Li et al., 1996; Allman et al., 1999; zur Übersicht: Hardy & Hayakawa, 2001). Ferner konnten Rolink et al. (1996) zeigen, daß eine Subpopulation der Fraktion A aus B220⁺/CD19⁻ Zellen besteht, die wahrscheinlich Vorläufer von Natürlichen Killer-Zellen (Nk-Zellen) sind.

B-Zellvorläufer der Fraktion A entwickeln sich zu B220⁺/CD43⁺/HSA⁺/BP-1⁻ Zellen (Fraktion B), die zumeist ein D_HJ_H-Rearrangement auf beiden IgH-Allelen tragen. Einige Zellen dieser Fraktion haben bereits eine V_HD_HJ_H-/D_HJ_H-IgH-Gen-Konfiguration, während nur in einem geringen Anteil der Zellen ein V_κJ_κ-Rearrangement nachgewiesen werden konnte (Ehlich et al., 1993). Die meisten Zellen der folgenden Fraktion C (B220⁺/CD43⁺/HSA⁺/BP-1⁺) tragen ein V_HD_HJ_H-Rearrangement, und etwa 15% der Zellen besitzen ein V_κJ_κ-Rearrangement (Ehlich et al., 1993; Novobrantseva et al., 1999).

Auch wenn sich in Zellen der Fraktionen A bis C eine graduelle Zunahme von IgH- und IgL-Rearrangements feststellen läßt, kann die Entwicklung dieser B-Zellvorläufer unabhängig von Ig-Gen-Rearrangements ablaufen. Tatsächlich weisen Mäuse, in denen keine Ig-Gen-

Umlagerungen stattfinden können, normale oder etwas vergrößerte pro-B-Zellkompartimente auf (Ehlich et al., 1993; Löffert et al., 1994).

Nur Zellen der Fraktionen B und C mit einem produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangement können eine μ HC mit einer surrogaten leichten Kette (engl.: „surrogate light chain“; SLC) in einem prä-B-Zell-Rezeptorkomplex (präBCR) auf ihrer Oberfläche exprimieren (Karasuyama et al., 1990; Tsubata & Reth, 1990; Winkler et al., 1995), der für die Transition der Zellen in die Fraktion C' ($B220^+/CD43^+/HSA^{++}/BP-1^+$) und D ($B220^+/CD43^+/sIgM^+$) nötig ist (Ehlich et al., 1993, 1994; Karasuyama et al., 1994; zur Übersicht: Melchers et al., 1995; Rajewsky, 1996; zur Struktur und weiteren Funktionen des präBCR siehe 1.3).

Pro-B-Zellen, die ein nicht-produktives $V_H D_H J_H$ -Rearrangement auf einem IgH-Allel tragen, können ein produktives $V_H D_H J_H$ -Rearrangement auf dem zweiten IgH-Allel generieren, oder durch V_H -Gen replacement Rekombination (Kleinfield et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996) das V_H -Gen eines nicht-produktiven $V_H D_H J_H$ -Genkomplexes durch ein anderes 5' gelegenes V_H -Gen ersetzen. V_H -Gen replacement Rekombinationen werden durch kryptische RSS-ähnliche Sequenzen vermittelt, die am 3' Ende der kodierenden Region von 80-90% aller bekannten V_H -Gensegmente vorliegen (Chen et al., 1995; Fanning et al., 1998). Die Effizienz, mit der kryptische RSS V_H -Gen replacement Rekombinationen in Wildtyp (Wt)-Mäusen vermitteln, könnte allerdings sehr gering sein (Nadel et al., 1998). Möglicherweise vermitteln kryptische RSS die Rekombination ca. 1300 mal weniger effizient als konservierte RSS (Nadel et al., 1998).

Pro-B-Zellen, die kein funktionelles $V_H D_H J_H$ -Rearrangement erwerben, sterben durch Apoptose (Fang et al., 1996; Young et al., 1997; Lu & Osmond, 1997; zur Übersicht: Lu & Osmond, 2000) und werden vermutlich von Makrophagen des Knochenmarks phagozytiert (Osmond et al., 1994; Lu & Osmond, 1997; zur Übersicht: Lu & Osmond, 2000).

Zellen der Fraktion D werden als prä-B-Zellen bezeichnet und tragen alle ein produktives $V_H D_H J_H$ -Rearrangement (Ehlich et al., 1994; ten Boekel et al., 1995). IgL-Rekombinationen finden vorwiegend im prä-B-Zellstadium statt (Spanopoulou et al., 1994; Young et al., 1994; Grawunder et al., 1995a; ten Boekel et al., 1995), jedoch können auch in μ HC⁻ pro-B-Zellen IgL-Rearrangements nachgewiesen werden (Ehlich et al., 1993; Novobrantseva et al., 1999).

Die Tatsache, daß im prä-B-Zellstadium die Rekombinationen der Ig κ -Genloci früher einsetzen als die der Ig λ -Loci (Arakawa et al., 1996; Engel et al., 1999), könnte Ursache dafür sein, daß 90-95% aller generierten B-Zellen der Maus Antikörper mit IgL-Ketten des κ -Isotyps ausprägen (Takemori & Rajewsky, 1981; ten Boekel et al., 1995; Yamagami et al., 1999a, 1999b).

Zellen der Fraktion D mit einem produktiven IgL-Rearrangement entwickeln sich nach Expression der IgL-Kette zu unreifen B-Lymphozyten (Fraktion E: $B220^+/IgM^+/IgD^-$), die einen IgM-Antikörper im BCR-Komplex auf der Zelloberfläche ausprägen.

Die hohe Diversität des Antikörper-Repertoires bedingt, daß unreife B-Zellen einen BCR exprimieren können, der körpereigene Antigene erkennt. Um Autoimmunreaktionen zu verhindern, haben sich verschiedene Mechanismen zur negativen Selektion von autoreaktiven B-Zellen entwickelt (zur Übersicht: Goodnow et al., 1995; Rajewsky, 1996; Meffre et al., 2000; Nemazee, 2000):

B-Zellen, die einen autoreaktiven BCR ausprägen, können eliminiert werden (Klonale Deletion, Nemazee & Bürki, 1989; Hartley et al., 1991; zur Übersicht: Goodnow et al., 1995).

Autoreaktive, unreife B-Zellen können funktionell inaktiviert werden, und sind dann u.a. durch ein geringes IgM-Expressionsniveau gekennzeichnet (Anergie, Goodnow et al., 1988; Erikson et al., 1991), was mit einer verringerten Antigen-Reaktivität einhergeht (Hartley et al., 1993). Durch sekundäre Ig-Rekombinationen können autoreaktive B-Zellen einen BCR neuer Antigen-Spezifität ausprägen (receptor editing, Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993; Radic et al., 1993), wobei sekundäre Ig-Rekombinationen wahrscheinlich bevorzugt auf den IgL-Loci stattfinden (Chen et al., 1997). Zwar können im Verlauf von receptor editing evtl. auch $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ replacement Rekombinationen stattfinden (Chen et al., 1995, 1997; zur Übersicht: Nemazee, 2000), jedoch scheinen die IgL-Loci aufgrund ihrer Struktur für sekundäre Ig-Rekombinationen besonders geeignet:

Da Gene, die die variable Region der IgL-Ketten kodieren durch Rekombination von V_L - und J_L -Gensegmenten entstehen, also keine D-Gensegmente aufweisen, können sekundäre Rekombinationen zwischen einem 5' des bereits vorhandenen $V_K J_K$ -Rearrangements gelegentlichem V_K - und einem 3' gelegentlichem J_K -Gensegment ablaufen. Viele primäre $V_K J_K$ -Genumlagerungen entstehen durch Inversion, wodurch viele V_K -Gene für weitere Rearrangements erhalten bleiben. Außerdem können Ig κ -Loci durch RS (engl.: „recombining sequence“)-medierte Rekombinationen inaktiviert werden (Moore et al., 1985; Alt et al., 1987), was die nachfolgende Ausprägung einer IgL-Kette von den Ig λ -Loci erlaubt.

Receptor editing könnte ein effizienter Mechanismus zur Rettung von ursprünglich autoreaktiven B-Zellen sein (Chen et al., 1997; Pelanda et al., 1997; Casellas et al., 2001), der wahrscheinlich in einer Subpopulation von Zellen der Fraktion D abläuft (Pelanda et al., 1997; Casellas et al., 2001).

Unreife B-Zellen, die das Knochenmark verlassen, werden als transitionelle B-Zellen bezeichnet, von denen wahrscheinlich nur ca. 10% periphere lymphoide Organe erreichen und innerhalb weniger Tage zu reifen B-Zellen differenzieren (Allman et al., 1993; Carsetti et al., 1995). Insgesamt werden wahrscheinlich nur ca. 3% aller im Knochenmark entstandenen unreifen B-Zellen in die periphere B-Zellpopulation der reifen, langlebigen B-Zellen selektioniert (Förster & Rajewsky, 1990; Rajewsky, 1996). Reife, langlebige und rezirkulierende B-Lymphozyten (Förster et al., 1989) entsprechen Zellen der Fraktion F ($B220^+/IgM^+/IgD^+$) (nach Hardy et al., 1991). Die Persistenz reifer B-Zellen im peripheren Immunsystem hängt von der kontinuierlichen Ausprägung eines funktionellen BCR ab (Lam et al., 1997).

Melchers et al. klassifizieren die Zellen der B-Zelllinie aufgrund ihres IgH-Rearrangement-Status und der differentiellen Expression von Oberflächen-Markern in verschiedene Entwicklungsstadien: pro-B-Zellen haben beide IgH-Allele in der Keimbahnkonfiguration (Melchers et al., 1993) und sind $B220^+/CD43^+/c-kit^+/CD25^-$ (Rolink et al., 1994; Melchers et al., 1995). Diese Zellen korrelieren teilweise mit Zellen der Fraktion A (nach Hardy et al., 1991; Rolink et al., 1994).

Pre-B-I-Zellen tragen $D_H J_H$ -Rearrangements und sind $B220^+/CD43^+/c-kit^+/CD25^-$. Diese Zellen entsprechen hauptsächlich Zellen der Fraktion B. Zellen mit einem funktionellen $V_H D_H J_H$ -Rearrangement werden als pre-B-II-Zellen ($B220^+/CD43^{+/-}/c-kit^+/CD25^+$) bezeichnet, die weiterhin in große und kleine pre-B-II-Zellen unterteilt werden. Große $B220^+/CD43^{+/-}/c-kit^+$

/CD25⁺ pre-B-II-Zellen wurden nicht in RAG-2T-, SCID-, μ MT- und λ 5T-Mäusen detektiert, so daß diese Zellen vermutlich mit den Zellen der Fraktion C' nach Hardy et al. (1991) korrelieren (Chen et al. 1994; Rolink et al., 1994). Große und kleine B220⁺/CD43⁻/c-kit⁻/CD25⁺ pre-B-II-Zellen entsprechen den sich teilenden, großen, bzw. den sich nicht teilenden, kleinen Zellen der Fraktion D (nach Hardy et al., 1991) (Chen et al., 1994; Rolink et al., 1994; Karasuyama et al., 1994; Melchers et al., 1995). Unreife B-Zellen entsprechen der Fraktion E und reife B-Zellen der Fraktion F (nach Hardy et al., 1991).

In dieser Arbeit wird die B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation zumeist aufgrund der differentiellen Expression von CD43 und CD25 in pro-B- und prä-B-Zellen unterteilt:

Da die Differenzierung von CD43⁺ pro-B-Zellen der Fraktionen A-C zu CD43^{+/+} prä-B-Zellen der Fraktionen C' und D (nach Hardy et al., 1991) mit der Expression von CD25 einhergeht (Chen et al., 1994; Rolink et al., 1994), werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit alle B220⁺/CD43⁺/CD25⁻/sIgM⁻ Zellen als pro-B-Zellen und B220⁺/CD43^{+/+}/CD25⁺/sIgM⁻ Zellen als prä-B-Zellen bezeichnet. Allerdings kann ein gewisser Anteil der CD43⁺/CD25⁻ pro-B-Zellen der Fraktionen B-C bereits eine μ HC in einem präBCR-Komplex ausprägen (Karasuyama et al., 1994; ten Boekel et al., 1997; Lu et al., 1998). Solche CD43⁺/CD25⁻ präBCR-exprimierenden B-Zellvorläufer der Fraktionen B-C sind vermutlich in der Transition zu CD43⁻/CD25⁺ prä-B-Zellen der Fraktionen C'-D, und werden aufgrund der Expression der Oberflächen-Antigene im Verlauf dieser Arbeit als präBCR-exprimierende pro-B-Zellen bezeichnet.

Nishikawa et al. teilen die B-Zellvorläufer aufgrund ihrer Eigenschaft, sich unter verschiedenen in vitro-Kulturbedingungen entwickeln zu können, in zwei Populationen ein: Aus einer Zellpopulation, die nur PA-6 Stromazellen zum Wachstum benötigt (PA-6-Vorläufer; diese Zellpopulation beinhaltet möglicherweise HSC's oder CLP's), können B-Zellvorläufer, die Zellen der Stromazelllinie PA-6 und IL-7 zum Wachstum benötigen (PA-6/IL-7-Vorläufer), entstehen (PA-6 Stromazellen produzieren im Gegensatz zu ST-2 Stromazellen (Ogawa et al., 1988) kein IL-7 (Sudo et al., 1989)). PA-6/IL-7-Vorläufer entwickeln sich zu B-Zellvorläufern, die nur IL-7 benötigen (IL-7-Vorläufer) bevor sie zu IL-7-unreaktiven IgM⁺-Zellen differenzieren (Hayashi et al., 1990; Era et al., 1991, 1994). Untersuchungen an SCID-Mäusen zeigten, daß sich die PA-6/IL-7-Vorläufer unabhängig von Ig-Gen-Rearrangements entwickeln können, während IL-7-Vorläufer nicht nachgewiesen werden konnten (Hayashi et al., 1990; Reichman-Fried et al., 1993). Somit scheint die Entwicklung von IL-7-Vorläufern von einem produktiven V_HD_HJ_H-Rearrangement abhängig zu sein (Rolink et al., 1991; Reichman-Fried et al., 1993; zur Übersicht: Era et al., 1994). In Übereinstimmung mit diesen Befunden ist die Zahl der PA-6/IL-7-Vorläufer im Knochenmark von μ HC-transgenen Mäusen stark reduziert, während die Anzahl der IL-7-Vorläufer unverändert ist (Era et al., 1991; Reichman-Fried et al., 1993). In Ig κ -transgenen Mäusen ist die Anzahl der IL-7-Vorläufer drastisch reduziert, weil in Folge der IgL-Ketten-Ausprägung möglicherweise weniger IL-7-Vorläufer entstehen oder diese schneller zu IL-7-unreaktiven B-Zellen differenzieren (Era et al., 1991).

PA-6/IL-7-Vorläufer werden vorwiegend in Fraktion B und C (nach Hardy et al., 1991) gefunden, während IL-7-Vorläufer in den Fraktionen B-C' vertreten sind, wobei letztere in Fraktion C' am

stärksten repräsentiert sind. Fraktion D weist jedoch wahrscheinlich keine Zellen der beiden B-Zellvorläufer-Populationen auf (Löffert et al., 1994).

1.3 Die Bedeutung des präBCR-Komplexes für die B-Zellentwicklung

Wie bereits in 1.2 angesprochen, können sich nur pro-B-Zellen mit einem produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangement nach Ausprägung einer μ HC zu prä-B-Zellen der Fraktionen C' und D (nach Hardy et al., 1991) entwickeln. So ist die B-Zellentwicklung in SCID-, RAG-1T-, RAG-2T- und JHT-Maus-Mutanten, die kein produktives $V_H D_H J_H$ -Rearrangement bilden können, in der Transition der Zellen von Fraktion C zu C' blockiert (Reichman-Fried et al., 1993; Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992; Gu et al., 1993; Ehlich et al., 1993). Die Expression einer transgenen μ HC in SCID-Mäusen erlaubt die Bildung eines prä-B-Zellkompartiments, während erst die gleichzeitige Expression eines produktiven IgH- und IgL-Transgens zur Generation von B-Zellen führt (Reichman-Fried et al., 1990, 1993; Spanopoulou et al., 1994; Young et al., 1994).

In B-Zellvorläufern können μ HC-Proteine mit der B-Zell-spezifisch ausgeprägten surrogaten leichten Kette assoziieren, und zusammen mit dem Signal-transduzierenden $Ig\alpha/Ig\beta$ -Heterodimer (zur Übersicht: Reth, 1992) in einem sogenannten präBCR-Komplex ausgeprägt werden (Pillai & Baltimore, 1987; Kerr et al., 1989; Karasuyama et al., 1990; Tsubata & Reth, 1990; Matsuo et al., 1991; Nishimoto et al., 1991; Abb. 2). Die surrogate leichte Kette wird aus den beiden Proteinen $\lambda 5$ und VpreB gebildet, wobei das $\lambda 5$ -Polypeptid im amino-terminalen Bereich homolog zur konstanten Region von $Ig\lambda$ -Ketten ist, und durch eine Disulfidbrücke an die C_H1 -Domäne der μ HC gebunden ist. Das VpreB-Protein hingegen weist eine hohe Homologie zur V-Domäne von IgH- und IgL-Ketten auf (Sakaguchi & Melchers, 1986; Kudo & Melchers, 1987). Die beiden Polypeptide $\lambda 5$ und VpreB sind durch nicht-kovalente Bindungskräfte miteinander assoziiert und formen eine IgL-Ketten-ähnliche Struktur (Karasuyama et al., 1990; zur Übersicht: Melchers et al., 1993; Melchers, 1999).

Nach der Proteinbiosynthese sind μ HC im endoplasmatischen Retikulum (ER) an das hsp70-Chaperon BIP (Alberini et al., 1990; Sitia et al., 1990) gebunden, wodurch μ HC-Proteine das ER nicht verlassen können. Wahrscheinlich interagiert das VpreB-Protein mit der V_H -Domäne der μ HC, während das an die C_H1 -Domäne der μ HC gebundene BIP vermutlich durch das $\lambda 5$ -Protein verdrängt wird. Der entstandene präBCR-Komplex kann dann das ER der Zelle verlassen (Minegishi et al., 1999a; zur Übersicht: Melchers, 1999). Allerdings gestatten nicht alle produktiv umgelagerten $V_H D_H J_H$ -Rearrangements die membrangebundene Ausprägung eines präBCR, vermutlich in Folge einer nur unzureichenden Assoziation von μ HC und SLC (Keyna et al., 1995; Ye et al., 1996; Kline et al., 1998; ten Boekel et al. 1997; 1998).

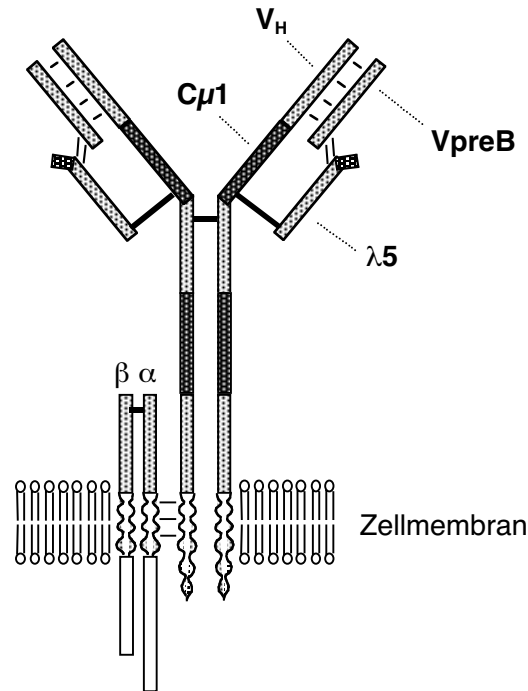


Abb. 2. Schematische Darstellung des präBCR-Komplexes.

Die beiden Proteine $\lambda 5$ und VpreB sind durch nicht-kovalente Bindungskräfte miteinander assoziiert und formen eine IgL-Ketten-ähnliche Struktur, die surrogate leichte Kette. $\lambda 5$ ist durch eine Disulfidbrücke an die $C_{\mu}1$ -Domäne der μ HC gebunden ($C_{\mu}1$). Der μ HC/ $\lambda 5$ /VpreB-Komplex ist nicht-kovalent mit dem Signal-transduzierenden Ig α /Ig β -Heterodimer assoziiert. Dicke schwarze Linien indizieren eine Disulfidbrücke, dünne Linien zeigen vermutliche nicht-kovalente Wechselwirkungen an. Die Abbildung wurde aus Keyna et al. (1995) entnommen und verändert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Der präBCR konnte auf der Oberfläche von A-MuLV-transformierten prä-B-Zellen und B-Zellvorläufern aus menschlichem Knochenmark nachgewiesen werden (Tsubata & Reth, 1990; Cherayil & Pillai, 1991; Misener et al., 1991; Karasuyama et al., 1993; Lassoued et al., 1993). Bisherige Analysen ex vivo-isolierter muriner B-Zellvorläufer ließen allerdings nur den intrazellulären Nachweis des präBCR zu (Karasuyama et al., 1994; Shinjo et al., 1994). Erst nach einstündiger in vitro-Kultivierung der Knochenmarkszellen konnte der präBCR auf einer Subpopulation von großen pre-B-I- und pre-B-II-Zellen (nach Melchers et al., 1995) nachgewiesen werden (Winkler et al., 1995). Die Schwierigkeiten beim Nachweis des präBCR könnten u.a. durch die wahrscheinlich 10- bis 100-fach niedrigere Expressionsstärke des präBCR-Komplexes im Vergleich zur Expressionsstärke von IgM auf reifen B-Zellen begründet sein (Karasuyama et al., 1993; Brouns et al., 1996). Außerdem prägt vermutlich nur eine relativ kleine Subpopulation der B-Zellvorläufer den präBCR aus, was den Nachweis zusätzlich erschweren könnte (Karasuyama et al., 1994; Winkler et al., 1995).

Die Auprägung eines membrangebundenen präBCR-Komplexes ist von essentieller Bedeutung für die frühe B-Zellentwicklung:

- In μ MT-Mäusen (Kitamura et al., 1991), in denen B-Zellvorläufer keinen membrangebundenen präBCR exprimieren können, ist die B-Zellentwicklung in der Transition vom pro-B- zum prä-B-

Zellkompartiment blockiert (Kitamura et al., 1991; Ehlich et al., 1993). Auch in Mäusen mit inaktiviertem $\lambda 5$ -Gen ($\lambda 5T$ -Mäuse) ist die B-Zellentwicklung im pro-B-Zellkompartiment blockiert (Kitamura et al., 1992; Ehlich et al., 1993; Karasuyama et al., 1994), da die B-Zellvorläufer in Folge der ausbleibenden $\lambda 5$ -Expression keinen präBCR ausprägen können. Allerdings akkumulieren im Knochenmark von $\lambda 5T$ -Mäusen mit zunehmenden Alter reife B-Zellen (Kitamura et al., 1992), deren Entstehung wahrscheinlich durch die Substitution der SLC durch in pro-B-Zellen exprimierte konventionelle IgL-Ketten erklärt werden kann (Pelanda et al., 1996). Tatsächlich tragen 4-7% aller pro-B-Zellen des Knochenmarks von Wt-Mäusen ein produktives IgL-Rearrangement vor der Ausprägung eines produktiven IgH-Rearrangements (Novobrantseva et al., 1999).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression eines membrangebundenen präBCR die Voraussetzung für die Differenzierung von pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen ist.

- In heterozygoten μ MT-Mäusen, deren B-Zellen nur die sezernierte Form der μ HC vom mutierten IgH-Allel exprimieren können, entwickeln sich B-Zellen, die zwei funktionelle μ HC's ausprägen (Kitamura & Rajewsky, 1992). Im Gegensatz zu B-Zellvorläufern von Wt-Mäusen, die nur jeweils ein produktives $V_H D_H J_H$ -Rearrangement ausprägen (Ehlich et al., 1994; Löffert et al., 1996), entwickeln sich im pro-B-Zellkompartiment von $\lambda 5T$ -Mäusen vermehrt allele inkludierte Zellen (Löffert et al., 1996; ten Boekel et al., 1998). Der membrangebundene präBCR vermittelt also die Inhibition weiterer $V_H \Rightarrow D_H J_H$ -Rearrangements auf dem homologen Chromosom (allele Exklusion, Pernis et al., 1965).

$D_H J_H$ -Rearrangements im Leseraster 2 (nach Ichihara et al., 1989) können ohne V_H -Gen als ein sogenanntes $D\mu$ -Protein ausgeprägt werden (Reth & Alt, 1984), und einen membrangebundenen Komplex mit der SLC sowie dem $Ig\alpha/Ig\beta$ -Heterodimer bilden (Tsubata et al., 1991; Horne et al., 1996). Dieser $D\mu/\lambda 5/VpreB$ -Komplex inhibiert wahrscheinlich ähnlich wie der präBCR weitere $V_H \Rightarrow D_H J_H$ -Rearrangements, und verhindert damit eine Differenzierung der $D\mu$ -exprimierenden pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen (Gu et al., 1991; Ehlich et al., 1994; Löffert et al., 1996; Tornberg et al., 1998).

Auf welche Weise der präBCR die allele Exklusion vermittelt ist unklar: Neben einer, mit der präBCR-Expression einhergehenden, stark verringerten RAG-Genexpression (Grawunder et al., 1995a) in μ HC⁺-B-Zellvorläufern, müssen durch Modulation der Chromatinstruktur weitere IgH-Gen-Rekombinationen dauerhaft unterdrückt werden (Constantinescu & Schlissel, 1997; Stanhope-Baker et al., 1996; Cherry & Baltimore, 1999). Denn die in kleinen, ruhenden prä-B-Zellen stattfindenden IgL-Rekombinationen werden ebenfalls durch die RAG-Proteine initiiert.

1.4 Die Funktion des präBCR-Komplexes in der Differenzierung von B-Zellvorläufern

Wie oben bereits erwähnt wurde, entwickeln sich nur pro-B-Zellen mit einem produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangement nach Ausprägung eines präBCR zu prä-B-Zellen. Tatsächlich weisen alle prä-B-Zellen der Fraktion D (nach Hardy et al., 1991) ein produktives $V_H D_H J_H$ -Rearrangement auf (Ehlich et al., 1994), wobei $\geq 95\%$ aller in prä-B-Zellen ausgeprägten μ HC's mit der SLC zu einem präBCR-Komplex assoziieren können (ten Boekel et al., 1997). Ob die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen auf dem bloßen Überleben der präBCR-

exprimierenden B-Zellvorläufer mit einem anschließend automatisch ablaufenden Differenzierungsprogramm basiert, oder ob der präBCR weitere Signale zur Differenzierung der Zellen vermitteln muß, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit umstritten.

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß die anti-apoptotischen Proteine *bcl-2* und *bcl-x_L*, welche in Lymphozyten verschiedene Apoptose-induzierende Signalkaskaden hemmen (zur Übersicht: Newton & Strasser, 2001), während der B-Zellentwicklung differentiell exprimiert werden: In pro-B-Zellen wird *bcl-2* relativ stark, in prä-B-Zellen hingegen nur sehr schwach ausgeprägt (Li et al., 1993; Fang et al., 1996). *Bcl-x_L* wird im Gegensatz dazu in prä-B-Zellen viel stärker exprimiert als in pro-B-Zellen (Fang et al., 1996).

Die Analyse von *bcl-2*-transgenen RAG-2T-Mäusen zeigte, daß die konstitutive Expression von *bcl-2* in einem vergrößerten pro-B-Zellkompartiment resultiert. Die dauerhafte *bcl-2*-Expression in pro-B-Zellen ist alleine allerdings nicht zur Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen ausreichend, sondern diese ist zusätzlich von der μ HC-Expression abhängig (Young et al., 1997).

Das pro-B-Zellkompartiment im Knochenmark von *bcl-x_L*-transgenen Mäusen ist 4-5 mal größer als in Wt-Mäusen, und weist viel häufiger pro-B-Zellen mit nicht-produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangements oder mit $D_H J_H$ -Rearrangements im Leseraster 2 auf als das in Wt-Mäusen (Fang et al., 1996). Konstitutive *bcl-x_L*-Überexpression verhindert also das Absterben von pro-B-Zellen mit unfunktionellen IgH-Rearrangements oder von $D\mu$ -exprimierenden Zellen (Fang et al., 1996). Da das prä-B-Zellkompartiment in *bcl-x_L*-transgenen Mäusen in seiner Größe nicht verändert ist und alle prä-B-Zellen ein produktives $V_H D_H J_H$ -Rearrangement tragen, vermuteten Fang et al. (1996), daß die Expression einer funktionellen μ HC möglicherweise zur verstärkten *bcl-x_L*-Expression in B-Zellvorläufern führt, der präBCR aber weitere Signale zum Eintritt in das prä-B-Zellkompartiment vermitteln muß. Die verstärkte *bcl-x_L*-Expression in prä-B-Zellen könnte wichtig für das weitere Überleben dieser B-Zellvorläufer sein (Fang et al., 1996; 1998). Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß das aus *bcl-x_L*-defizienten pro-B-Zellen entstehende prä-B-Zellkompartiment eine stark reduzierte Zellanzahl aufweist (Ma et al., 1995; Motoyama et al. 1995).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der präBCR neben vermutlichen anti-apoptotischen Signalen noch weitere Signale vermitteln muß, die die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen auslösen (Fang et al., 1996; 1998; Young et al., 1997).

Darüber hinaus war zu Beginn der vorliegenden Arbeit unklar, ob zur Generierung eines in seiner Größe normalen prä-B-Zellkompartiments das Überleben der differenzierten prä-B-Zellen ausreicht, oder ob die präBCR-exprimierenden Zellen zusätzlich noch eine Phase der proliferativen Expansion durchlaufen.

So vermuteten Lassoued et al. (1993), daß präBCR-vermittelte Signale eher zum Überleben von μ HC-exprimierenden prä-B-Zellen führen würden als zu deren proliferativen Expansion.

Da das prä-B-Zellkompartiment im Knochenmark von Wt-Mäusen 5-7 mal größer ist als das gesamte pro-B-Zellkompartiment (kalkuliert nach Löffert et al., 1994), wurde vorgeschlagen, daß μ HC⁺-B-Zellvorläufer eine Phase der proliferativen Expansion durchlaufen, wodurch eine entsprechend große prä-B-Zellpopulation generiert werden könnte (Melchers et al., 1994; Karasuyama et al., 1994). Karasuyama et al. (1994) zeigten, daß 60-70% der intrazellulär μ HC-

und SLC-ausprägenden prä-B-Zellen in der S/G₂ oder M-Phase des Zellzyklus sind, während sich nur 20-30% der pro-B-Zellen in der S/G₂ oder M-Phase des Zellzyklus befinden. Da weiterhin der präBCR nur auf großen, sich teilenden prä-B-Zellen nachgewiesen werden konnte (Winkler et al., 1995), vermittelt der präBCR wahrscheinlich Signale, die die Proliferation von prä-B-Zellen induziert oder deren Proliferation erlauben.

Osmond et al. vermuteten, daß prä-B-Zellen mindestens 1 Mitose durchlaufen (Park & Osmond, 1989; Osmond, 1991; Osmond et al., 1994). Aufgrund einer statistischen Analyse des V_H-Gen-Repertoires der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer- und B220⁺/IgM⁺ B-Zellpopulation des Knochenmarks der Maus schlugen Decker et al. (1991; Decker & Klinman, 1992) und Melchers et al. (1995) eine klonale Expansion von B-Zellvorläufern mit einem produktiven V_HD_HJ_H-Rearrangement durch 5-6 Zellteilungen vor.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, daß B-Zellvorläufer in Folge der präBCR-Expression proliferieren. Unbekannt ist, ob die präBCR-Expression per se die proliferative Expansion der prä-B-Zellen vermittelt, oder diese von im Knochenmark exprimierten Zytokinen und/oder anderen Faktoren abhängt.

Das haematopoetische Stroma im extravasculärem Kompartiment des Knochenmarks bildet ein Netzwerk von Zellen, an dessen Stromazellfortsätzen sich auch die Zellen der B-Zelllinie entwickeln (Jacobsen & Osmond, 1990; zur Übersicht: Osmond et al., 1994). Molekulare Wechselwirkungen zwischen Stromazellen und sich entwickelnden B-Zellvorläufern und B-Lymphozyten scheinen die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen der B-Zelllinie zu regulieren. In diese Wechselwirkung sind verschiedene Wachstumsfaktoren, Interleukine und Zelladhäsionsmoleküle involviert (zur Übersicht: Kincade, 1987, 1991; Kincade et al., 1989, 2000; Rosenberg & Kincade, 1994; Dorshkind, 2000; LeBien, 1998, 2000).

Während pro-B-Zellen in Abhängigkeit von IL-7 (Interleukin-7; Namen et al., 1988) und dem Kontakt zu Stromazellen proliferieren, benötigen prä-B-Zellen nur IL-7 zur Proliferation und/oder zum Überleben in vitro (Namen et al., 1988; Hayashi et al., 1990; Era et al., 1991, 1994; Rolink et al., 1991a; Reichman-Fried et al., 1993). IL-7 hat wahrscheinlich nicht nur einen positiven Effekt auf die Proliferation von B-Zellvorläufern, sondern auch auf deren Überleben, denn Zellen verschiedener B-Vorläufer-Zelllinien sterben nach IL-7-Entzug durch Apoptose (Rolink et al., 1991a; Borzillo et al., 1992; Griffiths et al., 1994; zur Übersicht: Lu & Osmond, 2000).

B-Zellvorläufer der Fraktionen A-D (nach Hardy et al., 1991) prägen den IL-7-Rezeptor (IL-7R) aus (Sudo et al., 1993; Era et al., 1994; Löffert et al. 1994; Kondo et al., 1994; Orlic et al., 1997; Wei et al., 2000), der aus IL-7R α -Kette (IL-7R α) und der gemeinsamen Zytokin-Rezeptor γ_c -Kette (γ_c) besteht (zur Übersicht: DiSanto et al., 1995a).

In IL-7-defizienten Mäusen sowie in γ_c -defizienten Mäusen ist die B-Zellentwicklung in der Transition von pro-B-Zellen ins prä-B-Zellstadium blockiert (von Freedon-Jeffrey et al., 1995; DiSanto et al., 1995b), wie auch in Wt-Mäusen nach Injektion von anti-IL-7- oder anti-IL-7R-Antikörpern (Grabstein et al., 1993; Sudo et al., 1993; Era et al., 1994). Die Überexpression von IL-7 in IL-7-transgenen Mäusen führt zu einem insgesamt vergrößerten B-Zellkompartiment (Ceredig et al., 1999). In IL-7R α -defizienten Mäusen ist die B-Zellentwicklung ebenfalls in der Transition von pro-B- zu prä-B-Zellen blockiert (Corcoran et al. 1998), wobei allerdings Peschon et al. (1994) die B-Zellentwicklung bereits in der Differenzierung der Zellen von Fraktion A nach

B (nach Hardy et al., 1991) gehemmt sahen. Es wird vermutet, daß das Zytokin TSLP (engl.: „Thymic Stroma Lymphopoietin“) in IL-7-defizienten Mäusen die Abwesenheit von IL-7 teilweise kompensieren kann, und die Entwicklung der B-Zellvorläufer bis zur Fraktion C (nach Hardy et al., 1991) erlaubt (Peschon et al., 1994; zur Übersicht: Candeias et al., 1997; LeBien, 1998), denn die IL-7R α -Kette ist auch Bestandteil des kürzlich klonierten TSLP-Rezeptors (Park et al., 2000; Pandey et al., 2000). Entsprechend konnte gezeigt werden, daß TSLP in vitro die Proliferation von B-Zellvorläufern erlaubt, und IL-7 zumindest teilweise ersetzen kann (Ray et al., 1996).

IL-7 scheint nicht nur einen Effekt auf das Überleben und die Proliferation von B-Zellvorläufern zu haben, sondern auch wichtig für die Differenzierung von pro-B-Zellen zu sein: In IL-7R α -defizienten pro-B-Zellen ist die D_H=>J_H-Rekombination unbeeinträchtigt, während V_H=>D_HJ_H-Rekombinationen teilweise inhibiert sind, wahrscheinlich in Folge einer ausbleibenden Transkription von distalen V_H-Genen (Corcoran et al., 1996, 1998).

Die Analyse von IL-7-, IL-7R α - und γ_c -defizienten Mäusen zeigt, daß die Entwicklung von B-Zellvorläufern von IL-7/IL-7R-Interaktionen abhängt. Die Inhibition der B-Zellentwicklung in der Transition von pro-B- zu prä-B-Zellen in diesen Mäusen könnte die Folge eines stark reduzierten Zellüberlebens und/oder einer inhibierten proliferativen Expansion sein. Es ist unbekannt, ob der präBCR anti-apoptotische Signale transduziert, und die Proliferation der prä-B-Zellen von IL-7 abhängt. Ebenso könnte der präBCR anti-apoptotische Signale transduzieren und die Proliferation der prä-B-Zellen vermitteln, während IL-7 einen zusätzlichen positiven Effekt auf das Überleben und/oder die weitere Expansion der prä-B-Zellen haben könnte.

Nach der Entdeckung des präBCR-Komplexes wurde vorgeschlagen, daß dieser möglicherweise zur Initiierung von präBCR-vermittelten Signalen einen Liganden auf Stromazellen oder anderen Zellen des Knochenmarks erkennen muß (Melchers et al., 1993). Auch wenn ein Ligand bis heute nicht identifiziert wurde, so gibt es doch Daten, die für seine Existenz sprechen könnten:

Die Kreuzvernetzung des präBCR auf A-MuLV-transformierten prä-B-Zelllinien mittels anti- μ HC-, anti-Ig β - oder anti- λ 5-Antikörpern führt zur Initiierung von IgL-Rekombinationen (Tsubatha et al., 1992), zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Takemori et al., 1990; Nomura et al., 1991; Misener et al., 1991; Nakamura et al., 1993), oder zur Änderung des Phosphorylierungsmusters von zytoplasmatischen Proteinen (Brouns et al., 1993; Matsuo et al., 1993). Eine Änderung des Phosphorylierungsmusters von zytoplasmatischen Proteinen wurde auch nach Kreuzvernetzung des präBCR mittels anti- μ HC- oder anti-Ig β -Antikörpern auf IL-7-abhängigen prä-B-Zelllinien beobachtet (Kato et al., 2000). Ferner führte die Kreuzvernetzung des präBCR auf ex vivo-isolierten prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von μ HC-transgenen RAG-2T-Mäusen zur verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (Young et al., 1997). Diese Daten spiegeln nicht nur die Funktionalität des präBCR-Komplexes als Signaltransduzierender Rezeptor wider, sondern lassen auch eine Signal-Transduktion durch den präBCR nach Bindung eines Liganden als möglich erscheinen.

Allerdings weisen transgene Mäuse, deren B-Zellvorläufer eine verkürzte μ HC ohne V_H-Domäne ausprägen, die nicht mit der SLC assoziieren kann, auch in Abwesenheit eines λ 5-Gens ein normales pro-B- und prä-B-Zellkompartiment auf (Corcos et al., 1995; Shaffer &

Schlüssel, 1997). Shaffer & Schlüssel (1997) vermuteten daher, daß die SLC in B-Zellvorläufern von Wt-Mäusen lediglich als Chaperon funktionieren könnte, welches die korrekte Faltung der μ HC-Proteine und deren membrangebundene Expression ermöglicht (siehe oben), und der präBCR keinen Liganden zur Transduktion von Signalen erkennen muß. Corcos et al. (1995) vermuteten hingegen, daß die verstärkte Aggregation der verkürzten μ HC-Proteine auf der Zelloberfläche Ursache für eine konstitutive Signal-Transduktion sein könnte, welche die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen unter diesen Bedingungen vermitteln könnte. Die verstärkte Aggregation der verkürzten μ HC-Proteine könnte eine unter normalen Bedingungen notwendige Interaktion des präBCR mit einem Liganden unnötig machen (Corcos et al., 1995).

Die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und eine proliferative Expansion der prä-B-Zellen könnte also nicht nur von IL-7/IL-7R-Interaktionen kontrolliert sein, sondern auch die Bindung eines Liganden auf Zellen des Knochenmarks durch den präBCR erfordern. Ebenso ist es möglich, daß der präBCR die Differenzierung von B-Zellvorläufern und eine proliferative Expansion der prä-B-Zellen unabhängig von IL-7 und anderen im Knochenmark ausgeprägten Faktoren vermittelt.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es zu klären, ob der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion von μ HC-exprimierenden B-Zellvorläufern unabhängig vom Kontext des Knochenmarks vermittelt.

Pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen, die ein zur IgH konstanten Region $c\mu$ invers orientiertes $V_H D_H J_H$ -Rearrangement tragen (VPEinv-Mäuse; Maruyama et al., 2000), wurden unter verschiedenen Bedingungen *in vitro* kultiviert. Die Verwendung der VPEinv-Mäuse ermöglicht durch induzierbare Cre-vermittelte Rekombination von entgegengesetzt orientierten, mutierten loxP Sequenzen, die das invertierte $V_H D_H J_H$ -Rearrangement flankieren, eine Inversion des IgH-Rearrangements, und damit die *de novo* Expression eines präBCR in B-Zellvorläufern außerhalb des Kontext des Knochenmarks.

Würde der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion von prä-B-Zellen unabhängig vom Kontext des Knochenmarks vermitteln, so würde das die vorgeschlagene Existenz eines präBCR-Liganden auf Zellen des Knochenmarks (Melchers et al., 1993) als unwahrscheinlich erscheinen lassen, und eine Notwendigkeit von kostimulierenden Faktoren während der präBCR-medierten Differenzierung und proliferativen Expansion von B-Zellvorläufern ausschließen.

Um zu untersuchen, ob der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion der prä-B-Zellen möglicherweise unabhängig von IL-7 vermittelt, wurden pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt- und $\lambda 5T$ -Mäusen *in vitro* unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Würden die isolierten pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen im Gegensatz zu pro-B-Zellen aus $\lambda 5T$ -Mäusen *in vitro* ohne die Zugabe von IL-7 und ohne Stromazellen zu prä-B-Zellen differenzieren und proliferieren, so würde dies vermuten lassen, daß der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die Proliferation der prä-B-Zellen unabhängig

von IL-7 vermittelt, oder daß prä-B-Zellen nur eine geringe IL-7-Konzentration zur Differenzierung und Proliferation benötigen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma, Deisenhofen bezogen. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Radioisotope wurden von der Firma Amersham, Braunschweig bezogen.

2.2 Mäuse

Tiere des Mausinzuchtstammes Balb/c wurden von der Firma Bomholdgard (Dänemark) bezogen. λ5T-Mäuse (Kitamura et al., 1992), JHT-Mäuse (Gu et al., 1993), B1-8f-Mäuse (Lam et al., 1997), B1-8i-Mäuse (Sonoda et al., 1997), ED-cre-Mäuse (Schwenk et al., 1998), VPE-Mäuse (Maruyama et al., 2000), VPEinv-Mäuse (Maruyama et al., 2000) und Tiere des Mausinzuchtstammes C57BL/6 wurden unter konventionellen Bedingungen in den Tierställen des Institut für Genetik, Universität zu Köln gezüchtet.

2.3 Monoklonale Antikörper und Antiseren

Folgende monoklonalen Antikörper wurden, gekoppelt an APC, PE, FITC, CyC, Biotin oder MACS-Mikropartikel verwendet:

Name	Spezifität	Referenz
Ra3-6B2	anti-CD45R/B220	Coffman & Weissman, 1981
S7	anti-CD43	Gulley et al., 1988
R33-24-12	anti-IgM	Grützmann, 1981; Leptin et al., 1984
R33-18-10.1	anti-Igκ	Grützmann, 1981
30F1	anti-HSA	Ledbetter & Herzenberg, 1979
3C7	anti-CD25 (IL-2Rα-Kette)	Pharmingen, San Diego, USA
1D3	anti-CD19	Pharmingen, San Diego, USA
SL156	anti-präBCR	Winkler et al., 1995
LM34	anti-λ5	Karasuyama et al., 1993
VP245	anti-VpreB	Karasuyama et al., 1993
M41	anti-μHC	Leptin et al., 1984

Die verwendeten Streptavidin-Cy-Chrome- und Streptavidin-PerCP-Konjugate stammen von Pharmingen (San Diego, USA), während das Streptavidin-Cy7PE-Konjugat von Caltag (Burlingame, USA) bezogen wurde. Das verwendete Streptavidin-Alexa594-Konjugat stammt von der Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande). Die an magnetische Mikropartikel gekoppelten Antikörper Ra3-6B2 und 1D3 wurden von der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach bezogen. Das Ziege anti Maus Ig-λ Serum (verwendet als PE-Konjugat) stammt von

Southern Biotechnologie (USA). Rattenserum wurde von B. Hampel, Köln, zur Verfügung gestellt.

2.4 Immunfluoreszenz und Zellsortierung

Nach Gewinnung von Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks aus Femur und Tibia oder der Milz erfolgte eine Lyse der Erythrozyten durch 2 min Inkubation in Tris-gepufferter, 0,165M NH_4Cl -Lösung auf Eis. Die Zellsuspension wurde durch Zugabe von 10 ml Färbemedium (modifiziertes RPMI 1640 ohne Phenolrot, ohne Biotin, ohne Riboflavin; 3% FCS, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES [pH 7.2], L-Glutamin) isoosmotisch gemacht und dadurch die Erythrozyten-Lyse beendet. Zelltrümmer wurden mittels Filtern durch ein Nylonnetz entfernt und die Zellkonzentration der Suspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Jeweils 10^6 Zellen einer Einzelzellsuspension wurden in 10 μl Färbemedium mit den entsprechenden Antikörpern für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mittels Färbelösung wurden Biotin-gekoppelte Antikörper in einem nachfolgendem Färbeschritt mit Streptavidin-Cy-Chrome, -PerCP, -Cy7PE oder Streptavidin-Alexa594 entwickelt.

Tote Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumiodid (1 $\mu\text{g/ml}$) angefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen.

Zur durchflußzytometrischen Analyse wurde ein FACScan oder ein FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, USA) verwendet. Einzelne Zellen wurden mit einem FACSstar+ (Becton Dickinson) sortiert.

2.4.1 Intrazelluläre μHC -Färbung

Nach erfolgter Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend in PBS resuspendiert und nach Zugabe des gleichen Volumen einer 4% Formaldehyd/PBS-Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln fixiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Färbung der Zellen in 0.05% Saponin/PBS/BSA/Azid mit dem FITC-gekoppelten Antikörper M41 für 20 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit 0.05% Saponin/PBS/BSA/Azid gewaschen, in PBS/BSA/Azid aufgenommen und analysiert.

2.4.2 Magnetische Zellsortierung

Zur FACS-Isolierung von Einzelzellen verschiedener B-Zellpopulationen aus dem Knochenmark wurde eine Anreicherung von B220⁺- oder CD19⁺-Zellen mit LS- oder VS-Säulen (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde das unter 2.4 beschriebene Färbemedium mit 2 mM EDTA verwendet.

2.5 Retrovirale Transfektion von 38B9 pro-B-Zellen mit dem μ HC-Expressionsvektor pELCV

Um zu testen, ob die $V_H D_H J_H$ -Segmente von VPE- und B1-8i-Mäusen die Ausprägung einer μ HC mit der surrogaten leichten Kette in einem membrangebundenen präBCR-Komplex zulassen, wurde das zu testende $V_H D_H J_H$ -Rearrangement in den retroviralen Expressionsvektor pELCV kloniert, und damit die A-MuLV transformierte pro-B Zelllinie 38B9 (Alt et al., 1981, 1984) transfiziert wie von ten Boekel et al., 1997 beschrieben. Der pELCV Vektor (ten Boekel et al., 1997) sowie die Verpackungszelllinie GP⁺E-86 (Chen & Okayama, 1987) wurden freundlicherweise von A. Rolink, Basel, Schweiz zur Verfügung gestellt.

Das $V_H D_H J_H$ -Rearrangement von VPE-Mäusen (Maruyama et al., 2000) und B1-8i-Mäusen (Sonoda et al., 1997) wurde mit dem V_H -J558 familienspezifischen Primer V_H -J558-1.Rde und dem J_H 4E-Primer (Ehlich et al., 1994) in einer 1. Runde mittels PCR amplifiziert, gefolgt von einer 2. Runde PCR mit den Primer V_H -J558-2.Rde und J_H 2C μ -B1-8 bzw. J_H 3C μ -PE. Die PCR-Reaktionen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt: Ein 30 μ l Reaktionsansatz enthielt 2 μ l DNA (s. 2.8), 1x PCR-Puffer (Life Technologies, Karlsruhe), 6.25 nmol je dNTP, 2 mM MgCl₂, 3 U Taq-Polymerase, 10 pmol der spezifischen 5'- und 3'-Primer. Dabei wurde folgendes PCR-Programm verwendet: 1 min 94°C, 25 x (45s 94°C, 45s 63°C; 90s 72°C), 5 min 72°C. Das in einer 3. Runde PCR mit den Primern V_H -J558-3.Rde (enthält in der 5' Region eine Sal-1 Restriktionsschnittstelle) und J_H 2C μ -B1-8 bzw. J_H 3C μ -PE (enthalten in der 3' Region eine stille Hind-III Restriktionsschnittstelle) erhaltene Produkt wurde mittels der Sal-1 und Hind-III Restriktionsschnittstellen in den Blueskript-Vektor pBSSk-II kloniert und anschließend sequenziert. Klonierte $V_H D_H J_H$ -Fragmente mit der korrekten Sequenz wurden dann in den retroviralen Vektor pELCV kloniert und anschließend unter Verwendung des $c\mu$ -Sequenzprimers erneut sequenziert. Als Folge der PCR-Amplifikation mit den von ten Boekel et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotiden wurde in der FR 1-Region des VDJ-PE Segments 5 Aminosäuren, und in der FR 1-Region des VDJ-B1-8 Segments 3 Aminosäuren ausgetauscht (Abb. 3). Die Nukeotidsequenzen und damit auch die Aminosäuresequenzen außerhalb der in Abb. 3 gezeigten FR 1-Regionen des VDJ-PE und VDJ-B1-8 Segments blieben unverändert. Die retroviralen μ HC-Expressionsvektoren mit den so veränderten, integrierten VDJ-PE bzw. VDJ-B1-8 Segmenten werden im Folgenden mit pELCV-PE bzw. pELCV-B1-8 bezeichnet.

3.5x10⁶ GP⁺E-86 Zellen je 10 cm² Platte wurden 5 h vor der Transfektion in IMDM (Gibco, BRL), 10% FCS, 5x10⁻⁵ M 2-ME, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin ausplattiert und anschließend mit 20 μ g retroviraler Plasmid-DNA durch Kalzium-Phosphat Methode transfiziert. Nach Übernachtinkubation (37°C, 7.5% CO₂) wurde das Medium durch 8.5 ml frisches IMDM-Medium je 10 cm² Platte ersetzt und für weitere 24 h inkubiert. Zellreste des Virus-haltigen Überstandes wurden für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert, der Überstand darauffolgend mit 4 μ g/ml Polybrene versetzt. 2x10⁶ 38B9 pro-B-Zellen wurden in 4 ml des Virus-haltigen Überstandes 5 h kultiviert und mit zusätzlichen 4 ml IMDM-Medium für weitere 24 h inkubiert. Infizierte pro-B-Zellen wurden durch 3 μ g/ml Puromycin (Sigma, Deisenhofen) in IMDM-Medium selektioniert und anschließend einzelne Klone auf μ HC- und präBCR-Oberflächenexpression untersucht. Als Färbemedium wurde dazu PBS/BSA/Azid mit 5% normalem Rattenserum verwendet.

V _H -J558-1.Rde	GCG AAG CTT ARG CCT GGG RCT TCA GTG AAG
V _H -J558-2.Rde	TGC AAC AGT CTG GAC CTG AGC TGG TGA AGC CTG GGG CTT CG
V _H -J558-3.Rde	TGC GAG GTC GAC CTG CAA CAG TCT GGA CCT
J _H 4E	AGG CTC TGA GAT CCC TAG ACA G
J _H 2C μ -B1-8	TTT GGG AAG CTT TGA CTC TCT GAG GAG ACT GTG AGA GTG G
J _H 3C μ -PE	TTT GGG AAG CTT TGA CTC TCT GCA GAG ACA GTG ACC AG
c μ -Sequenzprimer	GGG GGC TCT CGC AGG AGA CG

VPE-Sequenz (oben)

pELCV-PE-Sequenz (unten)

<----- F R 1 ----->

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu

CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG ACT TCA GTG AAG TTG

 CAG GTC GAC CTG CAA CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG TTG

Gln Val Asp Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu

Sal-I

B1-8i-Sequenz (oben)

pELCV-B1-8-Sequenz (unten)

<----- F R 1 ----->

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu

CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG

 CAG GTC GAC CTG CAA CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG

Gln Val Asp Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu

Sal-I

Abb. 3. Vergleichende Darstellung der FR 1-Region kodierenden Keimbahnsequenzen der V_HD_HJ_H-Segmente von VPE- und B1-8i-Mäusen mit den entsprechenden Sequenzen der pELCV-PE bzw. pELCV-B1-8 μ HC-Expressionsvektoren.

Gezeigt sind die Nukleotidsequenzen der V_HD_HJ_H-Segmente von VPE- und B1-8i-Mäusen und die dadurch kodierte Aminosäuren 1-20 der jeweiligen FR 1-Region (jeweils oben dargestellt). Die entsprechenden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der pELCV-PE und pELCV-B1-8 μ HC-Expressionsvektoren sind zum Vergleich jeweils darunter dargestellt. Punkte zeigen eine Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz an. Die in den pELCV-PE und pELCV-B1-8 μ HC-Expressionsvektoren ausgetauschten Aminosäuren sind unterstrichen dargestellt. Weiterhin sind die zur Klonierung der amplifizierten V_HD_HJ_H-Segmente in den μ HC-Expressionsvektor pELCV verwendeten Sal-I Restriktionsschnittstellen angegeben. Für weitere Details siehe Text.

2.6 Metabolische [³⁵S]-Markierung und Immunpräzipitationen

Zur radioaktiven Markierung von zellulären Proteinen mit L-[³⁵S]-Methionin und L-[³⁵S]-Cystein wurde PRO-MIX™ L-[³⁵S] der Firma Amersham, Braunschweig verwendet.

Je 4×10^6 Zellen wurden in L-Methionin- und L-Cystein-defizientem RPMI 1640 Medium, 5% FCS, 10 mM Hepes pH 7.2, L-Glutamin gewaschen, dann für 40 min bei 37°C, 7.5% CO₂ inkubiert und anschließend mit 200 μCi L-[³⁵S]-Methionin/L-[³⁵S]-Cystein PRO-MIX™ für 2 h bei 37°C, 7.5% CO₂ inkubiert. Nach Waschen der Zellen mittels PBS wurden die Zellen in NP-40 Lysepuffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM Iodacetamid, 1 mM PMSF, 2 μg/ml Aprotinin, 1 μg/ml Pepstatin) für 1 h auf Eis lysiert.

Das Vorklären der Lysate erfolgte durch Inkubation mit Protein-A-Sepharose, die mit normalem Kaninchenserum vorinkubiert worden war, über Nacht bei 4°C. Zur Immunpräzipitation von mit μHC- oder mit λ5-Proteinen assoziierten Molekülen wurden die vorgeklärten Lysate mit 5,5 μg/4x10⁶ Zellen des jeweiligen monoklonalen Antikörpers (s. 2.3) für 1 h inkubiert, gefolgt von einer 30 min Inkubation mit je 5,5 μg affinitätsgereinigten Kaninchen anti-Ratte IgG Antikörpern (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Nach Inkubation mit Protein-A-Sepharose Partikeln (Pharmacia, Uppsala, Schweden) für 1 h wurden die Präzipitate mit Lysepuffer gewaschen und in je 45 μl Laemmli-Puffer für 5 min aufgekocht. Die Präzipitate wurden anschließend in einem 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Gele wurden mit Coomassie blue für 20 min gefärbt, dann 2 h in 40% H₂O, 50% Ethanol, 10% Eisessig fixiert und getrocknet. Die Autoradiographie von getrockneten Gelen wurde mit einem Intensifying Screen auf Kodak-Filmen (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) bei -70°C durchgeführt.

2.7 Amplifikation von IgH μ-Transkripten

Zur Analyse der von prä-B-Zellen exprimierten μHC wurden IgH μ-Transkripte einzelner Zellen nach einem durch S. Schwers modifizierten Protokoll von Kantor et al. (1997) in einer cDNA-Synthese mit anschließender PCR in 3 Runden amplifiziert und sequenziert.

Einzelne prä-B-Zellen wurden in PCR-Gefäße mit 10 μl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.3], 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5% NP-40 und 6,2 U RNAGuard [Pharmacia, Freiburg]) sortiert. Zur Denaturierung der RNA wurden die Reaktionsgefäße für 1 min auf 65°C erhitzt und nachfolgend für 3 min auf Eis gekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 2,5 μl cDNA-Reaktionsmix (60 mM Tris-HCl [pH 8,3], 90 mM KCl, 3,6 mM MgCl₂, 12 mM DTT, 150 ng random hexamers [Boehringer, Mannheim], 5 mM dNTP) und 100 U Superscript II Reverse Transkriptase (Life Technologies, Karlsruhe) zugegeben. Es folgten Inkubationen bei 22°C (10 min), 37°C (15 min), 42°C (15 min) und 90°C (6 min).

Zur spezifischen Amplifikation von μHC-cDNA wurden 2,5 μl des cDNA-Reaktionsproduktes in einen PCR-Reaktionsansatz (50 μl) mit 1 x PCR-Puffer (Life Technologies, Karlsruhe), 200 μM je dNTP, 2 mM MgCl₂, 3 U Taq-DNA-Polymerase und den MsV_HE und CμE-Primern (je 5 pMol) gegeben. Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 96°C für 2 min erfolgte die PCR-Amplifikation mit 35 Zyklen (30s 97°C, 30s 50°C; 30s 72°C) gefolgt von 5 min Inkubation bei 72°C.

1,5 μ l des I.Runde RT-PCR-Produktes wurden durch eine entsprechend durchgeführte II.Runde PCR weiter vervielfältigt, wobei MsV_HE- und C μ A-Primer (je 10 pMol) eingesetzt wurden. Eine III.Runde PCR erfolgte dann für 15 Zyklen mit 1,5 μ l des II.Runde PCR-Produkts und den Primern MsV_HE und C μ I (je 10 pMol).

MsV _H E	GGG AAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG G
C μ E	GAC AGG GGG CTC TCG CAG GAG ACG
C μ A	AGG GGG AAG ACA TTT GGG AAG G
C μ I	ACA TTT GGG AAG GAC TGA CTC

2.8 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben

0,5 cm der Schwanzspitze einer Maus wurden in 500 μ l Lysepuffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 200 μ g Proteinase K) gegeben und für 12-18 h inkubiert. Unverdaute Zellreste wurden durch eine Zentrifugation entfernt, die DNA durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 200 μ l TE-Puffer resuspendiert.

2.9 PCR zur Bestimmung des Genotyps von Mäusen

Ein 30 μ l PCR-Reaktionsansatz enthielt 2 μ l DNA (siehe 2.8), 1x PCR-Puffer (Life Technologies, Karlsruhe), 6.25 nmol je dNTP, 2 mM MgCl₂, 3 U Taq-Polymerase, 10 pmol der spezifischen 5' und 3' Primer. Zur Amplifizierung wurde folgendes PCR-Programm verwendet: 1 min 94°C, 35 x (45s 94°C, 45s 63°C; 90s 72°C), 5 min 72°C.

Zur Bestimmung des Genotyps der unten aufgeführten Mausstämmen wurden folgende spezifische Primer-Kombinationen verwendet:

<u>Mausstamm</u>	<u>Primer-Kombination</u>
VPE-Mäuse	SAH3 + CDR3PE
VPEinv-Mäuse	LAH53 + CDR3PE
Wt-Mäuse	JH1 + DQ52
JHT-Mäuse	JHT1 + JHT2
ED-cre-Mäuse	CRE1 + CRE2

SAH3	TAA TCT GTC CTA AAG GCT CTG A
LAH53	GGA CCT CCA TCT GCT CTT ATT T
CDR3PE	GGT CTA TTA CTG TGC AAG TTG G
JH1	CCC GTT TCA GAA TGG AAT GTG C
DQ52	ACG TCG ACA AGG TTT TGA CTA AGC GGA GCA
JHT1	CAG TGA ATG ACA GAT GGA CCT CC
JHT2	GCA GAA GCC ACA ACC ATA CAT TC
Cre-1	CAA TTT ACT GAC CGT ACA C
Cre-2	CAT CGC CAT CTT CCA GCA G

2.10 Sequenzierung von PCR-Produkten

Zur Sequenzierung von amplifizierten IgH-Genkomplexen wurde das III.Runde PCR-Produkt über ein 1,2%-iges Agarosegel aufgereinigt und mittels Costar Spin-X-Säulen (Costar, Cambridge, USA) nach den Angaben des Herstellers eluiert. Nach Fällung der DNA und Resuspendierung in 20 μ l H₂O wurden 30 ng des PCR-Produktes mit dem Ready Reaction DyeDeoxyTerminator Cycle sequencing kit auf einem ABI1377 automatischen Sequenzierer (beides Applied Biosystems, Weiterstadt) nach den Angaben des Herstellers sequenziert. Zur Sequenzierung wurde dabei jeweils einer der angegebenen III.Runde PCR-Primer verwendet.

2.11 Datenbankvergleich der IgH-Genkomplexe

Die Identifizierung der IgH-Genkomplexe und der darin verwendeten V_H-Gene verschiedener V_H-Gen-Familien erfolgte mit dem Programm DNAPLOT von Werner Müller, Institut für Genetik, Köln (www.dnaplot.de).

2.12 Kultivierung von B-Zelllinien

Die 38B9 pro-B-, NFs5.3 prä-B- und die J558L μ m3 Myelom-Zelllinie (s. 3.2) wurden in IMDM (Gibco, BRL), 10% FCS, 5x10⁻⁵ M 2-ME, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 7,5% CO₂ kultiviert.

2.13 Etablierung und Kultivierung von pro-B-Zelllinien der fötalen Leber

Pro-B-Zelllinien der fötalen Leber wurden entsprechend der von Rolink et al. (1991) publizierten Methode kultiviert.

Nach Gewinnung einer Einzelzellsuspension der fötalen Leber (Tag 13-15 der Embryonalentwicklung) wurden Erythrozyten wie unter 2.4 beschrieben lysiert, die Zellen pelletiert und in einer Konzentration von ca. 4000 kernhaltigen Zellen/ml in IMDM (Gibco, BRL), 2% FCS, 5x10⁻⁵ M 2-ME, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin, 0,03% Primatone (Quest International, Naarden, USA), 1 x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, BRL), 5 μ g/ml Insulin (Sigma, USA), 100-240 U/ml humanes rIL-7 (R&D Systems, Minneapolis, USA) bei 37°C, 7,5% CO₂ auf einem semikonfluenten Rasen von γ -bestrahlten ST-2 Stromazellen (3000 rad) kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die gewachsenen pro-B-Zellen abgeerntet und für weitere 2 mal in einer Ausgangskonzentration von 1x10⁵ Zellen/ml unter gleichen Bedingungen für je 3 Tage kultiviert. Die Identität der etablierten Zelllinien als pro-B-Zelllinien wurde dann wie unter 3.3 beschrieben mittels FACS-Analyse bestätigt.

Etablierte pro-B-Zelllinien wurden für jeweils 3-4 Tage auf einem semikonfluenten Rasen von γ -bestrahlten ST-2 Stromazellen (3000 rad) in einer Ausgangskonzentration von 1x10⁵ Zellen/ml kultiviert.

Zellen der ST-2 Stromazelllinie wurden im oben angegebenen IMDM-Medium ohne IL-7 in einer Ausgangskonzentration von 1,2x10⁴ Zellen/ml für jeweils 3-4 Tage kultiviert.

2.14 Kultivierung von pro-B-Zellen des Knochenmarks

Mittels FACSstar+ isolierte pro-B-Zellen des Knochenmarks wurden in einer Ausgangskonzentration von ca. 1×10^5 Zellen/ml in IMDM (Gibco, BRL), 2% FCS, 5×10^{-5} M 2-ME, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin, 0,03% Primatone (Quest International, Naarden, USA), 1 x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, BRL) bei 37°C, 7,5% CO₂ kultiviert. In manchen Experimenten wurden pro-B-Zellen auf einem semikonfluenten Rasen von γ -bestrahlten ST-2 Stromazellen (3000 rad) kultiviert. Zur Induktion der de novo μ HC-Expression in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen wurden die isolierten B-Zellvorläufer für 24 h in IMDM-Medium mit 0,2 μ M 4-OH-Tamoxifen kultiviert (4-OH-Tamoxifen [Sigma, Deisenhofen] wurde als 5 mM Ausgangslösung in Ethanol abs. bei -20°C gelagert). Danach wurde das 4-OH-Tamoxifen-haltige IMDM-Medium abgenommen, und die Zellen durch 4 bis 5-malige Zugabe und Abnahme von frischem IMDM-Medium gewaschen. Es folgte eine weitere Kultivierung in IMDM-Medium ohne 4-OH-Tamoxifen für 3 Tage.

Nach dem Abernten wurde die Anzahl lebender Zellen in einem Lichtmikroskop mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei tote Zellen durch den Trypan-Blau Exklusions-Test von der Zählung ausgeschlossen wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1 B-Zellentwicklung in VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen

Zur Untersuchung, ob die Expression eines präBCR-Komplexes in B-Zellvorläufern die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und eine Proliferation von prä-B-Zellen unabhängig vom Kontext des Knochenmarks induziert, sollte in pro-B-Zellen die de novo Synthese einer μ HC und damit eines präBCR (falls die μ HC mit der SLC zu einem membrangebundenen präBCR assoziieren kann) unter verschiedenen Kulturbedingungen in vitro induziert werden.

Durch Kreuzung der von Maruyama et al. (2000) generierten VPEinv-Mäuse, die ein zur IgH konstanten Region $C\mu$ invers orientiertes $V_H D_H J_H$ -Rearrangement tragen, mit JHT- (Gu et al., 1993) und ED-cre-Mäusen (Schwenk et al., 1998) wurden VPEinv/JHT, ED-cre-Mäuse erhalten. VPEinv/JHT, ED-cre-Mäuse erlauben durch Cre-vermittelte Rekombination der entgegengesetzt orientierten, mutierten loxP Sequenzen eine Inversion des dazwischenliegenden invertierten VDJ-PE Gensegments, und damit eine de novo Expression einer μ HC (Maruyama et al., 2000) von einem der beiden IgH-Allele (Abb. 4)¹.

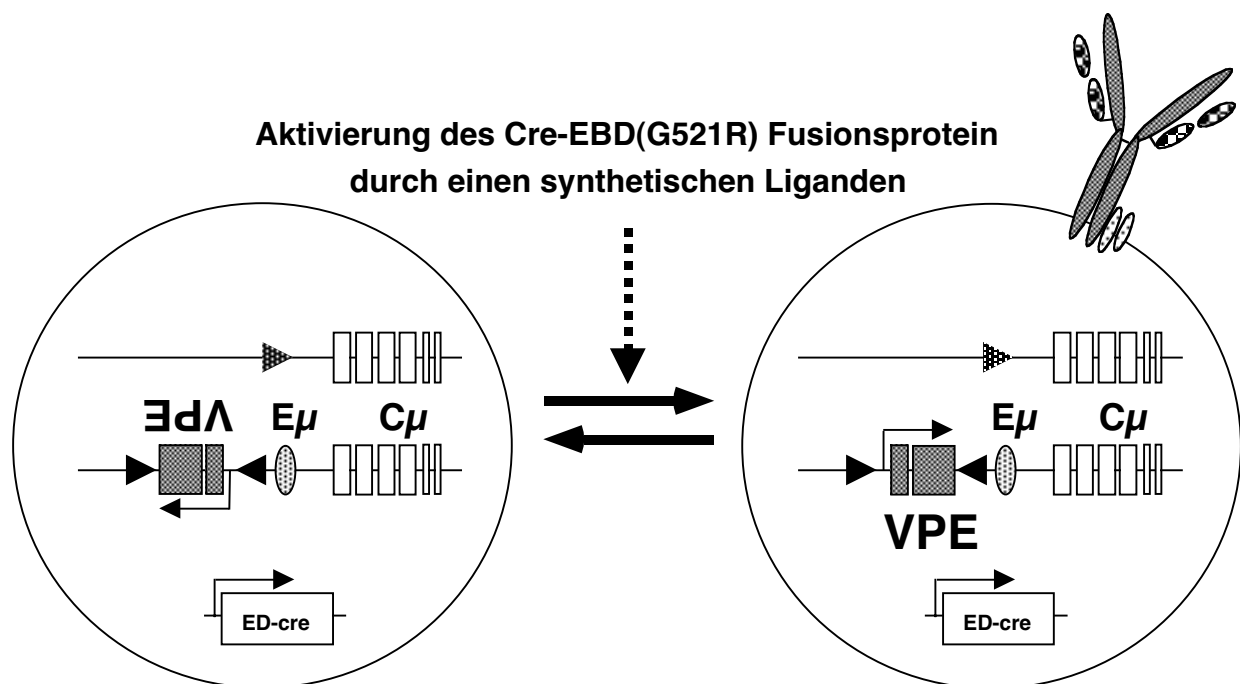


Abb. 4. Schematische Darstellung der beiden IgH-Loci in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen und das Prinzip der induzierbaren μ HC de novo Synthese in pro-B-Zellen.

Die Abbildung wurde entnommen aus Maruyama et al. (2000) und verändert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

¹ Eine Cre-vermittelte transchromosomale Rekombination einer mutierten loxP Sequenz des VPEinv-Alleles mit der Wildtyp loxP Sequenz des JHT-Alleles (Abb. 4; Gu et al., 1993) ist aufgrund der Sequenzspezifität der Cre-Rekombinase ausgeschlossen (Hoess et al., 1986).

Das in Zellen von ED-cre-transgenen Mäusen exprimierte Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und mutierter humaner Östrogen-Bindungs-Domäne (estrogen binding domain (EBD)) Cre-EBD(G521R)-Protein ermöglicht die kontrollierte Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Bindung eines synthetischen Liganden, nicht aber durch die natürlichen Östrogen-Rezeptor Agonisten β -Estradiol und Estriol (Schwenk et al., 1998). Dadurch kann in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen eine μ HC-Expression induziert werden (Abb. 4). Dabei entspricht das theoretisch erreichbare Maximum der μ HC de novo Synthese in VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen 50%, da aufgrund der das VDJ-PE Segment flankierenden, entgegengesetzt orientierten loxP Sequenzen eine Cre-vermittelte Rekombination in einem Gleichgewicht beider Orientierungen des VDJ-PE Segments resultieren sollte.

Um zu untersuchen, ob die in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen exprimierbare μ HC die Differenzierung von pro-B- zu prä-B- und weiter zu B-Zellen erlaubt, wurde die B-Zellentwicklung im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen analysiert. Denn in VPE-Mäusen liegt das VDJ-PE Segment durch Kreuzung einer VPEinv-Maus mit einer Deleter-Maus (Schwenk et al., 1995) bereits in der Orientierung vor, die die Expression einer μ HC erlaubt² (das IgH-Allel von VPE-Mäusen wird im Folgenden mit VPE-Allel bezeichnet).

Die Untersuchung der B-Zellentwicklung im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen erfolgte im Vergleich zu Wt- (BALB/c), B1-8i- und JHT-Mäusen. Während die B-Zellentwicklung in JHT-Mäusen, die kein $V_HD_HJ_H$ -Rearrangement generieren und damit keine μ HC exprimieren können, im pro-B-Zellstadium blockiert ist (Gu et al., 1993; Ehlich et al., 1993), erlaubt die in B1-8i IgH-Insertionsmäusen ausgeprägte μ HC eine relativ normale B-Zellentwicklung (Sonoda et al., 1997).

Die verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien wurden basierend auf dem von Hardy et al. (1991) eingeführten System anhand der differentiellen Expression der Oberflächen-Antigene HSA und CD43 unterschieden (s. 1.2 und Abb. 1). Zusätzlich wurde die Ausprägung des von Melchers et al. zur Identifizierung von prä-B-Zellen verwendeten Oberflächen-Antigens CD25 (IL-2R α -Kette) untersucht (s. 1.2).

Tatsächlich erlaubt die vom VPE-Allel ausgeprägte μ HC in VPE/JHT-Mäusen die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die Bildung eines prä-B-Zellkompartiments, das in seiner Größe nicht signifikant verschieden ist vom prä-B-Zellkompartiment im Knochenmark von B1-8i- und BALB/c-Mäusen (Abb. 5 und Tab. 1). Auch die Populationen der sich daraus entwickelnden unreifen B-Zellen und ferner der reifen B-Zellen im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen sind in ihrer Größe nicht signifikant verschieden von den entsprechenden Populationen in B1-8i- und Wt-Mäusen (Abb. 5 und Tab. 1).

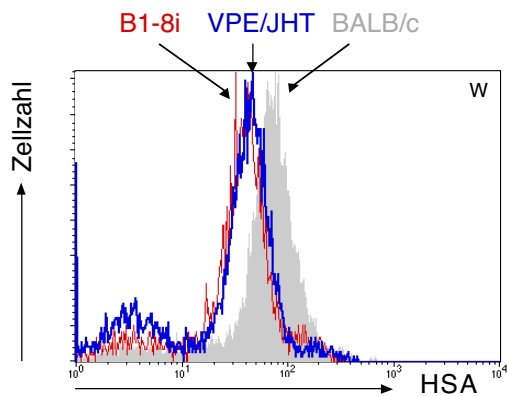
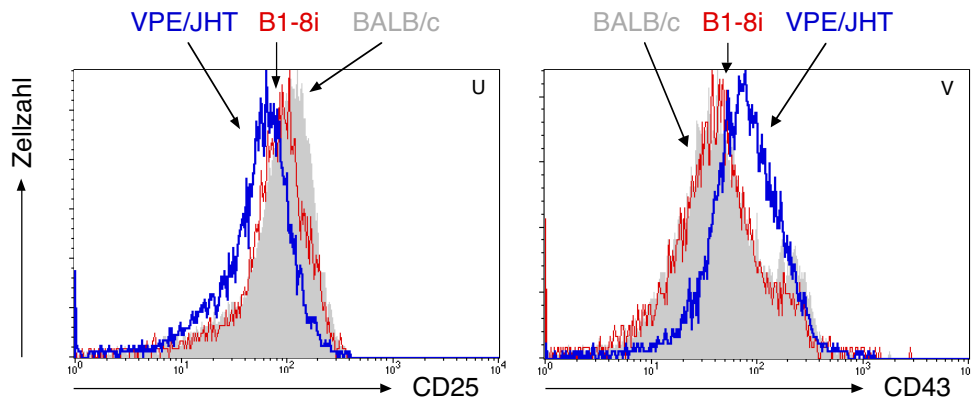
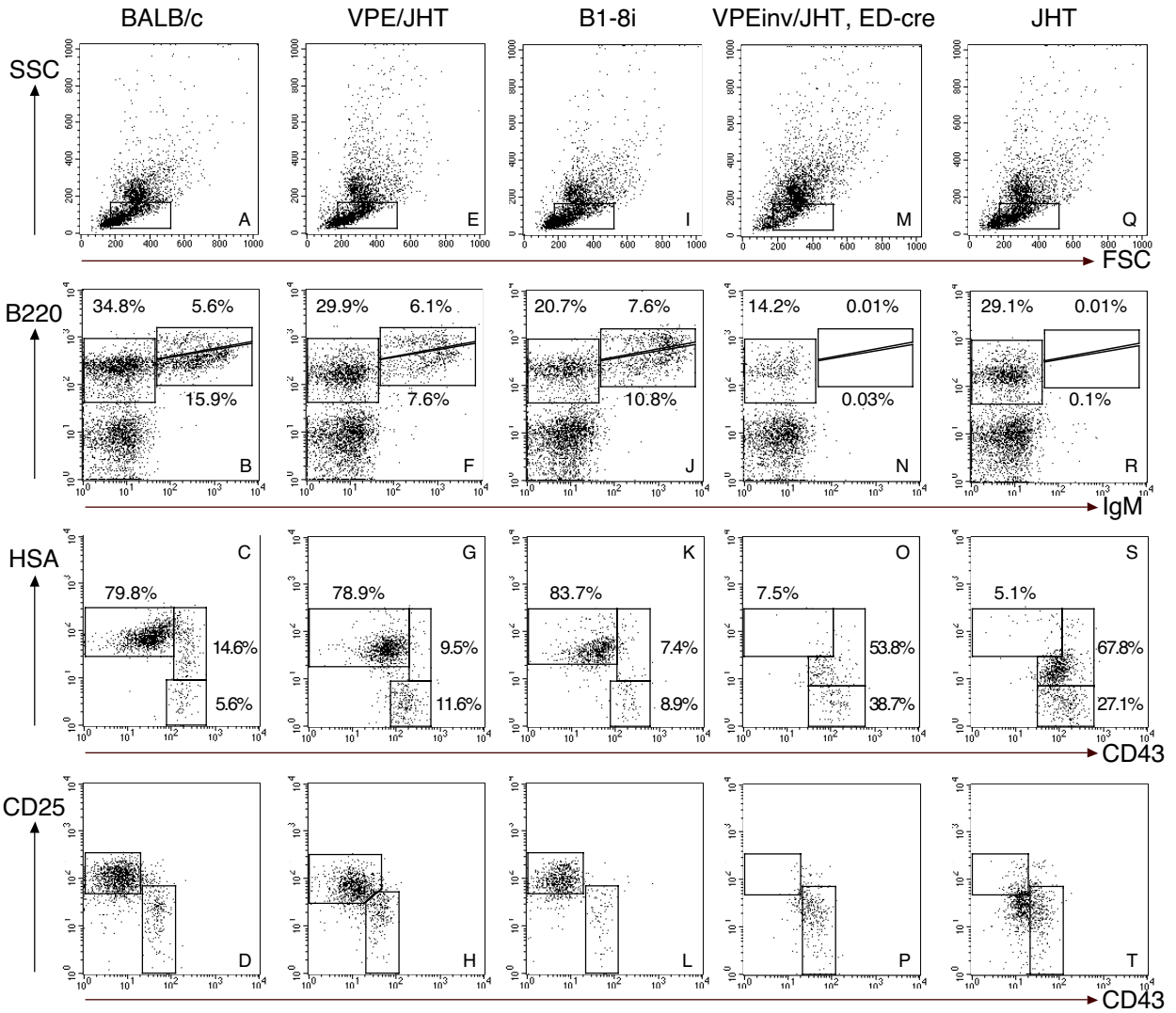
Jedoch unterscheidet sich das pro-B-Zellkompartiment in VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen deutlich von der pro-B-Zellpopulation in BALB/c-Mäusen. So sind im Knochenmark von BALB/c-Mäusen 25-30% aller pro-B-Zellen der Fraktion A angehörig, während mit 70-75% der Zellen die meisten zu den Fraktionen B-C' gehören (Abb. 5 und Tab. 1; Ehlich et al., 1993).

² Die in VPE-Mäusen ausgeprägte μ HC bildet in Kombination mit λ 1 IgL-Ketten einen Antikörper, der spezifisch für das Fluoreszenz-Protein Phycoerythrin (PE) ist (Maruyama et al., 2000).

Mausstamm	N	Kernhaltige Zellen insgesamt ($\times 10^7$)	B220 ⁺ Zellen ($\times 10^6$)	Fraktion					
				A ($\times 10^5$)	B-C' ($\times 10^5$)	D ($\times 10^5$)	E ($\times 10^5$)	F ($\times 10^5$)	
BALB/c	3	1,7 ± 0,3	5,8 ± 1,6	2,1 ± 0,6	4,9 ± 1,1	29,9 ± 10,5	15,8 ± 4,9	5,0 ± 1,2	
				3,6% ± 1,0%	8,5% ± 1,9%	51,6% ± 18,1%	27,2% ± 8,5%	8,6% ± 2,1%	
VPE/JHT	3	1,5 ± 0,1	3,1 ± 0,4	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,4	16,3 ± 3,7	5,8 ± 0,9	4,1 ± 0,8	
				8,1% ± 1,0%	8,4% ± 1,3%	52,6% ± 11,9%	18,7% ± 2,9%	13,2% ± 2,6%	
B1-8i	3	1,6 ± 0,1	3,7 ± 0,8	2,5 ± 0,7	1,3 ± 0,2	13,9 ± 5,1	10,1 ± 3,2	9,3 ± 2,8	
				6,8% ± 1,9%	3,5% ± 0,5%	37,6% ± 13,8%	27,3% ± 8,6%	25,1% ± 7,6%	
VPEinv/JHT, ED-cre	3	2,2 ± 0,3	0,8 ± 0,2	2,6 ± 0,3	4,5 ± 1,1	0,7 ± 0,4	< 0,02	< 0,01	
				32,5% ± 3,8%	56,3% ± 13,8%	8,8% ± 5,0%	≤ 0,3%	≤ 0,2%	
JHT	3	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,4	3,6 ± 0,5	8,8 ± 3,3	0,7 ± 0,2	< 0,05	< 0,01	
				27,7% ± 3,9%	67,7% ± 25,4%	5,4% ± 1,5%	≤ 0,5%	≤ 0,1%	

Tab. 1: Anzahl der Zellen in den Fraktionen A-F im Knochenmark von BALB/c- und mutanten Mäusen.

Die Knochenmarkszellen beider Femura von 5- bis 13-Wochen alten Mäusen wurden gezählt, und die Größe der einzelnen Fraktionen berechnet wie zuvor von Ehlich et al. (1993) beschrieben. Die Anzahl der Zellen in den Fraktionen A-F (nach Hardy et al., 1991) wurde mit Hilfe der in Abb. 5 dargestellten durchflußzytometrischen Profile anhand der prozentualen Häufigkeit von Zellen in den einzelnen Populationen berechnet. B220^{all}/IgM⁺-Zellen werden als Fraktion E, B220^{high}/IgM⁺-Zellen werden als Zellen der Fraktion F dargestellt. Auf eine weitere Analyse der IgD-Expression von Zellen der Fraktion F wurde verzichtet. Zu beachten ist die unterschiedliche Anzahl von B220⁺-Knochenmarkszellen in den verschiedenen Mausstämmen, wodurch eine prozentuale Darstellung des Anteils von Zellen in den Fraktionen A-F notwendig wird.



In VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen sind hingegen 50-70% der Zellen des pro-B-Zellkompartiments der Fraktion A zugehörig, während nur 30-50% aller pro-B-Zellen den Fraktionen B-C' angehören (Abb. 5 und Tab. 1). Dies könnte das Ergebnis einer beschleunigten B-Zellentwicklung durch die wahrscheinlich relativ frühe Expression einer μ HC in pro-B-Zellen von μ HC-transgenen Mäusen (Era et al., 1991; Chang et al., 1995) und in pro-B-Zellen von B1-8i IgH-Insertionsmäusen (Sonoda et al., 1997) sein. So prägen im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen ca. 84% und im Knochenmark von B1-8i-Mäusen ca. 90% der CD19⁺/CD43⁺ pro-B-Zellen intrazellulär μ HC-Proteine aus (Abb. 6)³. Im Gegensatz dazu sind nur ca. 33% der pro-B-Zellen von Wt-Mäusen intrazellulär μ HC⁺ (Abb. 6; Rolink et al., 1994; Schaal, 1996). Da in den beiden analysierten IgH-Insertionsmäusen die meisten pro-B-Zellen bereits eine μ HC ausprägen, die, falls sie in einem membrangebundenem präBCR-Komplex exprimiert werden kann, die weitere Differenzierung zu prä-B-Zellen ermöglicht, könnte die Verweildauer der Zellen im pro-B-Zellkompartiment kürzer sein als in Wt-Mäusen.

(←) Abb. 5. Durchflußzytometrische Analyse von Knochenmarkszellen aus BALB/c-, VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen und weiteren mutanten Mäusen.

(A-D) repräsentieren Daten einer BALB/c-Maus. (A): Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) der lebenden Knochenmarkszellen. Das kleine Fenster zeigt die Lymphozytenpopulation (Förster et al., 1989), die dann weiter analysiert wurde (B-D). Tote Zellen wurden durch Propidiumiodid von der Analyse ausgeschlossen.

(B): Darstellung der Fraktionen A-D, E und F durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM-Antikörpern. Die Prozentsätze zeigen den Anteil der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer (Fraktion A-D), der B220^{dull}/IgM⁺ unreifen B-Zellen (Fraktion E) und der B220^{bright}/IgM⁺ reifen B-Zellen (Fraktion F) an der Lymphozytenpopulation (wie in A gezeigt).

(C): Auftrennung der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer in die Fraktionen A, B-C' und D durch Färbung mit anti-HSA und anti-CD43/S7 Antikörpern. Die Prozentsätze zeigen den Anteil der Fraktionen A, B-C' und D an der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation (wie in B gezeigt).

(D): Auftrennung der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer in pro-B- und prä-B-Zellen durch Färbung mit anti-CD25 und anti-CD43/S7 Antikörpern.

Die Analyse der Knochenmarkszellen von VPE/JHT- (E-H), B1-8i- (I-L), VPEinv/JHT, ED-cre- (M-P) und JHT-Mäusen (Q-T) erfolgte analog zur Analyse der Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen (A-D).

(U): Vergleichende Darstellung des CD25 (IL-2R α -Kette) Oberflächenmarker-Profiles von B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufern aus BALB/c-, VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen. Beachte die schwächere CD25-Expression von prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen.

(V): Vergleichende Darstellung des CD43 Oberflächenmarker-Profiles von B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufern aus BALB/c-, VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen. Beachte, daß prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen mehr CD43 exprimieren als prä-B-Zellen aus BALB/c- und B1-8i-Mäusen.

(W): Vergleichende Darstellung des HSA Oberflächenmarker-Profiles von B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufern aus BALB/c-, VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen. Beachte das schwächere HSA-Expressionsniveau von prä-B-Zellen aus VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen im Vergleich zu prä-B-Zellen von BALB/c-Mäusen.

³ Allerdings kann bei der verwendeten Analyse methode eine Kontamination der analysierten CD19⁺ pro-B-Zellen mit μ HC⁺ CD43⁺ prä-B-Zellen und B-Zellen nicht ausgeschlossen werden, da in den untersuchten IgH-Insertionsmäusen die Separation dieser Zellpopulationen aufgrund der kleineren CD19⁺/CD43⁺ pro-B-Zellpopulation erschwert ist. Weil mit 50-70% der B220⁺ pro-B-Zellpopulation von VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen mehr Zellen der Fraktion A angehören als in BALB/c-Mäusen (25-30% der B220⁺ Zellen gehören der Fraktion A an), wobei die Subpopulationen A₀ und A₁ der Fraktion A aus CD19⁻ Vorläufern von NK-Zellen oder von anderen Zelllinien besteht (s. 1.2), ist die CD19⁺ B-Zellvorläuferpopulation in den verwendeten IgHi-Mäusen kleiner als in Wt-Mäusen.

Das von Sonoda et al. (1997) in diesem Kontext beobachtete, im Vergleich zu BALB/c-Mäusen insgesamt kleinere B220⁺ pro-B-Zellkompartiment in B1-8i-Mäusen konnte in dieser Analyse nicht bestätigt werden, möglicherweise in Folge der zum Teil erheblichen Standardabweichungen der ermittelten Zellanzahlen verschiedener Fraktionen (Tab. 1), wobei diese mit den von Sonoda et al. (1997) erhaltenen Standardabweichungen in etwa übereinstimmen. Jedoch ist das pro-B-Zellkompartiment von VPE/JHT-Mäusen signifikant größer als von B1-8i-Mäusen. VPE/JHT-Mäuse weisen ca. 2 mal mehr pro-B-Zellen der Fraktion B-C' auf als B1-8i-Mäuse (Tab. 1).

Ob dies die Folge von möglicherweise ablaufenden V_H-Gen replacement Rekombinationen (Kleinfeld et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996; s. auch 1.2) oder „silencing rearrangements“ in pro-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen ist, die in anderen IgH-Insertionsmäusen (Taki et al., 1995, Pewzner-Jung et al., 1998), nicht aber in B1-8i-Mäusen (Sonoda et al., 1997) beobachtet werden konnten, ist unklar (s. auch 3.5). Auch ist nicht auszuschließen, daß das größere pro-B-Zellkompartiment in VPE/JHT-Mäusen eine Folge des gemischten genetischen Hintergrundes dieses Mausstammes (129, C57BL/6) gegenüber dem C57BL/6-Hintergrund der verwendeten B1-8i-Mäuse ist. So können beispielsweise BALB/c-Mäuse ein bis zu zweifach größeres pro-B-Zellkompartiment aufweisen als C57BL/6-Mäuse (persönliche Mitteilung, Werner Müller).

Das sich aus der pro-B-Zellpopulation entwickelnde prä-B-Zellkompartiment von VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen unterscheidet sich zwar nicht signifikant in seiner Größe von demjenigen in Wt-Mäusen (Abb. 5 und Tab. 1), jedoch deutlich in der Expressionsstärke der zur Klassifizierung der Zellen genutzten differentiell ausgeprägten Oberflächenmarker. Prä-B-Zellen in VPE/JHT-Mäusen prägen CD43 schwächer und HSA sowie CD25 stärker auf der Zelloberfläche aus als pro-B-Zellen (Abb. 5), wodurch die B-Zellvorläufer hier in pro- und prä-B-Zellen unterschieden werden.

(➔) Abb. 6. Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären μ HC-Expression in pro-B-Zellen von BALB/c-, VPE/JHT-, VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen und weiteren mutanten Mäusen.

Die Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks aus den Femura von 3 Tieren des jeweiligen Mausstammes wurden vereint und durchflußzytometrisch analysiert:

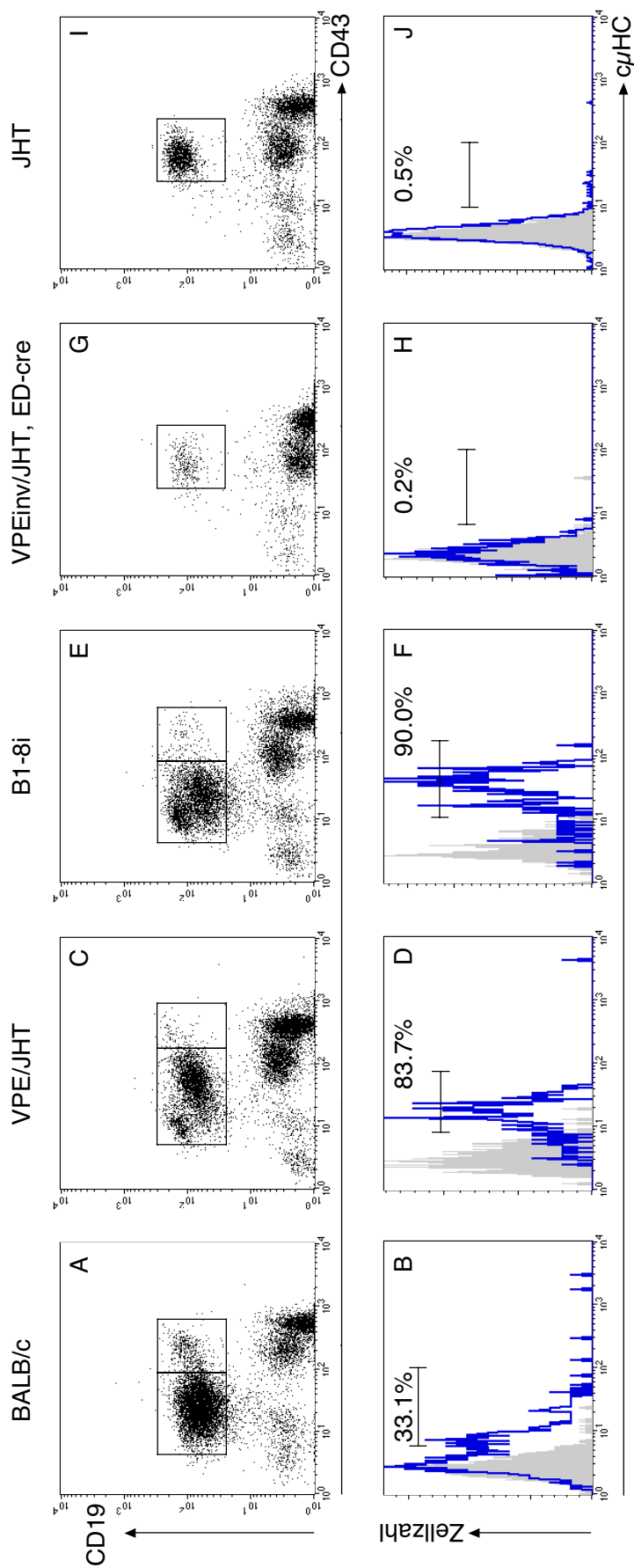
(A-B) repräsentieren Daten von BALB/c-Mäusen.

(A): Darstellung der CD43⁺ pro-B-Zellen und der CD43⁻ prä-B- und B-Zellen im Knochenmark von BALB/c-Mäusen durch Färbung mit anti-CD19 und anti CD43/S7 Antikörpern. Dargestellt sind die Zellen im Lymphozyten-Fenster (Förster et al., 1989).

(B): Darstellung der intrazellulären μ HC-Expression in CD19⁺/CD43⁺ pro-B-Zellen durch Färbung mit anti- μ HC Antikörpern (M41) in Saponinpuffer (s. 2.4.1). Es wurde jeweils die Fluoreszenz der ohne M41 Antikörper inkubierten Zellen schraffiert dargestellt, während die Fluoreszenz der mit M41 Antikörpern inkubierten Zellen durch eine dunkle Linie indiziert wird. Die Prozentsätze zeigen den Anteil der intrazellulär μ HC-exprimierenden Zellen ($c\mu$ HC⁺) des CD43⁺ pro-B-Zellkompartiments an.

Die Analyse der Knochenmarkszellen von VPE/JHT- (C-D), B1-8i- (E-F), VPEinv/JHT, ED-cre- (G-H) und JHT-Mäusen (I-J) erfolgte analog zur Analyse der Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen (A-B).

Wie die Analyse der intrazellulären μ HC-Expression von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von JHT-Mäusen zeigt (I-J), ist der Hintergrund der verwendeten Fluoreszenzfärbemethode sehr gering. Pro-B-Zellen von JHT-Mäusen können in Folge der deletierten J_H-Gensegmente kein IgH-Rearrangement bilden und damit keine μ HC exprimieren (Gu et al., 1993). Die Fluoreszenz der mit M41 Antikörpern inkubierten pro-B-Zellen aus JHT-Mäusen entspricht der Fluoreszenz der ohne M41 Antikörper inkubierten Zellen. Es wurde also keine unspezifische Färbung signifikanten Ausmaßes detektiert.



Jedoch exprimieren prä-B-Zellen in VPE/JHT-Mäusen mehr CD43 als prä-B-Zellen von BALB/c- und B1-8i-Mäusen (Abb. 5). Darüber hinaus erreichen prä-B-Zellen im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen nicht ganz die CD25-Expressionsstärke von prä-B-Zellen in Wt- oder B1-8i-Mäusen (Abb. 5). Ebenso prägen prä-B-Zellen in VPE/JHT-Mäusen HSA weniger stark aus als vergleichbare Wt-Zellen (Abb. 5), wobei allerdings auch prä-B-Zellen im Knochenmark von B1-8i-Mäusen ähnlich wenig HSA auf der Zelloberfläche exprimieren wie prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen (Abb. 5).

Ob diese Unterschiede in der Expressionsstärke der differentiell ausgeprägten Oberflächenmarker von prä-B-Zellen im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen im Vergleich zu Wt- und B1-8i-Mäusen ein verschiedenes Entwicklungsstadium dieser Zellen reflektieren, ist unklar. Ein Einfluß des gemischten genetischen Hintergrundes von VPE/JHT-Mäusen im Vergleich zu BALB/c-Mäusen und B1-8i-Mäusen (mit C57BL/6-Hintergrund) kann als Ursache für die unterschiedliche Ausprägung der Oberflächen-Antigene nicht ausgeschlossen werden. Auch läßt die im Vergleich zu BALB/c- und B1-8i-Mäusen nicht signifikant verschiedene Größe des prä-B-Zellkompartiments in VPE/JHT-Mäusen auf eine mit Einschränkungen normale B-Zellentwicklung schließen.

Da in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen eine μ HC-Expression erst in vitro, also außerhalb des Kontext des Knochenmarks nach Verabreichung eines synthetischen Liganden des Cre-EBD(G521R)-Fusionsproteins erfolgen sollte, wurde untersucht, in wieweit die B-Zellentwicklung dieser Mäuse ohne Verabreichung eines solchen Liganden im pro-B-Zellstadium blockiert ist.

Die Analyse des Knochenmarks von VPEinv/JHT, ED-cre Mäusen zeigt, daß in diesen Mäusen die B-Zellentwicklung in der Transition von pro- zu prä-B-Zellen blockiert ist: So sind in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen nur sehr wenige prä-B-Zellen detektierbar, vergleichbar mit dem im Knochenmark von JHT-Mäusen beobachteten Hintergrundwert (Abb. 5), deren pro-B-Zellen in Folge der deletierten J_H -Gensegmente kein $V_H D_H J_H$ -Rearrangement generieren und damit keine μ HC exprimieren können (Gu et al., 1993). Wie Tab. 1 zeigt, ist das prä-B-Zellkompartiment in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen tatsächlich nicht signifikant größer als der in JHT-Mäusen ermittelte Hintergrundwert. Diese Ergebnisse werden durch die Analyse der intrazellulären μ HC-Expression in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre- und JHT-Mäusen unterstützt. So sind prozentual nicht mehr pro-B-Zellen in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen intrazellulär μ HC⁺ ($c\mu$ HC⁺) als der mit dieser Fluoreszenzfärbung ermittelte Hintergrundwert in JHT-Mäusen (Abb. 6).

Während also die vom VPE-Allel ausgeprägte μ HC in VPE/JHT-Mäusen eine mit Einschränkungen normale B-Zellentwicklung erlaubt, ist die B-Zellentwicklung in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in der Transition der Zellen vom pro-B- zum prä-B-Zellkompartiment in Folge der nicht induzierten μ HC-Expression bei vermutlich sehr geringer Hintergrund-Rekombination des ED-cre Systems blockiert. Da die präBCR-Expression die Voraussetzung für eine normale B-Zellentwicklung ist (s. 1.3 und 1.4), und die B-Zellentwicklung in VPE/JHT-Mäusen mit Einschränkungen normal ist, sollte die vom VPE-Allel kodierte μ HC in einem membrangebundenen präBCR-Komplex ausgeprägt werden können, so daß in pro-B-Zellen

von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen eine induzierbare de novo Synthese eines funktionellen präBCR möglich sein sollte.

Die Tatsache, daß in VPE/JHT-Mäusen eine prä-B-Zellpopulation detektiert werden kann, die nicht in JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen auftritt (s. Abb. 5), bestätigt, daß Zellen dieser Population tatsächlich prä-B-Zellen sind, auch wenn diese im Vergleich zu Wt- und B1-8i-Kontrollzellen ein unterschiedliches Expressionsniveau der CD43-, HSA- und CD25-Oberflächenmarker aufweisen.

In wieweit prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen die vom VPE-Allel kodierte μ HC oder durch sekundäre IgH-Rekombinationen entstandene fremde μ HC's exprimieren, wird in 3.5.1 untersucht.

3.2 Das $V_H D_H J_H$ -Segment von VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen erlaubt vermutlich die Ausprägung einer μ HC in einem präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche von transfizierten pro-B-Zelllinien

Bisher ist der direkte Nachweis des präBCR durch Färbung von ex vivo-isolierten murinen Knochenmarkszellen nur intrazellulär möglich (Karasuyama et al., 1994; Shinjo et al., 1994). Winkler et al. (1995) konnten den präBCR nach einstündiger in vitro-Kultivierung von murinen Knochenmarkszellen auf der Zelloberfläche einer kleinen Population von B220⁺/slgM⁺/c-kit⁺ pre-B-I-Zellen und B220⁺/slgM⁺/CD25⁺ pre-B-II-Zellen (nach Melchers et al., 1995) detektieren. Eigene Versuche, den präBCR auf in vitro-kultivierten Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen nachzuweisen, schlugen jedoch mit dem auch von Winkler et al. (1995) verwendeten monoklonalen Antikörper SL156, der spezifisch für ein von μ HC und der SLC gebildetes Epitop ist, fehl (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnten Hardy et al. (2000) den präBCR auch nach einstündiger in vitro-Kultivierung nicht auf Zellen des Knochenmarks nachweisen.

Ten Boekel et al. (1997) testeten die Fähigkeit verschiedener μ HC's, einen präBCR auf der Zelloberfläche auszuprägen, durch retrovirale Transfektion eines das entsprechende $V_H D_H J_H$ -Segment enthaltenden μ HC-Expressionsvektors in eine transformierte pro-B-Zelllinie, die die SLC-Proteine $\lambda 5$ und VpreB ausdrückt. Die transfizierte pro-B-Zelllinie läßt nicht nur einen intrazellulären Nachweis von μ HC's zu, sondern auch die Detektion von im präBCR-Komplex ausgeprägten μ HC's auf der Zelloberfläche, sofern eine zu analysierende μ HC mit der SLC assoziieren kann (ten Boekel et al., 1997, 1998).

Daher wurde zum Nachweis, daß die vom VPE-Allel ausgeprägte μ HC mit der SLC zu einem membrangebundenen präBCR assoziieren kann, das VDJ-PE Segment sowie zum Vergleich das $V_H D_H J_H$ -Segment aus B1-8i-Mäusen (Sonada et al., 1997), hier als VDJ-B1-8 bezeichnet, in den retroviralen μ HC-Expressionsvektor pELCV wie von ten Boekel et al. (1997) beschrieben kloniert (Abb. 7), und der erhaltene pELCV-PE bzw. pELCV-B1-8 Vektor anschließend in die 38B9 pro-B-Zelllinie transfiziert (s. 2.5).

Im Rahmen der Klonierung wurden in der FR 1-Region des VDJ-PE Segments 5 Aminosäuren, und in der FR 1-Region des VDJ-B1-8 Segments 3 Aminosäuren ausgetauscht (s. 2.5, Abb. 3). Die Aminosäuresequenzen außerhalb der in Abb. 3 gezeigten FR 1-Regionen des VDJ-PE und VDJ-B1-8 Segments blieben unverändert.

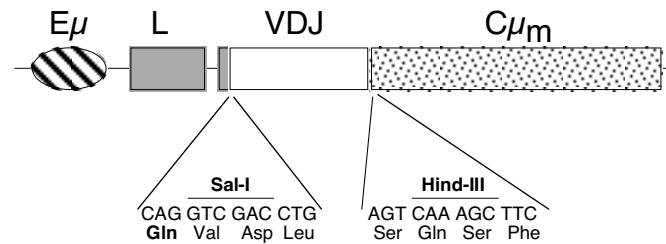


Abb. 7. Schematische Darstellung des μ HC-Expressionsvektors pELCV.

Gezeigt ist der Teil des Vektors, der die Leader-Sequenz (L) der μ HC des SP-6 Hybridoms (Iglesias et al., 1993), ein $V_H D_H J_H$ -Segment und die Sequenz der membrangebundenen μ HC konstanten Region ($C\mu_m$) enthält. Die Expression wird durch den μ HC Kern-Enhancer ($E\mu$) 5' der Leader-Sequenz kontrolliert. Die erste Aminosäure (Gln) der V_H -Domäne ist hervorgehoben. Eine „stille“ Hind-III Restriktionsschnittstelle wurde im dritten bzw. vierten Codon des $C\mu_m$ -Gens generiert. Das $V_H D_H J_H$ -Segment kann anhand der Sal-I und Hind-III Restriktionsschnittstellen durch ein anderes $V_H D_H J_H$ -Segment ersetzt werden. Die Darstellung wurde aus ten Boekel et al. (1997) entnommen und verändert.

Zwar ist unbekannt, welche von einem $V_H D_H J_H$ -Segment kodierte V_H -Domäne die Assoziation einer μ HC mit den SLC-Proteinen Vpre-B und $\lambda 5$ beeinflusst, doch konnten ten Boekel et al. (1998) mit der hier verwendeten Methode zeigen, daß in pro- und prä-B-Zellen sowie in reifen B-Zellen der Milz, die zwei produktive $V_H D_H J_H$ -Rearrangements aufweisen, nur ein IgH-Allel eine μ HC kodiert, die einen präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche ausprägen kann, während die vom zweiten IgH-Allel kodierte μ HC nicht mit der SLC assoziieren kann. Daher ist es unwahrscheinlich, daß durch die hier und von ten Boekel et al. (1997, 1998) verwendete Methode Änderungen in der Aminosäuresequenz der FR 1-Regionen eingefügt werden, die eine nicht zur Assoziation mit der SLC fähige μ HC so verändern, daß sie in einem präBCR-Komplex ausgeprägt werden kann (zur Diskussion s. 4.1.2.1).

Während der durch Transfektion der 38B9 pro-B-Zelllinie abgeleitete Klon PE-CL19 die vom pELCV-PE Vektor kodierte μ HC ausprägt, exprimiert der Klon B1-8-CL2 die vom pELCV-B1-8 Vektor kodierte μ HC.

(➔) Abb. 8. Durchflußzytometrische Analyse der μ HC- und präBCR-Oberflächenexpression von mit pELCV-PE und pELCV-B1-8 μ HC-Expressionsvektoren transfizierten pro-B-Zelllinien.

Während der Klon PE-CL19 die vom pELCV-PE Vektor kodierte μ HC ausprägt, exprimiert der Klon B1-8-CL2 die vom pELCV-B1-8 Vektor kodierte μ HC. Zum Vergleich wurden Zellen der J558L μ m3 Myelomzelllinie (sIgM⁺), NFs5.3 prä-B-Zelllinie (präBCR⁺) und der 38B9 pro-B-Zelllinie (μ HC⁻) analysiert.

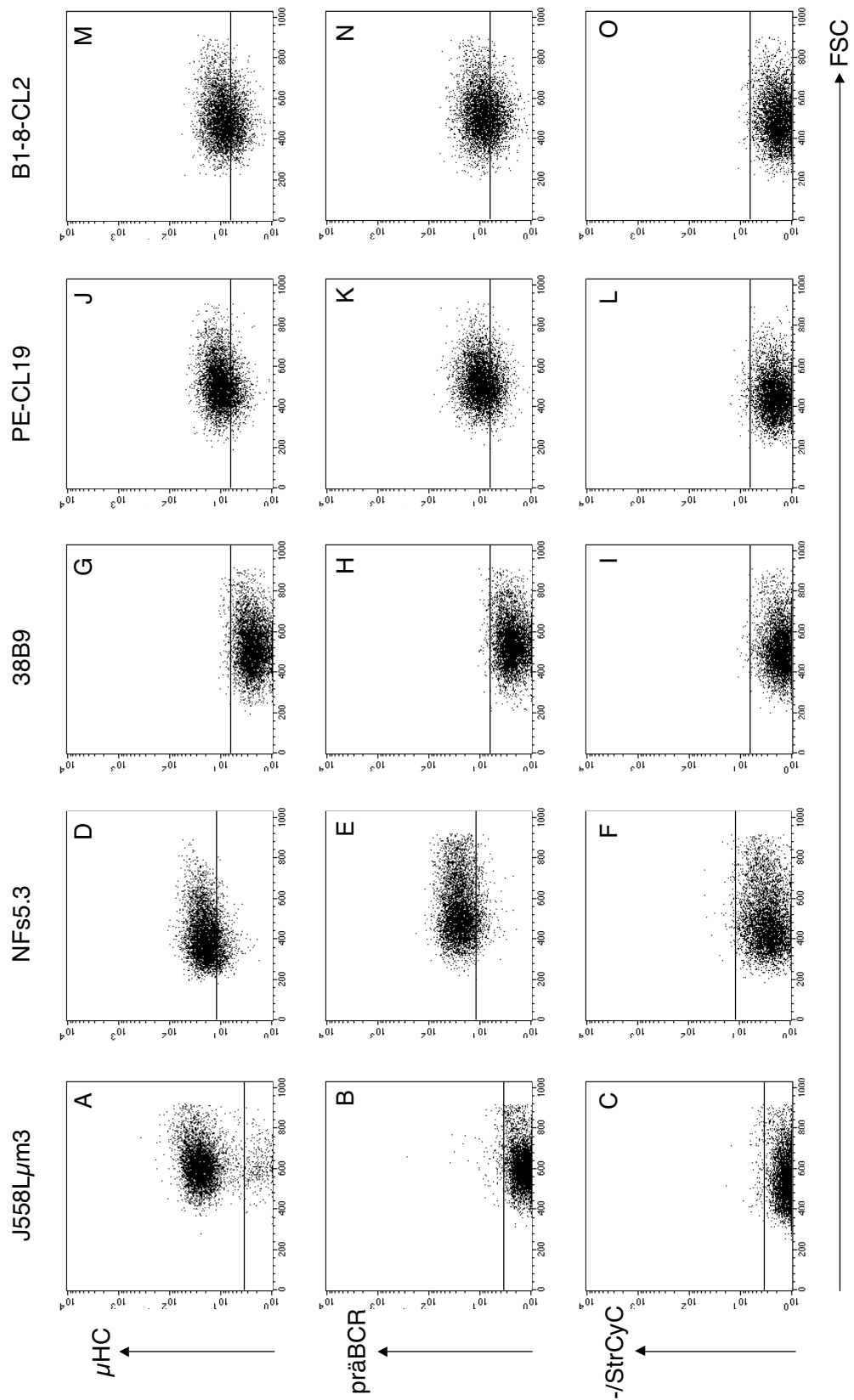
(A, D, G, J, M): Analyse der μ HC-Oberflächenexpression durch Färbung mit anti- μ HC Antikörpern (M41).

(B, E, H, K, N): Analyse der präBCR-Oberflächenexpression durch Färbung mit anti-präBCR Antikörpern (SL156).

(C, F, I, L, O): Analyse der Hintergrund-Fluoreszenz der verschiedenen Zelllinien nach Inkubation mit dem sekundären Reagenz Streptavidin-CyC, welches zur Entwicklung der anti- μ HC und anti-präBCR Antikörper verwendet wurde.

Es ist zu beachten, daß die J558L μ m3 Myelomzelllinie und die NFs5.3 prä-B-Zelllinie eine andere Hintergrundfluoreszenz als die 38B9 pro-B-Zelllinie sowie die davon abgeleiteten Klone PE-CL19 und B1-8-CL2 aufweisen.

Tote Zellen wurden durch Propidiumiodid von der Analyse ausgeschlossen.



Die Zellen der hier und von ten Boekel et al. (1997, 1998) verwendeten Abelson murine leukemia (A-MuLV)-transformierten pro-B-Zelllinie 38B9 (Alt et al., 1981) prägen weder eine μ HC oder ein $D\mu$ -Protein, noch IgL-Ketten aus (Alt et al., 1981, 1984; Karasuyama et al., 1993). Jedoch exprimiert die 38B9 pro-B-Zelllinie die SLC-Proteine $\lambda 5$ und VpreB im Komplex mit verschiedenen Glycoproteinen auf der Zelloberfläche (Karasuyama et al., 1993; Ohnishi et al., 2000).

Wie die Färbung mit dem μ HC-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) M41 (der mAk M41 bindet μ HC's sowohl mit, als auch ohne IgL-Ketten; Leptin et al., 1984) zeigt, prägen die Klone PE-CL19 und B1-8-CL2 eine μ HC auf der Zelloberfläche aus, während die 38B9 pro-B-Zelllinie $s\mu$ HC⁻ ist (Abb. 8). Die zum Vergleich analysierte, transformierte prä-B-Zelllinie NFs5.3 (Hardy et al., 1986), die einen präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche ausprägt (Karasuyama et al., 1993; Winkler et al., 1995), ist wie erwartet $s\mu$ HC⁺ (Abb. 8), ebenso wie die Myelomzelllinie J558L μ m3, die einen membrangebundenen IgM Antikörper mit $\lambda 1$ IgL-Ketten exprimiert (Abb. 8; Reth et al., 1987).

Die Färbung mit dem mAk SL156, der ausschließlich ein von μ HC und den SLC-Proteinen $\lambda 5$ und VpreB gebildetes Epitop, nicht aber freie $\lambda 5$ - und/oder freie VpreB-Proteine, oder IgL-Ketten erkennt (Winkler et al., 1995), zeigt weiterhin, daß die Klone PE-CL19 und B1-8-CL2 die μ HC in einem präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche exprimieren wie auch die zur Kontrolle analysierte prä-B-Zelllinie NFs5.3 (Abb. 8). Im Gegensatz dazu sind die pro-B-Zelllinie 38B9 und die Myelomzelllinie J558L μ m3 wie erwartet präBCR⁻ (Abb. 8).

Dabei prägen wahrscheinlich weder die prä-B-Zelllinie NFs5.3 und die pro-B-Zelllinie 38B9 (Abb. 9; Hardy et al., 1986; Karasuyama et al., 1993; Winkler et al., 1995), noch die Klone PE-CL19 und B1-8-CL2 Ig κ - oder Ig λ -leichte Ketten aus (Abb. 9). Ca. 91% der zur Kontrolle analysierten B-Zellen der Milz zweier C57BL/6-Mäuse sind slg κ ⁺ und ca. 9% dieser Zellen sind slg λ ⁺, was den erwarteten Verhältnissen entspricht (Takemori & Rajewsky, 1981; ten Boekel et al., 1995; Yamagami et al., 1999a, 1999b; Abb. 9). Das hier zur Detektion von Ig λ -Ketten verwendete Ziege anti-Maus Ig λ Serum sollte bis auf Ig λ X- alle Ig λ -Ketten erkennen, während der verwendete Ig κ -Ketten-spezifische mAk R33-18-10.1 alle Ig κ -Ketten bindet (Grützmann, 1981).

Die auf der Oberfläche präBCR⁺, aber slgL⁻ Klone PE-CL19 und B1-8-CL2 zeigen, daß die vom retroviralen μ HC-Expressionsvektor pELCV-PE bzw. pELCV-B1-8 kodierte μ HC's und damit wahrscheinlich auch die in der Keimbahn von VPE/JHT-, VPEinv/JHT, ED-cre- und B1-8i-Mäusen kodierte μ HC's mit der SLC in einem präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche exprimiert werden können.

(→) Abb. 9. Durchflußzytometrische Analyse der IgL-Oberflächenexpression der präBCR-ausprägenden Zelllinien PE-CL19 und B1-8-CL2

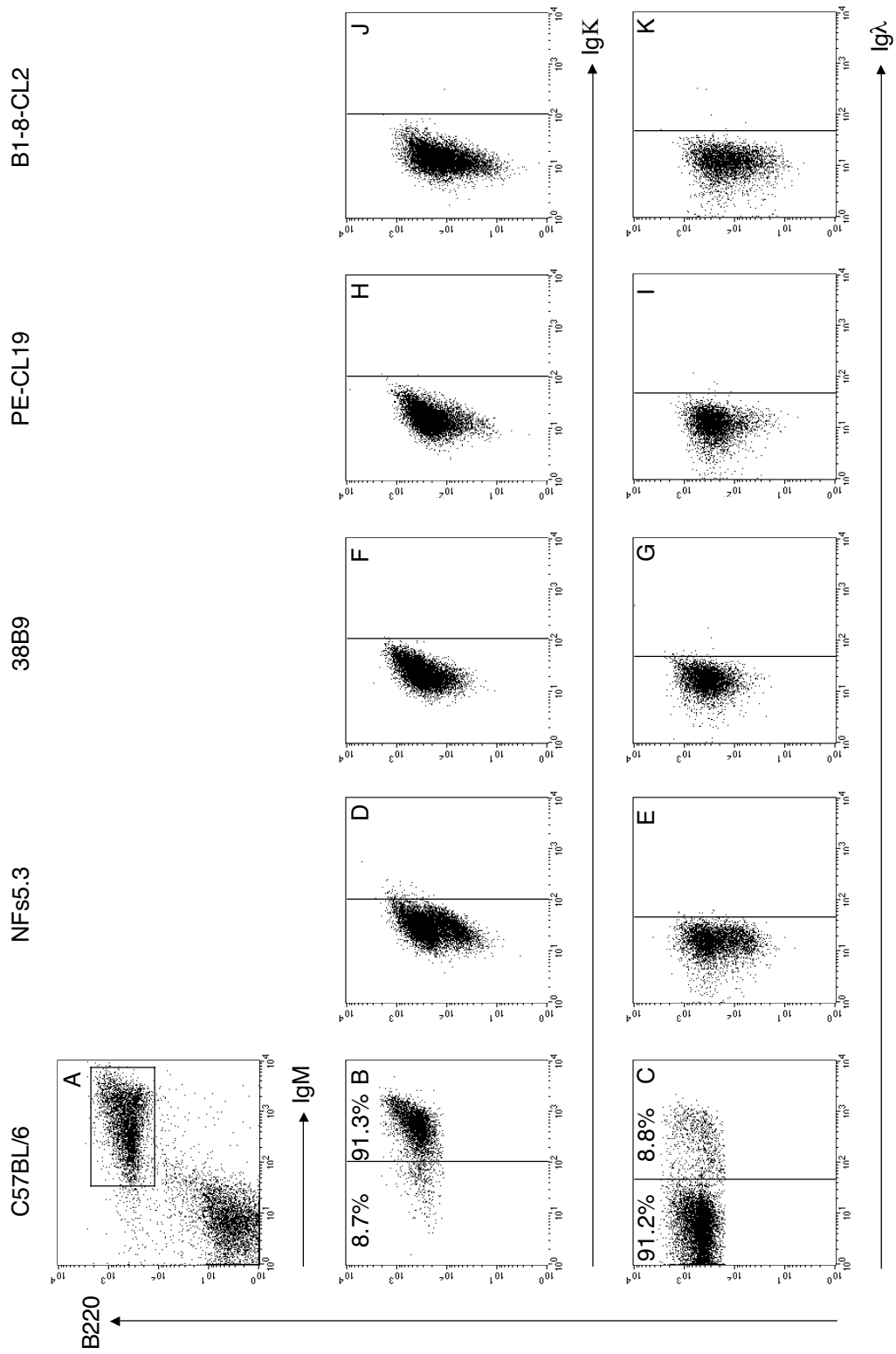
(A-C) repräsentieren Daten der zum Vergleich analysierten vereinten Milzzellen zweier C57BL/6-Mäusen (jeweils 8 Wochen alt).

(A): Darstellung der B220⁺/slgM⁺ B-Zellen der Milz durch Färbung mit anti-B220/CD45R und anti-IgM Antikörpern.

(B): Darstellung der slg κ ⁺ und slg κ ⁻ Zellen innerhalb der B220⁺/slgM⁺ B-Zellpopulation durch Färbung mit anti-Ig κ Antikörpern (R33-18-10).

(C): Darstellung der slg λ ⁺ und slg λ ⁻ Zellen innerhalb der B220⁺/slgM⁺ B-Zellpopulation durch Färbung mit Ziege anti-Maus Ig λ Serum.

Lebende Zellen der NFs5.3 prä-B-Zelllinie (D-E), der 38B9 pro-B-Zelllinie (F-G), des Klons PE-CL19 (H-I) und des Klons B1-8-CL2 (J-K) wurden mit Ausnahme der slgM-Expression analog zu A-C analysiert.



Zur Bestätigung dieser Ergebnisse auf biochemischer Ebene wurden nach radioaktiver Markierung von zellulären Proteinen mit L-[³⁵S]-Methionin und L-[³⁵S]-Cystein Immunpräzipitationen der markierten Zellysate mit dem μ HC-spezifischen mAk M41 und dem λ 5-spezifischen mAk LM34 (Karasuyama et al., 1993; Winkler et al., 1995) durchgeführt.

Wie in Abb. 10 gezeigt, führt die Immunpräzipitation von μ HC-Proteinen (86 kDa) mit dem mAk M41 (Spur 1-5) zur Kopräzipitation von Proteinen mit dem Molekulargewicht (MW) von 22 und 16 kDa sowohl im Zellysate von NFs5.3 prä-B-Zellen (Spur 1), als auch im Zellysate von PE-CL19 Zellen (Spur 3). Diese Proteine sind vermutlich die SLC-Proteine λ 5 (22 kDa) und VpreB (16 kDa), die nicht-kovalent miteinander assoziiert sind, und kovalent durch eine Disulfid-Brücke zwischen λ 5 und der C_H1-Domäne der μ HC im präBCR-Komplex vorliegen (Karasuyama et al., 1990, 1993; s. 1.3). Die anti- μ HC Immunpräzipitation von 38B9 pro-B-Zellysaten mit dem mAk M41 zeigt wie erwartet weder μ HC, noch die SLC-Proteine λ 5 und VpreB (Abb. 10, Spur 2), während von J558L μ m3-Zellysaten erwartungsgemäß die μ HC und λ 1 IgL-Ketten (28 kDa), nicht jedoch λ 5 und VpreB kopräzipitiert werden (Abb. 10, Spur 5). Die Immunpräzipitationen mit dem λ 5-spezifischen mAk LM34 (Abb. 10, Spur 6-10) bestätigen weiterhin die Identität der 22 kDa-Bande als λ 5 Protein und der 16 kDa-Bande als VpreB Protein, da beide Proteine wie erwartet nun auch ohne μ HC von 38B9 pro-B-Zellysaten kopräzipitiert werden (Spur 7).

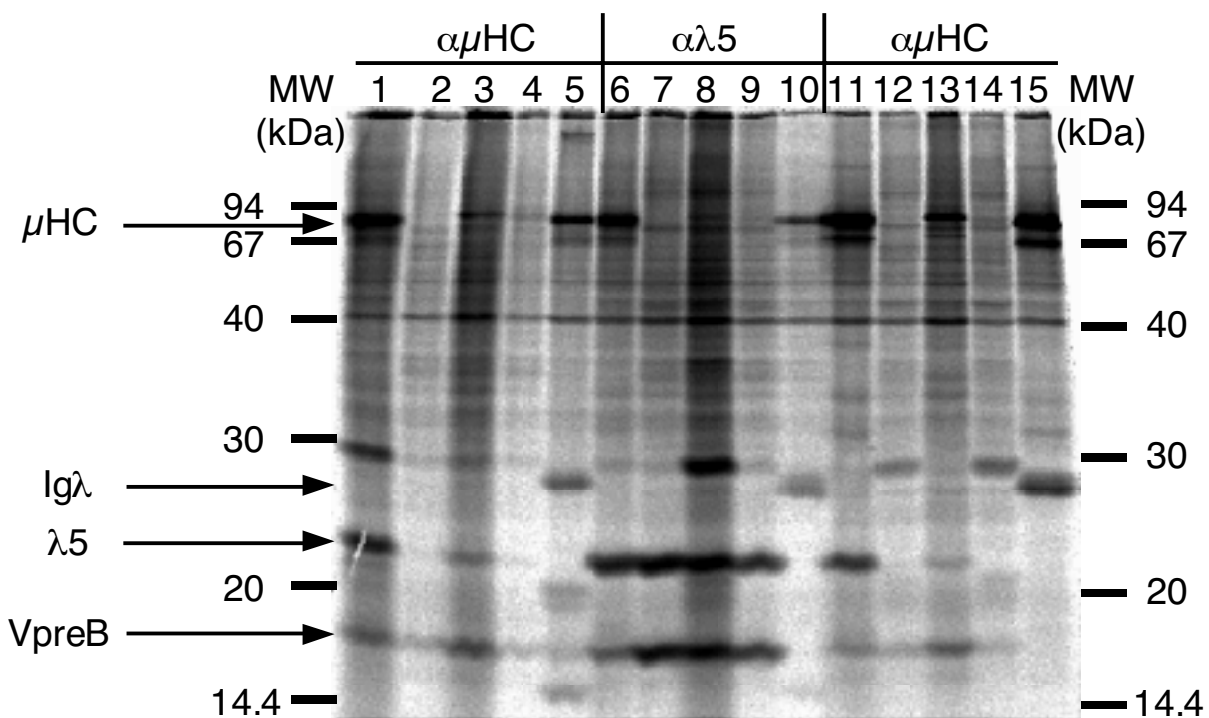


Abb. 10: Immunpräzipitationen der mit μ HC- und λ 5-Proteinen assoziierten Moleküle aus mit L-[³⁵S]-Methionin und L-[³⁵S]-Cystein markierten Zellysaten.

Immunpräzipitationen aus Zellysaten von NFs5.3 prä-B-Zellen (Spur 1, 6, 11), 38B9 pro-B-Zellen (Spur 2, 7, 12), PE-CL19 Zellen (Spur 3, 8, 13), B1-8-CL2 Zellen (Spur 4, 9, 14) und J558L μ m3 Zellen (Spur 5, 10, 15) mit dem μ HC-spezifischen mAk M41 (Spur 1-5) und dem λ 5-spezifischen mAk LM34 (Spur 6-10). Von den Überständen der Immunpräzipitationen mit dem λ 5-spezifischen mAk LM34 (Spur 6-10) wurde eine anschließende Immunpräzipitation mit dem μ HC-spezifischen mAk M41 durchgeführt (Spur 11-15).

Die anti- λ 5 Präzipitation führt in NFs5.3 prä-B- und PE-CL19-Zellysaten zur Kopräzipitation von VpreB, λ 5 und μ HC (Spur 6 und 8), wobei jedoch von PE-CL19-Zellysaten wesentlich weniger μ HC-Protein kopräzipitiert wird (Spur 8) als von NFs5.3 prä-B-Zellysaten (Spur 6). Dies läßt vermuten, daß in PE-CL19 Zellen nicht alle λ 5- und VpreB-Proteine im Komplex mit der von pELCV-PE kodierten μ HC vorliegen. Die mit dem Überstand der anti- λ 5 Präzipitation durchgeführte zweite anti- μ HC Präzipitation (Abb. 10, Spur 11-15) läßt weiterhin vermuten, daß in PE-CL19 Zellen auch nicht alle μ HC-Proteine im präBCR-Komplex vorliegen, da die μ HC-Bande stärker ist als die Banden der kopräzipitierten Proteine λ 5 und VpreB (Spur 13). Im Gegensatz dazu zeigt die entsprechende Präzipitation vom Überstand des NFs5.3 prä-B-Zellysats eine ähnliche quantitative Verteilung von μ HC und den SLC-Proteinen wie durch vorherige anti- λ 5 Immunpräzipitation (vergleiche Spur 11 und 6).

Ob diese Daten eine qualitativ schlechtere Assoziation der von pELCV-PE kodierten μ HC mit der SLC widerspiegelt, ist unklar, da die zum Vergleich durchgeführten Präzipitationen von B1-8-CL2-Zellysaten (Abb. 10, Spur 4, 9 und 14) keinen Vergleich zulassen⁴, und möglicherweise in beiden Klonen mehr SLC-Proteine synthetisiert werden als μ HC-Proteine vom jeweiligen retroviralen μ HC-Expressionsvektor.

Die Identität eines Proteins oder von Proteinen mit dem MW von ca. 29-30 kDa ist unklar, die mit unterschiedlicher Intensität in den Spuren 1-4, 6-9, 12 und 14 detektierbar sind, und die aufgrund ihres MW IgL-Ketten entsprechen könnten (Abb. 10). Wären dies konventionelle IgL-Ketten, die mit der jeweiligen μ HC in einem IgM-Antikörper auf der Zelloberfläche von NFs5.3 prä-B-Zellen und PE-CL19 Zellen ausgeprägt werden könnten, so daß sie in der anti- μ HC Präzipitation kopräzipitiert würden (Spur 1 und 3), so sollten sie auch nach vorheriger anti- λ 5 Präzipitation durch anti- μ HC Präzipitation in Spur 11 und 13 erneut kopräzipitiert werden. Da dies jedoch nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, daß NFs5.3 prä-B-Zellen und PE-CL19 Zellen nicht IgL-Ketten in einem IgM-Antikörper ausprägen, sondern diese Zelllinien einen präBCR-Komplex exprimieren.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der Immunpräzipitationen die durch Fluoreszenzfärbung mit dem präBCR-spezifischen mAk SL156 gewonnenen Ergebnisse, daß sowohl die vom pELCV-PE, als auch die vom pELCV-B1-8 Expressionsvektor kodierte μ HC und damit wahrscheinlich auch die in der Keimbahn von VPE/JHT-, VPEinv/JHT, ED-cre- und B1-8i-Mäusen kodierten μ HC's mit der SLC in einem präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche exprimiert werden können, was in Einklang mit der beobachteten relativ normalen B-Zellentwicklung in VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen steht (s. 3.1).

⁴ Aus ungeklärten Gründen wurden die in B1-8-CL2 Zellen ausgeprägten μ HC-Proteine (Abb. 8) entweder nicht radioaktiv markiert, oder in den Immunpräzipitationen nicht detektiert.

3.3 Das ED-cre System erlaubt die induzierbare μ HC-Expression in IL-7-abhängigen pro-B-Zelllinien von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen

Um die geeigneten Bedingungen für eine möglichst effiziente Induzierbarkeit der μ HC-Expression in vitro in pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen zu ermitteln, wurden aus der fötalen Leber von VPEinv/JHT- oder VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen IL-7-abhängige pro-B-Zelllinien etabliert (s. 2.13).

Die etablierten pro-B-Zelllinien zeigen das für pro-B-Zellen charakteristische Oberflächenmarker-Profil, sie sind B220⁺/CD19⁺/CD43⁺/CD25⁻/sIgM⁻ (Abb. 11).

Schwenk et al. (1998) ermittelten für eine Fibroblasten-Zelllinie, welche auch das in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen exprimierte Cre-EBD(G521R) Fusionsprotein ausprägte, eine Cre-vermittelte Deletionseffizienz eines von loxP Sequenzen flankierten Gens von 75-80% bei einer Ligandenkonzentration von 1 μ M 4-OH-Tamoxifen. Wie in Abb. 11 und Abb. 12 gezeigt, exprimieren ca. 33% der Zellen einer VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie intrazellulär μ HC-Proteine nach einer 24-stündigen Kultur in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen und IL-7-Medium mit 1 μ M 4-OH-Tamoxifen, während wie erwartet keine Zellen einer VPEinv/JHT pro-B-Kontrollzelllinie ohne ED-cre Transgen unter gleichen Bedingungen $c\mu$ HC⁺ waren (Abb. 12). Eine höhere Konzentration des synthetischen Liganden 4-OH-Tamoxifen als 1 μ M führte nicht zu einer gesteigerten Cre-vermittelten Rekombination gemessen anhand des prozentualen Anteils der $c\mu$ HC⁺-Zellen (Abb. 12). Nach 24-stündiger Kultivierung der IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen mit 1 μ M 4-OH-Tamoxifen in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen wird mit 33-37% $c\mu$ HC⁺-Zellen die höchste Effizienz der 4-OH-Tamoxifen-induzierten Rekombination erreicht, während eine 48-stündige Inkubation unter gleichen Bedingungen keine Effizienzsteigerung erzielte (Abb. 12).

(➔) Abb. 11. Durchflußzytometrische Analyse von Zellen des Knochenmarks einer BALB/c-Maus und einer IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie.

(A,B und D) repräsentieren Daten einer BALB/c-Maus. (C) repräsentiert Daten einer zweiten BALB/c-Maus.

(A): Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) der Knochenmarkszellen. Das kleine Fenster zeigt die Lymphozytenpopulation, die dann weiter analysiert wurde (B und D).

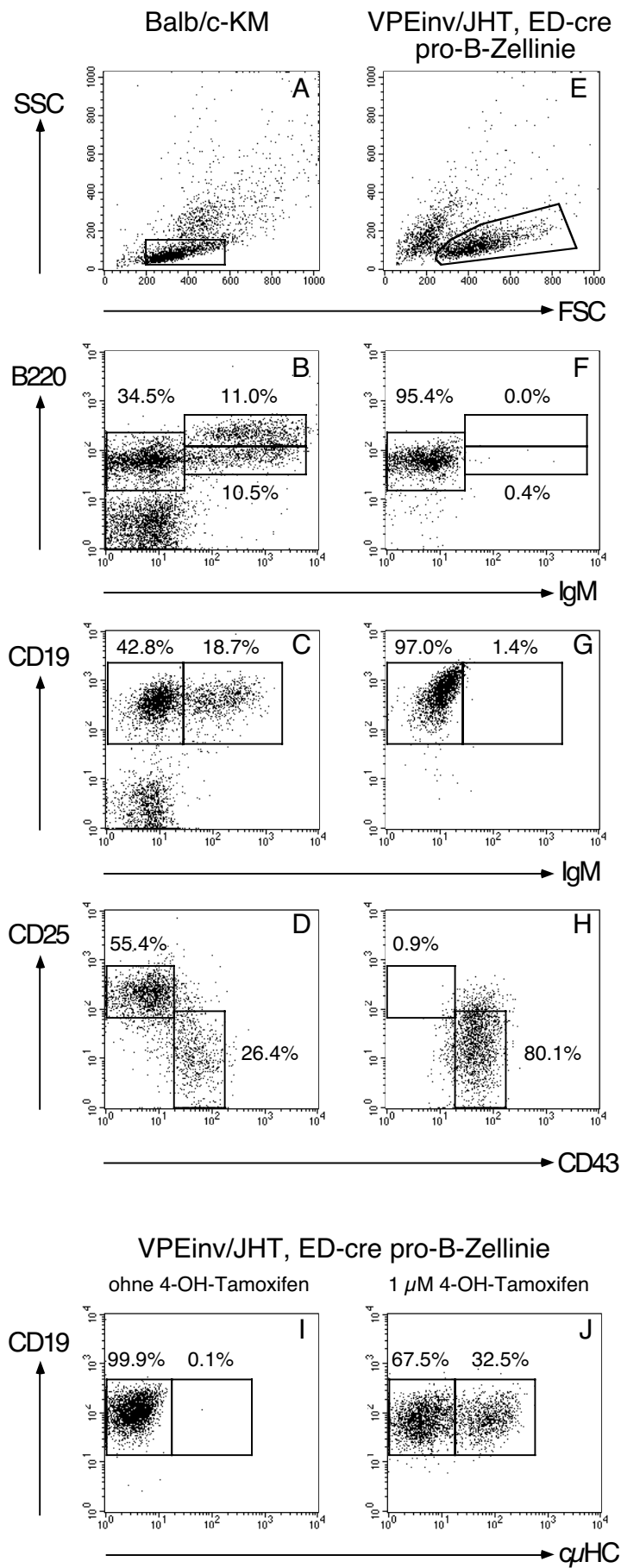
(B): Darstellung der Fraktionen A-D, E und F durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM-Antikörpern. Die Prozentsätze zeigen den Anteil der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer (Fraktion A-D), der B220^{dull}/IgM⁺ unreifen B-Zellen (Fraktion E) und der B220^{bright}/IgM⁺ reifen B-Zellen (Fraktion F) an der Lymphozytenpopulation (wie in A gezeigt).

(C): Darstellung der B-Zellvorläufer und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD19 und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentsätze zeigen den Anteil der CD19⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer und der CD19⁺/IgM⁺ B-Zellen an der Lymphozytenpopulation (analog zu dem in A gezeigten).

(D): Auftrennung der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer in pro-B- und prä-B-Zellen durch Färbung mit anti-CD25 und anti-CD43/S7 Antikörpern. Die Prozentsätze zeigen den Anteil der pro-B- und prä-B-Zellen an der B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation (wie in B gezeigt).

Die Analyse einer VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie (E-H) erfolgte in Analogie zur Analyse der Knochenmarkszellen der BALB/c-Mäuse (A-D).

(I-J): Analyse der intrazellulären μ HC-Expression ($c\mu$ HC) in Zellen einer VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie nach 24-stündiger Kultur in Gegenwart von ST-2 Stromazellen in IL-7-Medium mit 1 μ M 4-OH-Tamoxifen (J) oder ohne 4-OH-Tamoxifen (I).



Zellen der VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie, die ohne 4-OH-Tamoxifen kultiviert wurden, zeigten mit ca. 0,1% $c\mu\text{HC}^+$ -Zellen eine sehr geringe Hintergrund-Rekombination des ED-cre-Systems (Abb. 11 und Abb. 12).

Das theoretisch erreichbare Maximum der μHC de novo Synthese in VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen entspricht 50%, da aufgrund der das VDJ-PE Segment flankierenden, entgegengesetzt orientierten loxP Sequenzen eine Cre-vermittelte Rekombination in einem Gleichgewicht beider Orientierungen des VDJ-PE Segments resultieren sollte. Der hier erreichte höchste prozentuale Anteil von 33-37% $c\mu\text{HC}^+$ -Zellen nach 4-OH-Tamoxifen-Induktion sollte daher aus einer Cre-vermittelten Rekombination in 66-74% aller pro-B-Zellen resultieren und ist damit der von Schwenk et al. (1998) beobachteten 75-80%-igen Deletionseffizienz eines loxP flankierten Gens durch das exprimierte Cre-EBD(G521R) Fusionsprotein ähnlich.

Es ist allerdings unklar, warum nicht in allen Zellen der von Schwenk et al. (1998) verwendeten ED-cre-exprimierenden Fibroblasten-Zelllinie und der hier verwendeten IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinien eine Cre-vermittelte Rekombination durch 4-OH-Tamoxifen-Induktion erzielt werden konnte.

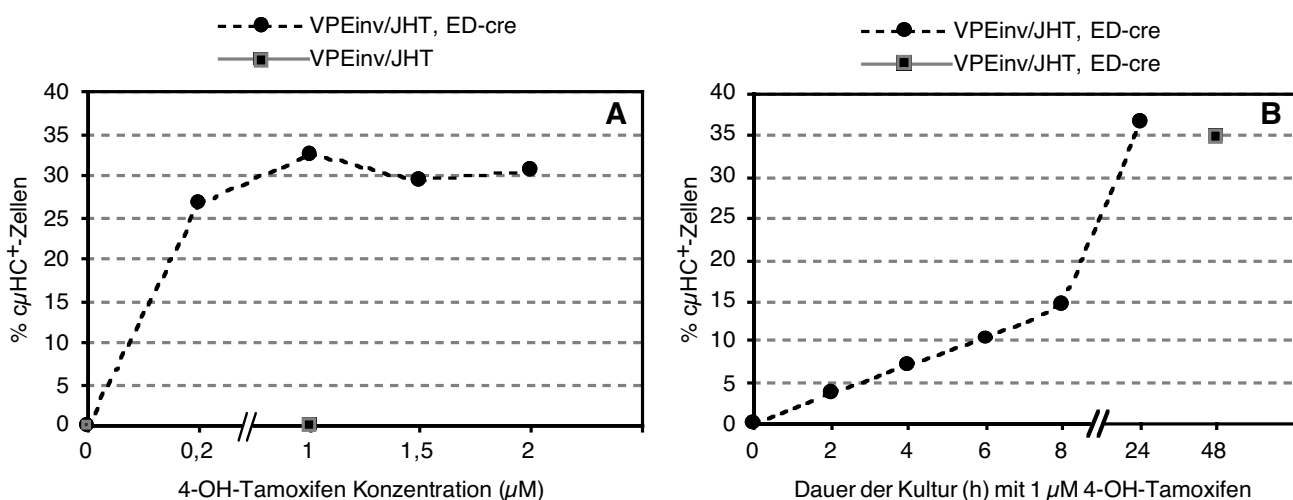


Abb. 12: 4-OH-Tamoxifen induzierte intrazelluläre μHC -Expression in VPEinv/JHT, ED-cre- oder VPEinv/JHT-pro-B-Zelllinien.

(A): Zellen einer VPEinv/JHT, ED-cre- oder VPEinv/JHT-pro-B-Zelllinie wurden für 24 h in IL-7-Medium alleine oder in Medium mit den angegebenen 4-OH-Tamoxifen-Konzentrationen kultiviert und die intrazelluläre μHC -Expression ($c\mu\text{HC}$) bestimmt wie in Abb. 11 gezeigt.

(B): Zellen einer VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie wurden für die angegebene Dauer in IL-7-Medium mit 1 μM 4-OH-Tamoxifen kultiviert, anschließend 3x in IL-7-Medium gewaschen und für weitere 24 h in IL-7-Medium ohne 4-OH-Tamoxifen kultiviert. Parallel dazu wurden Zellen einer VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie für 48h in IL-7-Medium mit 1 μM 4-OH-Tamoxifen kultiviert und anschließend die $c\mu\text{HC}$ -Expression analysiert wie in Abb. 11 gezeigt.

3.4 Zwar differenzieren pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen in Folge der präBCR-Expression in vitro zu prä-B-Zellen und proliferieren unabhängig von Stromazellen oder zugesetzten Zytokinen, doch scheint die präBCR-vermittelte Differenzierung von B-Zellvorläufern abhängig vom Kontext des Knochenmarks zu sein

Wie die Analyse von μ MT- und λ 5T-Mäusen im Vergleich zu Wt-Mäusen zeigte, können B-Zellvorläufer nur nach Ausprägung eines membrangebundenen präBCR zu prä-B-Zellen differenzieren und eine Phase der proliferativen Expansion durchlaufen (Kitamura et al., 1991, 1992; Ehlich et al., 1993; Karasuyama et al., 1994). Dabei ist unklar, ob die präBCR-Expression per se die Differenzierung und die proliferative Expansion der prä-B-Zellen vermittelt, oder diese von im Knochenmark exprimierten Zytokinen wie zum Beispiel IL-7 und/oder anderen Faktoren abhängt. Darüber hinaus muß der präBCR zur Initiierung von präBCR-vermittelten Signalen möglicherweise einen Liganden auf Stromazellen oder anderen Zellen des Knochenmarks binden (Melchers et al., 1993; Ye et al., 1996; s. 1.4 und 1.5).

Um zu untersuchen, in wieweit der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion von prä-B-Zellen unabhängig vom Kontext des Knochenmarks sowie unabhängig von zugesetzten Zytokinen vermittelt, wurden pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen isoliert (Abb. 13) und in Zellkulturmedium ohne IL-7 in An- oder Abwesenheit von ST-2 Stromazellen für 4 Tage kultiviert.

Parallel dazu wurden pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen isoliert und die μ HC-Expression in vitro durch Zugabe des synthetischen Liganden 4-OH-Tamoxifen des Cre-EBD(G521R) Fusionsproteins bei verschiedenen Kulturbedingungen induziert (Abb. 13). Somit sollte sichergestellt werden, daß pro-B-Zellen den präBCR erst in vitro, also außerhalb des Kontext des Knochenmarks, nach Cre-vermittelter Rekombination exprimieren.

Abb. 13 zeigt, daß nach Anreicherung von CD19⁺-Zellen des Knochenmarks von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen mittels MACS mit ca. 1% B220⁺/sIgM⁺ B-Zellen⁵ und praktisch keinen detektierbaren B220⁺/CD43⁻/CD25⁺/sIgM⁻ prä-B-Zellen die B-Zellentwicklung dieser Mäuse ohne Verabreichung eines synthetischen Liganden des ED-cre Systems (Schwenk et al., 1998) im pro-B-Zellstadium blockiert ist und rekapituliert damit die in 3.1 gezeigten Ergebnisse.

Die Reanalyse der isolierten Zellen zeigte, daß $\geq 95\%$ aller Zellen das B-Zell-spezifische CD45R/B220-Antigen ausprägten, und $\geq 93\%$ aller Zellen B220⁺/CD43⁺/CD25⁻/sIgM⁻ pro-B-Zellen waren (Abb. 13).

Die isolierten pro-B-Zellen wurden ohne Zugabe von IL-7 entweder in Anwesenheit von ST-2 Stromazellen⁶ oder ohne Stromazellen für 24 h in Medium mit 0.2 μ M 4-OH-Tamoxifen kultiviert. Die Analyse der intrazellulären μ HC-Expression nach 24 h zeigte, daß unabhängig von der

⁵ Wahrscheinlich sind tatsächlich weniger als 1% der mittels MACS angereicherten CD19⁺-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen B-Lymphozyten, denn im Fenster der B-Zellen treten einige tote Zellen auf, weil diese nicht vollständig durch Propidiumiodid von der Analyse ausgeschlossen werden konnten.

⁶ Zellen der verwendeten ST-2 Stromazelllinie (Ogawa et al., 1988) sezernieren geringe Mengen IL-7 nach Kontakt mit B-Zellvorläufern (Sudo et al., 1989; Rolink et al., 1991a; Grawunder et al., 1995b).

Gegenwart der Stromazellen 26-32% der lebenden pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen μ HC-Proteine ausprägten (Abb. 13), wobei zu diesem Zeitpunkt jedoch nur noch 30-35% der ausplattierten pro-B-Zellen lebend aus Kulturen ohne Stromazellen und 55-65% der ausplattierten pro-B-Zellen lebend aus Kulturen mit Stromazellen isoliert werden konnten. Ca. 74% aller B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläufer aus dem zur Kontrolle analysierten Knochenmark einer Wt-Maus waren $c\mu$ HC⁺ (Abb. 13), was früher ermittelten Werten entspricht (Rolink et al., 1994; Schaal, 1996). 0.3-1.4% der pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen, die nicht mit 4-OH-Tamoxifen kultiviert worden waren, prägten intrazellulär μ HC-Proteine aus (Abb. 13), was dem Hintergrund der verwendeten Analyseverfahren entspricht (vergleiche mit 3.1). Daher ist die Hintergrund-Rekombination des ED-cre Systems wie in 3.1 und 3.3 besprochen auch unter diesen Umständen sehr gering.

Nach 24 h wurde das 4-OH-Tamoxifen-haltige Kulturmedium durch Waschen der Zellen entfernt und diese anschließend für weitere 3 Tage ohne 4-OH-Tamoxifen und ohne Zugabe von IL-7 kultiviert (s. 2.14). Durch dieses Vorgehen sollte sichergestellt werden, daß die ED-cre vermittelte Rekombination nach einer gewissen Zeit endet und somit das VDJ-PE Segment in einer der beiden Orientierungen im IgH-Allel fixiert wird (s. dazu 3.1, Abb. 4).

In 3 unabhängigen Experimenten waren die aus Wt-Mäusen isolierten pro-B-Zellen nach insgesamt 4-tägiger Kultur ohne ST-2 Stromazellen und ohne Zugabe von IL-7 zu 37-45% B220⁺/CD43⁻/CD25⁺/sIgM⁻ prä-B-Zellen und 55-63% B220⁺/sIgM⁺ B-Zellen differenziert (Abb. 14). Pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen differenzierten in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen zu 43-64% prä-B-Zellen und 36-57% B-Zellen (Abb. 14; 3 unabhängige Experimente).

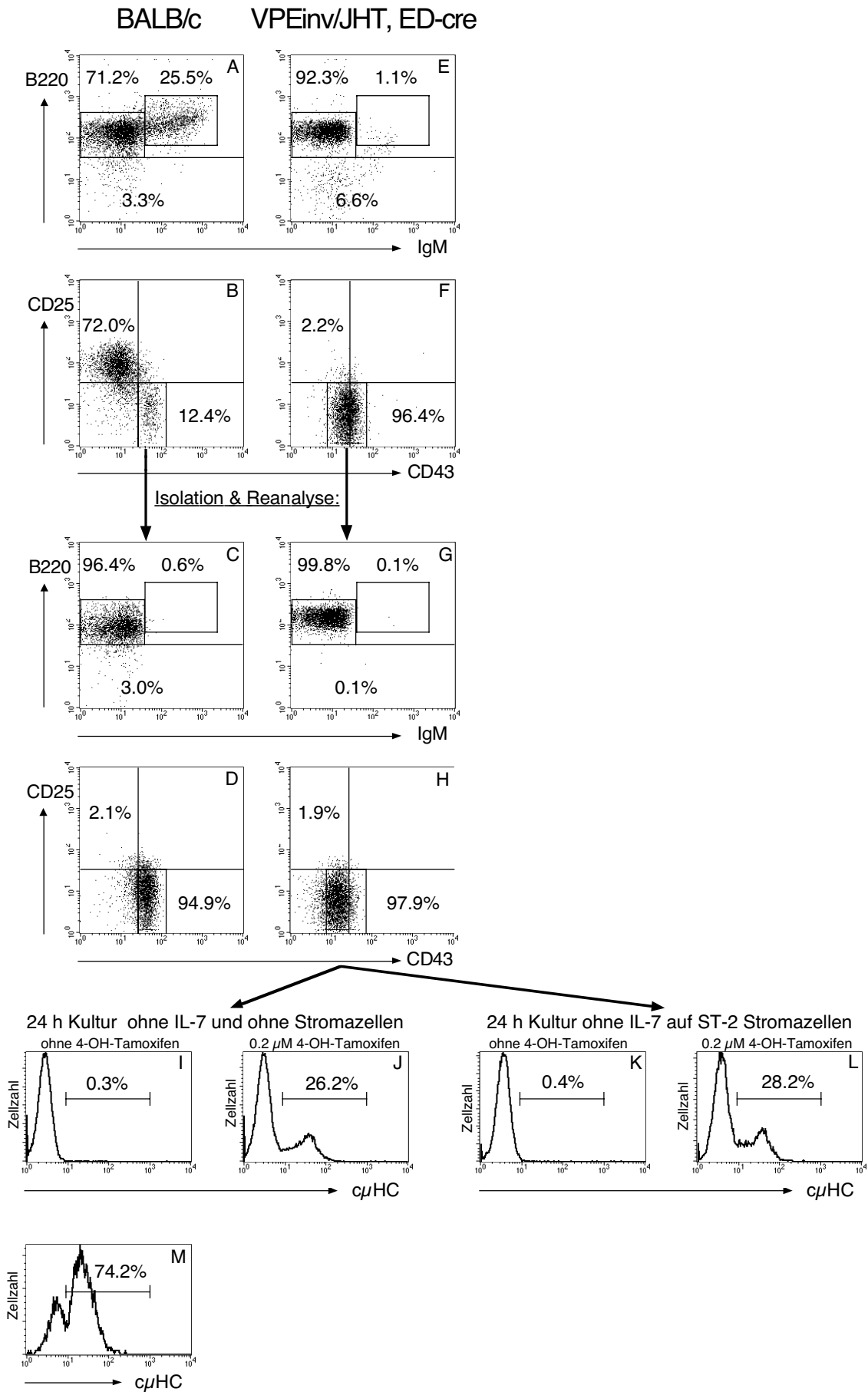
(➔) Abb. 13. Isolation von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen.

Die Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks aus Femur und Tibia von 3-5 BALB/c- oder VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen (im Alter von 4-7 Wochen) wurden vereint und CD19⁺ Zellen durch MACS wie unter 2.4.2 beschrieben isoliert. (A-B) repräsentieren Daten der lebenden Zellen nach Anreicherung von CD19⁺ Zellen des Knochenmarks von BALB/c-Mäusen.

(A): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Lymphozytenpopulation. (B): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in A gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation wie in (A) gezeigt. Pro-B-Zellen im gezeigten Fenster wurden durch FACS wie unter 2.4 beschrieben isoliert. (C-D) repräsentieren Daten der Reanalyse lebender Zellen nach Isolation von pro-B-Zellen wie in (A-B) gezeigt. (C): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Population der lebenden Zellen. (D): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation wie in (C) gezeigt.

Die Isolation von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen (E-F) und die Reanalyse der isolierten Zellen (G-H) erfolgte in Analogie zur Isolation und Reanalyse von pro-B-Zellen aus BALB/c-Mäusen (A-D).

(I-L): Analyse der intrazellulären μ HC-Expression ($c\mu$ HC) von isolierten pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen (E-H) nach 24-stündiger Kultur ohne Zugabe von IL-7 mit 0.2 μ M 4-OH-Tamoxifen (J, L) oder ohne 4-OH-Tamoxifen (I, K) in Gegenwart von ST-2 Stromazellen (I-J) oder ohne Stromazellen (K-L). (I-L) repräsentieren die Daten von B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläufern nach Färbung mit anti- μ HC Antikörpern. (M) repräsentiert die Daten der zur Kontrolle analysierten B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläufer aus dem Knochenmark einer BALB/c-Maus nach Färbung der intrazellulären μ HC-Expression mit anti- μ HC Antikörpern.



Während ca. 30% der isolierten pro-B-Zellen zu Kulturbeginn intrazellulär μ HC-Proteine ausgeprägt haben (ca. 30% aller pro-B-Zellen im Knochenmark von Wt-Mäusen prägen intrazellulär μ HC-Proteine aus; s. 3.1; Rolink et al., 1994; Schaal, 1996), waren nach 4-tägiger Kultur nicht nur 36-63% der lebenden Zellen slgM^+ , sondern auch 84-92% der entstandenen prä-B-Zellen $c\mu\text{HC}^+$ (Abb. 14), also insgesamt 90-95% aller aus der Kultur isolierten B220^+ Zellen $c\mu\text{HC}^+$. Weiterhin konnten an Tag 4 der Kultur ohne Stromazellen ca. 1.4 mal mehr und aus Kulturen mit ST-2 Stromazellen ca. 1.7 mal mehr lebende B220^+ Zellen isoliert werden als zu Beginn an pro-B-Zellen ausplattiert worden waren (Abb. 15; jeweils 3 unabhängige Experimente). Unter diesen Kulturbedingungen können also nur pro-B-Zellen mit einem produktiven $\text{V}_H\text{D}_H\text{J}_H$ -Rearrangement nach Ausprägung einer μ HC zu prä-B- und B-Zellen differenzieren.

Im Gegensatz zu entsprechend kultivierten Wt-pro-B-Zellen konnten nach 4-tägiger Kultur der pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen ohne Stromazellen keine lebenden Zellen mehr isoliert werden (Abb. 15), unabhängig von der zu Kulturbeginn durch 4-OH-Tamoxifen induzierten μ HC-Expression in 26-32% der lebenden pro-B-Zellen (Abb. 13) bzw. in 8-11% aller ausplattierten pro-B-Zellen.

Weiterhin konnten nach 4-tägiger Kultur von pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in Gegenwart von ST-2 Stromazellen wieder unabhängig von der induzierten μ HC-Expression nur ca. 20% lebende B220^+ Zellen der Ausgangspopulation isoliert werden, ca. 8.5 mal weniger als von unter gleichen Bedingungen kultivierten Wt-pro-B-Zellen (Abb. 15; 3 unabhängige Experimente).

(→) Abb. 14. Durchflußzytometrische Analyse von für 4 Tage kultivierten pro-B-Zellen aus BALB/c- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen.

Pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen wurden für 24 h ohne Zugabe von IL-7, mit oder ohne $0.2 \mu\text{M}$ 4-OH-Tamoxifen (mit + oder - 4-OH-Tamoxifen gekennzeichnet) kultiviert. Nach Entzug des 4-OH-Tamoxifens folgte eine weitere Kultivierung für 3 Tage ohne Zugabe von IL-7.

(A-C) repräsentieren Daten der Lymphozytenpopulation aus dem Knochenmark einer zur Kontrolle analysierten BALB/c-Maus.

(A): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-B220/CD45R und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Population der B220^+ Zellen.

(B): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in A gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern.

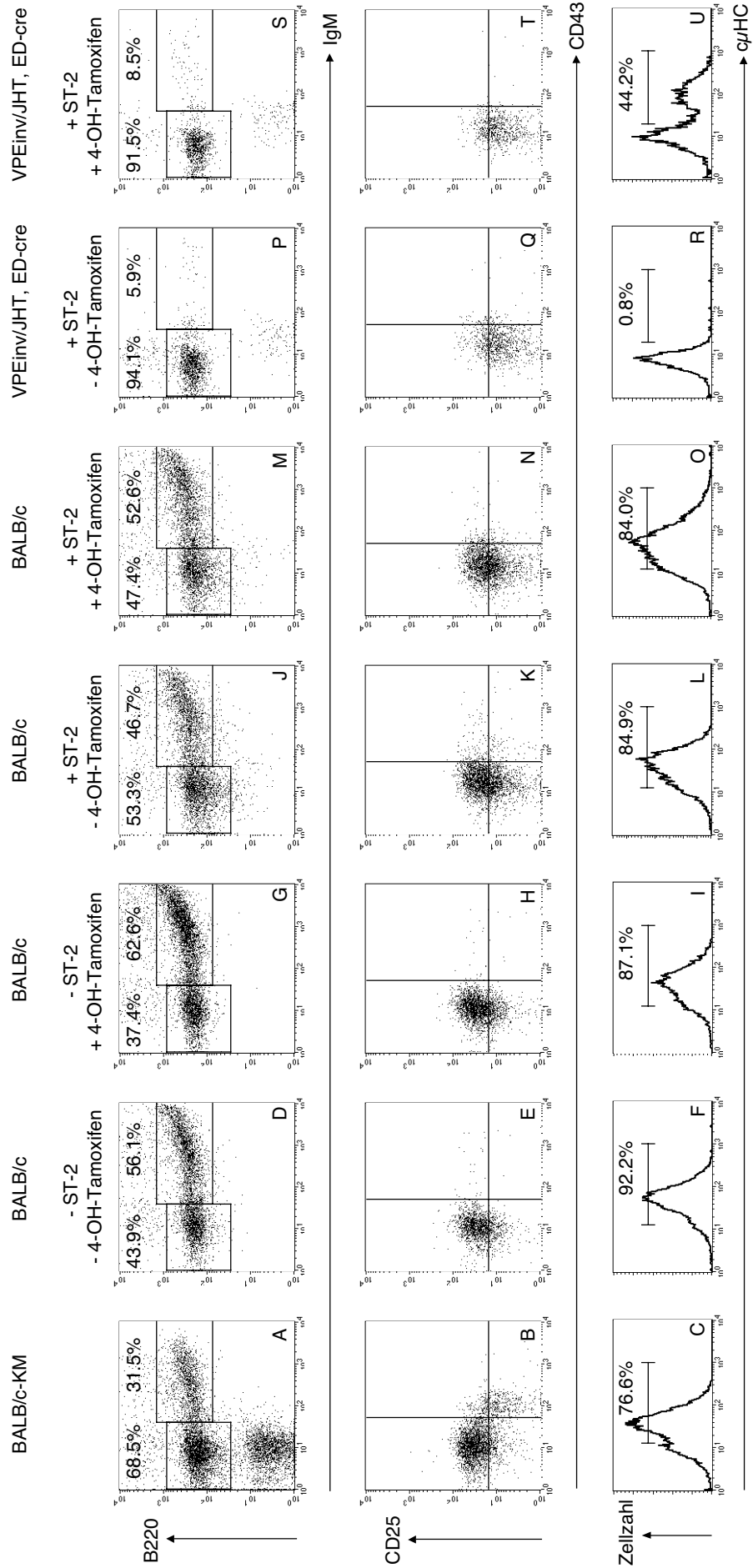
(C): Analyse der intrazellulären μ HC-Expression ($c\mu\text{HC}$) der $\text{B220}^+/\text{slgM}^-$ B-Zellvorläufer durch Färbung mit anti- μ HC Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die $\text{B220}^+/\text{slgM}^-$ B-Zellvorläuferpopulation.

(D-O) repräsentieren Daten von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen, die ohne Zugabe von IL-7 entweder in Abwesenheit von ST-2 Stromazellen (D-I) oder mit ST-2 Stromazellen (J-O) kultiviert wurden.

Es ist zu beachten, daß die isolierten Wt-pro-B-Zellen unabhängig von ST-2 Stromazellen und ohne Zugabe von IL-7 zu prä-B- und B-Zellen differenziert sind.

(P-U) repräsentieren Daten von pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen, die ohne IL-7-Zugabe in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen für 4 Tage kultiviert wurden.

Obwohl nach 24-stündiger Kultur mit $0.2 \mu\text{M}$ 4-OH-Tamoxifen 26-32% der lebenden pro-B-Zellen $c\mu\text{HC}^+$ waren (Abb. 13) und nach 4-tägiger Kultur ca. 44% der pro-B-Zellen intrazellulär μ HC-Proteine ausprägten (U), differenzierten die Zellen nicht zu $\text{B220}^+/\text{slgM}^-/\text{CD43}^-/\text{CD25}^-$ prä-B-Zellen.



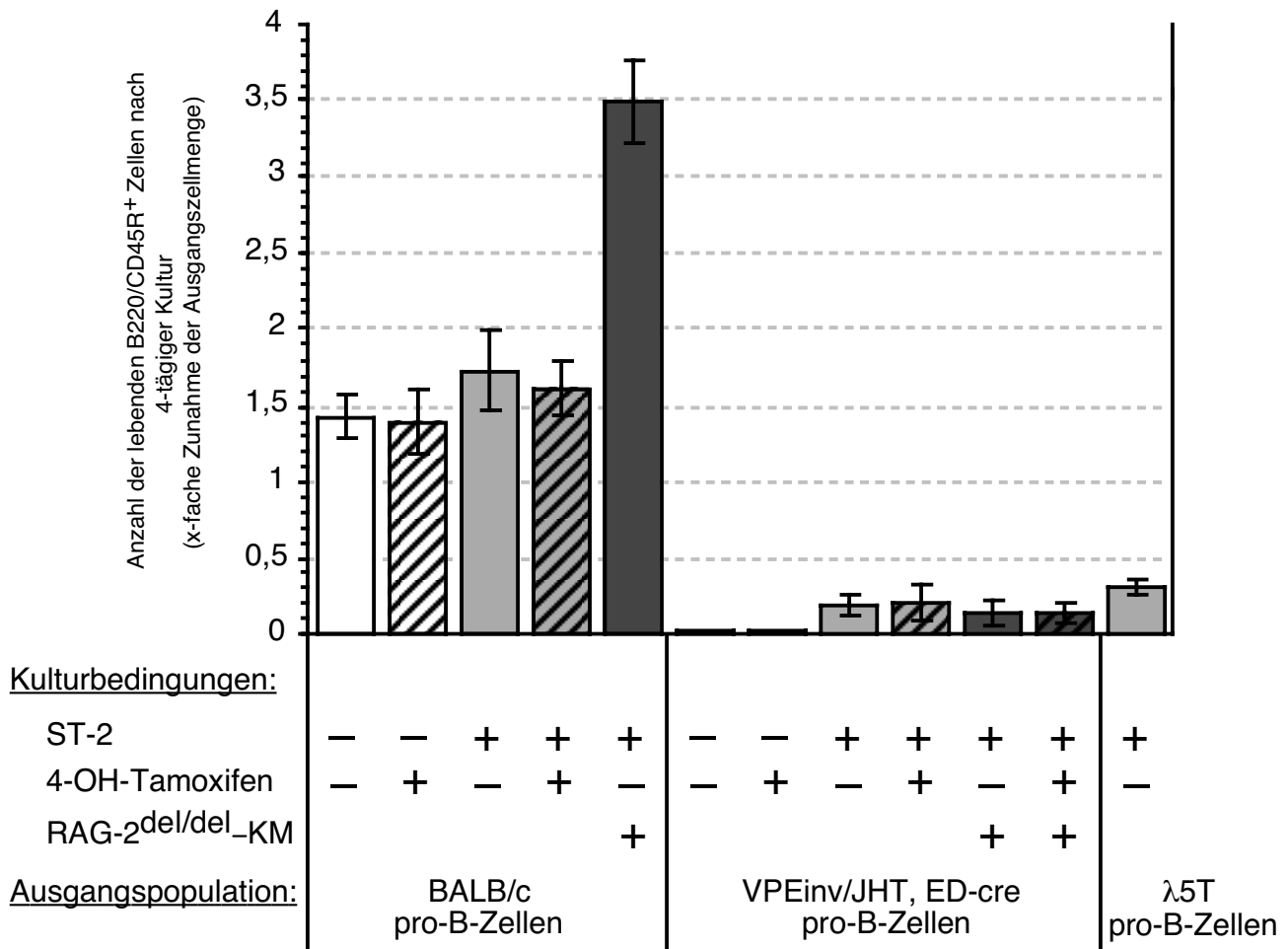


Abb. 15. Anzahl der lebenden B220/CD45R⁺ Zellen nach 4-tägiger Kultur von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-, VPEinv/JHT, ED-cre- und λ5T-Mäusen.

Mittels FACS isolierte pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von jeweils 3-5 BALB/c-, VPEinv/JHT, ED-cre- und λ5T-Mäusen wurden in einer Ausgangskonzentration von ca. 1×10^5 Zellen/ml in Medium ohne IL-7 unter verschiedenen Kulturbedingungen für 4 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen isoliert, die Anzahl lebender Zellen wie unter 2.14 beschrieben bestimmt, und der Anteil der B220/CD45R⁺ Zellen an der Population lebender Zellen durchflußzytometrisch ermittelt. Dargestellt ist die relative Anzahl lebender B220/CD45R⁺ Zellen als x-fache Zunahme der Ausgangszellzahl ausplattierter pro-B-Zellen.

Pro-B-Zellen wurden entweder mit oder ohne ST-2 Stromazellen kultiviert (durch + und - gekennzeichnet). Eine 24-stündige Inkubation in Medium mit oder ohne $0.2 \mu\text{M}$ 4-OH-Tamoxifen zu Beginn einer 4-tägigen Kultur ist durch + oder - indiziert. Weiterhin wird eine Kokultur mit Zellen einer Einzelzellsuspension des Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen (Hao et al., unveröffentlichte Ergebnisse) durch + gekennzeichnet.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit den ermittelten Standardabweichungen.

Das Ergebnis der Kultur von pro-B-Zellen aus λ5T-Mäusen repräsentiert den Mittelwert von 5 Einzelwerten eines einzigen Experiments.

Die Ergebnisse der Kokulturrexperimente mit Zellen einer Einzelzellsuspension des Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 3 Einzelwerten eines einzigen Experiments.

Zwar waren diese B220⁺ Zellen CD43⁻ wie die aus Wt-pro-B-Zellen differenzierten prä-B-Zellen, jedoch im Gegensatz zu prä-B-Zellen überwiegend CD25⁻ (vergleiche Abb. 14N und 14T), also nicht zu prä-B-Zellen differenziert⁷.

Obwohl also nach 24 h 26-32% der mit 4-OH-Tamoxifen behandelten lebenden VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen intrazellulär μ HC-Proteine ausprägten (Abb. 13) und am Tag 4 der Kultur mit ca. 44% der lebenden B220⁺/sIgM⁻ Zellen ein höherer prozentualer Anteil der Zellen intrazellulär μ HC⁺ waren (Abb. 14U), blieb eine Differenzierung zu prä-B-Zellen im Gegensatz zu den kultivierten pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen aus. In Übereinstimmung damit entwickelte sich aus den kultivierten pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen nach Induktion der μ HC-Expression nur ein geringer Prozentsatz an B-Zellen (vergleiche Abb. 14P und 14S). Weil an Tag 1 der Kultur mit 14-21% der Ausgangszellmenge mehr lebende B220⁺/c μ HC⁺ Zellen isoliert werden konnten als an Tag 4 der Kultur (9-11% lebende B220⁺/c μ HC⁺ oder B220⁺/sIgM⁺ Zellen der Ausgangszellmenge), haben μ HC-exprimierende VPEinv/JHT, ED-cre B-Zellvorläufer unter diesen Kulturbedingungen wahrscheinlich nicht proliferiert, oder ein großer Anteil der Zellen müßte nach erfolgter Proliferation abgestorben sein, ungleich den Wt-B-Zellvorläufern.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen in vitro unabhängig von Stromazellen und ohne die Zugabe von Zytokinen zu prä-B- und B-Zellen differenzieren. Die Differenzierung geht wahrscheinlich mit einer proliferativen Expansion von μ HC⁺ B-Zellvorläufern einher, da zu Kulturbeginn ca. 30% der isolierten pro-B-Zellen eine μ HC ausgeprägt haben, während nach 4-tägiger Kultur ohne IL-7 fast alle lebenden B220⁺ Zellen μ HC-Proteine exprimierten und insgesamt ca. 1.4 mal mehr lebende B220⁺ Zellen aus den Kulturen isoliert werden konnten als zu Beginn an pro-B-Zellen ausplattiert wurden.

Im Gegensatz dazu induziert die de novo Synthese von μ HC-Proteinen und damit wahrscheinlich auch die de novo Synthese eines präBCR in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen (s. 3.1 und 3.2) in vitro nicht die Differenzierung zu prä-B-Zellen. Tatsächlich sind ca. 80% bzw. 100% der ausplattierten pro-B-Zellen (in Abhängigkeit von der Kokultur mit Stromazellen) nach 4-tägiger Kultur ohne Zugabe von IL-7 abgestorben.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete in vitro-Differenzierung der pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen zu prä-B- und B-Zellen, sowie das Überleben und die Proliferation von μ HC-exprimierenden B-Zellvorläufern von der Expression eines präBCR abhängt, wurden pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von λ 5T-Mäusen isoliert (Abb. 16) und für 4 Tage in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen ohne Zugabe von IL-7 kultiviert. Obwohl ca. 20% der pro-B-Zellen von λ 5T-Mäusen intrazellulär μ HC-Proteine ausprägen (Karasuyama et al., 1994), ist die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen in λ 5T-Mäusen blockiert, da B-Zellvorläufer dieser Mäuse keinen präBCR-Komplex ausprägen können (Kitamura et al., 1992; Ehlich et al., 1993; Karasuyama et al., 1994).

⁷ Das Entwicklungsstadium von B220⁺/CD43⁻/CD25⁻/sIgM⁻ Zellen ist unklar, da eine Population solcher Zellen im Knochenmark von Wt-Mäusen nicht beschrieben wurde (Chen et al., 1994; Rolink et al., 1994). Jedoch wurden B220⁺/CD43⁻/CD25⁻/sIgM⁻ B-Zellvorläufer im Knochenmark von RAG-1- und RAG-2-defizienten oder Östrogen-behandelten Wt-Mäusen beobachtet (Medina et al., 2000), so daß eine Herabregulation der CD43-Expression in B-Zellvorläufern nicht immer mit einer μ HC-Expression korreliert.

Wie erwartet differenzierten die zum Vergleich kultivierten pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen zu 45% prä-B-Zellen und 55% B-Zellen (Abb. 17), wobei nach 4-tägiger Kultur wiederum ca. 1.7 mal mehr lebende B220⁺ Zellen isoliert werden konnten als zu Kulturbeginn ausplattiert worden waren (Abb. 15).

(→) Abb. 16. Isolation von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c- und VPEinv/JHT, ED-cre- und λ5T-Mäusen.

Die Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks aus Femur und Tibia von 3-5 BALB/c- oder VPEinv/JHT, ED-cre- oder λ5T-Mäusen (im Alter von 4-7 Wochen) wurden vereint und CD19⁺ Zellen durch MACS wie unter 2.4.2 beschrieben isoliert. (A-B) repräsentieren Daten der lebenden Zellen nach Anreicherung von CD19⁺ Zellen des Knochenmarks von BALB/c-Mäusen.

(A): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Lymphozytenpopulation.

(B): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in A gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation wie in (A) gezeigt. Pro-B-Zellen im gezeigten Fenster wurden durch FACS wie unter 2.4 beschrieben isoliert. (C-D) repräsentieren Daten der Reanalyse lebender Zellen nach Isolation von pro-B-Zellen wie in (A-B) gezeigt.

(C): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Population der lebenden Zellen.

(D): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation wie in (C) gezeigt.

Die Isolation von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen (E-F) oder λ5T-Mäusen (I-J) und die Reanalyse der isolierten Zellen (G-H) bzw. (K-L) erfolgte in Analogie zur Isolation und Reanalyse von pro-B-Zellen aus BALB/c-Mäusen (A-D).

(M-Q): Analyse der intrazellulären μHC-Expression (cμHC) von isolierten pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen (E-H) nach 24-stündiger Kultur ohne Zugabe von IL-7 mit 0.2 μM 4-OH-Tamoxifen (N, P), oder ohne 4-OH-Tamoxifen (M, O) in Gegenwart von ST-2 Stromazellen (O-P) oder ST-2 Stromazellen und einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen (M, N). (M-P) repräsentieren die Daten von B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufern nach Färbung mit anti-μHC Antikörpern. (Q) repräsentiert die Daten der zur Kontrolle analysierten B220⁺/IgM⁻ B-Zellvorläufer aus dem Knochenmark einer BALB/c-Maus nach Färbung der intrazellulären μHC-Expression mit anti-μHC Antikörpern.

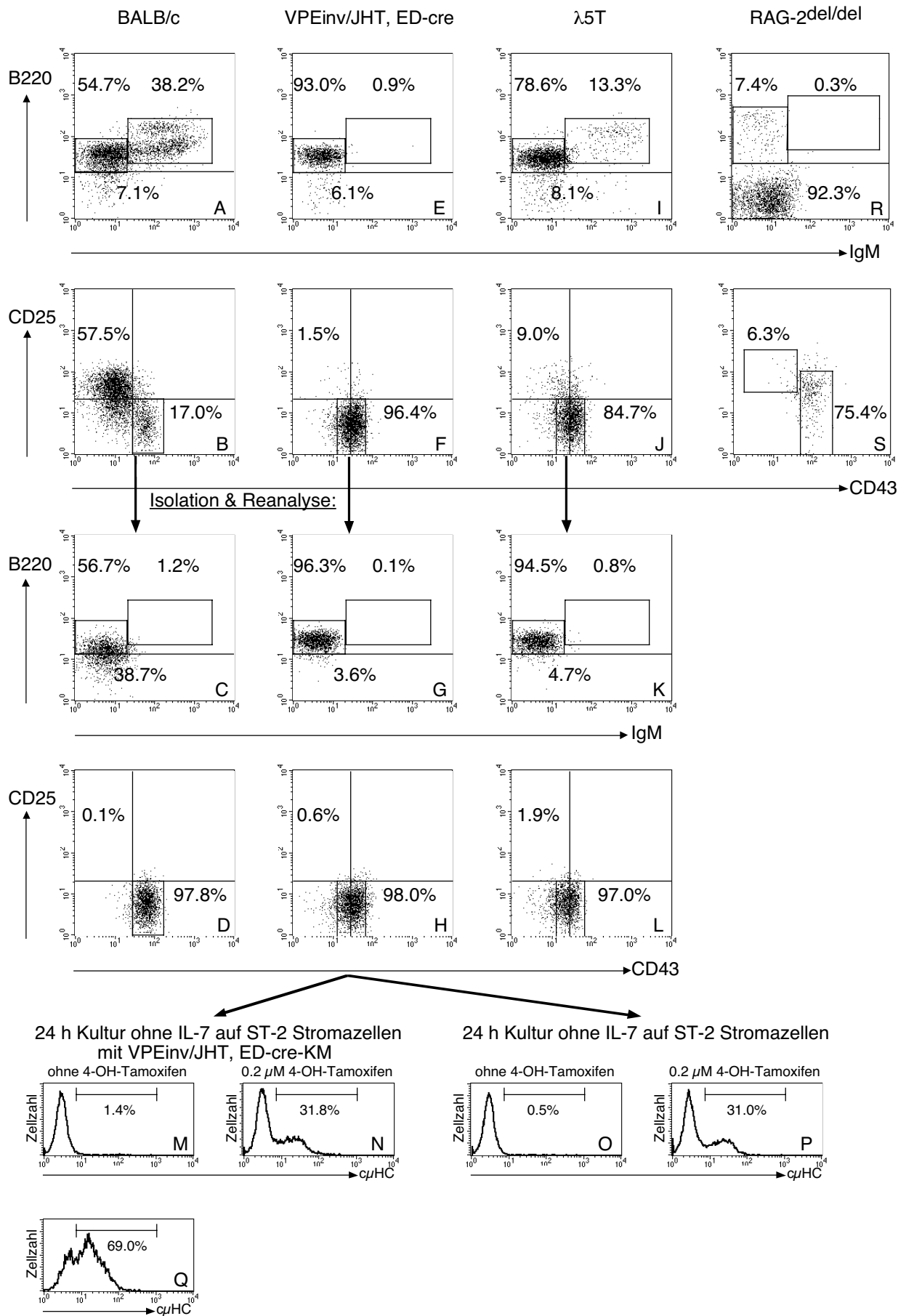
(R-S) repräsentieren Daten der Lymphozytenpopulation aus dem Knochenmark einer RAG-2del/del-Maus (Hao et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Zellen einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks einer RAG-2del/del-Maus wurden zur Kokultur mit pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen verwendet.

(R): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Lymphozytenpopulation.

(S): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in R gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation wie in (R) gezeigt.

Beachte, daß die B-Zellentwicklung in RAG-2del/del-Mäusen im pro-B-Zellstadium blockiert ist (Hao et al., unveröffentlichte Ergebnisse), so daß keine signifikante B220⁺/sIgM⁻/CD43⁻/CD25⁺ prä-B-Zellpopulation und B220⁺/sIgM⁺ B-Zellpopulation im Knochenmark dieser Mäuse zu detektieren ist.

α



Im Gegensatz dazu konnten nach 4-tägiger Kultur der pro-B-Zellen aus $\lambda 5T$ -Mäusen in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen nur ca. 30% lebende B220⁺ Zellen der ursprünglich ausplattierten Zellen isoliert werden (Abb. 15), 5-6 mal weniger als von unter gleichen Bedingungen kultivierten Wt-pro-B-Zellen. Nur 6-8% der lebenden B220⁺ Zellen waren B-Zellen (Abb. 17). Die meisten der 92-94% B220⁺/sIgM⁻ Zellen waren zwar CD43⁻ jedoch auch CD25⁻ (vergleiche Abb. 17N und 17D), das heißt, nicht zu prä-B-Zellen differenziert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß pro-B-Zellen in Abwesenheit des SLC-Proteins $\lambda 5$ auch in vitro nicht oder nur mit einer geringen Effizienz zu prä-B-Zellen differenzieren können. Da von der ursprünglich ausplattierten Anzahl der pro-B-Zellen nach 4-tägiger Kultur nur ca. 30% lebende B220⁺ Zellen isoliert werden konnten, sterben die meisten B-Zellvorläufer ohne Ausprägung eines präBCR nach kurzer Kultivierung ab. Die aus $\lambda 5T$ -pro-B-Zellen differenzierten B-Zellen könnten aufgrund einer frühen Expression von IgL-Ketten in einer kleinen Population der isolierten pro-B-Zellen entstanden sein, denn in einem geringem Anteil der Zellen des pro-B-Zellkompartiments von $\lambda 5T$ -Mäusen konnten Ig κ -Rearrangements nachgewiesen werden (Ehlich et al., 1993). Pelanda et al. (1996) zeigten, daß die frühe Expression eines Ig κ -Transgens im CD43⁺ pro-B-Zellkompartiment von $\lambda 5T$ -Mäusen tatsächlich die weitere B-Zellentwicklung ermöglicht.

(→) Abb. 17. Durchflußzytometrische Analyse von für 4 Tage kultivierten pro-B-Zellen aus BALB/c-, $\lambda 5T$ - und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen.

Pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-, $\lambda 5T$ - und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen wurden für 24 h ohne Zugabe von IL-7 auf ST-2 Stromazellen, mit oder ohne 0.2 μ M 4-OH-Tamoxifen (mit + oder - 4-OH-Tamoxifen gekennzeichnet) kultiviert. Nach Entzug des 4-OH-Tamoxifens wurde zu einigen Kulturen die gleiche Zahl von Zellen einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen hinzugegeben, wie an pro-B-Zellen ausplattiert worden war (mit + RAG-2^{del/del}-KM gekennzeichnet). Es folgte eine weitere Kultivierung für 3 Tage ohne Zugabe von IL-7.

(A-B) repräsentieren Daten der Lymphozytenpopulation aus dem Knochenmark einer zur Kontrolle analysierten BALB/c-Maus.

(A): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-B220/CD45R und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Population der B220⁺ Zellen.

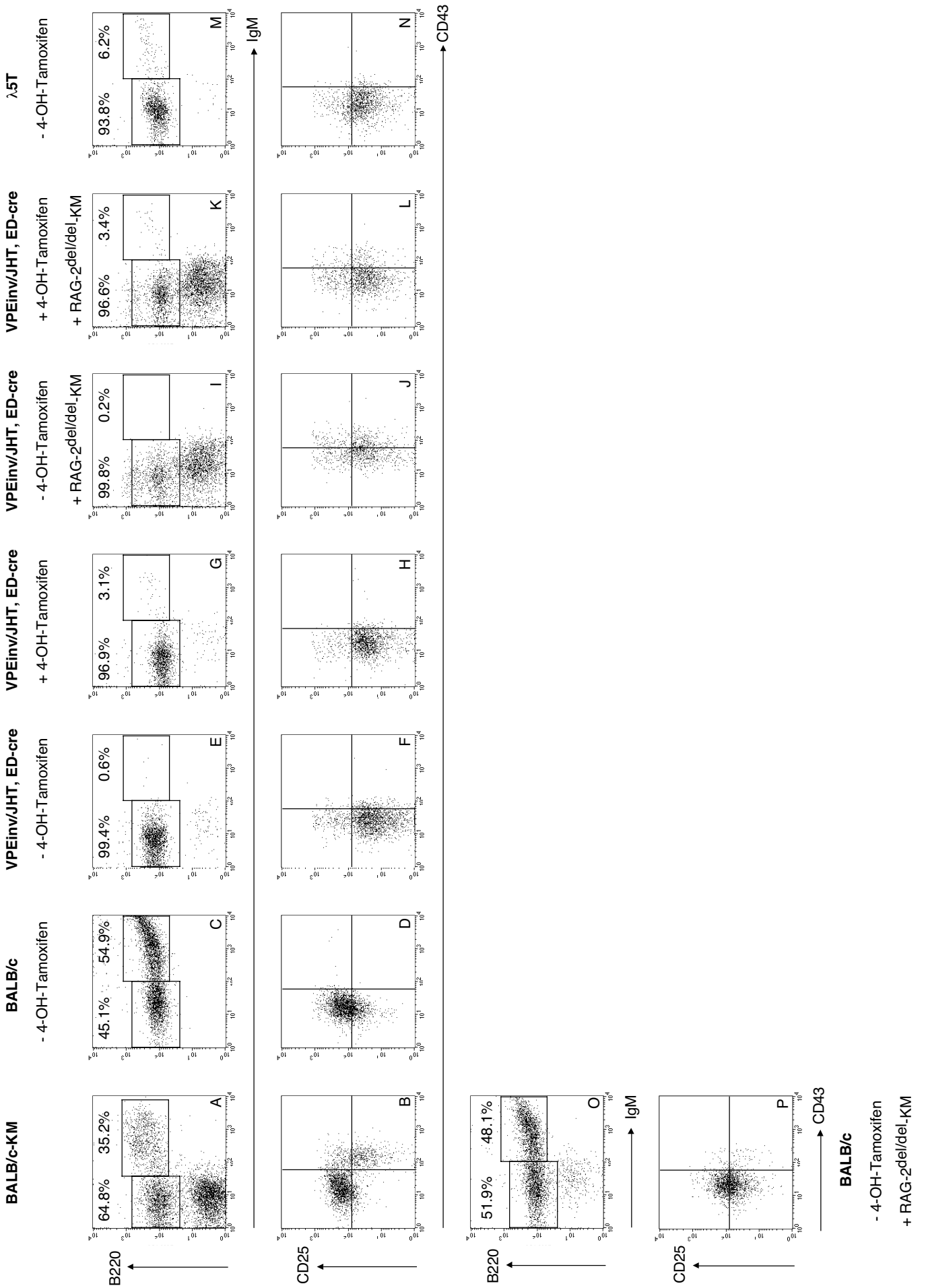
(B): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in A gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern.

(C, D, O, P) repräsentieren Daten von pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen, die auf ST-2 Stromazellen mit oder ohne Zellen einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen kokultiviert wurden.

(E-L) repräsentieren Daten von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen, die ohne Zugabe von IL-7 mit oder ohne Zellen einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen kokultiviert wurden.

Obwohl nach 24-stündiger Kultur von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen mit 0.2 μ M 4-OH-Tamoxifen 26-32% der Zellen c μ HC⁺ waren (Abb. 16), differenzierten die B-Zellvorläufer nicht zu B220⁺/IgM⁻/CD43⁻/CD25⁺ prä-B-Zellen (G-H), auch nicht nach Kokultur mit Zellen einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen (K-L).

(M, N) repräsentieren Daten von pro-B-Zellen aus $\lambda 5T$ -Mäusen, die ohne Zugabe von IL-7 in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen für 4 Tage kultiviert wurden. Beachte, daß $\lambda 5T$ -pro-B-Zellen in vitro nicht oder nur mit einer geringen Effizienz zu prä-B-Zellen differenzieren.



Wie die Ergebnisse der Kulturen von λ 5T-pro-B-Zellen zeigen, ist die beobachtete in vitro-Differenzierung von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen zu prä-B- und B-Zellen nicht nur von der Expression einer μ HC, sondern von der Ausprägung eines präBCR abhängig. Selbst unter der Annahme, daß nicht nur ca. 30% der isolierten Wt-pro-B-Zellen eine μ HC zu Kulturbeginn exprimiert haben, sondern daß alle pro-B-Zellen im Verlaufe der in vitro-Kultivierung eine μ HC ausgeprägt haben könnten, wären nur etwa 50% der pro-B-Zellen zur Ausprägung eines präBCR in vitro fähig gewesen. Denn ca. 50% aller in pro-B-Zellen exprimierten μ HC's können nicht in einem membrangebundenen präBCR ausgeprägt werden (ten Boekel et al., 1997). Da nach 4-tägiger Kultur ohne Zugabe von IL-7 und ohne Stromazellen ca. 1.4 mal mehr prä-B- und B-Lymphozyten isoliert werden konnten als zu Kulturbeginn an pro-B-Zellen ausplattiert wurde, und nur maximal 50% aller ausplattierten B-Zellvorläufer zu prä-B-Zellen differenziert sein können, müssen die entstandenen prä-B-Zellen proliferiert haben.

Die in vitro-Differenzierung der aus Wt-Mäusen isolierten pro-B-Zellen zu prä-B- und B-Lymphozyten und die Proliferation der μ HC⁺ Zellen findet ohne die Zugabe von Stromazellen und ohne die Zugabe von IL-7 statt (Abb. 14 und 15). Da eine signifikante Kontamination der kultivierten pro-B-Zellen mit B220⁻ Zellen des Knochenmarks, z.B. IL-7-produzierenden Stromazellen aufgrund der hohen Reinheit der isolierten pro-B-Zellpopulation ($\geq 95\%$ der isolierten Zellen waren B220⁺) als unwahrscheinlich erscheint, sollte unter diesen Bedingungen kein IL-7 oder nur eine geringe IL-7-Konzentration in den pro-B-Zellkulturen vorliegen. Daher lassen die hier präsentierten Ergebnisse vermuten, daß der präBCR die proliferative Expansion von prä-B-Zellen unabhängig von IL-7 vermittelt, oder daß prä-B-Zellen nur eine geringe IL-7-Konzentration zur Proliferation benötigen (zur ausführlichen Diskussion s. 4.3).

Da die de novo Expression eines präBCR in pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in vitro nicht die Differenzierung zu prä-B-Zellen induziert, differenzieren vermutlich nur solche Wt-pro-B-Zellen in vitro zu prä-B-Zellen, die bereits in vivo einen präBCR ausgeprägt haben. Dies steht nicht im Widerspruch zur Isolation der pro-B-Zellen als sIgM⁻ Zellen (Abb. 13 und 16), denn der präBCR-Komplex kann bisher nicht auf ex vivo-isolierten Zellen ohne vorherige in vitro-Kultivierung nachgewiesen werden (Karasuyama et al., 1994; Shinjo et al., 1994; Winkler et al., 1995; s. 1.3).

Um zu untersuchen, ob pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in vitro nach μ HC de novo Synthese zu prä-B-Zellen differenzieren falls sie mit Zellen des gesamten Knochenmarks kokultiviert werden, wurden pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen isoliert (Abb. 16) und in Kulturmedium mit oder ohne 0.2 μ M 4-OH-Tamoxifen in Anwesenheit von ST-2 Stromazellen ohne Zugabe von IL-7 kultiviert. Zu den isolierten pro-B-Zellen wurden entweder zu Kulturbeginn Zellen des gesamten Knochenmarks von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in einem Verhältnis von ca. 1:1 zugegeben, oder nach 24-stündiger Kultur mit oder ohne 4-OH-Tamoxifen in etwa die gleiche Anzahl von Zellen einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen (Hao et al., unveröffentlichte Ergebnisse) zugegeben wie an pro-B-Zellen ausplattiert worden war.

In RAG-2^{del/del}-Mäusen ist die B-Zellentwicklung im pro-B-Zellstadium blockiert (Abb. 16), weil das von loxP Sequenzen flankierte RAG-2-Gen durch Kreuzung mit einer Deleter-Maus

(Schwenk et al., 1995) inaktiviert wurde, und B-Zellvorläufer folglich kein Ig-Rearrangement bilden können (Hao et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Alle aus der Kokultur von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen mit Knochenmarkszellen von RAG-2^{del/del}-Mäusen entstehenden prä-B-Zellen und B-Zellen müssen daher von pro-B-Zellen der VPEinv/JHT, ED-cre-Mäuse abstammen.

Nach 24-stündiger Kultur von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen mit 0.2 μ M 4-OH-Tamoxifen prägten 26-32% der lebenden B220⁺ Zellen intrazellulär μ HC-Proteine aus (Abb. 16), während die ohne 4-OH-Tamoxifen kultivierten Zellen nur zu 0.3-1.4% $c\mu$ HC⁺ waren (Abb. 16). Wiederum konnten 55-65% aller ausplattierten pro-B-Zellen zu diesem Zeitpunkt als lebende Zellen isoliert werden.

Pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen, die nur mit ST-2 Stromazellen kultiviert wurden, differenzierten wie erwartet überwiegend nicht zu prä-B- oder B-Zellen unabhängig von der in 26-32% der lebenden B220⁺ Zellen induzierten μ HC-Expression (Abb. 17). Wiederum entwickelte sich aus den mit 4-OH-Tamoxifen für 24 h kultivierten VPEinv/JHT, ED-cre pro-B Zellen nur eine kleine Population von B-Zellen (vergleiche Abb. 17I und 17K). Die zur Kontrolle kultivierten pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen differenzierten erwartungsgemäß zu prä-B- und B-Zellen (Abb. 17).

Pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen, die entweder von Kulturbeginn an in einem Verhältnis von ca. 1:1 mit einer Einzelzellsuspension des gesamten Knochenmarks der gleichen Mäuse kokultiviert wurden, oder nach Ende der 24-stündigen Kulturperiode mit oder ohne 4-OH-Tamoxifen mit einer Einzelzellsuspension des Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen im gleichen Verhältnis kokultiviert wurden, differenzierten zum größten Teil nicht zu prä-B- oder B-Zellen (Abb. 17), obwohl an Tag 1 der Kultur nach Cre-vermittelter Rekombination 26-32% der lebenden B-Zellvorläufer intrazellulär μ HC-Proteine ausprägten (Abb. 16)⁸. So konnten trotz Kokultur mit RAG-2^{del/del}-Knochenmarkszellen nach insgesamt 4-tägiger Kultur wiederum unabhängig von der induzierten μ HC-Expression nur ca. 14% der ursprünglich ausplattierten B220⁺ Zellen lebend isoliert werden (Abb. 15). Damit hat die Kokultur von Knochenmarkszellen aus VPEinv/JHT, ED-cre- oder RAG-2^{del/del}-Mäusen mit VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen keinen positiven Effekt auf die Differenzierung der B-Zellvorläufer nach μ HC de novo Synthese in vitro.

Pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen, die mit ST-2 Stromazellen und einer Einzelzellsuspension des Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen unter gleichen Bedingungen kultiviert worden waren, differenzierten wie erwartet teilweise zu prä-B-Zellen und B-Lymphozyten (Abb. 17). Nach 4-tägiger Kultur konnten allerdings unter diesen Bedingungen ca. 3.5 mal mehr lebende prä-B- und B-Lymphozyten isoliert werden als zu Kulturbeginn an pro-B-Zellen ausplattiert worden waren, d.h. ca. 2 mal mehr lebende B220⁺ Zellen als aus vergleichbaren Kulturen nur mit ST-2 Stromazellen (Abb. 15).

Da sich prä-B-Zellen und B-Lymphozyten nur aus den kultivierten Wt-pro-B-Zellen, nicht aber aus pro-B-Zellen des zur Kokultur verwendeten RAG-2^{del/del}-Knochenmarks entwickelt haben

⁸ Die Daten der Kokulturen mit Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen und ST-2 Stromazellen sind nicht gezeigt.

können⁹, scheint die Kokultur mit RAG-2^{del/del}-Knochenmarkszellen einen positiven Effekt auf das Überleben und/oder die Proliferation von Wt-pro-B- und/oder prä-B-Zellen zu haben. Möglicherweise sezernieren Stromazellen des zur Kokultur verwendeten RAG-2^{del/del}-Knochenmarks IL-7 oder andere kostimulierende Faktoren (Era et al., 1991; Marshall et al., 1998), die das Überleben und die Proliferation sowohl von pro-B-Zellen als auch von prä-B-Zellen beeinflussen könnten.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, daß pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen in Folge der präBCR-Expression in vitro zu prä-B-Zellen und B-Lymphozyten differenzieren und prä-B-Zellen dabei eine Phase der proliferativen Expansion durchlaufen.

Die de novo Synthese einer μ HC in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen und damit vermutlich auch die de novo Synthese eines präBCR-Komplexes in diesen B-Zellvorläufern (s. 3.2) in vitro, also außerhalb des Kontext des Knochenmarks, führt jedoch nicht zur Differenzierung der pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen und nicht zu deren Proliferation, auch nicht in Gegenwart von ST-2 Stromazellen oder in Kokultur mit RAG-2^{del/del}-Knochenmarkszellen und ST-2 Stromazellen. Daher scheint die präBCR-vermittelte Differenzierung von μ HC-exprimierenden B-Zellvorläufern abhängig von im Kontext des Knochenmarks ausgeprägten Faktoren zu sein.

Die Bedingungen der hier durchgeführten Kokulturen mit RAG-2^{del/del}-Knochenmarkszellen könnten unzureichend für eine Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen nach in vitro induzierter μ HC-Expression sein, auch wenn diese Kokulturbedingungen einen positiven Einfluß auf das Überleben und/oder die Proliferation der Wt-pro-B-Zellen und/oder prä-B-Zellen haben.

Die hier zur Induktion der μ HC-Expression in pro-B-Zellen verwendete 4-OH-Tamoxifenkonzentration von 0.2 μ M hat keinen signifikanten Einfluß auf die Differenzierung (Abb. 14) und die Proliferation der B-Zellvorläufer aus Wt-Mäusen (Abb. 15). Damit sollte 4-OH-Tamoxifen in einer Konzentration von 0.2 μ M nicht die Ursache für die ausbleibende in vitro-Differenzierung der pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen nach μ HC de novo Synthese sein.

Ist die präBCR-vermittelte Differenzierung von B-Zellvorläufern tatsächlich abhängig von im Kontext des Knochenmarks exprimierten Faktoren, dann sollten pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen im Gegensatz zu pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in vitro effizient zu prä-B- und B-Zellen differenzieren und proliferieren. Denn ca. 80% der CD19⁺/CD43⁺ pro-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen prägen bereits in vivo, also im Kontext des Knochenmarks intrazellulär μ HC-Proteine (s. 3.1, Abb. 6) und damit wahrscheinlich bereits in vivo einen präBCR auf der Zelloberfläche aus.

⁹ Wie in Abb. 17 gezeigt, konnte nach Kokultur von pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen mit ST-2 Stromazellen und RAG-2^{del/del}-Knochenmarkszellen keine signifikante prä-B- oder B-Zellpopulation detektiert werden wie auch im Knochenmark von RAG-2^{del/del}-Mäusen (Abb. 16).

3.5 Pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen differenzieren in vitro zu prä-B-Zellen

Zur Untersuchung, ob die vom VPE-Allel kodierte μ HC in vitro die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion von prä-B-Zellen induziert, falls die μ HC und somit ein präBCR bereits in vivo ausgeprägt werden konnte, wurden $CD19^+/sIgM^-/CD43^+/HSA^{+/-}$ pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen mittels FACS isoliert (Abb. 18) und ohne Zugabe von IL-7 auf ST-2 Stromazellen kultiviert. Parallel dazu wurden pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von B1-8f/JHT, ED-cre- (Lam et al., 1997) und BALB/c-Mäusen isoliert (Abb. 18) und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Da mit ca. 90% der $CD19^+$ pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von B1-8i-Mäusen ähnlich viele pro-B-Zellen $c\mu$ HC⁺ sind wie von VPE/JHT-Mäusen (ca. 84% der $CD19^+$ pro-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen sind $c\mu$ HC⁺, s. 3.1), sollten die aus B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen isolierten pro-B-Zellen in einem vergleichbaren Ausmaß in vitro differenzieren und proliferieren wie pro-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen¹⁰.

Wie die Reanalyse der mittels FACS isolierten Zellen zeigt, sind nur 0.5% der aus den Wt-Mäusen isolierten Zellen bzw. nur 0.9% der aus den VPE/JHT-Mäusen isolierten Zellen kontaminierende $CD19^+/sIgM^-/CD43^-/HSA^{++}$ prä-B-Zellen, d.h. es wurden tatsächlich fast ausschließlich pro-B-Zellen isoliert (Abb. 18). Allerdings sind ca. 20% der aus B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen isolierten pro-B-Zellen tatsächlich kontaminierende prä-B-Zellen (Abb. 18).

In 2 unabhängigen Experimenten waren die aus VPE/JHT-Mäusen isolierten pro-B-Zellen nach 3-tägiger Kultur ohne Zugabe von IL-7 auf ST-2 Stromazellen zu 95.2% bzw. 78.9% prä-B-Zellen ($B220^+/sIgM^-/CD43^-/HSA^{++}/CD25^+$) und zu 4.8% bzw. 21.1% B-Zellen differenziert (Abb. 19 zeigt ein von 2 unabhängigen Experimenten). Dabei konnten 2.7 bzw. 3.3 mal mehr lebende $B220^+$ Zellen nach der Kultur isoliert werden, als am Kulturstart ausplattiert worden waren. Die pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen sind also in vitro zu prä-B-Zellen differenziert und haben proliferiert.

Eine Population von proliferierenden Zellen ist durch einen erhöhten Anteil an großen Zellen gekennzeichnet. So zeigt die Analyse des prä-B-Zellkompartiments aus dem zum Vergleich analysierten Knochenmark von BALB/c-Mäusen 34% große Zellen, die im Vorwärtsstreulicht (FCS) von den kleinen Zellen unterscheidbar sind (Abb. 19B), wobei sich ca. 70% der großen prä-B-Zellen in der S/G₂- oder M-Phase des Zellzyklus befinden (Karasuyama et al., 1994). Die Population unreifer B-Zellen weist hingegen nur ca. 10% große Zellen auf (Karasuyama et al., 1994), wobei nur ca. 5% der unreifen B-Zellen in der S/G₂- oder M-Phase des Zellzyklus sind (Hardy et al., 1991).

Auch die in vitro zu prä-B-Zellen differenzierten pro-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen weisen mit 43% viele große Zellen auf, charakteristisch für eine Population von proliferierenden Zellen (Abb. 19F), während die entstandenen B-Zellen wie erwartet fast ausschließlich kleine Zellen

¹⁰ Anstelle von B1-8i-Mäusen wurden aus Gründen der Verfügbarkeit B1-8f/JHT, ED-cre-Mäuse verwendet. In B1-8f-Mäusen ist das VDJ-B1-8 Gensegment von loxP Sequenzen flankiert (Lam et al., 1997). Da die Hintergrund-Rekombination des ED-cre Systems sehr gering ist (s. 3.1, 3.3, 3.4), ist eine ungewollte Cre-vermittelte Deletion des VDJ-B1-8 Gensegments nur in vernachlässigbar wenigen Zellen zu erwarten. Daher sollten pro-B-Zellen von B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen ähnlich effizient in vitro zu prä-B- und B-Zellen differenzieren und proliferieren wie pro-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen.

sind (Daten nicht gezeigt).

Die zum Vergleich analysierten pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen sind in 2 unabhängigen Experimenten in vitro zu 62.2% bzw. 50.1% prä-B- und zu 37.8% bzw. 49.9% B-Zellen differenziert (Abb. 19 zeigt ein von 2 unabhängigen Experimenten). Dabei haben diese Zellen proliferiert, da nach Kultur 2.6 bzw. 2.9 mal mehr lebende B220⁺ Zellen isoliert werden konnten als zu Kulturbeginn ausplattiert worden waren. Die entstandene prä-B-Zellpopulation weist 34% große Zellen auf (Abb. 19H), während fast alle entstandenen B-Lymphozyten kleine Zellen sind (Daten nicht gezeigt).

Auffällig ist, daß im gezeigten Experiment nach 3-tägiger Kultur von pro-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen nur ca. 5% B-Lymphocyten entstanden sind, während nach der Kultur von pro-B-Zellen aus B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen ca. 38% B-Zellen zu beobachten sind (vgl. Abb. 19E und 19G). Wie die Reanalyse der aus dem Knochenmark von B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen isolierten pro-B-Zellen zeigte, waren jedoch ca. 20% der Zellen tatsächlich kontaminierende prä-B-Zellen, während die aus VPE/JHT-Mäusen isolierten pro-B-Zellen nur zu ca. 0.9% mit prä-B-Zellen kontaminiert waren (Abb. 18). Da prä-B-Zellen eine kürzere Zeitspanne benötigen, um zu B-Zellen zu differenzieren als pro-B-Zellen (Osmond et al., 1994), könnte dies eine mögliche Ursache für den beobachteten höheren Anteil an B-Zellen in der Zellpopulation von kultivierten B1-8f/JHT, ED-cre-pro-B-Zellen gegenüber demjenigen in der Zellpopulation von kultivierten VPE/JHT-pro-B-Zellen und Wt-pro-B-Zellen sein. In einem weiteren Experiment differenzierten pro-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen in vitro nach 3-tägiger Kultur zu 21.1% B-Zellen (Daten nicht gezeigt).

(➔) Abb. 18. Isolation von pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-, VPE/JHT-, und B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen.

Die Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks aus Femur und Tibia von 3-5 BALB/c-, VPE/JHT- oder B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen (im Alter von 4-13 Wochen) wurden vereint.

(A-B) repräsentieren Daten der Lymphozytenpopulation des Knochenmarks von BALB/c-Mäusen.

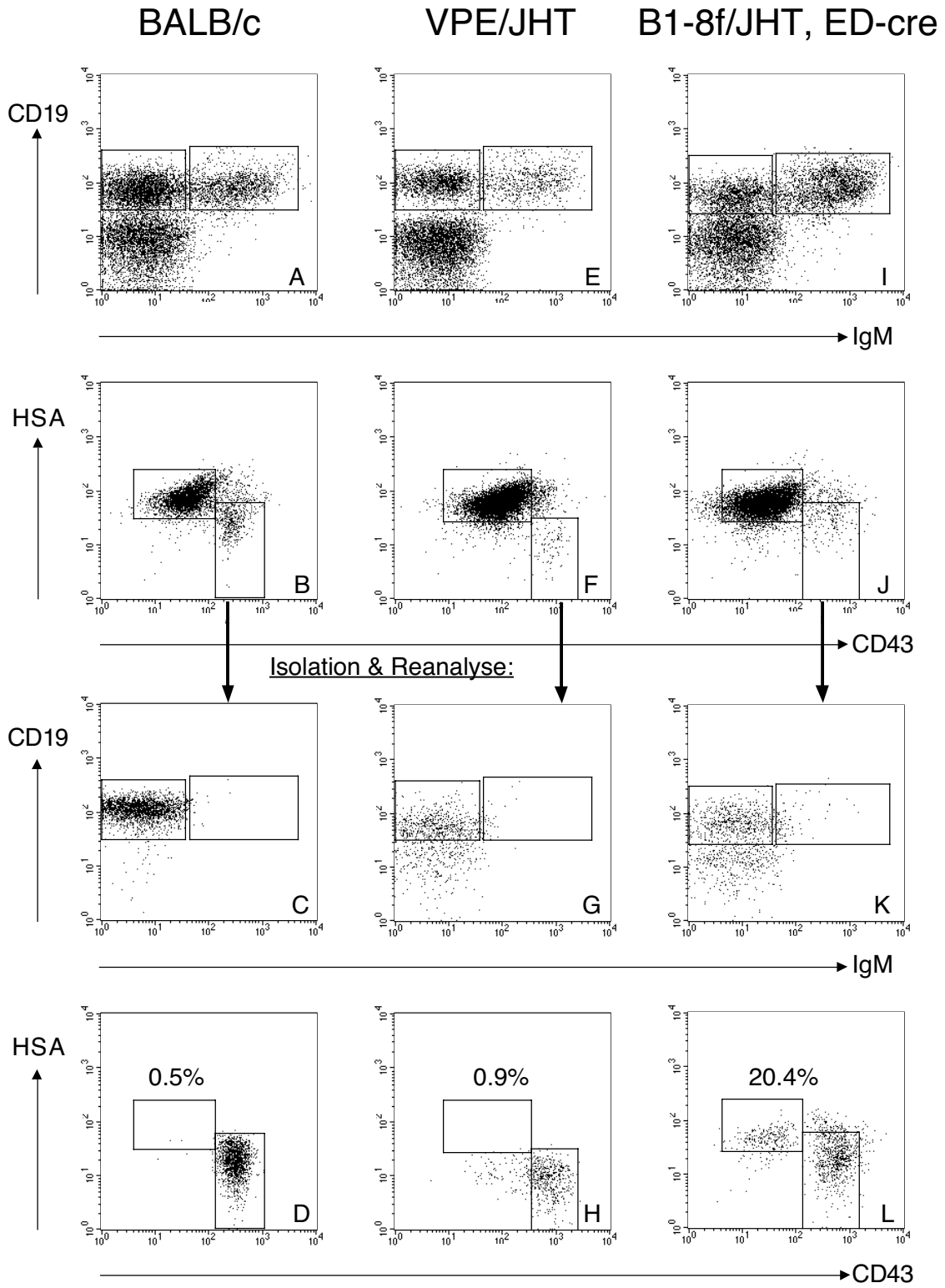
(A): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern.

(B): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in A gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-HSA Antikörpern. CD19⁺/sIgM/CD43⁺/HSA^{+/-} pro-B-Zellen im gezeigten Fenster wurden durch FACS wie unter 2.4 beschrieben isoliert. (C-D) repräsentieren Daten der Reanalyse lebender Zellen nach Isolation von pro-B-Zellen wie in (A-B) gezeigt.

(C): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern.

(D): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen durch Färbung mit anti-CD43 und anti-HSA Antikörpern. Die Prozentangabe bezieht sich auf die B220⁺/sIgM B-Zellvorläuferpopulation und gibt den Anteil kontaminierender prä-B-Zellen an der isolierten pro-B-Zellpopulation an.

Die Isolation der pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen (E-F) oder B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen (I-J) und die Reanalyse der isolierten Zellen (G-H) bzw. (K-L) erfolgte in Analogie zur Isolation und Reanalyse der pro-B-Zellen aus BALB/c-Mäusen (A-D).



Die parallel kultivierten und analysierten pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen differenzierten wie erwartet zum großen Teil ebenfalls zu prä-B-Zellen (70.0% bzw. 76.8%) und B-Lymphozyten (13.3% bzw. 23.2%) (Abb. 19 zeigt ein von 2 unabhängigen Experimenten), wobei die entstandene prä-B-Zellpopulation mit 52% ebenfalls viele große Zellen aufweist (Abb. 19D). Daß an Tag 3 der Kultur von Wt-pro-B-Zellen mit 13-23% B-Zellen ein geringerer Anteil als an Tag 4 mit 36-57% B-Zellen (s. 3.4) entstanden ist, dürfte die fortschreitende Differenzierung der kultivierten B-Zellvorläufer mit zunehmender Kulturdauer reflektieren. Insgesamt konnten in 2 unabhängigen Experimenten 1.6 bzw. 2 mal mehr lebende B220⁺ Zellen nach Kultur isoliert werden als bei Kulturstart ausplattiert worden waren, was den bereits beschriebenen Werten entspricht (s. 3.4). Allerdings waren im gezeigten Experiment 16.7% der B220⁺ Zellen pro-B-Zellen (Abb. 19). Diese pro-B-Zellen exprimieren möglicherweise keine μ HC und könnten sehr frühe B-Zellvorläufer repräsentieren, die auf Stromazellen ohne IL-7 wachsen können (Era et al., 1991).

Die von VPE/JHT- und B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen isolierten pro-B-Zellen sind also wie pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen in vitro zu prä-B- und B-Zellen differenziert und haben proliferiert, da in 2 unabhängigen Experimenten 2.7 bzw. 3.3 mal mehr lebende B220⁺ Zellen (VPE/JHT), und 2.6 bzw. 2.9 mal mehr lebende B220⁺ Zellen (B1-8f/JHT, ED-cre) nach Kultur detektiert werden konnten als zu Kulturbeginn ausplattiert worden waren.

(➔) Abb. 19. Durchflußzytometrische Analyse von für 3 Tage kultivierten pro-B-Zellen aus BALB/c- und VPE/JHT- und B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen.

Pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-, VPE/JHT- und B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen wurden für 3 Tage ohne Zugabe von IL-7 auf ST-2 Stromazellen kultiviert.

(A-B) repräsentieren Daten der Lymphozytenpopulation aus dem Knochenmark einer zur Kontrolle analysierten BALB/c-Maus.

(A): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-B220/CD45R und anti-IgM Antikörpern. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Population der B220⁺ Zellen.

(B): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in A gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-CD25 Antikörpern. Die Größe der Zellen innerhalb der B220⁺/CD43⁺/CD25⁺/sIgM⁻ prä-B-Zellpopulation ist im eingefügten Histogramm dargestellt: 34% der prä-B-Zellen sind große Zellen, die im Vorwärtsstreulicht (FSC) rechts der Markierung liegen und deutlich von den kleinen Zellen (links der Markierung) unterscheidbar sind. Die Prozentangabe bezieht sich auf die prä-B-Zellpopulation.

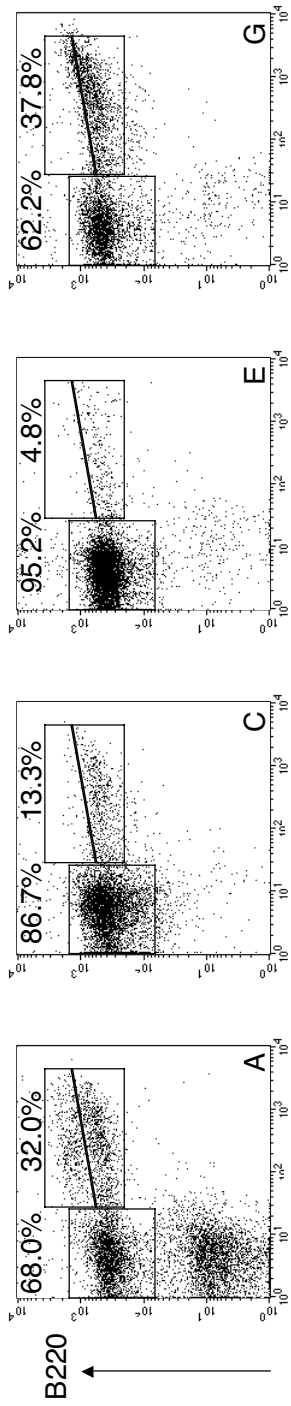
Die Analyse der für 3 Tage kultivierten pro-B-Zellen aus BALB/c- (C-D), VPE/JHT- (E-F) und B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen (G-H) erfolgte in Analogie zur Analyse der B-Zellkompartimente im Knochenmark der BALB/c-Maus (A-B).

Beachte, daß sich pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen in vitro zu prä-B- und B-Zellen entwickelt haben.

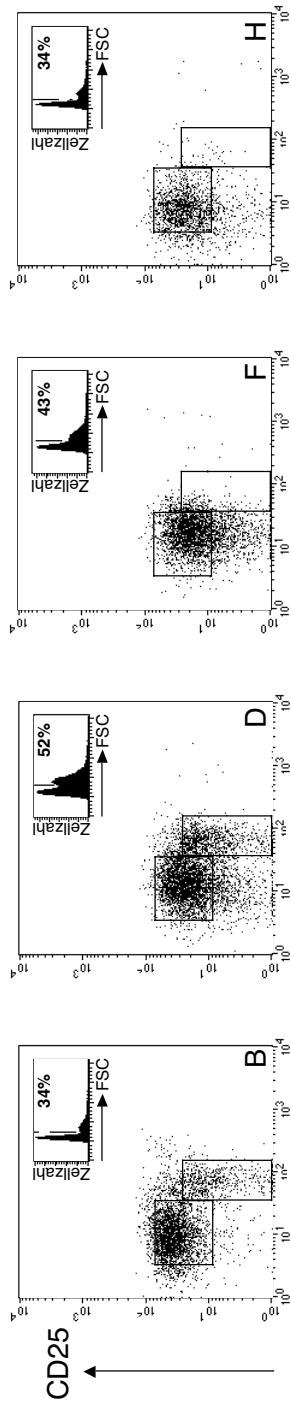
(I): Vergleichende Darstellung der HSA-Oberflächenexpression der für 3 Tage kultivierten pro-B-Zellen aus VPE/JHT- und B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen sowie der B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation aus dem Knochenmark einer BALB/c-Maus. Dargestellt ist jeweils die B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläuferpopulation.

Die aus pro-B-Zellen in vitro differenzierten prä-B-Zellen von VPE/JHT- und B1-8f/JHT, ED-cre-Mäusen weisen die für prä-B-Zellen typische starke HSA-Oberflächenexpression auf, wie der Vergleich zu pro-B- und prä-B-Zellen aus dem Knochenmark einer BALB/c-Maus zeigt (I).

BALB/c-KM BALB/c/c VPE/JHT B1-8f/JHT, ED-cre

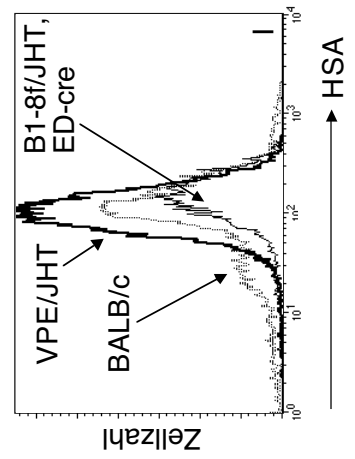


IgM



CD25

CD43



HSA

Diese Daten zeigen, daß die von VPE/JHT-pro-B-Zellen exprimierte μ HC als präBCR-Komplex die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die Proliferation der prä-B-Zellen induziert, falls die μ HC-Expression nicht erst in vitro nach Cre-vermittelter Rekombination (s. 3.4), sondern bereits in vivo erfolgte (s. 3.1).

Daher könnte die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen von Faktoren abhängen, die zwar in vivo, jedoch nicht in vitro im verwendeten Kultursystem vorhanden sind. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß der präBCR zur Initiierung von präBCR-vermittelten Signalen einen Liganden auf Zellen des Knochenmarks binden muß. Ein solcher präBCR-Ligand wäre dann wohl nicht auf den hier verwendeten ST-2 Stromazellen ausgeprägt gewesen (s. 3.4).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bestünde darin, daß pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen durch sekundäre V_H -Gen replacement Rekombinationsereignisse (Kleinfield et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996) andere μ HC-Proteine ausprägen könnten als die pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen nach μ HC de novo Synthese in vitro, so daß erstere zur Differenzierung und Proliferation in vivo und in vitro fähig sind, letztere aber nicht.

3.5.1 Die überwiegende Mehrheit der prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen und der in vitro aus VPE/JHT-pro-B-Zellen differenzierten prä-B-Zellen exprimieren nicht durch V_H -Gen replacement Rekombinationen entstandene fremde μ HC's, sondern die vom VPE-Allel kodierte μ HC

Um festzustellen, ob tatsächlich die vom ursprünglichen VPE-Allel kodierte μ HC in einem präBCR-Komplex sowohl in vivo als auch in vitro die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion der prä-B-Zellen vermittelt, wurden μ HC-Transkripte von einzelnen prä-B-Zellen wie in 2.7 beschrieben in einer RT-PCR amplifiziert und sequenziert.

Wie die Analyse der erhaltenen $V_H D_H J_H$ -Nukleotidsequenzen zeigte, exprimieren 16 von 18 prä-B-Zellen (89%), die aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen isoliert worden waren (Abb. 20) und von denen ein $V_H D_H J_H$ -Rearrangement amplifiziert werden konnte, das VDJ-PE Segment (Tab. 2). 2 von 18 prä-B-Zellen (11%) aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen exprimieren allerdings eine μ HC, die nicht vom VPE-Allel kodiert wird, sondern von einem $V_H D_H J_H$ -Rearrangement, das durch $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ - oder möglicherweise durch $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombination eines stromaufwärts vom insertierten VDJ-PE Segment gelegenen D_H -Elements und/oder V_H -Gens mit dem VDJ-PE Segment entstanden ist (Tab. 2 und Abb. 21). Alle analysierten $V_H D_H J_H$ -Rearrangements waren produktiv, d.h., sie erlauben die Ausprägung einer μ HC.

Weiterhin prägen 14 von 20 prä-B-Zellen (70%), die in einem zweiten Experiment in vitro aus pro-B-Zellen des Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen differenziert waren und proliferiert haben (Ergebnisse nicht gezeigt), und von denen ein $V_H D_H J_H$ -Rearrangement amplifiziert werden konnte, eine μ HC aus, die vom VPE-Allel kodiert wird (Tab. 2). 6 von 20 (30%) der in vitro aus pro-B-Zellen differenzierten prä-B-Zellen, von denen ein $V_H D_H J_H$ -Rearrangement amplifiziert

werden konnte, exprimieren allerdings eine μ HC, die nicht vom VPE-Allel kodiert wird, sondern von einem $V_H D_H J_H$ -Rearrangement, das durch $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ - oder möglicherweise durch $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombination eines stromaufwärts vom insertierten VDJ-PE Segment gelegenen D_H -Elements und/oder V_H -Gens mit dem VDJ-PE Segment entstanden ist (Tab. 2 und Abb. 21). Wiederum waren alle analysierten $V_H D_H J_H$ -Rearrangements produktiv.

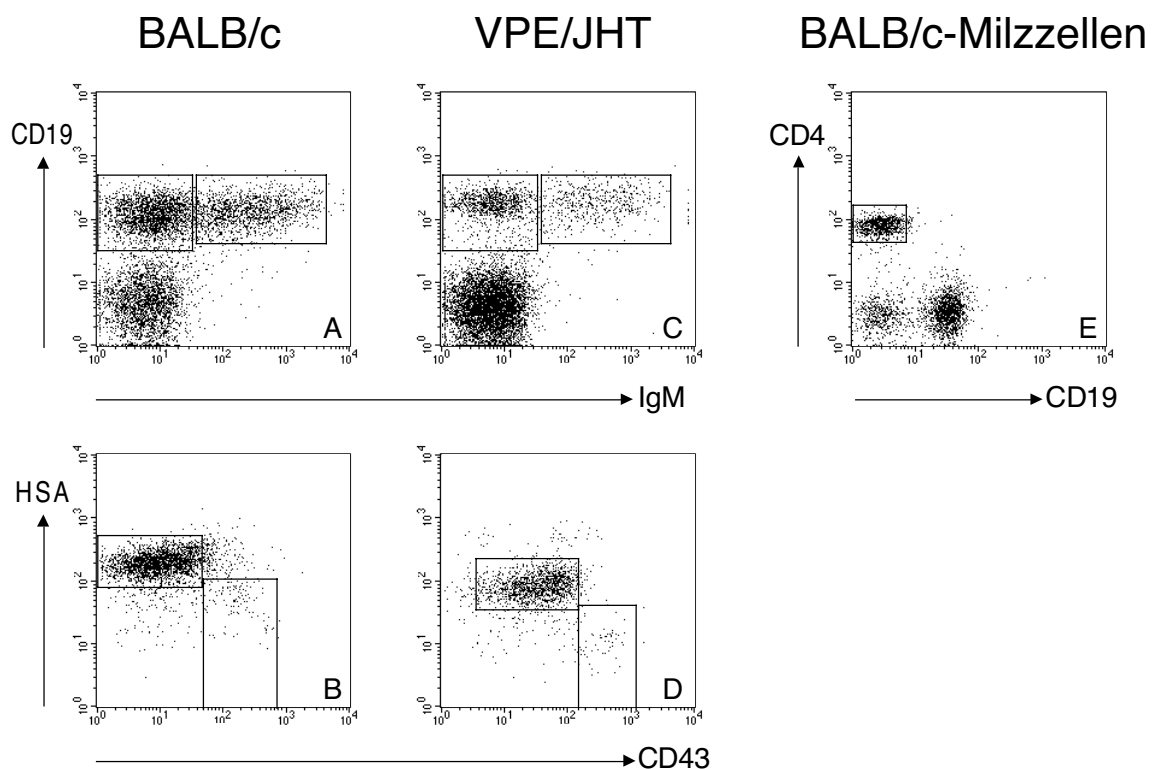


Abb. 20. Isolation einzelner prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c- und VPE/JHT-Mäusen.

Die Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks aus den Femura zweier BALB/c- oder VPE/JHT-Mäuse (im Alter von 4-8 Wochen) wurden vereint.

(A-B) repräsentieren Daten der Lymphozytenpopulation aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen.

(A): Darstellung von B-Zellvorläufern und B-Zellen durch Färbung mit anti-CD45R/B220 und anti-IgM Antikörpern.

(B): Auftrennung der pro-B- und prä-B-Zellen (wie in A gezeigt) durch Färbung mit anti-CD43 und anti-HSA Antikörpern. Einzelne $B220^+/CD43^+/HSA^{++}/sIgM^-$ prä-B-Zellen im gezeigten Fenster wurden durch FACS wie unter 2.4 beschrieben isoliert.

Die Isolation einzelner prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen (C-D) erfolgte in Analogie zur Isolation der prä-B-Zellen aus BALB/c-Mäusen (A-B).

Isolation von T-Lymphozyten als Negativkontrollzellen zur RT-PCR von μ HC-Transkripten:

(E): Dargestellt sind die B- und T-Lymphozyten der Milz einer BALB/c-Maus durch Färbung mit anti-CD4 und anti-CD19 Antikörpern. Einzelne $CD19^+/CD4^+$ T-Lymphozyten im gezeigten Fenster wurden als Negativkontrollzellen zur RT-PCR von μ HC-Transkripten isoliert.

Frühere Untersuchungen zeigten, daß die Wahrscheinlichkeit mit der verwendeten Methode mehr als eine Zelle in ein Reaktionsgefäß zu sortieren $< 1\%$ beträgt (Löffert et al., 1996; Novobrantseva et al., 1999).

	Anzahl der analysierten Zellen	Anzahl der PCR-Produkte**	Anzahl der sequenzierten PCR-Produkte	davon VDJ-PE Segment***	davon nicht VDJ-PE Segment***
BALB/c prä-B-Zellen	39	28 (72%)	20 (51%)	-	20 (100%)
VPE/JHT prä-B-Zellen (ex vivo isoliert)	45	19 (42%)	18 (40%)	16 (89%)	2* (11%)
VPE/JHT prä-B-Zellen (in vitro differenziert)	35	21 (60%)	20 (57%)	14 (70%)	6* (30%)
CD19/CD4 ⁺ T-Zellen der Milz einer BALB/c-Maus	14	-	-	-	-

Tab. 2: Analyse exprimierter μ HC-Transkripte einzelner prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen bzw. von VPE/JHT-Mäusen und einzelner, in vitro aus pro-B-Zellen differenzierten prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen.

*: Die Verbindungsregionen dieser $V_H D_H J_H$ -Genkomplexe sind in Abb. 21 dargestellt.

** : Es kann davon ausgegangen werden, daß die meisten PCR-Produkte nach der mit semi-genesteten Primer-Oligonukleotiden durchgeführten III.Runde-PCR auch tatsächlich von einem μ HC-Transkript stammen, da alle sequenzierten PCR-Produkte als ein μ HC-Transkript verifiziert wurden.

***: Diese Prozentangaben beziehen sich auf die jeweils sequenzierten PCR-Produkte. Alle analysierten IgH-Gen-Rearrangements waren produktiv, d.h., sie erlauben die Expression einer μ HC.

Bei den beobachteten V_H -Gen replacement Rekombinationen wurde wahrscheinlich das am 3' Ende des im VDJ-PE Segment verwendeten V_H -Gens (welches zur V_H -Genfamilie J558 gehört) vorhandene interne Heptamer (Kleinfeld et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995) als kryptische RSS verwendet (Abb. 21), so daß die ursprüngliche $V_H D_H J_H$ -Verbindungsregion des VDJ-PE Gensegments weitgehend erkennbar bleibt (Abb. 21). In 6 der 8 erhaltenen, vom VDJ-PE Segment verschiedenen $V_H D_H J_H$ -Rearrangements konnte ein fremdes V_H -Gen und ein fremdes D_H -Element identifiziert werden, so daß es sich hier um $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen handelt. Da nur in 2 der 8 vom VDJ-PE Segment verschiedenen $V_H D_H J_H$ -Rearrangements ein fremdes V_H -Gen, aber kein fremdes D_H -Gen vorliegt, handelt es sich wahrscheinlich in nur wenigen Fällen um ein $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rearrangement, wobei allerdings ein möglicherweise verwendetes D_H -Element nicht identifiziert werden konnte, sofern es kürzer als 5 bp ist.

$V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ - und $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -replacement Rekombinationen wurden auch in bestimmten B-Zellpopulationen anderer Ig-Insertionsmäuse gefunden (Chen et al., 1995, 1997; Cascalho et al., 1996; Bertrand et al., 1998), wobei die unphysiologische Struktur der jeweiligen IgHi-Loci mit in der Keimbahn verbliebenen D_H -Elementen stromaufwärts des insertierten $V_H D_H J_H$ -Gensegments erst $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen ermöglicht, die in Wt-Mäusen nicht auftreten können, da nach $V_H D_H J_H$ -Rekombination alle übrigen D_H -Elemente deletiert sind (Tonegawa, 1983).

In allen hier analysierten replacement Rekombinationen treten N-Nukleotid-Insertionen auf, was in Einklang mit früheren Beobachtungen steht (Taki et al., 1995; Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996; Bertrand et al., 1998; Pewzner-Jung et al., 1998). Da N-Nukleotide durch das Enzym TdT in $V_H D_H J_H$ -Rearrangements eingefügt werden (Alt & Baltimore, 1982; Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993) und dieses Enzym wahrscheinlich nur in pro-B-Zellen, nicht aber in prä-B-Zellen oder in unreifen B-Zellen des Knochenmarks exprimiert wird (Li et al., 1993), wurde vermutet, daß V_H -Gen replacement Rekombinationen wahrscheinlich nicht im Rahmen von Eliminierungen autoreaktiver B-Zell-Rezeptoren durch receptor editing (zur Übersicht: Nemazee, 2000) auftreten, sondern schon in einem BCR-unabhängigen pro-B-Zellstadium stattfinden (Taki et al., 1995; Chen et al., 1995, 1997; Cascalho et al., 1996; zur Übersicht: Nemazee, 2000).

Die beobachteten sekundären IgH-Rearrangements in prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen könnten durch nicht allel exkludierte $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen mit anschließender $V_H \Rightarrow D_H D_H J_H$ -Rekombination in pro-B-Zellen dieser Mäuse entstanden sein.

Wie erwartet, exprimieren alle der aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen isolierten prä-B-Zellen (Abb. 20) eine μ HC, die von einem vom VDJ-PE Segment verschiedenen produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangement kodiert wird (Tab. 2). Dabei konnten die in 19 von 20 $V_H D_H J_H$ -Rearrangements verwendeten V_H -Gene zu 10 von insgesamt 15 V_H -Genfamilien (Kofler et al., 1992; Mainville et al., 1996) zugeordnet werden, denen wohl 84 bis 91% aller in der Keimbahn der Maus existierenden V_H -Gene angehören (Kofler et al., 1992; persönliche Mitteilung, Roy J. Riblet). Von 14 als Negativkontrolle analysierten CD19⁺/CD4⁺ T-Zellen der Milz einer BALB/c-Maus (Abb. 20) konnten wie erwartet keine μ HC-Transkripte amplifiziert werden (Tab. 2).

Kantor et al. (1997) konnten mit den hier verwendeten Primeroligonukleotiden (s. 2.7) durch RT-PCR von μ HC-Transkripten einzelner Zellen sogar V_H -Gene aller 15 V_H -Genfamilien amplifizieren.

Daher kann davon ausgegangen werden, daß die meisten der in prä-B-Zellen von BALB/c- und VPE/JHT-Mäusen exprimierten μ HC-Transkripte mit der hier und von Kantor et al. (1997) verwendeten Methode amplifiziert werden können, auch wenn μ HC-Transkripte tatsächlich in nur 42-72% aller analysierten einzelnen Zellen detektiert werden konnten (Tab. 2).

Insgesamt zeigt diese Analyse, daß die meisten prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen eine vom VPE-Allel kodierte μ HC exprimieren (89% der amplifizierten μ HC-Transkripte enthielten das VDJ-PE Gensegment), während mit 70% der von prä-B-Zellen amplifizierten μ HC-Transkripte auch die meisten der in vitro aus pro-B-Zellen des Knochenmarks von VPE/JHT-Mäusen differenzierten prä-B-Zellen die vom VPE-Allel kodierte μ HC ausprägen. Daher induziert die vom VPE-Allel kodierte μ HC die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und auch deren proliferative Expansion durch Ausprägung in einem funktionellen präBCR-Komplex (s. auch 3.1 & 3.2), sofern der präBCR bereits in vivo und nicht erst in vitro exprimiert wird (s. 3.4 und 3.5).

-----V _H -Gen-----><-----CDR 3----->		< N ><--DSP2.2--><N ><-----JH3----->		D _H -		V _H -	
VPE	TCT GGG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGT	TGG AAC TAT GAT TTC GCC TGG TTT GCT TAC	TTC GCC	TGG TTT	Segment	Familie	
Z. 122	--- A- --- --- -T- --- --A	CGA CGA CGA AGT	---	---	DSP2.2	J558	
Z. 125	--- A- --- --T- --- --A	CGG ACG AGG ATT	---	---	n.i.	J558	
Z. 86	--- A- --- --C- --- --T	TCC CTC AGT	---	---	n.i.	J558	
Z. 89	--- A- --- A-G --C A-G --- --A	CGG GTA TGG TCA AGT	---	---	DSP2.	7183	
Z. 142	A-- -AT --- A-A --C A-G --C GGA	GGA GGG ATT ACG ACG AGT	---	---	DSP2.2	Q52	
Z. 152	--- A- --- --- --- --- --N --A	TGG GTA CGA CGG GGA AGT	---	---	DSP2.	J558	
Z. 153	--- A- --- --- --- --- -T- --- --A CTA TGG GGT AAC TAC GAG TGT	AGT TTA CTA CAA AGT	---	---	DFL16.	J558	
Z. 154	--- A- --- A-A --C C-T --- --A	AGT TTA CTA CAA AGT	---	---	DFL16.	n.i.	

Abb. 21: Nukleotidsequenzen der durch V_H-Gen replacement Rekombination entstandenen V_H=>V_HD_HJ_H- und V_HD_H=>V_HD_HJ_H-Rearrangements von einzelnen VPE/JHT-prä-B-Zellen.

Die analysierten prä-B-Zellen wurden entweder ex vivo aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen (Zelle 122 (Z.122) und Zelle 125 (Z.125)) isoliert, oder nach in vitro Differenzierung der prä-B-Zellen (Z.86, Z.89, Z.142, Z.152, Z.153, Z.154) aus pro-B-Zellen, welche von VPE/JHT-Mäusen stammten, isoliert.

Die obere Nukleotidsequenz zeigt die 3' Region des V_H-Gens und die CDR 3-Region des VDJ-PE Segments von VPE/JHT-Mäusen. Dabei ist innerhalb des 3' Bereichs der FR 3-Region des V_H-Gens das interne Heptamer (Kleinfield et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995), sowie das von Chen et al. (1995) vorgeschlagene mögliche Nonamer 12 bp stromaufwärts des Heptamers durch gepunktete Linie unterstrichen. Das verwendete D_H-Gensegment wurde identifiziert und unterstrichen, sofern es in mindestens 5 Nukleotiden mit einem bekannten D_H-Gensegment (Chang et al., 1992) übereinstimmt. Nukleotide, die nicht einem V_H-Gen, einem D_H-Gensegment oder dem J_H3-Element zugeordnet werden konnten, wurden als mögliche N- oder P-Nukleotide (Alt und Baltimore, 1982; Lafaille et al., 1989) betrachtet. Nukleotide, die einem V_H-Gen angehören könnten, jedoch auch als N-Nukleotide betrachtet werden könnten, sind kursiv dargestellt. Ferner ist die V_H-Genfamilie (Kofler et al., 1992; Mainville et al., 1996) des verwendeten V_H-Gens angegeben. Falls die Nukleotidsequenz keine Identifizierung eines D_H-Gensegments oder keine eindeutige Zuordnung eines V_H-Gens zu einer V_H-Genfamilie zuließ, wird n.i. (nicht identifiziert) angegeben.

N: Nicht identifiziertes Nukleotid. (-): Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz des VDJ-PE Gensegments.

4. DISKUSSION

4.1 Stellen pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen ein geeignetes experimentelles System zur Analyse von Auswirkungen der präBCR de novo Synthese auf B-Zellvorläufer dar?

Um zu untersuchen, ob der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen unabhängig vom Kontext des Knochenmarks vermittelt, sollte die Expression eines präBCR-Komplexes in pro-B-Zellen außerhalb des Knochenmarks *in vitro* unter verschiedenen Kulturbedingungen induziert werden.

4.1.1 Das ED-cre System erlaubt die induzierbare μ HC de novo Expression in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen

Die dazu verwendeten B-Zellvorläufer aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen erlauben durch Cre-vermittelte Rekombination der das VDJ-PE Segment flankierenden, mutierten loxP Sequenzen eine Inversion des dazwischenliegenden Gensegments, und damit die induzierbare Expression einer μ HC von einem der beiden IgH-Allele *in vitro* (s. 3.3 und 3.4). Die Analyse der B-Zellentwicklung im Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen zeigte, daß pro-B-Zellen dieser Mäuse ohne Verabreichung eines synthetischen Liganden des ED-cre Systems keine mit der verwendeten Analysemethode nachweisbaren Mengen an μ HC-Proteinen ausprägen (s. 3.1). Tatsächlich waren nicht mehr pro-B-Zellen in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen intrazellulär μ HC⁺ als der für pro-B-Zellen von JHT-Mäusen ermittelte Hintergrundwert, deren B-Zellvorläufer in Folge der deletierten J_H-Gensegmente kein V_HD_HJ_H-Rearrangement generieren und damit keine μ HC exprimieren können (Gu et al., 1993) (s. 3.1, Abb. 6). In Übereinstimmung damit ist in VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen keine signifikante prä-B-Zellpopulation detektierbar, wiederum vergleichbar mit dem in JHT-Mäusen ermittelten Hintergrundwert (s. 3.1, Abb. 5 und Tab. 1; s. 3.4).

Auch die Analyse der für 24 h ohne 4-OH-Tamoxifen kultivierten pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen ergab, daß mit 0.3-1.4% nicht mehr Zellen intrazellulär μ HC⁺ waren (s. 3.4, Abb. 13 und 16), als der mit der verwendeten Fluoreszenzfärbemethode ermittelte Hintergrundwert (s. 3.1, Abb.6). Ein ähnlich niedriger prozentualer Anteil an μ HC⁺ Zellen wurde auch bei Kultivierung von Zellen einer fötalen IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie ohne 4-OH-Tamoxifen beobachtet (s. 3.3, Abb. 11 und 12).

Die Hintergrund-Rekombination des ED-cre Systems ohne Verabreichung eines synthetischen Liganden ist also *in vivo* und *in vitro* sehr gering, was sowohl eine ungewollte, vorzeitige μ HC-Expression in B-Zellvorläufern im Kontext des Knochenmarks vor der Isolation der Zellen, als auch danach in den Negativkontrollen der *in vitro*-Kulturen verhindert.

Nach 24-stündiger Kultivierung von pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in der Gegenwart von 0.2 μ M 4-OH-Tamoxifen prägen hingegen 26-32% der Zellen intrazellulär μ HC-Proteine aus (s. 3.4). Das μ HC-Expressionsniveau ist dabei vergleichbar mit dem von intrazellulär μ HC⁺ B-Zellvorläufern (B220⁺/sIgM⁻ Zellen) aus Wt-Mäusen (s. 3.4, Abb. 13 und

16).

Da die unter 3.3 ermittelte optimale 4-OH-Tamoxifenkonzentration von 1 μM , bei der sich die höchste ermittelte Effizienz der induzierten Cre-vermittelten Rekombination mit 33-37% $c\mu\text{HC}^+$ Zellen einer IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie ergab, in Folge einer Toxizität auf ex vivo-isolierte Wt-pro-B-Zellen nicht eingesetzt werden konnte (zur Diskussion s. 4.4), wurde stattdessen eine 4-OH-Tamoxifenkonzentration von 0.2 μM verwendet. Diese geringere 4-OH-Tamoxifenkonzentration hat keinen signifikanten negativen Einfluß auf die Differenzierung und Proliferation von Wt-pro-B- bzw. Wt-prä-B-Zellen in vitro (s. 3.4; Abb. 14 und 15), und erlaubt nach 24-stündiger Kultivierung von pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen die μHC de novo Expression in 26-32% der Zellen, vergleichbar mit den unter diesen Umständen ermittelten ca. 26% $c\mu\text{HC}^+$ Zellen einer IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie.

Warum in IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinien auch unter höheren 4-OH-Tamoxifenkonzentrationen und einer zweitägigen Inkubationszeit nicht das theoretisch erreichbare Maximum der μHC de novo Synthese von 50% erreicht wurde, ist unklar. Aufgrund der das VDJ-PE Segment flankierenden, entgegengesetzt orientierten loxP Sequenzen sollte eine Cre-vermittelte Rekombination in einem Gleichgewicht beider Orientierungen des VDJ-PE Segments und damit in einer μHC de novo Synthese in maximal 50% aller Zellen resultieren (s. 3.1, Abb. 4). Der nach 4-OH-Tamoxifen-Induktion erreichte höchste prozentuale Anteil von 33-37% $c\mu\text{HC}^+$ Zellen einer IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie sollte daher aus einer Cre-vermittelten Rekombination in 66-74% aller pro-B-Zellen resultieren, und ist damit der von Schwenk et al. (1998) beobachteten 75-80%-igen Deletionseffizienz eines loxP flankierten Gens durch das Cre-EBD(G521R) Fusionsprotein ähnlich.

In Anbetracht der geringen Hintergrund-Rekombination des ED-cre Systems ohne Verabreichung eines synthetischen Liganden (s. auch Schwenk et al., 1998), erlauben B-Zellvorläufer aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen durch Cre-vermittelte Rekombination also tatsächlich eine induzierbare de novo Expression einer μHC in pro-B-Zellen außerhalb des Kontext des Knochenmarks.

4.1.2 Die vom VPE-Allel kodierte μHC kann in einem funktionellen präBCR-Komplex ausgeprägt werden

Die μHC -Expression in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen sollte zur Ausprägung eines präBCR-Komplexes führen, sofern die vom VPE-Allel kodierte μHC mit der SLC zu einem präBCR-Komplex assoziieren kann. Denn 70-80% aller pro-B-Zellen des Knochenmarks der Maus prägen die SLC-Proteine $\lambda 5$ und VpreB aus (Li et al., 1993; Karasuyama et al., 1994).

Decker et al. (1991) vermuteten, daß manche B-Zellvorläufer eine zur Assoziation mit der SLC unfähige μHC ausprägen könnten, und daß die betreffenden B-Zellvorläufer wahrscheinlich nicht zu prä-B-Zellen differenzieren können. Keyna et al. (1995) zeigten, daß manche μHC 's tatsächlich nicht mit den SLC-Proteinen $\lambda 5$ und VpreB zu einem präBCR-Komplex assoziieren

können. Die Analyse verschiedener transgener Mäuse bestätigte, daß nur solche $\mu\text{HC}'\text{s}$ eine Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen erlauben, die mit der SLC zu einem präBCR-Komplex assoziieren können: Während $V_{\text{H}}81\text{X}-\mu\text{HC}$ -transgene Mäuse, deren μHC einen präBCR bilden kann, eine normale B-Zellentwicklung in Abhängigkeit von der Expression der transgenen μHC und der SLC aufweisen (Martin et al., 1997), ist die B-Zellentwicklung in $V_{\text{H}}81\text{X}-\mu\text{HC}$ -transgenen JHT-Mäusen, deren μHC keinen präBCR bilden kann, im pro-B-Zellstadium blockiert (Kline et al., 1998). In diesen präBCR-defizienten Mäusen entwickeln sich daher weder prä-B- noch B-Zellen (Kline et al., 1998).

Neuere Studien lassen schließen, daß insgesamt nur ca. 50% aller in $\text{B}220^+/\text{c-kit}^+$ pro-B-Zellen ausgeprägten $\mu\text{HC}'\text{s}$ in einem membrangebundenen präBCR exprimiert werden können (ten Boekel et al., 1997). Die Fähigkeit einer μHC mit der SLC zu einem präBCR zu assoziieren, wird durch ihre V_{H} -Domäne bestimmt (zur Übersicht: Melchers, 1999; Melchers et al., 2000):

Während fast alle V_{H} -Domänen von $\mu\text{HC}'\text{s}$, die durch Gensegmente der 7183 V_{H} -Genfamilie kodiert werden, mit der SLC assoziieren können, können ca. 50% aller von V_{H} -Genen der J558 V_{H} -Genfamilie, und die Mehrheit der von V_{H} -Genen der Q52 V_{H} -Genfamilie kodierten V_{H} -Domänen nicht mit der SLC in einem membrangebundenen präBCR ausgeprägt werden (ten Boekel et al., 1997). V_{H} -Genfamilien unterscheiden sich also in der Fähigkeit der zugehörigen Gensegmente, eine V_{H} -Domäne zu kodieren, die mit der SLC assoziieren kann.

Zwar ist unbekannt, welche Region einer V_{H} -Domäne die Assoziation einer μHC mit den SLC-Proteinen V_{preB} und $\lambda 5$ beeinflusst, doch scheint u.a. die CDR 3-Region hierbei von Bedeutung zu sein: Die überwiegende Mehrheit der in pro-B-Zellen des Knochenmarks ausgeprägten $V_{\text{H}}81\text{X}-\mu\text{HC}'\text{s}$ ¹¹ kann nicht in einem membrangebundenen präBCR exprimiert werden, wobei diese $\mu\text{HC}'\text{s}$ zumeist von $V_{\text{H}}\text{D}_{\text{H}}\text{J}_{\text{H}}$ -Rearrangements mit insertierten N-Nukleotiden kodiert werden (ten Boekel et al., 1997). Jedoch können ca. 30% der in pro-B-Zellen der fötalen Leber ausgeprägten $V_{\text{H}}81\text{X}-\mu\text{HC}'\text{s}$ einen präBCR bilden, wobei diese $\mu\text{HC}'\text{s}$ von $V_{\text{H}}\text{D}_{\text{H}}\text{J}_{\text{H}}$ -Rearrangements ohne N-Nukleotide kodiert werden (nach Rolink et al., 2001)¹².

Während also die durch $V_{\text{H}}81\text{X}-\text{D}_{\text{H}}\text{J}_{\text{H}}$ -Rearrangements kodierten V_{H} -Domänen in Bezug auf ihre Fähigkeit, mit der SLC zu assoziieren, nur eine geringe CDR 3-Diversifizierung durch Insertionen von N-Nukleotiden und/oder P-Nukleotiden tolerieren, erlauben beispielsweise die durch Gensegmente der J558 V_{H} -Genfamilie kodierten V_{H} -Domänen diesbezüglich eine größere CDR 3-Diversität (ten Boekel et al., 1997).

Da sich V_{H} -Genfamilien in der Fähigkeit der zugehörigen Gensegmente unterscheiden, eine V_{H} -Domäne zu kodieren, die mit der SLC assoziieren kann (s. oben), sind wahrscheinlich auch andere Regionen als die CDR 3-Region einer V_{H} -Domäne für die Assoziation einer μHC mit den SLC-Proteinen V_{preB} und $\lambda 5$ entscheidend. Weil die Gerüstregionen FR 2 und FR 4 der V_{H} -Domäne wichtig für die Assoziation einer μHC mit einer konventionellen IgL-Kette zu sein scheinen, könnten diese Regionen auch einen Einfluß auf die Assoziation einer μHC mit der SLC haben (zur Übersicht: Melchers et al., 2000).

¹¹ Das $V_{\text{H}}81\text{X}$ -Gen ist das D_{H} -proximalste, funktionelle V_{H} -Gensegment in der Keimbahn der Maus (Yancopoulos et al., 1984).

¹² N-Nukleotide werden durch das Enzym TdT an den Grenzen der rekombinierten Gensegmente eingefügt (Alt & Baltimore, 1982; Desiderio et al., 1984; s. 1.1), wobei pro-B-Zellen der fötalen Leber im Gegensatz zu B-Zellvorläufern des Knochenmarks wenig oder kein TdT exprimieren (Li et al., 1993; Gilfillan et al., 1993).

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die in der Keimbahn von VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen kodierte μ HC tatsächlich mit der SLC zu einem membrangebundenen, funktionellen präBCR assoziieren kann. Die de novo Synthese einer μ HC in VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen außerhalb des Kontext des Knochenmarks sollte also auch zur Ausprägung eines präBCR-Komplexes führen.

4.1.2.1 Das $V_H D_H J_H$ -Segment von VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen erlaubt vermutlich die Ausprägung einer μ HC in einem präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche von transfizierten pro-B-Zelllinien

Bisher ist der direkte Nachweis des präBCR durch Fluoreszenzfärbung von ex vivo-isolierten murinen Knochenmarkszellen nur intrazellulär möglich (Karasuyama et al., 1994; Shonjo et al., 1994). In wieweit der präBCR auf der Zelloberfläche von murinen Knochenmarkszellen nachgewiesen werden kann, ist umstritten: Möglicherweise kann der präBCR erst nach einstündiger in vitro-Kultivierung auf der Zelloberfläche einer kleinen Population von pre-B-I- und pre-B-II-Zellen (nach Melchers et al., 1995) nachgewiesen werden (Winkler et al., 1995), obwohl Hardy et al. (2000) den präBCR unter annähernd identischen Bedingungen nicht auf der Zelloberfläche von B-Zellvorläufern detektieren konnten. Ebenso schlugen eigene Versuche, den präBCR auf in vitro-kultivierten Zellen des Knochenmarks nachzuweisen, fehl (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde das VDJ-PE Segment sowie zum Vergleich das VDJ-B1-8 Segment wie von ten Boekel et al. (1997) beschrieben in den retroviralen μ HC-Expressionsvektor pELCV kloniert (s. 3.2, Abb. 7) und der erhaltene pELCV-PE bzw. pELCV-B1-8 Vektor anschließend in die (A-MuLV)-transformierte pro-B-Zelllinie 38B9 transfiziert (s. 2.5). Der durch Transfektion abgeleitete Klon PE-CL19 prägt die vom pELCV-PE Vektor kodierte μ HC aus, während der Klon B1-8-CL2 die vom pELCV-B1-8 Vektor kodierte μ HC exprimiert. Die verwendete 38B9 pro-B-Zelllinie trägt auf beiden IgH-Allelen ein $D_H J_H$ -Rearrangement, während die IgL-Loci in Keimbahnkonfiguration vorliegen (Alt et al., 1981, 1984; Karasuyama et al., 1993). Zellen dieser pro-B-Zelllinie prägen weder eine μ HC oder $D\mu$ -Proteine, noch IgL-Ketten aus (Karasuyama et al., 1993, s. 3.2). Jedoch exprimiert die 38B9 pro-B-Zelllinie die SLC-Proteine $\lambda 5$ und VpreB im Komplex mit verschiedenen Glycoproteinen auf der Zelloberfläche (Karasuyama et al., 1993; Ohnishi et al., 2000).

Die Transfektion der 38B9 pro-B-Zelllinie mit einem μ HC-Expressionsvektor erlaubt ausgeprägte μ HC's nicht nur intrazellulär nachzuweisen, sondern darüber hinaus auch die Detektion von im präBCR-Komplex exprimierten μ HC's auf der Zelloberfläche, sofern eine zu analysierende μ HC mit der SLC assoziieren kann: Ten Boekel et al. (1997) ermittelten mit dieser Methode, daß 20 von 21 produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangements von prä-B-Zellen des Knochenmarks adulter Wt-Mäuse eine μ HC kodieren, die in einem präBCR-Komplex exprimiert werden kann. Im Gegensatz dazu kodieren 19 von 33 produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangements von pro-B-Zellen des Knochenmarks eine μ HC, die nicht in einem membrangebundenen präBCR ausgeprägt werden kann. Ten Boekel et al. (1998) konnten weiterhin mit der hier verwendeten Methode zeigen, daß in pro- und prä-B-Zellen sowie in reifen B-Lymphozyten der Milz, die zwei produktive $V_H D_H J_H$ -

Rearrangements aufweisen, nur ein IgH-Allel eine μ HC kodiert, die einen präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche ausprägen kann, während die vom zweiten IgH-Allel kodierte μ HC nicht mit der SLC assoziieren kann. Insgesamt erscheint es aufgrund dieser Ergebnisse als unwahrscheinlich, daß durch die hier und von ten Boekel et al. (1997, 1998) verwendete Methode eine zu analysierende μ HC durch die bei der Klonierung generierten Aminosäureaustausche innerhalb der FR 1-Region (s. 2.5, Abb. 3) so verändert wird, daß sie mit der SLC zu einem präBCR assoziieren kann, obwohl sie ohne die eingefügten Mutationen nicht zur präBCR-Expression fähig ist.

Bei der Klonierung des VDJ-PE und des VDJ-B1-8 Segments (beide $V_H D_H J_H$ -Rearrangements enthalten ein V_H -Gen der J558-Genfamilie) in den retroviralen μ HC-Expressionsvektor pELCV wurde die in allen bekannten funktionellen V_H -Genen der J558-Genfamilie konservierte Aminosäure Glutamin an Position 3 gegen die Aminosäure Asparaginsäure ausgetauscht, die in dieser Position nicht von den bekannten Gensegmenten der J558- V_H -Genfamilie kodiert wird (s. 2.5, Abb. 3). Alle anderen bei der Klonierung ausgetauschten Aminosäuren werden in einigen funktionellen V_H -Genen der J558-Genfamilie an entsprechender Position kodiert¹³. Aufgrund dieser Ergebnisse kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Auswirkungen die Änderungen in der Aminosäuresequenz auf die Kapazität der vom VDJ-PE bzw. vom VDJ-B1-8 kodierten μ HC mit der SLC zu assoziieren tatsächlich haben. Jedoch erscheint es aufgrund der von ten Boekel et al. (1997, 1998) publizierten Daten (s. oben) als unwahrscheinlich, daß durch die Änderungen in der Aminosäuresequenz der FR 1-Region eine nicht zur Assoziation mit der SLC fähige μ HC so verändert wird, daß sie in einem präBCR-Komplex ausgeprägt werden kann.

Die im Verlaufe dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzfärbungen mit dem präBCR-spezifischen mAk SL156 zeigten, daß der Klon PE-CL19 einen präBCR auf der Zelloberfläche ausprägt (s. 3.2, Abb. 8). Dabei bindet der präBCR-spezifische mAk SL156 ausschließlich ein von μ HC, $\lambda 5$ und VpreB gebildetes Epitop des präBCR, nicht aber freie $\lambda 5$ - und/oder VpreB-Proteine, oder IgL-Ketten auf B-Zellen von BALB/c-Mäusen und $\mu^+ \lambda^+$ B-Zellen von Ig κ -defizienten iE κ T-Mäusen (Winkler et al., 1995). Durch Fluoreszenzfärbung mit anti-Ig κ - und anti-Ig λ -Antikörpern wurde zusätzlich ausgeschlossen, daß der Klon PE-CL19 die μ HC möglicherweise zusammen mit konventionellen IgL-Ketten in einem IgM-Antikörper anstatt in einem präBCR mit der SLC auf der Zelloberfläche ausprägt (s. 3.2, Abb. 9).

Der zum Vergleich analysierte Klon B1-8-CL2 exprimiert ebenfalls einen präBCR-Komplex auf der Zelloberfläche (s. 3.2, Abb. 8 und 9), was frühere Ergebnisse bestätigt, die zeigen, daß die V_H -Domäne der μ HC des B1-8-Antikörpers mit den SLC-Proteinen $\lambda 5$ und VpreB zu einem präBCR assoziieren kann (Bornemann et al., 1997).

Die mit μ HC- und $\lambda 5$ -spezifischen mAk durchgeführten Immunpräzipitationen (s. 3.2, Abb. 10) bestätigen insgesamt die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen, daß die vom μ HC-Expressionsvektor pELCV-PE ausgeprägte μ HC und damit wahrscheinlich auch die in der Keimbahn von VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen kodierte μ HC mit der SLC zu einem

¹³ Die entsprechenden Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des Programms IgBlast des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) mit den in Keimbahn der Maus bekannten V_H -Gensegmenten verglichen.

präBCR-Komplex assoziieren kann. Die anti- $\lambda 5$ Präzipitationen von PE-CL19-Zellysaten führten allerdings zu einer deutlich geringeren Kopräzipitation von μ HC-Proteinen als in zum Vergleich durchgeführten Präzipitationen von NFs5.3 prä-B-Zellysaten (Zellen der transformierten NFs5.3 prä-B-Zelllinie [Hardy et al., 1986] exprimieren einen präBCR auf der Zelloberfläche [Karasuyama et al., 1993; Winkler et al., 1995; s. 3.2]). Eine Ursache dafür könnte sein, daß (i) die transfizierte 38B9 pro-B-Zelllinie möglicherweise deutlich weniger μ HC-Proteine vom retroviralen Vektor pELCV-PE exprimiert als endogene SLC-Proteine $\lambda 5$ und VpreB synthetisiert werden, und dadurch nur relativ wenige μ HC's im Vergleich zu den SLC-Proteinen mittels $\lambda 5$ -spezifischen mAk kopräzipitiert werden, und/oder daß (ii) die vom pELCV-PE kodierte μ HC eine qualitativ schlechtere Assoziation mit der SLC eingeht als die in der NFs5.3 prä-B-Zelllinie exprimierte μ HC. Eine vergleichende Quantifizierung der μ HC-Proteinmenge, die durch eine vollständige Präzipitation von $\lambda 5$ - und VpreB-Proteinen kopräzipitiert wird, sowie die vergleichende Quantifizierung der freien, nicht an die SLC gebundenen μ HC-Proteine in Zellysaten der beiden Klone PE-CL19 und B1-8-CL2 und der NFs5.3 prä-B-Zelllinie könnte diese Fragen klären.

Ob die Assoziation einer μ HC mit der SLC zu einem präBCR eine „Alles oder Nichts“-Reaktion ist, oder eine möglicherweise unterschiedlich starke Assoziation von in präBCR-Komplexen exprimierbaren μ HC's mit der SLC auch eine funktionelle Bedeutung hat, ist allerdings unklar. Bemerkenswerterweise führt die Differenzierung von einzelnen pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen in vitro zur Bildung unterschiedlich großer Zellgruppen mit einer Größe von 4 bis 64 Zellen (Rolink et al., 2000), was durch eine unterschiedlich starke Proliferation der Zellen in Abhängigkeit von der Qualität des jeweils ausgeprägten präBCR-Komplexes oder durch die Menge an jeweils ausgeprägten präBCR-Komplexen erklärt werden könnte (Rolink et al., 2000; Melchers et al., 2000). Melchers et al. (2000) schlugen in diesem Zusammenhang vor, daß verschieden starke Aviditäten, mit der unterschiedliche μ HC's mit der SLC assoziieren könnten, zu verschiedenen Mengen an exprimierten präBCR-Komplexen führen könnten, falls alle B-Zellvorläufer gleich viele SLC exprimieren. Unterschiedliche Mengen an ausgeprägten präBCR-Komplexen könnten eine unterschiedlich starke Proliferation der Zellen verursachen (Melchers et al., 2000). Bisher gibt es allerdings keine Evidenz für diese Hypothese.

Auch wenn der präBCR im Verlauf dieser Arbeit nicht direkt auf B-Zellvorläufern des Knochenmarks von VPE/JHT-, VPEinv/JHT, ED-cre-, B1-8i- und Wt-Mäusen nachgewiesen werden konnte, zeigen doch die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen und der Immunpräzipitationen insgesamt, daß die von den μ HC-Expressionsvektoren pELCV-PE und pELCV-B1-8 ausgeprägte μ HC und damit wahrscheinlich auch die in der Keimbahn von VPE/JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen kodierte μ HC sowie in der Keimbahn von B1-8-Mäusen kodierte μ HC mit der SLC zu einem präBCR-Komplex assoziieren kann.

4.1.2.2 Die vom VPE-Allel ausgeprägte μ HC erlaubt die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und deren proliferative Expansion

Die vom VPE-Allel ausgeprägte μ HC in VPE/JHT-Mäusen erlaubt die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die Bildung eines prä-B-Zellkompartiments, das in seiner Größe nicht

signifikant verschieden ist vom prä-B-Zellkompartiment im Knochenmark von B1-8i- und BALB/c-Mäusen. Auch die Populationen der sich daraus entwickelnden unreifen B-Zellen und ferner der reifen B-Lymphozyten im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen sind in ihrer Größe nicht signifikant verschieden von den entsprechenden Populationen in B1-8i- und Wt-Mäusen (s. 3.1, Abb. 5 und Tab. 1).

Dabei prägen, wie die Amplifikation von μ HC-Transkripten einzelner prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen ergab, ca. 90% der prä-B-Zellen (16 von 18 Zellen; s. 3.5.1 und Tab. 2), von denen ein μ HC-Transkript amplifiziert werden konnte, das VPE-Allel aus. Zwar konnte nur aus 42% aller analysierten prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen und aus 72% aller prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen ein $V_H D_H J_H$ -Rearrangement amplifiziert werden (s. 3.5.1 und Tab. 2), doch gehören die in 19 von 20 $V_H D_H J_H$ -Rearrangements einzelner Wt-prä-B-Zellen verwendeten V_H -Gene 10 von insgesamt 15 V_H -Genfamilien an. Da diesen 10 V_H -Genfamilien wohl 84-91% aller in der Keimbahn der Maus existierenden V_H -Gene angehören (Kofler et al., 1992; persönliche Mitteilung, Roy J. Riblet), und Kantor et al. (1997) darüber hinaus mit der hier zur RT-PCR von μ HC-Transkripten einzelner Zellen verwendeten Primeroligonukleotiden durch eine sehr ähnliche Methode sogar V_H -Gene aller 15 V_H -Genfamilien amplifizieren konnte, ist davon auszugehen, daß trotz einer Effizienz von 42-72% der RT-PCR-Amplifikation von μ HC-Transkripten einzelner Zellen ein repräsentatives Bild der in prä-B-Zellen von VPE/JHT- und Wt-Mäusen ausgeprägten μ HC-Transkripte erhalten wurde.

Da also die meisten der analysierten μ HC-Transkripte von prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen durch das VPE-Allel kodiert werden, und eine μ HC in Zellen dieser Mäuse nur von einem IgH-Allel ausgeprägt werden kann (das homologe IgH-Allel weist die JHT-Mutation auf), induziert die vom VPE-Allel kodierte μ HC die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und auch deren proliferative Expansion durch Ausprägung in einem funktionellen präBCR-Komplex. Denn das in VPE/JHT-Mäusen gebildete prä-B-Zellkompartiment ist in seiner Größe nicht signifikant verschieden vom prä-B-Zellkompartiment im Knochenmark von B1-8i- und Wt-Mäusen (s. oben). Daher erscheint es auch als unwahrscheinlich, daß prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen einen qualitativ schlechteren präBCR ausprägen und damit möglicherweise entscheidend weniger proliferieren würden als prä-B-Zellen der Vergleichsmäuse.

Die Analyse der μ HC-Transkripte von in vitro aus VPE/JHT-pro-B-Zellen differenzierten prä-B-Zellen, welche in vitro proliferiert haben (In 2 unabhängigen Experimenten konnten nach 3-tägiger Kultur von VPE/JHT-pro-B-Zellen 2.7 bzw. 3.3 mal mehr lebende B220⁺ Zellen isoliert werden, als am Kulturstart ausplattiert worden waren; s. 3.5), zeigte, daß mit 70% der Zellen (14 von 20 Zellen; s. 3.5.1 und Tab. 2), von denen ein μ HC-Transkript amplifiziert werden konnte, die meisten prä-B-Zellen eine vom VPE-Allel kodierte μ HC ausprägen. Da die in vitro-Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die Proliferation der prä-B-Zellen abhängig von der Expression einer μ HC in einem präBCR-Komplex ist (s. 3.4), bestätigt diese Analyse ebenfalls, daß die vom VPE-Allel ausgeprägte μ HC mit der SLC zu einem funktionellen präBCR assoziieren kann.

Warum in B-Zellvorläufern von VPE/JHT-Mäusen trotz präBCR-Expression und damit einhergehender alleler Exklusion V_H -Gen replacement Rekombinationen stattfinden, wird in 4.2 diskutiert.

Da also die vom VPE-Allel kodierte μ HC mit den SLC-Proteinen λ 5 und VpreB zu einem funktionellen präBCR-Komplex assoziieren kann, der die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen sowie die proliferative Expansion der prä-B-Zellen sowohl in vivo, als auch in vitro vermittelt, sollten pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen ein geeignetes experimentelles System zur Untersuchung der Frage, ob der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen unabhängig vom Kontext des Knochenmarks vermittelt, darstellen.

Da weiterhin ohne Verabreichung eines synthetischen Liganden des ED-cre Systems pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in vivo und in vitro keine μ HC ausprägen, wodurch die B-Zellentwicklung dieser Mäuse im pro-B-Zellstadium blockiert ist, erlaubt das ED-cre System tatsächlich die induzierbare μ HC de novo Synthese und damit auch die induzierbare präBCR de novo Synthese in pro-B-Zellen außerhalb des Kontext des Knochenmarks.

4.1.3 Die Ursache für das unterschiedliche Expressionsniveau differentiell ausgeprägter Oberflächenmarker während der B-Zellentwicklung in VPE/JHT-Mäusen im Vergleich zu Wt-Mäusen ist unklar

Das prä-B-Zellkompartiment von VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen unterscheidet sich, wie unter 4.1.2 bereits diskutiert, nicht signifikant in seiner Größe von demjenigen in Wt-Mäusen (s. 3.1, Abb. 5 und Tab. 1), jedoch deutlich in der Expressionsstärke der zur Klassifizierung der Zellen genutzten differentiell ausgeprägten Oberflächenmarker. Zwar prägen prä-B-Zellen in VPE/JHT-Mäusen CD43 schwächer und HSA sowie CD25 stärker auf der Zelloberfläche aus als pro-B-Zellen (s. 3.1, Abb. 5), wodurch die B-Zellvorläufer in pro- und prä-B-Zellen unterschieden werden konnten. Jedoch exprimieren prä-B-Zellen in VPE/JHT-Mäusen mehr CD43 als prä-B-Zellen von BALB/c- und B1-8i-Mäusen (Abb. 5V). Darüber hinaus erreichen prä-B-Zellen im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen nicht ganz die CD25-Expressionsstärke von prä-B-Zellen in Wt- oder B1-8i-Mäusen (Abb. 5U). Ebenso prägen prä-B-Zellen in VPE/JHT-Mäusen HSA weniger stark aus als vergleichbare Wt-Zellen (Abb. 5W), wobei allerdings auch prä-B-Zellen im Knochenmark von B1-8i-Mäusen ähnlich wenig HSA auf der Zelloberfläche exprimieren wie prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen (Abb. 5W). Ob diese Unterschiede in der Expressionsstärke der differentiell ausgeprägten Oberflächenmarker auf prä-B-Zellen im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen im Vergleich zu prä-B-Zellen von Wt- und B1-8i-Mäusen tatsächlich auch einen Einfluß auf die B-Zellentwicklung in VPE/JHT-Mäusen haben, ist unklar:

- (a) Die IL-2R α -Kette/CD25 ist neben der IL-2R β -Kette und der γ_c -Kette eine Untereinheit des funktionellen murinen IL-2R (zur Übersicht: Thèze et al., 1996). IL-2-defiziente Mäuse weisen eine beeinträchtigte B-Zellentwicklung auf (Demaison et al., 1998), vermutlich weil verschiedene Vorläuferzellen innerhalb der Fraktion A (nach Hardy et al., 1991) in Abhängigkeit von IL-2 proliferieren (Reya et al., 1996). Die B-Zellentwicklung im Knochenmark von IL-2R α -defizienten Mäusen ist jedoch unbeeinträchtigt (Willerford et al., 1995). Pro-B-Zellen der Fraktionen B-C prägen keine IL-2R α -Kette aus (Chen et al., 1994; Rolink et al., 1994) und scheinen IL-2-unabhängig zu sein (Reya et al., 1996), ebenso wie prä-B-Zellen, die zwar die IL-2R α -Kette ausprägen, auf deren Proliferation und Differenzierung IL-2 in vitro aber keinen Einfluß hat (Rolink et al., 1994). IL-2/IL-2R-

Interaktionen scheinen also insgesamt keinen direkten Einfluß auf das murine prä-B-Zellkompartiment zu haben, sondern möglicherweise nur auf frühe Vorläuferzellen der Fraktion A (nach Hardy et al., 1991).

- (b) Leukosialin/CD43 ist ein Sialoglycoprotein, das auf T-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, erythroiden Zellen und pro-B-Zellen sowie Plasma-B-Zellen exprimiert wird (Hardy et al., 1991). CD43 fungiert vermutlich als ein negativer Regulator der Zell-Zell-Interaktion von T-Lymphozyten und der Adhäsion von T-Zellen an Fibronectin sowie L-Selektin durch Bildung einer anti-adhäsiven Barriere auf der Zelloberfläche (Manjunath et al., 1995; Stockton et al., 1998). Die präzise Funktion von CD43 während der B-Zellentwicklung ist unklar, da sich B-Zellen in CD43-defizienten Mäusen normal entwickeln (Manjunath et al., 1995). CD43-transgene Mäuse, die CD43 konstitutiv auf Zellen der B-Zelllinie exprimieren, weisen 1.6 bis 2 mal mehr B-Zellen der Milz auf als Wt-Mäuse, was möglicherweise auf eine anti-apoptotische Wirkung von CD43 auf B-Zellen zurückzuführen ist (Dragone et al., 1995). Ob CD43 auch eine anti-apoptotische Wirkung auf pro-B- und prä-B-Zellen hat, ist unbekannt.
- (c) HSA („heat stable antigen“)/CD24 ist ein stark glycosyliertes Membranprotein, das mit zunehmender Stärke auf pro-B- und prä-B-Zellen sowie unreifen B-Zellen exprimiert wird (Hardy et al., 1991). Ein optimales HSA-Expressionsniveau entsprechend dem jeweiligen B-Zellentwicklungsstadium scheint wichtig für eine normale B-Zellentwicklung zu sein: Sowohl in HSA-transgenen Mäusen sind die Populationen von pro-B-, prä-B- und B-Zellen möglicherweise in Folge einer erhöhten Apoptoserate der Zellen (Lu & Osmond, 2000) um 30-70% verkleinert (Hough et al., 1996), als auch in HSA-defizienten Mäusen, in denen das prä-B-Zellkompartiment bzw. die Population der unreifen B-Zellen um 30-50% kleiner ist als in Wt-Mäusen (Nielsen et al., 1997). HSA könnte dabei entweder direkt über einen Signaltransduzierenden Mechanismus die Apoptoserate von Zellen der B-Zelllinie modulieren, oder indirekt über eine Veränderung der B-Zell/Stroma-Interaktion wirken (zur Übersicht: Lu & Osmond, 2000).

Die differentiell ausgeprägten Oberflächenmarker CD43 und HSA könnten also eine Funktion während der B-Zellentwicklung haben, wobei die genaue Funktion dieser Moleküle weitgehend unbekannt ist. Daher können mögliche Unterschiede im Entwicklungsstadium der prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen im Vergleich zu prä-B-Zellen von Kontrollmäusen, verursacht durch die veränderte CD25-, CD43- und HSA-Oberflächenmarkerexpression, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Umgekehrt könnte aber auch die veränderte CD25-, CD43- und HSA-Oberflächenmarkerexpression auf prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen ein unterschiedliches Entwicklungsstadium dieser Zellen reflektieren, ohne daß die veränderte Oberflächenmarkerexpression die Ursache hierfür wäre.

Wie oben erläutert, wurden B-Zellvorläufer von VPE/JHT-Mäusen durch die differentielle Ausprägung der Oberflächenmarker CD43, CD25 und HSA in pro-B- und prä-B-Zellen unterschieden. Die Tatsache, daß in VPE/JHT-Mäusen eine prä-B-Zellpopulation detektiert werden kann, die nicht in JHT- und VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen auftritt (s. 3.1, Abb. 5), bestätigt, daß Zellen dieser Population tatsächlich prä-B-Zellen sind, auch wenn diese im Vergleich zu Wt- und B1-8i-Kontrollzellen ein unterschiedliches Expressionsniveau der CD43-, HSA- und CD25-Oberflächenmarker aufweisen. Da weiterhin die Populationen der prä-B-,

unreifen B-Zellen und der reifen B-Lymphozyten im Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen in ihrer Größe nicht signifikant verschieden sind von den entsprechenden Populationen in B1-8i- und Wt-Mäusen (s. 3.1, Abb. 5 und Tab. 1), kann trotz unterschiedlichem Expressionsniveau der CD25-, CD43- und HSA-Oberflächenmarker auf prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen auf eine mit Einschränkungen normale B-Zellentwicklung in diesen Mäusen geschlossen werden.

4.2 V_H -Gen replacement Rekombinationen in VPE/JHT-Mäusen werden wahrscheinlich durch nicht allel exkludierte $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen ausgelöst

Zur Untersuchung des Einflusses von Ig μ - und IgL-Ketten auf die B-Zellentwicklung wurden in konventionellen Ig-transgenen Mäusen zumeist mehrere Kopien eines produktiven $V_H D_H J_H$ - und/oder $V_L J_L$ -Rearrangements mit den entsprechenden regulatorischen Genelementen an zufälliger Position im Genom integriert (Grosschedl et al., 1984; Rusconi & Köhler, 1985; Young et al., 1994). Dabei entsprachen Expressionsstärke und Expressionszeitpunkt konventioneller Transgene nicht unbedingt der physiologischen Situation. Diese systematischen Mängel konnten durch Generierung von Ig-Insertionsmäusen teilweise vermieden werden, in denen die endogenen J_H -Gensegmente und häufig auch das DQ52 D_H -Gensegment mittels homologer Rekombination durch ein produktiv rearrangiertes $V_H D_H J_H$ -Rearrangement ersetzt wurden. Dadurch wird eine annähernd physiologische Situation geschaffen, in der ein transgener $V_H D_H J_H$ -Genkomplex in physiologischer Position relativ zu den IgH konstanten Region kodierenden Genen im Genom integriert ist, was eine Expressionsregulation durch endogene Kontrollelemente sowie somatische Hypermutation und Klassenwechsel-Rekombinationen des modifizierten IgH-Genlocus erlaubt (Taki et al., 1993).

Allerdings werden bei der in vivo stattfindenden $V_H \Rightarrow D_H J_H$ -Rekombination die nicht im $D_H J_H$ -Rearrangement verwendeten D_H -Gensegmente deletiert (Tonegawa, 1983), während die Mehrheit der D_H -Elemente in IgHi-Mäusen stromaufwärts vom insertierten $V_H D_H J_H$ -Genkomplex zurückbleiben (Taki et al., 1993; Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996; Pelanda et al., 1997; Sonoda et al., 1997; Pewzner-Jung et al., 1998). Die in dieser Hinsicht unphysiologische Struktur der jeweiligen IgHi-Loci mit in der Keimbahn verbliebenen D_H -Gensegmenten stromaufwärts des insertierten $V_H D_H J_H$ -Genkomplexes erlaubt illegitime $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen, die das insertierte $V_H D_H J_H$ -Gensegment zerstören können ("silencing rearrangements"; Taki et al., 1995; Pewzner-Jung et al., 1998), oder durch $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen die Generierung eines neuen funktionellen $V_H D_H J_H$ -Gensegments, was zur Ausprägung eines BCR mit veränderter Antigen-Spezifität führen kann (Chen et al., 1995, 1997; Cascalho et al., 1996; Bertrand et al., 1998).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, prägt mit ca. 90% (16 von 18 Zellen; s. 3.5.1, Tab. 2) der ex vivo-isolierten prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen (aus denen ein μ HC-Transkript amplifiziert werden konnte) die überwiegende Mehrheit der Zellen das ursprüngliche VPE-Allel aus, während ca. 10% (2 von 18 Zellen) der Zellen ein durch sekundäre $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ - oder $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen entstandenes $V_H D_H J_H$ -Rearrangement in einer μ HC ausprägen. Mit 70% der Zellen prägt auch die Mehrheit der in vitro aus pro-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen differenzierten prä-B-Zellen (welche in vitro auch proliferierten) das VPE-Allel

aus (14 von 20 Zellen; s. 3.5.1 und Tab. 2), während 30% dieser Zellen (6 von 20 Zellen) ein durch sekundäre V_H -Gen replacement Rekombination entstandenes $V_H D_H J_H$ -Rearrangement in einer μ HC exprimieren.

Von insgesamt 8 durch V_H -Gen replacement Rekombinationen generierten $V_H D_H J_H$ -Rearrangements der aus VPE/JHT-Mäusen isolierten prä-B-Zellen oder in vitro aus pro-B-Zellen dieser Mäuse differenzierten prä-B-Zellen sind 6, also die Mehrheit, durch $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen entstanden (s. 3.5.1, Abb. 21). Nur 2 von 8 durch V_H -Gen replacement Rekombinationen generierte $V_H D_H J_H$ -Rearrangements sind möglicherweise durch $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen entstanden (s. 3.5.1, Abb. 21). Da beim $V_H D_H J_H$ -Rekombinationsprozeß neben N-Nukleotid- und P-Nukleotid-Insertionen auch Deletionen in Folge von Exonukleaseaktivität auftreten, können alle durch sekundäre IgH-Rekombinationen generierten $V_H D_H J_H$ -Genkomplexe durch sekundäre $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen entstanden sein, wobei jedoch ein verwendetes D_H -Gensegment nicht als ein solches eindeutig identifiziert werden konnte, falls seine Sequenz kürzer als 5 bp ist (s. 3.5.1, Tab. 2).

80-90% aller bekannten V_H -Gensegmente weisen ein internes, relativ konserviertes Heptamer am 3'-Ende auf (Chen et al., 1995; Fanning et al., 1998), das fast identisch mit der Heptamersequenz von RSS 5' der D_H -Gensegmente ist (Reth et al., 1986). Interne Heptamere können als kryptische RSS sowohl $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ replacement Rekombinationen (Kleinfeld et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996) als auch $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen vermitteln (Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996; Bertrand et al., 1998; Fanning et al., 1998). Weiterhin können auch andere kryptische RSS stromaufwärts eines V_H -Gens oder innerhalb davon sekundäre IgH-Rekombinationen vermitteln (Taki et al., 1995; Cascalho et al., 1996; Bertrand et al., 1998).

Bei allen hier beobachteten V_H -Gen replacement Rekombinationen könnte das am 3' Ende des im VDJ-PE Segment verwendeten V_H -Gens (welches zur J558 V_H -Genfamilie gehört) vorhandene interne Heptamer (Kleinfeld et al., 1986; Reth et al., 1986; Chen et al., 1995), möglicherweise zusammen mit einem stromaufwärts gelegenen Nonamer (Chen et al., 1995), als kryptische RSS verwendet worden sein, denn in allen entstandenen $V_H D_H J_H$ -Rearrangements ist noch die ursprüngliche Verbindungsregion (CDR 3-Region) des VDJ-PE Segments stromabwärts vom V_H -Genende mit den ursprünglichen N-Nukleotid-Insertionen identifizierbar (Abb. 21). Da allerdings nur in einem $V_H D_H J_H$ -Rearrangement (Z. 89) auch die 5 bp lange Sequenz 5'-CAAGT-3' stromabwärts vom ursprünglichen internen Heptamer des VPE-Allels noch vorhanden ist, kann für die Mehrheit der Rearrangements nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob tatsächlich das interne Heptamer als kryptische RSS verwendet worden ist (Abb. 21).

In allen hier analysierten V_H -Gen replacement Rekombinationen treten N-Nukleotid-Insertionen auf, was in Einklang mit früheren Beobachtungen steht (Taki et al., 1995; Chen et al., 1995; Cascalho et al., 1996; Bertrand et al., 1998; Pewzner-Jung et al., 1998). Da N-Nukleotide während des Rekombinationsprozesses durch das Enzym TdT in $V_H D_H J_H$ -Rearrangements eingefügt werden (Alt & Baltimore, 1982; Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993) und dieses Enzym wahrscheinlich nur in pro-B-Zellen, nicht aber in prä-B- oder unreifen B-Zellen des Knochenmarks exprimiert wird (Li et al., 1993; Wasserman et al., 1997; zur Übersicht: Hardy et

al., 2000), wurde vermutet, daß V_H -Gen replacement Rekombinationen wahrscheinlich nicht im Rahmen von Eliminierungen autoreaktiver B-Zell-Rezeptoren durch receptor editing (zur Übersicht: Nemazee, 2000) auftreten, sondern zur Diversifizierung des BCR-Repertoires dienen könnten (Taki et al., 1995; Chen et al., 1995, 1997; Cascalho et al., 1996; zur Übersicht: Nemazee, 2000). So wurden „silencing rearrangements“ und V_H -Gen replacement Rekombinationen sowohl in IgHi-Mäusen mit einem transgenen autoreaktiven BCR beobachtet (Chen et al., 1995, 1997; Pewzner-Jung et al., 1998), als auch in IgHi-Mäusen, die ein Transgen für einen vermutlich nicht autoreaktiven BCR tragen (Taki et al., 1995; Cascalho et al., 1996).

Weiterhin konnten Taki et al. (1995) direkt demonstrieren, daß sekundäre IgH-Rekombinationen bereits in pro-B-Zellen stattfinden können, d.h. in einem Entwicklungsstadium, bevor die Zellen einen potentiell autoreaktiven BCR ausdrücken können.

Die Anwesenheit von N-Nukleotid-Insertionen in allen hier analysierten durch V_H -Gen replacement Rekombinationen entstandenen $V_H D_H J_H$ -Rearrangements der prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen spricht für das Stattfinden sekundärer IgH-Rekombinationen in einem BCR-unabhängigen pro-B-Zellstadium.

Das pro-B-Zellkompartiment in VPE/JHT- und B1-8i-Mäusen weist 50-70% weniger B-Zellvorläufer der Fraktionen B-C' auf als das von BALB/c-Mäusen (s. 3.1, Tab. 1), was das Ergebnis einer beschleunigten B-Zellentwicklung durch die wahrscheinlich relativ frühe Expression einer μ HC in pro-B-Zellen von μ HC-transgenen Mäusen und IgH-Insertionsmäusen sein könnte (Era et al., 1991; Chang et al., 1995; Sonoda et al., 1997; s. 3.1). Allerdings ist das pro-B-Zellkompartiment in VPE/JHT-Mäusen signifikant größer als in B1-8i-Mäusen, es weist ca. 2 mal mehr pro-B-Zellen der Fraktionen B-C' auf als B1-8i-Mäuse (s. 3.1, Tab. 1). Dies könnte ein weiteres Indiz für die wahrscheinlich schon in pro-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen stattfindenden V_H -Gen replacement Rekombinationen sein, die die Entwicklung der betroffenen pro-B-Zellen verzögern und damit zu einem größeren pro-B-Zellkompartiment der Fraktionen B-C' führen könnten. Auch T15i-Mäuse, in deren pro-B-Zellen sekundäre IgH-Rekombinationen ablaufen (Taki et al., 1995), weisen ein größeres pro-B-Zellkompartiment als B1-8i-Mäuse auf, in denen möglicherweise in Folge des mutierten internen Heptamers des VDJ-B1-8 Segments keine sekundären IgH-Rekombinationen beobachtet wurden (Sonoda et al., 1997).

Auch wenn sekundäre IgH-Rekombinationen in VPE/JHT-Mäusen theoretisch im Rahmen von Eliminierungen autoreaktiver BCR durch receptor editing (Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993; Radic et al., 1993) auftreten könnten (Chen et al., 1995, 1997; zur Übersicht: Nemazee, 2000), und eine mögliche Autoreaktivität von B-Lymphozyten in diesen Mäusen nicht direkt ausgeschlossen werden kann, scheinen V_H -Gen replacement Rekombinationen in VPE/JHT-Mäusen aus den genannten Gründen bereits in pro-B-Zellen abzulaufen.

Ein Grund für das Auftreten sekundärer IgH-Gen-Rearrangements könnte die Unfähigkeit einer in pro-B-Zellen ausgeprägten μ HC sein, mit der SLC zu assoziieren (Marshall et al., 1996; ten Boekel et al., 1997). Die betreffenden B-Zellvorläufer können keinen präBCR ausdrücken, wodurch in Folge der ausbleibenden allelen Exklusion (s. 1.3) sekundäre IgH-Rekombinationen stattfinden könnten.

Da die vom VPE-Allel kodierte μ HC mit der SLC zu einem funktionellen präBCR-Komplex assoziieren kann (s. 4.1.2), sollten V_H -Gen replacement Rekombinationen in VPE/JHT-Mäusen jedoch durch andere Faktoren ausgelöst werden.

B1-8i/T15i-Mäuse sind beispielhaft für IgHi-Mäuse, in denen sekundäre IgH-Rekombinationen trotz vermittelter alleler Exklusion stattfinden: In einem signifikanten Anteil der B-Zellen von T15i/B1-8i-Mäusen in denen beide μ HC's ausprägt werden können, wird selektiv das T15i-Allel durch „silencing rearrangements“ inaktiviert (Sonoda et al., 1997), obwohl die vom B1-8i-Allel ausgeprägte μ HC einen präBCR bilden (s. 3.2 und 4.1.2; Bornemann et al., 1997) und sehr gut allele Exklusion vermitteln kann (ca. 98% der B-Zellen in B1-8i/Wt-Mäusen prägen nur den B1-8i IgM-Allotyp aus; Sonoda et al., 1997).

Da $D_H \Rightarrow J_H$ -Rearrangements nicht wie $V_H \Rightarrow D_H J_H$ -Rearrangements allel exkludiert werden (zur Übersicht: Storb, 1987) ist es möglich, daß die beobachteten sekundären IgH-Gen-Rearrangements in prä-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen durch nicht allel exkludierte $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen mit anschließender $V_H \Rightarrow D_H D_H J_H$ -Rekombination in B-Zellvorläufern dieser Mäuse entstanden sind. Dieser Mechanismus wurde als mögliche Ursache für die in T15i-Mäusen beobachteten sekundären IgH-Rekombinationen vorgeschlagen (Taki et al., 1995), und könnte erklären, warum die in VPE/JHT-prä-B-Zellen beobachteten sekundären IgH-Rekombinationen überwiegend $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rearrangements sind. $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen können nur in Ig-Insertionsmäusen aufgrund der unphysiologischen Struktur der jeweiligen IgHi-Loci mit in der Keimbahn verbliebenen D_H -Gensegmenten stromaufwärts des insertierten $V_H D_H J_H$ -Genkomplexes entstehen. Vermutlich sind $V_H D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen in pro-B-Zellen von VPE/JHT-Mäusen auf die unphysiologische Struktur des IgHi-Locus in Verbindung mit nicht allel exkludierten $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen zurückzuführen, und werden wahrscheinlich nicht durch äußere Faktoren induziert.

Erstaunlicherweise differieren mutante IgHi-Loci mit insertierten $V_H D_H J_H$ -Rearrangements relativ stark in ihrer Stabilität: Während ca. 98% aller B-Zellen des Knochenmarks von B1-8i-Mäusen, ca. 95% dieser B-Lymphozyten von 3-83 IgHi-Mäusen (im nicht autoreaktiven Hintergrund), und ca. 90% dieser B-Zellen von 17.2.25 IgHi-Mäusen den IgM-Allotyp des mutierten IgHi-Locus ausprägen, exprimieren nur ca. 50% dieser B-Lymphozyten von T15i-Mäusen den IgM-Allotyp des mutierten IgHi-Locus (Sonoda et al., 1997; Pelanda et al., 1997; Cascalho et al., 1996; Bertrand et al., 1998; Taki et al., 1995). Da wahrscheinlich ca. 90% der prä-B-Zellen des Knochenmarks von VPE/JHT-Mäusen die vom VPE-Allel kodierte μ HC ausprägen, ist davon auszugehen, daß auch ein ähnlich hoher Anteil der B-Lymphozyten des Knochenmarks die μ HC vom ursprünglichen VPE-Allel ausprägen. Damit gehört der IgHi-Locus von VPE/JHT-Mäusen im Vergleich zu den IgHi-Loci anderer IgH-Insertionsmäuse zu den stabilen IgHi-Loci.

Möglicherweise wird die Stabilität eines mutanten IgHi-Locus durch die Fähigkeit des insertierten $V_H D_H J_H$ -Rearrangements im pro-B-Zellstadium als Substrat für $D_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ - und $V_H \Rightarrow V_H D_H J_H$ -Rekombinationen zu dienen, bestimmt (Sonoda et al., 1997).

4.3 Der präBCR vermittelt die proliferative Expansion der prä-B-Zellen unabhängig von IL-7 oder erlaubt deren Proliferation bei geringer IL-7-Konzentration

Es ist bekannt, daß die Ausprägung eines membrangebundenen präBCR-Komplexes in verschiedener Hinsicht von essentieller Bedeutung für die frühe B-Zellentwicklung ist:

- Die Analyse von Mäusen, deren B-Zellvorläufer keinen präBCR auf der Zelloberfläche ausprägen können, zeigte, daß die Expression eines membrangebundenen präBCR-Komplexes die Voraussetzung für die Differenzierung von pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen ist (Kitamura et al., 1991; Kitamura et al., 1992; Ehlich et al., 1993; Karasuyama et al., 1994; Martin et al., 1997; Kline et al., 1998; s. 1.3, 1.4 und 4.1.2).
- Die Expression einer μ HC in einem präBCR vermittelt die Inhibition weiterer $V_H \Rightarrow D_H J_H$ -Rekombinationen auf dem homologen IgH-Allel (allele Exklusion; Kitamura & Rajewsky, 1992; Löffert et al., 1996; s. 1.3).
- Da das prä-B-Zellkompartiment im Knochenmark von Wt-Mäusen 5-7 mal größer ist als das gesamte pro-B-Zellkompartiment, und 60-70% der intrazellulär μ HC- und SLC-ausprägenden prä-B-Zellen in der S/G₂ oder M-Phase des Zellzyklus sind (im Gegensatz dazu befinden sich nur 20-30% der pro-B-Zellen in der S/G₂ oder M-Phase des Zellzyklus), durchlaufen prä-B-Zellen eine Phase der proliferativen Expansion, wodurch eine entsprechend große prä-B-Zellpopulation generiert wird (Karasuyama et al., 1994; Melchers et al., 1994; s. 1.4).

Pro-B-Zellen differenzieren also in Folge der präBCR-Expression zu prä-B-Zellen und proliferieren. Unbekannt ist allerdings, ob die präBCR-Expression per se die Differenzierung und die proliferative Expansion der prä-B-Zellen vermittelt, oder diese von im Knochenmark exprimierten Zytokinen wie zum Beispiel IL-7 und/oder anderen Faktoren abhängt.

Zahlreiche in vitro- und in vivo-Analysen zeigten, daß der Kontakt zu Stromazellen und IL-7/IL-7R-Interaktionen die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von B-Zellvorläufern regulieren (zur Übersicht: Candeias et al., 1997; DiSanto & Rodewald, 1998; Stoddart et al., 2000).

In vitro proliferieren pro-B-Zellen in Abhängigkeit von IL-7 und dem Kontakt zu Stromazellen (Hayashi et al., 1990; Era et al., 1991, 1994; Rolink et al., 1991a; Reichman-Fried et al., 1993). Doch IL-7 hat nicht nur einen positiven Einfluß auf die Proliferation von pro-B-Zellen, sondern auch eine anti-apoptotische Wirkung auf diese B-Zellvorläufer. Beispielsweise sterben Zellen verschiedener pro-B-Zelllinien nach IL-7-Entzug durch Apoptose (Rolink et al., 1991a; Borzillo et al., 1992; Griffiths et al., 1994). Ferner weisen pro-B-Zellen von IL-7-defizienten Mäusen einen höheren Anteil an apoptotischen Zellen auf und haben eine deutlich höhere Apoptose-Eintrittsrate als Wt-pro-B-Zellen. Im Gegensatz dazu weisen pro-B-Zellen von IL-7-transgenen Mäusen einen geringeren Anteil an apoptotischen Zellen auf und zeigen in vitro eine deutlich geringere Apoptose-Eintrittsrate als pro-B-Zellen von Wt-Mäusen (Lu & Osmond, 1997; Lu et al., 1999; zur Übersicht: Lu & Osmond, 2000).

Da B-Zellvorläufer, die keinen präBCR ausprägen können, vermutlich durch Apoptose sterben, könnte die Expression eines präBCR-Komplexes zur Transduktion anti-apoptotischer Signale

führen (Fang et al., 1996; Young et al., 1997; Lu & Osmond, 1997, 2000; Stoddart et al., 2000). Möglicherweise vermittelt der präBCR die gesteigerte Expression des anti-apoptotischen Proteins bcl-x_L in prä-B-Zellen (Ma et al., 1995; Motoyama et al., 1995; Fang et al., 1996; 1998; zur Übersicht: Stoddart et al., 2000; s. 1.4), daß verschiedene Apoptose-induzierende Signalkaskaden hemmt (zur Übersicht: Newton & Strasser, 2001).

Verschiedene Analysen lassen vermuten, daß nicht nur pro-B-Zellen sondern auch prä-B-Zellen IL-7 zur fortgesetzten Proliferation und/oder zum Überleben in vitro benötigen (Namen et al., 1988; Hayashi et al., 1990; Era et al., 1991, 1994; Hardy et al., 1991; Reichman-Fried et al., 1993; s. 1.4).

In IL-7-, IL-7R α - und γ_c -defizienten Mäusen ist die B-Zellentwicklung in der Transition von pro-B-Zellen ins prä-B-Zellstadium blockiert (Peschon et al., 1994; von Freeden-Jeffrey et al., 1995; DiSanto et al., 1995b; Corcoran et al. 1998), wie auch in Wt-Mäusen nach Injektion von anti-IL-7- oder anti-IL-7R-Antikörpern (Grabstein et al., 1993; Sudo et al., 1993; Era et al., 1994). Ferner führt die Überexpression von IL-7 in IL-7-transgenen Mäusen zu einem insgesamt vergrößerten B-Zellkompartiment (Ceredig et al., 1999).

Die Inhibition der B-Zellentwicklung in IL-7-, IL-7R α - und γ_c -defizienten Mäusen in der Transition von pro-B- zu prä-B-Zellen könnte die Folge einer teilweise inhibierten V_H=>D_HJ_H-Rekombination (Corcoran et al., 1996, 1998) und eines stark reduzierten Zellüberlebens und/oder einer inhibierten proliferativen Expansion sein.

Der präBCR könnte anti-apoptotische Signale transduzieren, während die Proliferation der prä-B-Zellen möglicherweise von IL-7 abhängig ist. Ebenso könnte der präBCR anti-apoptotische Signale transduzieren und die Proliferation der prä-B-Zellen vermitteln, während IL-7 einen zusätzlichen positiven Effekt auf das Überleben und/oder die weitere Expansion der prä-B-Zellen haben könnte.

In dieser Arbeit werden Ergebnisse präsentiert, die zeigen, daß pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen in Folge der präBCR-Expression in vitro zu prä-B-Zellen differenzieren und eine Phase der proliferativen Expansion durchlaufen, ohne daß es der Zugabe von Stromazellen oder von Zytokinen bedarf:

Pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen differenzieren in vitro während einer 4-tägigen Kultur ohne Stromazellen und ohne die Zugabe von Zytokinen zu 37-45% prä-B-Zellen und 55-63% B-Lymphozyten (s. 3.4, Abb. 14). Die Differenzierung geht mit einer proliferativen Expansion von μ HC⁺ B-Zellvorläufern einher, da zu Kulturbeginn ca. 30% der isolierten pro-B-Zellen eine μ HC ausgeprägt haben (s. 3.1, Abb. 6), während nach 4-tägiger Kultur fast alle lebenden B220⁺ Zellen μ HC-Proteine exprimieren (90-95% aller B220⁺ Zellen waren intrazellulär μ HC⁺ oder sIgM⁺; s. 3.4, Abb. 14), und insgesamt ca. 1.4 mal mehr lebende B220⁺ Zellen aus den Kulturen isoliert werden konnten als zu Beginn an pro-B-Zellen ausplattiert wurden (Abb. 15).

Pro-B-Zellen aus λ 5T-Mäusen differenzieren hingegen auch in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen nicht oder nur mit einer sehr geringen Effizienz in vitro zu prä-B-Zellen und B-Zellen (s. 3.4, Abb. 17), wobei nach 4-tägiger Kultur in der Gegenwart von Stromazellen nur ca.

30% lebende B220⁺ Zellen der ursprünglich ausplattierten Zellen isoliert werden konnten, 5-6 mal weniger als von unter gleichen Bedingungen kultivierten pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen (Abb. 15).

Wie die Ergebnisse der Kulturen von λ 5T-pro-B-Zellen zeigen, ist die beobachtete in vitro-Differenzierung der pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen zu prä-B- und B-Lymphozyten nicht nur von der Expression einer μ HC, sondern von der Ausprägung eines präBCR abhängig. Selbst unter der Annahme, daß 100% der Wt-pro-B-Zellen im Verlaufe der Kultur eine μ HC ausgeprägt haben könnten, wären nur ca. 50% der pro-B-Zellen zur Ausprägung eines präBCR in vitro fähig gewesen. Denn ca. 50% aller in pro-B-Zellen exprimierten μ HC's können nicht in einem membrangebundenen präBCR ausgeprägt werden (ten Boekel et al., 1997). Da nach 4-tägiger Kultur ohne IL-7 und ohne Stromazellen ca. 1.4 mal mehr prä-B- und B-Lymphozyten isoliert werden konnten als zu Kulturbeginn an pro-B-Zellen ausplattiert wurde, und nur maximal 50% aller ausplattierten B-Zellvorläufer zu prä-B-Zellen differenziert sein können, müssen die entstandenen prä-B-Zellen proliferiert haben.

Da μ HC⁻ Wt-pro-B-Zellen in vitro eine sehr hohe Apoptose-Eintrittsrate von ca. 9%/h aufweisen, so daß nach 4-6-stündiger Kultivierung von μ HC⁻ pro-B-Zellen 35-50% aller Zellen durch Apoptose sterben (Lu & Osmond, 1997; zur Übersicht: Lu & Osmond, 2000), ist anzunehmen, daß weniger als 100% aller ausplattierten pro-B-Zellen im Verlaufe des Kulturbeginns eine μ HC und damit weniger als 50% einen präBCR ausprägen konnten. Somit sollten tatsächlich weniger als 50% der ausplattierten pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen in vitro zu prä-B-Zellen differenziert sein und proliferiert haben.

Da die de novo Expression eines präBCR in pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in vitro nicht die Differenzierung zu prä-B-Zellen induziert, differenzieren vermutlich nur solche Wt-pro-B-Zellen in vitro zu prä-B-Zellen, die bereits in vivo einen präBCR ausgeprägt haben (s. 3.4 und 4.4). Da ca. 30% der pro-B-Zellen im Knochenmark von Wt-Mäusen intrazellulär μ HC⁺ sind, sollten ca. 15% aller aus dem Knochenmark isolierten B-Zellvorläufer bereits in vivo einen präBCR-Komplex ausgeprägt haben (ten Boekel et al., 1997). Die daraus in vitro differenzierten prä-B-Zellen müßten sich im Zeitraum von 4 Tagen 3-4 mal geteilt haben, um die beobachtete Zellmenge der lebend aus Kultur isolierten prä-B- und B-Zellen zu ergeben.

Die Differenzierung der pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen und deren proliferative Expansion findet in vitro ohne die Zugabe anderer Zellen (wie z.B. Stromazellen) und ohne die Zugabe von Zytokinen statt. Da die Ausgangspopulation der isolierten pro-B-Zellen zu $\geq 95\%$ aus B220⁺ Zellen und zu $\geq 93\%$ tatsächlich aus pro-B-Zellen bestand (s. 3.4, Abb. 13 und 16), ist eine signifikante Kontamination mit IL-7 produzierenden B220⁻ Stromazellen des Knochenmarks unwahrscheinlich, jedoch kann eine geringe IL-7-Konzentration in den gezeigten in vitro-Experimenten nicht ausgeschlossen werden.

IL-7 wird von Stromazellen des Knochenmarks, des Thymus, der fötalen Leber, der Tonsillen (Namen et al., 1988; Gimble et al., 1989; Sakata et al., 1990; Witte et al., 1993; Lisignoli et al., 1996) und von Epithelzellen der Haut sowie des Darms ausgeprägt (Heufler et al., 1993; Watanabe et al., 1995). Eine IL-7-Expression konnte in B-Zellen von Patienten mit chronischer lymphozytärer Leukämie („CLL“) und in Burkitt-Lymphomzelllinien, nicht aber in normalen B-Zellen detektiert werden (Frishman et al., 1993; Benjamin et al., 1994). Funk et al. (1995)

konnten die Ausprägung von IL-7 zwar in Stromazellen des Knochenmarks von Wt-Mäusen, jedoch nicht in B-Zellvorläufern oder B-Zellen nachweisen. Eine autokrine IL-7-Expression durch B-Zellvorläufer ist nicht bekannt (Funk et al., 1995; Rich, 1997; Rolink et al., 2000) und erscheint unwahrscheinlich (Funk et al., 1995; Stephan et al., 1998), sie kann allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt lassen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse vermuten, daß der präBCR die proliferative Expansion der prä-B-Zellen unabhängig von IL-7 vermittelt, oder daß prä-B-Zellen nur eine geringe IL-7-Konzentration zur Proliferation benötigen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß nur solche pro-B-Zellen in vitro unabhängig von Zytokinen und Stromazellen zu prä-B-Zellen differenzieren und proliferieren, die bereits im Kontext des Knochenmarks einen präBCR ausgeprägt haben, und schon in vivo die zum Eintritt in die Phase der proliferativen Expansion eventuell nötigen kostimulierenden Faktoren wie z.B. IL-7 gebunden haben (s. 4.4).

Diese Ergebnisse werden von den von Rolink et al. (2000) kürzlich publizierten Daten bestätigt: Rolink et al. zeigten, in zu den hier durchgeführten analogen Experimenten, daß CD19⁺/c-kit⁺/slgM⁻ pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen in vitro während einer 4-tägigen Kultur ohne Stromazellen und ohne Zugabe von IL-7 zu ca. 50% prä-B-Zellen und ca. 50% B-Zellen differenzieren. Dabei konnten auch unter Zusatz von Antikörpern, die IL-7/IL-7R-Interaktionen blockieren, ca. 2 mal mehr lebende Zellen nach 4-tägiger Kultur isoliert werden als an pro-B-Zellen zu Beginn ausplattiert wurde. Rolink et al. folgerten aufgrund der Abnahme der spezifischen Fluoreszenzintensität der mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu Kulturbeginn markierten Zellen, daß die proliferierenden Zellen sich durchschnittlich 3 bis 4 mal teilen. Pro-B-Zellen aus λ 5T-Mäusen differenzieren, wie auch in dieser Arbeit gezeigt (s. oben), nicht oder nur mit einer sehr geringen Effizienz zu prä-B- und B-Zellen, obwohl ca. 40% der B220⁺ Zellen nach 4-tägiger Kultur intrazellulär μ HC-Proteine ausprägen (Rolink et al., 2000). Auch proliferieren λ 5T-pro-B-Zellen in vitro nicht in einem signifikanten Ausmaß, da die meisten Zellen nach 4-tägiger Kultur die gleiche spezifische Fluoreszenzintensität aufweisen wie nach Markierung der Zellen zu Kulturbeginn (Rolink et al., 2000).

Dies zeigt, daß die kultivierten Wt-pro-B-Zellen nicht in einem signifikanten Ausmaß vor der Differenzierung zu prä-B-Zellen proliferieren, sondern nur nach Ausprägung des präBCR eine Phase der proliferativen Expansion durchlaufen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse der Kokulturen von pro-B-Zellen mit Stromazellen oder Knochenmarkszellen von RAG-2^{del/del}-Mäusen lassen vermuten, daß IL-7 einen positiven Effekt auf die Proliferation und/oder das Überleben von pro-B und/oder prä-B-Zellen hat:

In Kokulturen von Wt-pro-B-Zellen mit Stromazellen werden geringfügig mehr prä-B-Zellen und B-Lymphozyten generiert als in Kulturen von pro-B-Zellen ohne Stromazellen (s. 3.4, Abb. 15). Die Sezernierung von IL-7 durch ST-2 Stromazellen (Sudo et al., 1989; Rolink et al., 1991a) könnte Ursache für ein gesteigertes Überleben und/oder Proliferation sowohl der kultivierten pro-B-Zellen als auch der daraus differenzierten prä-B-Zellen sein.

Die Kokultur von Wt-pro-B-Zellen mit Stromazellen und einer Einzelzellsuspension des Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen führt zur Generierung von ca. 2 mal mehr prä-B-Zellen und B-Lymphozyten als aus vergleichbaren Kulturen nur mit ST-2 Stromazellen (s. 3.4, Abb. 15), wobei sich prä-B-Zellen und B-Lymphozyten nur aus den kultivierten Wt-pro-B-Zellen, nicht aber aus pro-B-Zellen des zur Kokultur verwendeten RAG-2^{del/del}-Knochenmarks entwickeln können (s. 3.4, Abb. 16). Das von Stromazellen des RAG-2^{del/del}-Knochenmarks sezernierte IL-7 und/oder andere kostimulierende Faktoren (Era et al., 1991; Marshall et al., 1998) könnten sowohl das Überleben und die Proliferation von pro-B-Zellen als auch von prä-B-Zellen positiv beeinflussen.

Weiterhin beobachteten Rolink et al. (2000) bei Kultivierung von pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen mit IL-7 die Entstehung von 2-3 mal mehr prä-B- und B-Zellen als bei vergleichbaren Kulturen ohne zusätzlichem IL-7.

Marshall et al. (1998) und Stoddart et al. (2000) zeigten, daß pro-B-Zellen nur in Gegenwart einer relativ hohen IL-7-Konzentration proliferieren können, während prä-B-Zellen bereits bei einer ca. tausendfach geringeren IL-7-Konzentration proliferieren. Daher schlugen Marshall et al. (1998; zur Übersicht: Stoddart et al., 2000) vor, daß die Expression eines präBCR-Komplexes möglicherweise zur Modulation des zur Proliferation nötigen IL-7 Konzentrations-Schwellenwertes in prä-B-Zellen führt. Dadurch könnten in Abhängigkeit von der lokalen IL-7-Konzentration des Stromazellnetzwerkes im Knochenmark selektiv B-Zellvorläufer nach präBCR-Expression eine proliferative Expansion bei niedriger IL-7-Konzentration durchlaufen, während pro-B-Zellen unter identischen Bedingungen bei geringer IL-7-Konzentration nicht proliferieren würden (Marshall et al., 1998; zur Übersicht: Stoddart et al., 2000).

Das von Marshall et al. (1998) vorgeschlagene Szenario scheint in Anbetracht der Tatsache, daß im Rahmen dieser Arbeit eine geringe IL-7-Konzentration in den pro-B-Zellkulturen nicht ausgeschlossen werden kann, zur Erklärung der hier und von Rolink et al. (2000) publizierten Ergebnisse durchaus geeignet zu sein:

Die kultivierten B-Zellvorläufer, die eine μ HC mit der SLC in einem präBCR-Komplex ausprägen, differenzieren zu prä-B-Zellen. Die präBCR-Expression induziert vermutlich anti-apoptotische Signale und eine Herabsetzung des IL-7-Konzentrations-Schwellenwertes, wodurch prä-B-Zellen bei geringer IL-7-Konzentration proliferieren könnten.

Nach einigen Zellteilungen differenzieren große, sich teilende prä-B-Zellen dann ins Entwicklungsstadium der kleinen, IL-7-unreaktiven prä-B-Zellen (Hardy et al., 1991; Löffert et al., 1994; Marshall et al., 1998), die sich nach erfolgreicher IgL-Rekombination und mit der Ausprägung eines BCR zu unreifen B-Lymphozyten entwickeln können.

Insgesamt scheint also das Überleben, die Differenzierung und die proliferative Expansion von B-Zellvorläufern mit einer funktionellen μ HC durch das Zusammenspiel von präBCR-Expression und IL-7 kontrolliert zu werden (Carsetti et al., 2000).

4.4 Die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen scheint vom Kontext des Knochenmarks abhängig zu sein

Nach der Entdeckung, daß pro-B-Zellen nur nach der Expression eines präBCR zu prä-B-Zellen differenzieren können, wurde vorgeschlagen, daß der präBCR-Komplex möglicherweise zur Initiierung von präBCR-vermittelten Signalen einen Liganden auf Stromazellen oder anderen Zellen des Knochenmarks binden muß (Melchers et al., 1993; Ye et al., 1996; Bosma et al., 1999).

Allerdings wurde bis heute ein präBCR-Ligand nicht identifiziert. Unterschiedliche experimentelle Ansätze ergaben vielmehr indirekte Evidenzen, die sowohl für als auch gegen die Existenz eines präBCR-Liganden sprechen:

Beispielsweise führt die Kreuzvernetzung des präBCR auf A-MuLV-transformierten prä-B-Zelllinien und IL-7-abhängigen prä-B-Zelllinien mittels anti- μ HC-, anti-Ig β - oder anti- λ 5-Antikörpern zur Initiierung von IgL-Rekombinationen (Tsubatha et al., 1992), zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Takemori et al., 1990; Nomura et al., 1991; Misener et al., 1991; Nakamura et al., 1993), oder zur Änderung des Phosphorylierungsmusters von zytoplasmatischen Proteinen (Brouns et al., 1993; Matsuo et al., 1993; Kato et al., 2000). Ferner exprimieren ex vivo-isolierte prä-B-Zellen aus dem Knochenmark von μ HC-transgenen RAG-2T-Mäusen nach Kreuzvernetzung des präBCR verstärkt den Aktivierungsmarker CD69 (Young et al., 1997).

Diese Daten spiegeln zum einen die Funktionalität des präBCR-Komplexes als Signaltransduzierender Rezeptor wider. Daß der präBCR für eine normale B-Zellentwicklung tatsächlich Signale transduzieren muß, wird dadurch deutlich, daß pro-B-Zellen in Folge einer Defizienz Signaltransduzierender Moleküle wie zum Beispiel der Tyrosin-Kinase Syk oder des „B cell linker protein“ (BLNK) nicht zu prä-B-Zellen differenzieren (Turner et al., 1995; Cheng et al., 1995; Jumaa et al., 1999; Pappu et al., 1999; Minegishi et al., 1999b; zur Übersicht: Muljo & Schlissel, 2000; Conley et al., 2000).

Zum anderen läßt die Initiierung von IgL-Rekombinationen, die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Änderung des Phosphorylierungsmusters von zytoplasmatischen Proteinen nach präBCR-Kreuzvernetzung auf prä-B-Zelllinien auch eine Signal-Transduktion durch den präBCR nach Bindung eines Liganden als möglich erscheinen.

So schlugen Ye et al. (1996) vor, daß prä-B-Zellen aufgrund der Fähigkeit der V_H -Domäne, einer im präBCR ausgeprägten μ HC einen möglichen Liganden zu binden, für die weitere Differenzierung und Proliferation selektioniert werden. Denn bestimmte produktive $V_H12-D_HJ_H$ -Rearrangements, die μ HC's kodieren, welche mit der SLC zu einem präBCR assoziieren können, sind im IgH-Gen-Repertoire von prä-B-Zellen deutlich seltener repräsentiert als im Repertoire von pro-B-Zellen (Ye et al., 1996). Dies könnte die Folge einer ausbleibenden positiven Selektion der $V_H12-\mu$ HC-ausprägenden prä-B-Zellen aufgrund einer nicht stattgefundenen präBCR/Liganden-Interaktion sein (Ye et al., 1996).

Um eine mögliche Ligandenbindung durch den präBCR zu verhindern, wurden transgene Mäuse generiert, deren B-Zellvorläufer eine verkürzte μ HC ohne V_H -Domäne und ohne assoziierte SLC ausprägen. Diese Mäuse weisen auch in Abwesenheit eines λ 5-Gens ein normales pro-B- und prä-B-Zellkompartiment auf (Corcos et al., 1995; Shaffer & Schlissel,

1997), so daß der präBCR möglicherweise keinen Liganden zur Initiierung der Signal-Transduktion erkennen muß. Allerdings könnte auch die verstärkte Aggregation der verkürzten μ HC-Proteine auf der Zelloberfläche Ursache für eine konstitutive Signal-Transduktion und damit für die beobachtete Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen sein (Corcos et al., 1995). Ebenso ist die Bindung eines möglichen Liganden durch die verbliebenen konstanten Domänen C_H3 und C_H4 der verkürzten μ HC's nicht auszuschließen (Muljo & Schlissel, 2000).

Rolink et al. (2000) kultivierten einzelne pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen ohne Zugabe von Zytokinen und ohne Stromazellen für 5 Tage. 15% aller ausplattierten einzelnen Zellen teilten sich innerhalb von 5 Tagen in vitro 2 bis 5 mal. Da 10-20% aller ausplattierten pro-B-Zellen bereits in vivo eine μ HC ausgeprägt haben, könnten 5-10% dieser Zellen auch in vivo einen präBCR ausgeprägt haben. Daher sollten laut Rolink et al. (2000) vermutlich auch einige B-Zellvorläufer in Zellkultur proliferiert haben, die erst in vitro einen präBCR ausgeprägt haben. Da die einzelnen B-Zellvorläufer ohne Kokultur von Stromazellen und ohne die Zugabe von Zytokinen proliferierten, vermuteten Rolink et al. (2000), daß die präBCR-vermittelte Proliferation und Differenzierung unabhängig vom Kontext des Knochenmarks ist, und daß der präBCR keinen Liganden zur Initiierung der Differenzierung und Proliferation binden muß.

Allerdings kann in einem solchen experimentellen Ansatz, und auch in den hier durchgeführten entsprechenden in vitro-Kulturen der pro-B-Zellpopulationen aus dem Knochenmark von Wt-Mäusen (s. 4.3), nicht ausgeschlossen werden, daß nur die B-Zellvorläufer in vitro differenzieren und proliferieren, die bereits im Kontext des Knochenmarks den präBCR ausgeprägt haben und dieser mit einem möglichen Liganden interagiert hat. So ist zur Zeit auch kein Oberflächenmarker bekannt, der es erlauben würde, lebende pro-B-Zellen, die keine μ HC exprimieren, von solchen pro-B-Zellen zu unterscheiden, die bereits eine μ HC und damit wahrscheinlich auch einen präBCR ausprägen. Weiterhin kann die präBCR-Expression bis jetzt nicht zuverlässig auf ex vivo-isolierten murinen B-Zellvorläufern nachgewiesen werden (s. dazu 4.1.2.1), so daß pro-B-Zellen nicht als Oberflächen-präBCR-negative Zellen isoliert werden können. Darüber hinaus würde eine präBCR-Detektion mittels anti-präBCR Antikörpern die Gefahr bergen, selbst auf sehr schwach präBCR-positiven Zellen, die eventuell als präBCR-negative Zellen isoliert würden, funktionell der Bindung eines möglichen präBCR-Liganden gleichzukommen.

In dieser Arbeit werden mit Hilfe eines induzierbaren μ HC-Expressionssystems Ergebnisse präsentiert, die vermuten lassen, daß die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen abhängig vom Kontext des Knochenmarks ist:

Pro-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen, von denen ca. 84% bereits vor der Isolation eine μ HC ausgeprägt haben (s. 3.1, Abb. 6) und damit bereits im Kontext des Knochenmarks auch einen präBCR exprimiert haben sollten, differenzieren in vitro in der Gegenwart von ST-2 Stromazellen zu prä-B-Zellen und proliferieren, so daß nach 3-tägiger Kultur ohne zugesetztes IL-7 2.7 bzw. 3.3 mal mehr prä-B- und B-Zellen entstehen als an pro-B-Zellen ausplattiert worden war (in 2 unabhängigen Experimenten; s. 3.5, Abb. 18 und 19). Dabei prägen die meisten der in vitro entstandenen prä-B-Zellen und fast alle der ex vivo aus dem Knochenmark

von VPE/JHT-Mäusen isolierten prä-B-Zellen die vom ursprünglichen VPE-Allel kodierte μ HC aus (zur ausführlichen Diskussion s. 4.1.2.2 und 4.2). Die vom VPE-Allel exprimierte μ HC kann mit der SLC zu einem funktionellen präBCR-Komplex assoziieren, der die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die Bildung eines in seiner Größe normalen prä-B-Zellkompartiments in VPE/JHT-Mäusen erlaubt (zur ausführlichen Diskussion s. 4.1.2).

Die Verwendung von B-Zellvorläufern aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen erlaubt nun eine induzierbare μ HC de novo Synthese in pro-B-Zellen außerhalb des Kontext des Knochenmarks (zur ausführlichen Diskussion s. 4.1.1). Da die vom VPE-Allel kodierte μ HC mit der SLC zu einem funktionellen präBCR assoziieren kann, und 70-80% aller pro-B-Zellen des Knochenmarks die SLC-Proteine λ 5 und VpreB exprimieren (Karasuyama et al., 1994), sollte die μ HC de novo Synthese auch zur präBCR de novo Synthese in VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen führen (s. 4.1.2).

Im Gegensatz zu der in vitro beobachteten Differenzierung und Proliferation der VPE/JHT-B-Zellvorläufer führt die de novo Synthese der gleichen μ HC in pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in vitro, also außerhalb des Kontext des Knochenmarks, nicht zur Differenzierung zu prä-B-Zellen und deren proliferativen Expansion. So exprimieren zwar nach 24-stündiger Kultivierung der VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen in der Gegenwart von 4-OH-Tamoxifen 26-32% der lebenden B-Zellvorläufer eine μ HC (s. 3.4, Abb. 13 und 16), doch bleibt eine Differenzierung zu prä-B-Zellen und B-Lymphozyten nach insgesamt 4-tägiger Kultivierung überwiegend aus (s. 3.4, Abb. 14 und 17), auch wenn zu diesem Zeitpunkt ca. 44% der B-Zellvorläufer eine μ HC ausprägen.

Auch die Kokultur von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen mit Stromazellen und Zellen des gesamten Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen führte trotz induzierter μ HC-Expression nicht zur Differenzierung zu prä-B-Zellen (s. 3.4, Abb. 17). Allerdings sollten die Ergebnisse der Kokulturen von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen mit Zellen des gesamten Knochenmarks von RAG-2^{del/del}-Mäusen als vorläufig betrachtet werden, denn VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen und RAG-2^{del/del}-Knochenmarkszellen wurden nur im Verhältnis 1:1 in einer bestimmten Dichte ausplattiert. Daher ist durchaus möglich, daß die μ HC de novo Synthese in VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen in vitro unter anderen als den getesteten Kokulturbedingungen eine Differenzierung zu prä-B-Zellen induziert.

Während also pro-B-Zellen, die in vivo bereits eine μ HC und wahrscheinlich einen präBCR ausgeprägt haben, in vitro zu prä-B- und B-Zellen differenzieren und proliferieren, bleibt eine Differenzierung und proliferative Expansion der B-Zellvorläufer nach de novo Synthese der identischen μ HC in vitro, also außerhalb des Kontext des Knochenmarks, aus. Die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen scheint somit vom Kontext des Knochenmarks abhängig zu sein.

Aufgrund dieser Daten kann nicht ausgeschlossen werden, daß der präBCR zur Initiierung der Signal-Transduktion und zur Vermittlung der pro-B-Zell-Differenzierung einen Liganden auf Zellen des Knochenmarks binden muß. Allerdings könnten auch andere von Zellen des Knochenmarks ausgeprägte Faktoren als ein möglicher präBCR-Ligand für die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen nötig sein. Faktoren, die die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen positiv beeinflussen könnten, sind neben IL-7 (s. 4.3) zum Beispiel SCF („stem cell

factor“/c-kit Ligand; Hardy et al., 1991; Era et al., 1994), SDF-1 („Stromal cell-derived factor-1“; Nagasawa et al., 1996), CD44 (Miyake et al., 1990), VLA-4 (Miyake et al., 1991), TSLP (Ray et al., 1996; Levin et al., 1999) und Hemokinin-1 (Zhang et al., 2000), oder eine Kombination dieser Faktoren.

Hess et al. (2001) veröffentlichten kürzlich zu den hier beschriebenen Experimenten analoge Studien mit pro-B-Zellen aus transgenen Mäusen, in denen die Expression eines μ HC-Transgens durch einen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator induziert werden kann. In diesem System scheint, im Widerspruch zu den hier präsentierten Daten, die de novo Synthese eines präBCR in pro-B-Zellen außerhalb des Kontext des Knochenmarks die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion von prä-B-Zellen zu induzieren. Die von Hess et al. (2001) beobachtete präBCR-induzierte Differenzierung und Proliferation der B-Zellvorläufer findet dabei allerdings nur in der Anwesenheit von Stromazellen oder IL-7 statt, während B-Zellvorläufer trotz μ HC-Expression in Kulturen ohne Stromazellen und ohne IL-7 absterben. Hess et al. (2001) schlossen daher, daß die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und die proliferative Expansion der prä-B-Zellen von im Knochenmark und von Stromazellen ausgeprägten Faktoren wie z.B. IL-7 abhängt, und der präBCR vermutlich keinen Liganden auf anderen Zellen des Knochenmarks binden muß.

Als mögliche Ursache für die von Hess et al. (2001) und die hier gezeigten widersprüchlichen Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, daß die von Hess et al. verwendete ST-2 Stromazelllinie möglicherweise Faktoren ausprägt, die für die präBCR-induzierte Differenzierung und Proliferation der pro-B- bzw. prä-B-Zellen essentiell sein könnten und die eventuell nicht von Zellen der hier verwendeten ST-2 Stromazelllinie exprimiert werden: Pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen differenzieren auch in Kokultur mit den von Hess et al. (2001) verwendeten ST-2 Stromazellen (freundlicherweise von T. Winkler [Universität Erlangen-Nürnberg] zur Verfügung gestellt) überwiegend nicht zu prä-B-Zellen und B-Lymphozyten (Experimente mit diesen ST-2 Stromazellen sind nicht gesondert gekennzeichnet, hier aber beispielsweise in 3.4, Abb. 17 repräsentiert).

Daher kann davon ausgegangen werden, daß die ausbleibende Differenzierung und proliferative Expansion der B-Zellvorläufer aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen nach in vitro erfolgter μ HC de novo Synthese nicht auf dem Fehlen eventuell notwendiger kostimulierender Faktoren wie IL-7 beruht.

Im Folgenden werden verschiedene Aspekte des VPEinv/JHT, ED-cre μ HC-Expressionssystems und des von Hess et al. (2001) verwendeten μ HC-Expressionssystems besprochen, sowie mögliche Ursachen für die widersprüchlichen Ergebnisse diskutiert:

- (a) Das von Hess et al. genutzte μ HC-Expressionssystem basiert auf der Ausprägung eines transgenen Tetracyclin-inhibierbaren Transaktivators und einem transgenen induzierbaren μ HC-Expressionsvektor in B-Zellvorläufern von doppeltransgenen RAG-2-defizienten Mäusen. Das Expressionsniveau der transgenen μ HC in pro-B-Zellen nach Tetracyclin-Entzug könnte abhängig vom Integrationsort der Transgene, der Kopienzahl der integrierten Transgene und den verwendeten Transkriptionskontrollelementen unphysiologisch hoch

sein, was aufgrund der von Hess et al. publizierten Daten nicht ausgeschlossen werden kann. Dadurch könnten die von Hess et al. verwendeten B-Zellvorläufer eine unphysiologisch hohe Anzahl an präBCR-Komplexen auf der Zelloberfläche ausprägen, was möglicherweise durch eine verstärkte Aggregation der präBCR-Komplexe eine konstitutive Signaltransduktion auslösen, und damit eine Differenzierung und proliferative Expansion der B-Zellvorläufer verursachen könnte. Im Gegensatz dazu sollten pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen nach Cre-vermittelter Inversion des invertierten VDJ-PE Segments ein relativ physiologisches μ HC- und präBCR-Expressionsniveau aufweisen, da das in den IgH-Locus insertierte invertierte VDJ-PE Segment unter der Expressionsregulation durch endogene Kontrollelemente steht (Maruyama et al., 2000). Tatsächlich ist nach Cre-vermittelter Rekombination das μ HC-Expressionsniveau von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen vergleichbar mit dem von B220⁺/sIgM⁻ B-Zellvorläufern aus Wt-Mäusen (s. 3.4, Abb. 13 und 16). Somit ist vorstellbar, daß die Differenzierung der VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen von einer präBCR/Liganden-Interaktion abhängen könnte, während die von Hess et al. verwendeten pro-B-Zellen in Folge einer konstitutiven präBCR-Signaltransduktion Liganden-unabhängig differenzieren könnten. Unbekannt ist allerdings, ob die von Hess et al. kultivierten B-Zellvorläufer tatsächlich eine unphysiologisch hohe präBCR-Expression aufweisen, und ob daraus eine verstärkte präBCR-Aggregation resultieren kann.

- (b) Das von Hess et al. verwendete transgene μ HC-Expressionssystem erlaubt nach Entzug von Tetracyclin die Bindung eines Transaktivators an den Tetracyclin-Operator, was die Transkription des μ HC-Transgens initiiert. Möglicherweise gewährleistet dieses System eine raschere Expression der μ HC in pro-B-Zellen als durch Cre-vermittelte Inversion des invertierten VDJ-PE Segments in pro-B-Zellen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen. Hess et al. konnten bereits 2 h nach Kulturbeginn μ HC-exprimierende pro-B-Zellen detektieren, und nach 12-stündiger Kultur mit 50% aller Zellen den größten prozentualen Anteil μ HC-ausprägender B-Zellvorläufer beobachten.

Zwar konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach 24-stündiger Kultivierung von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen mit 33-37% μ HC⁺ Zellen die höchste Effizienz der 4-OH-Tamoxifen-induzierten Rekombination in IL-7-abhängigen pro-B-Zelllinien erreicht werden (s. 3.3). Doch es ist unbekannt, mit welcher Kinetik B-Zellvorläufer dieser IL-7-abhängigen pro-B-Zelllinien und aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen isolierten pro-B-Zellen nach Kulturbeginn in der Gegenwart von 4-OH-Tamoxifen eine μ HC ausprägen.

Da μ HC⁻ pro-B-Zellen in vitro eine hohe Apoptose-Eintrittsrate von 9%/h aufweisen, welche in Gegenwart von ST-2 Stromazellen um etwa 50% geringer ist (Lu & Osmond, 1997), sollte eine möglichst rasche μ HC- bzw. präBCR-Expression nach Kulturbeginn vorteilhaft für die präBCR-vermittelte Differenzierung und Proliferation sein.

So kann nicht ausgeschlossen werden, daß pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen in vitro bis zur induzierten μ HC-Expression ein Apoptose-Stadium erreichen, das eine präBCR-vermittelte Differenzierung und Proliferation nicht mehr erlaubt. Im Gegensatz dazu könnten die von Hess et al. verwendeten pro-B-Zellen eventuell durch eine raschere μ HC-Expression unter gleichen Kulturbedingungen differenzieren und proliferieren. Da nach 4-tägiger Kokultur mit Stromazellen nicht alle ausplattierten VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen

abgestorben sind, sondern noch ca. 20% der ausplattierten Zellen lebend isoliert werden konnten (s. 3.4, Abb. 15), scheint dieses Szenario weniger wahrscheinlich zu sein.

- (c) Aktuelle Studien zeigten, daß die aus dem Bakteriophagen P1 stammende Cre-Rekombinase nicht nur wie bisher angenommen die Rekombination zwischen loxP bzw. mutanten loxP Sequenzen katalysiert, sondern daß auch kryptische „pseudo-loxP Sequenzen“ im Genom von Säugetieren existieren und miteinander rekombiniert werden können (Thyagarajan et al., 2000). Vermutlich abhängig von einer konstitutiv hohen Cre-Expression (Schmidt et al., 2000; Loonstra et al., 2001) können illegitime Cre-vermittelte Rekombinationen zwischen kryptischen „pseudo-loxP Sequenzen“ auftreten und verschiedene Chromosomen-Aberrationen verursachen, die beispielsweise in vivo zur Unfertilität von murinen Spermien (Schmidt et al., 2000) oder in vitro zur Wachstumsinhibition von Säugetierzellen führen können (Loonstra et al., 2001).

Da Zellen einer IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinie auch nach induzierter μ HC-Expression in 33-37% der B-Zellvorläufer (was aus einer Cre-vermittelten Rekombination in 66-74% aller pro-B-Zellen resultieren sollte) nicht deutlich verschieden von entsprechenden Zellen ohne induzierte Cre-vermittelte Rekombination proliferieren (eigene unveröffentlichte Daten), sollte das ED-cre Transgen von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen keine Chromosomen-Aberrationen und damit keine Wachstumsinhibition in einem Großteil der kultivierten pro-B-Zellen hervorrufen. Daher sollte auch die ausbleibende Differenzierung und Proliferation von VPEinv/JHT, ED-cre B-Zellvorläufern nach in vitro induzierter μ HC de novo Synthese nicht aufgrund unerwünschter, eventuell durch die Cre-Rekombinase hervorgerufener Chromosomen-Aberrationen verursacht werden.

Experimente mit den generierten IL-7-abhängigen VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zelllinien (s. 3.3) zeigten, daß nur wenige μ HC⁺ B-Zellvorläufer dieser Zelllinien zu prä-B-Zellen differenzieren und daß sich μ HC⁺ Zellen bezüglich der Proliferation und des Überlebens nicht signifikant von den μ HC⁻ pro-B-Zellen unterscheiden, unabhängig von der Gegenwart von IL-7 (eigene unveröffentlichte Daten). Rolink et al. (1991a; 1991b; 1993) zeigten in Übereinstimmung damit, daß nach Entzug von IL-7 nur wenige Zellen einer IL-7-abhängigen pro-B-Zelllinie zu prä-B- und B-Zellen differenzieren, während die meisten Zellen durch Apoptose sterben. Der Vergleich von pro-B-Zelllinien aus Wt- und λ 5T-Mäusen läßt vermuten, daß die Differenzierung von Zellen einer IL-7-abhängigen pro-B-Zelllinie zu prä-B-Zellen unabhängig von der Expression eines membrangebundenen präBCR-Komplexes ist und daß die gebildeten prä-B-Zellen nicht proliferieren (Rolink et al., 1993). Daher erlauben IL-7-abhängige pro-B-Zelllinien vermutlich nicht die Untersuchung von Auswirkungen einer präBCR-Expression auf die Differenzierung und Proliferation von B-Zellvorläufern.

- (d) Die μ HC de novo Synthese in VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen wurde in vitro durch Zugabe des synthetischen Liganden 4-OH-Tamoxifen des Cre-EBD-Fusionsproteins (s. 3.1, Abb. 4) induziert. Die unter 3.3 mittels IL-7-abhängiger pro-B-Zelllinien ermittelte optimale 4-OH-Tamoxifenkonzentration von 1 μ M konnte nicht zur Induktion der μ HC-Expression in pro-B-Zellen aus dem Knochenmark verwendet werden. Denn in 2 unabhängigen Experimenten starben alle pro-B-Zellen von Wt-Mäusen bei einer Konzentration von 1 μ M 4-OH-Tamoxifen, während parallel dazu ohne 4-OH-Tamoxifen kultivierte pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen und B-Lymphozyten differenzierten und proliferierten (Daten nicht gezeigt). Die hier

zur Induktion der μ HC-Expression in pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen verwendete 4-OH-Tamoxifenkonzentration von 0.2 μ M hat hingegen keinen signifikanten Einfluß auf die Differenzierung (Abb. 14) und die Proliferation der B-Zellvorläufer aus Wt-Mäusen (Abb. 15). Damit sollte 4-OH-Tamoxifen in einer Konzentration von 0.2 μ M nicht die Ursache für die ausbleibende in vitro-Differenzierung der pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen nach μ HC de novo Synthese sein.

- (e) Das Expressionsniveau der CD25-, CD43- und HSA-Oberflächenmarker von ex vivo-isolierten prä-B-Zellen aus VPE/JHT-Mäusen unterscheidet sich von dem auf prä-B-Zellen der Kontrollmäuse beobachteten Expressionsniveau (s. dazu 4.1.3). Dies könnte auf eine eingeschränkte Funktionalität des von VPE/JHT-Mäusen gebildeten bzw. des in VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen exprimierbaren präBCR hindeuten. Da die vom VPE-Allel kodierte μ HC in vivo die Bildung eines in seiner Größe normalen prä-B-Zellkompartiments erlaubt, und in vitro die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen sowie deren proliferative Expansion vermittelt, sollte jedoch die vom VPE-Allel kodierte μ HC mit der SLC in einem funktionellen präBCR ausgeprägt werden können. Daher sollten auch VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen nach μ HC de novo Synthese einen funktionellen präBCR exprimieren.
- (f) Im von Hess et al. verwendeten μ HC-Expressionssystem wird nach Induktion die μ HC des Sp6-Hybridoms (Köhler & Milstein, 1976; Rusconi & Köhler, 1985) ausgeprägt. Der Sp6-Antikörper bindet nicht nur Trinitrophenyl (TNP), sondern auch eine Reihe von potentiellen Autoantigenen wie ssDNA (einzelsträngige DNA), dsDNA (doppelsträngige DNA), Aktin, murines Albumin, Kollagen, Cytochrom, Transferrin und Myosin (Zöller & Achtnich, 1991). Während Sp6-transgene Mäuse eine relativ normale B-Zellentwicklung aufweisen, zeigen Sp6-transgene RAG-2-defiziente Mäuse zwar ein normales pro-B- und prä-B-Zellkompartiment, unreife und reife B-Zellen sind jedoch vermutlich in Folge einer klonalen Deletion autoreaktiver unreifer B-Lymphozyten kaum im Knochenmark und in der Milz detektierbar (Andersson et al., 1995). Ceredig et al. (2000) zufolge soll der von der Sp6- μ HC und der SLC gebildete präBCR ebenfalls potentielle Autoantigene wie zum Beispiel dsDNA binden können.

Somit könnten die hier präsentierten, zu den von Hess et al. (2001) publizierten Daten konträren Ergebnisse möglicherweise durch folgendes Szenario erklärt werden, falls der präBCR zur Initiierung von präBCR-vermittelten Signalen einen Liganden binden muß: Pro-B-Zellen differenzieren nach de novo Expression einer Sp6- μ HC in vitro zu prä-B-Zellen und proliferieren, weil der autoreaktive präBCR nach Bindung von in Zellkultur vorliegenden Autoantigenen wie dsDNA und Aktin (beispielsweise von toten Zellen) entsprechende Differenzierungs- und Proliferationssignale transduziert. Falls der von VPEinv/JHT, ED-cre pro-B-Zellen ausgeprägte präBCR nicht autoreaktiv ist, würde unter der Voraussetzung, daß ein präBCR-Ligand nicht im Kultursystem vorhanden ist, in diesen B-Zellvorläufern keine Differenzierung zu prä-B-Zellen nach μ HC de novo Synthese induziert.

Um die Ursache(n) für die von Hess et al. (2001) und die hier präsentierten widersprüchlichen Ergebnisse zu klären, könnte das die V_H -Domäne der Sp6- μ HC kodierende $V_H D_H J_H$ -Rearrangement in einem dem VPEinv-Allel homologen IgH-Locus inseriert werden. Pro-B-Zellen aus VPEinv/JHT, ED-cre-Mäusen und aus zu generierenden Insertionsmäusen, welche

die de novo Expression einer Sp6- μ HC erlauben, könnten dann unter identischen Bedingungen in vitro verglichen werden. Darüber hinaus wäre auch der umgekehrte Vergleich der vom VPE-Allel kodierten μ HC im von Hess et al. (2001) verwendeten μ HC-Expressionssystem mit der beschriebenen Sp6- μ HC interessant.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Knochenmark der Maus differenzieren aus hämatopoetischen Stammzellen im Verlauf der B-Zellentwicklung B-Vorläuferzellen (pro-B-Zellen). Pro-B-Zellen können nach Generierung eines produktiven $V_H D_H J_H$ -Rearrangements eine μ -Immunglobulin-schwere-Kette (μ HC) ausprägen, die mit einer aus den Proteinen $\lambda 5$ und VpreB gebildeten surrogaten leichten Kette und dem $Ig\alpha/Ig\beta$ -Heterodimer zu einem prä-B-Zell-Rezeptorkomplex (präBCR) assoziieren kann. Die Expression einer μ HC in einem membrangebundenen präBCR-Komplex ist essentiell für die Differenzierung von pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen und für die proliferative Expansion von prä-B-Zellen, die sich nach Generierung eines produktiven IgL -Rearrangements zu unreifen B-Lymphozyten entwickeln können.

Zwar ist die essentielle Bedeutung der präBCR-Expression für die frühe B-Zellentwicklung bekannt, jedoch ist unklar, ob die präBCR-vermittelte Differenzierung von B-Zellvorläufern und die proliferative Expansion der prä-B-Zellen abhängig von Interleukin-7 (IL-7) ist und/oder die Bindung eines Liganden durch den präBCR erfordert.

Um zu untersuchen, ob der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen unabhängig von im Knochenmark ausgeprägten kostimulierenden Faktoren und unabhängig von einem möglichen präBCR-Liganden vermittelt, wurden pro-B-Zellen aus VPEinv-Mäusen kultiviert, in denen eine μ HC de novo Synthese außerhalb des Kontext des Knochenmarks induziert werden kann.

Während pro-B-Zellen nach in vitro induzierter μ HC-Expression nicht zu prä-B-Zellen differenzieren, entwickeln sich pro-B-Zellen, die bereits in vivo, also im Kontext des Knochenmarks eine identische μ HC ausgeprägt haben, zu prä-B-Zellen und proliferieren.

Daher scheint die präBCR-vermittelte Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen abhängig von im Kontext des Knochenmarks ausgeprägten Faktoren zu sein.

Um zu untersuchen, ob der präBCR die Differenzierung von pro-B- zu prä-B-Zellen und eine proliferative Expansion von μ HC-exprimierenden B-Zellvorläufern möglicherweise unabhängig von IL-7 vermittelt, wurden pro-B-Zellen aus dem Knochenmark von Wildtyp (Wt)- und $\lambda 5$ -defizienten Mäusen isoliert und unter verschiedenen Bedingungen kultiviert.

Während sich pro-B-Zellen aus $\lambda 5$ -defizienten Mäusen in vitro nicht zu prä-B-Zellen entwickeln, differenzieren pro-B-Zellen aus Wt-Mäusen in vitro zu prä-B-Zellen und proliferieren, ohne daß es der Anwesenheit von Stromazellen oder der Zugabe von Zytokinen bedarf.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß der präBCR die Differenzierung von B-Zellvorläufern und die proliferative Expansion von prä-B-Zellen unabhängig von Interleukin-7 vermittelt, oder daß prä-B-Zellen nur eine geringe IL-7-Konzentration zur Proliferation benötigen.

5.1 ABSTRACT

During B cell development in the bone marrow of the mouse, progenitor B cells (pro-B cells) differentiate from hematopoietic stem cells. Pro-B cells that have acquired a productive $V_H D_H J_H$ rearrangement are able to express an immunoglobulin μ heavy chain (μ HC). After association with the $Ig\alpha/Ig\beta$ heterodimer and the surrogate light chain components $\lambda 5$ and $VpreB$, the μ HC can be expressed in a pre-B cell receptor complex (pre-BCR). The expression of a μ HC in a membrane-bound pre-BCR is essential for the differentiation of pro-B cells into pre-B cells and the proliferative expansion of pre-B cells. Pre-B cells that have acquired a productive IgL rearrangement can develop into immature B lymphocytes.

Although it is known that the pre-BCR expression is essential for the differentiation of progenitor B cells into pre-B cells, it is unclear whether the pre-BCR mediated differentiation of pro-B cells and the proliferative expansion of pre-B cells depends on the presence of interleukin-7 (IL-7) and/or on the binding of a putative ligand by the pre-BCR.

To investigate whether the pre-BCR induces the differentiation of pro-B into pre-B cells independently of costimulatory factors derived from the bone marrow and independently of a putative pre-BCR ligand, pro-B cells from $VPEinv$ -mice that allow an inducible de novo synthesis of a μ HC in vitro were cultured under various conditions.

Whereas pro-B cells from $VPEinv$ -mice do not differentiate into pre-B cells after in vitro induced μ HC-expression irrespective of the presence of stromal cells, pro-B cells that expressed the same μ HC already in vivo in the bone marrow environment develop into pre-B cells and proliferate.

Therefore it appears that the pre-BCR mediated differentiation of pro-B cells requires yet undefined factors present in the bone marrow environment.

To investigate whether the pre-BCR mediates the differentiation of progenitor B cells into pre-B cells and the proliferation of pre-B cells independently of IL-7, pro-B cells from the bone marrow of wild-type (wt)- and $\lambda 5$ -deficient mice were cultured under various conditions in vitro.

Whereas pro-B cells from $\lambda 5$ -deficient mice do not differentiate into pre-B cells in vitro, pro-B cells from wt-mice develop into pre-B cells and proliferate without addition of stromal cells or cytokines, like IL-7.

These data suggest that the pre-BCR mediates the differentiation of progenitor B cells and the proliferative expansion of pre-B cells independently of IL-7, or that pre-B cells require only a low concentration of IL-7 in order to proliferate.

6. LITERATUR

Alberini, C. M., Bet, P., Milstein, C., and Sitia, R. (1990). Secretion of immunoglobulin M assembly intermediates in the presence of reducing agents, *Nature* 347, 485-7.

Allman, D. M., Ferguson, S. E., Lentz, V. M., and Cancro, M. P. (1993). Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells, *J Immunol* 151, 4431-44.

Allman, D., Li, J., and Hardy, R. R. (1999). Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination, *J Exp Med* 189, 735-40.

Alt, F., Rosenberg, N., Lewis, S., Thomas, E., and Baltimore, D. (1981). Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MULV- transformed cells: rearrangement of heavy but not light chain genes, *Cell* 27, 381-90.

Alt, F. W., and Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4118-22.

Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Blackwell, T. K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments, *Embo J* 3, 1209-19.

Alt, F. W., Blackwell, T. K., DePinho, R. A., Reth, M. G., and Yancopoulos, G. D. (1986). Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation, *Immunol Rev* 89, 5-30.

Alt, F. W., Blackwell, T. K., and Yancopoulos, G. D. (1987). Development of the primary antibody repertoire, *Science* 238, 1079-87.

Andersson, J., Melchers, F., and Rolink, A. (1995). Stimulation by T cell independent antigens can relieve the arrest of differentiation of immature auto-reactive B cells in the bone marrow, *Scand J Immunol* 42, 21-33.

Arakawa, H., Shimizu, T., and Takeda, S. (1996). Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci, *Int Immunol* 8, 91-9.

Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., and et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements, *Cell* 79, 885-92.

Barnes, D. E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A., and Lindahl, T. (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice, *Curr Biol* 8, 1395-8.

Benjamin, D., Sharma, V., Knobloch, T. J., Armitage, R. J., Dayton, M. A., and Goodwin, R. G. (1994). B cell IL-7. Human B cell lines constitutively secrete IL-7 and express IL-7 receptors, *J Immunol* 152, 4749-57.

Bertrand, F. E., Golub, R., and Wu, G. E. (1998). V(H) gene replacement occurs in the spleen and bone marrow of non- autoimmune quasi-monoclonal mice, *Eur J Immunol* 28, 3362-70.

Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A., and et al. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation, *Cell* 80, 813-23.

- Bornemann, K. D., Brewer, J. W., Perez, E., Doerre, S., Sita, R., and Corley, R. B. (1997). Secretion of soluble pre-B cell receptors by pre-B cells, *J Immunol* 158, 2551-7.
- Borzillo, G. V., Endo, K., and Tsujimoto, Y. (1992). Bcl-2 confers growth and survival advantage to interleukin 7-dependent early pre-B cells which become factor independent by a multistep process in culture, *Oncogene* 7, 869-76.
- Bosma, G. C., Chang, Y., Karasuyama, H., and Bosma, M. J. (1999). Differential effect of an Ig mu transgene on development of pre-B cells in fetal and adult SCID mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11952-7.
- Brodeur, P. H., and Riblet, R. (1984). The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes, *Eur J Immunol* 14, 922-30.
- Brouns, G. S., de Vries, E., van Noesel, C. J., Mason, D. Y., van Lier, R. A., and Borst, J. (1993). The structure of the mu/pseudo light chain complex on human pre-B cells is consistent with a function in signal transduction, *Eur J Immunol* 23, 1088-97.
- Brouns, G. S., de Vries, E., Neefjes, J. J., and Borst, J. (1996). Assembled pre-B cell receptor complexes are retained in the endoplasmic reticulum by a mechanism that is not selective for the pseudo-light chain, *J Biol Chem* 271, 19272-8.
- Burnet, F. M. (1959). *The clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. (Cambridge, Cambridge University Press).
- Candeias, S., Muegge, K., and Durum, S. K. (1997). IL-7 receptor and VDJ recombination: trophic versus mechanistic actions, *Immunity* 6, 501-8.
- Carsetti, R., Kohler, G., and Lamers, M. C. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment, *J Exp Med* 181, 2129-40.
- Carsetti, R. (2000). The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment, *J Exp Med* 191, 5-8.
- Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L., and Wabl, M. (1996). A quasi-monoclonal mouse, *Science* 272, 1649-52.
- Casellas, R., Shih, T. A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. (2001). Contribution of receptor editing to the antibody repertoire, *Science* 291, 1541-4.
- Ceredig, R., Andersson, J., Melchers, F., and Rolink, A. (1999). Effect of deregulated IL-7 transgene expression on B lymphocyte development in mice expressing mutated pre-B cell receptors, *Eur J Immunol* 29, 2797-807.
- Ceredig, R., Rolink, A. G., Melchers, F., and Andersson, J. (2000). The B cell receptor, but not the pre-B cell receptor, mediates arrest of B cell differentiation, *Eur J Immunol* 30, 759-67.
- Chang, Y., Paige, C. J., and Wu, G. E. (1992). Enumeration and characterization of DJH structures in mouse fetal liver, *Embo J* 11, 1891-9.
- Chang, Y., Bosma, G. C., and Bosma, M. J. (1995). Development of B cells in scid mice with immunoglobulin transgenes: implications for the control of V(D)J recombination, *Immunity* 2, 607-16.
- Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol Cell Biol* 7, 2745-52.
- Chen, J., Ma, A., Young, F., and Alt, F. W. (1994). IL-2 receptor alpha chain expression during early B lymphocyte differentiation, *Int Immunol* 6, 1265-8.

- Chen, C., Nagy, Z., Prak, E. L., and Weigert, M. (1995). Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing, *Immunity* 3, 747-55.
- Chen, C., Prak, E. L., and Weigert, M. (1997). Editing disease-associated autoantibodies, *Immunity* 6, 97-105.
- Cheng, A. M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J. B., and Pawson, T. (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development, *Nature* 378, 303-6.
- Cherayil, B. J., and Pillai, S. (1991). The omega/lambda 5 surrogate immunoglobulin light chain is expressed on the surface of transitional B lymphocytes in murine bone marrow, *J Exp Med* 173, 111-6.
- Cherry, S. R., and Baltimore, D. (1999). Chromatin remodeling directly activates V(D)J recombination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10788-93.
- Coffman, R. L., and Weissman, I. L. (1981). B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family, *Nature* 289, 681-3.
- Coffman, R. L., and Weissman, I. L. (1983). Immunoglobulin gene rearrangement during pre-B cell differentiation, *J Mol Cell Immunol* 1, 31-41.
- Conley, M. E., Rohrer, J., Rapalus, L., Boylin, E. C., and Minegishi, Y. (2000). Defects in early B-cell development: comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse, *Immunol Rev* 178, 75-90.
- Constantinescu, A., and Schlissel, M. S. (1997). Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development, *J Exp Med* 185, 609-20.
- Corcoran, A. E., Smart, F. M., Cowling, R. J., Crompton, T., Owen, M. J., and Venkitaraman, A. R. (1996). The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis, *Embo J* 15, 1924-32.
- Corcoran, A. E., Riddell, A., Krooshoop, D., and Venkitaraman, A. R. (1998). Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor, *Nature* 391, 904-7.
- Corcos, D., Dunda, O., Butor, C., Cesbron, J. Y., Lores, P., Bucchini, D., and Jami, J. (1995). Pre-B-cell development in the absence of lambda 5 in transgenic mice expressing a heavy-chain disease protein, *Curr Biol* 5, 1140-8.
- Critchlow, S. E., Bowater, R. P., and Jackson, S. P. (1997). Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV, *Curr Biol* 7, 588-98.
- Decker, D. J., Boyle, N. E., Koziol, J. A., and Klinman, N. R. (1991). The expression of the Ig H chain repertoire in developing bone marrow B lineage cells, *J Immunol* 146, 350-61.
- Decker, D. J., and Klinman, N. R. (1992). Interrelating B cell subpopulations and environmental regulation with the expression of three tiers of repertoire diversity, *Int Rev Immunol* 8, 159-71.
- Demaison, C., Fiette, L., Blanchetiere, V., Schimpl, A., Theze, J., and Froussard, P. (1998). IL-2 receptor alpha-chain expression is independently regulated in primary and secondary lymphoid organs, *J Immunol* 161, 1977-82.
- Desiderio, S. V., Yancopoulos, G. D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M. A., Landau, N., Alt, F. W., and Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells, *Nature* 311, 752-5.

- Di Santo, J. P., Kuhn, R., and Muller, W. (1995a). Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo functions by gene targeting, *Immunol Rev* 148, 19-34.
- Di Santo, J. P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., and Rajewsky, K. (1995b). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 377-81.
- Di Santo, J. P., and Rodewald, H. R. (1998). In vivo roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development, *Curr Opin Immunol* 10, 196-207.
- Dildrop, R., Gause, A., Muller, W., and Rajewsky, K. (1987). A new V gene expressed in lambda-2 light chains of the mouse, *Eur J Immunol* 17, 731-4.
- Dorshkind, K. (2000). Understanding how pre-B cells come of age, *Nat Immunol* 1, 369-70.
- Dorshkind, K., and Horseman, N. D. (2000). The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency, *Endocr Rev* 21, 292-312.
- Dörner, T., Farner, N.L. und Lipsky, P.E. (1999). Two Mechanisms of Somatic Hypermutation of Ig V Genes., *Immunologist* 7, 153.
- Dragone, L. L., Barth, R. K., Sitar, K. L., Disbrow, G. L., and Frelinger, J. G. (1995). Disregulation of leukosialin (CD43, Ly48, sialophorin) expression in the B-cell lineage of transgenic mice increases splenic B-cell number and survival, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 626-30.
- Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Muller, W., and Rajewsky, K. (1993). Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development, *Cell* 72, 695-704.
- Ehlich, A., Martin, V., Muller, W., and Rajewsky, K. (1994). Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells, *Curr Biol* 4, 573-83.
- Eisen, H. N., and Reilly, E. B. (1985). Lambda chains and genes in inbred mice, *Annu Rev Immunol* 3, 337-65.
- Engel, H., Rolink, A., and Weiss, S. (1999). B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages, *Eur J Immunol* 29, 2167-76.
- Era, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamoto, M., Honjo, T., Akagi, K., Miyazaki, J., and Yamamura, K. (1991). Differentiation of growth signal requirement of B lymphocyte precursor is directed by expression of immunoglobulin, *Embo J* 10, 337-42.
- Era, T., Nishikawa, S., Sudo, T., Wang, F. H., Ogawa, M., Kunisada, T., and Hayashi, S. (1994). How B-precursor cells are driven to cycle, *Immunol Rev* 137, 35-51.
- Erikson, J., Radic, M. Z., Camper, S. A., Hardy, R. R., Carmack, C., and Weigert, M. (1991). Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice, *Nature* 349, 331-4.
- Fang, W., Mueller, D. L., Pennell, C. A., Rivard, J. J., Li, Y. S., Hardy, R. R., Schlissel, M. S., and Behrens, T. W. (1996). Frequent aberrant immunoglobulin gene rearrangements in pro-B cells revealed by a bcl-xL transgene, *Immunity* 4, 291-9.
- Fang, W., Weintraub, B. C., Dunlap, B., Garside, P., Pape, K. A., Jenkins, M. K., Goodnow, C. C., Mueller, D. L., and Behrens, T. W. (1998). Self-reactive B lymphocytes overexpressing Bcl-xL escape negative selection and are tolerized by clonal anergy and receptor editing, *Immunity* 9, 35-45.

- Fanning, L., Bertrand, F. E., Steinberg, C., and Wu, G. E. (1998). Molecular mechanisms involved in receptor editing at the Ig heavy chain locus, *Int Immunol* 10, 241-6.
- Förster, I., Vieira, P., and Rajewsky, K. (1989). Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse, *Int Immunol* 1, 321-31.
- Förster, I., and Rajewsky, K. (1990). The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4781-4.
- Frank, K. M., Sekiguchi, J. M., Seidl, K. J., Swat, W., Rathbun, G. A., Cheng, H. L., Davidson, L., Kangaloo, L., and Alt, F. W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV, *Nature* 396, 173-7.
- Frishman, J., Long, B., Knospe, W., Gregory, S., and Plate, J. (1993). Genes for interleukin 7 are transcribed in leukemic cell subsets of individuals with chronic lymphocytic leukemia, *J Exp Med* 177, 955-64.
- Funk, P. E., Stephan, R. P., and Witte, P. L. (1995). Vascular cell adhesion molecule 1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow, *Blood* 86, 2661-71.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., and Weigert, M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance, *J Exp Med* 177, 999-1008.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire, *Science* 261, 1175-8.
- Gimble, J. M., Pietrangeli, C., Henley, A., Dorheim, M. A., Silver, J., Namen, A., Takeichi, M., Goridis, C., and Kincade, P. W. (1989). Characterization of murine bone marrow and spleen-derived stromal cells: analysis of leukocyte marker and growth factor mRNA transcript levels, *Blood* 74, 303-11.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., and et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice, *Nature* 334, 676-82.
- Goodnow, C. C., Cyster, J. G., Hartley, S. B., Bell, S. E., Cooke, M. P., Healy, J. I., Akkaraju, S., Rathmell, J. C., Pogue, S. L., and Shokat, K. P. (1995). Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development, *Adv Immunol* 59, 279-368.
- Gottlieb, T. M., and Jackson, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen, *Cell* 72, 131-42.
- Grabstein, K. H., Waldschmidt, T. J., Finkelman, F. D., Hess, B. W., Alpert, A. R., Boiani, N. E., Namen, A. E., and Morrissey, P. J. (1993). Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody, *J Exp Med* 178, 257-64.
- Grawunder, U., Leu, T. M., Schatz, D. G., Werner, A., Rolink, A. G., Melchers, F., and Winkler, T. H. (1995a). Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement, *Immunity* 3, 601-8.
- Grawunder, U., Rolink, A., and Melchers, F. (1995b). Induction of sterile transcription from the kappa L chain gene locus in V(D)J recombinase-deficient progenitor B cells, *Int Immunol* 7, 1915-25.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., and Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells, *Nature* 388, 492-5.

- Grawunder, U., West, R. B., and Lieber, M. R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement, *Curr Opin Immunol* 10, 172-80.
- Griffiths, S. D., Goodhead, D. T., Marsden, S. J., Wright, E. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Korsmeyer, S. J., and Greaves, M. (1994). Interleukin 7-dependent B lymphocyte precursor cells are ultrasensitive to apoptosis, *J Exp Med* 179, 1789-97.
- Grosschedl, R., Weaver, D., Baltimore, D., and Costantini, F. (1984). Introduction of a mu immunoglobulin gene into the mouse germ line: specific expression in lymphoid cells and synthesis of functional antibody, *Cell* 38, 647-58.
- Grützmann, R. (1981) Vergleichende idiotypische Analyse von Rezeptoren mit Spezifität für Histokompatibilitätsantigene, Universität zu Köln, Köln.
- Gu, H., Kitamura, D., and Rajewsky, K. (1991). B cell development regulated by gene rearrangement: arrest of maturation by membrane-bound D mu protein and selection of DH element reading frames, *Cell* 65, 47-54.
- Gu, H., Zou, Y. R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting, *Cell* 73, 1155-64.
- Gu, Y., Jin, S., Gao, Y., Weaver, D. T., and Alt, F. W. (1997). Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8076-81.
- Gulley, M. L., Ogata, L. C., Thorson, J. A., Dailey, M. O., and Kemp, J. D. (1988). Identification of a murine pan-T cell antigen which is also expressed during the terminal phases of B cell differentiation, *J Immunol* 140, 3751-7.
- Hardy, R. R., Dangl, J. L., Hayakawa, K., Jager, G., and Herzenberg, L. A. (1986). Frequent lambda light chain gene rearrangement and expression in a Ly-1 B lymphoma with a productive kappa chain allele, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1438-42.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow, *J Exp Med* 173, 1213-25.
- Hardy, R. R., Li, Y. S., Allman, D., Asano, M., Gui, M., and Hayakawa, K. (2000). B-cell commitment, development and selection, *Immunol Rev* 175, 23-32.
- Hardy, R. R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways, *Annu Rev Immunol* 19, 595-621.
- Hartley, S. B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A. B., Basten, A., and Goodnow, C. C. (1991). Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens, *Nature* 353, 765-9.
- Hartley, S. B., Cooke, M. P., Fulcher, D. A., Harris, A. W., Cory, S., Basten, A., and Goodnow, C. C. (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death, *Cell* 72, 325-35.
- Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Sudo, T., Kodama, H., Suda, T., and Nishikawa, S. (1990). Stepwise progression of B lineage differentiation supported by interleukin 7 and other stromal cell molecules, *J Exp Med* 171, 1683-95.
- Hess, J., Werner, A., Wirth, T., Melchers, F., Jack, H. M., and Winkler, T. H. (2001). Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1745-50.

- Heufler, C., Topar, G., Grasseger, A., Stanzl, U., Koch, F., Romani, N., Namen, A. E., and Schuler, G. (1993). Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes, *J Exp Med* 178, 1109-14.
- Hoess, R. H., Wierzbicki, A., and Abremski, K. (1986). The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination, *Nucleic Acids Res* 14, 2287-300.
- Horne, M. C., Roth, P. E., and DeFranco, A. L. (1996). Assembly of the truncated immunoglobulin heavy chain D mu into antigen receptor-like complexes in pre-B cells but not in B cells, *Immunity* 4, 145-58.
- Hough, M. R., Chappel, M. S., Sauvageau, G., Takei, F., Kay, R., and Humphries, R. K. (1996). Reduction of early B lymphocyte precursors in transgenic mice overexpressing the murine heat-stable antigen, *J Immunol* 156, 479-88.
- Ichihara, Y., Hayashida, H., Miyazawa, S., and Kurosawa, Y. (1989). Only DFL16, DSP2, and DQ52 gene families exist in mouse immunoglobulin heavy chain diversity gene loci, of which DFL16 and DSP2 originate from the same primordial DH gene, *Eur J Immunol* 19, 1849-54.
- Iglesias, A., Nichogiannopoulou, A., Williams, G. S., Flaswinkel, H., and Kohler, G. (1993). Early B cell development requires mu signaling, *Eur J Immunol* 23, 2622-30.
- Jacobsen, K., and Osmond, D. G. (1990). Microenvironmental organization and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow, *Eur J Immunol* 20, 2395-404.
- Jumaa, H., Wollscheid, B., Mitterer, M., Wienands, J., Reth, M., and Nielsen, P. J. (1999). Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65, *Immunity* 11, 547-54.
- Kantor, A. B., Merrill, C. E., Herzenberg, L. A., and Hillson, J. L. (1997). An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells, *J Immunol* 158, 1175-86.
- Karasuyama, H., Kudo, A., and Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain, *J Exp Med* 172, 969-72.
- Karasuyama, H., Rolink, A., and Melchers, F. (1993). A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines, *J Exp Med* 178, 469-78.
- Karasuyama, H., Rolink, A., Shinkai, Y., Young, F., Alt, F. W., and Melchers, F. (1994). The expression of VpreB/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice, *Cell* 77, 133-43.
- Kato, I., Miyazaki, T., Nakamura, T., and Kudo, A. (2000). Inducible differentiation and apoptosis of the pre-B cell receptor-positive pre-B cell line, *Int Immunol* 12, 325-34.
- Kerr, W. G., Cooper, M. D., Feng, L., Burrows, P. D., and Hendershot, L. M. (1989). Mu heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (psi L) in human pre-B cell lines, *Int Immunol* 1, 355-61.
- Keyna, U., Beck-Engeser, G. B., Jongstra, J., Applequist, S. E., and Jack, H. M. (1995). Surrogate light chain-dependent selection of Ig heavy chain V regions, *J Immunol* 155, 5536-42.
- Kincade, P. W. (1987). Experimental models for understanding B lymphocyte formation, *Adv Immunol* 41, 181-267.
- Kincade, P. W., Lee, G., Pietrangeli, C. E., Hayashi, S., and Gimble, J. M. (1989). Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow, *Annu Rev Immunol* 7, 111-43.

- Kincade, P. W. (1991). Molecular interactions between stromal cells and B lymphocyte precursors, *Semin Immunol* 3, 379-90.
- Kincade, P. W., Medina, K. L., Payne, K. J., Rossi, M. I., Tudor, K. S., Yamashita, Y., and Kouro, T. (2000). Early B-lymphocyte precursors and their regulation by sex steroids, *Immunol Rev* 175, 128-37.
- Kirchgessner, C. U., Patil, C. K., Evans, J. W., Cuomo, C. A., Fried, L. M., Carter, T., Oettinger, M. A., and Brown, J. M. (1995). DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect, *Science* 267, 1178-83.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene, *Nature* 350, 423-6.
- Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F., and Rajewsky, K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development, *Cell* 69, 823-31.
- Kitamura, D., and Rajewsky, K. (1992). Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion, *Nature* 356, 154-6.
- Kleinfield, R., Hardy, R. R., Tarlinton, D., Dangl, J., Herzenberg, L. A., and Weigert, M. (1986). Recombination between an expressed immunoglobulin heavy-chain gene and a germline variable gene segment in a Ly 1+ B-cell lymphoma, *Nature* 322, 843-6.
- Kline, G. H., Hartwell, L., Beck-Engeser, G. B., Keyna, U., Zaharevitz, S., Klinman, N. R., and Jack, H. M. (1998). Pre-B cell receptor-mediated selection of pre-B cells synthesizing functional mu heavy chains, *J Immunol* 161, 1608-18.
- Kofler, R., Geley, S., Kofler, H., and Helmborg, A. (1992). Mouse variable-region gene families: complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses, *Immunol Rev* 128, 5-21.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Eur J Immunol* 6, 511-9.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT- deficient lymphocytes, *Science* 261, 1171-5.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow, *Cell* 91, 661-72.
- Kudo, A., and Melchers, F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes, *Embo J* 6, 2267-72.
- Kwan, S. P., Max, E. E., Seidman, J. G., Leder, P., and Scharff, M. D. (1981). Two kappa immunoglobulin genes are expressed in the myeloma S107, *Cell* 26, 57-66.
- Lafaille, J. J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., and Tonegawa, S. (1989). Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining, *Cell* 59, 859-70.
- Lam, K. P., Kuhn, R., and 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.
- Lassoued, K., Nunez, C. A., Billips, L., Kubagawa, H., Monteiro, R. C., LeBlen, T. W., and Cooper, M. D. (1993). Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage in pre-B cell differentiation, *Cell* 73, 73-86.

- LeBien, T. W. (1998). B-cell lymphopoiesis in mouse and man, *Curr Opin Immunol* 10, 188-95.
- LeBien, T. W. (2000). Fates of human B-cell precursors, *Blood* 96, 9-23.
- Ledbetter, J. A., and Herzenberg, L. A. (1979). Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens, *Immunol Rev* 47, 63-90.
- Leptin, M., Potash, M. J., Grutzmann, R., Heusser, C., Shulman, M., Kohler, G., and Melchers, F. (1984). Monoclonal antibodies specific for murine IgM I. Characterization of antigenic determinants on the four constant domains of the mu heavy chain, *Eur J Immunol* 14, 534-42.
- Levin, S. D., Koelling, R. M., Friend, S. L., Isaksen, D. E., Ziegler, S. F., Perlmutter, R. M., and Farr, A. G. (1999). Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism, *J Immunol* 162, 677-83.
- Li, Y. S., Hayakawa, K., and Hardy, R. R. (1993). The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver, *J Exp Med* 178, 951-60.
- Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K., and Hardy, R. R. (1996). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow, *Immunity* 5, 527-35.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF, *Nature* 376, 263-7.
- Lisignoli, G., Monaco, M. C., Facchini, A., Toneguzzi, S., Cattini, L., Hilbert, D. M., Lavaroni, S., Belvedere, O., and Degrassi, A. (1996). In vitro cultured stromal cells from human tonsils display a distinct phenotype and induce B cell adhesion and proliferation, *Eur J Immunol* 26, 17-27.
- Löffert, D., Schaal, S., Ehlich, A., Hardy, R. R., Zou, Y. R., Muller, W., and Rajewsky, K. (1994). Early B-cell development in the mouse: insights from mutations introduced by gene targeting, *Immunol Rev* 137, 135-53.
- Löffert, D., Ehlich, A., Muller, W., and Rajewsky, K. (1996). Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development, *Immunity* 4, 133-44.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., and Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9209-14.
- Lu, L., and Osmond, D. G. (1997). Apoptosis during B lymphopoiesis in mouse bone marrow, *J Immunol* 158, 5136-45.
- Lu, L., Smithson, G., Kincade, P. W., and Osmond, D. G. (1998). Two models of murine B lymphopoiesis: a correlation, *Eur J Immunol* 28, 1755-61.
- Lu, L., Chaudhury, P., and Osmond, D. G. (1999). Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: apoptosis and Bcl- 2/Bax content of precursor B cells in bone marrow of mice with altered expression of IL-7 and recombinase-activating gene-2, *J Immunol* 162, 1931-40.
- Lu, L., and Osmond, D. G. (2000). Apoptosis and its modulation during B lymphopoiesis in mouse bone marrow, *Immunol Rev* 175, 158-74.
- Ma, A., Pena, J. C., Chang, B., Margosian, E., Davidson, L., Alt, F. W., and Thompson, C. B. (1995). Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4763-7.

- Mainville, C. A., Sheehan, K. M., Klamman, L. D., Giorgetti, C. A., Press, J. L., and Brodeur, P. H. (1996). Deletional mapping of fifteen mouse VH gene families reveals a common organization for three Igh haplotypes, *J Immunol* 156, 1038-46.
- Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M., and Ardman, B. (1995). Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43, *Nature* 377, 535-8.
- Marshall, A. J., Wu, G. E., and Paige, G. J. (1996). Frequency of VH81x usage during B cell development: initial decline in usage is independent of Ig heavy chain cell surface expression, *J Immunol* 156, 2077-84.
- Marshall, A. J., Fleming, H. E., Wu, G. E., and Paige, C. J. (1998). Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression, *J Immunol* 161, 6038-45.
- Martin, F., Chen, X., and Kearney, J. F. (1997). Development of VH81X transgene-bearing B cells in fetus and adult: sites for expansion and deletion in conventional and CD5/B1 cells, *Int Immunol* 9, 493-505.
- Maruyama, M., Lam, K. P., and Rajewsky, K. (2000). Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen, *Nature* 407, 636-42.
- Matsuo, T., Kimoto, M., and Sakaguchi, N. (1991). Direct identification of the putative surface IgM receptor-associated molecule encoded by murine B cell-specific mb-1 gene, *J Immunol* 146, 1584-90.
- Matsuo, T., Nomura, J., Kuwahara, K., Igarashi, H., Inui, S., Hamaguchi, M., Kimoto, M., and Sakaguchi, N. (1993). Cross-linking of B cell receptor-related MB-1 molecule induces protein tyrosine phosphorylation in early B lineage cells, *J Immunol* 150, 3766-75.
- McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M., and Oettinger, M. A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps, *Cell* 83, 387-95.
- Medina, C. A., and Teale, J. M. (1993). Restricted kappa chain expression in early ontogeny: biased utilization of V kappa exons and preferential V kappa-J kappa recombinations, *J Exp Med* 177, 1317-30.
- Medina, K. L., Strasser, A., and Kincade, P. W. (2000). Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors, *Blood* 95, 2059-67.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M. C. (2000). Antibody regulation of B cell development, *Nat Immunol* 1, 379-85.
- Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B., and Rolink, A. (1993). The surrogate light chain in B-cell development, *Immunol Today* 14, 60-8.
- Melchers, F., Haasner, D., Grawunder, U., Kalberer, C., Karasuyama, H., Winkler, T., and Rolink, A. G. (1994). Roles of IgH and L chains and of surrogate H and L chains in the development of cells of the B lymphocyte lineage, *Annu Rev Immunol* 12, 209-25.
- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H., Ghia, P., and Andersson, J. (1995). Positive and negative selection events during B lymphopoiesis, *Curr Opin Immunol* 7, 214-27.
- Melchers, F. (1999). Fit for life in the immune system? Surrogate L chain tests H chains that test L chains, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2571-3.

- Melchers, F., ten Boekel, E., Seidl, T., Kong, X. C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A. G., and Andersson, J. (2000). Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells, *Immunol Rev* 175, 33-46.
- Milstein, C., Even, J., Jarvis, J. M., Gonzales-Fernandez, A., and Gherardi, E. (1992). Non-random features of the repertoire expressed by the members of one V kappa gene family and of the V-J recombination, *Eur J Immunol* 22, 1958.
- Minegishi, Y., Hendershot, L. M., and Conley, M. E. (1999a). Novel mechanisms control the folding and assembly of lambda5/14.1 and VpreB to produce an intact surrogate light chain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3041-6.
- Minegishi, Y., Rohrer, J., Coustan-Smith, E., Lederman, H. M., Pappu, R., Campana, D., Chan, A. C., and Conley, M. E. (1999b). An essential role for BLNK in human B cell development, *Science* 286, 1954-7.
- Misener, V., Downey, G. P., and Jongstra, J. (1991). The immunoglobulin light chain related protein lambda 5 is expressed on the surface of mouse pre-B cell lines and can function as a signal transducing molecule, *Int Immunol* 3, 1129-36.
- Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S., Ono, S., Hamaoka, T., and Kincade, P. W. (1990). Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long- term bone marrow cultures, *J Exp Med* 171, 477-88.
- Miyake, K., Weissman, I. L., Greenberger, J. S., and Kincade, P. W. (1991). Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis, *J Exp Med* 173, 599-607.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes, *Cell* 68, 869-77.
- Moore, M. W., Durdik, J., Persiani, D. M., and Selsing, E. (1985). Deletions of kappa chain constant region genes in mouse lambda chain- producing B cells involve intrachromosomal DNA recombinations similar to V-J joining, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6211-5.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and et al. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x- deficient mice, *Science* 267, 1506-10.
- Muljo, S. A., and Schlissel, M. S. (2000). Pre-B and pre-T-cell receptors: conservation of strategies in regulating early lymphocyte development, *Immunol Rev* 175, 80-93.
- Nadel, B., Tang, A., and Feeney, A. J. (1998). V(H) replacement is unlikely to contribute significantly to receptor editing due to an ineffectual embedded recombination signal sequence, *Mol Immunol* 35, 227-32.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1, *Nature* 382, 635-8.
- Nakamura, T., Sekar, M. C., Kubagawa, H., and Cooper, M. D. (1993). Signal transduction in human B cells initiated via Ig beta ligation, *Int Immunol* 5, 1309-15.
- Namen, A. E., Lupton, S., Hjerrild, K., Wignall, J., Mochizuki, D. Y., Schmierer, A., Mosley, B., March, C. J., Urdal, D., and Gillis, S. (1988). Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7, *Nature* 333, 571-3.
- Nemazee, D. A., and Burki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes, *Nature* 337, 562-6.

- Nemazee, D. (2000). Receptor editing in B cells, *Adv Immunol* 74, 89-126.
- Newton, K., & Strasser, A. (2001). Cell Death Control In Lymphocytes, *Advances in Immunology* 76, 179.
- Nielsen, P. J., Lorenz, B., Muller, A. M., Wenger, R. H., Brombacher, F., Simon, M., von der Weid, T., Langhorne, W. J., Mossmann, H., and Kohler, G. (1997). Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice, *Blood* 89, 1058-67.
- Nishimoto, N., Kubagawa, H., Ohno, T., Gartland, G. L., Stankovic, A. K., and Cooper, M. D. (1991). Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6284-8.
- Nomura, J., Matsuo, T., Kubota, E., Kimoto, M., and Sakaguchi, N. (1991). Signal transmission through the B cell-specific MB-1 molecule at the pre-B cell stage, *Int Immunol* 3, 117-26.
- Novobrantseva, T. I., Martin, V. M., Pelanda, R., Muller, W., Rajewsky, K., and Ehlich, A. (1999). Rearrangement and expression of immunoglobulin light chain genes can precede heavy chain expression during normal B cell development in mice, *J Exp Med* 189, 75-88.
- Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M. C., and Li, G. C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination, *Nature* 382, 551-5.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5, *Nature* 401, 556-62.
- O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (2000). Transcriptional regulation of early B-lymphocyte differentiation, *Immunol Rev* 175, 94-103.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination, *Science* 248, 1517-23.
- Ogawa, M., Nishikawa, S., Ikuta, K., Yamamura, F., Naito, M., and Takahashi, K. (1988). B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac, *Embo J* 7, 1337-43.
- Ohnishi, K., Shimizu, T., Karasuyama, H., and Melchers, F. (2000). The identification of a nonclassical cadherin expressed during B cell development and its interaction with surrogate light chain, *J Biol Chem* 275, 31134-44.
- Olson, M. C., Scott, E. W., Hack, A. A., Su, G. H., Tenen, D. G., Singh, H., and Simon, M. C. (1995). PU. 1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation, *Immunity* 3, 703-14.
- Osmond, D. G. (1986). Population dynamics of bone marrow B lymphocytes, *Immunol Rev* 93, 103-24.
- Osmond, D. G. (1991). Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs, *Curr Opin Immunol* 3, 179-85.
- Osmond, D. G., Rico-Vargas, S., Valenzona, H., Fauteux, L., Liu, L., Janani, R., Lu, L., and Jacobsen, K. (1994). Apoptosis and macrophage-mediated cell deletion in the regulation of B lymphopoiesis in mouse bone marrow, *Immunol Rev* 142, 209-30.
- Osmond, D. G., Rolink, A., and Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model, *Immunol Today* 19, 65-8.

- Ouyang, H., Nussenzweig, A., Kurimasa, A., Soares, V. C., Li, X., Cordon-Cardo, C., Li, W., Cheong, N., Nussenzweig, M., Iliakis, G., et al. (1997). Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination *In vivo*, *J Exp Med* 186, 921-9.
- Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S. D., Puel, A., Farr, A. G., Ziegler, S. F., Leonard, W. J., and Lodish, H. F. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin, *Nat Immunol* 1, 59-64.
- Pappu, R., Cheng, A. M., Li, B., Gong, Q., Chiu, C., Griffin, N., White, M., Sleckman, B. P., and Chan, A. C. (1999). Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development, *Science* 286, 1949-54.
- Park, Y. H., and Osmond, D. G. (1989). Dynamics of early B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow: proliferation of cells containing terminal deoxynucleotidyl transferase, *Eur J Immunol* 19, 2139-44.
- Park, L. S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Muller, W., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Farr, A. G., et al. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor, *J Exp Med* 192, 659-70.
- Pelanda, R., Schaal, S., Torres, R. M., and Rajewsky, K. (1996). A prematurely expressed Ig(kappa) transgene, but not V(kappa)J(kappa) gene segment targeted into the Ig(kappa) locus, can rescue B cell development in lambda5-deficient mice, *Immunity* 5, 229-39.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R. M., Nemazee, D., and Rajewsky, K. (1997). Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification, *Immunity* 7, 765-75.
- Pernis, B. G., Chiappino, G., Kelus, A.S. und Gell, P.G.H. (1965). Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues, *J Exp Med* 122, 853.
- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., and et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice, *J Exp Med* 180, 1955-60.
- Pewzner-Jung, Y., Friedmann, D., Sonoda, E., Jung, S., Rajewsky, K., and Eilat, D. (1998). B cell deletion, anergy, and receptor editing in "knock in" mice targeted with a germline-encoded or somatically mutated anti-DNA heavy chain, *J Immunol* 161, 4634-45.
- Pillai, S., and Baltimore, D. (1987). Formation of disulphide-linked mu 2 omega 2 tetramers in pre-B cells by the 18K omega-immunoglobulin light chain, *Nature* 329, 172-4.
- Radic, M. Z., Erikson, J., Litwin, S., and Weigert, M. (1993). B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors, *J Exp Med* 177, 1165-73.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system, *Nature* 381, 751-8.
- Ray, R. J., Furlonger, C., Williams, D. E., and Paige, C. J. (1996). Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development *in vitro*, *Eur J Immunol* 26, 10-6.
- Reichlin, A., Hu, Y., Meffre, E., Nagaoka, H., Gong, S., Kraus, M., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. (2001). B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta, *J Exp Med* 193, 13-23.

- Reichman-Fried, M., Hardy, R. R., and Bosma, M. J. (1990). Development of B-lineage cells in the bone marrow of scid/scid mice following the introduction of functionally rearranged immunoglobulin transgenes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2730-4.
- Reichman-Fried, M., Bosma, M. J., and Hardy, R. R. (1993). B-lineage cells in mu-transgenic scid mice proliferate in response to IL-7 but fail to show evidence of immunoglobulin light chain gene rearrangement, *Int Immunol* 5, 303-10.
- Reth, M. G., and Alt, F. W. (1984). Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells, *Nature* 312, 418-23.
- Reth, M., Gehrmann, P., Petrac, E., and Wiese, P. (1986). A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production, *Nature* 322, 840-2.
- Reth, M., Petrac, E., Wiese, P., Lobel, L., and Alt, F. W. (1987). Activation of V kappa gene rearrangement in pre-B cells follows the expression of membrane-bound immunoglobulin heavy chains, *Embo J* 6, 3299-305.
- Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes., *Ann Rev Immunol* 10, 97.
- Reya, T., Yang-Snyder, J. A., Rothenberg, E. V., and Carding, S. R. (1996). Regulated expression and function of CD122 (interleukin-2/interleukin-15R-beta) during lymphoid development, *Blood* 87, 190-201.
- Rich, B. E. (1997). Autocrine expression of interleukin-7 rescues lymphoid expansion in interleukin-7-deficient mice, *Immunology* 92, 374-80.
- Rolink, A., Kudo, A., Karasuyama, H., Kikuchi, Y., and Melchers, F. (1991a). Long-term proliferating early pre B cell lines and clones with the potential to develop to surface Ig-positive, mitogen reactive B cells in vitro and in vivo, *Embo J* 10, 327-36.
- Rolink, A., Streb, M., Nishikawa, S., and Melchers, F. (1991b). The c-kit-encoded tyrosine kinase regulates the proliferation of early pre-B cells, *Eur J Immunol* 21, 2609-12.
- Rolink, A., Karasuyama, H., Grawunder, U., Haasner, D., Kudo, A., and Melchers, F. (1993). B cell development in mice with a defective lambda 5 gene, *Eur J Immunol* 23, 1284-8.
- Rolink, A., Haasner, D., Nishikawa, S., and Melchers, F. (1993). Changes in frequencies of clonable pre B cells during life in different lymphoid organs of mice, *Blood* 81, 2290-300.
- Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H., and Melchers, F. (1994). IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development, *Int Immunol* 6, 1257-64.
- Rolink, A., ten Boekel, E., Melchers, F., Fearon, D. T., Krop, I., and Andersson, J. (1996). A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors, *J Exp Med* 183, 187-94.
- Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5- deficient B-cell progenitors, *Nature* 401, 603-6.
- Rolink, A. G., Winkler, T., Melchers, F., and Andersson, J. (2000). Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment, *J Exp Med* 191, 23-32.
- Rolink, A. G., Schaniel, C., Andersson, J., and Melchers, F. (2001). Selection events operating at various stages in B cell development, *Curr Opin Immunol* 13, 202-7.

- Rosenberg, N., and Kincade, P. W. (1994). B-lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it, *Curr Opin Immunol* 6, 203-11.
- Rusconi, S., and Kohler, G. (1985). Transmission and expression of a specific pair of rearranged immunoglobulin mu and kappa genes in a transgenic mouse line, *Nature* 314, 330-4.
- Sakaguchi, N., and Melchers, F. (1986). Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes, *Nature* 324, 579-82.
- Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W., and Tonegawa, S. (1980). Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes, *Nature* 286, 676-83.
- Sakata, T., Iwagami, S., Tsuruta, Y., Teraoka, H., Tatsumi, Y., Kita, Y., Nishikawa, S., Takai, Y., and Fujiwara, H. (1990). Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line, *J Leukoc Biol* 48, 205-12.
- Sawchuk, D. J., Weis-Garcia, F., Malik, S., Besmer, E., Bustin, M., Nussenzweig, M. C., and Cortes, P. (1997). V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins, *J Exp Med* 185, 2025-32.
- Schaal, S. (1996) Durchflußzytometrische Charakterisierung von B-Zellvorläuferpopulationen in der Maus, Promotion, Universität zu Köln, Köln.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1, *Cell* 59, 1035-48.
- Schmidt, E. E., Taylor, D. S., Prigge, J. R., Barnett, S., and Capecchi, M. R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13702-7.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells, *Nucleic Acids Res* 23, 5080-1.
- Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P. O., Rajewsky, K., and Stewart, A. F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice, *Nucleic Acids Res* 26, 1427-32.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages, *Science* 265, 1573-7.
- Shaffer, A. L., and Schliessel, M. S. (1997). A truncated heavy chain protein relieves the requirement for surrogate light chains in early B cell development, *J Immunol* 159, 1265-75.
- Shapiro, M. A., and Weigert, M. (1987). How immunoglobulin V kappa genes rearrange, *J Immunol* 139, 3834-9.
- Shinjo, F., Hardy, R. R., and Jongstra, J. (1994). Monoclonal anti-lambda 5 antibody FS1 identifies a 130 kDa protein associated with lambda 5 and Vpre-B on the surface of early pre-B cell lines, *Int Immunol* 6, 393-9.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement, *Cell* 68, 855-67.
- Sitia, R., Neuberger, M., Alberini, C., Bet, P., Fra, A., Valetti, C., Williams, G., and Milstein, C. (1990). Developmental regulation of IgM secretion: the role of the carboxy-terminal cysteine, *Cell* 60, 781-90.

- Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D., and Rajewsky, K. (1997). B cell development under the condition of allelic inclusion, *Immunity* 6, 225-33.
- Spanopoulou, E., Roman, C. A., Corcoran, L. M., Schlissel, M. S., Silver, D. P., Nemazee, D., Nussenzweig, M. C., Shinton, S. A., Hardy, R. R., and Baltimore, D. (1994). Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice, *Genes Dev* 8, 1030-42.
- Stanhope-Baker, P., Hudson, K. M., Shaffer, A. L., Constantinescu, A., and Schlissel, M. S. (1996). Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro, *Cell* 85, 887-97.
- Stavnezer, J. (2000). Molecular processes that regulate class switching, *Curr Top Microbiol Immunol* 245, 127-68.
- Stephan, R. P., Reilly, C. R., and Witte, P. L. (1998). Impaired ability of bone marrow stromal cells to support B-lymphopoiesis with age, *Blood* 91, 75-88.
- Stockton, B. M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., and von Andrian, U. H. (1998). Negative regulation of T cell homing by CD43, *Immunity* 8, 373-81.
- Stoddart, A., Fleming, H. E., and Paige, C. J. (2000). The role of the preBCR, the interleukin-7 receptor, and homotypic interactions during B-cell development, *Immunol Rev* 175, 47-58.
- Storb, U. (1987). Transgenic mice with immunoglobulin genes, *Annu Rev Immunol* 5, 151-74.
- Sudo, T., Ito, M., Ogawa, Y., Iizuka, M., Kodama, H., Kunisada, T., Hayashi, S., Ogawa, M., Sakai, K., and Nishikawa, S. (1989). Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development, *J Exp Med* 170, 333-8.
- Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., and Yoshida, H. (1993). Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9125-9.
- Takemori, T., and Rajewsky, K. (1981). Lambda chain expression at different stages of ontogeny in C57BL/6, BALB/c and SJL mice, *Eur J Immunol* 11, 618-25.
- Takemori, T., Mizuguchi, J., Miyazoe, I., Nakanishi, M., Shigemoto, K., Kimoto, H., Shirasawa, T., Maruyama, N., and Taniguchi, M. (1990). Two types of mu chain complexes are expressed during differentiation from pre-B to mature B cells, *Embo J* 9, 2493-500.
- Taki, S., Meiering, M., and Rajewsky, K. (1993). Targeted insertion of a variable region gene into the immunoglobulin heavy chain locus, *Science* 262, 1268-71.
- Taki, S., Schwenk, F., and Rajewsky, K. (1995). Rearrangement of upstream DH and VH genes to a rearranged immunoglobulin variable region gene inserted into the DQ52-JH region of the immunoglobulin heavy chain locus, *Eur J Immunol* 25, 1888-96.
- ten Boekel, E., Melchers, F., and Rolink, A. (1995). The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development, *Int Immunol* 7, 1013-9.
- ten Boekel, E., Melchers, F., and Rolink, A. G. (1997). Changes in the V(H) gene repertoire of developing precursor B lymphocytes in mouse bone marrow mediated by the pre-B cell receptor, *Immunity* 7, 357-68.
- ten Boekel, E., Melchers, F., and Rolink, A. G. (1998). Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression, *Immunity* 8, 199-207.

- Theze, J., Alzari, P. M., and Bertoglio, J. (1996). Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions, *Immunol Today* 17, 481-6.
- Thiebe, R., Schable, K. F., Bensch, A., Brensing-Kuppers, J., Heim, V., Kirschbaum, T., Mitlohner, H., Ohnrich, M., Pourrajabi, S., Roschenthaler, F., et al. (1999). The variable genes and gene families of the mouse immunoglobulin kappa locus, *Eur J Immunol* 29, 2072-81.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M. J., Groth, A. C., and Calos, M. P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites, *Gene* 244, 47-54.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells, *J Exp Med* 177, 1009-20.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity, *Nature* 302, 575-81.
- Tornberg, U. C., Bergqvist, I., Haury, M., and Holmberg, D. (1998). Regulation of B lymphocyte development by the truncated immunoglobulin heavy chain protein Dmu, *J Exp Med* 187, 703-9.
- Tsubata, T., and Reth, M. (1990). The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface, *J Exp Med* 172, 973-6.
- Tsubata, T., Tsubata, R., and Reth, M. (1991). Cell surface expression of the short immunoglobulin mu chain (D mu protein) in murine pre-B cells is differently regulated from that of the intact mu chain, *Eur J Immunol* 21, 1359-63.
- Tsubata, T., Tsubata, R., and Reth, M. (1992). Crosslinking of the cell surface immunoglobulin (mu-surrogate light chains complex) on pre-B cells induces activation of V gene rearrangements at the immunoglobulin kappa locus, *Int Immunol* 4, 637-41.
- Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L., and Tybulewicz, V. L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk, *Nature* 378, 298-302.
- Tutter, A., Brodeur, P., Shlomchik, M., and Riblet, R. (1991). Structure, map position, and evolution of two newly diverged mouse Ig VH gene families, *J Immunol* 147, 3215-23.
- van Gent, D. C., McBlane, J. F., Ramsden, D. A., Sadofsky, M. J., Hesse, J. E., and Gellert, M. (1995). Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system, *Cell* 81, 925-34.
- van Gent, D. C., Ramsden, D. A., and Gellert, M. (1996). The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination, *Cell* 85, 107-13.
- van Gent, D. C., Hoim, K., Pauli, T. und Gellert, M. (1997). Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins., *EMBO J* 16, 2665.
- Victor, K. D., Vu, K., and Feeney, A. J. (1994). Limited junctional diversity in kappa light chains. Junctional sequences from CD43+B220+ early B cell progenitors resemble those from peripheral B cells, *J Immunol* 152, 3467-75.
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E., and Murray, R. (1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine, *J Exp Med* 181, 1519-26.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation, *Immunity* 5, 537-49.

- Wasserman, R., Li, Y. S., and Hardy, R. R. (1997). Down-regulation of terminal deoxynucleotidyl transferase by Ig heavy chain in B lineage cells, *J Immunol* 158, 1133-8.
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Iwao, Y., Tsuchiya, M., Ishikawa, H., Aiso, S., Hibi, T., and Ishii, H. (1995). Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes, *J Clin Invest* 95, 2945-53.
- Wei, C., Zeff, R., and Goldschneider, I. (2000). Murine Pro-B Cells Require IL-7 and Its Receptor Complex to Up-Regulate IL-7R α , Terminal Deoxynucleotidyltransferase, and $c\mu$ Expression, *J Immunol* 164, 1961-70.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment, *Immunity* 3, 521-30.
- Winkler, T. H., Rolink, A., Melchers, F., and Karasuyama, H. (1995). Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface, *Eur J Immunol* 25, 446-50.
- Witte, P. L., Frantsve, L. M., Hergott, M., and Rahbe, S. M. (1993). Cytokine production and heterogeneity of primary stromal cells that support B lymphopoiesis, *Eur J Immunol* 23, 1809-17.
- Yamagami, T., ten Boekel, E., Andersson, J., Rolink, A., and Melchers, F. (1999a). Frequencies of multiple IgL chain gene rearrangements in single normal or kappaL chain-deficient B lineage cells, *Immunity* 11, 317-27.
- Yamagami, T., ten Boekel, E., Schaniel, C., Andersson, J., Rolink, A., and Melchers, F. (1999b). Four of five RAG-expressing J κ -small pre-BII cells have no L chain gene rearrangements: detection by high-efficiency single cell PCR, *Immunity* 11, 309-16.
- Yancopoulos, G. D., Desiderio, S. V., Paskind, M., Kearney, J. F., Baltimore, D., and Alt, F. W. (1984). Preferential utilization of the most JH-proximal VH gene segments in pre-B-cell lines, *Nature* 311, 727-33.
- Yancopoulos, G. D., and Alt, F. W. (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes, *Annu Rev Immunol* 4, 339-68.
- Ye, J., McCray, S. K., and Clarke, S. H. (1996). The transition of pre-BI to pre-BII cells is dependent on the VH structure of the μ /surrogate L chain receptor, *Embo J* 15, 1524-33.
- Young, F., Ardman, B., Shinkai, Y., Lansford, R., Blackwell, T. K., Mendelsohn, M., Rolink, A., Melchers, F., and Alt, F. W. (1994). Influence of immunoglobulin heavy- and light-chain expression on B-cell differentiation, *Genes Dev* 8, 1043-57.
- Young, F., Mizoguchi, E., Bhan, A. K., and Alt, F. W. (1997). Constitutive Bcl-2 expression during immunoglobulin heavy chain- promoted B cell differentiation expands novel precursor B cells, *Immunity* 6, 23-33.
- Yurovsky, V. V., and Kelsoe, G. (1993). Pairing of VH gene families with the lambda 1 light chain: evidence for a non-stochastic association, *Eur J Immunol* 23, 1975-9.
- Zhang, Y., Lu, L., Furlonger, C., Wu, G. E., and Paige, C. J. (2000). Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis, *Nat Immunol* 1, 392-7.
- Zhu, C., Bogue, M. A., Lim, D. S., Hasty, P., and Roth, D. B. (1996). Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates, *Cell* 86, 379-89.
- Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation, *Cell* 79, 875-84.

Zoller, M., and Achtnich, M. (1991). Evidence for regulation of naturally activated autoreactive B cells, *Eur J Immunol* 21, 305-12.

7. ANHANG

Abb. 22 (S. 115ff). Nukleotidsequenzen von μ HC-Transkripten aus einzelnen prä-B-Zellen von Wt- und VPE/JHT-Mäusen, oder in vitro aus VPE/JHT-pro-B-Zellen differenzierten prä-B-Zellen.

Die Bezeichnung der Nukleotidsequenz des μ HC-Transkriptes enthält mit „Wt-prä-B/Z.27“ oder „VPE/JHT-prä-B/Z.38“ die Angabe aus welchem Mausstamm die isolierte prä-B-Zelle stammt, gefolgt von einer Zellnummerierung wie „Z.38“. Angegeben wird weiterhin zu welcher V_H -Genfamilie (Kofler et al., 1992; Mainville et al., 1996) das verwendete V_H -Gen zugeordnet werden konnte¹⁴, der Name des verwendeten D_H -Gensegments und dessen Leseraster (rf), das identifizierte J_H -Element, sowie ob das $V_H D_H J_H$ -Rearrangement produktiv rearrangiert ist (produktiv), also die Expression einer μ HC erlaubt.

Das verwendete D_H -Gensegment wurde als solches identifiziert, sofern es in mindestens 5 Nukleotiden mit einem bekannten D_H -Gensegment (Chang et al., 1992) übereinstimmte. Nukleotide, die nicht einem V_H -Gen, einem D_H -Gensegment oder einem J_H -Element zugeordnet werden konnten, wurden als mögliche N- oder P-Nukleotide (Alt und Baltimore, 1982; Lafaille et al., 1989) betrachtet. Falls die Nukleotidsequenz keine Identifizierung eines D_H -Gensegments oder keine eindeutige Zuordnung eines V_H -Gens zu einer V_H -Genfamilie zuließ, wird n.i. (nicht identifiziert) angegeben.

Die Nukleotidsequenz des zur Amplifikation verwendeten $MsV_H E$ -Primeroligonukleotids am 5' Ende jedes μ HC-Transkripts ist mit unterbrochener Linie unterstrichen. Die Nukleotidsequenzen sind in Form von V_H -Gensegment, >N-,P-Nukleotide<, D_H -Gensegment, >N-,P-Nukleotide<, J_H -Gensegment angegeben.

N: Nicht identifiziertes Nukleotid.

Wie in 3.5.2 beschrieben, prägen die meisten der ex vivo aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen isolierten prä-B-Zellen oder der aus pro-B-Zellen dieser Mäuse in vitro differenzierten prä-B-Zellen, von denen eine μ HC-Transkript amplifiziert werden konnte, das ursprüngliche VPE-Allel aus (s. 3.5.2, Tab. 2). Alle Nukleotidsequenzen von durch V_H -Gen replacement Rekombinationen mit dem ursprünglichen VDJ-PE Segment entstandenen $V_H D_H J_H$ -Rearrangements sind hier angegeben (s. auch Tab. 2 und Abb. 21). Da die Nukleotidsequenzen der vom ursprünglichen VPE-Allel exprimierten μ HC-Transkripte mit der von Maruyama et al. (2000) publizierte Nukleotidsequenz übereinstimmen (mit Ausnahme der Sequenz des verwendeten $MsV_H E$ -Primeroligonukleotids), wird hier beispielhaft nur die Nukleotidsequenz eines einzigen vom ursprünglichen VPE-Allel ausgeprägten μ HC-Transkripts einer prä-B-Zelle aus dem Knochenmark von VPE/JHT-Mäusen (VPE/JHT-prä-B/Z.38) gezeigt.

¹⁴ Die Identifizierung der IgH-Genkomplexe und der darin verwendeten V_H -Gene verschiedener V_H -Gen-Familien erfolgte mit dem Programm DNAPLOT von Werner Müller, Institut für Genetik, Köln (www.dnplot.de).

Wt-prä-B/Z.27: V_H1-Familie; DQ52 (rf3); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAACCTGGGGCCTCAGTGAAG
 ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTG
 GACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCACTGGTTATACTGAGTACAATCAGAAGTT
 CAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCT
 GACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA AACTGG >C<
 CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAAAG

Wt-prä-B/Z.28: V_H10-Familie; DFI16.1 (rf3); J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTTCACTGACTATTACATGTATTGGGTTCCGACACTCCGG
 AAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACAGTGT
 GAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT
 GAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA >TTTCCC< TTATTACTACGG
 TATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGCTCCTCAGAG

Wt-prä-B/Z.29: V_H3-Familie; DSP2.1 (oder: DSP2.5, DSP2.7) (rf1); J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTTAC
 TCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCACTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCC
 AGGAAACAACTGGAAGGATGGGCTACATACACTACAGTGGTAGCACTAACTACAACCCATCTCTCA
 AAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCAAGAACCAGTTCTTCTGAGTTGAATTCTGTGACTA
 CTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGA >A< ATGGTAACTAC
 TACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGA

Wt-prä-B/Z.45: V_H2-Familie; D_H-Segment n.i.; J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCC
 ATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAAACCGGCTATGGTGTAACTGGGTTCCGACGCTCCAG
 GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGTGGTGAAGCACAGACTATAATTCAGTCTCA
 AATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCA
 AACTGATGACACAGCCAGGNACTACTGTGCCAGA >GCCTTCTT< CTAT
 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCNAAG

Wt-prä-B/Z.47: V_H5-Familie; DSP2. (rf1); J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTTCACTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACGCTCCAG
 AGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAGAAATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACACTGT
 GACGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCT
 GAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG >GGAGGGAGG< TGGTTAC >CCC<
 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGA

Wt-prä-B/Z.49: V_H1-Familie; DFI16.1 (rf1); J_H1; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
 ATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAGCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTG
 GACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTAGTACTAACTACAATGAGAAGTT
 CAAGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCT
 GACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCA >AAGGAG< TACGGTA >CCTT<
 GTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACNACGGTCACGGTCTCCTCAA

Wt-prä-B/Z.51: V_H6-Familie; D_H-Segment n.i.; J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAAC
 TCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
 AAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATT
 CAGTCAAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAA
 CTTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTG >TGAGACATGGGG<
 GGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTNTCTGCAGA

Wt-prä-B/Z.53: V_H1-Familie; D_H-Segment n.i.; J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 ATACCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAACATGGACTGGGTGAAGCAGAGCCATG
 GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTC
 AAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTG
 ACATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA >AAGGCTCTCT<
 ATACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCNAAG

Wt-prä-B/Z.58: V_H4-Familie; DSP2. (rf1); J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAA
 CTNTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAG
 GGAAAGGGCTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGCAGTACGATAAACTATACGCCATCTCT
 AAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGCTGTACCTGCAAATGAGCAAAGTG
 AGATCTGAGGACACAGCCCTTTATTACTGTGCAAGA >CGCC< CCTAC >CCCCAT<
 TACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGA

Wt-prä-B/Z.61: V_H9-Familie; DSP2.10 oder DSP2.11 (rf1); J_H2; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGCT
 ATACCTTCACAACTATGCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGG
 GCTGGAAATACACCAACACTGGAGAGCCAACATATGGTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTC
 TTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACATGGCTACA
 TATTTCTGTGCAAGA >TCACGAA< ACTATAGGTACG
 ACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGAG

Wt-prä-B/Z.62: V_H12-Familie; D_H-Segment n.i.; J_H1; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAAACCCTCACAGTCACTNNTTCC
 TCGCCTGCTCTATTACTGGTTTCCCCATCACCAGTGGTTACTACTGGATCTGGATCCGTCAGTCACC
 TGGGAAACCCCTAGAATGGATGGGGTACATCACTCATAGTGGGGAAACTTTCTACAACCCATCCCTC
 CAGAGCCCCATCTCCATTACTAGAGAAACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAATTGAACTCTGTGAC
 CACAGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCA >GGAGACAGCGCGGGT<
 TACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGA

Wt-prä-B/Z.105: V_H3-Familie; DSP2. (rf3); J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAACCTTNTCAGTCACTTTTAC
 TCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCC
 AGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATACTACAGTGGTAGCACTAACTACAACCCATCTCTC
 AAAAGTCGAATCTCTACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCAATTGAACTCTGTGAC
 TACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGA >GG< ATGGTTA >GGTCCTT<
 ATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCNCAGANA

Wt-prä-B/Z.110: V_H1-Familie; DFI16.1 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCNAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGNNTTCTGGATACGCCTTCACTAATTACTTTGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTG
 GACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTT
 CAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCT
 GACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGA >AGGGGATTC<
TATTACTACGGTAGTAGCTAC >GTTGGGG<
 CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Wt-prä-B/Z.111: V_H3-Familie; DQ52 (rf3), J_H4, produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTC
 TCACCTGCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCC
 AGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTAGCAATAACTACAACCCATCTCTC
 AAAAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAAGTTGAACTCTGTGAC
 TACTGAGGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGA >GATCT< CTGGGAC >TT<
 CTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGNCCTCAGTNNCCGTGTNCTC

Wt-prä-B/Z.112: V_H-Familie n.i.; DSP2. (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTNGAGGTNCANCTGCAGGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTC
TGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGAGTGTAGGCTGGATTCTGCAGCCT
 TCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGAATGATGATAAGTACTATAACCCAGCC
 CTGAAAAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAACAACCAGGTATTCTCAAGATCGCCAGTG
 TGGTCACTGCAGATACNGCCACATACTACTGTGC >TCGAATAG< TCTACT >CCACCG<
 CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Wt-prä-B/Z.116: V_H5-Familie; DSP2. (rf1); J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGNGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACITTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCAG
 ACAAGAGGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACAGTGT
 GAAGGGGCGATTACCATNTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT
 GAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTAC TGTGCAAGA >C< ACTATGGTA >TCCTACCGGCCT<
 ATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGAGA

Wt-prä-B/Z.117: V_H14-Familie; DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCAGGGGCCTCAGTCAAG
 TTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
 AACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTGATACTGAATATGCCCCGAAGTT
 CCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCT
 GACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGT >AC< CTACTATGATTAC >C<
 CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGNA

Wt-prä-B/Z.118: V_H1-Familie; DQ52 (rf2); J_H2; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
 TATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGG
 AAAGAACCCTTGAGTGGATTGACTTATTAATCCTTACAATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTTCA
 AGGGCAAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCTCAGTCTGA
 CATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA >GA< GGGAC >GGT<
 ACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCNCAGAGA

Wt-prä-B/Z.119: V_H1-Familie; DSP2.9 (rf3); J_H4; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTGAAG
 ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTG
 GACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGTCTATTTATCCTGGAAATAGTGATACTAGCTACAACCAGAAGTT
 CAAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCT
 GACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGA >CGG< TGGTTACTAC >TTT<
 CTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGANA

Wt-prä-B/Z.155: V_H5-Familie; DSP2.7 (rf1); J_H1; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTTCGCCAGACTCCAG
 ACAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACAGTGT
 GAAGGGGCGATTACCCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT
 GAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA >CAGAGGG< CCTACTATGGTAACTA
 >CGG< CTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGA

VPE/JHT-prä-B/Z.86: V_H1-Familie; DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCNAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGC
 TGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCACTAGCTACTGGAT
 AGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTAG
 TACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCCTGAGATAACATCCTCCAACACAGCCTAC
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGT >TCCCTCAGTTGGA<
ACTATGATT >TCG< CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.89: V_H5-Familie; DSP2. (rf1); DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCAGAGAAGG
 GGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCC
 GATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACCCTGTTCTGCAAATGACCAGTCTAAGGTCTGAGGA
 CACGGCCATGTATTACTGTGCAAGA >CGGG< IATGGT >CAAGTTGGA< ACTATGATT >TCG<
 CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.122: V_H1-Familie; DSP2.2 (oder DSP 2.3) (rf3); DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAANTNNAGGNGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCCTCAGTGAAG
 ATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
 GACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTT
 CAAGGGTAAAGCCCACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCT
 AACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGA >CG< ACGAC >GAAGTTGGA< ACTATGATT
 >TCG< CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.125: V_H1-Familie; DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGT
 TGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATGATATAAACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGA
 ACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCTGGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTC
 AAGGGCAAGGCCCACTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGGCTG
 ACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGA >CGGACGAGGATTTGGA< ACTATGATT
 >TCG< CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.142: V_H2-Familie; DSP2.2 (rf2); DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCNAGGTGCAAGCTGCAGGAGTNTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTC
CATCACTTGCAGTGTCTCTGGGTTTTCATTAACCAGCTATGGTGTACTGCGGTTCCGCCAGCCTCCA
 GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGAAGCACAAATTATAATTCGGCTCTC
 ATGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGC
 AAAGTATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCGGA >GGAGG< GATTACGAC >GAGTTGGA<
ACTATGATT >TCG< CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.152: V_H1-Familie; DSP2. (rf1); DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
ATATCCTGCAAGGCTTCTGGTACTCATTCACTGGCTACTACATGCAGTGGGTGAAGCAGAGCCATG
 GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAACAATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTT
 CAAGGGCAAGGCCATATTAAGTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCT
 GACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCNAGA >TGGG< TACGAC >GGGGAAGTTGGA<
ACTATGATT >TCG< CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCNCTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.153: V_H1-Familie; DFL16. (rf1); DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGNCCTCAGTGAAG
ATTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
 GACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGAATACTACAATGGAAAGTT
 CAAGGGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCT
 AACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGA >CTATGGGGTA< ACTACG >AGTGTGGA<
ACTATGATT >TCG< CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.154: V_H-Familie n.i.; DFL16. (rf3); DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCANCTGCAGNAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAG
 GGAAAGGGNTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGCAGTACGATAAACTATACGCCATCTNT
 AAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGCTGTACCTGCAAATGAGCAAAGTG
 AGATCTGAGGACACAGCCCTTTACTGTGCAAGA >AGT< TTACTAC >AAAGTTGGA<
ACTATGATT >TCG< CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTNGTCACTGTCTCTGCA

VPE/JHT-prä-B/Z.38: V_H1-Familie; DSP2.2 (rf1); J_H3; produktiv

GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGTTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAA
 GGCCCTGAGTGGATCGGAATGATTGCTCCTTCTGATAATTATACTAAGTACAATCAAAGTTCAAGGGTAA
 GGCCACATTGACAGTAGGCACATCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGGGGA
 CTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGT >TGGA< ACTATGATT >TCG<
 CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

LEBENS LAUF

Mario Zierden

Geboren am 20.03.1969 in Prüm, Deutschland

Ledig

Schulbildung

1976 – 1980	Grundschule Prüm
1980 – 1988	Regino-Gymnasium Prüm
Juni 1988	Allgemeine Hochschulreife
1989 – 1990	Grundwehrdienst

Studium

1990 – 1992	Studium der Biologie (Diplom) an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
1992 – 1996	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität zu Köln
1995 – 1996	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter der Anleitung von Prof. Dr. Rajewsky Thema: Molekulare Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark der Maus
Juni 1996	Diplomprüfung in Biologie
seit Juli 1996	Promotionsstudium am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter der Anleitung von Prof. Dr. Rajewsky

Köln, Oktober 2001

ANMERKUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1996 bis Oktober 2001 unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Rajewsky am Institut für Genetik der Universität zu Köln angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich allen MitarbeiterInnen der Abteilung für Immunologie für ihren Rat und Unterstützung jedweder Art danken. Hervorheben möchte ich dabei Åsa Böhm, Angela Egert, Brigitte Hülser, Anke Leinhaas, Ursula Lichtenberg, Werner Müller, Tanja Novobrantseva, Gisela Schmall, Christian Voßhenrich und Hannelore Wirges-Koch.

Claudia Uthoff-Hachenberg und Brigitte Hampel möchte ich für die vielfältige Hilfe bei der Zellkultur danken.

Mein besonderer Dank gilt Christoph Göttlinger, der auch noch bei später Stunde und manchmal gegen die „Interessen“ des FACSstar+ für die sterile Isolierung der gewünschten Zellen inklusive Reanalyse gesorgt hat.

Mitsuo Maruyama danke ich herzlich für die Bereitstellung der VPE- und VPEinv-Mäuse, sowie für Rat, Tat, Diskussionen und für das leckere Sushi!

Weiterhin danke ich den Teilnehmern des B-Zell-Clubs für die zahlreichen Diskussionen.

Stephan Schwers und Manfred Kraus danke ich für das Korrekturlesen und die Diskussionen.

Andreas Ehlich danke ich für das Korrekturlesen, seinen Rat und die zahlreichen Diskussionen im Verlauf dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Rajewsky für seine Betreuung, die besonders kompetente Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die vielfältigen Anregungen im Verlauf dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung dieses Studiums und ihre moralische Unterstützung. Mein Dank gilt auch meiner Schwester Claudia.

Zu guter Letzt danke ich ganz besonders Nadine Wilsing für ihre stetige moralische Unterstützung, die vielen Diskussionen, für Rat und Tat, sowie für ihren Optimismus!

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klaus Rajewsky betreut worden.

Köln, im Oktober 2001

Mario Zierden