

Stefan Rieken  
Dr. med.

## **G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>-vermittelte Signaltransduktion in lienalen Marginalzonen-B-Lymphozyten der Maus**

geboren am 13.07.1979 in Cloppenburg  
Staatsexamen am 27.11.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pharmakologie  
Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. Nina Wettschureck

Zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie Rezeptoren für Chemokine, Lysophospholipide oder extrazelluläre Nukleotide, sind auf Zellen des Immunsystems exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation leukozytärer Funktionen. Die Wirkungen dieser Rezeptoren werden teils durch die G<sub>i</sub>-Familie heterotrimerer G-Proteine, teils durch die Familien G<sub>12/13</sub> oder G<sub>q/11</sub> vermittelt. Während G<sub>q/11</sub> zu einer Aktivierung von  $\beta$ -Isoformen der Phospholipase C führt, bewirkt G<sub>12/13</sub> eine Aktivierung der kleinen GTPase RhoA. Beide Signalweiterleitungsmechanismen sind an der Regulation von Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferation in Leukozyten beteiligt. Um die Funktion G<sub>12/13</sub>-vermittelter Signalwege im Immunsystem zu untersuchen, wurden Mauslinien hergestellt und analysiert, in denen G $\alpha_{12}$  und G $\alpha_{13}$  in B-Lymphozyten mit Hilfe des Cre/loxP-Systems inaktiviert sind. Anhand dieser Mauslinien wurde *in vitro* und *in vivo* die Rolle von G-Proteinen im Immunsystem definiert, mit dem Ziel, zu einem besseren Verständnis der Modulation der Leukozytenfunktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beizutragen.

Licht- sowie immunfluoreszenzmikroskopische Analysen konnten belegen, dass B-G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$ -DKO-Mäuse über eine signifikant reduzierte Anzahl von Marginalzonen-B-Lymphozyten (MZBZ) in der lienalen Marginalzone verfügen. Eine quantitative Bestimmung mittels durchflusszytometrischer Experimente ergab Verluste von mehr als 75 % der in Wildtyp-Mäusen ermittelten MZBZ-Zahlen. Trotz des konstitutiven Verlustes von G $\alpha_{12}$  in allen auch nicht-lymphozytären Zellen der analysierten Mauslinie, wurde durch immunhistochemische sowie immunfluoreszenzhistologische Untersuchungen eine regelhafte Anordnung von Sinusendothelien sowie Marginalzonen-Makrophagen nachgewiesen, so dass der beobachtete Phänotyp ursächlich dem Verlust von G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$  in B-Lymphozyten zugeschrieben werden konnte. Die pathophysiologische Konsequenz der MZBZ-Reduktion wurde in B-Lymphozyten-Proliferationsexperimenten nach LPS-Exposition sowie in quantitativen Messungen der Antikörperproduktion nach TNP-Ficoll-Immunisierung untersucht; dabei ergab sich ein um mehr als ein Drittel reduzierter Proliferationswert der mit LPS stimulierten B-Lymphozyten. Ferner war die Produktion von gegen TNP-Ficoll gerichteten IgM- und IgG<sub>3</sub>-Antikörpern in B-G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$ -DKO-Mäusen im Vergleich zu gleichartig immunisierten Kontrolltieren um 90 % reduziert.

Das Wanderungsverhalten von B-Lymphozyten-spezifisch G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$ -doppeldefizienten MZBZ und folliculären B-Lymphozyten in Richtung von Chemokinen, die ihre Effekte ganz überwiegend über G $\alpha_i$ -vermittelte Signaltransduktionsprozesse vermitteln, entsprach dem der analysierten Wildtypen und ließ sich durch CXCL 12 und CXCL 13 stimulieren. Auffällig jedoch imponierte eine deutliche Hypermigration von B-G $\alpha_{12}$ /G $\alpha_{13}$ -DKO-MZBZ in Richtung von Serum sowie S1P-haltigem Medium. Eine veränderte Expression von S1P-Rezeptoren konnte als Ursache für diese Hypermigration ausgeschlossen werden. Vielmehr zeichnete sich eine veränderte S1P-Wirksamkeit dahingehend ab, dass S1P-induzierte und G $\alpha_i$ -

vermittelte Migrationsprozesse weiterhin unverändert im B- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -DKO-Tier fortbestehen, während eine S1P-induzierte und  $G\alpha_{12/13}$ -vermittelte Inhibition der Migration im DKO-Tier ausfällt. Diesem Befund scheint eine Störung der zellulären Polarisierung in Abwesenheit von  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  zu Grunde zu liegen.

Über diesen Migrationsbefund hinaus konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer integrinspezifischen Adhäsion von B-Lymphozyten auf ICAM-1-beschichteten Oberflächen nicht nur durch Chemokine, sondern auch durch die Serumphospholipide S1P und LPA hervorgerufen werden kann und dass diese proadhäsiven Effekte von LPA und S1P in B- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -DKO-B-Lymphozyten fehlen. In angeschlossenen Migrationsuntersuchungen konnte demonstriert werden, dass seröse Lysophospholipide wie LPA über  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -vermittelte Signaltransduktionsmechanismen eine wirksame Adhäsion von MZBZ auf ICAM-1 induzieren und so follikelwärts gerichteten Chemokingradienten entgegenwirken. Damit wurde die Bedeutung der Lysophospholipide S1P und LPA im Rahmen der MZBZ-Homöostase aufgezeigt; nur durch die Adhärenzsteigerung von MZBZ im ICAM-1-reichen Stromabett der Marginalzone, in welcher Chemokin- oder Lysophospholipidgradienten insbesondere follikuläre B-Lymphozyten (FoBZ) fortwährend follikel- oder sinuswärts attrahieren, wird ein physiologischer Marginalzonen-Aufbau ermöglicht.

Basierend auf diesen Befunden wird daher postuliert, dass der *in vivo* beobachtete Verlust der MZBZ-Population in B- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -DKO-Tieren auf eine Kombination aus B-zellspezifischem Adhäsionsdefekt und MZBZ-spezifischem Migrationsdefekt zurückzuführen ist. Damit ist eine neue Verbindung zwischen der Signaltransduktion von Lysophospholipiden und den komplexen Homingmechanismen von MZBZ aufgezeigt worden.