

Freiburg – B-Zell-Rezeptoren

# Paradigmenwechsel

■ Wie schwierig es ist, Daten zu publizieren, die der Lehrmeinung widersprechen, davon weiß Michael Reth aus Freiburg zu berichten. Er entwickelte eine neue Hypothese zur Aktivierung von B-Zell-Rezeptoren.

Die Stimmung von Michael Reth, der am MPI für Immunbiologie in Freiburg forscht und Sprecher des Exzellenzclusters BIOSS ist, pendelt irgendwo zwischen genervt, erledigt und freudig erregt. „Es hat zwei Jahre gedauert, bis wir das Paper endlich durch hatten“, sagt er mit einem grimmen Lächeln. Zwei Jahre von der Einreichung bis zum Druck. Zunächst war der Artikel abgelehnt worden, dann wurde ein vierter Gutachter bestellt, schließlich weitere Experimente angefordert. So kann es einem ergehen, wenn man Daten veröffentlichten will, die der Lehrbuchmeinung diametral entgegenstehen. Und genau solche Daten hatte Reth mit seinem Postdoc Jianying Yang produziert (*Nature* 2010, 467(7314):465-9).

Es geht dabei um eine immunologische Frage: Was passiert, wenn eine unreife B-Zelle auf ein Antigen trifft, das zu den Rezeptoren der B-Zelle passt? Klar, die B-Zelle wird aktiviert. Man weiß, welche Signalwege gestartet werden, damit die ruhende B-Zelle zur Plasmazelle heranreifen und Antikörper produzieren kann. Wie aber erkennt der B-Zell-Rezeptor (BCR) „sein“ Antigen? Und wie wird verhindert, dass B-Zellen schon vor der Berührung mit ihrem Antigen aktiv sind? Immerhin trägt so eine Zelle auf ihrer Oberfläche rund 120.000 Kopien dieser Rezeptoren, die membrangebundene Versionen der Antikörper sind.

BCR bestehen aus dem extrazellulären, membrangebundenen Immunglobulin (IgM oder IgD) sowie einem Dimer aus zwei weiteren Transmembranproteinen, dem Ig $\alpha$  und dem Ig $\beta$  (siehe Bild). Diese beiden Proteine haben intrazelluläre Do-

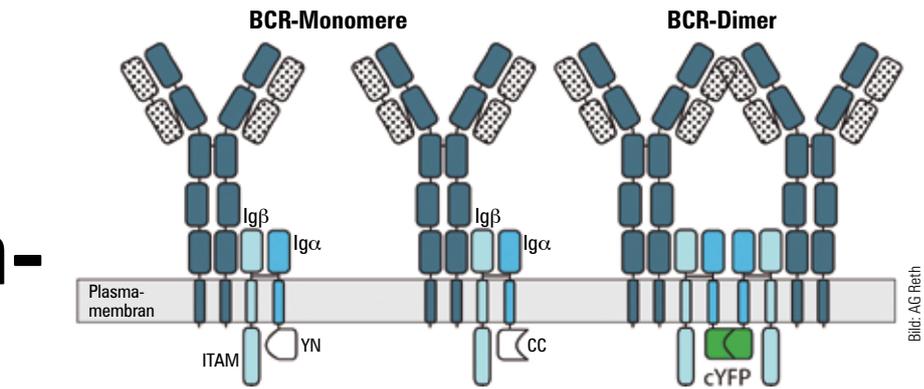


Bild: AG Reth

mänen namens ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), die durch Proteintyrosinkinasen wie Lyn oder Syk phosphoryliert werden, wenn das Antigen an den BCR gebunden hat. Danach bindet SYK an den BCR und dies schließlich startet mindestens vier verschiedene Signalwege, die die B-Zelle aktivieren. Einzelne Rezeptoren können übrigens nicht von löslichen monovalenten Liganden (mit nur einer Antikörper-Bindungsstelle) aktiviert werden. Auf dieser Beobachtung beruht die *Crosslinking*-Hypothese, nach der die Rezeptoren auf der Oberfläche ruhender B-Zellen einzeln vorliegen, durch den Kontakt mit dem passenden Antigen aber dimerisieren, was die mit dem Rezeptor assoziierten Kinasen aktivieren soll.

## Fluoreszenz bei Dimerisierung

„An diesem Model zweifeln wir allerdings schon länger“, sagt Reth. Und zwar aus zwei Gründen. Erstens, glaubt Reth, sind Antigene strukturell sehr unterschiedlich und es wird solche geben, die allein aus sterischen Gründen BCR-Monomere nicht so verbinden können, dass die Kinasen aktiviert werden. Und zweitens könnte auch ein BCR-Monomer zwei Kinasen gleichzei-

tig binden – es enthält ja auch zwei ITAMs – und so die Signalgebung starten. Um das Problem zu analysieren, muss man die Molekül-Wechselwirkungen *in vivo* zeit-aufgelöst untersuchen – eine nicht ganz einfache Sache.

Eine Möglichkeit wäre eine FRET-Analyse (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). Hierbei markiert man die Moleküle, die miteinander in Wechselwirkung treten, mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Diese sind so gewählt, dass das von Farbstoff A abgestrahlte Licht Farbstoff B aktiviert. Fluoresziert B, bedeutet das, dass die Moleküle zumindest sehr eng beieinander sind.

Theoretisch klingt das gut, praktisch ist FRET jedoch eine komplizierte, anspruchsvolle Methode und auch fehleranfällig. Denn beide Farbstoffe liefern auch unabhängig voneinander Signale, die bei einer FRET-Analyse voneinander subtrahiert werden müssen. Zudem ist ein FRET-Signal nicht nur von der Entfernung, sondern auch von der Orientierung der Fluorophore abhängig.

Yang und Reth beschritten daher einen anderen Weg und konzipierten ein Experiment, das auf Methoden der synthetischen Biologie basiert. Die Forscher exprimierten

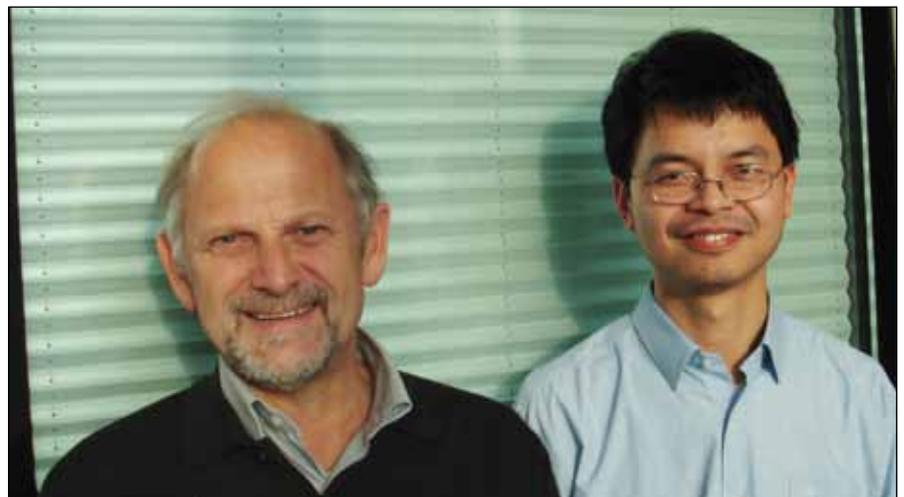


Foto: Karin Hollficher

Der Immunologe **Michael Reth** (li.) und sein Postdoc **Jianying Yang** (re.) fanden, dass B-Zell-Rezeptoren – entgegen der Lehrmeinung – auf ruhenden B-Zellen als Oligomere vorliegen.

die Gene für leichte und schwere Ketten des Immunglobulins gegen das Standard-Antigen NIP sowie die Gene für Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  in *Drosophila*-S2-Schneider-Zellen. Die transfizierten Zellen produzierten wie gewünscht BCR und deponierten sie auf der Zellmembran. Um zu erkennen, ob der BCR auf ruhenden Zellen als Monomer (wie von der *Crosslinking*-Hypothese postuliert) vorlag oder als Oligomer, nutzten die Forscher eine Technik namens BiFC.

BiFC steht für „*Bimolecular Fluorescence Complementation*“. Dabei exprimiert man in Zellen Hybridproteine, bei denen die N-terminale Halbdomäne von *Yellow Fluorescence Protein* (YN) und die C-terminale Halbdomäne von *Cyan Fluorescence Protein* (CC) an potenziell interagierende Moleküle gekoppelt ist. Eine Fluoreszenz wird nur dann zu detektieren sein, wenn die beiden Hybridproteine so nahe zusammenkommen, dass sich die für sich inaktiven Halbdomänen der Fluoreszenzproteine zu einem funktionstüchtigen Molekül vereinigen können. „Der entscheidende Vorteil im Vergleich zu FRET liegt darin, dass man fast keine Hintergrundstrahlung hat“, erklärt Reth. Wenn es also fluoresziert, dann haben die Hybridproteine Dimere gebildet!

Bevor die Forscher die postulierte Dimerisierung der BCRs zu prüfen begannen, machten sie einen *Proof of Principle*. Dafür koppelten sie den Genabschnitt für YN an ein Ig $\alpha$ -Gen, den Genabschnitt für CC an ein Ig $\beta$ -Gen. Zwölf Stunden nach der Co-Expression aller Komponenten zeigte sich die Fluoreszenz in der Plasmamembran – ein Zeichen dafür, dass die Ig $\alpha$ - und Ig $\beta$ -Proteine ein stabiles Dimer bildeten, welches als Teil des BCR an die Zelloberfläche transportiert wurde.

### Crosslinking-Hypothese falsch?

Um nun die Vorgänge an den B-Zell-Rezeptoren zu verfolgen, exprimierten die Forscher die passenden IgM- beziehungsweise IgD-Moleküle in Kombination mit Wildtyp-Ig $\beta$  und zwei Formen von Ig $\alpha$ : ein Ig $\alpha$  war an YN gekoppelt, das andere an CC. Eine Fluoreszenz sollte sich bei diesem Experiment nur dann zeigen, wenn zwei Ig $\alpha$ -Transmembranproteine sehr nahe zusammen kommen. Und dies ist dann der Fall, wenn sich mindestens BCR-Dimere bilden, denn jeder BCR enthält ja nur ein Ig $\alpha$ -Molekül. Und in der Tat: Yang und Reth fanden Fluoreszenz: Die Oberflächen der transgenen Zellen leuchteten schön grün. Doch die Zellen waren nicht durch ein Antigen aktiviert worden – und dieser Befund steht im krassen Gegensatz zur *Crosslinking*-Hypothese.

Reth und Yang interpretieren ihre Daten dahingehend, dass die „stillen“ B-Zell-Rezeptoren oligomerisieren, aber durch den Kontakt mit dem Antigen dissoziieren. Reth berichtet, er hätte diese Daten vor drei Jahren auf einer Konferenz vorgestellt – daraufhin herrschte beredtes Schweigen in Saale. Denn seine Theorie stand nun einmal in direktem Widerspruch zum bisherigen Modell, welches unter anderem von FRET-Daten aus dem Labor von Susan Pierce, Laboratory of Immunogenetics, NIH in Rockville (USA), gestützt wird. Pierce fand nur geringe FRET-Signale bei ruhenden B-Zellen, sehr starke dagegen nach der Zugabe von Antigen.

Reth denkt, dass beim ruhenden BCR die angebundenen Halbdomänen YN und CC so zueinander orientiert sind, dass sie nur sehr wenig FRET produzieren. „Das Fehlen von FRET-Signalen erlaubt es daher nicht, zu entscheiden, ob Rezeptoren als Monomere oder als Dimere vorliegen.“

Ein klassischer Expertenstreit. Was stimmt? Wer hat Recht? Das wäre schon spannend zu wissen, denn eine fehlerhafte Regulation von B-Zell-Rezeptoren führt zu Krankheiten wie Leukämie, Lymphomen oder Autoimmunität. Könnte man die Aktivierung der Rezeptoren unterbinden, hätte man möglicherweise völlig neue Therapieoptionen. „Die Wissenschaft lebt von der kontroversen Diskussion. Vielleicht ist sogar eine völlig andere Interpretation der Daten möglich. Allerdings haben wir kürzlich unsere BiFC-Daten mit zwei anderen Methoden bestätigen können“, sagt Reth.

### Wer zu früh kommt, ...

Reth hatte schon vor zehn Jahren klare, hauptsächlich biochemische, Hinweise für die Existenz eines oligomeren B-Zell-Rezeptors gefunden und dies in *Immunity* (2000, 13:5) publiziert. Diese Daten wurden schlichtweg ignoriert – ein Fall von „wer zu früh kommt, den bestraft die Wissenschaft“? Das jedenfalls glaubt der Freiburger Immunologe und sagt: „In mehreren Arbeiten zeigte sich mittlerweile, dass es auf der Plasmamembran viel mehr höherorganisierte Strukturen gibt, als bisher angenommen wurde.“ Beispielsweise zeigten die Untersuchungen von Björn Lillemeier (Salk Institute, La Jolla) und Mark Davis (Stanford University, Palo Alto), dem Entdecker des T-Zell-Antigenrezeptors, dass diese Moleküle auch in Gruppen vorliegen (*Nat Immunol* 2010, 11:90). „Dieses Modell ist vollkommen komplementär zu unseren Daten“, so Reth. „Das ganze Feld der Rezeptorforschung ist in einem Paradigmenwechsel.“ **KARIN HOLLRICHER**

## Does quality differ between restriction enzymes?

Try Takara Quality Starter Box of 13 Restriction Enzymes Only 99€



### Content

Product	Size	Product	Size
<i>Bam</i> H I	1,000 U	<i>Sal</i> I	1,000 U
<i>Eco</i> R I	1,000 U	<i>Sma</i> I	500 U
<i>Hind</i> III	1,000 U	<i>Sph</i> I	200 U
<i>Kpn</i> I	500 U	<i>Xba</i> I	1,000 U
<i>Nde</i> I	200 U	<i>Xho</i> I	500 U
<i>Not</i> I	200 U	DNA Ligation Kit (Mighty Mix)	150 $\mu$ l
<i>Pst</i> I	1,000 U	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	200 $\mu$ l
<i>Sac</i> I	500 U		

Universal Buffer Set (1 ml each, except 10X Buffer H 2 x 1ml)  
And 10 x Loading Buffer 1 ml.

### Ordering Information

Product Name	Cat. No.	Size	Price (€)
Restriction Enzyme Starter Box	1400	1 box	99

Order from

**TAKARA BIO EUROPE**  
[www.takara-bio.eu](http://www.takara-bio.eu)

orders@takara-bio.eu • tech@takara-bio.eu  
Tel: Europe: +33(0)1 3904 6880 • Austria: 0800 296 141 •  
Germany: 0800 182 5178 • Switzerland: 0800 563 629 •  
UK: 0808 234 8063 • Fax: +33(0)1 3904 6870

**Takara**