Untersuchung der Regulation und Aktivität der DNA-

Doppelstrangbruchreparatur in humanen B-Lymphozyten

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

25. Juli 2005

vorgelegt von Maren Mierau aus Köln

angefertigt am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit München

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp

Prüfung: 14. Dezember 2005

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

AID promotes transcription-dependent non-conservative hyperrecombination in human B cells Maren Mierau, Guido Drexler, André Kutzera, Joachim Ellwart, Eberhard Fritz, Jürgen Bachl and Berit Jungnickel (Manuskript in Vorbereitung)

Die Arbeit wurde bzw. wird auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

8th DNA Repair Workshop, Ulm 2004 (Poster)

Keystone Symposium 2005 "B cell development, function and disease" (Poster)

2th Workshop on Recombination and Repair, Hamburg 2005 (Vortrag)

Inhaltsverzeichnis

INH	ALTSVERZEICHNISI
ABE	BILDUNGSVERZEICHNISVI
TAE	BELLENVERZEICHNIS VII
ABł	KÜRZUNGEN VIII
1 E	INLEITUNG 1
1.1	Die B-Lymphozyten im adaptiven Immunsystem1
1.2	Die Keimzentrumsreaktion in der T-Zell-abhängigen Immunantwort2
1.	2.1 Somatische Hypermutation
1.	2.2 Aktivierungsinduzierte Cytidindeaminase (AID)
1.3	B-Zell-Lymphome7
1.4	DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Eukaryoten9
1.	4.1 Nicht homologe Endverknüpfung9
1.	4.2 Homologe Rekombination
1.	4.3 Regulation der Doppelstrangbruchreparatur
1.5	Reportersysteme für homologe Rekombination13
1.6	Zielsetzung16
2 E	RGEBNISSE
2.1	mRNA-Expressionsanalysen von Reparaturfaktoren in B-Zellen
2.	1.1 mRNA-Expressionsunterschiede in humanen B-Zell-Populationen
2.	1.2 Proliferationsgekoppelte Regulation der Reparaturgene
2.	1.3 mRNA-Expressionsunterschiede in humanen B-Lymphomzelllinien
2.2	Proteinmengen und Lokalisation von Reparaturfaktoren in B-Zelllinien

2.3	Rekombinationsaktivität in humanen B-Zelllinien	23
2.	3.1 Etablierung eines Reportersystems für homologe Rekombination in humanen B-	
	Zelllinien	23
2.	3.2 Unterschiede in der Rekombinationsaktivität verschiedener B-Zelllinien	26
2.4	Transkriptionsabhängigkeit der Hyperrekombination	28
2.5	AID-Überexpression verstärkt die Rekombinations- und Hypermutations-	
	aktivität	32
2.6	Untersuchungen zur Mutationseinführung während des Rekombinations- prozesses	34
2.7	Präferentielle Nutzung der nicht konservativen Rekombination in B-Zellen	37
2.	7.1 PCR-Analyse der Rekombinationskassette in GFP-positiven Zellen	37
2.	7.2 Analyse von reisolierten Reporterplasmiden	39
2.8	Vergleich der Expressionsstärke der Rekombinationsprodukte	41
2.9	Produkte der nicht konservativen Rekombination bei ins Genom integrierten	
	Rekombinationsreportern	42
2.10	Niedrige Aktivität der konservativen Rekombination in B-Zellen	43
2.11	Einfluss von Rad51 auf die Rekombination	46
3 D	ISKUSSION	. 48
3.1	Expression von Doppelstrangbruchreparaturfaktoren in B-Zellen	48
3.2	Rekombination, somatische Hypermutation und AID	50
3.3	Die Rolle von Rad51 in der homologen Rekombination	55
3.4	Ausblick	59
4 N	IATERIAL UND METHODEN	. 60
4.1	Material	60
4.	1.1 Chemikalien	60

4.1.2 Geräte	60
4.1.3 Größenmarker	61
4.1.3.1 DNA-Größenstandard	61
4.1.3.2 Proteingrößenstandard	61
4.1.4 Plasmide	62
4.1.5 Zelllinien	63
4.1.6 Bakterien	64
4.1.7 Antikörper	64
4.1.8 Oligonukleotide	65
4.1.9 Enzyme	66
4.2. Zellkultur	66
4 2 1 Einfrieren von Zellen	
4.2.2 Transfektion von Zellen	
4.2.3 Selektion	67
4.2.4 Bestimmung der Rekombinationsaktivität	67
4.2.5 Inaktivierung und Reaktivierung von <i>c-mvc</i> in der Zelllinie P493-6	67
4.2.6 Färbung der Zellen mit konjugierten Antikörpern für FACS-Analysen	68
4.2.7 FACS-Analyse	68
4.2.8 Sortieren von Zellen mit Hilfe von FACS	68
4.2.9 Herstellung von Zellpellets für RNA-, DNA- oder Proteinanalysen	68
4.3 Mikrobiologische Methoden	69
4.3.1 Vermehrung von Bakterien	69
4.3.2 Hitzeschock-kompetente Bakterien	69
4.3.3 Transformation von Bakterien	70
4.3.3.1 Hitzeschock-Transformation	70
4.3.3.2 Transformation durch Elektroporation	70
4.3.4 Plasmidpräparation nach Sambrook et al. 1989	70
4.3.5 Plasmidpräparation mit dem JetStar-Kit	71
4.4 Methoden der DNA-Verarbeitung	71
4.4.1 DNA-Direkt-Präparation	71
4.4.2 DNA-Präparation mittels QIAamp	71
4.4.3 Hirt-Extrakte zur Plasmidreisolierung	72

4.4	4.4 DNA-Konzentrationsmessung	. 72
4.4	4.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	. 72
4.4	4.6 Agarosegelelektrophorese	. 72
4.4	4.7 Polymerase-Ketten-Reaktion	. 73
4.4	4.8 Quantitative real time PCR	. 75
4.4	4.9 Southern Blot	. 78
4.4	4.10Hybridisierung	. 79
4.4	4.11 Herstellung radioaktiver Sonden	. 79
4.5	Plasmid-Klonierungstechniken	. 80
4.5	5.1 Behandlung mit Restriktionsenzymen	. 80
4.5	5.2 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	. 80
	4.5.2.1 Ligation mit der T4-Ligase	. 80
	4.5.2.2 Ligation eines Fragments in den GEM T-Vektor	. 81
4.5	5.3 Dephosphorylierung freier DNA-Enden	. 81
4.5	5.4 Gelisolierung von DNA-Fragmenten	. 81
4.6	Klonierung der Plasmide	. 81
4.6	6.1 Rekombinationskassette und GFP	. 81
4.6	5.2 pBC230	. 81
4.6	5.3 pRTS	. 81
4.6	5.4 pAK7 und pAK6	. 82
4.6	6.5 pAK14	. 82
4.6	6.6 pAK37 und pAK36	. 82
4.6	6.7 pAK29, pAK21 und pAK24	. 82
4.6	5.8 pAK39	. 82
4.6	6.9 pAK41	. 82
4.7	Techniken zur Isolierung und Analyse von RNA	. 82
4.7	7.1 Spektrometrische Quantifizierung von RNA	. 82
4.7	7.2 Qualitätskontrolle von RNA	. 83
4.7	7.3 Präparation von RNA aus Zellen	. 83
4.7	7.4 Erststrang cDNA-Synthese	. 83
4.8	Proteinbiochemische Methoden	. 84
4.8	8.1 Präparation von Proteinen aus Zellen	. 84

4.8.2 Proteinquantifizierung	
4.8.3 SDS-PA-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970	
4.8.4 Western-Blot	
4.8.5 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper	
4.9 Zytoplasma-Kern-Fraktionierung	
5 ZUSAMMENFASSUNG	89
6 LITERATURVERZEICHNIS	
DANKSAGUNG	101
ERKLÄRUNG	102
LEBENSLAUF	103

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Analyse der Kopienzahlen des Reporters über die Zeit in Raji-Zellen
Tab. 2: Mutationsanalyse der Rekombinationskassette aus Raji-Zellen
Tab. 3: Analyse der reisolierten Reporter
Tab. 4: Mittlere Fluoreszenzintensität der Rekombinationsprodukte 41
Tab. 5: Anzahl der Rekombinaten f 45
Tab. 6: Anzahl der Rekombinaten pro Reporterkopie für beide Reporter der Rekombination 45
Tab. 7: Für Transfektionen verwendete Plasmide
Tab. 8: Zelllinien und Selektionsbedingungen
Tab. 9: Antikörper mit Konjugation und Pufferbedingungen 64
Tab. 10: Oligonukleotide
Tab. 11: Transfektionsbedingungen der einzelnen Zelllinien
Tab. 12: Cp-Werte der quantitativen PCR f ür CD1977
Tab. 13: Kopienzahlbestimmung zu den Rekombinationsaktivitäts- und
Überexpressionsexperimenten77
Tab. 14: Kopienzahlen aus den Überexpressionsexperimenten 77
Tab. 15: Kopienzahlbestimmung zum Vergleich der nicht konservativen und konservativen
Rekombinationsaktivität (Tag 35 nach der Transfektion)

Abkürzungen

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
Amp	Ampicillinresistenzgen
AP-Stelle	Apurin-Apyrimidin Stelle
BCR	.B cell receptor', B-Zell-Rezeptor
BIR	Bruch-induzierte Replikation
bp	Basenpaare
BRCA1	breast cancer susceptibility gene 1'
BSA	bovine serum albumine', Rinderserum Albumin
C	Cytosin
CSR	class switch recombination'. Klassenwechselrekombination
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid ⁴ . Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	catalytic subunit', DNA-Proteinkinase katalytische Untereinheit
dNTP	Desoxyribonukleotidtrinhosphat
Dox	Doxycyclin
dsDNA	donnelsträngige DNA
D-Segment	diversity'-Segment des V-Gens
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
Eu	IgH-Enhancer
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
Ei	I-C intronic enhancer-nuclear'
et al	et alterae' und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting' Fluoreszenzgekoppelte Zellanalyse
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FKS	fötales Kälberserum
σ	Gramm
G	Guanin (DNA)
GC	Gene conversion'. Genkonversion
GFP	green fluorescent protein'
HR	homologe Rekombination
Ig	Immunoglobulin
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
J-Segment	ioining'-Segment des V-Gens
kb	Kilobasen
1	Liter
M	molar
MAR	.matrix attachment region'
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mМ	Millimolar
-	

mRNA	Boten-(,messenger') RNA
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
NHEJ	,non homologous end joining', nicht homologe Endverküpfung
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	,phosphate buffered saline', Phosphat-gepufferte Saline
PCR	, polymerase chain reaction', Polymerasekettenreaktion
R	Purinbasen: Adenin oder Guanin
RNA	,ribonucleic acid', Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
rpm	,rounds per minute', Umdrehungen pro Minute
S	Sekunde
SDS	,sodium dodecyl sulphate', Natriumdodecylsulfat
SDSA	Synthese-abhängige Stranganlagerung
SSA	, single strand annealing', Einzelstrang-Anlagerung
ssDNA	, single stranded', einzelsträngige DNA
Т	Thymin
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
TLS	Transläsionssynthese
U	Unit
UNG	Urazil-Glycosylase
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
V-Segment	,variable'-Segment des V-Gens
W	Adenin oder Thymin
W/V	,weight per volume'; Gewicht pro Volumen
Y	Pyrimidinbasen: Thymin oder Cytosin
YFP	,yellow fluorescent protein'

1 Einleitung

1.1 Die B-Lymphozyten im adaptiven Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen hat sich entwickelt, um den Organismus vor Pathogenen zu schützen. Um auf die unendlich große Vielfalt an Pathogenen schnell und effizient reagieren zu können, stützt sich die Abwehr auf das angeborene und das adaptive Immunsystem. Sie bestehen aus mehreren Komponenten, die miteinander interagieren.

Zum adaptiven Immunsystem gehören die Lymphozyten, die sich in T- und B-Zellen unterteilen. Beide Zelltypen exprimieren antigenspezifische Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie auf ihrer Oberfläche, wobei jede Zelle allerdings nur eine einzige Spezifität ausprägt. Um der Vielfalt der Antigene zu begegnen, haben sich mehrere Mechanismen der Rezeptordiversifizierung entwickelt. Der Rezeptor der B-Zelle, auch Antikörperrezeptor genannt, besteht aus vier Aminosäureketten: zwei identischen schweren Ketten (IgH) und zwei identischen leichten Ketten (IgL). Die Kombination aus verschiedenen leichten und schweren Ketten leistet einen Beitrag zur Diversifizierung (Tonegawa, 1983). Eine weitere Diversifizierung ergibt sich aus der V(D)J-Umlagerung, einem Prozess, der irreversible Veränderungen ins Genom einführt. Hier wird je ein V-, D- (nur für die schwere Kette) und J-Gensegment zusammengefügt, von denen jeweils mehrere Exemplare im Genom vorhanden sind (Bogue and Roth, 1996; Tonegawa, 1983). Die rearrangierten Segmente kodieren für die variable Region des Antikörpers, die für die Antigenerkennung zuständig ist. Durch regulierte Mechanismen während des Zusammenfügens der Gensegmente wird die kodierende Sequenz der variablen Region weiter verändert und individualisiert (Bogue and Roth, 1996; Lafaille et al., 1989; Landau et al., 1987).

Er gibt zusätzlich noch verschiedene Klassen von Antikörpern, die über die konstante Region der schweren Kette definiert sind. Sie erfüllen verschiedene Effektorfunktionen und erweitern so die Reaktivität des Immunsystems. Zu Beginn ihrer Entwicklung exprimieren alle B-Zellen Antikörper der Klassen IgM und IgD, die durch die konstante Region festgelegt sind. Im Verlauf der Immunreaktion kann die konstante Region durch deletierende Rekombination des Locus ausgetauscht werden. Diese Klassenwechselrekombination ist wie die V(D)J-Rekombination eine irreversible auch genetische Veränderung des Immunglobulinlocus (Stavnezer, 1996). Ein weiterer genetischer Prozess, der während der Immunantwort stattfinden kann, ist die somatische Hypermutation. Dieser Prozess führt Mutation in die variable Region des Antikörpers ein und vermittelt im Zusammenwirken mit weiteren Prozessen im Keimzentrum eine Affinitätsreifung des Antikörpers (Rajewsky, 1996).

1.2 Die Keimzentrumsreaktion in der T-Zell-abhängigen Immunantwort

Während der T-Zell-abhängigen Immunantwort finden in der besonderen Umgebung des Keimzentrums zwei genetische Prozesse statt, die die Reaktion auf das Pathogen optimieren sollen (Rajewsky, 1996).

Werden die B-Zellen durch die Bindung eines Antigens aktiviert, können sie entweder zu Plasmazellen mit niederaffinem Antikörper differenzieren oder sie wandern in die primären Follikel der sekundären lymphatischen Gewebe ein und initiieren die Bildung eines Keimzentrums (Kelsoe, 1995). Die aktivierten B-Zellen differenzieren hier zu Zentroblasten, die sich alle 6 bis 7 Stunden teilen und sich in der dunklen Zone des Keimzentrums befinden (Liu et al., 1991). Hier findet somatische Hypermutation statt (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991). Die Zentroblasten differenzieren weiter zu Zentrozyten, die sich in der hellen Zone des Keimzentrums befinden, sich nicht mehr teilen und Klassenwechsel durchführen (Liu et al., 1996; Liu et al., 1991). In der hellen Zone befinden sich ebenfalls T-Zellen und follikuläre dentritische Zellen (FDC), die das Antigen präsentieren. Hier konkurrieren die B-Zellen, die einen mutierten Antikörper tragen, um die Antigenbindung. B-Zellen mit höheraffinen Antikörpern konkurrieren erfolgreicher um das Antigen und erhalten dann durch die T-Zellen ein positives Überlebenssignal (Kelsoe, 1995). Die B-Zelle kann dann entweder zu einer Plasmazelle oder zu einer Gedächtniszelle differenzieren oder möglicherweise auch wieder an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen (Hollowood and Goodlad, 1998; Kelsoe, 1995).

Das Keimzentrum bildet eine Umgebung im Organismus, die mit Hilfe der somatischen Hypermutation die Affinitätsreifung des Antikörpers ermöglicht (Rajewsky, 1996).

1.2.1 Somatische Hypermutation

Der Prozess der somatischen Hypermutation führt hauptsächlich Punktmutationen in die variable Region der Immunglobulinloci mit einer Frequenz von 10⁻³ bis 10⁻⁴ Mutationen/bp/Generation ein, bei denen eine Dominanz von Transitionen über Transversionen beobachtet wurde (Berek et al., 1991; McKean et al., 1984). Der Bereich, in dem die Mutationen eingeführt werden, erstreckt sich etwa über 2 kb stromabwärts vom Promotor. Die Mutationen verteilen sich über diese Region mit einem Maximum bei 1,5 kb und brechen dann relativ abrupt ab (Lebecque and Gearhart, 1990; Rothenfluh et al., 1993).

Die Mutationen sind nicht zufällig verteilt, sondern es konnte die Konsensussequenz RGYW identifiziert werden, die ein präferentielles Ziel (Hot Spot) der Hypermutation ist (Betz et al., 1993; Dorner et al., 1998; Rogozin and Kolchanov, 1992). Neben Punktmutationen konnten aber auch Deletionen und Insertionen beobachtet werden (Bemark and Neuberger, 2003; Goossens et al., 1998; Wilson et al., 1998).

Schon länger bekannt ist, dass die Aktivierung der Hypermutation von der Transkription abhängig ist (Peters and Storb, 1996; Storb et al., 1998). Die Stärke der Hypermutation korreliert mit der Stärke der Transkription (Fukita et al., 1998). Es besteht allerdings keine Abhängigkeit von der Sequenz des Immunglobulinlocus für die Aktivität der somatischen Hypermutation (Azuma et al., 1993; Yelamos et al., 1995), sondern vielmehr sind ein funktioneller Promotor und die Enhancer der Immunglobulingene als notwendige Elemente identifiziert worden (Betz et al., 1994; Peters and Storb, 1996). Die Irrelevanz der Sequenz zeigt sich auch dadurch, dass andere Gene ein Ziel der somatischen Hypermutation sein können (Pasqualucci et al., 2001).

Der genaue Mechanismus der somatischen Hypermutation ist bislang noch ungeklärt. Es wurde aber schon lange eine Beteiligung von fehlerhafter DNA Reparatur und DNA-Synthese postuliert (Brenner and Milstein, 1966).

Da auch Deletion und Duplikationen in den Immunglobulingenen beobachtet wurden, könnten DNA-Brüche ein mögliches Substrat für die Reparatur sein (Goossens et al., 1998; Sale and Neuberger, 1998). Es konnten tatsächlich Brüche in den Immunglobulingenen von hypermutierenden Zellen mit Hilfe der Linkervermittelten PCR (LM-PCR) detektiert werden (Bross et al., 2002; Papavasiliou and Schatz, 2000). Die Entstehung der Brüche war transkriptions- und enhancerabhängig und es konnten Mutationen in der Nähe der Brüche gefunden werden (Bross et al., 2002). Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen den Brüchen und der somatischen Hypermutation schließen. In einer ausführlichen Studie konnten sowohl glatte als auch überwiegend überhängende Bruchenden identifiziert werden, wobei letztere verstärkt auch in anderen Genen auftaten, von denen bekannt ist, dass sie das Ziel von Hypermutation sein können (Zan et al., 2003). In der gleichen Studie konnte auch eine Bindung von Ku70/80, Komponenten der nicht homologen Endverknüpfung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, an die glatten Brüche beobachtet werden, während bei den überhängenden Brüchen nur eine Bindung von Rad51 und Rad52, Faktoren der homologen Rekombination, nachgewiesen werden konnte. Dies unterstützt eine Theorie, nach der homologe Rekombination an der somatischen Hypermutation beteiligt sein kann. Diese Annahme entstammt auch der Beobachtung von Genkonversion zwischen verschiedenen Immunglobulingenen (Tsai et al., 2002; Xu and Selsing, 1994). Außerdem konnte die Generierung der Brüche der S- und G2-Phase des Zellzyklus zugeordnet werden

(Papavasiliou and Schatz, 2000). In diesen Zellzyklusphasen findet präferentiell homologe Rekombination statt. Trotzdem lassen diese Ergebnisse noch offen, ob die DNA-Brüche ein

mechanistisches Intermediat der Hypermutation sind oder nur ein Nebenprodukt.

Desweiteren konnte eine Beteiligung von fehlerhaft replizierenden DNA-Polymerasen nachgewiesen werden. Sie kommen zusätzlich zu den akkurat replizierenden DNA-Polymerasen im Organismus vor und sind wichtiger Bestandteil des Reparaturmechanismus der Transläsionssynthese (TLS), da sie in der Lage sind DNA-Schäden zu überwinden (Goodman and Tippin, 2000). Eine Rolle bei der somatischen Hypermutation konnte den Polymerasen η , ζ und ι nachgewiesen werden (Diaz et al., 2001; Faili et al., 2002; Rogozin et al., 2001; Zan et al., 2001; Zeng et al., 2001). Da in allen bisherigen Experimenten zu den fehlerhaft replizierenden Polymerasen nie eine vollständige Inhibition der Hypermutation beobachtet werden konnte, herrscht wahrscheinlich eine gewisse Redundanz.

Auch der Mismatch-Reparatur durch die Faktoren Msh2 und Msh6 konnte eine Rolle in der Hypermutation zugeordnet werden, wie auch der Urazil-Glycosylase, einem anderen Faktor der Exzisionsreparatur (Di Noia and Neuberger, 2002; Imai et al., 2003; Wiesendanger et al., 2000). Das Schlüsselenzym allerdings, das für die Hypermutation und auch den Klassenwechsel essentiell ist und einen funktionellen Zusammenhang zwischen den identifizierten Komponenten herstellen kann, ist die Aktivierungsinduzierte Cytidindeaminase (AID).

1.2.2 Aktivierungsinduzierte Cytidindeaminase (AID)

Die Aktivierungsinduzierte Cytidindeaminase (AID) wurde auf Grund ihrer Expression in aktivierten B-Zellen entdeckt (Muramatsu et al., 1999). Die Inaktivierung von AID hatte eine völlige Abwesenheit von Klassenwechsel und Hypermutation zur Folge. Dies lässt sich auch in Klasse II Hyper-IgM-Patienten beobachten, denn sie tragen Mutationen im AID-Gen (Zhu et al., 2003).

Homologievergleiche der AID-Struktur zeigten, dass es Ähnlichkeiten zu Cytidindeaminasen wie APOBEC1 gibt (Muramatsu et al., 1999). Untersuchungen zeigten, dass AID in der Lage ist Cytidin zu Urazil zu deaminieren. Ob allerdings RNA wie bei APOBEC1 oder DNA das Substrat von AID ist, ist noch nicht zweifelsfrei erwiesen, obwohl bisher in *in vitro* Experimenten keine Aktivität von AID an RNA gezeigt werden konnte (Begum et al., 2004; Dickerson et al., 2003; Petersen-Mahrt et al., 2002). Dagegen konnte in Expressions-Experimenten in *Escherichia coli* eine Aktivität von AID auf DNA beobachtet werden, da Mutationen in der DNA detektiert werden konnten (Petersen-Mahrt et al., 2002).

Durch weitere *in vitro* Experimente konnte bevorzugt einzelsträngige und nicht doppelsträngige DNA, es sei denn sie liegt supercoiled vor, als Substrat identifiziert werden (Shen and Storb, 2004). Überraschenderweise wurde dabei ebenfalls festgestellt, dass eine Aktivität von AID *in vitro* erst nach einer Behandlung mit RNase erreicht werden konnte (Bransteitter et al., 2003). Kurze RNA-Fragmente scheinen also im aktiven Zentrum von AID gebunden zu sein.

Die ssDNA als Substrat und die eventuelle Beteiligung von RNA stellt eine Verbindung zur Transkriptionsabhängigkeit der Hypermutation her. Dies würde ebenfalls die Notwendigkeit der sterilen Transkription erklären, die während des Klassenwechsels im Bereich der switch-Regionen detektiert werden kann. Unterstützt wird die Verbindung zwischen Transkription und AID-Aktivität durch die Entdeckung, dass AID mit der RNA-Polymerase II interagiert (Nambu et al., 2003). Allerdings bedarf es anscheinend auch der Replikation und Reparatur, um die Mutationen in der DNA zu fixieren oder eventuell auch die Brüche für den Klassenwechsel zu induzieren. Für diese Theorie spricht die nachgewiesene Interaktion von AID mit dem Replikationsprotein A (RPA) (Chaudhuri et al., 2004).

Viele der bisherigen Experimente stützen ein weithin akzeptiertes Modell nach M. Neuberger (Rada et al., 2004), das auf Replikation und Reparaturmechanismen basiert, um ausgehend von den durch AID produzierten Urazilen die Mutationen in der DNA einzuführen (Abb.1). Das Modell setzt die Urazile, die durch Deaminierung von Cytidin durch AID entstehen, an den Anfang des Mechanismus der somatischen Hypermutation. Ausgehend davon können Mutationen einfach durch Replikation über das Urazil hinweg entstehen, also durch Insertion eines Adenins. Bei diesen Mutationen handelt es sich dann um Transitionen. Alternativ kann aber auch die Mismatch-Reparatur mit Msh2 beim Urazil ansetzen und durch fehlerhafte DNA-Synthese Mutationen einführen wie zum Beispiel A/T-Mutationen durch Polymerase n. Ein anderer Weg ist die Exzision des Urazils durch die DNA-Glycosylase, so dass eine Apurin/Apyrimidin-Stelle (AP-Stelle) in der DNA entsteht. Hier kann dann durch DNA-Synthese jede Art von Mutation oder durch einen AP-Endonuklease Einzelstrangbrüche in der DNA entstehen. Die Brüche sind ein wichtiges Intermediat des Klassenwechsels und entstehen erst spät in diesem Prozess, da eine Inaktivierung der Urazil-Glycosylase (UNG), die die Urazile ausschneidet, und des Exzisionsreparaturfaktors Msh2 eine völlige Abwesenheit des Klassenwechsels zur Folge hat (Rada et al., 2004). Während der somatischen Hypermutation könnten also diese Einzelstrangbrüche der Ausgang für weitere Reparaturmechanismen wie etwa homologe Rekombination sein, die entweder fehlerfrei sein kann oder mit Hilfe von fehlerhaft replizierenden Polymerasen Mutationen einführen kann.



Abb. 1: Modell der somatischen Hypermutation nach M. Neuberger

Modell der somatischen Hypermutation (SHM) und Klassenwechselrekombination (CSR) nach Neuberger (Rada et al., 2004). Ausgangspunkt des Mechanismus ist die Deaminierung von Cytidin durch AID, so dass ein Urazil in der DNA entsteht. Darauf folgen DNA-Synthese oder die Aktivität von Faktoren der Exzisionsreparatur und von fehlerhaft replizierenden DNA-Polymerasen, die zur Einführung von Mutationen und Generierung von Brüchen für den Klassenwechsel führen.

Eine potentielle Beteiligung der homologen Rekombination an der Hypermutation wird durch das Ergebnis unterstützt, dass die Generierung von überhängenden DNA-Bruchenden, die eine Bindung von Faktoren der homologen Rekombination ermöglichen, abhängig ist von der Anwesenheit von AID. Untersuchungen in der Hühner-B-Zelllinie DT40 sprechen andererseits gegen eine Involvierung von Rekombination in den Hypermutationsmechanismus. In Hühner-B-Zellen wird das Antikörperrepertoir erweitert, indem ein Sequenzaustausch zwischen Pseudogenen und einem rearrangiertem Ig-Gen mittels AID-abhängiger Genkonversion, einem Mechanismus der homologen Rekombination, statt findet (Arakawa et al., 2002). Erst nach einer Hemmung der Rekombination in diesen Zellen konnte Hypermutation beobachtet werden (Sale et al., 2001).

Eine Voraussetzung für die Theorie von Neuberger ist eine Lokalisation von AID im Kern der B-Zelle. Da in der Aminosäuresequenz von AID eine mögliche nukleäre Import- und auch eine mögliche Exportsequenz identifiziert worden sind, wurden Versuche zur subzelluläre Lokalisation unternommen. Bei den Ergebnissen zu diesen Versuchen herrscht allerdings bisher nur in dem Punkt Einigkeit, dass die größere Fraktion des Proteins im Zytoplasma zu finden ist (Brar et al., 2004; Ito et al., 2004; Rada et al., 2002). Dies deutet möglicherweise einen regulatorischen Mechanismus an, der dafür sorgt, dass nicht zu viel potentiell mutagenes AID-Protein die DNA erreicht.

AID ist eventuell schädlich für die Zelle, da bei ektopischer Expression eine genomweite Aktivität des Proteins bei der Mutationseinführung beobachtet werden konnte (Wang et al., 2004). Ein Zusammenhang zwischen deregulierter AID-Aktivität und Krebsentstehung wurde auch an Mäusen gezeigt, die AID ubiquitär überexprimieren. Diese Mäuse starben früh an hauptsächlich T-Zell-Lymphomen (Okazaki et al., 2003). Einen weiteren Hinweis auf einen Beitrag von AID beziehungsweise somatischer Hypermutation ist die Tatsache, dass in einigen Typen von Lymphomen andere Gene, wie zum Beispiel *CD95* oder *bcl-6*, als nur die Immunglobulingene mutiert sein können (Pasqualucci et al., 2001). Zudem konnte auch ein Zusammenhang zwischen AID und für B-Zell-Lymphome typischen Translokationen beobachtet werde, die bei Abwesenheit von AID nicht mehr induziert werden konnten (Ramiro et al., 2004).

1.3 B-Zell-Lymphome

Nach der aktuellen Klassifizierung der WHO (World Health Organization) unterscheidet man zur Zeit etwa 15 verschiedene Arten von B-Zell-Lymphomen. Eine Klassifizierung ist nicht nur für die Pathologie der Lymphome wichtig sondern auch für den Therapieansatz. In eine Klassifizierung zur Unterscheidung der Lymphome ist eingeflossen, dass diese aus verschieden B-Zell-Populationen hervorgegangen sind (Kuppers, 2005). Die Abstammung der Lymphomzellen von B-Zellen aus unterschiedlichen Stadien der Entwicklung wurde zumeist anhand des Status der Immunglobulingene festgestellt (Kuppers et al., 1999). Aber auch über Vergleiche von Genexpressionsprofilen konnten Lymphome bestimmten B-Zell-Populationen zugeordnet werden (Alizadeh et al., 2000). Der Hintergrund für diese Möglichkeit die Herkunft eines Lymphoms über solche Eigenschaften zu ermitteln, ist die Annahme, dass die Lymphomzelle durch die Transformation in ihrem Differenzierungszustand fixiert worden ist. Aus diesen Untersuchungen zur Abstammung wurde deutlich, dass die meisten Lymphome auf Keimzentrums-B-Zellen zurückgehen. Zum Beispiel ist ein von Keimzentrums-B-Zellen abstammendes und mit 30-40 % sehr häufig vorkommendes Lymphom das Diffuse großzellige B-Zell-Lymphom. Diese Art von Lymphom lässt sich allerdings auch noch in viele Subtypen unterteilen, da es zum Teil aus anderen Lymphomtypen, wie etwa dem Follikulären Lymphom, entstehen kann. Weitere von Keimzentrums-B-Zellen abstammende Lymphome sind Hodgkin, Follikuläres und Burkitt-Lymphom. Andere Lymphome dagegen haben sich zum Beispiel aus Mantelzonen-B-Zellen wie das Mantel-Zell-Lymphom oder aus Marginalzonen-B-Zellen wie das MALT-Lymphom entwickelt (Kuppers, 2005).

Wie die meisten Krebsarten sind auch B-Zell-Lymphome mit charakteristischen genetischen Veränderungen assoziiert. So ist ein typisches Merkmal vieler B-Zell-Lymphome das Vorhandensein von chromosomalen Translokationen, die die Immunglobulingene betreffen (Kuppers and Dalla-Favera, 2001). Diese Translokationen bringen andere Gene unter die Kontrolle des aktiven Immunglobulinlocus und sorgen so für eine Deregulation und konstitutive Expression des betroffenen Gens. Zur Tumorentstehung kommt es dann, wenn es sich bei den Genen um Onkogene handelt, wie zum Beispiel im Falle von *c-myc* oder *bcl-6*. Die Translokation t(8;14), die den Locus der schweren Kette mit dem c-myc-Gen fusioniert, ist charakteristisch für das Burkitt-Lymphom (Blum et al., 2004). Bei genauerer Betrachtung der Bruchstellen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen zwei Typen von Burkitt-Lymphomen. Im endemischen Burkitt-Lymphom, das in Zentralafrika auftritt und zu 90% positiv für eine Epstein-Barr-Virusinfektion (EBV) ist, betreffen die Brüche meist einen Bereich 100bp stromaufwärts der kodierenden Region des *c-myc*-Gens und das J-Segment im IgH-Locus (Hecht and Aster, 2000; Neri et al., 1988). Im sporadischen Burkitt-Lymphom dagegen, das in der westlichen Welt verbreitet ist und nur in 30% EBV positiv ist, befinden sich die Bruchstellen häufig zwischen dem ersten und zweiten Exon des c-myc-Gens und in der Klassenwechselregion (Sµ) des IgH-Locus (Hecht and Aster, 2000; Neri et al., 1988). Von der Lokalisation der Bruchstellen kann man auf die möglichen Ursachen für die Generierung der Brüche schließen, die der Ausgangpunkt für die Translokationen sind. So sind die Bruchstellen in der Klassenwechselregion des IgH-Locus, die im sporadischen Burkitt-Lymphom auftreten. wahrscheinlich auf Klassenwechselrekombination zurückzuführen. Beim endemischen Burkitt-Lymphom entstehen die Brüche in der variablen Region des IgH-Locus wahrscheinlich durch somatische Hypermutation.

Die beiden Keimzentrumsprozesse, Klassenwechsel und Hypermutation, führen AIDabhängig Brüche in die Immunglobulingene ein. Werden die so induzierten Brüche allerdings nicht korrekt repariert, können sie zu Translokationen in der DNA führen und so zur Tumorentstehung beitragen. Sehr genau regulierte Mechanismen der Doppelstrangbruchreparatur sind also erforderlich, um eine Lymphomentstehung zu verhindern.

1.4 DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Eukaryoten

DNA-Doppelstrangbrüche können durch exogene Faktoren wie Strahlung oder Chemikalien entstehen oder auch durch endogene Prozesse wie Replikation oder Transkription. Während der Reifung der B-Zellen finden ebenfalls Prozesse statt, die zu Doppelstrangbrüchen in der DNA führen können. Ein einziger Strangbruch kann zum Tod der Zelle führen. Um dies zu verhindern, hat die Zelle ein Netzwerk von Signalwegen, die miteinander wirken und einen Arrest im Zellzyklus erreichen, um die Reparaturmechanismen aktiv werden zu lassen (Shiloh, 2003). Der Zelle stehen hier zwei Hauptreparaturwege zur Verfügung: Nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) und homologe Rekombination (HR) (Kanaar et al., 1998). Die beiden Wege unterscheiden sich vor Allem dadurch, dass die Reparatur durch NHEJ fehlerhaft sein kann, während die HR als sehr akkurat gilt. Dieser Unterschied ist in den Mechanismen der beiden Reparaturwege begründet.

1.4.1 Nicht homologe Endverknüpfung

Die nicht homologe Endverknüpfung ist der Mechanismus der präferentiell von Säugerzellen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen genutzt wird. Bei diesem Reparaturweg erfolgt eine direkte Wiederverknüpfung zweier freier DNA-Enden (Lieber et al., 2003).

Zuvor müssen die Enden abhängig von der Art des Bruches oft noch prozessiert werden. Das kann zu Sequenzveränderungen führen, die diesen Reparaturweg fehlerhaft machen. Die Bindung und Prozessierung der DNA-Enden erfolgt durch den DNA-PK-Komplex, der sich aus dem zuerst bindenden Heterodimer Ku80/Ku70 und der anschließend rekrutierten DNA-PKcs (DNA-PK catalytic subunit) zusammensetzt. Dieser Komplex leitet die Bindung der LigaseIV und ihrem Hilfsfaktor XRCC4 ein, die die DNA-Enden wieder verknüpfen.

Die NHEJ konnte als der Reparaturmechanismus identifiziert werden, der an der Wiederverknüpfung der DNA-Enden beim V(D)J-Rearragment zuständig ist (Taccioli et al., 1993). Wahrscheinlich übernimmt die Endverknüpfung diese Aufgabe auch bei der Klassenwechselrekombination (Casellas et al., 1998; Manis et al., 2002; Rolink et al., 1996).

Ob die NHEJ auch eine Rolle bei der somatischen Hypermutation spielt, ist noch unklar.

Die charakteristische Eigenschaft der homologen Rekombination bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur ist die Notwendigkeit von homologen Sequenzen für den Reparaturmechanismus. Die Verwendung von homologen Sequenzen ist der Grund für die in der Regel sehr präzise und fehlerfreie Reparatur. Dieser Reparaturweg wird bevorzugt von der Hefe angewendet.

Die homologe Rekombination lässt sich in vier Reparaturwege unterteilen (Helleday, 2003). Ausgangssubstrat für alle Wege sind einzelsträngige DNA-Enden, die von Rad51, Rad 52 und Rad54 gebunden werden können. Rad51 katalysiert mit Hilfe von Rad52 und Rad54 die Invasion des Einzelstranges in den homologen DNA-Strang. So werden die aus vier DNA-Einzelsträngen bestehenden Holliday-Strukturen gebildet, die entlang der DNA verschoben werden können (Abb.2). An dem freien 3'-Ende der DNA kann DNA-Synthese stattfinden, wobei der intakte homologe Strang als Vorlage dient. Im nächsten Schritt erfolgt die Auflösung der Holliday-Strukturen. Das genaue Produkt dieses als klassische oder konservative Rekombination bezeichneten Mechanismus ist abhängig davon, in welcher Orientierung die Holliday-Strukturen aufgelöst werden. So kann entweder Genkonversion mit oder ohne cross-over auftreten (Helleday, 2003; Paques et al., 1998; Szostak et al., 1983). Eine anderer konservativer Reparaturweg ist Synthese-abhängige Stranganlagerung (SDSA: synthesis dependent strand annealing) (Abb.2). Er beginnt ebenfalls mit der Invasion eines Einzelstranges in den Homologiebereich und der daraufhin induzierten DNA-Synthese. In diesem Fall aber kommt es nicht zur Ausbildung einer zweiten Holliday-Struktur, sondern der replizierte Strang lagert sich wieder an seinen komplementären Strang an und die noch vorhandenen Lücken werden aufgefüllt (Helleday, 2003; Paques et al., 1998).

Die Stranginvasion kann aber auch zu einem alternativen Ausgang der Rekombination führen, der Bruch-induzierte Replikation (BIR) genannt wird (Abb.2). Hierbei unterbleibt ein Zurückwechseln des eingewanderten Einzelstranges und die DNA-Synthese verläuft weiter entlang des homologen Stranges. Da dies je nach Lage des Homologiebereiches zu genetischen Veränderungen führen kann, lässt sich dieser Reparaturweg als nicht konservative Rekombination bezeichnen. Zur Zeit ist noch unklar, welche Reparaturfaktoren an diesem Prozess beteiligt sind. Eine Rolle von Rad51 bei BIR konnte bisher weder definitiv ausgeschlossen noch bestätigt werden (Davis and Symington, 2004; Ira and Haber, 2002; Lundin et al., 2003).



Abb. 2: Reparaturwege der homologen Rekombination

Schematische Darstellung der verschiedenen Wege der homologen Rekombination nach Helleday et.al.. Die Rekombination lässt sich grob in zwei Gruppen einteilen: konservative und nicht konservative Rekombination. Zur konservativen Rekombination zählen die Mechanismen der Genkonversion (GC) und SDSA (Synthese-abhängige Stranganlagerung). Als nicht konservativ, da Deletionen oder Translokation auftreten können, bezeichnet man SSA (Einzelstrang-Anlagerung) und BIR (Bruch-induzierte Replikation).

Als ebenfalls nicht konservative Rekombination bezeichnet man auch die Einzelstrang-Anlagerung (SSA: single strand annealing) (Abb.2) (Helleday, 2003; Lin et al., 1985; Paques and Haber, 1999). In diesem Mechanismus, der auch das Vorhandensein von homologen Sequenzen in cis benötigt, wird allerdings der zwischen den Homologiebereichen liegende Teil der DNA-Sequenz deletiert. Dieser Weg ist Rad51 unabhängig, benötigt aber Rad52 und Rad59 (Davis and Symington, 2001; Fishman-Lobell et al., 1992).

Im Gegensatz zur Hefe verwenden Säugerzellen präferentiell die nicht-homologe Endverknüpfung. Nur während des Zellzyklus verschiebt sich die Balance zwischen den Reparaturwegen. So verwendet die Zelle in der G0 und G1 Phase des Zyklus nicht-homologe Endverknüpfung, während in der S und G2 Phase vorwiegend homologe Rekombination abläuft, da hier die homologen Schwesterchromatiden zur Verfügung stehen (Lee et al., 1997; Takata et al., 1998). Diese replikationsabhängige Regulation ist sinnvoll für die Zelle, da die 12

Verwendung eines Reparaturweges zum vermeidlich falschen Zeitpunkt zu Fehlern wie Verlust der Heterozygotie oder Translokationen führen kann. So kann eine Veränderung der Balance zwischen den Reparaturwegen zur Tumorentstehung beitragen.

1.4.3 Regulation der Doppelstrangbruchreparatur

Um eine Bruch in der DNA zu reparieren, besitzt die Zelle ein Netzwerk von Enzymen, die Brüche detektieren, Reparaturfaktoren rekrutieren und den Zellzyklus regulieren. Man nimmt an, dass ein Sensor die Brüche wahrnimmt und daraufhin einen Sigaltransduktor aktiviert, der die Reparaturfaktoren leitet und auch einen Zellzyklusarrest initiiert (Shiloh, 2003).

Eine Schlüsselposition in der Bruchreparatur nimmt ATM ein, das die Aufgabe eines erfüllt. Mutationen in diesem Gen führen im Menschen zur Transduktors Krebsprädispositionskrankheit Ataxia telangiectasia. ATM gehört zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinasen. Bis heute konnte eine Reihe an Enzymen identifiziert werden, die von ATM phosophoryliert und dadurch entweder aktiviert oder inaktiviert werden. Diese Faktoren lösen in der Regel einen Zellzyklusarrest aus, wie zum Beispiel p53. p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der ein Programm induziert, das zu einem Zellzyklusarrest hauptsächlich in der Transition von G1- zur S-Phase und Apoptose führen kann (Yu and Zhang, 2005). Des Weiteren hat p53 einen direkten Einfluss auf die Aktivität der Rekombination, indem es mit Faktoren der Rekombination oder auch deren Regulatoren interagiert (Linke et al., 2003; Yun et al., 2004). So hemmt p53 die Aktivität von Rad51, einem wichtigen Faktor der Rekombination, und unterdrückt damit die homologe Rekombination (Linke et al., 2003). Die Funktionen von p53 in der Zellzyklusregulation und der homologen Rekombination sind in verschiedenen Domänen des Proteins lokalisiert, so dass nur eine der Aktivitäten durch Mutationen im p53-Gen betroffen sein kann (Saintigny et 1999). Zellen, die defizient für p53 sind, zeigen eine erhöhte spontane al.. Rekombinationsaktivität, was zum Teil auf die fehlende Hemmung von Rad51-Aktivität zurückzuführen ist (Mekeel et al., 1997; Yoon et al., 2004). Eine Defizienz für ATM, das in der Signalkaskade stromaufwärts agiert, bewirkt ebenfalls eine Erhöhung der Rekombinationsaktivität (Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2003).

Ein weiteres Zielprotein von ATM ist NbsI. Dieses Enzym bildet ein Komplex mit Mre11 und Rad50. Phosphorylierung von NbsI führt zum Arrest in der S-Phase des Zellzyklus. Obwohl NbsI im Signalweg nach ATM kommt, ist es möglich, dass der Komplex aus Mre11, Rad50 und NbsI als Bruchsensor agiert (Paull and Lee, 2005). Man nimmt an, dass der Komplex mit der Replikationsgabel entlang der DNA wandert. Rad50 hält dabei möglicherweise die Schwesterchromatide zusammen und unterstützt so die Rekombination durch das Bereitstellen einer homologen Sequenz (Hopfner et al., 2002).

Ein anderer Faktor, der von ATM phosphoryliert wird und ebenfalls die homologe Rekombination unterstützt, ist BRCA1. BRCA1 hilft Rad51 an Bruchstellen zu lokalisieren (Bhattacharyya et al., 2000). Die Kinase DNA-PKcs, die in der nicht homologen Endverknüpfung involviert ist, wird ebenfalls direkt von ATM phosphoryliert und damit aktiviert (Shiloh, 2003).

Ein weiteres Substrat von ATM ist das Histon H2AX. Herde (Foci) von phosphoryliertem H2AX (γ -H2AX) konnten an DNA-Bruchstellen nachgewiesen werden (Pilch et al., 2003). Die phosphorylierten Histone sind entlang mehrerer Kilobasen um den Bereich des Bruchs zu finden. H2AX ist allerdings nicht essentiell für die Reparatur, da eine Defizienz nur geringe Auswirkungen auf die Effizienz der Reparatur hat (Celeste et al., 2003; Celeste et al., 2002). Neben γ -H2AX akkumulieren auch die meisten anderen erwähnten Faktoren wie NbsI und Rad51 als Foci am Ort des Bruches (Kobayashi et al., 2002; Paull et al., 2000).

1.5 Reportersysteme für homologe Rekombination

Die meisten und auch ersten Untersuchungen zum Mechanismus der homologen Rekombination wurden in der Hefe vorgenommen, da sie eine starke Rekombinationsaktivität hat. Die Hefe bietet mit dieser Eigenschaft einen günstigen Modellorganismus in zweierlei Hinsicht. Auswirkungen Mutationen potentiell die DNAvon in für Doppelstrangbruchreparatur wichtigen Genen lassen sich gut anhand von Wachstums- und Überlebensanalysen nach DNA-Brüche induzierender Behandlung wie etwa Bestrahlung untersuchen. Andererseits lassen sich die Mutanten relativ einfach herstellen, da die gerichtete genetische Manipulation (gene targeting) in der Hefe sehr effizient ist.

Um allerdings die verschiedenen Wege der homologen Rekombination in der Hefe zu untersuchen und in andere eukaryotische Zellsysteme zu wechseln, war es nötig Reportersysteme zu entwickeln. Diese Reportersysteme benötigen auf Grund des Mechanismus der Rekombination immer zwei homologe Sequenzen und bestehen so zumeist aus einem Gentandem (Cho et al., 1998; Hendricks et al., 2003; Pierce et al., 2001; Smih et al., 1995). Die beiden Kopien des Genes wurden dabei auf unterschiedliche Weise inaktiviert, damit zumindest eins der Gene durch Rekombination wieder hergestellt werden kann. Ob die beiden Genkopien sich dabei direkt hintereinander auf einem Plasmid oder getrennt auf mehrere Plasmiden befinden oder etwa gemeinsam oder auch separat ins Genom integriert wurden, legt in der Regel die jeweilige Fragestellung fest. Die Wahl des Genes, das als Reporter für die Rekombination dient, ist abhängig vom Modellsystem. Gerade in der Hefe werden bevorzugt Resistenzgene verwendet (Cho et al., 1998; Paques and Haber, 1999). Aber auch Farbmarker wie LacZ und GFP werden häufig und besonders in anderen Zellsystemen verwendet (Pierce et al., 2001; Rockwood et al., 2003; Rudin et al., 1989).

Eine weitere Komponente, die den Reportern zusätzlich beigefügt werden kann, ist eine Schnittstelle, um die für die Rekombination nötigen Brüche zu induzieren. Dafür gibt es mehrere Strategien. Entweder verwendet man standardmäßige Restriktionsenzyme, mit denen man den Reporter behandelt bevor er in das Modellsystem eingebracht wird (Feldmann et al., 2000). So lassen sich verschiedene DNA-Überhänge als Ausgangssubstrat für die Rekombination generieren. Ein Nachteil bei dieser Methode ist, dass die Phase in der die DNA zum Kern gelangt unkontrollierbar für Vorgänge an den freien DNA Enden ist. Diese Unsicherheit kann man umgehen, indem man die auf Grund ihrer 18bp langen Erkennungssequenz nur selten schneidende Endonuklease I-SceI verwendet (Pierce et al., 2001; Richardson et al., 2004). So kann der Reporter zuerst eingebracht werden und anschließend induziert man die Expression der Endonuklease. Als andere Möglichkeit zur Bruchgenerierung wurden auch schon Transposonelemente mit dazugehöriger Transposase verwendet (van Heemst et al., 2004). Dieses System kam allerdings vor Allem in Versuchen zum NHEJ zu Anwendung, um ganze Bereiche zu deletieren und so Ablesen zu können, ob hier überhaupt ein Bruchinsertion und Reparatur stattgefunden hat. Es könnte sonst sein, dass keine Veränderungen an der DNA Sequenz geschehen und so die ungeschnittenen Reporter nicht von geschnittenen und korrekt reparierten zu unterscheiden sind. Dies wird besonders problematisch, wenn die beide Reparaturwege, homologe Rekombination und nicht homologe Endverknüpfung, unterschieden werden sollen.

Rekombinationsreporter dagegen, die auf die Verwendung von Endonukleasen verzichten, messen eine Kombination aus spontan eingeführten Brüchen und der Nutzung der homologen Rekombination zur Reparatur der Brüche. Dies erbringt eine weitere Komponente in der Analyse der Eigenschaften des Modellsystems und reflektiert in vielen Fällen auch weit besser die physiologische Situation in den Zellen.

Der in dieser Arbeit verwendete Rekombinationsreporter basiert auf zwei GFP-Genen, die hintereinander gefügt sind und nur durch ein Puromycin-Resistenzgen getrennt sind (Drexler et al., 2004a; Drexler et al., 2004b). Beide GFP-Gene sind nicht funktionell. Das vordere Gen ist durch eine Insertion, die eine Leserasterverschiebung bewirkt, inaktiviert worden. Beim zweiten GFP-Gen wurde das 5'-Ende deletiert. Diese Struktur entspricht dem gängigen Konzept für die Detektion der homologen Rekombination. In dieser Form ist der Reporter in



Abb. 3: Rekombinationsereignisse auf dem Reporter

Schematische Darstellung der Rekombinationswege am Beispiel des Rekombinationsreporters. Im grünen Kasten ist das Produkt der konservativen Rekombination dargestellt, während die Produkte der nicht konservativen Rekombination und der Genkonversion mit cross over mit einem roten Kasten markiert sind.

der Lage jede Art von Rekombination zu detektieren. Abhängig vom Rekombinationsweg können zwei verschiedene Produkte entstehen. Führt die Zelle Genkonversion ohne cross over durch, so entsteht ein Produkt in dem die Rekombinationskassette an sich erhalten bleibt, und nur die Insertion des Akzeptors wurde durch die korrekte Sequenz ersetzt. Das gleiche Ergebnis erbringt der Reparaturweg SDSA. Dies sind beides Rekombinationswege, die eben wegen dieser Eigenschaft, die Ursprungssequenz weitesgehend zu erhalten, als konservativ bezeichnet werden. Das andere mögliche Produkt entsteht bei der Genkonversion mit cross over. Hier wird der Bereich zwischen den beiden GFP-Genen, das Puromycin-Resistenzgen also, scheinbar deletiert. Dieses Deletionsprodukt entsteht auch durch die anderen beiden Reparaturwege, BIR und SSA, die als nicht konservativ bezeichnet werden, da es zu Deletionen kommen kann. Dass durch die Genkonversion mit cross over ebenfalls ein Deletionsprodukt entsteht, ist für die Auswertung vernachlässigbar, da diese Form der

Genkonversion nur sehr selten während der Mitose auftritt. Sie findet eher speziell während der Meiose Anwendung (Prado and Aguilera, 2003).

Um direkt konservative Rekombination zu messen, ist ein veränderter Reporter nötig. Es bieten sich zwei Möglichkeiten der Veränderung an, die den Reporter spezifisch für konservative Rekombination machen. Eine Möglichkeit ist die Invertierung des Donor-GFP-Gens. Die andere Möglichkeit ist eine Deletion des 3' kodierenden Bereichs des Donors. Im ersten Falle kann kein Deletionsprodukt mehr entstehen, während bei der zweiten Veränderung das Deletionsprodukt, das durch nicht konservative Rekombination entsteht, kein funktionelles GFP-Gen mehr ergibt.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war eine Analyse der Aktivität und Regulation der Doppelstrangbruchreparatur in B-Zellen. Während der T-zellabhängigen Immunantwort finden in den B-Zellen Prozesse statt, die DNA-Strangbrüche einführen. Diese Prozesse sind Klassenwechselrekombination und somatische Hypermutation.

Die Doppelstrangbruchreparatur sollte in diesen Zellen sehr stringent reguliert sein, zumal der Prozess der Hypermutation intrinsisch schon Mutationen in die DNA einführt. Die Untersuchung der Regulation und Aktivität der Strangbruchreparatur sollte auch Aufschluss über eine Beteiligung dieses Reparaturmechanismus an der somatischen Hypermutation geben. Analysen zu einer Deregulation oder einer für die Keimzentrumsprozesse notwendigen differentiellen Regulation der Reparatur könnten Hinweise auf eine Rolle in der Tumorentstehung liefern. Um dies zu untersuchen, wurden Analysen zur Expression der Faktoren der Doppelstrangbruchreparatur in primären B-Zellen und B-Lymphomzelllinien durchgeführt und die Aktivität der homologen Rekombination in den Zelllinien mit Hilfe eines funktionellen Reporters bestimmt. Die Anwendung des funktionellen Reporters ermöglicht eine Bestimmung der Nutzung der homologen Rekombination und des Auftretens von DNA-bruchinduzierenden Ereignissen in den B-Zellen. Zudem sollte die genaue Analyse Rekombinationsprodukte Aufschluss über die von den Zellen verwendeten der Rekombinationswege liefern, um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Prozesses an der somatischen Hypermutation oder auch der Tumorentstehung zu erhalten.

2 Ergebnisse

2.1 mRNA-Expressionsanalysen von Reparaturfaktoren in B-Zellen

2.1.1 mRNA-Expressionsunterschiede in humanen B-Zell-Populationen

Um Hinweise für eine mögliche differentielle Regulation von Reparaturprozessen in B-Zellen zu erhalten, wurden die mRNA-Mengen von verschiedenen Reparaturfaktoren analysiert, die entweder an NHEJ oder HR beteiligt sind.

Die mRNA-Mengen wurden mittels quantitativer real-time PCR bestimmt und auf CD19mRNA-Mengen normalisiert. CD19 wurde hier und auch in den folgenden Experimenten als Referenzgen gewählt, da dessen Expression unabhängig von der Aktivierung und Proliferation in B-Zelllinien ist (M. Schlee, 2003; Doktorarbeit) und in den Experimenten mit isogenen Zellpopulationen nicht signifikant schwankte (Tab.12, Methodenteil). Um Hinweise auf die physiologische Regulation von Reparaturfaktoren in B-Zellen zu erhalten, wurde die mRNA-Expression verschiedener Reparaturfaktoren in humanen naiven (IgD+) und aktivierten Keimzentrums-B-Zellen (CD77+) analysiert. In Zentroblasten waren die mRNA-Mengen der Komponenten des DNA-PK-Komplexes und Rad51 und Rad54, der wichtigsten Faktoren der DSB-Reparatur, erhöht (Abb.4). Diese erhöhte Expression könnte entweder auf die Aktivierung und Differenzierung oder aber auf die gesteigerte Proliferationsrate von Zentroblasten im Vergleich zu ruhenden B-Zellen zurückzuführen sein. Bezeichnend ist, dass der Expressionsunterschied für die HR-Faktoren Rad51 und Rad54 deutlich stärker ist (Faktor 60 bis 100; Abb. 4) als für die Komponenten der NHEJ (Faktor 2 bis 3; Abb. 4).

2.1.2 Proliferationsgekoppelte Regulation der Reparaturgene

Da der Unterschied der mRNA-Mengen zwischen naiven und Keimzentrums-B-Zellen möglicherweise auf eine proliferationsinduzierte Expression der Reparaturfaktoren zurückzuführen ist, sollte dies mit Hilfe der Zelllinie P493-6 untersucht werden.

Die Zelllinie P493-6 kann konditional durch c-Myc vermittelte Proliferation wachsen. Durch Zugabe von Tetracyclin kann die c-Myc-Expression gestoppt werden, sodass die Zellen ruhenden B-Zellen gleichen, die keine Zellteilung durchführen. Für dieses Experiment wurde einem Teil der Zellen Tetracyclin für zwei Tage zugesetzt, dann wieder ausgewaschen und nach 0, 8 und 24 Stunden wurden Zellen abgenommen und cDNA hergestellt.

aufgelistet.



Abb. 4: mRNA-Expressionsmengen von Reparaturfaktoren in primären B-Zellen. Relative mRNA-Mengen der Faktoren der Doppelstrangbruchreparatur in primären naiven und Keimzentrums-B-Zellen normalisiert auf CD19-mRNA-Mengen. A) für die Faktoren der nicht homologen Endverknüpfung Ku80, Ku70 und DNA-PKcs. Für Faktoren der homologen Rekombination B) Rad51 und C) Rad54. Die Cp-Werte für CD19 sind in Tabelle 12 (Methodenteil)

In ruhenden, das heißt durch Tetracyclin Zugabe in ihrem Wachstum gestoppten P493-6-Zellen ist im Vergleich zu konstant proliferierenden Zellen eine deutliche Reduktion der mRNA-Mengen aller untersuchten Reparaturfaktoren zu beobachten (Probe –Tet und +Tet, Abb. 5). Eine proliferationsinduzierte Erhöhung der mRNA-Mengen der Reparaturfaktoren mit einem Maximum bei 24 Stunden zeigt sich in den ausgewaschenen und wieder *c-myc* exprimierenden P493-6 Zellen. Die Reparaturfaktoren sind hier allerdings wohl keine direkten c-Myc-Zielgene, da der c-Myc-Effekt erst im späteren Zeitverlauf deutlich wird.

Auffällig an diesem Ergebnis ist, dass auch hier die Expressionsunterschiede für die Gene der homologen Rekombination (Faktor 10 bis 20) deutlich stärker waren als für die Gene der NHEJ (Faktor 4 bis 5).

18



Abb. 5: Proliferationsgekoppelte mRNA-Expression der Reparaturfaktoren in P493-6. Relative mRNA-Mengen der Faktoren der Doppelstrangbruchreparatur normalisiert auf CD19mRNA-Mengen in P493-6-Zellen, die durch Tetracyclinabhängige Inhibition der *c-myc*-Expression in ihrem Teilungsverhalten gehemmt und wieder in den Zellzyklus entlassen wurden für 0, 8 und 24 Stunden. Für die Faktoren der nicht homologen Endverknüpfung A) Ku80, Ku70 und DNA-PKcs. Für Faktoren der homologen Rekombination B) Rad51 und C) Rad54. Die Cp-Werte für CD19 sind in Tabelle 12 (Methodenteil) aufgelistet.

2.1.3 mRNA-Expressionsunterschiede in humanen B-Lymphomzelllinien

Es sollte untersucht werden, ob die beobachteten Expressionsunterschiede für die Reparaturfaktoren auch in kultivierten B-Lymphomzelllinien zu finden sind, die bestimmte Stufen der B-Zellentwicklung widerspiegeln und konstitutiv proliferieren.



Abb. 6: mRNA-Expressionsmengen von Reparaturfaktoren in B-Zelllinen.

Relative mRNA-Mengen der Faktoren der Doppelstrangbruchreparatur normalisiert auf CD19mRNA-Mengen in den B-Zelllinien Raji, BJAB, DG75, 721 und EREB2-5. Für die Faktoren der nicht homologen Endverknüpfung A) Ku80, Ku70 und DNA-PKcs. Für Faktoren der homologen Rekombination B) Rad51 und C) Rad54. Die Cp-Werte für CD19 sind in Tabelle 12 (Methodenteil) aufgelistet. Die relativen mRNA-Mengen von Ku70 und Ku80 in DG75 betragen 2489 und 877 und wurden hier aus Darstellungsgründen nicht gezeigt.

Dazu wurde cDNA von drei Lymphomzelllinien verwendet, die einen Keimzentrumsphänotyp aufweisen. Die Linie Raji wurde aus einem Burkitt-Lymphom isoliert und weist die charakteristische c-myc-IgH-Translokation auf. Sie hebt sich wegen konstitutiver Hypermutation und EBV-Positivität von den anderen Linien ab. Bei DG75 und BJAB handelt es sich ebenfalls um Burkitt- oder Burkitt-ähnliche Zelllinien, wobei in den BJAB-Zellen die charakteristische c-myc-IgH-Translokation nicht vorhanden ist. Bei 721 und EREB2-5 handelt es sich um durch EBV-Infektion immortalisierte lymphoblastoide Zelllinien

20

(LCL). Sie weisen keinen Keimzentrumsphänotyp auf und ähneln eher naiven oder aktivierten B-Zellen.

Die mRNA-Mengen der NHEJ Faktoren DNA-PKcs, Ku80 und Ku70 und der HR-Faktoren Rad51 und Rad54 zeigten überraschenderweise Unterschiede zwischen den Zelllinien und auch Expressionsunterschiede innerhalb einer Zelllinie für die einzelnen Reparaturwege. Dies Feststellung ist auch unabhängig davon, ob auf CD19-mRNA-Mengen normalisiert oder von gleichen cDNA-Mengen ausgegangen wurde (Abb.6). Es lässt sich allerdings keine Korrelation zwischen den RNA-Expressionsmengen und den Typen von Zelllinien oder den Reparaturfaktoren oder auch Reparaturwegen erkennen. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass in diesen Zellen ein viel komplexeres Regulationsschema als nur proliferationsgekoppelte Induktion der Expression vorliegt. Diese Unterschiede zwischen den Linien müsste allerdings noch mit unabhängigen Methoden verifiziert werden, um eine genauere Relation der mRNA-Mengen zwischen den Zelllinien zu bestimmen.

2.2 Proteinmengen und Lokalisation von Reparaturfaktoren in B-Zelllinien

Da die mRNA-Menge für ein Gen nicht zwingend seine Proteinmenge in der Zelle widerspiegelt, die für eine funktionelle Interpretation der Expression relevant ist, wurden die Proteinmengen der Reparaturfaktoren Ku80 und Ku70 für NHEJ und Rad51 für homologe Rekombination in diesen oben beschriebenen B-Zelllinien und der T-Zelllinie Jurkat als Kontrolle bestimmt.

Es zeigten sich keine Expressionsunterschiede für die NHEJ-Faktoren Ku80 und Ku70 zwischen den einzelnen Zelllinien (Abb.7A). Da für Ku80 allerdings bekannt ist, dass seine Aktivität auch über subzelluläre Lokalisation reguliert sein kann, wurden Zytoplasma und Kerne der Zellen getrennt und vergleichend auf Ku80-Proteinmenge untersucht. Als Kontrolle für die Separation wurde für die Kernfraktion Orc3-Antikörper und für die Zytoplasmafraktion I κ B α -Antikörper genutzt, wie hier an Beispiel der T-Zelllinie Jurkat gezeigt ist (Abb.7B). In allen getesteten Zelllinien war Ku80 Protein zu gleichen Teilen im Zytoplasma und im Kern lokalisiert, so dass eine Regulation durch differentielle Lokalisation in diesen Zellen unwahrscheinlich scheint (Abb.7C).

Die Analyse der Proteinmengen von Faktoren der homologen Rekombination wurde auf Rad51 fokussiert. Interessanterweise ergaben sich für die Rad51-Proteinmengen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. So hatte die Burkitt-Lymphomzelllinie DG75 die höchste Menge an Rad51, während in anderen B-Zelllinien wie Raji und EREB2-5 fast kein Rad51 Protein nachweisbar war (Abb.7D). Eine relativ zu DG75 und Raji mittlere Proteinmenge konnte in BJAB und 721 beobachtet werden. Diese mittlere Rad51-Proteinmenge konnte auch in der nicht-B-Zelllinie Jurkat nachgewiesen werden.

Auf Proteinebene zeigen sich also nur Unterschiede in den Expressionsmengen für Rad51, einen Faktor der homologen Rekombination, während die Proteinmengen der Faktoren der nicht homologen Endverknüpfung gleich sind in den verschiedenen Zelllinien.

Zusammenfassend kann man somit sagen, dass die Analyse der Expression der Reparaturfaktoren interessante Unterschiede für die Reparaturwege zeigte. So konnte für die Gene der NHEJ nur eine geringere Induktion in Keimzentrums-B-Zellen im Gegensatz zu den Genen der homologen Rekombination festgestellt werden. In B-Zelllinien aber spiegelten sich die Unterschiede in der mRNA-Expression der NHEJ-Gene nicht in den Proteinmengen dieser Faktoren wider und auch eine differentielle subzelluläre Lokalisation von Ku80 konnte nicht beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den Faktoren der NHEJ gab es für Schlüsselfaktoren der homologen Rekombination Hinweise für eine differentielle Regulation auf verschiedenen Ebenen. So war eine starke Induktion der mRNA-Mengen von Rad51 und Rad54 in Keimzentrums-B-Zellen Vergleich naiven **B-Zellen** beobachten, die Teil auf eine im zu zu zum proliferationsgekoppelte Regulation zurückzuführen ist. In den Zelllinien, die verschiedenen B-Zell-Populationen gleichen und konstitutiv proliferieren, konnten auch deutliche Expressionsunterschiede auf Proteinebene für Rad51, einen wichtigen Faktor der homologen Rekombination, nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Faktoren der NHEJ ist dies ein deutlicher Hinweis auf weitere Wege der differentiellen Regulation für Rad51, und damit eventuell auch der homologen Rekombination, in B-Zellen.



Abb. 7: Proteinmengen und Lokalisation von Reparaturfaktoren in B-Zelllinien.

Western-Blot-Analyse der Proteinmengen in den B-Zelllinien Raji, BJAB, DG75, 721 und EREB2-5 und der T-Zelllinie Jurkat standardisiert auf β -Aktin-Proteinmengen. A) Proteinmengen der Faktoren der nicht homologen Endverknüpfung Ku70 und Ku80 und D) des Rekombinationsfaktors Rad51. Analyse der subzellulären Lokalisation von Ku80. B) Separation der zytoplasmatischen Zellfraktion (C) und der nukleären Fraktion (N) und Ku80-Proteinmengen am Beispiel Jurkat. Als Separationskontrollen dienten IkB α für die zytoplasmatischen Fraktion und Orc3 für die nukleäre Fraktion. Gesamtzellfraktion (T). C) Ku80-Lokalisation in den Zelllinien DG75, Raji, EREB2-5 und P493-6. D) Proteinmengen des Rekombinationsfaktors Rad51 in den B-Zelllinien Raji, BJAB, DG75, 721 und EREB2-5 und der T-Zelllinie Jurkat standardisiert auf β -Aktin-Proteinmengen.

2.3 Rekombinationsaktivität in humanen B-Zelllinien

2.3.1 Etablierung eines Reportersystems für homologe Rekombination in humanen B-Zelllinien

Da die Expression von Rad51, einem Schlüsselfaktor der homologen Rekombination, in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich war, lag es nahe die Aktivität der homologen Rekombination in diesen Zelllinien zu bestimmen.

Dazu wurde ein Reporter benutzt, der auf zwei hintereinander angeordneten GFP-Genen basiert, die beide nicht funktionell sind. Das Akzeptor-GFP-Gen wurde durch eine Insertion unfunktionell, die eine Leserasterverschiebung verursacht, während das Donor-GFP-Gen wegen der Deletion der 5' kodierenden Sequenz nicht funktionell ist (Abb.8A). Durch


Abb. 8: Reportersystem zur Bestimmung der Aktivität der homologen Rekombination und dessen experimentelle Anwendung.

A) Aufbau der Rekombinationskassette und theoretisch auftretende Produkte. Die Bst1107I-Schnittstelle charakterisiert ein repariertes GFP-Gen. B) Episomal replizierender Vektor mit der Rekominationskassette, angetrieben vom CMV-Promotor und Ig-Enhancer. C) FACS-Analyse über die Zeit in Tagen von Raji-Zellen, transfiziert mit dem Rekombinationsreporter (pAK7) oder einem Konstrukt, in dem das Donor-GFP-Gen deletiert wurde (pAK14). Dargestellt sind 50000 für pAK7 und 10⁵ lebende Zellen für pAK14. D) Graphische Darstellung der Akkumulation von GFP-positiven Zellen über die Zeit von einem Monat.

24

Tage	Cp CMV	Cp HPRT	Effizienz CMV	Effzienz HPRT	Kopien
7	18,71	26,81	1,87	1,75	26
14	18,88	27,15	1,87	1,75	28
21	19,30	27,26	1,87	1,72	15
31	23,13	28,71	1,87	1,72	3
35	23,62	28,01	1,87	1,72	2
40	25,03	26,84	1,87	1,75	1

Tah	1. Ana	lvse de	r Ko	nienzahlen	des Re	norters üher	die '	Zeit in	Raii-Zellen
rap.	I: Alla	iyse ue	r n u	pienzamen	ues ne	porters uper	ule	Len m	Kaji-Lenen

Raji-Zellen wurden mit pAK7 transfiziert. Im Verlauf der Kultivierung wurden Zellen abgenommen und DNA-Präparationen hergestellt, die zur Bestimmung der Kopienzahlen des Reporters mittels quantitativer PCR genutzt wurden. Die niedrigere Kopienzahl am Tag 7 ist auf die zu diesem Zeitpunkt noch unvollständige Selektion zurückzuführen. Für die Auswertung der Rekombinationsaktivität wurden die Kopienzahlen um Tag 20 nach der Transfektion verwendet, da sie sich hier nicht gravierend ändern. Tage: Tage nach der Transfektion

homologe Rekombination kann das Akzeptor-Gen wiederhergestellt werden und die Expression des Gens kann dann über FACS (Fluorescence activated cell sorting; Abb.8A und C) detektiert werden. Diese Rekombinationskassette, bestehend aus den zwei GFP-Genen, die nur durch ein Puromycin-Resistenzgen getrennt sind. wurde von dem Cytomegalovirus(CMV)-Promotor angetrieben (Abb.8B). Dieser Promotor hatte sich in Vorexperimenten als stark genug erwiesen, um eine detektierbare Expression des GFP-Proteins in B-Zellen zu gewährleisten. Zusätzlich befanden sich noch in den meisten Experimenten die Immunglobulin-Enhancer auf dem Plasmid. Für eine episomale Replikation und Erhaltung des Plasmids enthielt es die EBV-Elemente EBNA1 und OriP. Das für die Selektion auf reportertragende Zellen nötige Resistenzgen, meist das Hygromycinresistenzgen, wurde von dem Simian Virus 40 (SV40)-Promotor angetrieben. Erst mit diesem Promotor war es möglich, eine Selektion auf den Reporter in B-Zelllinien durchzuführen, da die Aktivität des Promotors es zuließ, dass eine geringe Anzahl des Reporterplasmids für das Überleben der Zellen ausreichend war.

Eine weitere Voraussetzung für die Rekombinationsanalyse war die Transfizier- und Selektierbarkeit der einzelnen Zelllinien. Zur Bestimmung der Rekombinationsaktivität muss das Reporterpasmid effizient in die B-Zelllinien transfiziert werden und auf das Plasmid selektiert werden, um dann die Akkumulation von GFP-positiven Zellen über die Zeit von etwa einem Monat mittels FACS-Analyse messen zu können. In Abbildung 8 D ist das Ergebnis bei dieser Vorgehensweise am Beispiel der Zelllinie Raji gezeigt, mit deren Hilfe das System auch etabliert worden ist. Die Selektion erstreckte sich über die ersten zwei 26

Wochen der Messung. In dieser Zeit ist der Anstieg der Anzahl GFP-positiver Zellen nicht ausschließlich auf Rekombinationsereignisse zurückzuführen, sondern auch auf die Selektion. Bemerkenswerterweise ist in den Raji-Zellen ein kontinuierlicher Anstieg der Zahl an GFPpositiven Zellen auch über die Selektionsphase hinaus zu beobachten. Das bedeutet, dass in den Raji-Zellen fortlaufend Brüche generiert und über homologe Rekombination repariert werden. Um ausschließen zu können, dass die detektierten Reparaturereignisse auf andere Reparaturprozesse, wie etwa NHEJ, zurückzuführen sind, wurde der Donor der Rekombinationskassette entfernt. Wäre ein anderer Prozess außer homologer Rekombination verantwortlich, könnte eventuell auch ohne homologe Sequenz durch die Deletion der Insertion im Akzeptor-GFP-Gen eine GFP-Expression erreicht werden. Nach Transfektion dieses deletierten Konstrukts konnten über den Zeitraum von einem Monat und länger keine GFP-positiven Zellen in Raji detektiert werden (Abb.8C). Die Notwendigkeit einer homologen Sequenz für die Generierung von GFP-positiven Zellen verweist also eindeutig auf homologe Rekombination als Reparaturmechanismus.

Um die HR-Aktivität von verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können, war es nötig die Kopienzahl des Rekombinationsreporters während der Analyse zu bestimmen. Dazu wurden stichprobenartig im Versuchsverlauf DNA-Präparationen von den Zellen hergestellt. Zur Bestimmung der Kopienzahl wurde die quantitative real-time PCR angewendet. Dabei wurden Primer für den CMV-Promotor der Rekombinationskassette benutzt und mit Hilfe des genomischen Lokus des HPRT-Gens, der die analysierte Zellmenge repräsentiert, die Kopienzahl des Reporters pro Zelle errechnet. Die Kopienzahl variiert in verschiedenen Experimenten, je nach Transfektionseffizienz und sie nahm auch während des Verlaufs des Experiments langsam aber kontinuierlich ab (Tab.1). Dieser Kopienverlust hielt an, bis in der Regel nach zirka zwei Monaten nur noch eine Kopie übrig und nötig war, um die Resistenz aufrecht zu erhalten.

2.3.2 Unterschiede in der Rekombinationsaktivität verschiedener B-Zelllinien

Um die Rekombinationsaktivität in B-Zelllinien zu bestimmen, wurde der in der oben beschriebenen Etablierung verwendete Rekombinationsreporter transfiziert. Da eine Voraussetzung für die Analyse Transfizier- und Selektierbarkeit der Zelllinien ist, konnten nur einige der getesteten Linien verwendet werden. Für die Analyse als geeignet erwiesen sich Raji, BJAB, 721, EREB2-5 und die T-Zelllinie Jurkat. Die Linie DG75 zeigte sich nur teilweise als geeignet. Das Transfektionsverfahren und die Selektion sind sehr effektiv in dieser Linie. In mehrfachen Experimenten kam es aber nach den zwei Wochen der Selektion zu einem zunehmenden Verlust der Expression des Reporters. Wahrscheinlich ist dieses



Abb. 9: Rekombinationsaktivität in B-Zelllinien

Rekombinationsaktivität der B-Zelllinien Raji, BJAB, DG75, 721 und EREB2-5 und der T-Zelllinie Jurkat. Gezeigt ist die Anzahl der Rekombinationsereignisse pro 10⁶ Kopien des Reporters gemessen über einen Monat. In den ersten 14 Tagen wurde auf Vektor tragende Zellen selektiert.

Phänomen auf epigenetische Veränderungen des Reporters zurückzuführen, da der Reporter bei der Methode zur Kopienzahlbestimmung noch nachweisbar war, und auch Tests mit einem GFP-Expressionsplasmid einen Verlust der Expression trotz Anwesenheit des Plasmids ergaben (Tab.13, Methodenteil). Allerdings konnte durch Behandlung der Zellen mit Trichostation A (TSA), das Histondeacetylasen hemmt, die Expression nicht wiederherstellt werden (Daten nicht gezeigt). So ist eine definitive Aussage zur Stärke der HR-Aktivität in DG75 nicht möglich, auch wenn aus den Daten ersichtlich ist, dass in dieser Linie Rekombination stattfindet (Abb.9).

Für die anderen Zelllinien ergaben sich nach der Bestimmung der Kopienzahl reproduzierbare Graphen für die Rekombinationsaktivität (Abb.9 und Tab.13, Methodenteil). Es zeigte sich, dass in den B-Zelllinien BJAB und Raji eine erhöhte Aktivität der homologen Rekombination festgestellt werden konnte (Abb.9). Dieser Hyperrekombinationsphänotyp ist allerdings nicht typisch für B-Zellen, da die Linien 721 nur durchschnittliche und EREB2-5 fast gar keine Rekombinationsaktivität hatten. Auch in der T-Zelllinie Jurkat konnten nur wenige bis gar keine Rekombinanten beobachtet werden.

Mit dem optimierten Reportersystem für homologe Rekombination ist es möglich, Unterschiede der Rekombinationsaktivität verschiedener Zelllinien reproduzierbar zu detektieren. Die in diesen Versuchen gemessenen Rekombinationsereignisse sind auf spontane Brüche im Reporter zurückzuführen und stellen so eine Kombination aus der Menge 28

an Brüchen und der Tendenz der Zellen zur Bruchreparatur über homologe Rekombination dar. Zwei mögliche Prozesse, die für die Entstehung der Brüche verantwortlich sein können, sind Transkription oder Replikation.

2.4 Transkriptionsabhängigkeit der Hyperrekombination

Eine Abhängigkeit der Rekombinationsaktivität von der Transkription würde eine mögliche Verbindung zur somatischen Hypermutation als einen Prozess herstellen, der DNA-Brüche in Keimzentrums-B-Zellen generiert. Andererseits könnte eine verstärkte Generierung von replikationsabhängigen Brüchen und der Reparatur über homologe Rekombination auf einen möglichen Beitrag zur Lymphomentstehung hinweisen.

Um eine Transkriptionsabhängigkeit der Rekombination zu untersuchen, wurde ein Plasmid verwendet, das einen Tetracyclin induzierbaren bidirektionalen Promotor hat, der zum Einen die Rekombinationskassette und zum Anderen ein verkürztes Gen des NGF-Rezeptors (nerve growth factor receptors) als Expressionsmarker antreibt (Abb.10A). Die Regulation des Promotors erfolgte mit Hilfe eines tetracyclinabhängigen Systems (Abb.10B), das aus einem Transaktivator, der bei Tetracyclin-Zugabe an die Operatorelemente im Promotor bindet, und einem Repressor besteht, der sich bei Tetracyclin-Zugabe vom Promotor löst. Dieses System aus Aktivator und Repressor verhindert einerseits zuverlässig eine Expression in Abwesenheit von Tetracyclin und ist andererseits recht gut induzierbar bei Tetracylin-Zugabe. Allerdings gibt es in diesem System erfahrungsgemäß Unterschiede in der Induzierbarkeit bei den Zelllinien und auch innerhalb der transfizierten Zellen. Dies machte es erforderlich, für eine Analyse Einzelzellklone zu generieren und auf ihre Induzierbarkeit zu testen. In Abbildung 10D ist die Induzierbarkeit am Beispiel je eines Klons der Zelllinien Raji und BJAB gezeigt.

Der induzierbare Vektor wurde in Raji- und BJAB-Zellen transfiziert, und dann wurden Einzelzellklone für die Analyse herangezogen. In Zeitabständen von einer Woche wurde je ein Aliquot aller Klone mit dem Tetracyclin-Analog Doxycyclin induziert und der verbliebene Teil weiter ohne Zusatz kultiviert. Die Klone wurden je dreimal induziert und über zwei Wochen hinweg analysiert. Ist die Rekombination transkriptionsabhängig, so ergibt sich bei jeder neuen Induktion anfangs etwa die gleiche Anzahl GFP-positiver Zellen, die erst während der zwei Wochen ansteigt (Abb.10C). Im Falle von transkriptionsunabhängiger Rekombination setzt sich mit jeder neuen Induktion der Anstieg der Anzahl an GFP-positiven Zellen fort (Abb.10C). Da eine korrekte Analyse von einer effektiven Expression des Reporters abhängt, wurden nur einige Klone auf Grund ihrer konstanten Induzierbarkeit für die Auswertung ausgewählt. Für Raji ergaben sich nach diesem Kriterium sechs verwertbare Klone und für BJAB sieben Klone.



Abb. 10: Experimenteller Ansatz zur Untersuchung einer transkriptionsgekoppelten Rekombinationsaktivität

Aufbau der Tetracyclin-regulierbaren bidirektionalen Expressionskassette. B) Vektor mit der Expressionskassette und den Elementen der Expressionsregulation: rtTA und tTR-KRAB. Der Vektor wird episomal in den Zellen erhalten. C) Theorie zur Interpretation der Ergebnisse im Bezug auf eine Transkriptionsabhängigkeit der Rekombination. Aliquots der Einzelzellklone werden im Abstand von je einer Woche mit dem Tetracyclin-Analog Doxycyclin induziert (roter Pfeil) und die Anzahl der GFP-positiven Zellen über zwei Wochen bestimmt. D) Bestimmung der Induzierbarkeit des Reporters anhand der NGF-Rezeptor-Expression.



Abb. 11: Einfluss der Transkription auf die Rekombinationsaktivität in Raji Graphische Darstellung der FACS-Analyse der Einzelzellklone über zwei Wochen. Jeder Graph (marine, magenta, blau) stellt je eine von drei Induktionen des gleichen Klons dar. Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der einzelnen Induktionen. Die Zahlen über den Diagrammen bezeichnen die Nummer der jeweiligen Klone. Die Skala der X-Achse ist für alle Klone gleich gewählt, um die Aktivitätsunterschiede zu illustrieren.

Betrachtet man die einzelnen Klone von Raji, sieht man deutliche Unterschiede in der Aktivität der Rekombination. So können drei Gruppen identifiziert werden (Abb.11). Die erste Gruppe zeigte eine nicht transkriptionsabhängige basale Rekombinationsaktivität (10 und 6). Im Klon 25 war allerdings deutlich eine transkriptionsabhängige Hyperrekombination zu beobachten. Die anderen Klone zeigten eine mittlere Rekombinationsaktivität, die anscheinend auch transkriptionsabhängig ist (28; 27; 20).

Vergleicht man dagegen die Ergebnisse für die BJAB-Klone, so zeigt sich in allen Klonen nur ein geringer Anstieg der Anzahl von GFP-positiven Zellen. Zudem scheint die detektierte Rekombinationsaktivität nicht transkriptionsabhängig zu sein (Abb.11).





Graphische Darstellung der FACS-Analyse der Einzelzellklone über zwei Wochen. Jeder Graph (marine, magenta, blau) stellt je eine von drei Induktionen des gleichen Klons dar. Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der einzelnen Induktionen. Die Skala der X-Achse ist für alle Klone gleich gewählt und unterscheidet sich von der in Abbildung 11, da hier die Zahl der detektierten Rekombinanten niedriger ist.





Western-Blot-Analyse der AID-Proteinmengen in A) den analysierten Zelllinien und B) in den Subklonen von Raji aus der Transkriptionsanalyse, standardisiert auf β -Aktin-Proteinmengen.

Interessanterweise unterscheiden sich Raji- von BJAB-Zellen durch die Expressionsmenge des AID-Proteins (Abb. 13 A). In Raji-Zellen, in denen eine deutliche AID-Expression zu sehen ist, konnte transkriptionsabhängige Rekombination beobachtet werden, allerdings nicht in allen analysieren Klonen. Von einer anderen Burkitt-Lymphomzelllinie namens Ramos, die ebenfalls AID exprimiert, ist aber bekannt, dass die AID-Expression in Subklonen der Zellen variieren kann (Zhang et al., 2001). Die Analyse der Raji-Klone ergab auch tatsächlich Unterschiede in den AID-Proteinmengen, wie in Abbildung 13 B zu sehen ist. Klon 25, der eine eindeutig transkriptionsabhängige Hyperrekombination aufwies, hatte die höchste AID-Proteinmenge, während die Klone mit der basalen Rekombinationsaktivität nur geringe Mengen AID exprimierten. In den Klonen mit dem intermediären Rekombinationsphänotyp konnten dem entsprechend signifikante, aber nicht so hohe AID-Proteinmengen nachgewiesen werden wie in Klon 25. Die transkriptionsabhängige Hyperrekombination korreliert also mit der AID-Expression. Dies weist darauf hin, dass AID einen Einfluss auf die transkriptionsabhängige Rekombinationsaktivität hat und ein maßgeblicher Faktor für die Hyperrekombination in Raji sein kann.

2.5 AID-Überexpression verstärkt die Rekombinations- und Hypermutationsaktivität

Um den Einfluss von AID auf die Rekombination direkt zu untersuchen wurde AID-Protein in den Zelllinien Raji und BJAB überexprimiert. Dazu wurden parallel ein Doxycyclin-induzierbarer Expressionsvektor für AID (pAK21) und der Rekombinationsreporter (pAK37) in die Zellen transfizert. Um Einflüsse durch die Selektionszusätze oder Doxycyclin auf das Ergebnis auszuschließen, wurde als Kontrolle zusätzlich eine Kotransfektion mit dem Rekombinationsreporter und einem ebenfalls induzierbaren Expressionsvektor, der für den NGF-Rezeptor kodiert, durchgeführt (pAK24). Die Entstehung von GFP-positiven Zellen wurde dann über die Zeit gemessen. Während der gesamten Messung war die Expression von AID oder dem NGF-Rezeptor mittels 1µg/ml Doxycyclin induziert worden. In Abbildung 14 sind für Raji (A) und BJAB (B), mit und ohne AID-Überexpression, die Anzahl der detektierten Rekombinationsereignisse umgerechnet auf die Kopienzahl des Rekombinationsreporters und gemessen über einen Monat gezeigt (Tab.14, Methodenteil). Sowohl für Raji als auch für BJAB lässt sich deutlich eine Erhöhung der Rekombinationsfrequenz durch die Überexpression von AID erkennen. In Abbildung 15 sind die AID-Proteinmengen der transfizierten Raji- und BJAB-Zellen zu sehen. Es ist eine deutlich Überexpression von AID in den jeweils mit dem AID-Expressionsvektor transfizierten Zellen zu erkennen.



Abb. 14: Einfluss von AID-Überexpression auf die Rekombinations- und Hypermutationsaktivität.

AID-Überexpression und Expression von NGF-Rezeptor in A) Raji und B) BJAB mit gleichzeitiger Bestimmung der Rekombinationsaktivität über einen Monat. Dargestellt sind Rekombinationsereignisse pro Reporterkopie. Transfizierte Plasmide: pAK37, pAK21 und pAK24 C) Analyse der Hypermutationsaktivität in AID- oder NGF-Rezeptor-überexprimierenden Raji-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl der Revertanten in 10^5 Zellen. Transfizierte Plasmide: pMS(Y)X, pAK21 und pAK24. Die Expression von AID und NGFR wurde durch ständige Zugabe von 1µg/ml Doxycyclin induziert.





Western-Blot-Analyse der AID-Proteinmengen in den AID- oder NGFR-überexprimierenden Zelllinien, standardisiert auf β -Aktin-Proteinmengen. Das zusätzlich eingeführte AID-Protein ist mit einem HA-Marker versehen und kann so anhand des Molekulargewichts vom endogenen AID unterschieden werden. Die Menge an AID mit dem Molekulargewicht des endogenen AID scheint sich durch die Expression von exogenem AID zu erhöhen. Die Ursache dafür ist bisher unbekannt.

Eine Überexpression von AID-Protein hat ebenfalls Auswirkungen auf die somatische Hypermutation in Raji-Zellen Dies wurde mit Hilfe eines (Abb.14C). Hypermutationsreporters untersucht (Ruckerl et al., 2004). Dieser Reporter basiert auf einem YFP Gen, das wegen einer Punktmutation, die für ein verfrühtes Stoppcodon sorgt, nicht funktionell ist. Wenn durch die Einführung von Mutationen das Stoppcodon revertiert wird, kann die YFP-Expression mittels FACS detektiert werden. In Abbildung 14C ist zu erkennen, dass in den Zellen mit AID-Überexpression die Anzahl an Revertanten höher ist als in Zellen, die lediglich den NGF-Rezeptor exprimieren. In diesem Versuchsverlauf war es leider nicht möglich die Kopienzahl des Hypermutationsreporters verlässlich zu ermitteln, da die AID-Expression die Vitalität der Zellen stark negativ beeinflusst. Der Effekt von AID auf die Zahl der Reversionsereignisse konnte aber in drei unabhängigen Experimenten beobachtet werden. Die Überexpression von AID-Protein verstärkt nicht nur den Hypermutationsphänotyp in

Raji-Zellen sondern erhöht auch die Rekombinationsaktivität sowohl in Raji- als auch BJAB-Zellen. Da Rekombination mechanistisch auf DNA-Brüche angewiesen ist, erhöht AID wahrscheinlich die Anzahl der Brüche in der DNA.

2.6 Untersuchungen zur Mutationseinführung während des Rekombinationsprozesses

AID ist ein Schlüsselenzym der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels. Es führt durch die Deaminierung von Cytosin Urazil in die DNA ein. Das Urazil ist dann Ausgangspunkt für mehrere Prozesse, die zur Mutationseinführung im Falle von somatischer Hypermutation und auch zu DNA-Doppelstrangbrüchen besonders im Falle von

Methode	Enhancer	Status	Sequenzen	Punktmutationen
	+	repariert	10	3
PCR-Analyse	+	unrepariert	10	0
	-	repariert	10	(1)
	+	repariert	17	0
	+	unrepariert	5	0
reisoliert	-	repariert	12	2
	+	GFP-Kontrolle	8	0
	_	GEP-Kontrolle	8	0

Tab. 2: Mutationsanalyse der Rekombinationskassette aus Raji-Zellen

Klassenwechsel führen können. An diesen Prozessen sind die Reparaturmechanismen der Zelle beteiligt. Nun konnte in den vorhergegangenen Experimenten ein Zusammenhang zwischen von AID eingeführten Brüchen und der homologen Rekombination hergestellt werden. Möglicherweise könnte homologe Rekombination ein Reaktionsweg der somatischen Hypermutation sein und die Einführung von Mutation ermöglichen. Eine Untersuchung der Rekombinationsereignisse auf Mutationen könnte Aufschluss darüber bringen, ob es sich bei Hypermutation und Rekombination um zusammenhängende oder aber um parallele Prozesse handelt. Für diese Analyse wurde die Zelllinie Raji gewählt, da sie endogenes AID-Protein exprimiert und konstitutive Hypermutation aufweist.

Zunächst wurden GFP-positive Zellen sortiert, die aus Transfektionen mit dem Rekombinationsreporter, der einmal mit und einmal ohne IgH-Enhancer versehen war, stammten. Da die somatische Hypermutation abhängig vom Vorhandensein von Enhancern ist, sollte ein Vergleich zwischen den Reportern mit und ohne Enhancer einen Unterschied in der Zahl der Mutationen ergeben, wenn ein mechanistischer Zusammenhang zwischen Rekombination und somatischer Hypermutation besteht. Außerdem wurden reparierte und nicht reparierte Sequenzen aus der selben Transfektion verglichen, deren Status mittels Restriktionsanalyse analysiert wurde. Durch die Insertion in das Akzeptor GFP-Gen ist eine Bst1107I Restriktionsstelle zerstört worden, die im Donor GFP-Gen noch vorhanden ist, und gleichzeitig ist ein neue Schnittstelle für das Enzym BgIII eingeführt worden. So stellen Sequenzen, die sensitiv gegenüber Bst1107I sind, ein repariertes funktionelles GFP-Gen dar (Abb.16A).

Mit der DNA aus den GFP-positiven Zellen wurde eine PCR mit der akkurat replizierenden Pfu-Polymerase durchgeführt, die das erste GFP-Gen des Reporters amplifiziert. Die PCR-

Produkte wurden in den pGEM-T-Vektor ligiert und in Bakterien eingebracht und vereinzelt. Die aus den Bakterienkolonien gewonnenen GFP-Sequenzen wurden nach repariert oder nicht repariert unterschieden.

Jeweils zehn reparierte und nicht reparierte Produkte aus diesem Ansatz wurden sequenziert (Tab.2). Es konnten drei verschiedene Punktmutationen in den reparierten Sequenzen aus den Zellen, die mit dem Reporter mit Enhancer transfiziert wurden, detektiert werden. Dabei handelte es sich um stille Mutationen. In den unreparierten Produkten wurden keine Mutationen gefunden. Bei den Sequenzen aus dem Reporter ohne Enhancer stellte sich heraus, dass die selbe Sequenz mehrfach auftrat, da in vier der zehn sequenzierten PCR-Produkten die gleiche Mutation zu finden war. Einschränkend ist zusätzlich zu erwähnen, dass bei den in der PCR-Analyse gefundenen Mutationen nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass es sich dabei um von der PCR Reaktion eingeführte Mutationen handelt.

Um also PCR-Artefakte auszuschließen, wurde in einem alternativen Ansatz der Reporter mittels "plasmid rescue" wieder aus den Zellen reisoliert. Auch hier mussten zuerst die reparierten GFP-Gene von den nicht reparierten mit Hilfe der Restriktionsanalyse mit Bst1107I und BglII unterschieden werden. Für den Reporter mit Enhancer wurden 17 Plasmide mit repariertem GFP-Gen und 5 Plasmide mit nicht repariertem sequenziert und für den Reporter ohne Enhancer 12 Sequenzen analysiert. Zusätzlich wurden auch je 8 Plasmide einer GFP-Kontrolle mit und ohne Enhancer sequenziert. Bei der Kontrolle handelt es sich um das funktionelle GFP-Gen, aus dem die jeweils nicht funktionellen GFP-Komponenten der Rekombinationskassette hervorgegangen sind. In den Sequenzen dieser Kontrollen konnten keine Mutationen gefunden werden. Entgegen der Erwartung nach der Analyse der PCR-Produkte konnte auch in den 17 reparierten Sequenzen des Enhancer Konstrukts keine Mutationen beobachtetet werden. Dagegen zeigten sich zwei Punktmutationen in den Sequenzen des Konstrukts ohne Enhancer (Tab.2).

Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Mutationseinführung während der Rekombination und dem Prozess der somatischen Hypermutation besteht in Raji-Zellen also nicht. Da Mutationen in sowohl Enhancer tragenden als auch enhancerfreien Konstrukten gefunden werden konnten, scheint eine physiologisch regulierte Mutationseinführung, die sich auf somatische Hypermutation stützt, nicht vorzuliegen. Rekombination und Hypermutation sind also eher in parallel ablaufende Prozesswege einzuordnen, die allerdings beide durch AID induziert werden. So ergibt sich die Frage um welche Rekombinationsprozesse es sich dabei handelt.

2.7 Präferentielle Nutzung der nicht konservativen Rekombination in B-Zellen

2.7.1 PCR-Analyse der Rekombinationskassette in GFP-positiven Zellen

Die homologe Rekombination unterteilt sich in mindestens vier Reparaturwege, die auf Grund ihrer Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt sind. Man unterscheidet konservative und nicht konservative Rekombination. Wendet man diese Reparaturmechanismen auf den Rekombinationsreporter an, ergeben sich zwei mögliche Produkte (Abb.16A). Bei dem Produkt der konservativen Rekombination bleibt die Rekombinationskassette in ihrer Form erhalten und nur ein Sequenzaustausch im Bereich der Insertion findet statt (Abb.16A). Die nicht konservative Rekombination erzeugt ein Deletions-Produkt, in dem der Bereich zwischen den beiden GFP-Genen nicht mehr vorhanden ist. Um nun die Rekombinationsprodukte zu analysieren, wurden zuerst die GFP-positiven Zellen sortiert. Dies geschah in der Regel etwa 60 bis 70 Tage nach der Transfektion.

Die Nutzung von verschiedenen PCR-Primer-Paarungen ermöglichte eine Unterscheidung der zwei möglichen Rekombinationsprodukte (Abb.16A). Die Primer-Paarung (PCR1), bei der die Primer am 5' und am 3' Ende des GFP-Gens lokalisiert sind, zeigt die gesamte Reparatur, also beide möglichen Produkte. Bei der zweiten Primer-Paarung (PCR2) ist der zweite Primer in der Sequenz zwischen dem Akzeptor- und dem Donor-GFP-Gen lokalisiert. So werden lediglich Produkte der konservativen Rekombination amplifiziert. Da diese Primer-Paarungen auch nicht reparierte GFP-Gene amplifizieren, ist eine zusätzlich Restriktionsanalyse mit Bst1107I nötig, wie schon bei der Mutationsanalyse beschrieben, um die reparierten von den nicht reparierten Sequenzen zu unterscheiden.

Es wurden GFP-positive Zellen der Transfektionen mit dem Rekombinationsreporter von Raji, BJAB, DG75 und 721 sortiert. Für die sortierten Zellen wurde die PCR-Reaktion mit den beiden PCR-Primer-Paarungen durchgeführt und mit den Restriktionsenzymen behandelt. Zum Nachweis auch geringer Mengen an Restriktionsfragmenten wurden diese auf Nitrocellulose transferiert und mit einer radioaktiven GFP-Sonde detektiert.



Abb. 16: Analyse der Rekombinationprodukte mittels PCR und Restriktion

Schematische Darstellung der möglichen Rekombinationsprodukte und der PCR-Restriktions-Strategie zur Unterscheidung der Produkte, die entweder auf konservative (linkes Produkt) oder auf nicht konservative Rekombination (rechtes Produkt) zurückzuführen sind. PCR1 weist beide möglichen Rekombinationsprodukte und nicht reparierte GFP-Gene nach und ergibt ein etwa 720bp großes Produkt. PCR2 weist nur das Produkt nach, bei dem die Rekombinationskassette als solche erhalten geblieben ist, und auch nicht reparierte GFP-Gene. PCR2 liefert ein etwa 770bp großes Produkt. Zur Unterscheidung der reparierten und nicht reparierten GFP-Gene dienen Restriktionsschnittstellen. Eine BglII-Schnittstelle befindet sich in der Insertion, die das Akzeptor-GFP-Gen deaktiviert hat. Diese Schnittstelle wird durch Rekombination durch eine Bst1107I-Schnittstelle ersetzt, die sich im Donor-GFP-Gen befindet. Die durch Restriktion entstehenden Fragmentgrößen sind etwa 450bp und 270bp im Falle von PCR1 und 450bp und 320bp im Falle von PCR2. Bst1107I sensitive PCR-Produkte, d.h. das Erscheinen der kleineren Fragmente bei einer Restriktion mit Bst1107I, sind indikativ für stattgefundene Reparatur. B) Southern-Blot-Analyse. Oben: Analyse der Rekombinationsprodukte aus zwei unabhängigen Transfektion mit Raji, DG75 und 721 mit PCR1 und PCR2. Restriktionsanalyse der PCR-Produkte mit BglII für nicht reparierte und Bst1107I für reparierte GFP-Gene. Unten: Analyse des Reporters mit PCR1 und PCR2 aus zwei unabhängigen Transfektionen mit Raji und einer Transfektion mit BJAB und Restriktion mit Bst1107I.

In Abbildung 16B ist das Ergebnis für zwei unabhängige Raji-Proben, DG75 und 721 zu sehen. Die Restriktionsanalysen mit den Restriktionsenzymen Bst1107I und BglII für die erste PCR zeigen, dass es sich wirklich um reparierte GFP-Gene handelt. Dass der Großteil der PCR- Produkte Bst1107I sensitiv ist, bedeutet, dass die Sortierung sehr rein war und nur noch eine Kopienzahl von ein bis zwei Kopien pro Zelle vorlag.

Die selbe Analyse für die zweite PCR-Primer-Paarung ergab überraschenderweise, dass die Reparatur des GFP-Genes praktisch nicht über konservative Rekombination geschehen ist, da keine Bst1107I-sensitive PCR-Produkte nachgewiesen werden konnten (Abb.16B). Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch in der Analyse von sortierten BJAB-Zellen (Abb16B).

Nur im Falle von DG75 lassen sich bei der PCR-Primer-Paarung für konservative Rekombination signifikant Fragmente auf der Höhe der restriktionssensitiven PCR-Produkte erkennen. Dies bedeutet, dass alle Zelllinien Brüche hauptsächlich über den nicht konservativen Rekombinationsweg reparierten und nur DG75 detektierbar auch zu einem geringen Teil konservative Rekombination durchführt.

2.7.2 Analyse von reisolierten Reporterplasmiden

Um zu verifizieren, dass vorwiegend Produkte der nicht konservativen Rekombination entstanden sind, wurde aus den expandierten GFP-positiven sortierten Zellen der Linien Raji, 721, DG75 und BJAB der transfizierte Reporter wieder reisoliert. Dazu wurden Hirt-Extrakte hergestellt und die wiedergewonnenen Plasmide in Bakterien transformiert.

Die Restriktionsanalyse einzelner Plasmide ergab, dass hauptsächlich eine perfekte Fusion der GFP-Gene und damit eine Deletion der Sequenz dazwischen stattgefunden hat, wie es anhand der vorherigen PCR-Analyse und der Theorien zum Rekombinationsmechanismus zu erwarten war (Abb.17A). In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Plasmid-Reisolierung zusammengefasst. Nur bei einem einzigen aus der Zelllinie 721 reisolierten Plasmid konnte ein Produkt der konservativen Rekombination identifiziert werden (Abb.17B). Dass ein solches Plasmid nicht aus der Linie DG75 isoliert werden konnte, liegt wahrscheinlich an der geringen Zahl an Plasmiden die überhaupt aus dieser Linie gewonnen werden konnten.

Die Analyse der reisolierten Plasmide zeugt von einem weitgehend fehlerfreien Ablauf der Rekombination, da kaum Plasmide detektiert werden konnten, die nicht eines der erwarteten Fragmentmuster lieferten.



Abb. 17: Restriktionsanalyse der reisolierten Reporter

Analyse der reisolierten Reporter mittels Restriktion und Agarosegelelektrophorese. A) Reisolierte Reporter aus Raji (oben) und 721 (unten) wurden durch eine Restriktion mit EcoRI analysiert. Die Pfeile markieren das Fragment, das spezifisch für das Deletionsprodukt sind. Erwartete Fragmente: unrepariert/konservativ: 5670, 2632, 2629, 2107, 1538, 1055, 736; Deletion: 5670, 2629, 2107, 1538, 1055, **852**, 736. B) Restriktionsanalyse der reisolierten Reporter aus 721 mit EcoRV und Bst1107I. Die Pfeile markieren das Fragment, das spezifisch für das Deletionsprodukt ist. Der Stern markiert das charakeristische Fragment für das Produkt der konservativen Rekombination. Erwartete Fragmente: unrepariert: 6303, 3864, **3700**, 2225, **311**; Deletion: 6303, 3864, 2225, **1920**, **311**; konservativ (Genkonversion): 6303, 3864, 2225, **1920**, **1767**, 311. Da die Restriktion mit EcoRI unrepariert und konservative Rekombination nicht unterscheidet, wurde für diese Proben auch die Restriktion mit EcoRV und Bst1107I durchgeführt.

Zelllinie	Kolonien	analysiert	repariert	Deletions-	unrepariert	Verun-
				produkt		reinigung
Raji	45	24	18	18	5	1
Raji	77	11	8	8	1	2
BJAB	800	12	3	3	1	8
DG75	8	8	7	7	0	1
721	500	20	18	17	2	0

Tab. 3: Analyse der reisolierten Reporter



Abb. 18: Analyse der Expression der Rekombinationsprodukte mittels FACS

FACS-Analyse der Expression der beiden möglichen Rekombinationsprodukte am Beispiel von Raji und DG75. GC: Produkt der konservativen Rekombination; del: Deletionsprodukt.

Zelllinie	Deletionsprodukt	Konservatives Produkt		
Raji	1791	1265		
	1464	557		
	221	258		
DG75	1184	1192		
	999	1338		

Tab. 4: Mittlere Fluoreszenzintensität der Rekombinationsprodukte

2.8 Vergleich der Expressionsstärke der Rekombinationsprodukte

Um sicher zu stellen, dass die präferentielle Detektion von nicht konservativen Rekombinationsprodukten nicht auf einen Expressionsstärkenunterschied zurückzuführen ist, wurden sowohl das Deletions- als auch das konservative Produkt in die Zelllinien transfiziert.

Bei den transfizierten Plasmiden handelt es sich um zwei aus 721 reisolierte Plasmide (8 und 9; Abb.17B). Der Expressionsvergleich der beiden Produkte in den Zelllinien Raji und DG75 zeigt, dass die beiden entstandenen Konstrukte gleich stark exprimiert werden (Abb.18). Die durchschnittlichen Fluoreszensintensitäten sind in Tabelle 4 aufgelistet und lassen trotz einiger Variabilität den Schluss zu, dass das konservative Produkt gegenüber dem Deletionsprodukt kein Expressionsnachteil hat, der zu einer präferentiellen Detektion des Deletionsproduktes führen würde.



Abb. 19: Analyse der Rekombinationsereignisse von ins Genom integrierten Reportern Southern-Blot-Analyse der PCR- und Restriktionsanalyse der Rekombinationsprodukte von ins Genom integrierten Reporterkassetten. Gezeigt sind je drei Subklone von Raji mit integrierten oder episomalen Reportern und je ein Subklon mit integriertem Reporter für BJAB und DG75. Die Analyse der Rekombinationsereignisse entspricht der in Abbildung 16 gezeigten und beschriebenen Strategie.

2.9 Produkte der nicht konservativen Rekombination bei ins Genom integrierten Rekombinationsreportern

Bei der Analyse der Rekombinationsprodukte hatte sich gezeigt, dass in allen untersuchten Zelllinien fast ausschließlich die Brüche über nicht konservative Rekombination repariert werden. Dass dieses Phänomen nicht nur mit dem extrachromosomalen Status des Reporters zusammenhängt, sollte mittels ins Genom integrierter Rekombinationskassetten untersucht werden. Es wurden Einzelzellklone der Zelllinien Raji, BJAB und DG75 hergestellt, die die Rekombinationskassette fast ausschließlich im Genom tragen sollten, da ein linearisierter Vektor, dem das EBNA1-Gen fehlt, transfiziert wurde. Klone, in denen Rekombinanten detektiert werden konnten und die eine Kopienzahl zwischen vier und sieben Reportern aufwiesen, wurden expandiert und GFP-positive Zellen sortiert. Die GFP-positiven Zellen wurden mit der unter 2.7.1 erläuterten PCR-Strategie analysiert.

In Abbildung 19 ist der Southern Blot für die PCR-Restriktionsanalyse von je drei Raji Klonen, die entweder den Reporter integriert oder episomal tragen, und je einem Klon von DG75 und BJAB mit integrierter Rekombinationskassette gezeigt. Auch mit dem ins Genom integrierten Reporter zeigte sich in allen untersuchten Linien eine präferentielle Reparatur des GFP-Genes mittels nicht konservativer Rekombination. Die fast ausschließlich von den Zellen genutzte nicht konservative Rekombination ist also nicht auf die technische Anwendung des Reporters als episomale DNA-Struktur zurückzuführen, sondern muss funktionelle Ursachen haben.

2.10 Niedrige Aktivität der konservativen Rekombination in B-Zellen

Die PCR-Analyse der Rekombinationsprodukte birgt einige Nachteile, die dieses Verfahren nur schwer quantifizierbar für die geringe Frequenz der konservativen Rekombination machen. Für diese Methode müssen die GFP-positiven Zellen sortiert werden und die Ausbeute ist für die verschiedenen Zelllinien auf Grund der Rekombinationsaktivität sehr unterschiedlich. Für die weitere Analyse müssen die sortierten Zellen expandiert werden, was zu einer weiteren Verlust von rekombinierten Plasmiden führen kann. So könnten sich auch Präferenzen zur Reparaturwegnutzung abzeichnen, die nur auf das Herauswachsen eines bestimmten Produktes zurückzuführen sind. Das System der PCR-Analyse ist für die quantitative Detektion der konservativen Rekombination kaum sensitiv genug. Deshalb wurde der Rekombinationsreporter so verändert, dass nur noch konservative Rekombination detektiert werden kann. Dazu wurde das 3' Ende des Donor-GFP-Genes deletiert. Mit dieser Veränderung ist im Falle von nicht konservativer Rekombination das resultierende Produkt, das Deletionsprodukt also, nicht funktionell (Abb.20A und Daten nicht gezeigt). Lediglich wenn ein Sequenztransfer im Bereich der Insertion im Akzeptor stattfindet und die Rekombinationskassette erhalten bleibt, wird das Akzeptor-GFP-Gen exprimiert.

Sowohl der in den vorangegangenen Experimenten verwendete Reporter für die gesamte Rekombinationsaktivität als auch der neue Reporter für die konservative Rekombination wurden in die bisher schon verwendeten Zelllinien transfiziert und die Anzahl der GFPpositiven Zellen in den jeweiligen Transfektionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Selektion bestimmt und verglichen (Tab.5 und 6). Hier zeigt sich wiederum deutlich, dass die Frequenz der GFP-positiven Zellen in der Transfektion mit dem Reporter für konservative Rekombination (Abb.20B, obere Reihe) weit niedriger ist als die Frequenz der GFP-positiven Zellen in der Transfektion mit dem Reporter für konservative Rekombination (Abb.20B, obere Reihe) weit niedriger ist als die Frequenz der GFP-positiven Zellen in der Transfektion mit dem Reporter, der alle Rekombinationswege detektiert (Abb.20B, untere Reihe). Auffällig ist auch hier wieder, dass für DG75 der prozentuale Anteil der konservativen Rekombination an der Gesamtrekombination höher liegt (3-5%, Tab.5) als der der anderen Zelllinien (1%, Tab.5). Dies bestätigt das Ergebnis aus der Untersuchung der Rekombinationsprodukte. Außerdem erklären die in 721 detektierten GFP-positiven Zellen bei der Transfektion mit dem konservativen Reporter, dass ein solches Produkt bei der Reisolierung gefunden werden konnte, obwohl in der PCR-Analyse keine konservative Rekombination nachgewiesen werden konnte.

Für eine korrekte Auswertung war es allerdings nötig, die Zahl an Rekombinanten auf die in den Zellen befindliche Kopienzahl der Reporter umzurechnen. Mit dieser Umrechnung auf

Α



Abb. 20: Vergleich der Aktivität von konservativer und nicht konservativer Rekombination A) Schematische Darstellung der Reporter für die gesamte Rekombination und der konservativen Rekombination und deren Produkte. B) FACS-Analyse der Transfektionen von Raji, BJAB, 721 und DG75 mit dem Reporter der gesamten Rekombination und dem Reporter der konservativen Rekombination nach 4 Wochen.

die Kopienzahl zeigte sich, dass der Prozentanteil der konservativen Rekombination in DG75 noch höher lag, nämlich bei etwa 30 % (Tab.6). Dies begründet sich darin, dass weniger Kopien im Falle des konservativen Reporters in DG75 vorlagen, während in den anderen Zelllinien die Kopienzahl der beiden Reporter etwa gleich war (Tab.15, Methodenteil). Bringt man dieses Ergebnis in den Zusammenhang mit den Proteinexpressionsanalysen für diese Zelllinien, so ist auffällig, dass sich DG75 durch eine besonders hohe Rad51-Expression auszeichnet.

Zelllinie	Rekombinanten	Rekombinanten	%	
	Reporter 1	Reporter 2		
Raji	1953	31	1,1	
	3548	39	1,1	
	2927	33	1,6	
BJAB	1062	15	1,4	
	1913	6	0,3	
DG75	1954	102	5,2	
	2888	69	2,4	
	2461	110	4,5	
721	833	9	1,0	
	1111	12	1,0	

Tab. 5: Anzahl der Rekombinaten für beide Reporter der Rekombination

Reporter 1: Reporter der gesamten Rekombination

Reporter 2: Reporter für konservative Rekombination

%: Anteil der konservativen Rekombination an der gesamten Rekombination

Tab. 6 Anzahl der Rekombinaten pro Reporterkopie für beide Reporter der Rekombination

Zelllinie	R1	R2	%	R1/V	R2/V	%
Raji	3211	9	0,3	6833	18	0,3
	4925	6	0,1	10478	13	0,1
	3063	19	0,6	6517	39	0,6
BJAB	1532	16	1,0	4940	52	1,0
	1600	25	1,6	5161	80	1,6
	1922	16	0,8	6201	51	0,8
DG75	2435	236	9,7	3006	1178	39,2
	910	45	5,0	1124	227	20,2
	955	67	7,0	1179	334	28,3
721	131	4	3,4	1633	55	3,4
	249	1	0,6	3117	18	0,6
	188	1	0,5	2352	12	0,5

R1: Anzahl der Rekombinanten, detektiert in Linien, die mit dem Reporter der gesamten Rekombination transfiziert wurden

R2: Anzahl der Rekombinanten, detektiert in Linien, die mit dem Reporter für konservative Rekombination transfiziert wurden

/V: Anzahl der Rekombinationsereignisse umgerechnet auf die Kopienanzahl der Reporter

%: Anteil der konservativen Rekombination an der gesamten Rekombination

Rad51 ist am Strangaustausch im Rekombinationsprozess beteiligt, also einer sehr frühen Phase dieses Prozesses. In den vorherigen Experimenten konnte eine präferentielle Nutzung der nicht konservativen Rekombination zur Reparatur der Brüche festgestellt werden. Allerdings zeigte sich für die Zelllinie DG75 ein signifikanter Anteil von konservativer Rekombination. Eben in dieser Zelllinie konnte eine hohe Rad51-Expression detektiert werden. Dies wirft die Frage auf, ob Rad51 an der Entscheidung für den konservativen Rekombinationsweg beteiligt ist.

Um dies zu klären wurde Rad51 in Raji, DG75 und BJAB Zellen überexprimiert. Da sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, dass eine massive Überexpression von Rad51 tödlich für die Zellen ist, wurde der Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare Expressionsvektor benutzt, der es erlaubt durch die Titration der Induktormenge deutlich geringere Mengen von Rad51 zu exprimieren. Der Rad51-Expressionsvektor oder ein Kontrollvektor mit dem NGF-Rezeptor wurden parallel mit dem Rekombinationsreporter in die Zellen transfiziert und Doxycyclin zugesetzt.

Da die genaue Expressionsmenge auch von der Kopienzahl des Expressionsvektors in den Zellen abhängig ist, konnte in diesem Experiment zunächst nur im Falle von Raji eine Induktion der Rad51-Expression erreicht werden, die im Western Blot sichtbar war (Abb.21B) und das Überleben der Zellen nicht beeinflusst hat. In diesem konkreten Fall wurde mit 1ng/ml Doxycyclin induziert. In DG75-Zellen war das Tet-System für diese Analyse nicht anwendbar, da auch ohne Zugabe von Doxycyclin eine massive Expression von Rad51 vorlag, die ein Sterben der Zellen zur Folge hatte.

Nach der Bestimmung der Kopienzahl des Reporters in den beiden Transfektion von Raji-Zellen ist zu erkennen, dass bereits eine leichte Überexpression von Rad51 die Frequenz der Rekombination deutlich erhöht (Abb.21A und Tab.14, Methodenteil).

Da die Induktion der Rad51-Expression nicht von Beginn des Experiments an stattgefunden hatte, war eine längere Kultivierungsphase nötig, um Zeit für eine Ausbildung von Unterschieden in der Rekombinationsaktivität in den transfizierten Zellen zu lassen. Die lange Kultivierung der Zellen hat zum Abfallen der Kurve für die Kontrolle mit dem NGF-Rezeptor beigetragen. Dies ist eine Problematik, die in den bisherigen Experimenten vermieden werden konnte. Dennoch konnte durch die erhöhte Expression von Rad51 ein deutlicher Effekt auf die Rekombinationsaktivität auch nach über einem Monat der Kultivierung erzielt werden.





A) Rekombinationsaktivität der B-Zelllinien Raji mit entweder Rad51-Überexpression oder NGF-Rezeptor-Expression. Gezeigt ist die Anzahl der Rekombinationsereignisse pro 10⁶ Kopien des Reporters gemessen über die Dauer von 50 Tagen. Transfizierte Plasmide: pAK37, pAK24 und pAK41. B) Western-Blot-Analyse der Expression von Rad51 in den Raji-Zellen aus dem Experiment, das in A gezeigt ist.

Eine vorläufige Analyse der Rekombinationsprodukte aus sortierten GFP-positiven Zellen dieser Transfektionen wurde mit Hilfe der PCR-Strategie durchgeführt, die nur beschränkte Sensitivität für konservative Rekombination aufweist. Darin konnte bisher keine signifikante Änderung der Nutzung der konservativen Rekombination detektiert werden.

3 Diskussion

3.1 Expression von Doppelstrangbruchreparaturfaktoren in B-Zellen

Um die Regulation von Faktoren der DNA-Doppelstrangbruchreparatur in B-Zellen nachzuvollziehen, wurden mRNA-Mengen und auch Proteinmengen einiger wichtiger Faktoren in verschiedenen B-Zell-Subtypen und Zelllinien bestimmt.

der mRNA-Expression DNA-Ein Vergleich von Reparaturgenen der Doppelstrangbruchreparatur in naiven B-Zellen und aktivierten Keimzentrums-B-Zellen zeigte, dass in den aktivierten B-Zellen eine höhere Expression vorlag. Der Effekt war für die Faktoren der homologen Rekombination stärker als für die der Endverknüpfung. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte eine proliferationsgekoppelte Regulation sein, da aktivierte B-Zellen sich schnell teilen. Die Reparaturfaktoren werden während des Zellzyklus besonders benötigt, da hier zum Beispiel durch Replikation Brüche entstehen können. Eine von Proliferation abhängige Induktion der Reparaturgene konnte anhand der Zelllinie P493-6 gezeigt werden, deren Proliferation über ein Tetracyclin-induzierbares cmyc-Gen reguliert wurde. Die Reparaturgene sind allerdings keine direkten c-Myc-Zielgene, da die Induktion ihrer Expression erst nach 24 Stunden ein Maximum erreichte. Direkte Zielgene von c-Myc zeigen dagegen schon nach vier bis acht Stunden eine maximale Expression. Dies bedeutet, dass die Regulation der Reparaturgene allgemein an den Zellzyklus gekoppelt ist. Obwohl keine detailierten Expressionsdaten vorliegen, ist bekannt, dass die Reparaturfaktoren eng mit den Zellzyklus-Kontrollpunkten und dem NFkB-Signalweg verknüpft sind (Canman and Lim, 1998).

Es besteht die Möglichkeit, dass die Induktion der Expression der Reparaturgene in den aktivierten B-Zellen neben Proliferation auch auf die Aktivität der Keimzentrumsprozesse in diesen Zellen zurückzuführen ist. So konnte in B-Zellen beobachtet werden, dass eine Inhibition des Klassenwechsels mit einer Reduktion der NFkB-Aktivität und einer reduzierten Expression der Reparaturfaktoren der nicht homologen Endverknüpfung einherging (Cerutti et al., 2000). Ein Unterschied in den mRNA-Mengen zwischen aktivierten und Keimzentrums-B-Zellen ließ sich für Rad51 auch mittels Microarray beobachten (Alizadeh et al., 2000).

Bei der Untersuchung von Zelllinien, die verschiedenen B-Zell-Populationen ähneln, zeichneten sich zwar Unterschiede in den mRNA-Mengen für die Gene der Doppelstrangbruchreparatur ab. Auf Proteinebene ergaben sich jedoch keine Unterschiede in 49

den Proteinmengen für Ku70 und Ku80. Auch eine differentielle Lokalisation von Ku80 konnte nicht beobachtet werden. Dies deutet möglicherweise auf eine posttranskriptionelle Regulation von Ku70 und Ku80 hin, der man allerdings noch detailierter nachgehen müsste.

Möglicherweise reflektieren die detektierten Proteinmengen genau die Menge an NHEJ-Reparaturfaktoren, die eine durchschnittlich proliferierende Zellpopulation benötigt. Die Endverknüpfung gilt als am Klassenwechsel beteiligter Mechanismus, was auch die Expressionsdaten für die primären B-Zellproben erklären würde (Manis et al., 2002; Rolink et al., 1996). Allerdings zeigen die hier verwendeten Zelllinien, obwohl sie Keimzentrumsmarker aufweisen, keine Aktivität der Klassenwechselrekombination. Dies könnte erklären, dass keine Expressionsunterschiede der NHEJ-Reparaturfaktoren auf Proteinebene zwischen den Zelllinien zu finden waren, die Keimzentrum-B-Zellen und aktivierten oder naiven B-Zellen ähneln. Zudem ist offenbar ein direkter Schluss von mRNA-Mengen auf Proteinmengen bei den Faktoren der Endverknüpfung nicht zulässig, so dass ein Vergleich zwischen den mRNA-Daten aus den primären B-Zellen mit denen der Zelllinien erschwert wird.

Interessanterweise konnten deutliche Unterschiede in den Proteinmengen des Rekombinationsfaktors Rad51 in den Linien nachgewiesen werden. Diese Unterschiede korrelieren allerdings nicht mit den bisher gemessenen mRNA-Mengen in den Zelllinien. Vielleicht ist auch für die Faktoren der homologen Rekombination eine posttranskriptionelle Regulation aktiv in den Zellen. Dies ist ein interessantes Ergebnis, da es auch Hinweise auf eine komplexe Expressionsregulation von Rad51 in der Hefe gibt. Hier ist bekannt, dass die Aktivität der homologen Rekombination zu einer verstärkten Expression von Rad51 führt. In Hefe-Zellen, die defizient für andere Faktoren der Rekombination sind (Rad50, Rad52, Rad54) und deshalb keine Rekombination mehr durchführen können, war eine Induktion von Rad51-mRNA nicht mehr zu beobachten (Cohen et al., 2002). Für eine definitive Aussage über diese Regulation müssten die mRNA-Mengen allerdings noch weitergehend untersucht werden.

Es zeigte sich, dass die Linie DG75 die größte Menge Rad51-Protein verglichen mit den anderen Linien exprimierte. Die Burkitt-Lymphom-Zelllinie DG75 ist bekannt für ihre gute Verwendbarkeit für gezielte Genmanipulationen (Maier et al., 2005). Diese Methode bedient sich des zellulären Prozesses der konservativen homologen Rekombination. Dies impliziert einen möglichen Zusammenhang zwischen Rad51-Proteinmengen und einer Aktivität des konservativen Rekombinationsweges. Bei der Interpretation der Daten ist allerdings auch zu berücksichtigen, dass es sich bei den Zelllinien um aus Lymphomen isolierte Tumorzellen handelt. So könnten die Expressionsunterschiede zwischen den Linien und die Diskrepanz zwischen der mRNA-Menge und den Proteinmengen auch den Auswirkungen der transformierenden Ereignisse in den Zellen zuzuschreiben sein. Expressionsunterschiede, die sogar jeweils ein definiertes Expressionsprofil ergaben, konnten in der Anwendung des Lymphochips von L. Staudt für verschiedene Lymphomtypen beobachtet werden (Alizadeh et al., 2000). So könnten auch die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede zwischen der geringen mRNA- und der vergleichsweise hohen Proteinmenge für Rad51 in DG75 auf eine lymphomspezifische Veränderung, wie zum Beispiel Mutationen im Rad51-Gen, zurückzuführen sein, die eine Stabilisierung des Proteins verursachen könnten. Aufschluss darüber könnte zum Einen eine Analyse des Rad51-Locus geben und zum Anderen ließe sich die Stabilität des Proteins mit Hilfe eines Experiments mit Cycloheximid, das die Proteinbiosynthese hemmt, testen.

Die mRNA-Expressionsanalysen zeigten also Unterschiede in der Expressionsstärke von Faktoren der Doppelstrangbruchreparatur zwischen naiven und Keimzentrums-B-Zellen, die nur zum Teil auf eine proliferationsgekoppelte Induktion zurückzuführen sind. In phänotypisch ähnlichen, konstitutiv proliferierenden B-Zelllinien waren die Proteinmengen für die Faktoren der nicht homologen Endverknüpfung gleich. Interessanterweise konnte für den Rekombinationsfaktor Rad51 eine differentielle Proteinexpression beobachtet werden.

3.2 Rekombination, somatische Hypermutation und AID

Die erstmalige Anwendung eines Reportersystems in B-Zellen, das die funktionelle Aktivität der homologen Rekombination nachweist, ermöglicht einen direkten Einblick in die Regulation der Reparaturmechanismen in B-Zellen, die auf Grund der Keimzentrumsreaktion auf genetisch verändernde Prozesse reagieren müssen.

Für eine Analyse der Rekombinationsaktivität wurde ein Reporter verwendet, der auf einer Rekombinationskassette basiert, die aus zwei nicht funktionellen GFP-Genen besteht (Drexler et al., 2004a; Drexler et al., 2004b). Dieser Aufbau aus zwei Genen, von denen je eines als homologe Sequenz für die Reparatur des anderen mittels Rekombination dient, ist eine gängige Strategie bei Rekombinationsreportern. In dieser Konstellation kann lediglich eine homologievermittelte Reparatur das eine GFP-Gen wiederherstellen, wie mittels eines Reporterkonstrukts, bei dem der Sequenzdonor deletiert worden ist, gezeigt werden konnte.

Da der hier verwendete Reporter auf dem GFP-Gen basiert, war es möglich die Rekombinationsereignisse mittels Fluoreszenzanalyse zu detektieren. Vorraussetzung für eine solche Anwendung war allerdings eine ausreichende Expressionsstärke des Reporters in den relevanten Zelltypen. Zudem ist es für die Nutzung dieses Reporters nötig, dass für Langzeitexperimente transformier- und selektierbare Zelllinien verwendet werden. Ein längerer Verlauf der Experimente war in unserem Fall erwünscht, da der Reporter auf spontane Brüche in den Zellen angewiesen ist und auf eine Akkumulation der GFP-positiven Zellen geachtet wurde, die als Indikator für konstitutive Rekombinationsaktivität diente. Deshalb wurden für die Bestimmung der Rekombinationsaktivität B-Zelllinien ausgewählt, die gut transfizierbar waren. Da untersucht werden sollte, wie B-Zellen auf die bruchinduzierenden Prozesse im Keimzentrum reagieren, war ein anderes Kriterium für die

Darum wurden für die Analyse Keimzentrums-B-Zell-ähnliche Lymphomzelllinien und EBVimmortalizierte lymphoblastoide Zelllinien verwendet, die ruhenden oder aktivierten B-Zellen ähneln. Die Lymphomlinien unterscheiden sich im EBV-Status, in der *c-myc*-Translokation und in der Hypermutationsaktivität.

Auswahl der Zelllinien, dass sie phänotypisch bestimmten B-Zell-Populationen ähneln.

Bei der Bestimmung der Rekombinationsaktivität in diesen Zelllinien zeigte sich, dass einigen Linien Hyperrekombinationsaktivität aufwiesen, während andere Linien durchschnittliche oder fast gar keine Rekombinationsaktivität zeigten. Interessanterweise handelte es sich bei den beiden Linien mit der starken Aktivität um die Lymphomzelllinien, die Keimzentrums-B-Zellen ähneln. Wegen der Keimzentrums-Prozesse und der erhöhten Expression von Reparaturgenen in Keimzentrumszellen war die erhöhte Aktivität eines Reparaturweges in diesen Linien besonders bezeichnend.

Die erhöhte Rekombinationsaktivität spiegelt zwei Elemente wider: die Anzahl der Brüche und die Neigung der Zellen Brüche mittels homologer Rekombination zu reparieren. Neben den Keimzentrumsprozessen, in deren Verlauf Brüche entstehen, die eventuell über Rekombination repariert werden, können auch andere Ursachen für die Hyperrekombination vorliegen. Da es sich um Lymphomzelllinien handelt, könnten tumorspezifische Veränderungen und Deregulationen der Reparaturwege wie zum Beispiel Mutationen in den DNA-Schaden-Signalproteinen ATM oder p53 zu erhöhter Bruchinduktion und Rekombination beitragen (Bishop et al., 2003). Diese beiden Möglichkeiten lassen sich unterscheiden. Eine Abhängigkeit der gemessenen Rekombination von Transkription wäre ein Hinweis auf eine Verbindung zur physiologisch regulierten Brucheinführung bei der somatischen Hypermutation. Der Einfluss der Transkription auf die Aktivität der Hypermutation ist bekannt und es gibt Hinweise auf eine Verbindung des Schlüsselenzyms AID zur Transkription über die RNA-Polymerase II und die Bindung von einzelsträngiger DNA (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2004).

Eine Deregulation der zellulären Reparaturprozesse oder Zellzykluskontrollen, die oft eine Voraussetzung für das Entstehen oder das Überleben von Tumorzellen ist, manifestiert sich in der Replikation. Während der Synthesephase im Zellzyklus kann es durch Schäden in der DNA zu stockenden Replikationsgabeln und zur Entstehung von Brüchen kommen. Diese Brüche können von der Zelle über verschiedene Wege repariert werden, auf deren Auswahl eine lymphomspezifische Deregulation Einfluss nehmen könnte und optional zur Hyperrekombination führen kann, wie für Mutationen in p53 und ATM beschrieben.

Mit Hilfe eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors, der die Rekombinationskassette antrieb, wurde die Rekombination auf Transkriptionsabhängigkeit in den beiden Zelllinien Raji und BJAB untersucht. Es zeigte sich, dass es bei der Linie Raji Unterschiede in den Subklonen gab. Einige Klone zeigten eine transkriptionsabhängige Hyperrekombination, während andere Klone eine basale Rekombinationsaktivität auswiesen, die wohl eher auf andere Prozesse wie etwa Replikation zurückzuführen war. In der Linie BJAB konnte im Gegensatz dazu in allen Klonen nur eine basale Rekombinationsaktivität, die nicht transkriptionsabhängig zu sein scheint, beobachtet werden. Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Zelllinien in ihrer Expression von AID. Die transkriptionsgekoppelte Hyperrekombination konnte eindeutig auch in den einzelnen Raji-Klonen mit der AID-Expression korreliert werden.

Überraschenderweise konnte aber in den BJAB-Klonen aus diesem Experiment keine Hyperrekombination mehr detektiert werden. Zum Einen wurde für diesen Versuch ein anderer Vektorhintergrund benutzt, der im Gegensatz zu dem konstitutiv exprimierten Reporter keine Immunglobulin-Enhancer aufwies. Möglicherweise erfordert die in BJAB gemessene AID-unabhängige Rekombinationsaktivität Elemente, die auch zu einer strukturellen Änderung und Zugänglichkeit der DNA beitragen. Da das verwendete Expressionssystem aber auf der Wirkung eines Repressors beruht, der bis zum gewünschten Expressionszeitpunkt den Promotor blockiert, könnte es sein, dass diese Repression die DNA durch epigenetische Veränderungen für homologe Rekombination unzugänglich macht. Aus Hefe ist diesbezüglich bekannt, dass die Chromatinstruktur Einfluss auf die Reparatur nimmt (Thoma, 2005). Dieses Argument bezieht sich auch auf die geringe Anzahl GFP-positiver Zellen, die nach der Induktion der Expression für beide Zelllinien detektiert werden konnte. Da diese basale Rekombination offensichtlich nicht durch Transkription induzierbar ist, muss sie eine andere Ursache haben. Replikation könnte eine Quelle sein, allerdings ist dafür die Anzahl der GFP-positiven Zellen zu niedrig, da die Klone bis zur Analyse aus Einzelzellen herangewachsen waren. Dies könnte ebenfalls auf einen Einfluss der Chromatinstruktur zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu BJAB ist in Raji neben einer in diesem Experiment möglicherweise ebenfalls inhibierten AID-unabhängigen Aktivität die mit AID-Expression korrelierte Hyperrekombination zu beobachten. Letztere scheint aber nur bei sehr hoher AID-Expression induziert zu werden. Dies könnte auf eine Art von dosisabhängiger Aktivität von AID hinweisen (Arakawa et al., 2002; Zhang et al., 2001). Man nimmt an, dass AID in geringer Konzentration gerichtet agiert. Wird es allerdings überexprimiert, überschreitet die Proteinmenge einen Schwellenwert, die zu einer eher ubiquitären Aktivität im Genom führen kann, die unabhängig von den Ig-Enhancern ist (Wang et al., 2004). Dass in Raji mit durchschnittlicher AID-Expression die Rekombinationsaktivität nicht von den Enhancern abhängig ist, konnte in anderen Experimenten beobachtet werden, in denen der konstitutive Reporter ohne Enhancer benutzt worden ist. Hier konnte kaum ein Unterschied in der Rekombinationsaktivität im Vergleich zu dem Reporter mit Enhancer festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In dem enhancerfreien Hintergrund des Tetracyclin-Systems ist dagegen die Hyperrekombination nur in stark AID-exprimierenden Klonen zu sehen.

Die Überexpression von AID in Raji und in BJAB bewirkte sowohl eine Erhöhung der Rekombinationsaktivität als auch der Hypermutationsaktivität. Das deutet in Verbindung mit der zuvor erläuterten AID-abhängigen transkriptionsgekoppelten Hyperrekombination darauf hin, dass AID wahrscheinlich verstärkt Brüche in die DNA einführt. Allerdings könnten dann auch andere Zelllinien wie zum Beispiel EREB2-5, die auch detektierbare Mengen AID exprimieren, diesen Phänotyp zeigen. Dies ist aber sowohl von der Aktivität und Funktionalität des AID-Proteins in diesen Linien abhängig, als auch davon, ob die induzierten Brüche über homologe Rekombination repariert werden. In Raji und BJAB könnte also eine Regulation der Reparaturwege vorliegen, die eine Reparatur mittels homologer Rekombination zulässt, während in den anderen Zellen dieser Reparaturweg eher nicht genutzt wird. Möglicherweise ist die Regulation in Raji und BJAB auf keimzentrumsspezifische Mechanismen zurückzuführen.

Es ist bekannt, dass Mutationen im p53-Gen einen Hyperrekombinationsphänotyp verursachen können (Mekeel et al., 1997). Die hier verwendeten Burkitt-Lymphom-Zelllinien sind defizient für p53, da dies in der Regel eine Voraussetzung für ihr Überleben ist (Ichikawa, 2000). Es ist aber auch bekannt, dass Bcl-6, das in Keimzentrumszellen

54

typischerweise exprimiert ist, p53 hemmt und somit die physiologische p53-Expression in diesen Zellen wahrscheinlich niedrig ist (Phan and Dalla-Favera, 2004).

Alternativ bewirkt auch eine niedrige Aktivität von ATM einen Hyperrekombinationsphänotyp (Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2003; Drexler et al., 2004b) und es wurde gezeigt, dass ATM im Keimzentrum nur schwach exprimiert ist (Starczynski et al., 2003). Dies könnte einen Mechanismus implizieren, in dem die Keimzentrums-B-Zellen durch Repression der ATM-Expression die Reparatur von AID induzierten Brüchen in Richtung Rekombination zu lenken. Dies wäre auch in Anlehnung an das Modell von Neuberger eine weitere Möglichkeit der Ig-Diversifizierung. Die AID-induzierten Brüche könnten der Ausgangspunkt für Rekombination sein, die nach dem Vorbild der Hühner-B-Zellen auch zu einer Diversifizierung der Sequenz beitragen könnte. Für eine Beteiligung der Rekombination spricht eine Untersuchung von AID-induzierten Brüchen in den Immunglobulingenen, die gezeigt hat, dass AID DNA-Enden generiert, die als Substrate für Rekombination dienen können und mit Rad51 und Rad52 assoziiert sind (Zan et al., 2003).

Dass eine AID-Expression nicht zwingend ausreichend für eine Induktion von Rekombination ist, sondern eine zusätzliche Regulation der Rekombination nötig ist, zeigte sich auch in eigenen Experimenten mit Fibroblasten. Es war zu beobachten, dass eine ektopische Expression von AID erst dann eine Erhöhung der Rekombinationsaktivität induzierte, wenn dies in einem ATM-defizienten Hintergrund erfolgte (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die durch AID induzierten Brüche erst durch Rekombination repariert werden, wenn in den Zellen Rekombination als präferentieller Reparaturweg genutzt wird.

Die Verwendung eines funktionellen Reportersystems für homologe Rekombination in humanen B-Zellen erlaubte erstmals eine kritische Evaluierung des Verhältnisses von homologer Rekombination und somatischer Hypermutation in B-Zellen.

Die Analyse der reparierten GFP-Gene hat gezeigt, dass keine Mutationen während des Reparaturvorgangs eingeführt worden sind. Dies spricht gegen eine Beteiligung der homologen Rekombination als maßgeblicher Reparaturweg am Hypermutationsprozess, um die Punktmutationen einzuführen. Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass die Rekombination als Nebenweg der Hypermutation durch die von AID induzierten Brüche aktiviert wird. Dies ist auch mit dem Experiment in der Hühner-B-Zelllinie DT40 konsistent, in denen erst eine Repression der Rekombinationsaktivität zur Hypermutation führte. Hühner führen in ihren B-Zellen zur Antikörperdiversifizierung Genkonversion durch, bei der die Sequenzinformationen von Ig-Pseudogenen auf ein rearrangiertes Ig-Gen übertragen werden. In DT40-Zellen, die defizient für die Rekombinationsfaktoren XRCC2 und 3 sind, konnte 55

statt Genkonversion eine erhöhte Anzahl von Mutationen festgestellt werden (Sale et al., 2001). So ist der Effekt der AID-Überexpression in den B-Zelllinien wahrscheinlich auf eine Steigerung der Anzahl an Brüchen, die durch AID induziert wurden, zurückzuführen, die dann unter anderem auch über homologe Rekombination repariert werden. Homologe Rekombination ist also möglicherweise ein von der Zelle gewollter Nebenweg der Reparatur, der vielleicht abhängig vom Zellzyklus verbliebene oder durch Replikation an AID-induzierten Läsionen entstandene Brüche beseitigt oder auch einen Sequenzaustausch leistet, der entweder zur Wiederherstellung der Ausgangssequenz oder zur Diversifizierung beiträgt. Dieser würde auch eine Erklärung für Ig-Hybridgene geben, die in Keimzentrums-B-Zellen detektiert worden sind. In IgG-positiven B-Zellen konnten V-Gene isoliert werden, die sich aus zwei verschiedenen V-Gen Segmenten zusammensetzten. Die Entstehung dieser Hybride könnte auf die Rekombinationsprozesse zurückzuführen sein, die in unserer Arbeit beobachtet wurden (Tsai et al., 2002; Xu and Selsing, 1994).

Unabhängig von der physiologischen Relevanz für die Antikörper-Diversifizierung können die Überexpressionsexperimente mit AID und der resultierenden Aktivitätssteigerung der homologen Rekombination als weiterer Hinweis gedeutet werden, dass die von AID induzierten Läsionen zur Einführung von Brüchen in die DNA führen können.

Um die Hyperrekombination in Raji allerdings noch zuverlässiger auf den Einfluss von AID zurückzuführen, sollte AID in diesen Zellen zum Beispiel durch Expression einer dominant negativen AID-Mutante inhibiert werden. Ist AID der Schlüsselfaktor, sollte die Inhibition eine Reduktion der Rekombinationaktivität zu Folge haben. Dieses Resultat würde das Auftreten von AID-induzierten Brüchen während der Keimzentrumsprozesse unterstreichen, da Rekombination nur an Brüchen stattfinden kann.

3.3 Die Rolle von Rad51 in der homologen Rekombination

Der verwendete Reporter ermöglicht eine Unterscheidung der homologen Rekombination in konservative und nicht konservative Rekombination. Abhängig von der Verwendung dieser Rekombinationssubwege ergeben sich zwei verschiedene Rekombinationsprodukte. Das auf nicht konservative Rekombination zurückzuführende Produkt ähnelt einem Deletionsprodukt, bei dem die beiden GFP-Gene fusionieren und der Bereich dazwischen deletiert wird. Bei der konservativen Rekombination dagegen bleibt die Rekombinationskassette in ihrer Form erhalten. Durch die Genkonversion mit cross over würde ebenfalls ein Deletionsprodukt entsteht. Normalerweise tritt diese Form der Genkonversion aber kaum Aguilera, 2003).

während der Mitose auf, sondern wird speziell während der Meiose genutzt (Prado and

Die Analyse der Rekombinationsprodukte in den verschiedenen B-Zelllinien ergab erstaunlicherweise eine präferentielle Nutzung der nicht konservativen Rekombination. Es konnten fast ausschließlich Deletionprodukte nachgewiesen werden. Durch Reisolation des Reporters aus den Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass diese Deletionsprodukte in der Regel perfekt die Struktur einer Fusion der GFP-Gene zeigten, bei der der Bereich zwischen den Genen fehlt.

Dass es sich bei diesem Phänomen nicht um einen Effekt des extrachromosomalen Status des Reporterplasmids handelt, sollte ausgeschlossen werden, indem der Reporter ins Genom integriert wurde. Auch in diesem Experiment wurde vorwiegend nicht konservative Rekombination beobachtet. Die Zellen verwenden also präferentiell den Reparaturweg der nicht konservativen Rekombination. Auffallend war allerdings, dass in der Zelllinie DG75 verglichen mit den anderen Linien ein höherer Anteil an konservativer Rekombination detektiert werden konnte.

Da die Analyse der Rekombinationsereignisse in der hier verwendeten Form eine genaue Quantifizierung der konservativen Rekombination erschwerte, wurde dieses Ergebnis auch mit Hilfe eines modifizierten Reporters verifiziert. Für diesen Reporter wurde die 3' kodierende Sequenz des Donor-GFP-Gens entfernt, so dass das Deletionsprodukt der nicht konservativen Rekombination kein funktionelles GFP-Gen ergibt. Mit dieser quantitativeren Methode konnte der Anteil an konservativer Rekombination an der gesamten Reparatur in DG75 auf etwa 30% bestimmt werden, während für die anderen Zelllinien nur 1 bis 3% detektiert werden konnte.

Eine Abhängigkeit der Rekombinationsereignisse von der Länge des Abstandes zwischen den beiden homologen Sequenzen ist schon festgestellt worden (Schildkraut et al., 2005). Da mit den hier benutzten Reportern auch konservative Rekombination detektiert werden konnte und durch das Vorhandensein von mehreren Kopien auch intermolekulare Rekombination möglich ist, ist ein solcher Einfluss auf das Ergebnis aber sehr unwahrscheinlich.

Interessanterweise handelt es sich bei DG75 um die Zelllinie, die in den Expressionsanalysen die höchste Rad51-Proteinmenge aufwies und die bekannt ist für effiziente gezielte Genmanipulation. Diese Methode bedient sich des Mechanismus der konservativen Rekombination. Diese Korrelation deutet darauf hin, dass Rad51 Einfluss auf die Entscheidung der Zelle hat, welcher der Rekombinationswege für die Reparatur von Brüchen genutzt werden soll. Dass Rad51 präferentiell an der konservativen Rekombination

beteiligt ist, wurde bisher zwar schon angenommen, eine mögliche regulatorische Kausalität, die auch wechselseitig sein kann, wie aus der Hefe bekannt (Cohen et al., 2002), ist aber noch nicht zweifelsfrei gezeigt worden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten zu einer Klärung beitragen.

Es konnte bereits beobachtet werden, dass Rad51-Überexpression in embryonalen Stammzellen eine Veränderung in der Art der auftretenden Rekombinationsprodukte bewirken kann (Richardson et al., 2004). In dieser Studie konnte ein erhöhtes Auftreten von Produkten beobachtet werden, die entweder auf SSA oder auf Genkonversion mit cross over zurückgehen. Zumindest ein Weg der konservativen Rekombination ist hier also durch die Rad51-Expression favorisiert worden. Diese Ergebnisse lassen sich aber dennoch nur schwer auf DG75 und die anderen Linien übertragen, da ein anderes Reportersystem verwendet worden ist und die Rad51-Expressionsmengen nicht direkt zu vergleichen sind. Es ist zudem bekannt, dass sich auch mit embryonalen Stammzellen, ebenso wie mit DG75, gezielte genetische Manipulationen durchführen lassen. Somit ist auch dieses Modellsystem nur schwer mit den anderen B-Zelllinien zu vergleichen.

Um mit dem hier verwendeten Reportersystem einen direkten Einfluss der Rad51-Expression auf die Nutzung der konservativen Rekombination nachzuweisen, wurden Rad51-Überexpressionsexperimente durchgeführt. Für die Überexpression von Rad51 wurde ein induzier- und titrierbares Expressionssystem gewählt, da sich in ersten eigenen Experimenten die Vitalität der Zellen mit konstitutiver Rad51-Expression als stark eingeschränkt erwies.

Die moderate Überexpression von Rad51 in Raji-Zellen hatte eine Erhöhung der homologen Rekombinationsaktivität zur Folge. Diese Beobachtung als Effekt der Überexpression wurde schon früher festgestellt (Arnaudeau et al., 2001; Paffett et al., 2005). In den meisten dieser Studien wurden allerdings nie die Rekombinationsprodukte im Detail untersucht. Im eigenen Experiment konnte bisher aber keine signifikante Steigerung der Nutzung der konservativen Rekombination beobachtet werden. Zieht man allerdings in Betracht, dass in der oben beschriebenen Überexpressionsstudie (Richardson et al., 2004) ein erhöhtes Auftreten von Genkonversion mit cross over oder SSA beobachtet worden ist, könnte dieses vorläufige Ergebnis auch auf die Struktur des Reporters zurückzuführen sein. Genkonversion mit cross over liefert bei dem verwendeten Reporter ebenfalls das Deletionsprodukt.

In den bisher veröffentlichten Experimenten mit Rad51 wurde übereinstimmend berichtet, dass eine Überexpression von Rad51 eine genomische Instabilität erzeugt, die sich durch eine erhöhte Anzahl von Translokationen auszeichet. Die in DG75 gemessene hohe Proteinmenge für Rad51 könnte demzufolge einen Beitrag zur Tumorentstehung und Progression geleistet haben. Zusätzlich dazu ist möglicherweise auch die Nutzung der nicht konservativen Rekombination, die im Besonderen bei den anderen Zelllinien möglicherweise auf Grund der niedrigeren Rad51-Expression noch häufiger ist, als Ursache für die Lymphomentstehung denkbar. Die Verwendung von nicht konservativer Rekombination kann ebenfalls zu Translokation und Deletionen führen. Diese Annahme stützt sich auch auf Experimente mit Fibroblasten-Zelllinien, die aus Gebärmutterhalskarzinomen isoliert worden sind, und ebenfalls präferentiell nicht konservative Rekombination durchführen (Daten nicht gezeigt).

Dass gerade in den meisten B-Zelllinien die Rad51-Expression verhältnismäßig gering ist, könnte aber auch auf keimzentrumsspezifische Mechanismen zurückzuführen sein. Eventuell ist es für die aktivierten B-Zellen wichtig Rad51-Expression zu reprimieren, um die Durchführung von somatischer Hypermutation zu erlauben (Li and Maizels, 1997; Peakman and Maizels, 1998). Dass sich diese Prozesse ausschliessen, konnte in DT40-Zellen beobachtet werden und entspricht auch den Ergebnissen der oben erläuterten Analysen der Rekombinationsaktivität (Sale et al., 2001).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen also erstmals, dass humane B-Lymphomzelllinien präferentiell nicht konservative Rekombination für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen nutzen. Ob dies im Zusammenhang mit den Keimzentrumsprozessen steht oder eine Folge oder auch Ursache der Lymphomentstehung ist, ist noch unklar. Es konnte zudem eine Korrelation zwischen der Rad51-Expression und der Nutzung der konservativen Rekombination hergestellt werden. Für Therapieansätze könnten diese Feststellungen gerade im Zusammenhang mit der Rad51-Expression eine Rolle spielen, da einige Therapeutika auf eine Schädigung der DNA der proliferierenden Tumorpopulation setzten, die zum Tod der Krebszellen führen soll (Gatti and Zunino, 2005; Prise et al., 2005; Sedletska et al., 2005). Eine Deregulation der Reparaturmechanismen in diesen Zellen könnte sie resistent gegenüber den Therapeutika machen oder bei einer Induktion von DNA-Schäden die Tumorprogression sogar noch verschlimmern (Henning and Sturzbecher, 2003).

Möglicherweise ist Rad51 allerdings bei der Entscheidung für einen Reparaturweg nicht als alleiniger Schlüsselfaktor zu betrachten. Es bedarf wahrscheinlich noch weiterer Komponenten, um den genauen Reparaturweg festzulegen, wie zum Beispiel die Struktur der Brüche oder auch die Phase des Zellzyklus, in der die Brüche auftreten.

3.4 Ausblick

Der Mechanismus der somatischen Hypermutation ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Als zentrales Schlüsselenzym, das sowohl essentiell für die somatische Hypermutation als auch für den Klassenwechsel ist, konnte die Cytidindeaminase AID identifiziert werden. Wir konnten Hinweise darauf finden, dass AID in der Lage ist Brüche in der DNA zu induzieren.

Die AID-Expression ist anscheinend ein Grund für die Hyperrekombination in Raji. Um dies allerdings definitiv zu bestätigen, bietet sich die Nutzung einer dominant negativen AID-Mutante an. Bewirkt AID eine verstärkte Generierung von Brüchen, sollte die Rekombinationsfrequenz geringer werden in Raji-Zellen, die die dominant negative AID-Mutante exprimieren. Mit Hilfe dieses Reportersystems ließe sich auch bestimmen, zu welchem Zeitpunkt während des Mechanismus der somatischen Hypermutation Brüche entstehen. Nach dem Modell von Neuberger ist für einen Generierung von Brüchen eine Prozessierung der von AID eingeführten Urazile durch Komponenten der Basenexzisionsreparatur nötig. Eine Hemmung der Urazil-Glycosylase sollte so den selben Effekt haben, wie die dominant negative AID-Mutante. Das Gleiche gilt eventuell auch für Faktoren der Mismatch-Reparatur.

Des Weiteren wäre zu klären, inwiefern AID eine Rolle bei der Entscheidung spielt, welcher Weg der Rekombination von der B-Zelle verwendet wird. Da AID möglicherweise auch einen Einfluss auf die Struktur der DNA-Brüche hat, könnten durch Prozessierung der freien DNA-Enden bestimmte Reparaturwege favorisiert werden. Das Reportersystem ermöglicht es, die Auswirkungen von AID auf zum Beispiel durch Bestrahlung eingeführte Brüche zu untersuchen. Eine Analyse des Status von ATM in den Zellen könnte eine weiteren Hinweis geben, welche Ursachen der Hyperrekombinationsphänotyp in den Zellen hat.

Auch der Einfluss von Rad51 auf die Wahl des Reparaturweges besonders im Zusammenhang mit der Keimzentrumsreaktion und der AID-Expression sollte im Detail analysiert werden.

Eine physiologische Relevanz der in dieser Arbeit aufgezeigten Zusammenhänge im Besonderen in der Keimzentrumsreaktion lässt sich final wohl am Besten *in vivo* untersuchen. Dazu könnte der hier vorgestellte Reporter als Transgen und optional angetrieben durch einen B-zell-spezifischen Promotor in Mäuse eingebracht werden.
4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma, St. Luise, USA oder Merck, Darmstadt bezogen, wenn nicht anders vermerkt.

4.1.2 Geräte

Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules, USA
Eppendorftischzentrifuge	Eppendorf, Köln
Entwicklermaschine X-OMAT	Kodak, USA
Elektorporator	BioRad, Hercules, USA
FACScan	Becton Dickinson, USA
Zellsorter MO-Flow	Becton Dickinson, USA
Inkubator	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen
Light Cycler	Roche, Mannheim
Photometer	Eppendorf, Köln
Umluft-Sterilbank	Haereus Christ Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Hybridisierungsofen	Thermo Electron Corperation

4.1.3.1 DNA-Größenstandard

(MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

Um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können, die in einem Agarosegel aufgetrennt worden sind, wurde gleichzeitig mit der Probe ein Marker geladen. Der verwendete Marker ist in Abbildung 22 gezeigt.



Abb. 22: DNA-Größenmarker Gene Ruler[™] DNA Ladder Mix

4.1.3.2 Proteingrößenstandard

(Invitrogen, USA)

Um das molekulare Gewicht von Proteinen zu bestimmen, die in einem SDS-PA-Gel aufgetrennt worden sind, wurde neben den Proben ein Proteingrößenstandard geladen (Abb. 23). Die Proteine des Standards sind kovalent an einen blauen Farbstoff gebunden, um sie sichtbar zu machen.

	Band No.	Apparent Molecular Weight		
1	1	179.3 kDa		
2	2	120 kDa		
3	3	83.8 kDa		
4	4	65.8 kDa*		
6	5	50.1 kDa		
7	6	38.6 kDa		
8	7	27.5 kDa		
9	8	20.5 kDa		
10	9	16.1 kDa		
	10	6.7 kDa		
	*Orientation band (pink in color)			

Abb. 23: Proteinstandard Bench Mark[™] Pre-stained Protein Ladder

4.1.4 Plasmide

Alle hier verwendeten Plasmide trugen für die episomale Erhaltung das virale EBNA1-Gen und den viralen Replikationsstart OriP. Das jeweilige Gen oder die Reporterkassette wurde vom CMV-Promotor und die Resistenzgene vom SV40-Promotor angetrieben. Details sind unter 4.6 aufgeführt. In Abbildung 24 sind die Plasmide dargestellt, auf denen die hier verwendeten Vektoren basieren (Tab.7). Die Gene für HA-AID und Rad51 waren zusätzlich über eine IRES mit dem NGF-Rezeptorgen verbunden.

Die DNA der Rekombinationskassette und des GFP-Gens wurden uns freundlicherweise von Guido Drexler überlassen (Drexler et al., 2004a; Drexler et al., 2004b). Das HA-AID-Fusionsgen stammt von Jürgen Bachl.



Abb. 24: Grundstruktur der Plasmide

Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide A) pBC230 und B) pRTS.

Plasmid	Gen/Reporter	Resistenz	Tet-System	Ig-Enhancer	Ursprung
pAK14	GFPframeshift	Hyg	nein	ja	pBC230
pAK21	HA-AID	Hyg	ja	nein	pRTS
pAK24	NGFR	Hyg	ja	nein	pRTS
pAK29	Grec/NGFR	Hyg	ja	nein	pRTS
pAK36	GFP	Puro	nein	ja	pBC230
pAK37	Grec	Puro	nein	ja	pBC230
рАК39	GC	Hyg	nein	ja	pBC230
pAK41	Rad51	Hyg	ja	nein	pRTS
pAK5	Grec	Hyg	nein	nein	pBC230
pAK6	GFP	Hyg	nein	ja	pBC230
pAK7	Grec	Hyg	nein	ja	pBC230
pMS(Y)X	YFP-TAG	Puro	nein	ja	pBC230

 Tab. 7: Für Transfektionen verwendete Plasmide

Grec: Rekombinationskassette für gesamte Rekombination

GC: Rekombinationskassette für konservative Rekombination

GFPframeshift: Akzeptor-GFP-Gen der Rekombinationskassette; ohne Donor

GFP-TAG: Hypermutationsreporter aus einem GFP-Gen mit Stoppcodon

Hyg: Hygromycinresistenz

Puro: Puromycinresistenz

4.1.5 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 8 mit ihren jeweiligen Selektionsbedingungen

aufgelistet. EREB2-5 wurde zusätzlich 1µg/ml Östrogen zugesetzt.

 Tab. 8: Zelllinien und Selektionsbedingungen

Zelllinie	Hygromycin	Puromycin	Quelle
	[µg/ml]	[µg/ml]	
Raji	200	0,8	J. Bachl
BJAB	200	0,8	B. Kempkes
DG75	400	0,8	B. Kempkes
721	100		B. Kempkes
EREB2-5	50		M. Schlee
Jurkat	200		H. Babbe, Köln
P493-6			B. Kempkes

4.1.6 Bakterien

DH5a

F⁻, ϕ dlacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k ⁻, m_k ⁻), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169, λ ⁻

XL1blue

(Stratagene, USA)

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10(Tet^r)]

4.1.7 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 mit den jeweiligen Anwendungsbedingungen aufgeführt.

Spezifität	Verdünnung	Puffer	Konjugat	Verwendung	Quelle
AID	1:5	TBS-0,1%Tween		Western	E. Kremmer
Ku70	1:1000	PBS		Western	Santa Cruz
Ku80	1:1000	PBS		Western	Santa Cruz
Rad51	1:1000	PBS		Western	Santa Cruz
Aktin	1:500	TBS-0,1%Tween		Western	Promega
Orc3	1:100	PBS		Western	E. Kremmer
ΙκΒα	1:1000	PBS		Western	Santa Cruz
Ziege-IgG	1:10.000	PBS	POX	Western	Sigma
Ratte-IgG	1:10.000	TBS-0,1%Tween	POX	Western	E.Kremmer
Maus-IgG	1:500	TBS-0,1%Tween	POX	Western	Promega
Kaninchen-IgG	1:10.000	PBS	POX	Western	Sigma
NGF-Rezeptor	1:10	PBS-0,5%BSA	PE	FACS	Pharmingen

Tab. 9: Antikörper mit Konjugation und Pufferbedingungen

POX: Peroxidase

PE: Phycoerythrin

4.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die in Tabelle 10 aufgelistet sind, wurden von Metabion, München bezogen.

Tab. 10: Oligonukleotide

Name	Sequenz
GFPin1	AAG AAA TGG CTA GCA AAG GAG AAG
GFP2	CTC AGT TGT ACA GTT CAT CCA TG
Puro5	ACA CAT TCC ACA GGG TCG AGG
hKu70RT1	GCT GTT CAC CAA TGA AGA CAA CC
hKu70RT2	CTT GGT ATC GCT AGG CAG AAG C
hKu80RT1	CAG TGT CTG CTG CAC AGA GC
hKu80RT2	CTC AGC TGT GAC AGA ACT TC
hDNAPKRT1	GCT G TG CCC TCA GCT GGC T TG
hDNAPKRT2	ATA ACT CCT TGT TGT TCG AAT CCA C
hRad51RT1	ATT GAG ACT GGA TCT ACT ACA G
hRad51RT4	GGC ACT GTC TAC AAT AAG CAG TGC
hRad54RT	GCG GCC TCA TCA GAG AGA GG
hRad54RT	CAA GCA GAT CGT TCT GGA TG
hHPRT2	CTA ATG TGA TAG ACT ACT GCT TTG
hHPRT3	CCA AAC TCA ACT TGA ACT CTC
MMCMV3	GCA TTA TGC CCA GTA CAT GAC C
MMCMV4	CGG TTC ACT AAA CGA GCT CTG C
MMCMV5	GAG GCC TAT ATA AGC AGA GCT C
MMCMV6	AGC TTG CTG ACT AGA GGA TCC C
hRad51Ex for	<u>GGC CTC ACT GGC C</u> AC CAT GGG AAT GCA
	GAT GCT GCA GCT TG
hRad51Ex rev	<u>GGC CTC ACT GGC C</u> GT CGA C TC A GT CTT
	TGG CAT CTC CCA C

Dick: Start- und Stoppcodon Unterstichen: SfiI-Schnittstelle Kursiv: Kozak-Sequenz 66

4.1.9 Enzyme

T4-Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase	Eppendorf
Pfu-Polymerase	Stratagene, USA
Restriktionsenzyme	Fermentas
	New England Biolabs
Proteinase K	Fermentas

4.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkultur wurden in einer Umluft-Sterilbank (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten vorgenommen. Die Zellen wurden in einem Inkubator (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zentrifugationen fanden stets bei 4°C mit 1200rpm in einer Minizentrifuge (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) statt. Alle Zelllinien wurden im folgenden Medium kultiviert:

Zellkulturmedium

500ml	RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Schottland)
50ml	FKS (Biochrom KG, Berlin)
5ml	Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco BRL, Schottland)
5ml	Glutamin (200mM) (Gibco BRL, Schottland)
5ml	Natriumpyruvat (100mM) (Gibco BRL, Schottland)

4.2.1 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in etwa 1 bis 1,5ml FKS mit 10% DMSO bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff eingefroren.

4.2.2 Transfektion von Zellen

Es wurden immer 10µg DNA transfiziert. Je nach Zelllinie wurden verschiedene Transfektionsbedingungen verwendet (Tab.11). Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal im jeweiligen Transfektionsmedium gewaschen (Tab.11). Das RPMI-Medium wurde für die Transfektion immer ohne Zusätze verwendet. Die Transfektionen wurden in Küvetten mit 0,4cm Elektrodenabstand vorgenommen. Bei jeder Transfektion wurde als Transfektionsund Selektionskontrolle stets ein Kontrollplasmid mit GFP-Expression (pAK6 oder pAK36) mitgeführt.

Zelllinie	Medium	Volumen [µ1]	μF	Volt
Raji	PBS	400	850	250
BJAB	RPMI	250	850	250
DG75	PBS	400	850	250
EREB2-5	PBS	400	850	250
721	RPMI	250	975	180
Jurkat	PBS	400	1000	300

Tab. 11: Transfektionsbedingungen der einzelnen Zelllinien

4.2.3 Selektion

Je nach transfiziertem Plasmid wurde den Zellen entweder Hygromycin und/oder Puromycin zugesetzt. Die Konzentration der Selektionszusätze war abhängig von der Zelllinie. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

4.2.4 Bestimmung der Rekombinationsaktivität

Die Zellen wurden mit entweder pAK7, pAK37 oder pAK29 nach dem oben erklärten Verfahren transfiziert. Nach drei bis vier Tagen wurde Selektionsmedium zugesetzt. Etwa zwei Wochen nach der Transfektion (10 Tagen nach Selektionsstart) war die Selektion in der Regel abgeschlossen. Dies war an der GFP-Kontrolle, in der sich nur noch GFP-positive Zellen befanden, zu erkennen.

Während der gesamten Zeit, beginnend ab dem Selektionsstart, wurden alle zwei bis drei Tage FACS-Analysen durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der Zellen abgenommen, durch Zentrifugation aufkonzentriert und mit Propidiumiodid versetzt. Bei der FACS-Messung wurden möglichst immer 100.000 lebende Zellen pro Transfektion aufgenommen und die Zahl der GFP-positiven Zellen darin bestimmt.

Zu einem Zeitpunkten nach Abschluss der Selektion; d.h. etwa drei und vier Wochen nach der Transfektion, wurden Zellen abgenommen und für die Bestimmung der Kopienzahl des Reporters verwendet. Aus der Anzahl der GFP-positiven Zellen, umgerechnet auf die Kopienzahl des Reporters pro Zelle, und der Zeit wurden Diagramme zum Verlauf der Rekombinationsaktivität erstellt.

4.2.5 Inaktivierung und Reaktivierung von *c-myc* in der Zelllinie P493-6

Es wurde zu $6x10^7$ Zellen in Zellkulturmedium 1µg/ml Tetracyclin zugegeben. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Zellen mit 50ml PBS/10% FKS dreimal gewaschen. Danach

wurde das Zellpellet in 125ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen inkubiert. Vor dem Auswaschen des Tetracyclins, unmittelbar danach und 8 und 24 Stunden wurden Zellpellets zu $3x10^6$ Zellen sedimentiert. Eine Kontrollkultur wurde ohne Tetracyclin kultiviert.

4.2.6 Färbung der Zellen mit konjugierten Antikörpern für FACS-Analysen

Es wurden etwa 2 x 10^5 Zellen abgenommen und einmal mit PBS 0,5% BSA gewaschen. Für die Färbung wurden die Zellen mit dem 1:10 verdünnten Antikörper bei Raumtemperatur in einem Volumen von 10µl PBS 0,5% BSA für mindestens 15 min inkubiert. Danach wurden sie einmal mit PBS 0,5% BSA gewaschen und in 70µl PBS mit 1µg/ml Propidiumiodid (PI) aufgenommen.

4.2.7 FACS-Analyse

Die Zellen, die auf GFP-Expression untersucht werden sollten, wurden im Medium, das noch mit 1μ g/ml PI versetzt wurde, direkt im FACScan analysiert. Für eine Analyse der NGF-Rezeptorexpression wurden die Zellen wie oben beschrieben vorbereitet. Auf GFP-Expression wurden stets 10^5 lebende Zellen analysiert, während bei der Analyse auf NGF-Rezeptorexpression 5000 Zellen aufgenommen worden sind.

4.2.8 Sortieren von Zellen mit Hilfe von FACS

Die Sortierung der GFP-positiven Zellen wurde mit Hilfe des FACS-Sorters (MO-Flow, Becton Dickinson, USA) von Joachim Ellwart steril und bei 4°C durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zuvor einmal mit PBS gewaschen und in mindestens 1ml oder zu einer Zellkonzentration von 5 x 10^7 Zellen/ml in PBS aufgenommen. Nach der Sortierung wurden die Zellen sofort wieder in Medium überführt.

4.2.9 Herstellung von Zellpellets für RNA-, DNA- oder Proteinanalysen

Für die Herstellung von Zellpellets für RNA-, DNA- oder Proteinanalysen wurde etwa 3 x 10⁶ Zellen abgenommen und einmal mir PBS gewaschen. Final wurde die gesamte Flüssigkeit vom Zellpellet entfernt, das Pellet aufgelockert und bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

68

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Vermehrung von Bakterien

Um kompetente Bakterien herzustellen oder eine für Analysen, Klonierung oder Transfektion von ES-Zellen geeignete Menge Plasmid-DNA aus den Bakterien zu gewinnen, mußten diese zuvor vermehrt werden. Dafür wurde mit Antibiotika versetztes LB-Medium (Ausnahme: Herstellung kompetenter Bakterien) mit einer kleinen Menge Bakterien inokuliert und bei 37°C für 14 bis 16 Stunden geschüttelt. Die zum Animpfen nötigen Einzelkolonien wurden bei 37°C auf LB-Agarplatten gezogen, die ebenfalls Antibiotika beinhalten können. Auf den Platten wurden die Bakterien vereinzelt und bildeten so nach mehreren Teilungen Kolonien aus genetisch gleichen Klonen.

LB-Medium	LB-Agarplatten
1% Trypton	15g Agar pro 1 Liter LB-Medium
0,5% Hefeextrakt	
0,17 M NaCl	

4.3.2 Hitzeschock-kompetente Bakterien

(Hanahan, 1983)

DH5 α -Bakterien wurden vereinzelt auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 3 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit der kleinen Übernachtkultur inokulierte man 200ml LB-Medium (Start-OD₆₀₀ \approx 0,02). Die Bakterienlösung wurde bei 37°C geschüttelt, bis sie zu einer optischen Dichte bei 600nm von 0,4 bis 0,5 gewachsen war. War diese Dichte erreicht, wurde das Wachstum gestoppt, indem die Zellen für etwa 10 Minuten auf Eis gekühlt wurden. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die gekühlten Zellen wurden bei 6000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in 60ml eisgekühlten TFBI resuspendiert und nochmals bei 4000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 8ml TFBII aufgenommen und in 100µl-Aliquots aufgeteilt. Die Bakteriensuspension wurde bei -80°C gelagert.

70

TFBI	TFBII
30mM K-Acetat	10mM Mops pH 7,0
50mM MnCl ₂	75mM CaCl ₂
100mM RbCl	10mM RbCl
10mM CaCl ₂	15% Glycerin
15% Glycerin	

4.3.3 Transformation von Bakterien

4.3.3.1 Hitzeschock-Transformation

(Hanahan, 1983)

Zu 100µl Suspension kompetenter Bakterien gab man ca. 1 ng DNA oder eine Ligationsreaktion. Das Gemisch wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42°C für 45 Sekunden gegeben. Nachdem die Zellen für 5 Minuten auf Eis gekühlt worden waren, ließ man sie in 500µl LB-Medium bei 37°C schüttelnd für maximal eine Stunde regenerieren. Danach wurden die Bakterien auf mit entsprechenden Antibiotika versetzten Agarplatten ausgestrichen, um so über Nacht einzelne Kolonien zu erhalten.

4.3.3.2 Transformation durch Elektroporation

Die einzubringende Plasmid-DNA mußte in deionisiertem Wasser gelöst sein, da keine Salze im Transformationsansatz sein dürfen. Die Salze würden den elektrischen Widerstand in der Lösung erhöhen und so zu Überhitzung führen. Deshalb wurde die DNA mit 100% Ethanol gefällt und das Pellet in etwa 10µl deionisierten Wasser gelöst. Zu der DNA wurden 50µl kompetente Bakterien (Stratagene, USA) gegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine gekühlte Küvette (0,1cm-Elektrodenabstand) überführt. Den elektrischen Puls setzte man mit dem Elektroporator bei 25µF Kapazität, 1,7kV und 200Ω. Nach dem Elektropuls gab man sofort 1ml LB-Medium auf die Bakterien und schüttelte sie für eine Stunde bei 37°C. Danach wurden die Bakterien auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

4.3.4 Plasmidpräparation nach Sambrook et al. 1989

Diese Präparationsmethode verzichtet auf die Verwendung von Säulen, um die DNA aus der Lösung zu isolieren. Stattdessen wird die DNA mittels Ethanol gefällt.

1,5ml einer Bakterienkultur wurden in einer Eppendorfzentrifuge bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl Lösung I gelöst. 200µl Lösung II wurden zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Der Lysepuffer wird durch Zugabe von 150µl Lösung III neutralisiert, die gleichzeitig auch Proteine, genomische DNA und Zelltrümmer fällte. Danach inkubierte man für 10 Minuten auf Eis. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 13000rpm in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von zwei Volumen 100% igem Ethanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation, wie oben beschrieben, wurde das Pellet mit 70% igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50µl 10mM Tris pH8,5 resuspendiert.

Lösung I	Lösung II	Lösung III
50mM Glukose	0,2N NaOH	3M KAcetat
25mM Tris HCl pH8,0	1% SDS	2M Eisessig
10mM EDTA pH8,0		
RNase 20µg/ml		

4.3.5 Plasmidpräparation mit dem JetStar-Kit

Dieses Produkt wurde zur Präparation von größeren Mengen Plasmid verwendet. Dazu wurden 200ml LB Medium mit Antibiotikum versetzt, mit Bakterien angeimpft und über nacht bei 37°C geschüttelt. Aus dieser Bakterienkultur wurde mit Hilfe des JetStar-Systems nach Herstellerprotokoll die Plasmid-DNA isoliert.

4.4 Methoden der DNA-Verarbeitung

4.4.1 DNA-Direkt-Präparation

Diese Methode ermöglicht eine verlustfreie allerdings auch nicht sehr reine Präparation von DNA aus einer sehr geringen Anzahl von Zellen. Dazu werden 50 μ l Lysispuffer aus 10mM Tris und 0,5 μ g/ μ l Proteinase K auf 10⁵ Zellen gegeben und 2,5 Std. bei 50°C inkubiert. Danach wird die Proteinase K durch Inkubation für 10 min bei 95°C inaktiviert. Die gewonnene DNA kann für PCR-Reaktionen genutzt werden.

4.4.2 DNA-Präparation mittels QIAamp

Die Benutzung des QIAamp Kits zur Präparation von DNA aus Zellen ist sehr sauber, aber es kann zu DNA-Verlust kommen. Bei der Anwendung wurde nach Herstellerempfehlung verfahren.

4.4.3 Hirt-Extrakte zur Plasmidreisolierung

Diese Methode reichert extrachromosomale DNA an und erleichtert so eine Reisolierung von Plasmiden aus Zellen, um diese zurück in Bakterien zu transformieren.

10⁶ Zellen wurden abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Dem Zellpellet wurde dann in 400µl HirtI resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100µl HirtII zugegeben und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Präzipitation der DNA wurde das Gemisch über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde die DNA durch 40-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Die extrachromosomale DNA sollte sich im Überstand befinden und wurde durch das Phenol-Chloroform-Verfahren von Proteinen gereinigt. Dazu wurde ein Volumen (500µl) eines 1:1 Phenol-Chloroform-Gemisch zugegeben, gut gemischt und die Phasen durch Zentrifugation für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und damit das Verfahren nochmals wiederholt. Danach wurde die oben beschriebene Prozedur nochmals mit reinem Chloroform zur Entfernung von Phenolresten durchgeführt. Die erhaltene Phase wurde mit einem Zehntel 3M NaAc versetzt und 2 Volumen 100% iger Ethanol zugegeben, um die DNA zu fällen. Die DNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und mit 70% igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in Wasser aufgenommen und nach oben beschriebenem Transformationsprotokoll für Elektroporation die kompetenten XL1blue-Bakterien (Stratagene, USA) verwendet.

4.4.4 DNA-Konzentrationsmessung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung wurde das Photometer benutzt. Hier wird die Absorption bei einer Lichtwellenlänge von 260nm gemessen (A_{260}). Licht dieser Wellenlänge wird von den zyklischen Basen in der DNA mit dem durchschnittlichen Faktor 50 absorbiert. So ergibt sich die Formel: DNA-Konzentration = $A_{260} \times 50 \times Verdünnung$.

4.4.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Klasse II Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA spalten. Alle Enzyme wurden mit den von den Firmen empfohlenen Puffern und Zusätzen verwendet.

4.4.6 Agarosegelelektrophorese

Um das Ergebnis einer Restriktion, PCR-Reaktion oder DNA-Reinigung zu überprüfen, lud man einen Anteil der Proben auf ein 1% bis 1,5% iges Agarosegel [w/v]. Dazu wurde die

Probe zuvor mit Ladepuffer versetzt. Die DNA-Fragmente wurden in einem elektrischen Feld mit bis zu 100V aufgetrennt.

Agarosegel	10x Ladepuffer
1-1,5mg Agarose	0,25% Bromphenolblau
pro 100ml 1xTAE	30 % Glycerin
1,5µl 100mg/ml Ethidiumbromid	50mM Tris

4.4.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) lassen sich spezifisch DNA-Fragmente amplifizieren.

Hierzu benötigt man eine DNA-Matrize, zwei Primer-Oligonukleotide, die die zu amplifizierene Sequenz auf den komplementären Strängen flankieren, freie Nukleotide und hitzebeständige DNA-Polymerase. Ein Inkubationsprogramm aus mehreren Zyklen von DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und DNA-Synthese sorgt für die Amplifizierung des DNA-Fragments.

Als Negativkontrolle setzte man parallel zu jeder PCR-Reaktion das gleiche Reaktionsgemisch ohne Matrizen-DNA an. So kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Amplifikation des erhaltenen Fragments auf eine Verunreinigung mit Fremd-DNA zurückzuführen war. Die PCR-Produkte wurden bei 4°C gelagert.

Alle benutzten Primer-Oligonukleotide wurden von Metabion (München) bezogen und sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Je nach Notwendigkeit kann man zwischen verschiedenen DNA-Polymerasen wählen.

Taq-Polymerase

(Eppendorf, Darmstadt)

Diese Polymerase wurde benutzt, um die Rekombinationsereignisse zu analysieren.

Für die PCR-Reaktion mit der Taq-Polymerase wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

73

Matrizen-DNA	0,1 bis 0,75ng in 1 bis 2 μl
je Primer 10µM	1 µl
dNTPs 2mM	2,5 µl
10x Puffer	2,5 µl
25mM MgCl ₂	2 µl
Taq-Polymerase (10U/µl)	0,15 µl
Wasser	auf 25µl auffüllen

Die PCR-Reaktion vollzog sich bei folgender Temperaturabfolge mit meist 35 Zyklen in einer PCR-Maschine:

Start	94°C	für 2 min
Zyklische Denaturierung	94°C	für 30 sec
Zyklische Anlagerung	60-63°C	für 45 sec
Zyklische Verlängerung	72°C	für 1min/kb
Finale Verlängerung	72°C	für 10 min

Pfu-Polymerase

(Stratagene, USA)

Diese Polymerase wurde für die Amplifizierung der GFP-Gene, die auf Mutationen untersucht werden sollten, genutzt. Auch Gene für Expressionsvektoren wurden mit dieser relativ fehlerfreien Polymerase amplifiziert.

Für die PCR-Reaktion mit der Pfu-Polymerase wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

μl

Matrizen-DNA	0,1 bis 0,75ng in 1 bis 2
je Primer 10µM	1 µl
dNTPs 2mM	2,5 µl
10x Puffer mit MgCl ₂	2,5 µl
Pfu-Polymerase (10U/µl)	1 µl
Wasser	auf 25µl auffüllen

Die PCR-Reaktion vollzog sich bei folgender Temperaturabfolge mit meist 35 Zyklen in einer PCR-Maschine:

-	7	5
	1	\mathcal{I}

Start	94°C	fiir 2 min
	<i>y</i> 1 e	141 2 mm
Zyklische Denaturierung	94°C	für 30 sec
Zyklische Anlagerung	60-63°C	für 45 sec
Zyklische Verlängerung	72°C	für 3min
Finale Verlängerung 72°C	für 10 min	

4.4.8 Quantitative real time PCR

(LightCycler, Roche)

Die LightCycler-Methode nach Roche ist eine PCR-Reaktion, die mit einer Faststart Taq DNA-Polymerase und dem dsDNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green1 arbeitet. Die Taq Polymerase ist mit hitzelabilen Blockgruppen modifiziert und so bei Raumtemperatur inaktiv. Erst durch Erhitzen auf 95°C wird die Reaktion gestartet.

SYBR Green 1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an dsDNA bindet und dessen Fluoreszenz durch diese Bindung um das 100fache gesteigert wird. So können die entstandenen Produkte mittels ihrer Fluoreszenz detektiert werden.

Die benutzten Primer-Oligonukleotide wurden bei Metabion (München) bestellt und sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem LightCycler (Roche) mit dieser Temperaturabfolge mit 55 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung der DNA		
und Aktivierung der Polymerase	95°C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95°C	für 1 sec
Zyklische Anlagerung	60-63°C	für 10 sec
Zyklische Verlängerung	72°C	für 1min pro 1,5kb
Aufschmelzen	70°C bis 97°C	in 10 sec
Abkühlen	40°C	für 15 sec

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

cDNA-Matrize (1:10)	1µl
Roche-Mix	1µl
25mM MgCl ₂	0,8µ1
je Primer (10mM)	0,5µl
H ₂ O	6,7µl

Als Matrize diente entweder cDNA zur Bestimmung der mRNA-Mengen der Reparaturfaktoren oder auch DNA-Präparationen aus Zellen zu Ermittlung der Kopienzahl. Entstandene PCR-Produkte wurden seriell verdünnt, um eine Eichgerade zu erstellen. Folgende Verdünnungsserie wurde erstellt: 10⁻³; 10⁻⁵; 10⁻⁷; 10⁻⁹ und Wasser als Negativkontrolle. Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes mit steigender Zykluszahl zu. Diese Fluoreszenzzunahme wird von dem LightCycler gemessen und in einem Graphen dargestellt. Ein Programm ermittelt aus dieser Amplifikationskurve den crossing point (Cp), der die Anzahl der Zyklen angibt, die nötig waren, um eine definierte Menge an PCR-Produkt zu erreichen.

Trägt man nun den Logarithmus der Konzentrationen gegen den Cp-Wert auf, erhält man die Eichgerade. Die Effizienz (E) der Reaktion errechnete sich mit Hilfe der Steigung (m) der Eichgeraden mit folgender Formel: $E = 10^{-1/m}$

Wenn nun K die Anzahl der PCR-Produkte darstellt, die am crossing point präsent sind, T_0 die Ausgangskonzentration der Probe und Cp die Anzahl der Zyklen, die nötig sind um die definierte Menge an PCR-Produkt zu erhalten, dann ergibt sich folgende Gleichung:

$$\mathbf{K} = \mathbf{T}_0 \left(\mathbf{E} \right)^{\mathbf{C}\mathbf{p}}$$

Da die Menge an PCR-Produkt am Cp für alle Proben gleich ist, ergibt sich folgende Formel:

$$T_{0gesucht} \ x \ (E_{gesucht})^{Cpgesucht} = T_{0Referenzgen} \ x \ (E_{Referenzgen})^{Cp \ Referenzgen}$$

Im Falle der Kopienzahlbestimmung ist T_0 des Referenzgens bekanntermaßen 1 oder 2 je nach Geschlecht, da es sich um den genomischen Locus von HPRT handelt. Setzt man dies in die Formel ein und löst nach der gesuchten Ausgangskopienzahl auf, ergibt sich folgendes:

$$T_{0gesucht} = \frac{(E_{Referenzgen})^{CpReferenzgen}}{(E_{gesucht})^{Cpgesucht}} \quad (x \ 2)$$

Zur Ermittlung der relativen mRNA-Expression wurde T_0 des Referenzgens gleich 100% gesetzt, so dass sich folgende Formel ergibt:

 $T_{0gesucht} = 100 \text{ x} \frac{(E_{Referenzsgen})^{CpReferenzgen}}{(E_{gesucht})^{Cpgesucht}}$

Eigenschaften	Probe	Cp CD19
Gleicher Donor	IgD+	21,89
	CD77+	19,67
	P493-6 –Tet	23,76
Isogene Zelllinie	P493-6 +Tet	22,56
Isogene Zemme	P493-6 –Tet 8h	22,89
	P493-6 –Tet 24h	23,87
	Raji	20,79
Zelllinien verschiedener	BJAB	23,04
Donor	DG75	24,59
Donor	721	22,69
	EREB2-5	23,25

Tab. 12: Cp-Werte der quantitativen PCR für CD19

Tab. 13: Kopienzahlbestimmung zu	den Rekombinationsaktivitäts- und
Überexpressionsexperimenten	

Linie	Tage	Cp CMV	Cp HPRT	Effizienz CMV	Effzienz HPRT	Kopien
BJAB	25	19,34	26,75	1,87	1,75	34
DG75	21	16,17	27,92	1,99	1,72	61
721	21	18,94	26,99	1,99	1,72	11
Jurkat	25	16,77	27,51	1,87	1,75	130
EREB	21	21,14	26,58	1,99	1,72	1

Tab. 14: Kopienzahlen aus den Überexpressionsexperimenten

Linie	Konstrukt	Tag	Ср	Ср	Effizienz	Effzienz	Kopien
			CMV	HPRT	CMV	HPRT	
BJAB	NGFR	28	28,17	36,50	1,75	1,64	19
	AID	28	23,97	31,73	1,75	1,64	19
Raji	NGFR	27	26,93	38,15	1,75	1,64	40
	AID	27	31,65	36,60	1,75	1,64	2
Raji	NGFR	52	26,89	27,85	1,75	1,64	2
	Rad51	52	27,56	29,48	1,75	1,64	4

Tab.	15:	Kopienzahlbestim	mung zum	Vergleich	der	nicht	konservativen	und	konservativen
Reko	mbiı	nationsaktivität (Ta	ag 35 nach	der Transfe	ektio	n)			

Linie	Konstrukt	Cp CMV	Cp HPRT	Effizienz	Effzienz	Kopien
				CMV	HPRT	
Raji	Grec	17,49	25,69	1,89	1,80	51
		17,09	25,73	1,97	1,83	44
	GC	17,02	24,80	1,89	1,80	40
		16,54	25,30	1,97	1,83	50
BJAB	Grec	17,75	23,10	1,89	1,80	31
		17,46	24,41	1,97	1,83	31
	GC	17,01	23,10	1,89	1,80	30
		16,69	23,62	1,97	1,83	33
DG75	Grec	19.07	26,19	1,89	1,80	25
		18,87	25,99	1,97	1,83	15
	GC	16,05	24,82	1,89	1,80	76
		15,67	25,24	1,97	1,83	86
721	Grec	21,25	25,41	1,89	1,80	8
		21,09	25,64	1,97	1,83	5
	GC	21,51	25,66	1,89	1,80	8
		21,14	26,33	1,97	1,83	8

Grec: Rekombinationskassette für gesamte Rekombination

GC: Rekombinationskassette für konservative Rekombination

4.4.9 Southern Blot

(Southern, 1975)

Mit dieser Methode können spezifische DNA-Fragmente aus einer großen Menge anderer Fragmente detektiert werden, wie sie zum Beispiel bei einer Restriktion von genomischer DNA entstehen.

Die mit einem Restriktionsenzym verdauten PCR-Produkte wurden nach Zusatz von Ladepuffer auf ein 0,8% iges Agarosegel, das mit Ethidiumbromid versetzt war, geladen und aufgetrennt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, um später die Fragmentgrößen abschätzen zu können.

Vor dem Transfer wurde das Gel in 0,25M HCl für etwa 15 Minuten geschüttelt. Danach wurde das Gel durch einstündiges Schütteln im Transferpuffer neutralisiert und equilibriert.

Die DNA wurde mit Hilfe des Transferpuffers und Kapillarkräfte auf die Nitrocellulose-Membran (Amersham Pharmacia, Braunschweig) transferiert.

Der Transfer wurde für 4 bis 16 Stunden durchgeführt. Danach wurde die Membran in 2xSSC oder 0,5M Tris HCl pH 7,5 für 5 Minuten neutralisiert. Die DNA wurde durch einstündiges Backen bei 80°C an der Membran fixiert.

20xSSC	Transferpuffer (TS)
3M NaCl	0,4 M NaOH
0,3M Na-Citrat	0,6 M NaCl

4.4.10 Hybridisierung

Die getrocknete Membran wurde mit 2xSSC wieder befeuchtet und dann bei 65°C mit 25ml Prähybridisierungspuffer für mindestens 4 Stunden rollend im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach dem Blocken wurde dem Prähybridisierungspuffer die radioaktiv markierte Sonde zugesetzt. Die Hybridisierung der Sonde fand über Nacht bei 65°C rollend im Hybridisierungsofen statt.

Überschüssige Sonde wurde durch 20-minütiges Waschen mit Waschpuffer bei 65°C entfernt. Der gewaschene Blot wurde eingeschweißt. Zur Sichtbarmachung der radioaktiven Banden wurde die Membran in eine Kassette auf Kodak-BioMax-Filme gelegt und der Film bei -80°C belichtet. Die Belichtungszeit reichte von 6 Stunden bis zu wenigen Tagen. Die Filme wurden in der Entwicklermaschine entwickelt.

Prähybridisierungspuffer	Waschpuffer
1M NaCl	2x SSC
50mM Tris pH7,5	0,1% SDS
10% Dextransulfat	
1% SDS	

250µg/ml sonifizierte DNA

4.4.11 Herstellung radioaktiver Sonden

Um ein spezifisches DNA-Fragment auf einer Blotmembran sichtbar zu machen, werden radioaktiv markierte Sonden verwendet. Die DNA-Sonde wurde über PCR mit den Primern GFPin1 und GFP2 hergestellt und umfasste das gesamte GFP-Gen.

Zur radioaktiven Markierung wurden etwa 25ng der DNA-Sonde verwendet, die in 45μ l H₂O gelöst war. Die DNA wurde für 5 min bei 95°C aufgekocht und nach 5-minütiger Abkühlung

79

auf Eis mit einem Aliquot rediPrimeTM II (Amersham Pharmacia, Braunschweig) gemischt. Zuletzt wurde mit ³²P radioaktiv markiertes dCTP (50μCi) zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Mit Hilfe einer Sephadex-Säule (Microspin S-200 HR, Amersham Pharmacia, Braunschweig) und Zentrifugation bei 3000 rpm für eine Minute wurde die radioaktive Sonde von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Nach 3-minütigem Kochen, um die Sonde zu denaturieren, wurden 30.000.000dpm/min der Sonde der Prähybridisierungslösung zugegeben und die Membran mit diesem Gemisch bei 65°C inkubiert.

4.5 Plasmid-Klonierungstechniken

4.5.1 Behandlung mit Restriktionsenzymen

Klasse II Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA spalten. Die Enzyme werden zu präparativen oder analytischen Zwecken eingesetzt. Alle Enzyme wurden mit den von den Firmen empfohlenen Puffern und Zusätzen und bei empfohlener Temperatur verwendet.

4.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

4.5.2.1 Ligation mit der T4-Ligase

(Sambrook et al. 1989)

Die T4-Ligase (Gibco BRL, Paisley, Schottland) verknüpft das Riboserückgrad der DNA über die Phosphatbrücke. Sie wurde genutzt, um DNA-Fragmente in ein Plasmid einzufügen. Dazu mußten die freien Enden der Fragmente an die des linearisierten Plasmids ligiert werden.

Man setzte ein Mengenverhältnis von Plasmid zu Fragment von 1:3 ein, um die Integration des Fragments in das Plasmid zu fördern und die Bildung von religierten Plasmiden zu minimieren. Die Ligation wurde in einem Volumen von 10µl bis 15µl bei 4°C über Nacht vorgenommen.

Variationen dieses Ligationsansatzes mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 10µl wurden verwendet:

3 μl Vektor-DNA (etwa 0,1μg DNA)
5 μl Insert-DNA (etwa 0,3μg DNA= 3x Vektor-DNA-Menge)
2 μl 5x Ligationspuffer
1μl T4-Ligase 5U/μl

80

4.5.2.2 Ligation eines Fragments in den GEM T-Vektor

(Promega, Madison, USA)

Dieses Kit beinhaltet Ligationspuffer, linearisierten Vektor und Ligase. Es eignet sich für die Klonierung von PCR-Produkten.

Beim Ansatz der Ligation wurde nach Herstellerempfehlung verfahren, über Nacht bei 4°C ligiert und die Blau-Weiß-Analyse der Bakterienkolonien vorgenommen.

4.5.3 Dephosphorylierung freier DNA-Enden

Die Alkalische Phosphatase (CIP; Roche, Mannheim) entfernt die Phosphate an den freien 5'-Enden der DNA. Die Entfernung der Phosphate an linearisierten Vektor soll die Religation des Vektors verhindern.

Dazu wurde der linearisierte Vekor mit einer Unit der Phosphatase und dem von der Firma empfohlenen Puffer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

4.5.4 Gelisolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung bestimmter Fragmente wurden die DNA nach der Restiktionsbehandlung auf ein Agarosegel geladen und die gewünschten Fragmente ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels der Extraktionskits QIAquick und QIA EXII aus der Agarose gereinigt.

4.6 Klonierung der Plasmide

4.6.1 Rekombinationskassette und GFP

Die Rekombinationskassette und das GFP-Gen wurde über *KpnI* und *BbsI* aus pGrec und pDx6 entfernt und in pEGFP-N1 (Clontech, USA) inseriert, um eine *PacI*-Flankierung zu erreichen, mit der sich die Gene beliebig weitertransferieren lassen.

4.6.2 pBC230

CMV-Promotor für des Gen von Interesse; Enhancer: MAR, E3', E_i. SV40-Promotorgetriebenes Hygromycinresistenzgen; OriP; EBNA1-Gen; Ampicillinresistenzgen.

4.6.3 pRTS

Minimaler bedirektionaler CMV-Promotor für die Gene von Interesse, versehen mit Tetracyclin-Operatorelementen; CMV-Enhancer; rtTA-IHRES-rTR-KRAB angetrieben vom chicken-beta-actin-Promotor; OriP; EBNA1-Gen; Ampicillinresistenzgen.

4.6.4 pAK7 und pAK6

In die *Sfil*-Schnittstellen in pBC230 wurde eine *PacI*-Schnittstelle eingeführt, über die die Rekombinationskassette oder das GFP-Gen eingefügt wurden.

4.6.5 pAK14

Zur Deletion des Donors wurde pAK7 mit *BstBI* aufgeschnitten, so dass die Donorsequenz herausfiel, und religiert.

4.6.6 pAK37 und pAK36

Austausch des Hygromycinresistenzgens in pAK7 und pAK6 durch das Puromycinresistenzgen aus pMS(Y)X über *SnaBI* und *SwaI*.

4.6.7 pAK29, pAK21 und pAK24

In pRTS wurde zwischen die Schnittstellen *BglII* und *SwaI* eine *PacI*-Schnittstelle eingeführt, in die die Rekombinationskassette eingefügt wurde oder nicht (pAK21 und 24). Über *SfiI* wurden die Gene von AID und dem NGF-Rezeptor eingefügt.

4.6.8 pAK39

Das 3'-Ende des Donor-GFP-Gens wurde zwischen den Schnittstellen *BstBI* im GFP-Gen und *KpnI* in pAK7 deletiert.

4.6.9 pAK41

Das Rad51-Gen wurde von cDNA aus Raji mittels PCR amplifiziert und in pCR2.1-TOPO inseriert. Über *SalI* und *XhoI* wurde die IRES-NFG-Rezeptor Sequenz aus pAK21 hinter das RAD51-Gen eingefügt. Über *SfiI* wurde die Rad51-Expressionskassette in pRTS umgesetzt.

4.7 Techniken zur Isolierung und Analyse von RNA

4.7.1 Spektrometrische Quantifizierung von RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in einer Lösung wurde das Photometer verwendet. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen (A_{260}). Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1 ungefähr einer Menge von 40µg/ml. So ergibt sich die Formel: RNA-Konzentration [µg/ml] = $A_{260} \times 40 \times Verdünnung$

4.7.2 Qualitätskontrolle von RNA

Durch Gelelektrophorese lässt sich ermitteln, ob die RNA nach der Präparation noch intakt ist. Je 5µl der RNA-Proben wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 90V aufgetrennt.

RNA-Laufpuffer	DEPC-H ₂ O
1x MOPS	0,01% Diethylpyrocarbonat
in DEPC- H ₂ O	in H ₂ O _{bid.}
	autoklaviert

5x RNA-Ladepuffer	RNA-Agarosegel
62,5% Formamid	1g Agarose
9,25% Formaldehyd	1x MOPS
1,25x MOPS	5% Formaldehyd
50µg/ml Bromphenolblau	in DEPC- H ₂ O
in DEPC- H ₂ O	

10x MOPS –Puffer

500µg Ethidiumbromid

200mM MOPS (4-Morpholin-Propanschwefelsäure) 80mM Natriumacetat 10mM EDTA

4.7.3 Präparation von RNA aus Zellen

(RNeasy Mini Kit, Qiagen)

Um die RNA aus Zellen zu isolieren, wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet, der auf Säulchen mit RNA bindender Silikatgel-Membran basiert.

In der Regel wurden $3x10^6$ Zellen für die Isolation abgenommen und weiter nach Herstellerempfehlung verfahren. Die Zellen wurden hier durch fünfmaliges Auf- und Abziehen durch eine 0,9mm Nadel in einer 1ml Spritze homogenisiert.

4.7.4 Erststrang cDNA-Synthese

(1st Strand cDNA Synthesis Kit, Roche)

Mit Hilfe der reversen Transkriptase kann RNA in einzelsträngige cDNA transkribiert werden. Die RT hat eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität und benötigt einen

Primer, der sich an das 3'-Ende des RNA-Moleküls anlagert, um die DNA-Synthese zu initiieren. Für die cDNA-Synthese wurde 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Der **1st Strand cDNA Synthesis Kit** beinhaltet einen Reaktionspuffer, freie dNTPs und Oligo-p(dT)₁₅ Primer. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription bei 42°C für 1 Stunde. Durch Erhitzen auf 99°C für 5 Minuten wurde die reverse Transkriptase inaktiviert.

Der Reaktionsansatz für eine cDNA-Synthese setzt sich wie folgt zusammen:

RNA	ca. 1µg
10xPuffer	2µ1
dNTP-Mix	4µ1
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	2µ1
RNase Inhibitor	1µ1
AMV Reverse Transkriptase	0,8µl
H ₂ O	auf 20µl auffüllen

4.8 Proteinbiochemische Methoden

4.8.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung der Proteine wurden 3x10⁶ Zellen bei 1200rpm für 5 Minuten sedimentiert und mit PBS gewaschen. Zu dem Zellpellet wurden 60µl heißer 2x Laemmli Probenpuffer zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Der Laemmli Probenpuffer enthielt kein BROMPHENOLBLAU und kein DTT, da diese beiden Substanzen bei der späteren Proteinquantifizierung stören würden. Um die Degradation der Proteine durch Proteasen zu minimieren, wurden Proteaseinhibitoren zugegeben (Protease Inhibitor Complete Mini Tabletten, Roche). Die Proben wurden 5 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend gut gemischt. Die Lysate wurden für weitere Experimente verwendet bzw. bei –20°C eingefroren.

2x Laemmli Probenpuffer

4% SDS20% Glycerin250mM Tris

(DC Protein Assay, Bio-Rad)

Die Menge des Proteins wurde mit Hilfe des DC Protein Assay (Bio-Rad) photometrisch bestimmt. Dieser Assay funktioniert ähnlich wie der Lowry Assay (Lowry et al., 1951)und ist kompatibel mit dem Laemmli-Probenpuffer, der 2,5% SDS enthält. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt unter Nutzung des mitgelieferten Proteinkonzentrationsstandards.

4.8.3 SDS-PA-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970

Bei dieser Methode wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel (PA-Gel) aufgetrennt, das 0,1% SDS enthält. Zur Vorbereitung wurde zu jeder Probe jeweils 1/10 Volumen 1M DTT und 1/10 Volumen Bromphenolblau-Lösung gegeben und diese 5 Minuten bei 100°C aufgekocht.

Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Die vorbereiteten Proben wurden auf das mit Laemmli-Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard mitgeführt (siehe 4.1.3.2). Die Elektrophorese wurde in einer Höfer-Vorrichtung (Amersham Pharmacia, Braunschweig) bei 100V durchgeführt.

Trenngel 10%

4ml	H ₂ O
3,3ml	30% Acrylamid (rotiphorese Gel 30, Roth)
2,5ml	1,5M Tris pH 8,8
100µ1	10% SDS
100µ1	10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)
4µl	10% TEMED (N,N,N`,N`- Tetramethylendiamin)

Trenngel 12%

3,3ml	H_2O
4ml	30% Acrylamid
2,5ml	1,5M Tris pH 8,8
100µ1	10% SDS
100µ1	10% APS
4ul	10% TEMED

Sammelgel		10x Laemmli Laufpuffer
3,4ml	H ₂ O	250mM Tris
840µ1	30% Acrylamid	1,92M Glycin
625µl	1M Tris pH 6,8	1% SDS
50µ1	10% SDS	auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen
50µ1	10% APS	
3µl	10% TEMED	

4.8.4 Western-Blot

Bei der Western-Blot Analyse handelt es sich um den elektrischen Transfer von den in einem SDS-PA-Gel aufgetrennten Proteinen auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran. Es wurde ein sogenannter "Nass-Blot" in einem Bio-Rad-Tank durchgeführt, bei dem die gesamte Blotvorrichtung mit Blotpuffer überdeckt ist. Vor dem Blotvorgang wurde die Nitrozellulosemembran (Hybond-P, Amersham Pharmacia, Braunschweig) in Methanol angefeuchtet. Anschließend wurde die Membran in Wasser gewaschen und fünf Minuten in Blotpuffer equilibriert. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls fünf Minuten in Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurde die Nitrozellulosemembran gelegt und auf diese vier weitere in Blotpuffer getränkte Filterpapiere. Dieser Aufbau wurde zwischen Anode und Kathode so angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Membran wanderten. Die Transferkammer wurde mit Blotpuffer gefüllt und für eine Stunde unter Rühren ein elektrisches Feld von 100V angelegt. Anschließend wurde die Membran in PBS gewaschen und für fünf Minuten reversibel mit Ponceau S gefärbt. Für weitere Analysen wurde die Membran in Wasser gewaschen bis die Ponceau S Färbung entfernt war.

10x Blotpuffer (ohne Methanol)250mM Tris1,92M Glycin

1x Blotpuffer1x Blotpuffer20% Methanol

10x Ponceau S2% Ponceau S30% Trichloressigsäure30% Sulfosalicylsäure

4.8.5 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper

Spezifische Proteine wurden durch Färbung mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Auf diese Weise konnten die Banden, in denen das gesuchte Protein enthalten war, gezielt angefärbt werden. Der Proteinnachweis erfolgt über zwei Antikörper. Der Erstantikörper bindet spezifisch das gesuchte Protein und mit Hilfe des Zweitantikörpers, der den Erstantikörper spezifisch bindet, wird das Protein mittels einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Das emittiert Licht kann durch die Exposition eines lichtsensitiven Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia, Braunschweig) nachgewiesen werden.

Die Blotmembran wurde, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, in einer 5% Milchpulver-PBS-Lösung zwischen 30 und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur oder 4°C auf einem Schüttler durchgeführt. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der in einer 1%-Milchpulver-Lösung (+ 0,05% Azid) verdünnt wurde, über Nacht inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend wurde sie mit dem Zweitantikörper, der in einer 1% Milchpulver-Lösung verdünnt wurde, für 1 bis 3 Stunden inkubiert. Der nicht gebundene Zweitantikörper wurde durch dreimaliges 10-minütiges Waschen in PBS entfernt. Dann wurde mit dem ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia, Braunschweig) die Chemolumineszenz-Reaktion angeregt. Die Membran wurde auf einen Film aufgelegt und der Film anschließend in einer Kodak-Entwicklungsmaschine entwickelt.

Die für die Immundetektion verwendeten Antikörper, deren Verdünnungen und benutzten Inkubationslösungen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

4.9 Zytoplasma-Kern-Fraktionierung

Die Fraktionierung wurde angewandt, um die Verteilung von Proteinen in der Zelle zu bestimmen. Dazu mussten das Zytoplasma von den Zellkernen getrennt werden und für eine vergleichende Analyse gleiche Anteile auf das SDS-PA-Gel geladen werden.

Für die Fraktionierung wurden $3x10^6$ Zellen abgenommen und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 90µl Mendez A resuspendiert und davon 30µl als Gesamtfraktion abgenommen. Die verbliebenen 60µl Zellsuspension wurden mit 40µl Mendez A aufgefüllt und 0,4µl 10% TritonX zu einer finalen Konzentration von 0,04% zur Lyse der Zellmembran zugesetzt. Die Reaktion wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Die Kerne wurden dann durch Zentrifugation für 4 min bei 1300rpm und bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge sedimentiert. Das Kernpellet wurde mit 150µl Mendez A und Zentrifugation wie zuvor beschrieben

gewaschen. Das erhaltene Pellet stellt die Kernfraktion dar. Der Überstand aus der ersten Zentrifugation wurde für 1 Std. bei 4°C und voller Geschwindigkeit der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde als Zytoplasmafraktion weiterverwendet. Zur Analyse der Fraktionen wurden der Zytoplasmafraktion und der Kernfraktion je 100µl

Laemmli-Probenpuffer (siehe SDS-PAGE) und der Gesamtfraktion 70 μ l Laemmli-Probenpuffer zugesetzt. Es wurden je 14 μ l der Zytoplasma- und der Gesamtfraktion und 7 μ l der Kernfraktion auf das SDS-PA-Gel geladen.

Mendez A

10mM	Hepes
10mM	KCl
1,5mM	MgCl ₂
10%	Glycerol
0,34M	Sucrose
0,5mM	DTT

Protease inhibitor (Protease Inhibitor Complete Mini Tabletten, Roche)

5 Zusammenfassung

Während der T-Zell-abhängigen Immunantwort bilden die aktivierten B-Lymphozyten das Keimzentrum, in dem Klassenwechselrekombination und somatische Hypermutation stattfinden. Der Mechanismus dieser Prozesse ist besonders im Falle der somatischen Hypermutation noch weitgehend unbekannt. Als essentieller Faktor konnte bisher die Aktivierungsinduzierte Cytidindeaminase AID identifiziert werden, die über Läsionen Mutationen und eventuell auch DNA-Doppelstrangbrüche in die DNA einführen kann. Da DNA-Brüche für die Zelle potentiell gefährlich sind, ist eine sehr stringente Regulation der DNA-Reparatur besonders in B-Zellen notwendig, denn eine fehlgeleitete Reparatur in B-Zellen kann zur Tumorentstehung beitragen. Prinzipiell haben die Zellen zwei Möglichkeiten DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren: die nicht homologen Endverknüpfung und die homologe Rekombination. Letztere unterteilt sich in die fehlerfreie konservative und die potentiell aberrante nicht konservative Rekombination.

In dieser Arbeit wurde die Regulation und Aktivität der Doppelstrangbruchreparatur, im Besonderen der homologen Rekombination, in B-Zellen untersucht. Diese Analysen sollten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung dieses Prozesses an der somatischen Hypermutation geben und ergründen, wie B-Zellen auf die AID-abhängigen DNA-Läsionen reagieren.

Eine Analyse der Expression von Doppelstrangbruchreparaturfaktoren in primären B-Zellen und B-Lymphomzelllinien ergab eine erhöhte Expression dieser Faktoren in Keimzentrums-B-Zellen, die unter Anderem auf eine proliferationsgekoppelten Regulation der Reparaturgene zurückzuführen ist. Auffällig besonders die differentielle Expression war des Rekombinationsfaktors Rad51 in den Zelllinien. Die Bestimmung der Aktivität der homologen Rekombination in diesen Zellen mit Hilfe eines extrachromosomalen Reporters, der auf zwei hintereinander liegenden nicht funktionellen GFP-Genen basiert, zeigte eine Hyperrekombinationsaktivität für einige Zelllinien. In einem Tetracyclin regulierbaren System konnte transkriptionsgekoppelte Hyperrekombination gezeigt werden, die mit AID-Expressionsmengen korreliert. Es handelt sich dabei um fast ausschließlich nicht konservative Rekombination. Eine Nutzung der konservativen Rekombination konnte mit Rad51-Expressionsmengen korreliert werden. Eine Überexpression von AID bewirkte eine Erhöhung der Rekombinations- und der Hypermutationsaktivität. Folglich führt AID wahrscheinlich eine erhöhte Anzahl von Brüchen in die DNA ein, während Rad51 Einfluss auf die Wahl des Rekombinationsweges nehmen kann. In den reparierten GFP-Genen konnten keine Mutationen gefunden werden. Somit ist die Rekombinationsaktivität wohl eher eine Folge der AIDinduzierten Brüche, als ein an der somatischen Hypermutation direkt beteiligter Weg. Die präferentielle Nutzung nicht konservativer Rekombination in den B-Lymphomzelllinien weist auf mögliche Folgen oder auch Ursachen der Lymphomentstehung hin oder ist eine von den Keimzentrumsprozessen geforderte physiologische Bedingung in Keimzentrums-B-Zellen, um einen Beitrag zur Antikörper-Diversifizieung zu leisten. Diese Fragen könnten durch weitere Untersuchungen geklärt werden, die die Rolle von AID in der Induktion der Rekombination betreffen und den Einfluss von Rad51 auf die Rekombinationswege.

6 Literaturverzeichnis

- Alizadeh, A.A., M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J. Hudson, Jr., L. Lu, D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M.R. Grever, J.C. Byrd, D. Botstein, P.O. Brown, and L.M. Staudt. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403:503-11.
- Arakawa, H., J. Hauschild, and J.M. Buerstedde. 2002. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science*. 295:1301-6.
- Arnaudeau, C., L. Rozier, C. Cazaux, M. Defais, D. Jenssen, and T. Helleday. 2001. RAD51 supports spontaneous non-homologous recombination in mammalian cells, but not the corresponding process induced by topoisomerase inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 29:662-7.
- Azuma, T., N. Motoyama, L.E. Fields, and D.Y. Loh. 1993. Mutations of the chloramphenicol acetyl transferase transgene driven by the immunoglobulin promoter and intron enhancer. *Int Immunol.* 5:121-30.
- Begum, N.A., K. Kinoshita, M. Muramatsu, H. Nagaoka, R. Shinkura, and T. Honjo. 2004. De novo protein synthesis is required for activation-induced cytidine deaminasedependent DNA cleavage in immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:13003-7.
- Bemark, M., and M.S. Neuberger. 2003. By-products of immunoglobulin somatic hypermutation. *Genes Chromosomes Cancer*. 38:32-9.
- Berek, C., A. Berger, and M. Apel. 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*. 67:1121-9.
- Betz, A.G., C. Milstein, A. Gonzalez-Fernandez, R. Pannell, T. Larson, and M.S. Neuberger. 1994. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell*. 77:239-48.
- Betz, A.G., C. Rada, R. Pannell, C. Milstein, and M.S. Neuberger. 1993. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2385-8.
- Bhattacharyya, A., U.S. Ear, B.H. Koller, R.R. Weichselbaum, and D.K. Bishop. 2000. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. J Biol Chem. 275:23899-903.
- Bishop, A.J., C. Barlow, A.J. Wynshaw-Boris, and R.H. Schiestl. 2000. Atm deficiency causes an increased frequency of intrachromosomal homologous recombination in mice. *Cancer Res.* 60:395-9.

- Bishop, A.J., M.C. Hollander, B. Kosaras, R.L. Sidman, A.J. Fornace, Jr., and R.H. Schiestl. 2003. Atm-, p53-, and Gadd45a-deficient mice show an increased frequency of homologous recombination at different stages during development. *Cancer Res.* 63:5335-43.
- Blum, K.A., G. Lozanski, and J.C. Byrd. 2004. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 104:3009-20.
- Bogue, M., and D.B. Roth. 1996. Mechanism of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol*. 8:175-80.
- Bransteitter, R., P. Pham, M.D. Scharff, and M.F. Goodman. 2003. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:4102-7.
- Brar, S.S., M. Watson, and M. Diaz. 2004. Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J Biol Chem.* 279:26395-401.
- Brenner, S., and C. Milstein. 1966. Origin of antibody variation. Nature. 211:242-3.
- Bross, L., M. Muramatsu, K. Kinoshita, T. Honjo, and H. Jacobs. 2002. DNA double-strand breaks: prior to but not sufficient in targeting hypermutation. *J Exp Med.* 195:1187-92.
- Canman, C.E., and D.S. Lim. 1998. The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene*. 17:3301-8.
- Casellas, R., A. Nussenzweig, R. Wuerffel, R. Pelanda, A. Reichlin, H. Suh, X.F. Qin, E. Besmer, A. Kenter, K. Rajewsky, and M.C. Nussenzweig. 1998. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *Embo J.* 17:2404-11.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M.J. Kruhlak, D.R. Pilch, D.W. Staudt, A. Lee, R.F. Bonner, W.M. Bonner, and A. Nussenzweig. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*. 5:675-9.
- Celeste, A., S. Petersen, P.J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, O.A.
 Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M.J. Difilippantonio, C.
 Redon, D.R. Pilch, A. Olaru, M. Eckhaus, R.D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F.
 Livak, K. Manova, W.M. Bonner, M.C. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2002.
 Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*. 296:922-7.
- Cerutti, A., A. Schaffer, R.G. Goodwin, S. Shah, H. Zan, S. Ely, and P. Casali. 2000. Engagement of CD153 (CD30 ligand) by CD30+ T cells inhibits class switch DNA recombination and antibody production in human IgD+ IgM+ B cells. *J Immunol*. 165:786-94.
- Chaudhuri, J., C. Khuong, and F.W. Alt. 2004. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature*. 430:992-8.
- Cho, J.W., G.J. Khalsa, and J.A. Nickoloff. 1998. Gene-conversion tract directionality is influenced by the chromosome environment. *Curr Genet*. 34:269-79.

- Cohen, Y., M. Dardalhon, and D. Averbeck. 2002. Homologous recombination is essential for RAD51 up-regulation in Saccharomyces cerevisiae following DNA crosslinking damage. *Nucleic Acids Res.* 30:1224-32.
- Davis, A.P., and L.S. Symington. 2001. The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates single-strand annealing. *Genetics*. 159:515-25.
- Davis, A.P., and L.S. Symington. 2004. RAD51-dependent break-induced replication in yeast. *Mol Cell Biol*. 24:2344-51.
- Di Noia, J., and M.S. Neuberger. 2002. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 419:43-8.
- Diaz, M., L.K. Verkoczy, M.F. Flajnik, and N.R. Klinman. 2001. Decreased frequency of somatic hypermutation and impaired affinity maturation but intact germinal center formation in mice expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *J Immunol*. 167:327-35.
- Dickerson, S.K., E. Market, E. Besmer, and F.N. Papavasiliou. 2003. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med.* 197:1291-6.
- Dorner, T., S.J. Foster, N.L. Farner, and P.E. Lipsky. 1998. Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: targeting of RGYW motifs on both DNA strands. *Eur J Immunol*. 28:3384-96.
- Drexler, G.A., S. Rogge, W. Beisker, F. Eckardt-Schupp, M.Z. Zdzienicka, and E. Fritz. 2004a. Spontaneous homologous recombination is decreased in Rad51C-deficient hamster cells. *DNA Repair (Amst)*. 3:1335-43.
- Drexler, G.A., S. Wilde, W. Beisker, J. Ellwart, F. Eckardt-Schupp, and E. Fritz. 2004b. The rate of extrachromosomal homologous recombination within a novel reporter plasmid is elevated in cells lacking functional ATM protein. *DNA Repair (Amst)*. 3:1345-53.
- Faili, A., S. Aoufouchi, E. Flatter, Q. Gueranger, C.A. Reynaud, and J.C. Weill. 2002. Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature*. 419:944-7.
- Feldmann, E., V. Schmiemann, W. Goedecke, S. Reichenberger, and P. Pfeiffer. 2000. DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* 28:2585-96.
- Fishman-Lobell, J., N. Rudin, and J.E. Haber. 1992. Two alternative pathways of doublestrand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol.* 12:1292-303.
- Fukita, Y., H. Jacobs, and K. Rajewsky. 1998. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity*. 9:105-14.
- Gatti, L., and F. Zunino. 2005. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol Med.* 111:127-48.

- Goodman, M.F., and B. Tippin. 2000. Sloppier copier DNA polymerases involved in genome repair. *Curr Opin Genet Dev.* 10:162-8.
- Goossens, T., U. Klein, and R. Kuppers. 1998. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:2463-8.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80.
- Hecht, J.L., and J.C. Aster. 2000. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol*. 18:3707-21.
- Helleday, T. 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res.* 532:103-15.
- Hendricks, C.A., K.H. Almeida, M.S. Stitt, V.S. Jonnalagadda, R.E. Rugo, G.F. Kerrison, and B.P. Engelward. 2003. Spontaneous mitotic homologous recombination at an enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) cDNA direct repeat in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:6325-30.
- Henning, W., and H.W. Sturzbecher. 2003. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology*. 193:91-109.
- Hollowood, K., and J.R. Goodlad. 1998. Germinal centre cell kinetics. J Pathol. 185:229-33.
- Hopfner, K.P., C.D. Putnam, and J.A. Tainer. 2002. DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol*. 12:115-22.
- Ichikawa, A. 2000. Prognostic and predictive significance of p53 mutation in aggressive B-cell lymphoma. *Int J Hematol*. 71:211-20.
- Imai, K., G. Slupphaug, W.I. Lee, P. Revy, S. Nonoyama, N. Catalan, L. Yel, M. Forveille, B. Kavli, H.E. Krokan, H.D. Ochs, A. Fischer, and A. Durandy. 2003. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol.* 4:1023-8.
- Ira, G., and J.E. Haber. 2002. Characterization of RAD51-independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Mol Cell Biol*. 22:6384-92.
- Ito, S., H. Nagaoka, R. Shinkura, N. Begum, M. Muramatsu, M. Nakata, and T. Honjo. 2004. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:1975-80.
- Jacob, J., G. Kelsoe, K. Rajewsky, and U. Weiss. 1991. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 354:389-92.
- Kanaar, R., J.H. Hoeijmakers, and D.C. van Gent. 1998. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol*. 8:483-9.

Kelsoe, G. 1995. In situ studies of the germinal center reaction. Adv Immunol. 60:267-88.

- Kobayashi, J., H. Tauchi, S. Sakamoto, A. Nakamura, K. Morishima, S. Matsuura, T. Kobayashi, K. Tamai, K. Tanimoto, and K. Komatsu. 2002. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol.* 12:1846-51.
- Kuppers, R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer. 5:251-62.
- Kuppers, R., and R. Dalla-Favera. 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 20:5580-94.
- Kuppers, R., U. Klein, M.L. Hansmann, and K. Rajewsky. 1999. Cellular origin of human Bcell lymphomas. N Engl J Med. 341:1520-9.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Lafaille, J.J., A. DeCloux, M. Bonneville, Y. Takagaki, and S. Tonegawa. 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.
- Landau, N.R., D.G. Schatz, M. Rosa, and D. Baltimore. 1987. Increased frequency of Nregion insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol Cell Biol*. 7:3237-43.
- Lebecque, S.G., and P.J. Gearhart. 1990. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med.* 172:1717-27.
- Lee, S.E., R.A. Mitchell, A. Cheng, and E.A. Hendrickson. 1997. Evidence for DNA-PKdependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 17:1425-33.
- Li, M.J., and N. Maizels. 1997. Nuclear Rad51 foci induced by DNA damage are distinct from Rad51 foci associated with B cell activation and recombination. *Exp Cell Res*. 237:93-100.
- Lieber, M.R., Y. Ma, U. Pannicke, and K. Schwarz. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:712-20.
- Lim, J.W., H. Kim, and K.H. Kim. 2002. Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NFkappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem*. 277:46093-100.
- Lin, F.L., K. Sperle, and N. Sternberg. 1985. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:1391-5.
- Linke, S.P., S. Sengupta, N. Khabie, B.A. Jeffries, S. Buchhop, S. Miska, W. Henning, R. Pedeux, X.W. Wang, L.J. Hofseth, Q. Yang, S.H. Garfield, H.W. Sturzbecher, and C.C. Harris. 2003. p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res.* 63:2596-605.

50.

- Liu, Y.J., J. Zhang, P.J. Lane, E.Y. Chan, and I.C. MacLennan. 1991. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol*. 21:2951-62.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-75.
- Lundin, C., N. Schultz, C. Arnaudeau, A. Mohindra, L.T. Hansen, and T. Helleday. 2003. RAD51 is involved in repair of damage associated with DNA replication in mammalian cells. *J Mol Biol*. 328:521-35.
- Maier, S., M. Santak, A. Mantik, K. Grabusic, E. Kremmer, W. Hammerschmidt, and B. Kempkes. 2005. A somatic knockout of CBF1 in a human B-cell line reveals that induction of CD21 and CCR7 by EBNA-2 is strictly CBF1 dependent and that downregulation of immunoglobulin M is partially CBF1 independent. *J Virol.* 79:8784-92.
- Manis, J.P., D. Dudley, L. Kaylor, and F.W. Alt. 2002. IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity*. 16:607-17.
- McKean, D., K. Huppi, M. Bell, L. Staudt, W. Gerhard, and M. Weigert. 1984. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:3180-4.
- Mekeel, K.L., W. Tang, L.A. Kachnic, C.M. Luo, J.S. DeFrank, and S.N. Powell. 1997. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene*. 14:1847-57.
- Muramatsu, M., V.S. Sankaranand, S. Anant, M. Sugai, K. Kinoshita, N.O. Davidson, and T. Honjo. 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.* 274:18470-6.
- Nambu, Y., M. Sugai, H. Gonda, C.G. Lee, T. Katakai, Y. Agata, Y. Yokota, and A. Shimizu. 2003. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science*. 302:2137-40.
- Neri, A., F. Barriga, D.M. Knowles, I.T. Magrath, and R. Dalla-Favera. 1988. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* USA. 85:2748-52.
- Okazaki, I.M., H. Hiai, N. Kakazu, S. Yamada, M. Muramatsu, K. Kinoshita, and T. Honjo. 2003. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med.* 197:1173-81.
- Paffett, K.S., J.A. Clikeman, S. Palmer, and J.A. Nickoloff. 2005. Overexpression of Rad51 inhibits double-strand break-induced homologous recombination but does not affect gene conversion tract lengths. *DNA Repair (Amst)*. 4:687-98.
- Papavasiliou, F.N., and D.G. Schatz. 2000. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature*. 408:216-21.
- Paques, F., and J.E. Haber. 1999. Multiple pathways of recombination induced by doublestrand breaks in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:349-404.
- Paques, F., W.Y. Leung, and J.E. Haber. 1998. Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 18:2045-54.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R.S. Chaganti, R. Kuppers, and R. Dalla-Favera. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 412:341-6.
- Paull, T.T., and J.H. Lee. 2005. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle*. 4:737-40.
- Paull, T.T., E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert, and W.M. Bonner. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 10:886-95.
- Peakman, M.C., and N. Maizels. 1998. Localization of splenic B cells activated for switch recombination by in situ hybridization with Igamma1 switch transcript and Rad51 probes. *J Immunol*. 161:4008-15.
- Peters, A., and U. Storb. 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity*. 4:57-65.
- Petersen-Mahrt, S.K., R.S. Harris, and M.S. Neuberger. 2002. AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*. 418:99-103.
- Phan, R.T., and R. Dalla-Favera. 2004. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*. 432:635-9.
- Pierce, A.J., P. Hu, M. Han, N. Ellis, and M. Jasin. 2001. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev*. 15:3237-42.
- Pilch, D.R., O.A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig, and W.M. Bonner. 2003. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol.* 81:123-9.
- Prado, F., and A. Aguilera. 2003. Control of cross-over by single-strand DNA resection. *Trends Genet.* 19:428-31.
- Prise, K.M., G. Schettino, M. Folkard, and K.D. Held. 2005. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol.* 6:520-8.

- Rada, C., J.M. Di Noia, and M.S. Neuberger. 2004. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell*. 16:163-71.
- Rada, C., J.M. Jarvis, and C. Milstein. 2002. AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7003-8.
- Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. Nature. 381:751-8.
- Ramiro, A.R., M. Jankovic, T. Eisenreich, S. Difilippantonio, S. Chen-Kiang, M. Muramatsu, T. Honjo, A. Nussenzweig, and M.C. Nussenzweig. 2004. AID is required for cmyc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*. 118:431-8.
- Richardson, C., J.M. Stark, M. Ommundsen, and M. Jasin. 2004. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene*. 23:546-53.
- Rockwood, L.D., A. Nussenzweig, and S. Janz. 2003. Paradoxical decrease in mutant frequencies and chromosomal rearrangements in a transgenic lacZ reporter gene in Ku80 null mice deficient in DNA double strand break repair. *Mutat Res.* 529:51-8.
- Rogozin, I.B., and N.A. Kolchanov. 1992. Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1171:11-8.
- Rogozin, I.B., Y.I. Pavlov, K. Bebenek, T. Matsuda, and T.A. Kunkel. 2001. Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase eta error spectrum. *Nat Immunol*. 2:530-6.
- Rolink, A., F. Melchers, and J. Andersson. 1996. The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity*. 5:319-30.
- Rothenfluh, H.S., L. Taylor, A.L. Bothwell, G.W. Both, and E.J. Steele. 1993. Somatic hypermutation in 5' flanking regions of heavy chain antibody variable regions. *Eur J Immunol*. 23:2152-9.
- Ruckerl, F., R. Mailhammer, and J. Bachl. 2004. Dual reporter system to dissect cis- and trans-effects influencing the mutation rate in a hypermutating cell line. *Mol Immunol*. 41:1135-43.
- Rudin, N., E. Sugarman, and J.E. Haber. 1989. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. 122:519-34.
- Saintigny, Y., D. Rouillard, B. Chaput, T. Soussi, and B.S. Lopez. 1999. Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene*. 18:3553-63.
- Sale, J.E., D.M. Calandrini, M. Takata, S. Takeda, and M.S. Neuberger. 2001. Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation. *Nature*. 412:921-6.

- Sale, J.E., and M.S. Neuberger. 1998. TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity*. 9:859-69.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. and T. Manatis. 1989.Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Habor Laboratory Press*
- Schildkraut, E., C.A. Miller, and J.A. Nickoloff. 2005. Gene conversion and deletion frequencies during double-strand break repair in human cells are controlled by the distance between direct repeats. *Nucleic Acids Res.* 33:1574-80.
- Schlee, M. 2003. Identifizierung und Charakterisierung vob Zielgenen des Epstein Barr Virus nukleären Antigens 2 (EBNA2). *Doktorarbeit*
- Sedletska, Y., M.J. Giraud-Panis, and J.M. Malinge. 2005. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*. 5:251-65.
- Shen, H.M., and U. Storb. 2004. Activation-induced cytidine deaminase (AID) can target both DNA strands when the DNA is supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:12997-3002.
- Shiloh, Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 3:155-68.
- Smih, F., P. Rouet, P.J. Romanienko, and M. Jasin. 1995. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 23:5012-9.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 98:503-17.
- Starczynski, J., W. Simmons, J.R. Flavell, P.J. Byrd, G.S. Stewart, H.S. Kullar, A. Groom, J. Crocker, P.A. Moss, G.M. Reynolds, M. Glavina-Durdov, A.M. Taylor, C. Fegan, T. Stankovic, and P.G. Murray. 2003. Variations in ATM protein expression during normal lymphoid differentiation and among B-cell-derived neoplasias. *Am J Pathol.* 163:423-32.
- Stavnezer, J. 1996. Antibody class switching. Adv Immunol. 61:79-146.
- Storb, U., A. Peters, E. Klotz, N. Kim, H.M. Shen, K. Kage, B. Rogerson, and T.E. Martin. 1998. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription. *Curr Top Microbiol Immunol*. 229:11-9.
- Szostak, J.W., T.L. Orr-Weaver, R.J. Rothstein, and F.W. Stahl. 1983. The double-strandbreak repair model for recombination. *Cell*. 33:25-35.
- Taccioli, G.E., G. Rathbun, E. Oltz, T. Stamato, P.A. Jeggo, and F.W. Alt. 1993. Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science*. 260:207-10.

- Takata, M., M.S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, and S. Takeda. 1998. Homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J.* 17:5497-508.
- Thoma, F. 2005. Repair of UV lesions in nucleosomes- intrinsic properties and remodeling. DNA Repair (Amst).
- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 302:575-81.
- Tsai, H.F., N. D'Avirro, and E. Selsing. 2002. Gene conversion-like sequence transfers in a mouse antibody transgene: antigen selection allows sensitive detection of V region interactions based on homology. *Int Immunol*. 14:55-64.
- van Heemst, D., L. Brugmans, N.S. Verkaik, and D.C. van Gent. 2004. End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair (Amst)*. 3:43-50.
- Wang, C.L., R.A. Harper, and M. Wabl. 2004. Genome-wide somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:7352-6.
- Wiesendanger, M., B. Kneitz, W. Edelmann, and M.D. Scharff. 2000. Somatic hypermutation in MutS homologue (MSH)3-, MSH6-, and MSH3/MSH6-deficient mice reveals a role for the MSH2-MSH6 heterodimer in modulating the base substitution pattern. J Exp Med. 191:579-84.
- Wilson, P.C., O. de Bouteiller, Y.J. Liu, K. Potter, J. Banchereau, J.D. Capra, and V. Pascual. 1998. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. J Exp Med. 187:59-70.
- Xu, B., and E. Selsing. 1994. Analysis of sequence transfers resembling gene conversion in a mouse antibody transgene. *Science*. 265:1590-3.
- Yelamos, J., N. Klix, B. Goyenechea, F. Lozano, Y.L. Chui, A. Gonzalez Fernandez, R. Pannell, M.S. Neuberger, and C. Milstein. 1995. Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature*. 376:225-9.
- Yoon, D., Y. Wang, K. Stapleford, L. Wiesmuller, and J. Chen. 2004. P53 inhibits strand exchange and replication fork regression promoted by human Rad51. *J Mol Biol.* 336:639-54.
- Yu, J., and L. Zhang. 2005. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 331:851-8.
- Yun, S., A.C.C. Lie, and A.C. Porter. 2004. Discriminatory suppression of homologous recombination by p53. Nucleic Acids Res. 32:6479-89.
- Zan, H., A. Komori, Z. Li, A. Cerutti, A. Schaffer, M.F. Flajnik, M. Diaz, and P. Casali. 2001. The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity*. 14:643-53.

- Zan, H., X. Wu, A. Komori, W.K. Holloman, and P. Casali. 2003. AID-dependent generation of resected double-strand DNA breaks and recruitment of Rad52/Rad51 in somatic hypermutation. *Immunity*. 18:727-38.
- Zeng, X., D.B. Winter, C. Kasmer, K.H. Kraemer, A.R. Lehmann, and P.J. Gearhart. 2001. DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol*. 2:537-41.
- Zhang, W., P.D. Bardwell, C.J. Woo, V. Poltoratsky, M.D. Scharff, and A. Martin. 2001. Clonal instability of V region hypermutation in the Ramos Burkitt's lymphoma cell line. *Int Immunol.* 13:1175-84.
- Zhu, Y., S. Nonoyama, T. Morio, M. Muramatsu, T. Honjo, and S. Mizutani. 2003. Type two hyper-IgM syndrome caused by mutation in activation-induced cytidine deaminase. J Med Dent Sci. 50:41-6.

4 Danksagung

Hier möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich möchte ich meiner Betreuerin Dr. Berit Jungnickel danken für die Bereitstellung dieses unheimlich interessanten Themas, die intensive Betreuung, die Diskussionen und Beratung und dafür, dass sie mich immer unterstützt hat.

Vielen Dank auch an André Kutzera für die unentbehrliche praktische Unterstützung und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Ich danke auch Prof. Dr. Dirk Eick für die Übernahme der offiziellen Betreuung, die die Arbeit an der GSF ermöglicht hat, und die unterstützende wissenschaftliche Beratung.

Mein Dank gilt auch Guido Drexler, Eberhard Fritz und Friederike Eckardt-Schupp für die Bereitstellung ihres Rekombinationsreporters und der bereitwilligen Hilfe bei Fragen zur DNA-Reparatur.

Vielen Dank an Jürgen Bachl, nicht nur für den Hypermutationsreporter und die AID-Gene, sondern auch für die Hilfe bei technischen und fachlichen Fragen.

Ein Dank auch an Joachim Ellwart und Karin Nispel für das geduldige Sortieren der wenigen GFP-positiven Zellen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Georg Bornkamm für die Vektoren und die Hilfe bei fachlichen Fragen.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei der gesamten Jungnickel-Arbeitsgruppe bestehend aus Stephi, André, Sandra, Hanna, Isha und Sushmita bedanken für die wirklich tolle Atmosphäre sowohl im Labor als auch außerhalb. Besonders möchte ich mich hier auch bei Stephi Tobollik für die Freundschaft bedanken und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatte und mich so manchesmal vor dem Hungertod bewahrt hat. Vielen Dank an Hanna fürs schnelle Lesen.

Mein Dank geht auch an alle Leute vom ersten Stock des Hämatologikums für fachliche und praktische Hilfe und die Gemeinschaft, besonders im Lunch Club…lecker!

Insbesondere danken möchte ich Cornelia Hömig für ein bisschen Rheinland in Bayern, Florian Rückerl für echt tolle und nicht immer fachbezogene Diskussionen und Julia Rastelli ebenfalls für die Diskussionen und den sportlichen Ausgleich und allen drei möchte ich danken für die Freundschaft.

Zum Schluss möchte ich auch ganz besonders meinen Eltern danken, die immer für mich da waren und mich in jeder nur erdenklichen Hinsicht unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, den 25. Juli 2005

Maren Mierau

Lebenslauf

Maren Mierau	geboren in Köln
	am 12.04.1977

Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulischer Bildungsweg

1983-1987	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Köln Bilderstöckchen
1987-1996	Dreikönigsgymnasium in Köln
1996	Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1996-2001	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
2000-2001	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Klaus Rajewsky, Universität Köln "Gezielte konditionale Geninaktivierung der DNA-Polymerase λ in murinen embryonalen Stammzellen"
Seit Februar 2002	Doktorarbeit am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München zum Thema: "Untersuchung der Regulation und Aktivität der DNA- Doppelstrangbruchreparatur in humanen B-Lymphozyten"