

Anne Doster  
Dr. med.

## **Analyse von Expression und Funktion der Recombinase activating genes in Toll-like Receptor-9 stimulierten peripheren Blut-B-Lymphozyten**

Promotionsfach: Hygiene  
Doktorvater: Prof. Dr. med. K. Heeg

Rag-1 und Rag-2 sind die Schlüsselenzyme der V(D)J-Rekombination, der molekularen Basis für die Diversifizierung der B- und T-Zell-Rezeptoren. Dieser Enzymkomplex hat bei der initialen V(D)J-Rekombination in der B-Zell-Entwicklung wie auch im anschließenden  $\kappa/\lambda$ -Rearrangement und beim  $V_H$ -Element-Replacement eine zentrale Aufgabe. Folglich wird Rag-1 und -2 in der Toleranzentwicklung bzw. in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Zudem wird eine Korrelation der Re-Expression der Enzyme im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, wie JIA oder SLE, mit dem Oberflächenmarker CD5 beschrieben. In einer vorherigen Studie unter Mitwirkung der Autorin konnte gezeigt werden, dass der TLR9 Agonist CpG ODN 2006 die CD5 Expression triggert. Daher war es Ziel dieser Doktorarbeit zu analysieren, ob es im Rahmen einer TLR9 Stimulation zu einer Re-Expression von Rag-1 und -2 in peripheren Blut-B-Zellen gesunder Spender kommt.

Die Daten dieser Dissertation zeigen, dass unter Stimulation mit CpG ODN eine Induktion von Rag-1 mRNA und Protein in peripheren Blut-B-Zellen stattfindet. Dies konnte mittels PCR, FACS-Analyse und Western Blot ermittelt werden. Wie in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie und FACS-Analyse detektiert, ist die Rag-Re-Expression in B-Zell-Blasten am stärksten ausgeprägt und geht mit starker Proliferation einher. Desweiteren konnte mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie, FACS-Analyse sowie Annexin-Färbungen gezeigt werden, dass der starke Proliferationsstimulus auf einer CpG ODN getriggerten prolongierten PKB/Akt-Aktivität beruht, die mit der Blastenbildung und der ZAP70-Expression korreliert.

Weiter belegen die durchgeführten Untersuchungen, dass alle für eine Funktion der Rag-Enzyme notwendigen Ko-Faktoren (wie z.B. die Enzyme des NHEJ-Komplex: Ku70/80, Artemis, TdT, Pol  $\mu$ , Pol  $\lambda$ , DNA Ligase-4, XLF und XRCC4) in peripheren Blut-B-Zellen vorhanden sind. Während Artemis, TdT, Pol  $\mu$ , Pol  $\lambda$ , DNA Ligase-4, XLF und XRCC4 auf mRNA Ebene nachgewiesen wurden, wurde das Schlüsselenzym des NHEJ-Komplex, Ku70/80, sowohl auf mRNA-Ebene mittels real-time RT PCR, als auch auf Protein-Ebene mittels FACS-Analyse, Western Blot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie detektiert. Hierbei konnte eine signifikante Steigerung der Expression von Ku70/80 auf Protein-Ebene nach CpG ODN Stimulation gezeigt werden. Zudem konnte Ku70/80 nach CpG ODN Stimulation mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie nukleär und zytosolisch lokalisiert werden.

Rag-2 konnte weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Das re-exprimierte Rag-1-Protein jedoch konnte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie nukleär lokalisiert werden und ist damit am Ort seiner Funktion bei einer VDJ-Rekombination vorhanden. Zudem konnten nach CpG ODN Stimulation von aufgereinigten Ig $\kappa$ -B-Zellen, Ig $\lambda$  +-B-Zellen detektiert werden. Somit ist von einem  $\kappa/\lambda$ -Rearrangement auszugehen und damit die Funktionalität des Rag-Heterodimers nachgewiesen. Eine sehr strikte Regulierung von Rag-2 ist darüber hinaus sehr wahrscheinlich, und es ist technisch möglich, dass die geringe Menge in einzelnen Zellen mit den verwendeten Methodiken nicht detektiert werden konnte.

Eine Korrelation von CD5 und der Re-Expression von Rag-1 konnte anhand der durchgeführten Experimente nicht nachvollzogen werden.

Desweiteren konnte das für die Somatische Hypermutation wichtige Enzym AID (Activation-induced cytidine deaminase), ebenso wie die Enzyme der Proliferations-induzierten DNA-Reparatur (PCNA, RAD5, RAD6) mittels real time RT-PCR in peripheren Blut-B-Zellen nachgewiesen

werden.

Zusammengefasst werfen die Daten dieser Dissertation Anhaltspunkte für eine neue Funktion des TLR9 auf: TLR9 könnte an der Veränderung, Bearbeitung von B-Zell-Rezeptoren in der Peripherie, d.h. außerhalb des Knochenmarks und der Keimzentren, der sogenannten Rezeptor revision, beteiligt sein.