
DIE ROLLE VON P53 WÄHREND DER KEIMZENTRUMSREAKTION

Dissertation

der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
16. August 2010

vorgelegt von

Kerstin Braunschmidt

aus Bad Muskau

angefertigt am
Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

1. Gutachter:

Prof. Dr. Berit Jungnickel

2. Gutachter:

Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung:

08. November 2010

Gewidmet meinem Mann und meiner Familie.

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

A critical role for p53 in the germinal center reaction. Braunschmidt, K., Fischer-Burkardt, S., Küppers, R., Zimmer-Strobl, U. and Jungnickel, B. (Manuskript in Vorbereitung)

Die Arbeit wurde auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

Sonderforschungsbereich TRR54 Teilprojekt A4 in Berlin, 2009 (Vortrag)

„Interact“ PhD Symposium in Martinsried, 2007 (Poster)

Vorarbeiten zu dieser Studie sind in folgende Publikationen eingeflossen:

Non-conservative homologous recombination in human B lymphocytes is promoted by activation-induced cytidine deaminase and transcription. Mierau M, Drexler GA, Kutzera A, Braunschmidt K, Ellwart J, Eckardt-Schupp F, Fritz E, Bachl J and Jungnickel B. Nucleic Acids Res. 2008 Oct; 36(17): 5591-601.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Die adaptive Immunantwort.....	2
2.1.1 Die Diversität des B-Zell-Rezeptors	3
2.1.2 Die Keimzentrumsreaktion.....	5
2.1.3 Die somatische Hypermutation.....	6
2.2 Die Entstehung von B-Zell-Lymphomen	10
2.3 Das Tumorsuppressorgen <i>p53</i>	11
2.3.1 Organisation des p53 Proteins	11
2.3.2 Regulation von p53.....	13
2.3.3 Folgen der p53-Aktivierung	14
2.3.3.1 Inhibierung des Zellzyklus und Regulation der DNA-Reparatur	15
2.3.3.2 Induktion von Apoptose	16
2.3.4 Zusammenhang von p53 und somatischer Hypermutation.....	17
2.4 Zielsetzung der Arbeit.....	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Der Einfluss von p53 auf die somatische Hypermutation in Burkitt-Lymphomzelllinien.....	19
3.1.1 Identifizierung von Burkitt-Lymphomzelllinien mit funktionellem p53	19
3.1.2 Untersuchung der somatischen Hypermutationsaktivität in Burkitt-Lymphomzelllinien mit verschiedenem p53 Status.....	22
3.2 Einfluss von p53 auf die somatische Hypermutation in normalen Keimzentrums-B-Zellen.....	27

3.2.1	p53 Expression in Keimzentrumszellen	27
3.2.2	Untersuchung von T- und B-Zellpopulationen in nicht immunisierten p53 ^{+/+} und p53 ^{-/-} Mäusen.....	28
3.2.3	Untersuchung der Keimzentrumszellen in der Milz von immunisierten p53 ^{+/+} und p53 ^{-/-} Mäusen.....	32
3.2.4	Untersuchung der T-Zellabhängigen Immunantwort in p53 ^{-/-} Mäusen	34
3.2.5	Gestörte Affinitätsreifung in p53 ^{-/-} Mäusen	34
3.2.6	Mutationsanalyse von <i>Ig</i> -Genen und nicht <i>Ig</i> -Genen in p53 ^{+/+} und p53 ^{-/-} Keimzentrumszellen.....	37
3.2.6.1	Analyse der Mutationsfrequenz und des Mutationsmusters in Immunglobulingenen.....	37
3.2.6.2	SHM-Analyse in nicht <i>Ig</i> -Genen (<i>bcl-6</i> und <i>c-myc</i>)	41
3.2.7	Mutationsanalyse des selektierten <i>V_H186.2</i> Gens in p53 ^{+/+} und p53 ^{-/-} Keimzentrumszellen.....	43
4	Diskussion	46
4.1	Funktionelle Analyse von Burkitt-Lymphomzelllinien mit unterschiedlichem p53 Status	46
4.2	Bestimmung der Hypermutationsaktivität in Abhängigkeit von p53 in Burkitt-Lymphomzelllinien.....	49
4.3	Expression und Funktionalität von p53 in murinen Keimzentrums-B-Zellen.....	51
4.4	Verminderte Anzahl der B1-Zellen in p53 ^{-/-} Mäusen.....	52
4.5	Bildung von Keimzentrums-B-Zellen.....	52
4.6	Normal funktionierende <i>Ig</i> -Klassenwechselrekombination in p53 ^{-/-} Mäusen	53
4.7	Gestörte Affinitätsreifung in p53 ^{-/-} Mäusen	54
4.8	Mutationsanalyse der <i>Ig</i> -Gene in Keimzentrums-B-Zellen.....	55
4.9	Mutationsanalyse von nicht <i>Ig</i> -Genen.....	57
4.10	Beeinträchtigte Selektion von Keimzentrums-B-Zellen in p53 ^{-/-} Mäusen	58
4.11	Ausblick	60
5	Material und Methoden	62

5.1	Material.....	62
5.1.1	Chemikalien	62
5.1.2	Geräte	62
5.1.3	Verwendete Kits	63
5.1.4	Datenverarbeitung.....	63
5.1.5	Größenmarker	63
5.1.5.1	DNA-Größenstandard	63
5.1.5.2	Proteingrößenstandard	63
5.1.6	Plasmide	64
5.1.7	Bakterien	64
5.1.8	Zelllinien	64
5.1.9	Antikörper.....	65
5.1.10	Oligonukleotide	66
5.1.11	Enzyme	67
5.1.12	Mausstamm.....	68
5.2	Zellkultur	68
5.2.1	Bestimmung der Zelldichte	68
5.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	69
5.2.3	Zellkulturbedingungen	69
5.2.4	Induktion von p53 durch IR	70
5.2.5	Transfektion von Zellen	70
5.2.6	Bestimmung der Hypermutationsaktivität.....	70
5.2.7	Proliferationsassay	71
5.3	Techniken der DNA-Analyse	72
5.3.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	72
5.3.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	72
5.3.3	DNA-Direkt-Präparation	72
5.3.4	DNA-Präparation aus Mäuseschwänzen	72

5.3.5	DNA-Quantifizierung	73
5.3.6	DNA-Gelelektrophorese	73
5.3.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	73
5.3.8	pGEM-T-Klonierung	75
5.3.9	DNA-Sequenzierung und Datenauswertung	75
5.4	Techniken zur Isolierung und Analyse von RNA	76
5.4.1	Spektrometrische Quantifizierung von RNA	76
5.4.2	Qualitätskontrolle von RNA.....	76
5.4.3	Präparation von RNA aus Zellen.....	76
5.4.3.1	RNeasy Mini Kit.....	76
5.4.3.2	peqGOLD TriFast™-Kit.....	77
5.4.4	Erststrang cDNA-Synthese.....	77
5.4.5	Quantitative RT-PCR	77
5.5	Proteinbiochemische Methoden	79
5.5.1	Präparation von Proteinen aus Zellen.....	79
5.5.2	Proteinquantifizierung.....	80
5.5.3	SDS-PA-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	80
5.5.4	Westernblot.....	81
5.5.5	Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper	82
5.6	Mausanalysen	83
5.6.1	Mausverpaarungen	83
5.6.2	Immunisierung von Mäusen.....	83
5.6.3	Präparation primärer Maus-Lymphozyten.....	83
5.6.4	Isolierung von B-Zellen aus der Milz.....	83
5.6.5	Isolierung von Keimzentrums-B-Zellen	84
5.6.6	FACS-Analyse von verschiedenen Zellpopulationen	84
5.6.7	Immunohistochemie von Gefrierschnitten	85
5.6.8	Präparation von Blutserum aus Mäuseblut.....	86

5.6.9	„Enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA).....	86
5.6.9.1	Bestimmung der spezifischen Standard Ig-Titer.....	86
5.6.9.2	Bestimmung der NP-spezifischen Ig-Titer.....	87
6	Literatur	88
7	Anhang.....	100
7.1	Abkürzungen.....	100
7.2	Danksagung.....	102
7.3	Ehrenwörtliche Erklärung	103
7.4	Erklärung.....	104
7.5	Lebenslauf.....	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Entwicklungsstadien der B-Zellen	4
Abbildung 2 B-Zellaktivierung und die Keimzentrumsreaktion	6
Abbildung 3 Modell der somatischen Hypermutation (nach Di Noia und Neuberger, 2007) ..	8
Abbildung 4 Funktionelle Domänen von p53.....	12
Abbildung 5 p53-Sequenzanalyse und funktioneller Test in verschiedenen BL-Zelllinien	21
Abbildung 6 Reportersystem zur Bestimmung der SHM-Aktivität	23
Abbildung 7 Hypermutationsaktivität von BL100 in Abhängigkeit von p53	24
Abbildung 8 Hypermutationsaktivität von Raji in Abhängigkeit von p53	26
Abbildung 9 mRNA Expressionsmengen von p53 und bcl-2 in Keimzentrums- und naiven B-Zellen	28
Abbildung 10 B-Zellentwicklung im Knochenmark	29
Abbildung 11 B-Zellpopulationen in der Milz.....	30
Abbildung 12 B-Zellpopulationen im Peritoneum.....	31
Abbildung 13 Bildung von Keimzentren und Keimzentrums-B-Zellen in der Milz.....	33
Abbildung 14 Gesamtmenge an verschiedenen Immunglobulinen im Serum	35
Abbildung 15 Bildung NP-spezifischer IgG1 Antikörper während der Immunantwort.....	36
Abbildung 16 Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus	38
Abbildung 17 Mutationsanalyse des J _H 4 Intronbereichs	39
Abbildung 18 Mutationsanalyse des J _H 4 Intronbereichs zweier separater Analysen.....	40
Abbildung 19 Genomische Organisation von <i>bcl-6</i> und <i>c-myc</i>	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Anzahl der T-Zellen in verschiedenen Organen.....	30
Tabelle 2	Mutationsfrequenzen ($\times 10^{-5}$ Mutationen pro bp).....	42
Tabelle 3	Analyse der $V_H186.2$ Sequenzen von Keimzentrums-B-Zellen	44
Tabelle 4	Verwendeten Zelllinien.....	64
Tabelle 5	FACS-Antikörper für die Mausanalyse	65
Tabelle 6	Antikörper für ELISA.....	66
Tabelle 7	Oligonukleotide für die SHM-Analyse	67
Tabelle 8	Oligonukleotide für die RT-PCR	67

1 ZUSAMMENFASSUNG

Eine wesentliche Eigenschaft der humoralen Immunantwort ist die Generierung von B-Lymphozyten mit hochaffinen Antikörpern für ein spezifisches Antigen. Die somatische Hypermutation (SHM) in B-Lymphozyten des Keimzentrums nimmt bei der Affinitätsreifung von Antikörpern eine zentrale Rolle ein. Dabei führt die Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase (AID) DNA-Läsionen in den Locus der Immunglobuline (Ig) ein, und deren fehlerhafte Prozessierung kann so zu einer erhöhten Affinität der Antikörper führen. Die Aktivität von AID ist jedoch nicht nur auf die *Ig*-Gene begrenzt und somit kann eine nicht akkurate Regulation der SHM zur Entstehung von B-Zelllymphomen beitragen. Die Tatsache, dass in über 50 % aller menschlichen Tumoren p53 mutiert vorliegt, und p53 als Tumorsuppressor in vielen Reparaturmechanismen involviert ist, könnte ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Regulationsmechanismen der SHM und p53 sein. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher der Einfluss von p53 auf die SHM-Aktivität während der Keimzentrumsreaktion untersucht werden. Dazu wurden zunächst verschiedene Burkitt-Lymphomzelllinien mit noch funktionalem p53 ausgewählt, und mit einem Transgen-basierten Hypermutationsassay wurde die SHM-Aktivität in Abhängigkeit von p53 ermittelt. Diese Untersuchung zeigte für BL100, dass durch die Hemmung von p53 mit einem chemischen Inhibitor die Hypermutationsrate deutlich erhöht wurde.

Für weitere Untersuchungen wurden p53-defiziente Mäuse herangezogen, welche im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen keine Auffälligkeiten hinsichtlich wesentlicher T- und B-Zellpopulationen und auch der *Ig*-Klassenwechselfunktion aufwiesen. Versuche mit Keimzentrums-B-Zellen der Milz von p53^{-/-} Mäusen zeigten eine moderate, aber signifikante Erhöhung der SHM-Frequenz in den *Ig*-Genen. Sehr interessant war das Ergebnis, dass die Affinitätsreifung von NP-spezifischen Antikörpern in p53^{-/-} B-Zellen erheblich gestört ist. Weitere Analysen zeigten, dass der Selektionsprozess von B-Zellen mit höheraffinen Antikörpern bedeutend beeinträchtigt ist, was die verminderte Affinitätsreifung in p53-defizienten Mäusen erklärt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse geben somit Hinweise auf eine neue Rolle von p53 während der Keimzentrumsreaktion.

2 EINLEITUNG

Das Immunsystem ermöglicht dem Organismus eine Vielzahl von Krankheitserregern und Fremdstoffen zu erkennen und zu eliminieren. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr von pathogenen Mikroorganismen, welche die natürlichen Barrieren des menschlichen Körpers überwunden haben. Dazu gehören unter anderem Gewebemakrophagen und Granulozyten, die für die zelluläre Abwehr zuständig sind und das Komplementsystem, welches zur angeborenen humoralen Immunität in Gewebezweischenräumen und im Blut beiträgt. Wenn die Erreger die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems überwinden oder umgehen, wird eine adaptive Immunantwort ausgelöst. Hierbei entstehen antigenspezifische Effektorzellen, die den Krankheitserreger gezielt angreifen, sowie Gedächtniszellen, welche vor einer erneuten Infektion mit demselben Erreger schützen. (C.A. Janeway, 5. Auflage)

2.1 Die adaptive Immunantwort

Die wichtigsten Bestandteile des adaptiven Immunsystems in Säugetieren sind die B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen). Unterschiedliche T-Zelltypen übernehmen dabei verschiedene Aufgaben, wie z.B. die Aktivierung von B-Zellen oder die Vernichtung von Zellen, die mit Krankheitserregern infiziert sind. Die B-Zellen dagegen produzieren während der Immunantwort Antikörper, welche die Bekämpfung von Pathogenen in extrazellulären Bereichen ermöglichen. Sowohl bei den B-Lymphozyten als auch bei den T-Lymphozyten spielt die Antigenerkennung durch einen spezifischen Rezeptor eine wesentliche Rolle. Während die Entstehung und Differenzierung von B-Zellen im Knochenmark stattfindet, findet die Differenzierung der im Knochenmark entstandenen T-Zellen im Thymus statt. Dabei erfolgt die somatische Umordnung verschiedener Gensegmente, welche für den B- bzw. T-Zell-Rezeptor kodieren (Pancer und Cooper, 2006). Daraufhin folgen weitere Diversifizierungsschritte, die zu einer veränderten Affinität der Antigenrezeptoren führen oder die Effektorfunktion des Rezeptors modifizieren können (Cannon *et al.*, 2004).

2.1.1 Die Diversität des B-Zell-Rezeptors

Der B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor: BCR*) ist ein integraler Membran-Proteinkomplex und gehört zur Immunglobulinsuperfamilie. Er besteht aus je zwei identischen leichten (IgL) und schweren (IgH) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind. Die aminoterminalen variablen (V-) Regionen der schweren und leichten Ketten bilden zusammen zwei identische Antigenbindungsstellen. Die konstanten (C-) Regionen der schweren Ketten legen den Isotyp des Antikörpers (der sezernierten Form des B-Zell-Rezeptors) und damit seine Effektorfunktionen fest (Tonegawa, 1983).

Das Antikörper- oder Immunglobulinrepertoire beim Menschen umfasst ungefähr 10^{11} verschiedene Antikörpermoleküle (Schatz *et al.*, 1992). Die enorme Vielfalt der Antigenrezeptoren wird im Wesentlichen durch genetische Mechanismen gewährleistet, die zur Neukombination oder gezielten Veränderung von Gensegmenten auf dem Immunglobulinlocus führen. Zum einem werden die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten von verschiedenen Gensegmenten kodiert, von denen viele Kopien im Keimbahngenom vorliegen. Die DNA-Abschnitte werden als V (*variable*)-, D (*diversity*)- und J (*joining*)-Gensegmente bezeichnet, wobei nur die schwere Kette D-Gensegmente enthält. Die V(D)J-Genumlagerung oder somatische Rekombination, bei der zufällig je ein V-, D- und J-Gensegment zu einem vollständigen V-Region-Exon zusammengefügt wird, leistet bereits einen großen Beitrag zur Diversität (Jung und Alt, 2004). Sie beginnt mit der Anlagerung der RAG1/RAG2-Rekombinase-Komplexe an die Rekombinationssignalsequenzen (RSS), welche die Gensegmente flankieren. Bei der Zusammenlagerung der RAG-Proteinkomplexe gelangen die zu verknüpfenden Segmente in räumliche Nähe und die dazwischen liegende DNA wird als geschlossenes zirkuläres Fragment entfernt. Durch die Beteiligung der terminalen Desoxynucleotidyltransferase (TdT) sowie von Nukleasen (Artemis) können an den Verknüpfungsstellen Nukleotide hinzugefügt (P- und N-Nukleotide) oder entfernt werden, was zu einer junktionalen Vielfalt führt (Bassing *et al.*, 2002). Ein weiterer Mechanismus, der an der Erhöhung der Antikörpervielfalt beteiligt ist, beruht auf der Kombination der verschiedenen leichten und schweren Polypeptidketten zu einem vollständigen Immunglobulinmolekül (Tonegawa, 1983).

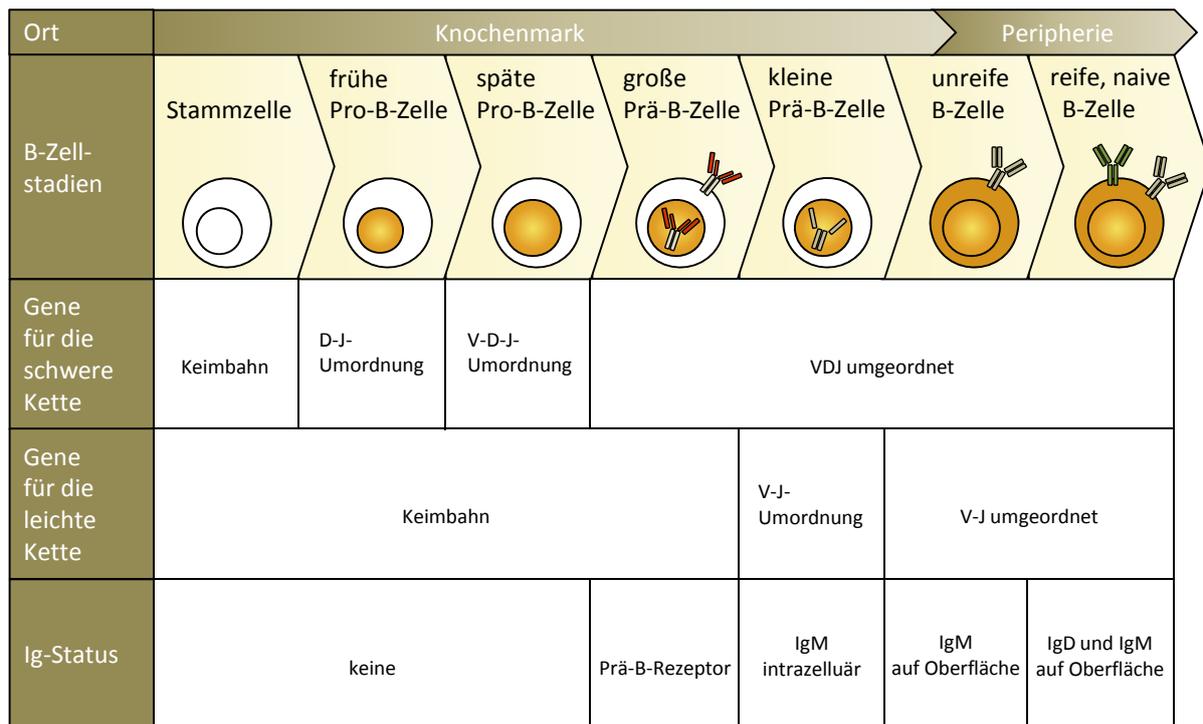


Abbildung 1 Entwicklungsstadien der B-Zellen

Darstellung unterschiedlicher Stadien während der B-Zellentwicklung im Knochenmark und in peripheren lymphatischen Organen, sowie des Rekombinationsstatus der Immunglobulin-Loci der Zellen und des Vorhandenseins von Immunglobulin (Ig) auf der Oberfläche der B-Zellen.

Während der B-Zellentwicklung im Knochenmark erfolgt zunächst die Genumordnung am Locus der schweren Kette in den Pro-B-Zellen (Abbildung 1). Nach einer produktiven Genumlagerung wird eine intakte Immunglobulin-H-Kette als Teil des Prä-B-Rezeptors exprimiert, was zum Eintritt in das Stadium der Prä-B-Zelle führt (Kudo und Melchers, 1987; Melchers *et al.*, 1993). Erst nach mehreren Zellteilungen der großen Prä-B-Zellen entwickeln sich die kleinen Prä-B-Zellen und die V-J-Umordnung der leichten Kette beginnt. Nach erfolgreicher Genumlagerung für die leichte Kette befinden sich die Zellen im Stadium einer unreifen B-Zelle, welche ein komplettes IgM-Molekül auf der Oberfläche exprimieren (Bossy *et al.*, 1991). Wenn B-Zellen diesen gesamten Prozess der Bildung eines funktionellen B-Zell-Rezeptors im Knochenmark abgeschlossen haben, können sie im peripheren Blut zirkulieren und dabei auf das Antigen treffen, für das ihr Rezeptor/ Antikörper spezifisch ist. Die zirkulierenden IgM- und IgD-positiven Zellen, die auch als naive B-Zellen bezeichnet werden, wandern wiederholt in die Follikel der sekundären lymphatischen Organe ein und erhalten dort Überlebenssignale von folliculären-dendritischen Zellen (FDC; *follicular dendritic cells*) (Kosco und Gray, 1992). Bei längerem Antigenkontakt und durch direkte Interaktion mit einer T-Zelle, die durch dasselbe Antigen bereits aktiviert wurde, kommt es schließlich zur B-

Zell-Aktivierung (Parker, 1993). Im nachfolgenden findet die Keimzentrumsreaktion statt und es kommt dabei zur weiteren Erhöhung der Antikörperdiversität und -spezifität.

2.1.2 Die Keimzentrumsreaktion

Keimzentren entstehen während der T-Zell abhängigen Immunantwort in den primären Follikeln sekundärer lymphatischer Organe und tragen zur Affinitätsreifung der B-Zell-Rezeptoren sowie zur Bildung von B-Gedächtniszellen bei.

Nach Aktivierung der B-Zellen durch Bindung ihres Antigens und gleichzeitiger Kostimulation von T-Zellen können sie zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren, welche in extrafollikuläre Bereiche wandern und niederaffine Antikörper sezernieren (MacLennan *et al.*, 2003). Ein kleiner Teil der aktivierten B-Zellen wandert jedoch in primäre Lymphfollikel und bildet dort Keimzentren (Liu *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991), wie in Abbildung 2 veranschaulicht. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass das reife Keimzentrum in zwei verschiedene Bereiche geteilt werden kann, in eine dunkle und eine helle Zone (MacLennan, 1994). In der dunklen Zone befinden sich dicht gepackt die als Zentroblasten bezeichneten B-Zellen, die sich alle sechs bis sieben Stunden teilen (Liu *et al.*, 1991). Hier findet auch die somatische Hypermutation (SMH) an den Genen für die variablen Regionen der Antikörper statt (Berek *et al.*, 1991; Kuppers *et al.*, 1993). Wenn die Zentroblasten reifen, differenzieren sie zu Zentrozyten mit verringerter Teilungsrate, die vermehrt Oberflächen-Immunglobuline exprimieren, und bilden die helle Zone des Keimzentrums (Liu *et al.*, 1991). Hier führen sie die Klassenwechselrekombination (CSR; *class switch recombination*) durch, die es erlaubt Antikörper mit verschiedenen Effektorfunktionen zu exprimieren (Liu *et al.*, 1996). Auch FDC, die unprozessierte Antigene tragen, und antigenspezifische T-Zellen befinden sich in der hellen Zone (Kroese *et al.*, 1990). Die Zentrozyten werden auf bessere Antigenbindung selektiert, indem sie mit hoher Affinität an das von den FDC präsentierte Antigen binden und dadurch ein kurzfristiges Überlebenssignal erhalten. Das aufgenommene Antigen präsentieren die B-Zellen den antigenspezifischen T-Zellen (Gray *et al.*, 1991; Kosco *et al.*, 1988a), und mit Hilfe der CD40/CD40-Ligand-Interaktion erhalten sie ein zweites längerfristiges Überlebenssignal (Kelsoe, 1995). B-Zellen, die aufgrund von Mutationen die Fähigkeit verloren haben einen funktionellen B-Zell-Rezeptor zu exprimieren, oder deren Antikörper Selbst-Antigene bzw. keine Antigene erkennen, werden durch Apoptose eliminiert (Liu *et al.*, 1989). Neueste Untersuchungen beschreiben auch die Möglichkeit, dass

Zentrozyten wieder zurück in die dunkle Zone wandern, um dort erneut den Prozess der SHM zu durchlaufen (Schwickert *et al.*, 2007). Die positiv selektierten Zentrozyten verlassen das Keimzentrum und differenzieren anschließend zu antikörpersezernierenden Plasmazellen oder zu langlebigen B-Gedächtniszellen, welche bei einer erneuten Infektion aktiviert werden können (Hollowood und Goodlad, 1998; Kelsoe, 1995).

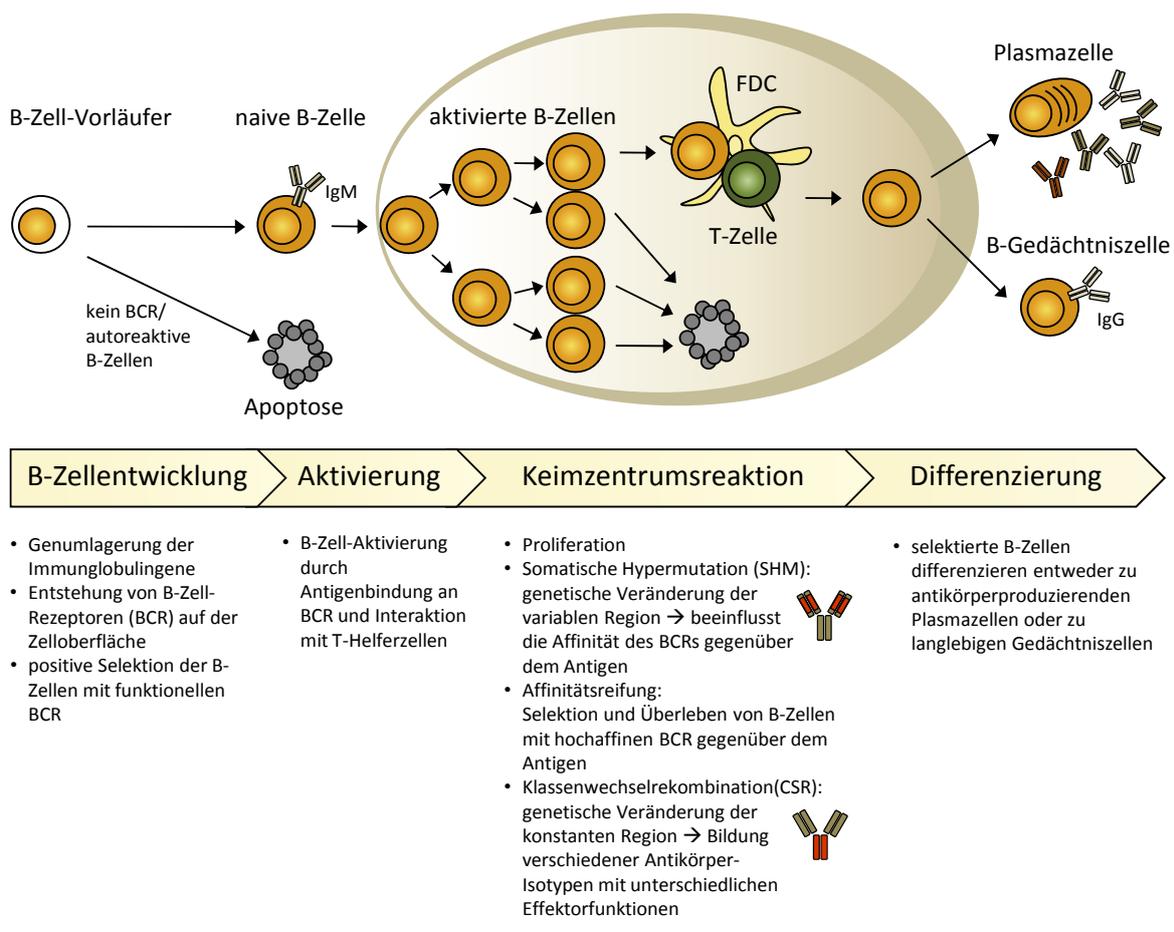


Abbildung 2 B-Zellaktivierung und die Keimzentrumsreaktion

Übersichtsdarstellung der Keimzentrumsreaktion einer aktivierten B-Zelle nach Antigenkontakt, sowie die damit verbundene Affinitätsreifung des B-Zellrezeptors und anschließende Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen bzw. zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen.

2.1.3 Die somatische Hypermutation

Die somatische Hypermutation (SHM) bildet die Grundlage der Affinitätsreifung im Keimzentrum. In der umgeordneten V-Region der Immunglobulingene werden Punktmutationen mit einer Rate von 10^{-3} bis 10^{-4} Mutationen/Basenpaar/Generation eingeführt, welche millionenfach höher liegt als die spontane Mutationsrate im übrigen

Genom (McKean *et al.*, 1984; Rajewsky, 1996). Die Mutationen häufen sich dabei in einem etwa 2 kb langen stromabwärts vom V_H -Promotor gelegenen Bereich (Lebecque und Gearhart, 1990), wobei neben Punktmutationen seltener auch Deletionen, Duplikationen und Insertionen gefunden wurden (Goossens *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998). Bei den Punktmutationen handelt es sich hauptsächlich um Transitionsmutationen, dabei werden Purinbasen (A, G) durch andere Purinbasen oder Pyrimidinbasen (C, T, U) durch andere Pyrimidinbasen ersetzt (Golding *et al.*, 1987). Es konnten sogenannte DGYW-Hotspot-Motive (D = A/G/T, W = A/T, Y = C/T) identifiziert werden, die ein bevorzugtes Ziel für die Hypermutation darstellen (Betz *et al.*, 1993; Rogozin und Kolchanov, 1992).

Es ist bekannt, dass die Transkription der Zielgene für die SHM notwendig ist, und eine Korrelation zwischen der Mutationsfrequenz und dem Transkriptionslevel in dem Ig-Locus besteht (Bachl *et al.*, 2001; Fukita *et al.*, 1998; Peters und Storb, 1996). Allerdings spielt die Sequenz des V-Gens selbst keine große Rolle in der Aktivierung des Mutationsprozesses, da auch künstliche Gensequenzen mutiert werden, wenn diese das V-Gen ersetzen (Yelamos *et al.*, 1995). Es konnte sogar gezeigt werden, dass während der Keimzentrumsreaktion in humanen B-Zellen andere Gene, wie *bcl-6* und *CD95*, ebenfalls, aber zu einem geringeren Ausmaß Mutationen anhäufen (Muschen *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 1998). Jedoch bleibt der genaue Mechanismus der Mutationszielführung weitgehend ungeklärt.

Sowohl in der SHM als auch in der CSR spielt die Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase (AID) eine wesentliche Rolle. In B-Zellen AID-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass die CSR vollständig verhindert und die SHM äußerst reduziert wird (Muramatsu *et al.*, 2000). AID konnte auch in Zusammenhang mit einer Immunschwäche-Krankheit, dem Hyper-IgM-Syndrom Typ 2 (HIGM2), gebracht werden. Diese Patienten tragen Mutationen im AID-Gen, welche in eine erhöhte Produktion von niedrig affinen und unmutierten IgM-Antikörper sowie in eine Keimzentrumshyperplasie resultieren (Revy *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003). AID weist große Sequenzhomologie zur RNA editierenden Deaminase APOBEC1 auf und ist ebenfalls in der Lage Cytosin zu Uracil zu deaminieren (Muramatsu *et al.*, 1999), wobei jedoch einzelsträngige DNA als Substrat für AID dient (Bransteitter *et al.*, 2003; Chaudhuri *et al.*, 2003).

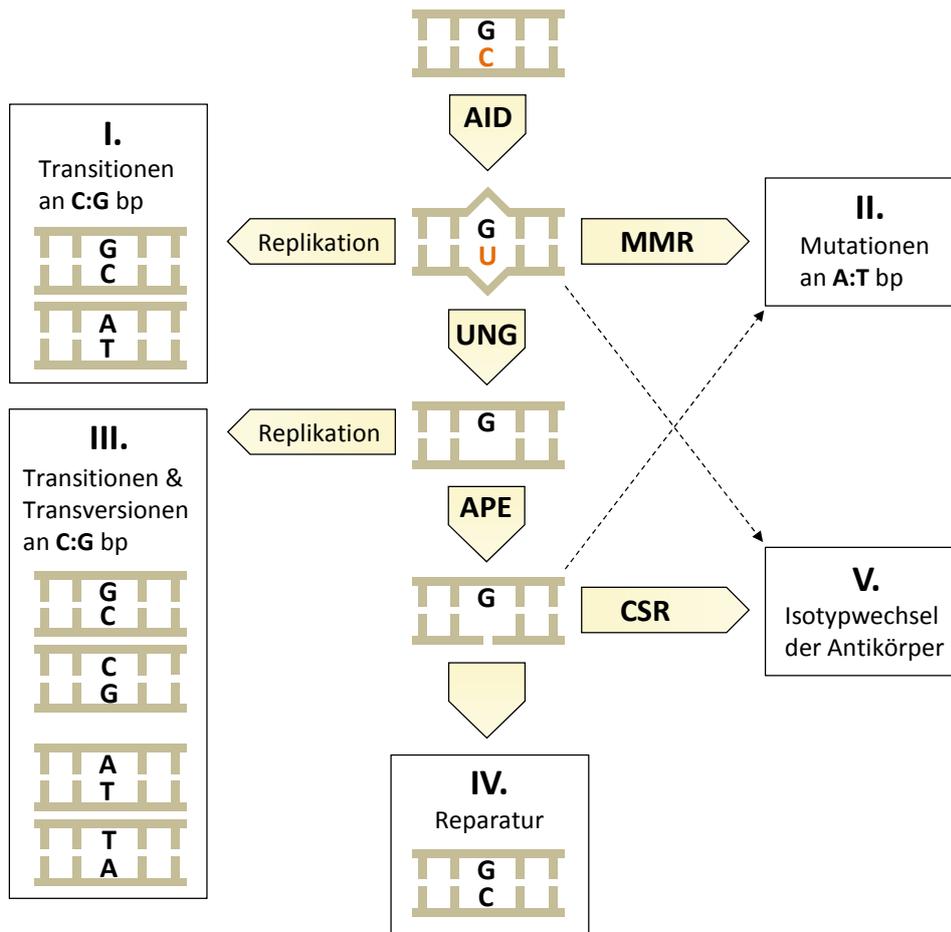


Abbildung 3 Modell der somatischen Hypermutation (nach Di Noia und Neuberger, 2007)

Die SHM wird durch die Deaminierung von Cytosin zu Uracil durch AID eingeleitet. Die eingeführten Läsionen in die DNA können zeitgleich oder unabhängig voneinander über verschiedene fehleranfällige bzw. fehlerfreie Reparaturwege prozessiert werden. Details siehe Text. AID: Aktivierungsinduzierte Cytidine-Deaminase. MMR: mismatch-Repair. UNG: Urazil-Glycosylase. APE: apurinische/apyrimidinisch Endonuklease. CSR: class switch recombination, Klassenwechselrekombination.

Die Antikörperdiversifizierung wird durch die AID-vermittelte Deaminierung von Cytosin zu Uracil eingeleitet, wie in dem gängigen Modell nach Di Noia und Neuberger, 2007 in Abbildung 3 veranschaulicht. Von diesem initialen Schritt ausgehend können verschiedene Prozesse stattfinden, welche zur fehlerfreien Reparatur der Läsion oder zur Entstehung von Mutationen führen können. Die bei der Deaminierung entstandene dU:dG-Fehlpaarung kann entweder während der DNA-Synthese repliziert werden, was zu Transitionsmutationen an G:C-Basenpaaren führen kann (I), oder wird durch Komponenten (MSH2/MSH6) der mismatch-Reparatur (MMR) erkannt (II). Dabei wird lediglich ein längerer Abschnitt dieses DNA-Bereichs unter Beteiligung der Exonuklease I und der Polymerase η modifiziert, wodurch vor allem Mutationen an A:T-Basenpaaren entstehen (Delbos *et al.*, 2007). Aber auch die Erkennung der dU:dG-Läsion durch die Urazil-Glycosylase (UNG) ist möglich, was zur

Entfernung des Uracils und gleichzeitig zur Entstehung einer Apurin/Apyrimidin-Stelle (AP-Stelle) führt. Bei der Replikation durch fehlerhaft prozessierende DNA-Polymerasen (TLS-Polymerasen), wie Pol θ , ζ , und Rev1, über eine AP-Stelle kann es sowohl zu Transitionen als auch Transversionen an G:C Basenpaaren kommen (III) (Martomo *et al.*, 2008; Goodman und Tippin, 2000; Diaz *et al.*, 2001; Faili *et al.*, 2002a; Jansen *et al.*, 2006; Ross und Sale, 2006; Zan *et al.*, 2001). Ausgehend von der AP-Stelle können auch Einzelstrangbrüche durch eine AP-Endonuklease (APE) in die DNA eingeführt werden, die dann durch die Basen-Exzisionsreparatur fehlerfrei repariert werden können (IV). Die eingefügten Einzelstrangbrüche dienen aber auch als Substrat für die CSR (V), welche die konstanten Region der Immunglobulinkette verändert und somit zur Entstehung von unterschiedlichen Antikörperisotypen (IgG, IgA oder IgE) mit unterschiedlichen Funktionen beiträgt.

Während der Antikörperdiversifizierung beim Prozess der SHM kommt es folglich zur Entstehung von Mutationen in den *Ig*-Genen, die vor allem auf die AID vermittelte Einführung von DNA-Läsionen zurückzuführen sind. Aber auch die Beteiligung der zuvor beschriebenen DNA-Reparaturwege, die den Schaden entweder fehlerfrei oder fehlerhaft reparieren, ist von großer Bedeutung. Dabei könnte der Rad6-Weg eine entscheidende Rolle spielen. Der fehlerfreie und der fehlerhafte Pfad des Rad6-Weges werden über die Ubiquitinierung von PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*), einer Plattform für DNA-Polymerasen und anderen Reparaturenzymen bei der Replikation, aktiviert. Während es bei der Monoubiquitinierung von PCNA zur Rekrutierung von Transläsionspolymerasen kommt, die Mutationen ins Genom einführen können, aktiviert die Polyubiquitinierung einen fehlerfreien Bypass der Läsionen. In mehreren Studien, unter anderem in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Rad6 Weg bei der somatischen Hypermutation involviert ist (Bachl *et al.*, 2006; Arakawa *et al.*, 2006; Langerak *et al.*, 2009; Roa *et al.*, 2008). So konnten wir zum Beispiel beobachten, dass durch Inaktivierung des an dem Rad6 Weg beteiligten Enzym Rad18 die SHM-Aktivität in DT40 Zellen vermindert wurde (Bachl *et al.*, 2006).

Die Entstehung von B-Zell-Lymphomen kann durch eine Deregulation der SHM begünstigt werden. Beispielsweise können dadurch Schäden in die kodierende oder regulatorische Region von Proto-Onkogenen, wie *PIM1*, *c-myc* und *Pax5*, eingeführt werden und chromosomale Translokationen können die Folge sein (Pasqualucci *et al.*, 2001; de Yébenes und Ramiro, 2006). Ob die Deregulation der SHM auf einer fehlerhaften Zielleitung von AID

oder auf einem Ungleichgewicht der fehlerfreien und fehlerhaften Reparaturmechanismen beruht, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

2.2 Die Entstehung von B-Zell-Lymphomen

Die Lymphomzellen entstammen von B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien, wobei die meisten Lymphome auf Keimzentrums-B-Zellen zurückzuführen sind. Hinweise darauf gibt z.B. die Expression Keimzentrums-spezifischer Oberflächenmarker, wie CD77 (Kuppers und Dalla-Favera, 2001), da die Lymphomzelle durch die Transformation in ihrem Differenzierungsstadium fixiert worden ist (Kuppers, 2005). Eindeutiger sind allerdings genetische Analysen, die Aufschluss darüber gaben, dass die meisten V-Gene der B-Zell-Lymphome mutiert sind (Cleary *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1995; Kuppers *et al.*, 1997), was eine charakteristische Eigenschaft von Keimzentrums-B-Zellen und ihren Nachkommen ist. Es existieren viele verschiedene Arten der B-Zell-Lymphome, wie z.B. das Diffuse Groß-Zell-Lymphom (DLCL), Hodgkin-Lymphom (HL), Follikuläre Lymphome (FL) und das Burkitt-Lymphom (BL), die von Keimzentrums-B-Zellen abstammen (Kuppers, 2005).

Vergleichbar mit B-Zell-Lymphomen ist eine Eigenschaft von Keimzentrums-B-Zellen neben der Einführung von Mutationen in *Ig*-Genen, dass auch andere Gene mutiert werden (Muschen *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 1998). Es kürzlich konnte in normalen murinen B-Zellen gezeigt werden, dass auch AID genomweit aktiv ist und die eingeführten Läsionen entweder weitgehend fehlerfrei oder fehlerhaft repariert werden können (Liu *et al.*, 2008). Ein Beispiel dafür ist das Gen *bcl-6*, welches nach unzureichender Reparatur Mutationen akkumuliert, während *c-myc* weitgehend fehlerfrei repariert wird (Liu *et al.*, 2008).

Bei konstitutiver SHM, wie sie in Lymphomzellen vorkommt, kann die deregulierte Reparatur von nicht *Ig*-Genen zusätzlich auch zur Deregulation von Onkogenen führen, wie zum Beispiel beim Onkogen *c-myc*, das durch Translokationen in den *Ig*-Locus gelangte und folglich unter Kontrolle der *Ig*-Regulatorsequenzen in Burkitt-Lymphomen steht (Blum *et al.*, 2004; Kuppers und Dalla-Favera, 2001). Für das *c-myc* Gen konnte nicht nur die daraus resultierende Deregulation der Expression gezeigt werden, sondern auch die Einführung von Mutationen in das translozierte *c-myc* Gen, die auf dem Mechanismus der Antikörper-Hypermutation beruht (Bemark und Neuberger, 2000). Solche chromosomalen Translokationen sind auf Fehlregulation bei den Prozessen der somatischen Hypermutation und Klassenwechselrekombination zurückzuführen (Kuppers und Dalla-Favera, 2001), bei

denen AID-induzierte Strangbrüche eingeführt und nicht korrekt repariert werden. Um der Lymphomentstehung vorzubeugen, werden folglich sehr genau regulierte Mechanismen der DNA-Reparatur in Keimzentrumszellen benötigt.

2.3 Das Tumorsuppressorgen *p53*

Das Produkt des Tumorsuppressorgens *p53* wurde erstmals 1979 beschrieben (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979) und wenige Jahre später wurde auch das entsprechende Gen dazu entdeckt. Das *p53* Gen liegt auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 17 und besteht aus 11 Exons. Funktionelles *p53* ist von enormer Bedeutung, da *p53* eine zentrale Steuereinheit für Proliferation und Wachstum der Zelle darstellt. Tatsächlich konnte in über 50% aller Tumore im Menschen mutiertes *p53* gefunden werden (Hollstein *et al.*, 1991). In Tumoren mit unverändertem *p53* kann dessen Funktion ebenfalls beeinträchtigt werden, indem es z.B. von viralen Proteinen gebunden wird, Schadenssignalwege nicht mehr zu *p53* weitergeleitet werden oder es zum erhöhten Abbau von *p53* kommt. Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen führen mehr als 85% der in Tumoren gefundenen Mutationen in *p53* zum Austausch einer Aminosäure (Petitjean *et al.*, 2007). Ein großer Anteil dieser Mutationen befindet sich in der DNA-Bindungsdomäne, was die Bindung von *p53* an Zielgene beeinträchtigen kann. Neben somatischen Mutationen gibt es auch Keimbahnmutationen in *p53*, wie bei Patienten mit dem seltenen Li-Fraumeni Syndrom (Varley, 2003). Der Verlust des verbliebenen Wildtyp-Alleles führt so zur Bildung einer Vielzahl von Tumoren.

Wenn *p53* mutiert oder auf andere Weise inaktiviert ist, kann die Zelle nicht mehr auf Stresssignale mit Zellzyklussarrest und DNA Reparatur bzw. Zelltod reagieren und die Tumorentstehung wird begünstigt.

2.3.1 Organisation des *p53* Proteins

Wie der Name verrät, handelt es sich bei *p53* des Menschen um ein 53 kDa großes Protein, welches 393 Aminosäuren (AS) lang ist und grundsätzlich aus 4 Domänen besteht (Abbildung 4). Die N-terminale Domäne (NTD) kann in die Transaktivierungsdomäne (TAD; AS 1-42) und in die konservierte, prolinreiche Region (AS 40-92) gegliedert werden. Verschiedene Proteine der Transkriptions-Maschinerie binden an die TAD und aktivieren somit die Expression von verschiedenen *p53*-Zielgenen (Lu und Levine, 1995; Fields und Jang, 1990; Thut *et al.*, 1995).

Auch die Bindungsstellen für Mdm2, einen negativen Regulator von p53, ist in dieser Region lokalisiert (Chen *et al.*, 1993; Picksley *et al.*, 1994). Die zentrale Region von p53 ist die Sequenz-spezifische DNA-Bindungsdomäne (DBD; AS 101-301), welche entscheidend für die DNA-Bindungsaktivität ist. Daher ist es nicht verwunderlich, dass in der DNA-Region, die für die DBD kodiert, über 90% aller Mutationen lokalisiert sind, die in menschlichen Krebsarten gefunden worden sind (Hamroun *et al.*, 2006). An die DNA-Bindungsdomäne grenzt die Oligomerisierungsdomäne (OD; AS 307-355) an, welche für die Dimerisierung von p53 essentiell ist (Wang *et al.*, 1994). P53 kann nur als Tetramer (Dimer von zwei Dimeren) Zielgene binden und aktivieren (Hainaut *et al.*, 1994). Zusätzlich besitzt die OD noch ein nukleäres Exportsignal (NES). Die abschließende C-terminale regulatorische Domäne (RD; AS 356-393) enthält drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) (Shaulsky *et al.*, 1990) und eine nichtspezifische DNA-Bindungsdomäne, die geschädigte DNA erkennt. Zudem ist diese Region in die Herunterregulierung der DNA-Bindung der DBD involviert (Harms und Chen, 2005).

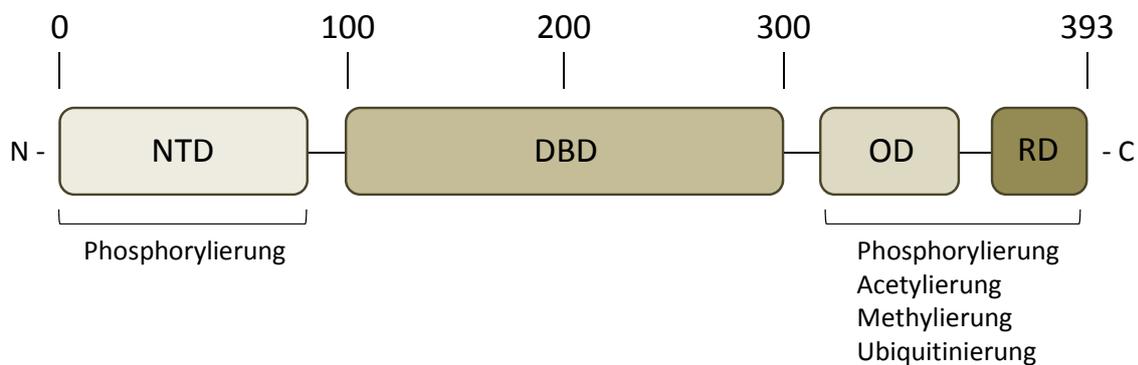


Abbildung 4 Funktionelle Domänen von p53

Dargestellt sind die wichtigsten funktionellen Domänen des Proteins p53 und die möglichen Modifikationen an den N- und C-terminalen Regionen: die N-terminale Domäne (NTD), welche die Transaktivierungsdomäne und die Bindungsstelle für Mdm2 enthält, die Sequenz-spezifische DNA-Bindungsdomäne (DBD), die Oligomerisierungsdomäne (OD) und die regulatorische Domäne (RD). Details siehe Text.

Modifizierungen von p53 durch Phosphorylierung, die wichtig für die Stabilität von p53 sind, finden vor allem im N-terminalen Bereich statt. Im C-terminalen Bereich kommt es neben Phosphorylierung auch noch zur Acetylierung, Methylierung und Sumoylierung, was die Fähigkeit der Regulierung von sequenzspezifischer DNA-Bindung, Oligomerisierungszustand, Kern-Import/-Export und Ubiquitinierung beeinflusst (Appella und Anderson, 2001).

2.3.2 Regulation von p53

Unter normalen Wachstumsbedingungen in der Zelle ist die Menge an p53 Protein sehr gering. Die Aktivität von p53 wird vor allem auf Proteinebene reguliert. Ein essentieller Regulator dabei ist die E3-Ubiquitinligase Mdm2 (*murine double minute 2*; im Menschen als HDM2 bezeichnet). Mdm2 wurde ursprünglich als Onkoprotein identifiziert, welches p53 bindet und die p53-vermittelte Transaktivierung verhindert (Momand *et al.*, 2000).

Mdm2 blockiert die Aktivierung von p53 zum einen durch die direkte Bindung an p53 und zum anderen durch die Kennzeichnung von p53 für die Proteindegradation durch Ubiquitylierung (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997; Midgley und Lane, 1997). Mdm2 und p53 sind in einem sogenannten negativen *feedback loop* involviert, sodass die Konzentrationen beider Proteine in der Zelle genauestens reguliert werden können. Aktives p53 induziert dabei Mdm2, welches wiederum die Degradation von p53 reguliert. p53 selbst kann eine Konsensussequenz im Promotorbereich von *mdm2* binden und induziert somit die *mdm2*-Genexpression (Barak *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993).

Die Aktivierung von p53 kann hauptsächlich durch DNA-Schäden und Onkogene erfolgen. Beispielsweise können ionisierende und ultraviolette Strahlung, Alkylierungen von Basen, Depurinierung der DNA oder auch Reaktion mit freien Sauerstoffradikalen zur Schädigung der DNA führen (Giaccia und Kastan, 1998; Gudkov und Komarova, 2003; Oren, 2003). Die Schadenserkennung durch Proteinkinasen, wie ATM und ATR, kann dann zur posttranslationalen Modifizierung von p53 beitragen und somit zur Unterbrechung der p53-inhibierenden Interaktion mit Mdm2 führen. Dadurch wird p53 stabilisiert und aktiviert, was in der transkriptionellen Aktivierung von p53-Zielgenen resultiert (Shieh *et al.*, 1997; Bode und Dong, 2004). Aber auch aktivierte Onkogene, wie z.B. Ras oder c-Myc, können über p14arf-Aktivierung die Interaktion zwischen p53 und Mdm2 stören und so zur Stabilität von p53 beitragen (Lowe and Sherr, 2003).

Die bekanntesten Signalwege für die Schadenserkennung werden durch ATM (*ataxia-telangiectasia mutated* Genprodukt) und ATR (*ATM-und Rad3-related* Proteinkinase) vermittelt. ATM wird hauptsächlich durch DNA-Doppelstrangbrüche, verursacht durch ionisierende Strahlung, stimuliert, was wiederum in der Aktivierung von Chk2 resultiert (Steegenga *et al.*, 1996). ATM selbst bewirkt die Phosphorylierung von Serin 15, während Chk2 Serin 20 im N-terminalen Bereich von p53 nahe der Mdm2 Bindungsstelle phosphoryliert. Diese Modifikationen beeinträchtigen die Bindung an Mdm2 und führen

somit nicht nur zur Stabilisierung von p53 im Zellkern sondern erhöhen auch seine Affinität für spezifische Promotorregionen (Appella und Anderson, 2001).

Bei der Aktivierung von p53 in Zellen, die UV-Strahlung ausgesetzt waren, spielt ATR eine zentrale Rolle. Dabei phosphoryliert ATR p53 sowohl an Serin 15 als auch Serin 37. Die in der Signalkaskade unterhalb von ATR liegende Kinase Chk1 und Caseinkinase II phosphorylieren ebenfalls p53 und bewirken die daraus folgende Stabilisierung des Proteins (Appella und Anderson, 2001).

Eine andere Möglichkeit die Funktion von p53 zu induzieren, unabhängig von DNA-Schäden, ist die Expression von Onkogenen. Ein Beispiel dafür ist das Onkogen Ras, der das Protein p14arf aktiviert, welches die p53-Mdm2 Interaktion beeinträchtigt (Lowe und Sherr, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass P14arf nukleoplasmatisches p53 stabilisieren kann, indem es Mdm2 bindet und im Zellkern zurückhält (Weber *et al.*, 1999). Alle drei beschriebenen Signalwege verhindern die Degradation von p53 und erlauben folglich die Ausübung der Funktion als Tumorsuppressor.

2.3.3 Folgen der p53-Aktivierung

p53 fungiert hauptsächlich als Transkriptionsfaktor, welcher somit die Expression oder Repression von verschiedenen Genen bewirkt (Yew und Berk, 1992; Pietsenpol *et al.*, 1994). Dabei erkennt die zentrale DNA-Bindungsdomäne von p53 ein spezifisches Element (*recognition elements, REs*) in der DNA verschiedener Promotoren und bindet diese (Inga *et al.*, 2002; Hoh *et al.*, 2002). Dadurch kommt es zur Rekrutierung von Faktoren der Transkriptionsmaschinerie in die Nähe des Promotors, und die Transkription der entsprechenden Gene wird initiiert. Aber auch Protein-Proteininteraktion von p53 mit anderen Faktoren kommt vor, wie z.B. bei der Aktivierung von Apoptose (Moll *et al.*, 2005). Sobald p53 aktiviert ist, kann das entweder zu Zellzyklusarrest oder zu programmiertem Zelltod (Apoptose) führen. Neben diesen bestverstandenen Funktionen von p53 konnte eine genomweite ChIP-Analyse viele p53-regulierte Gene identifizieren, welche in weitaus mehr Prozessen als zunächst gedacht eine Rolle spielen. Beispielsweise ist p53 in der Regulation der Glykolyse (Bensaad *et al.*, 2006) und Autophagie (Crighton *et al.*, 2006), der Reparatur von genotoxischen Schäden (Gatz und Wiesmuller, 2006), beim Überleben der Zellen und Regulierung von oxidativen Stress (Bensaad und Vousden, 2005), in zellulärer Seneszenz

(Kortlever *et al.*, 2006), Angiogenese (Teodoro *et al.*, 2006), Zelldifferenzierung (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006) und Knochenmarksumgestaltung (Wang *et al.*, 2006) involviert.

2.3.3.1 Inhibierung des Zellzyklus und Regulation der DNA-Reparatur

Einer der zentralen Funktionen von p53 ist die Einleitung des Zellzyklusarrests als Reaktion auf DNA-Schädigung. Das ermöglicht die Reparatur des Schadens bevor es zur weiteren Replikation des Genoms kommt und verhindert somit, dass die beschädigte DNA an die Tochterzellen weitergegeben wird. Der verantwortliche molekulare Mechanismus dahinter ist die transkriptionelle Aktivierung des *p21* Gen durch p53 (el-Deiry *et al.*, 1993). Das p21 Protein bindet dabei verschiedene Cyclin und Cyclinabhängige Kinasen (Cdk)-Komplexe (Rousseau *et al.*, 1999) und inhibiert somit deren Kinasenaktivität, was dann zu einem Stopp im Übergang von G1- zu S-Phase (und auch G2 zu M) des Zellzyklus führt. p21 wurde als eines der ersten direkten Zielgene von p53 identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion dieses Gens die Fähigkeit von p53 zur Induktion eines Zellzyklusarrests enorm herabsetzt (Brugarolas *et al.*, 1995). Zudem kann p21 auch PCNA binden (Gulbis *et al.*, 1996). Die p21-PCNA Komplexe verhindern z.B. die PCNA-abhängige DNA-Replikation durch Polymerase δ (Fotedar *et al.*, 2004; Waga *et al.*, 1994). p21 kann demnach durch Einwirken auf Cyclin-Cdk-Komplexe und auf PCNA einen Stopp in der DNA-Replikation erreichen.

Neben der Induktion des Zellzyklusarrestes hat p53 sowohl direkten als auch indirekten Einfluss auf die Regulation der DNA-Reparatur. Die Überexpression von Gadd45 in einigen Zellen kann auch zu einem Arrest in der G1-Phase führen. Das von p53 regulierte Gen *Gadd45* (**g**rowth **a**rrest and **DNA** **d**amage **i**nducible **g**ene) kann ebenfalls an PCNA binden und ist auch bei der Nukleotid-Exzision Reparatur (NER) (Smith *et al.*, 1994) und der Basen-Exzision Reparatur (BER) beteiligt (Jung *et al.*, 2007). Es gibt aber auch Hinweise auf eine direkte Beteiligung von p53 bei der BER (Offer *et al.*, 1999; Offer *et al.*, 2001; Offer *et al.*, 2002). Beispielsweise konnte die Interaktion von p53 mit der Polymerase β , die bei der BER beteiligt ist, nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte eine durch Bindung von p53 bewirkte Inhibierung von XPB, XPD und CSB, d.h. von Komponenten der NER, gezeigt werden (Wang *et al.*, 1995). Auch die Identifizierung von einigen Faktoren der Mismatch Reparatur (MMR) als p53 Zielgene (Scherer *et al.*, 2000; Warnick *et al.*, 2001; Chen und Sadowski, 2005) verdeutlicht die Bedeutung von p53 nicht nur bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, wie Homologe Rekombination (HR) und Nichthomologe

Endverknüpfung (NHEJ), sondern auch bei der Reparatur von Schäden eines Stranges, wie bei BER, NER und MMR (Gatz und Wiesmuller, 2006).

2.3.3.2 Induktion von Apoptose

Eine einschneidende Antwort von p53 auf DNA-Schäden ist die Induktion von Apoptose. Bei der Apoptose wird grundsätzlich zwischen zwei Signaltransduktionswegen unterschieden, wobei eine Interaktion beider Wege nicht ausgeschlossen wird (Zinkel *et al.*, 2005; Kamer *et al.*, 2005). Der extrinsische Weg wird durch die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren (z.B. CD95) eingeleitet, während der intrinsische Weg auf Stresssignale innerhalb der Zelle reagiert und über Mitochondrien vermittelt wird (Green, 1998). Obwohl p53 in beiden Signalwegen involviert ist, scheint p53 in dem intrinsischen Weg eine größere Rolle zu spielen.

Der intrinsische Weg kann ausgelöst werden, indem p53 als Transkriptionsfaktor die Expression pro-apoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie z.B. Bax und Bak, anregt. Es konnten aber auch weitere essentielle apoptotische Zielgene von p53 identifiziert werden, wie Noxa und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), die ebenfalls der pro-apoptotischen Bcl-2 Familie zugeordnet werden können. Zum Beispiel konnten in PUMA-defizienten Mäusen schwere Defekte in der p53-vermittelten Apoptose festgestellt werden (Yu und Zhang, 2003). Diese pro-apoptotischen Proteine bewirken die Freisetzung von Cytochrom c und anderen apoptosefördernden Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Cytoplasma, welche sich dann mit Apaf-1 zu einem Apoptosom zusammensetzen. Dadurch wird eine Signalkaskade initiiert, die nacheinander verschiedene Caspasen, wie Caspase-9, -3 und -7, aktiviert und schließlich zum Zelltod führt (Danial und Korsmeyer, 2004).

Zusätzlich kann p53 auch die Expression anti-apoptotischer Faktoren der Bcl-2-Familie hemmen, beispielsweise Bcl-2 und Bcl-xL, welche wiederum Bax und Bak negativ regulieren (Cory und Adams, 2002).

Dass transkriptionsunabhängige Mechanismen für die Induktion von Apoptose durch p53 ebenfalls existieren, konnte in mehreren Studien u.a. mit p53-Mutanten, die weder DNA binden noch die Transkription aktivieren können, gezeigt werden (Chipuk *et al.*, 2004; Yee und Vousden, 2005; Haupt *et al.*, 1995). Weitere Daten weisen sogar auf einen Zusammenhang zwischen transkriptionellen und cytoplasmatischen Funktionen von p53 hin.

Dabei ermöglicht PUMA die Freigabe von cytoplasmatischen p53 aus der inhibitorischen Verbindung mit Bcl-xL, was dann die direkte transkriptionsunabhängige Aktivierung von Bax durch p53 erlaubt (Chipuk *et al.*, 2005).

2.3.4 Zusammenhang von p53 und somatischer Hypermutation

Während der somatischen Hypermutation in Keimzentrumzellen deaminiert AID Cytidine in der variablen Region der *Ig*-Gene. Die dabei entstandenen Urazile und Intermediate werden dabei nicht nur fehlerfrei repariert sondern auch über verschiedene mutagene Reparaturwege prozessiert. Eingefügte Mutationen, die den BCR nicht komplett zerstören, können so zur Diversität des Antikörpers beitragen.

Die Beteiligung von p53 bei diversen Reparaturwegen, die während der SHM involviert sind, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Beispielsweise unterliegen BER und MMR der Regulation von p53 (Jung *et al.*, 2007; Gatz und Wiesmuller, 2006). Die Komponenten der MMR (Msh2/Msh6) und die Urazil-Glycosylase der BER können dabei sowohl Mutationen während der SHM erzeugen als auch U:G-Mispaarungen fehlerfrei reparieren (Di Noia und Neuberger, 2007). p53 spielt aber auch vermutlich bei der Regulation des Rad6-Weges eine Rolle, da es die Aktivität von fehlerhaften DNA-Polymerasen während der replikationsgekoppelten Transläsionssynthese (TLS) beeinflusst (Avkin *et al.*, 2006). Dabei reguliert p53 die Effizienz und Genauigkeit der TLS über die p21-vermittelte Modulierung von PCNA. In mehreren Studien unter anderem in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Rad6 Weg bei der somatischen Hypermutation involviert ist (Bachl *et al.*, 2006; Arakawa *et al.*, 2006; Langerak *et al.*, 2009; Roa *et al.*, 2008).

Bisher ist es in der Literatur noch umstritten, ob p53 im Keimzentrum exprimiert wird und somit funktionell dort wirkt oder nicht. In einer Studie wurde die transkriptionelle Herunterregulierung der p53-Expression durch Bcl-6 beschrieben (Phan und Dalla-Favera, 2004). Bekannt ist auch, dass Bcl-6, als wichtiger Transkriptionsrepressor im Keimzentrum vermehrt gebildet wird (Cattoretti *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995). Widersprüchliche Argumente Anderer zeigen aber Publikationen, in denen deutlich die Expression von p53 in Keimzentrumzellen nachgewiesen wurde (Martinez-Valdez *et al.*, 1996; Ranuncolo *et al.*, 2007). Aber auch die Beobachtung, dass B-Zellen vor DNA schädigenden, chromosomalen Translokation während der CSR durch p53 geschützt werden (Ramiro *et al.*, 2006), gibt Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von p53 in der Keimzentrumreaktion.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Während der Keimzentrumsreaktion nimmt die SHM bei der Affinitätsreifung von Antikörpern eine besondere Stellung ein. Sie birgt aber auch eine Gefahr bei der Lymphomentstehung, da die Aktivität der SHM nicht nur auf *Ig*-Gene beschränkt ist sondern auch genomweit vorkommt. Da p53 in den meisten Tumoren mutiert vorliegt und als Tumorsuppressor in vielen Reparaturmechanismen involviert ist, könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Regulationsmechanismen der SHM und p53 vermutet werden. In dieser Doktorarbeit sollte der Einfluss von p53 auf den Prozess der Hypermutation in Burkitt-Lymphomzelllinien und im Mausmodell untersucht werden.

Zunächst wurden geeignete Zelllinien ausgewählt, die hypermutieren und noch funktionelles p53 aufweisen. Diese Zelllinien sollten dann auf ihre Hypermutationsaktivität in Abhängigkeit von p53, durch Verwendung eines spezifischen Inhibitors, getestet werden.

Von besonderem Interesse erschien die Untersuchung des Effektes von p53 auf die SHM in einem Mausmodell, da es sich hierbei um ein genetisch klar definiertes Modellsystem handelt. Da bereits p53-defiziente Mäuse zur Verfügung standen, wurden diese im Vergleich zu p53-profiziente Mäuse zunächst auf Defekte in der Entwicklung von diversen T- und B-Zellpopulation, Entstehung von Keimzentren bzw. Keimzentrums-B-Zellen und Antigen-spezifischen Antikörpern untersucht. Anschließend sollte die Mutationsfrequenz und eventuelle Mutationsmuster sowohl in *Ig*-Genen als auch nicht *Ig*-Genen sowie die Affinitätsreifung von Antigen-spezifischen Antikörpern von Keimzentrums-B-Zellen immunisierter Mäuse analysiert werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Der Einfluss von p53 auf die somatische Hypermuation in Burkitt-Lymphomzelllinien

Für eine *in vitro* Untersuchung der somatischen Hypermuation (SHM) standen verschiedene humane B-Zell-Lymphomzelllinien zur Verfügung. In Vorarbeiten wurden diese Zelllinien auf die Stärke ihrer Hypermuationsaktivität getestet (Scheller *et al.*, 2010) und anhand dieser Eigenschaft für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt. Zudem wurde die Hühner-B-Lymphomzelllinie DT40 herangezogen, welche unter anderem auch SHM durchführt (Arakawa und Buerstedde, 2004; Arakawa *et al.*, 2004). Die Untersuchung der Hypermuationsaktivität in Abhängigkeit von p53 setzt allerdings funktionelles p53 Protein in diesen Zelllinien voraus. Es ist aber bekannt, dass *p53* in mehr als 50 % aller menschlichen Tumore mutiert vorliegt (Hollstein *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurden zunächst die verschiedenen B-Lymphomzelllinien auf deren p53-Funktionalität getestet.

3.1.1 Identifizierung von Burkitt-Lymphomzelllinien mit funktionellem p53

In der Literatur ist immer noch nicht eindeutig geklärt, ob p53 in der DT40 Zelllinie tatsächlich exprimiert wird und somit funktionell vorliegt (Takao *et al.*, 1999; Tanikawa *et al.*, 2000). Leider ist es uns nicht gelungen das p53 kodierende Gen in DT40 zu amplifizieren, sodass für alle weiteren Experimente die humanen B-Zell-Lymphomzelllinien herangezogen wurden.

Um eine erste Aussage über die Funktionalität von p53 in den B-Zell-Lymphomzelllinien zu treffen, wurde das p53 kodierende Gen in diesen Zelllinien sequenziert. Dazu wurde die gesamte RNA der Burkitt-Lymphomzelllinien (BL-Zelllinie) Raji, BL100, P3HR1 und HH514 isoliert, gefolgt von der Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) und anschließend wurde das p53 kodierende Gen amplifiziert. Bei der anschließenden Sequenzanalyse des Gesamtproduktes konnten schon genetische Veränderungen bei allen BL-Zelllinien beobachtet werden. Um festzustellen, ob diese Mutationen beide *p53* Allele oder nur eins davon betreffen, wurde das *p53*-Amplifikat in einem Zwischenschritt in den pGEMT-Vektor kloniert und nachfolgend verschiedene Klone jeder BL-Zelllinie sequenziert.

Auffällig war eine Mutation (CCC→CGC), die nur auf einem Allel bei Raji, BL100 und P3HR1 vorkommt (Abbildung 5A). Diese Punktmutation resultiert in einen Austausch der Aminosäure (AS) Prolin an Position 72 durch Arginin (Pro72Arg) in der prolinreichen Domäne des p53 Proteins. In der Literatur werden diese polymorphen Formen des p53 Proteins als Wildtypvarianten mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben (Dumont *et al.*, 2003; Pim und Banks, 2004; Siddique und Sabapathy, 2006).

Die Sequenzierungsanalyse bestätigte die in der Literatur beschriebenen Mutationen in der BL-Zelllinie Raji, welche beide p53-Allele betreffen (Farrell *et al.*, 1991; Duthu *et al.*, 1992). Zusätzlich zu der Wildtypvariante (Pro72Arg) ist eine Punktmutation (TAC→CAC) in diesem Allel zu finden, die zu einem Austausch von Tyrosin durch Histidin an Position 234 (Tyr234His) in der DBD des Proteins führte. Das zweite Allel ist ebenfalls mutiert (CGA→CAA), womit Arginin durch Glutamin (Arg213Gln) ersetzt wurde (Abbildung 5A).

Bei BL100 dagegen wurde nur in einem Allel eine Mutation (AAC→GAC) gefunden, welche zum Austausch von Asparagin durch Aspartat (Asn239Asp) in der DBD des p53 Proteins führte. Im dem anderen Allel wurde die zuvor beschriebene Wildtypvariante (Pro72Arg) gefunden (Abbildung 5A).

Die Sequenzanalyse für p53 der BL-Zelllinie P3HR1 ergab, ähnlich wie bei BL100, dass neben der Pro72Arg-Variante in dem einen Allel das andere Allel nur eine Punktmutation (TAC→CAC) beherbergte. Wie in Abbildung 5A dargestellt, ergab sich aus dieser genetischen Veränderung der AS-Austausch von Tyrosin durch Histidin (Tyr163His). Die mit Hilfe der Sequenzierung gefundenen Mutationen in P3HR-1 sind ebenfalls in der Literatur beschrieben (Farrell *et al.*, 1991).

HH514, ein Subklon von P3HR1, unterscheidet sich von der parentalen Zelllinie nur darin, dass die Mutation von TAC zu CAC (Protein: Tyr163His) bei beiden Allelen auftritt und dass die Pro72Arg-Variante nicht vorhanden ist (Abbildung 5A).

Da für BL100 und P3HR-1 nur in einem Allel eine Punktmutation in der DNA Bindungsdomäne gefunden wurde, während das andere Allel nicht betroffen ist, lässt sich vermuten, dass diese Zelllinien noch funktionelles p53 besitzen. Um diese Hypothese zu testen, wurden BL100, Raji, P3HR-1, HH514 und zwei Kontrollzelllinien mit Wildtyp p53 (konditional immortalisierte Zelllinie P493-6 und lymphoblastoide Zelllinie Rosi) mit 8 Gy bestrahlt und anschließend eine Westernblot-Analyse mit Antikörpern für p53 und dessen Zielgen p21 durchgeführt (Abbildung 5B). Die mit γ -Bestrahlung (IR) behandelten Zelllinien

P493-6 und Rosi zeigen eine deutliche Induktion der p53 Proteinexpression. Auch p21 ist in den behandelten Zellen stark exprimiert, was deutlich zeigt, dass das induzierte p53 in diesen Zellen funktionell ist.

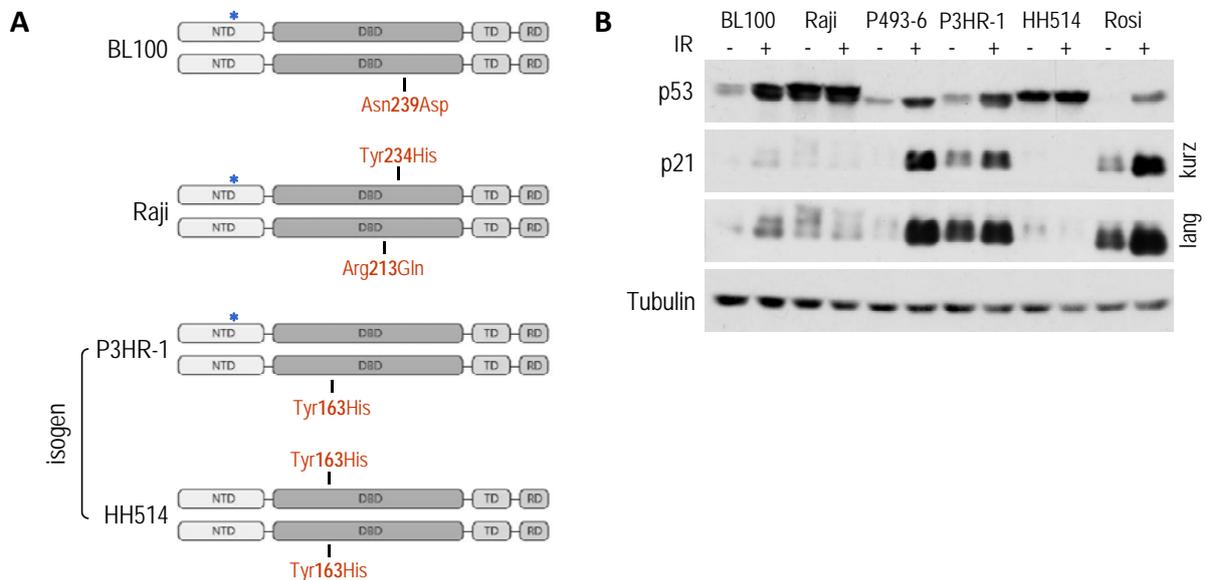


Abbildung 5 p53-Sequenzanalyse und funktioneller Test in verschiedenen BL-Zelllinien

A) Vereinfachte Darstellung der identifizierten Mutationen im jeweiligen *p53*-Allel der Zelllinien BL100, Raji, P3HR1 und HH514, welche einen Aminosäureaustausch in der DNA-Bindedomäne (DBD) des *p53* Protein zur Folge hatte. Der blaue Stern (*) repräsentiert die Pro72Arg-Wildtypvariante in der N-terminalen Domäne (NTD). B) Westernblot-Analyse der *p53* und *p21* Proteinmengen in verschiedenen mit IR (γ -Bestrahlung) behandelten Zelllinien. Für *p21* sind zwei Expositionen (kurz/lang) dargestellt und Tubulin wird als Ladekontrolle verwendet.

Die in BL100 beobachtete Expression von *p53* und *p21* infolge der Behandlung spricht ebenfalls für noch funktionelles *p53* in dieser Zelllinie. Raji dagegen zeigt eine Akkumulation von *p53* in der nicht behandelten Probe, und nach der Bestrahlung ist auch keine Induktion zu erkennen. In Tumoren mit mutiertem *p53* sind häufig erhöhte Mengen an *p53* Protein zu finden, welche oft auf eine Beeinträchtigung der Regulation durch Mdm2 zurückzuführen sind (Midgley und Lane, 1997; Buschmann *et al.*, 2000). Die Akkumulation von *p53* ist demnach meist ein Anzeichen dafür, dass das *p53* Gen in diesen Zellen mutiert vorliegt. Schwache basale Proteinmengen von *p21* in Raji sind zwar vorhanden, jedoch ist keine Induktion der *p21* Expression in den bestrahlten Zellen zu beobachten.

Das Zelllinienpaar P3HR-1 und HH514 ist vergleichbar mit BL100 und Raji. Während bei P3HR-1 durch Bestrahlung die *p53* und *p21* Expression induziert wird, akkumuliert *p53*

bereits in der unbehandelten Probe der Zelllinie HH514, und gleichzeitig ist keine p21-Induktion erkennbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der durch genotoxischen Stress induzierte Signalweg über p53 und p21 in den Zelllinien BL100 und P3HR-1 noch intakt ist, was die Voraussage der p53-Sequenzierungsanalyse bestätigt und somit für noch funktionelles p53 Protein in diesen Zellen spricht. Die Ergebnisse für Raji und HH514 lassen vermuten, dass die Funktion des p53 Proteins in diesen Zelllinien durch die gefundenen Mutationen im Gen beeinträchtigt ist.

3.1.2 Untersuchung der somatischen Hypermutionsaktivität in Burkitt-Lymphomzelllinien mit verschiedenem p53 Status

Um den Einfluss von p53 auf die Translations-Synthese während der somatischen Hypermution zu untersuchen, wurde ein auf GFP (*Green Fluorescent Protein*) basierendes und von H. Scheller weiterentwickeltes Reportersystem verwendet (Bachl und Olsson, 1999; Scheller *et al.*, 2010). Das von J. Bachl und C. Olsson entwickelte Versuchssystem wurde von H. Scheller so verändert, dass durch Austausch des Promotors vor dem Hygromydingen der Selektionsprozess verbessert wurde (Scheller *et al.*, 2010). Wie in Abbildung 6 veranschaulicht trägt das episomale Plasmid des SHM-Reporters ein *GFP* Gen mit einem vorzeitigen Stoppcodon (**TAG**), sodass kein funktionelles GFP Protein translatiert werden kann. Durch Mutationsereignisse, vor allem G zu C Transversionen in der Zelle, kann das Stoppcodon zu einem TAC-Codon (Bachl und Olsson, 1999) umgewandelt werden. Die Frequenz der durch Hypermution erzeugten Revertanten, bei denen das funktionelle *GFP*-Gen rekonstituiert werden konnte, ist über die FACS-Analyse detektierbar (Abbildung 6).

Die im vorherigen Abschnitt aufgeführten Burkitt-Lymphomzelllinien wurden mit dem SHM-Reporter transfiziert und durch Zugabe von Hygromycin wurden diejenigen Zellen selektioniert, die das episomale Plasmid aufgenommen haben. Das Fortschreiten der Selektion wurde mit Hilfe eines GFP-tragenden Vergleichsvektors kontrolliert. Nach Abschluss der Selektion, zirka 14 bis 17 Tage nach der Transfektion, wurde ein Teil der Kultur mit einem p53-Inhibitor (Pifithrin- α , PFT) versetzt.

PFT wurde erstmals 1999 als chemischer Inhibitor von p53 identifiziert, der vor letalen Nebenwirkungen bei der Krebsbehandlung von Mäusen schützte (Komarov *et al.*, 1999). *In vitro* Experimente zeigten, dass PFT reversibel die p53-abhängige Apoptose und die

transkriptionelle Aktivierung, vor allem von *Cyclin G*, *p21* und *mdm2*, blockiert (Komarov *et al.*, 1999). Der genaue Wirkungsmechanismus des Inhibitors ist allerdings noch unklar.

Alle 2 bis 3 Tage während des Experimentes wurden Zellaliquots der unbehandelten und der mit PFT versehenen Kultur entnommen und die Anzahl GFP positiver Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt.

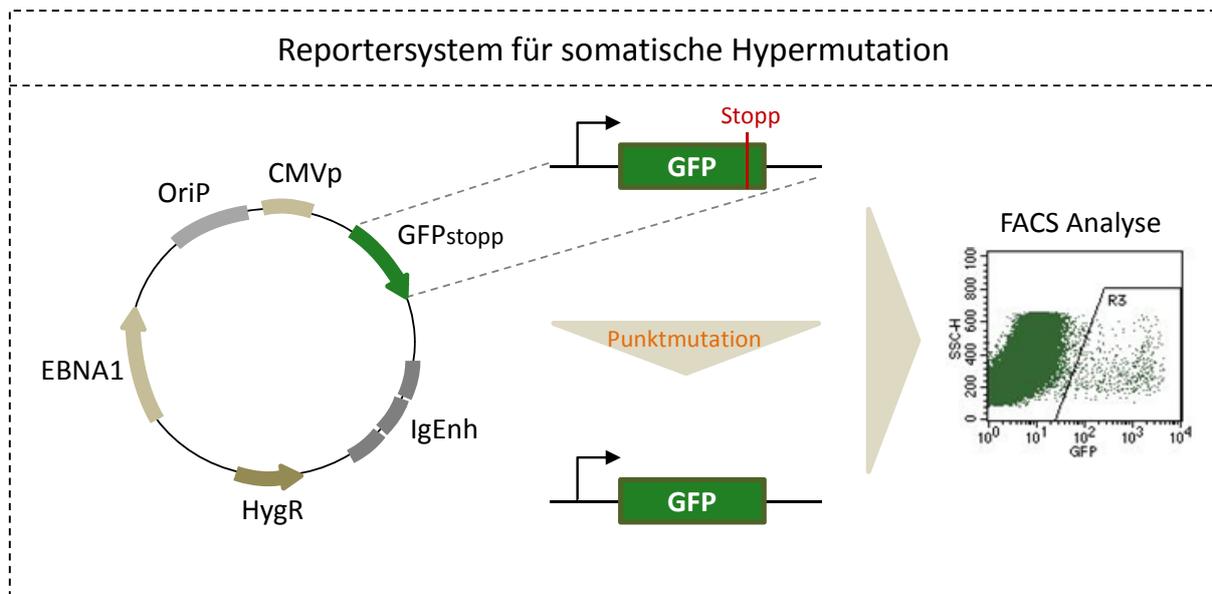


Abbildung 6 Reportersystem zur Bestimmung der SHM-Aktivität

Dargestellt ist der episomale Vektor mit dem GFP-Reporter, angetrieben von einem CMV Promotor (CMVp) und Ig-Enhancern (IgEnh). Für die Erhaltung der episomalen Replikation enthält der Vektor noch die EBV-Elemente OriP und EBNA1. Zur Selektion plasmidtragender Zellen dient das Hygromycinresistenzgen (HygR). Die Reversion des vorzeitigen Stoppcodon führt zur Translation von funktionellem GFP, welches mittels FACS-Analyse detektiert werden kann.

Aufgrund geringer Transfektionseffizienz der Zelllinien P3HR-1 und HH514 und vorzeitigen Absterbens der Zellen während des Versuches war leider mehrfach keine Auswertung dieses Zelllinienpaares möglich. Aus diesem Grund wurde der Fokus auf die anderen beiden Zelllinien gelegt.

In Abbildung 7A ist ein repräsentatives Ergebnis von drei durchgeführten Versuchen für BL100 dargestellt. Der Graph veranschaulicht den Anteil GFP-positiver Zellen (Revertanten) von etwa einer Million lebender Zellen, die durch wiederholte FACS-Messungen über einen Zeitraum von 30 Tagen ermittelt wurden. Im Verlauf des Experimentes ist eine sichtbare Zunahme von Revertanten in der unbehandelten BL100 Zellkultur zu sehen. Das bedeutet, dass diese Zellen kontinuierlich hypermutieren. Nach Zugabe von PFT in unterschiedlichen Konzentrationen (10 μ M und 20 μ M) steigt die Anzahl der Revertanten deutlich im Vergleich

zur unbehandelten Kultur. Bei Betrachtung der Lebenszellzahl wird klar, dass der p53-Inhibitor keinen starken Einfluss auf das Überleben der Zellen hat (Abbildung 7B). Zusätzlich wurden am Ende des Versuches Aliquots von behandelten und unbehandelten Zellen entnommen und diese für eine Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen p53 und p21 aufbereitet (Abbildung 7D). Hier ist gut zu erkennen, dass PFT tatsächlich eine inhibierende Wirkung auf die p53 Expression hat und somit auch kein p21 mehr exprimiert wird. Folglich ist der p53-Inhibitor in diesem Versuchsaufbau anscheinend funktionell.

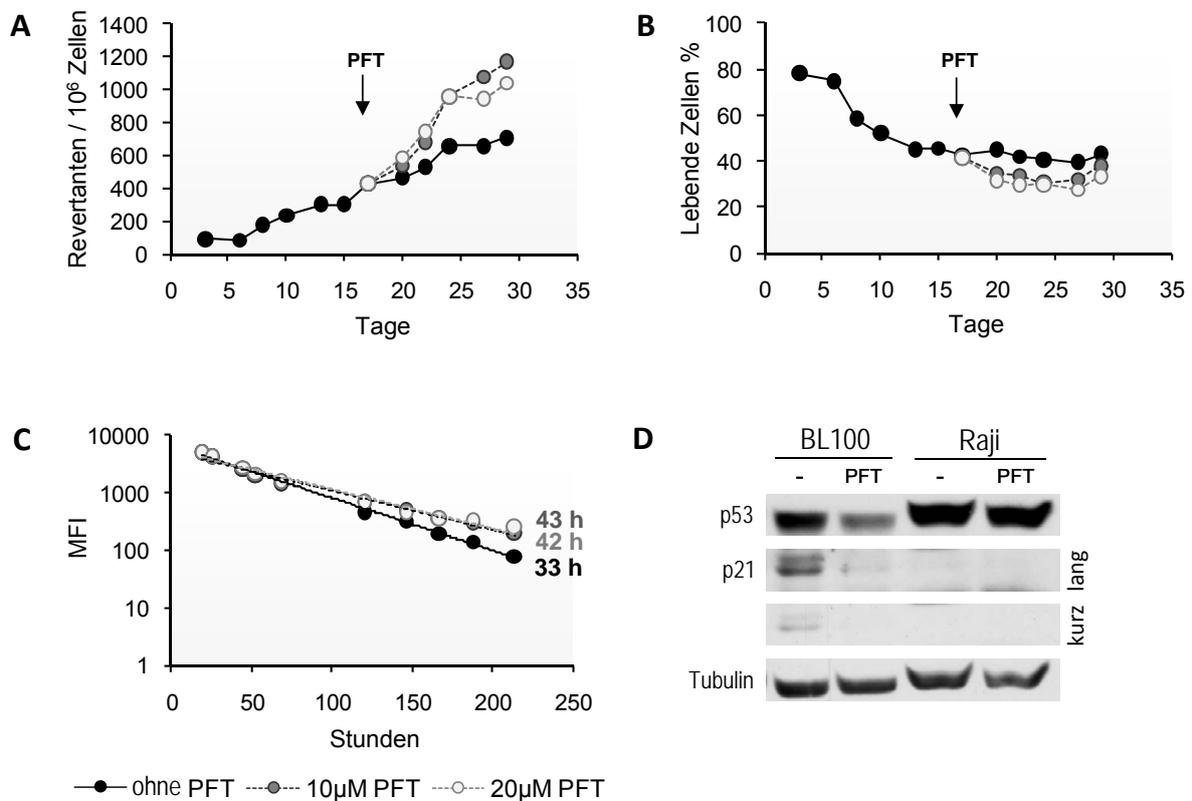


Abbildung 7 Hypermutationsaktivität von BL100 in Abhängigkeit von p53

A) Gezeigt ist die Anzahl der Revertanten (GFP-positive Zellen) von einer Million gemessener lebender Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen. Der schwarze Pfeil veranschaulicht die Zugabe des p53-Inhibitors (PFT), zirka 17 Tagen nach der Transfektion. Das Ergebnis repräsentiert einen von drei durchgeführten SHM-Versuchen für BL100. B) Prozentualer Anteil lebender Zellen während des Versuches. C) CFDA(CFSE)-Proliferationsassay. Dargestellt sind die Exponentialfunktionen, die für die Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeiten in Stunden (h) dienen. D) Westernblotanalyse für unbehandelte und mit 10 μ M PFT behandelte BL100- und Raji-Zellen 20 bzw. 26 Tage nach Transfektion mit Antikörpern gegen p53 und p21.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Erhöhung der Hypermutationsrate nach PFT-Zugabe auf eine ebenso schnellere Proliferation der Zellen zurückzuführen ist, wurde ein Proliferationsexperiment mit dem Farbstoff CFDA (Carboxyfluorescein Diacetat)

durchgeführt. Aufgrund seiner chemischen Struktur kann CFDA in die Zellen diffundieren und wird dort chemisch modifiziert, sodass ein grün fluoreszierender Succinimidyl Ester (kurz CFSE) entsteht (Quah *et al.*, 2007). CFSE selbst kann nicht mehr aus den Zellen hinaus diffundieren und die Zellen bleiben folglich irreversibel durch CFSE gefärbt. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen übertragen und die Geschwindigkeit der abnehmenden Fluoreszenzintensität kann als Maß zur Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit verwendet werden. Durch tägliche FACS-Analysen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt und graphisch in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden dargestellt (Abbildung 7C). Die jeweiligen Gleichungen der erhaltenen Exponentialfunktionen dienen der Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeit.

In Abbildung 7C sind außerdem für BL100 die Proliferationsgeschwindigkeiten in Stunden zu den entsprechenden Geraden zugeordnet. Deutlich zu sehen ist eine langsamere Proliferation der mit PFT behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Der p53-Inhibitor hat anscheinend eine negative Auswirkung auf die Proliferation der Zellen. Jedoch erklärt die verlangsamte Proliferation nicht den zuvor beobachteten Anstieg der somatischen Hypermutation in BL100 nach Verabreichung von PFT, sondern deutet möglicherweise auf eine p53-abhängige Erhöhung der SHM hin.

Die Zelllinie Raji, welche mutiertes *p53* besitzt, zeigt ebenfalls eine konstante Hypermutationsaktivität im Verlauf der Zeit (Abbildung 8A). Nach Zugabe von PFT allerdings stagniert die Anzahl der Revertanten. Vergleichbar mit BL100 scheint der p53-Inhibitor keinen nachteiligen Einfluss auf das Überleben der Raji-Zellen zu haben (Abbildung 8B). Auch die Proliferationsgeschwindigkeit ist bei den mit PFT behandelten Zellen (Abbildung 8C) geringer. Möglicherweise könnte die verlangsamte Proliferation bei den mit PFT versehenen Raji-Zellen eine Erklärung für die niedrigere SHM sein.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten somit hypermutierende BL-Zelllinien identifiziert werden, welche noch funktionelles p53 besitzen. Das SHM-Experiment mit einem funktionellen p53-Inhibitor für BL100 zeigte deutlich, dass nach Hemmung von p53 die Hypermutationsaktivität erhöht war.

Zusätzlich stand noch ein weiteres *in vitro* Zellsystem zur Verfügung, welches bezüglich p53 ein genetisch klar definiertes Modellsystem ist. Dabei handelt es sich um die humane Darmkrebszelllinie HCT116 und deren p53-defizienten Klon, der durch einen kompletten *knockout* von p53 aus der ursprünglich p53-profizienten HCT116 Zellen generiert wurde

(Vogelstein und Kinzler, 1992). Jedoch scheiterte der Versuch ein Reporter für die Untersuchung der somatischen Hypermuation in Abhängigkeit von p53 in diesen Zellen konditional zu transfizieren. Auch veränderte Versuchsbedingungen und verschiedene Transfektionsmethoden blieben erfolglos. Aus diesem Grund erschien es sinnvoller weitere Untersuchungen in einem ebenfalls genetisch klar definierten *in vivo* Modell, in p53-defizienten Mäusen, fortzusetzen.

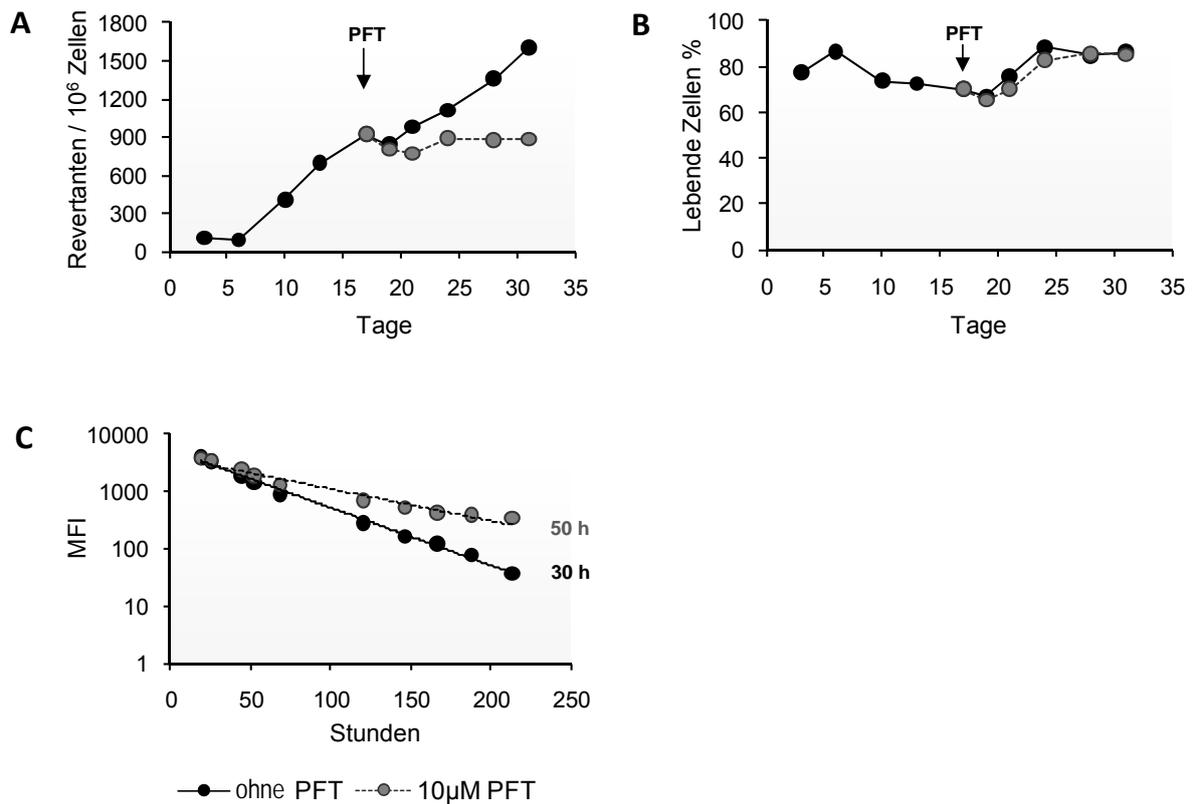


Abbildung 8 Hypermutationsaktivität von Raji in Abhängigkeit von p53

A) Gezeigt ist die Anzahl der Revertanten (GFP-positive Zellen) von einer Million gemessener lebender Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen. Der schwarze Pfeil veranschaulicht die Zugabe des p53-Inhibitors (PFT), zirka 17 Tagen nach der Transfektion. B) Prozentualer Anteil lebender Zellen während des Versuches. C) CDFA(CFSE)-Proliferationsassay. Dargestellt sind die Exponentialfunktionen, die für die Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeiten in Stunden (h) dienen.

3.2 Einfluss von p53 auf die somatische Hypermutation in normalen Keimzentrums-B-Zellen

Inwieweit p53 die somatische Hypermutation während der Keimzentrumsreaktion *in vivo* beeinflusst, sollte mit Hilfe des p53-Mausmodells geklärt werden. Die transgene Maus (C57BL/6) beherbergt eine Deletion des kodierenden Bereichs zwischen Exon 2 und 7 im p53-Gen. Diese Mutation verhindert vollständig die p53 Proteinsynthese (Jacks *et al.*, 1994). Die p53^{-/-} Nachkommen sind zwar lebensfähig und entwickeln sich normal, jedoch haben sie eine hohe Veranlagung zur Tumorentstehung. In allen nachfolgenden Versuchen wurden p53-heterozygote Mäuse miteinander verpaart, und deren p53-profiziente und p53-defiziente Nachkommen wurden mit einem Alter von 8 bis 12 Wochen für verschiedene Analysen herangezogen, um unter anderem der Tumorgefahr vorzubeugen.

3.2.1 p53 Expression in Keimzentrumszellen

Wie in der Einleitung angedeutet, ist die Frage immer noch nicht ausreichend geklärt, ob p53 in Keimzentrum exprimiert wird und auch funktionell vorliegt. Um festzustellen wie es sich im p53-Mausmodell verhält wurden zunächst p53^{+/+} und p53^{-/-} Mäuse intraperitoneal mit (4-hydroxy-3-nitrophenyl) azetyl-konjugiertem Hühner- γ -Globulin (NP-CGG) immunisiert, welches eine T-Zell-abhängige Immunantwort hervorruft. 14 Tage nach der Immunisierung wurde die Milz entnommen und der Zellverband aufgeschlossen. Anschließend folgte die Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle B220 (spezifisch für B-Zellen), PNA (spezifisch für Keimzentrumszellen) und CD95 (spezifisch für aktivierte B-Zellen). Die angefärbten Milzzellen wurden im Anschluss mit Hilfe eines FACSAria in zwei Fraktionen sortiert, die Keimzentrums-B-Zellen (B220⁺ PNA^{high} CD95⁺) und die Nicht-Keimzentrums- bzw. naiven B-Zellen (B220⁺ PNA^{low} CD95⁻). Die gesamte RNA beider Fraktionen wurde isoliert und nachfolgend in cDNA transkribiert. Die mRNA Mengen für p53 und bcl-2 wurden anhand quantitativer RT-PCR Analysen bestimmt und auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. In Abbildung 9A sind vergleichbare p53 mRNA-Mengen in den Keimzentrums B-Zellen sowie in den naiven B-Zellen von zwei individuellen Wildtyp-Mäusen detektierbar. Wie erwartet konnte bcl-2 in den naiven B-Zellen nachgewiesen werden (Martinez-Valdez *et al.*, 1996), während die Keimzentrum B-Zellen deutlich weniger bcl-2 mRNA exprimieren (Abbildung 9B).

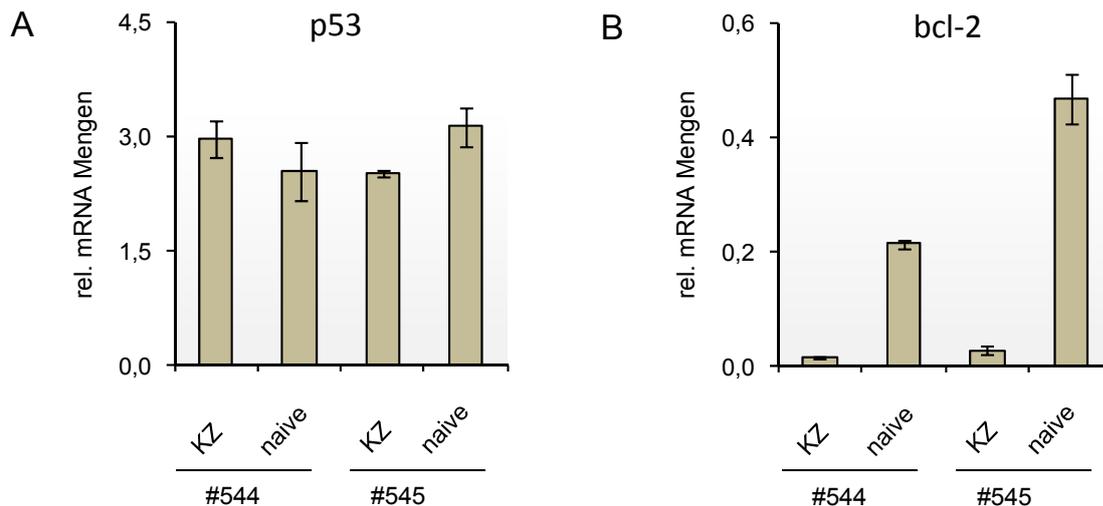


Abbildung 9 mRNA Expressionsmengen von p53 und bcl-2 in Keimzentrums- und naiven B-Zellen

Relative mRNA-Mengen von p53 (A) und bcl-2 (B) in Keimzentrums-B-Zellen (KZ) und naiven B-Zellen (naive) der Milz in verschiedenen Mäusen (#544 und #545) normalisiert auf GAPDH-mRNA-Mengen. Die Fehlerbalken beziehen sich auf zwei unabhängig durchgeführte RT-PCRs mit Triplikaten (p53) und Duplikaten (bcl-2)

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass in Keimzentrums-B-Zellen der Milz p53 exprimiert wird. Anscheinend wird p53 im Keimzentrum nicht vollständig von Bcl-6 herunterreguliert, sodass p53 weiterhin funktionell tätig sein kann. Eine Aussage über p53 Proteinmengen im Keimzentrum ist leider nicht möglich, da einerseits die Anzahl an Keimzentrums-B-Zellen einer Maus sehr gering ist und andererseits p53 unter normalen Bedingungen unter der Detektierungsgrenze liegt.

3.2.2 Untersuchung von T- und B-Zellpopulationen in nicht immunisierten p53^{+/+} und p53^{-/-} Mäusen

Um Defekte in der Entwicklung von T- und B-Lymphozyten in der p53-defizienten Maus auszuschließen, die dann negativ die Bildung von Keimzentrums-B-Zellen und auch eine funktionelle T- und B-Zellinteraktion beeinflussen könnten, wurden zunächst die wichtigsten Lymphozyten-Populationen im Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten und in der Bauchhöhle untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Organe von 8 bis 12 Wochen alten, nicht immunisierten Mäusen präpariert und die Einzelzellsuspensionen nach Antikörperfärbung mittels FACS analysiert.

Die im Knochenmark entstehenden B-Zellen können je nach Entwicklungsstadium grob in vier Populationen eingeteilt werden: die Pro-B-Zellen (B220^{low}, IgM⁻, CD43⁺), Prä-B-Zellen (B220^{low}, IgM⁻, CD43⁻), unreife B-Zellen (B220⁺, IgM⁺, IgD⁻) und reife B-Zellen (B220⁺, IgM⁺, IgD⁺), wie in Abbildung 10 dargestellt. Der prozentuale Anteil der vier B-Zell-Populationen in

p53-defizienten Mäusen ist vergleichbar mit dem der Wildtyp-Mäuse, was für eine normale B-Zell-Entwicklung im Knochenmark in den p53^{-/-} Mäusen spricht. Auch die Anzahl von T-Zellen (CD5⁺ bzw. CD3⁺) sowie CD4- und CD8-positiver T-Zell-Populationen in Thymus, Milz und Lymphknoten sind in den p53-defizienten Mäusen normal im Vergleich zu den p53-profizienten Mäusen (Tabelle 1). Nur die absolute Gesamtzahl an Thymozyten ist in den p53^{-/-} Mäusen verringert, während der prozentuale Wert mit dem Wildtyp vergleichbar ist, was möglicherweise experimentell bedingt sein kann. Wichtig jedoch ist, dass sowohl die absoluten als auch die prozentualen Werte für die T-Zellen im Lymphknoten und in der Milz keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

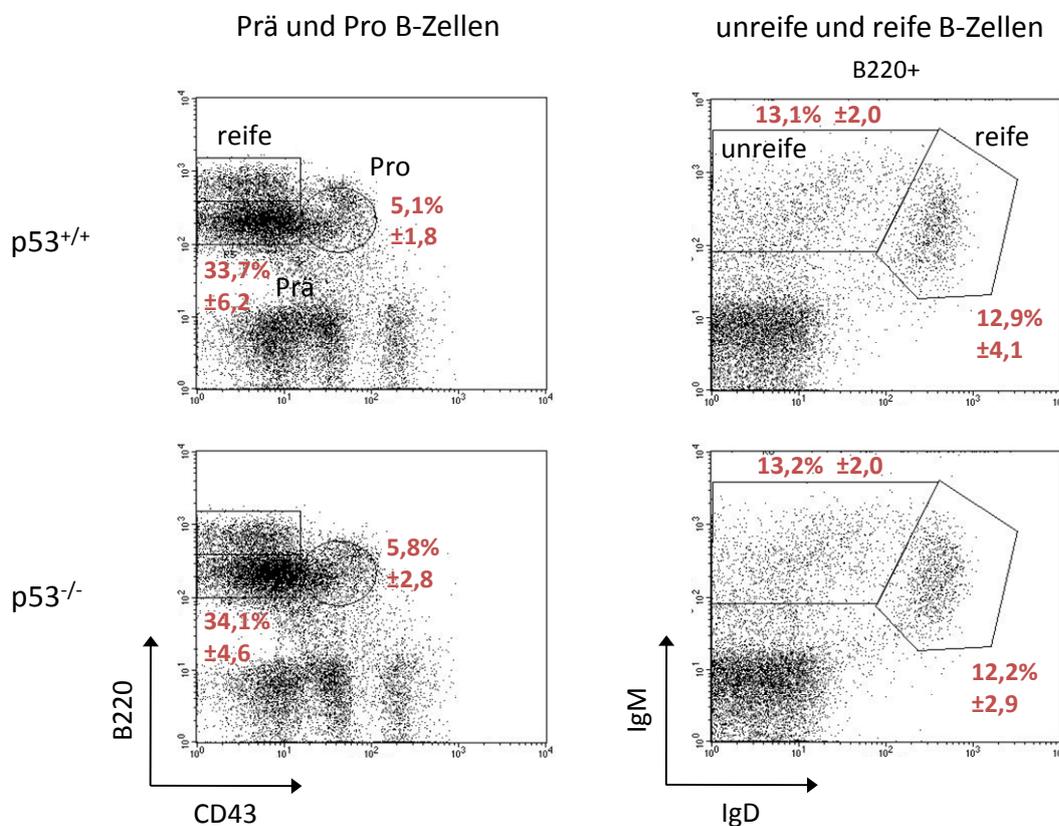


Abbildung 10 B-Zellentwicklung im Knochenmark

Lymphozyten des Knochenmarks wurden analysiert auf die Expression von B220 und CD43 (links; Prä und Pro B-Zellen) und B220⁺ Zellen auf die Expression von IgM und IgD (rechts; unreife und reife B-Zellen). Angegeben sind die prozentualen Mittelwerte inkl. Standardabweichung der einzelnen Populationen von 5 individuellen Mäusen jedes Genotyps.

Die von Knochenmark entstammenden transitionale B-Zellen gelangen vom Blutkreislauf in die Milz und differenzieren dort über verschiedene Stadien (T1, T2, T3) schließlich zu reifen B-Zellen. Transitionale B-Zellen (T1 bis T3) können mit AA4.1 und B220 Antikörper gefärbt werden, und mit Hilfe der Expression von IgM und CD23 können die einzelnen Stadien

unterschieden werden (Abbildung 11). Der Anteil an T1, T2 und T3 B-Zellen der $p53^{-/-}$ Mäuse weist ebenfalls keinen wesentlichen Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen auf. Auch die zwei Hauptpopulationen reifer B-Zellen in der Milz zeigen eine normale Verteilung mit zirka 65-70 % folliculären B-Zellen ($B220^{+}$, $CD21^{+}$, $CD23^{+}$) und ungefähr 5 % Marginalzonen B-Zellen ($B220^{+}$, $CD21^{\text{high}}$, $CD23^{-}$) (Abbildung 11).

Tabelle 1 Anzahl der T-Zellen in verschiedenen Organen

		Mäuse	Lymphknoten $CD3^{+}$		Milz $CD3^{+}$		Thymus $CD5^{+}$	
%	$p53^{+/+}$	5	58,5	$\pm 8,7$	26,3	$\pm 4,0$	97,6	$\pm 0,5$
	$p53^{-/-}$	5	56,6	$\pm 11,8$	26,5	$\pm 5,3$	97,9	$\pm 0,9$
$\times 10^6$	$p53^{+/+}$	5	1,1	$\pm 0,3$	17,2	$\pm 8,3$	85,5	$\pm 21,6$
	$p53^{-/-}$	5	1,2	$\pm 0,8$	14,8	$\pm 12,1$	58,3	$\pm 50,7$

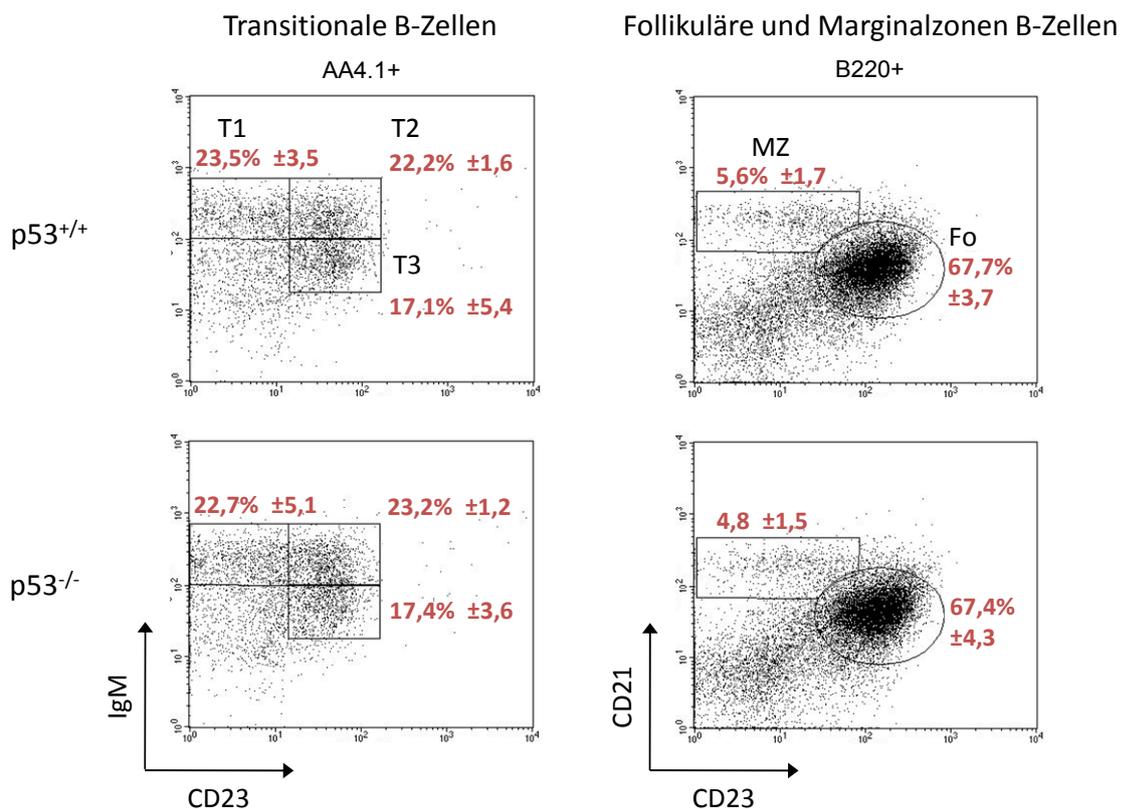


Abbildung 11 B-Zellpopulationen in der Milz

AA4.1⁺ Lymphozyten der Milz wurden auf die Expression von IgM und CD23 analysiert (links; Transitionale B-Zellen T1-T3). Rechts sind Follikuläre (Fo) und Marginalzonen (Mz) B-Zellen dargestellt. B220⁺ Zellen wurden auf die Expression von CD21 und CD23 untersucht. Angegeben sind die prozentualen Mittelwerte inkl. Standardabweichung der einzelnen Populationen von 4 (T1-T3) bzw. 16 (Fo und Mz B-Zellen) individuellen Mäusen jeden Genotyps.

Neben verschiedenen Entwicklungsstadien von B-Zellen gibt es die B1-Zellen und die konventionellen B-Zellen (B2-Zellen). B1-Zellen sind vor allem in der Bauchhöhle (Peritoneum) vorhanden, während nur 5 % in der Milz vorkommen und diese im Lymphknoten gänzlich fehlen (Berland und Wortis, 2002). B1-Zellen wiederum können anhand der Expression von CD5 in B1a-Zellen ($B220^{\text{low}}$, IgM^+ , CD5^+) und B1b-Zellen ($B220^{\text{low}}$, IgM^+ , CD5^-) unterteilt werden (Abbildung 12A). In Abbildung 12B ist der prozentuale Anteil von B1a, B1b und B2-Zellen von 9 Mäusen pro Genotyp veranschaulicht. Es ist deutlich erkennbar, dass die durchschnittliche Prozentzahl der B1a und B1b-Zellen p53-defizienter Mäuse signifikant reduziert ist, während die der B2-Zellen erhöht vorliegt. Da B1-Zellen hauptsächlich in der T-Zellunabhängigen Immunantwort involviert sind (Berland und Wortis, 2002), kann zusammenfassend gesagt werden, dass alle anderen untersuchten B-Zellpopulationen, welche für T-Zellabhängige Immunreaktionen und auch für die T-Zellen selbst wichtig sind, normale Werte in $p53^{-/-}$ Mäusen aufweisen.

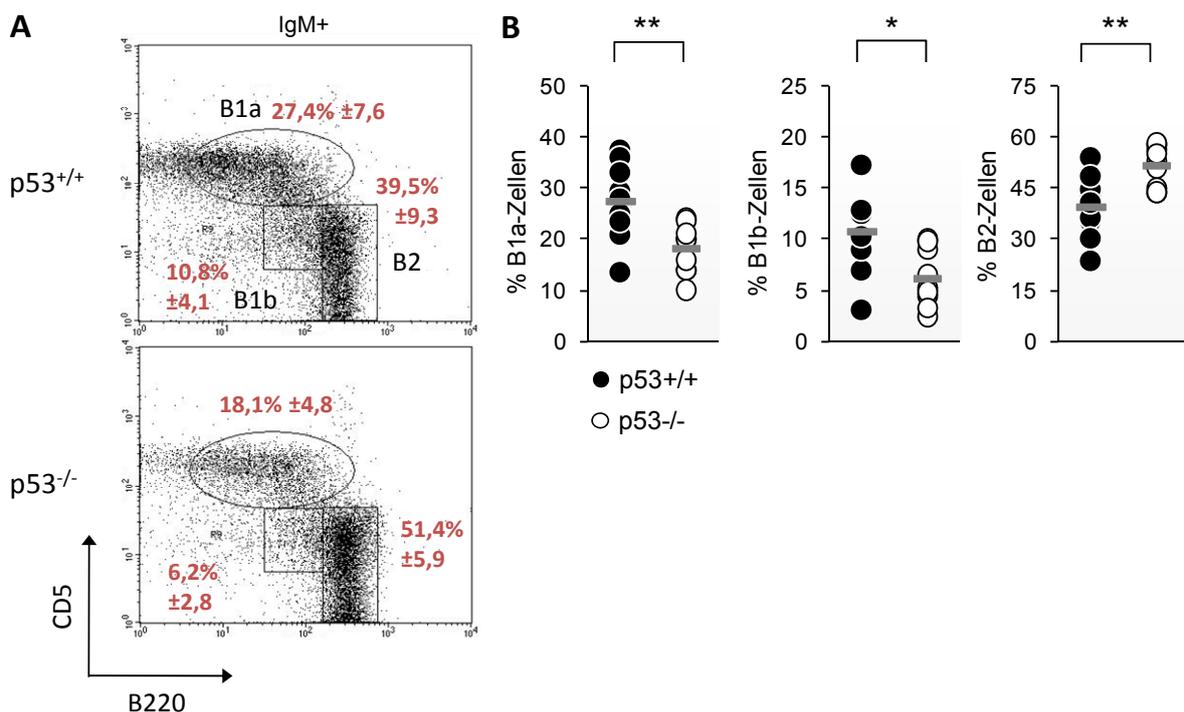


Abbildung 12 B-Zellpopulationen im Peritoneum

IgM^+ Lymphozyten des Peritoneums wurden auf die Expression von CD5 und B220 analysiert um B1a-, B1b- und B2-Zellen zu differenzieren. (A) Angegeben sind die prozentualen Mittelwerte inkl. Standardabweichung für die einzelnen Populationen von 9 individuellen Mäusen jeden Genotyps. (B) Darstellung im Diagramm der prozentualen Werte der B1a-, B1b- und B2-Zellen von $p53^{+/+}$ (schwarze Punkte) und $p53^{-/-}$ Mäusen (weiße Punkte). Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Mittelwerte sind durch horizontale Balken dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student's T-Test)

3.2.3 Untersuchung der Keimzentrumzellen in der Milz von immunisierten p53^{+/+} und p53^{-/-} Mäusen

Für eine vergleichende Hypermutationsanalyse von Genen in Keimzentrum-B-Zellen sollte die Bildung von Keimzentren in p53-defizienten Mäusen der in Wildtyp-Mäusen entsprechen. Um dies zu bestätigen, wurden p53^{+/+} und p53^{-/-} Mäuse mit NP-CGG i.p. immunisiert. Tag 7, 14 und 21 nach Immunisierung wurde die Milz entnommen und 8-10 µm dicke Gefrierschnitte mit einem Kryotom angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden anschließend mit α-IgM und α-PNA Antikörper immunohistochemisch gefärbt und Fotos mit 10-facher Vergrößerung angefertigt. In Abbildung 13A sind repräsentativ histologische Schnitte der Milz beider Genotypen für Tag 7, 14 und 21 nach Immunisierung dargestellt. Ebenso wie die Wildtyp-Mäuse zeigen p53-defiziente Mäuse eine intakte Struktur der Mantelzonen B-Zellen (IgM⁺), in rot dargestellt. Auch die Bildung der Keimzentren (PNA⁺; blau gefärbt) in p53^{-/-} Mäusen ist mit den p53^{+/+} Mäusen vergleichbar. Sie sind schon deutlich am Tag 7 nach Immunisierung zu sehen und am Tag 21 schon fast wieder verschwunden.

In Ergänzung zur immunohistologischen Untersuchung von Keimzentren in der Milz wurden 7, 14, 21 und 28 Tage nach Immunisierung die Milzzellen auf aktivierte Keimzentrumzellen mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Eine repräsentative Darstellung von B220⁺, PNA^{high} und CD95⁺ Keimzentrum-B-Zellen am Tag 14 ist in Abbildung 13B veranschaulicht. Wie vermutet weisen sowohl p53^{+/+} Mäuse als auch p53^{-/-} Mäuse knapp 3 % aktivierte Keimzentrum B-Zellen auf. Abbildung 13C zeigt die Kinetik der während der NP-spezifischen Immunantwort gebildeten Keimzentrumzellen einzelner Mäuse. Übereinstimmend mit der immunohistologischen Analyse sind schon 7 Tage nach Immunisierung eine hohe Anzahl an Keimzentrum B-Zellen zu sehen, welche nachfolgend allmählich abnimmt, sodass am Tag 28 fast keine mehr detektierbar sind. Erwähnenswert ist die beobachtete hohe Variabilität zwischen den Mäusen eines Genotyps, was die Untersuchung von mehr als 2 Mäusen pro Genotyp voraussetzt, um eine klare Aussage zu treffen. Grundsätzlich wird an den gesamten Daten deutlich, dass die Entstehung von Keimzentrum-B-Zellen nach Stimulierung mit einem Antigen in den p53-defizienten Mäusen anscheinend normal verläuft.

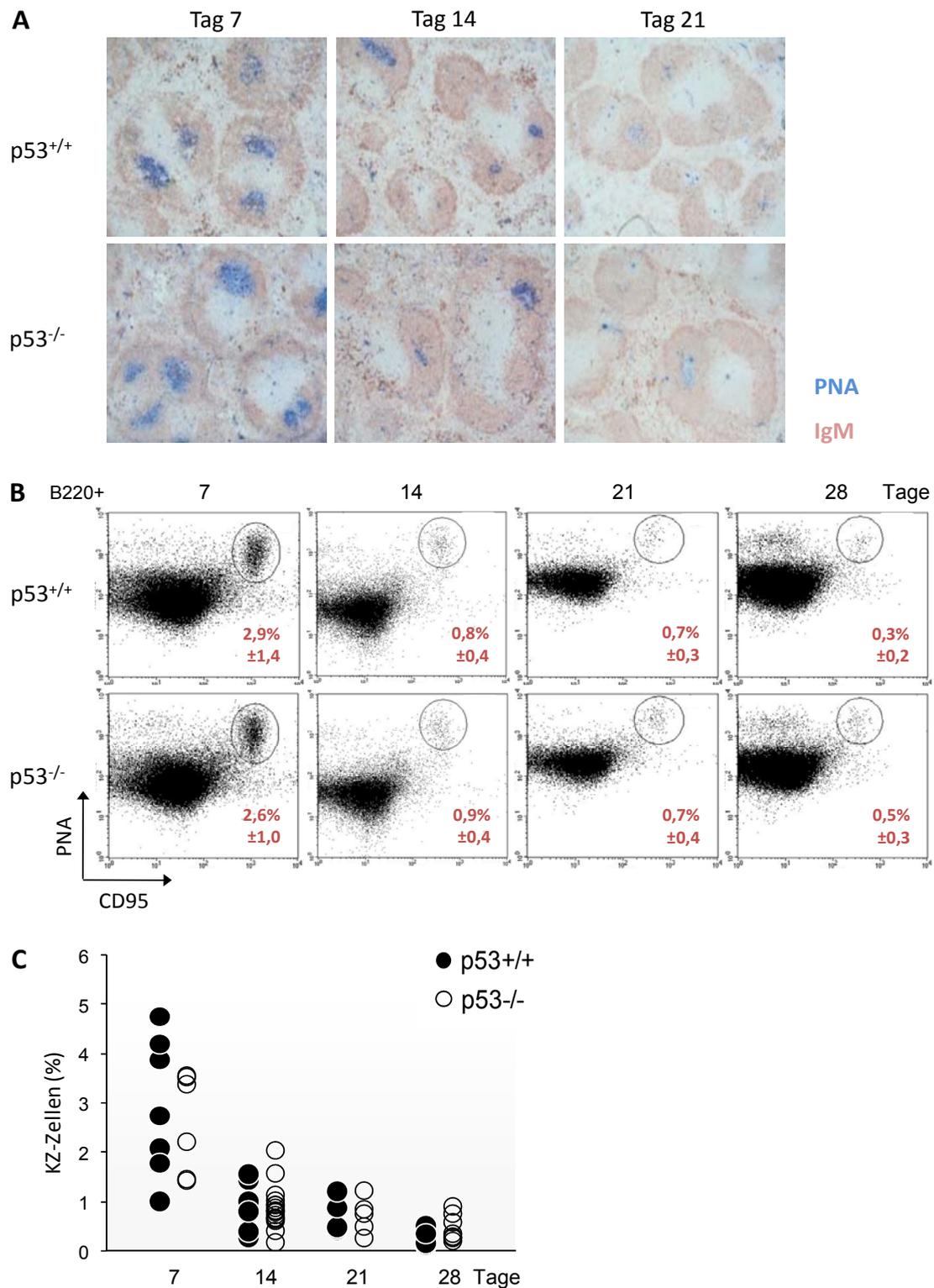


Abbildung 13 Bildung von Keimzentren und Keimzentrums-B-Zellen in der Milz

p53^{+/+} und p53^{-/-} Mäuse wurden mit NP-CGG i.p. immunisiert und am Tag 7, 14, 21 und 28 danach wurde die Milz entnommen. (A) Immunohistologische Analyse von Keimzentren der Milz. Gefrierschnitte wurden gefärbt mit anti-IgM spezifisch für B-Zellen (rot) und anti-PNA spezifisch für Keimzentrums-B-Zellen (blau). Vergrößerung 10-fach. (B) und (C) B220⁺ Lymphozyten wurden auf die Expression von PNA und CD95 spezifisch für aktivierte B-Zellen analysiert und als (B) FACS-Bild repräsentativ mit Mittelwert und Standardabweichung in % für Tag 7 bis Tag 28 bzw. die (C) Keimzentrums-B-Zellen gegenüber der Zeit in einem Diagramm dargestellt. Analysiert wurden 5 bis 19 Mäuse pro Genotyp. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus (schwarzer Punkt entspricht p53^{+/+} Maus und weißer Punkt entspricht p53^{-/-} Maus).

3.2.4 Untersuchung der T-Zellabhängigen Immunantwort in p53^{-/-} Mäusen

Wie im vorherigen Abschnitt festgestellt, weisen alle an der T-Zellabhängigen Immunantwort beteiligten B-Zellpopulationen in der p53-defizienten Maus normale Werte auf. Nun muss nur noch geklärt werden, ob diese Zellpopulationen auch funktionell sind. Dazu werden im Folgenden die während der Immunantwort gebildeten Immunglobuline in p53^{-/-} Mäusen mit denen in Wildtyp Mäusen verglichen.

Zunächst wurde Blut von 5 bis 7 nicht immunisierten Mäusen je Genotyp entnommen und mit Hilfe der ELISA-Methode die Gesamtmenge an vorhandenen Immunglobulinen im Serum bestimmt. In Abbildung 14A sind die Titer ($\mu\text{g/ml}$) der Antikörper IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgA für individuelle Mäuse dargestellt. Sowohl p53^{+/+} als auch p53^{-/-} Mäuse zeigen normale und auch vergleichbare Mengen an Immunglobulinen.

Des Weiteren wurden die während der T-Zellabhängigen Immunantwort gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper 28 Tage nach NP-CGG Immunisierung mittels ELISA gemessen. In Abbildung 14B sind die relativen Werte der NP-spezifischen Immunglobuline IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 wieder für die einzelnen Mäuse beider Genotypen aufgezeigt. Auch hier sind die Mengen der Immunglobuline in p53-defizienten Mäusen vergleichsweise normal.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass in den p53^{-/-} Mäusen die T- und B-Zellinteraktion funktionell ist, was wichtig für die Aktivierung und das Überleben von B-Zellen im Keimzentrum ist, und dass der Immunglobulin-Klassenwechsel ebenfalls normal stattfindet.

3.2.5 Gestörte Affinitätsreifung in p53^{-/-} Mäusen

Eine wesentliche Funktion von Keimzentren ist die Generierung hochaffiner Antikörper. Beim Prozess der SHM werden Punktmutationen in Gene der V-Region der schweren und leichten Immunglobulinkette eingefügt, was somit die Diversität des B-Zellrezeptors erhöht und die Affinität für das Antigen verändern kann (Liu *et al.*, 1997). Bei der Affinitätsreifung werden nur die Zellen positiv selektioniert, die einen funktionellen B-Zellrezeptor mit hoher Affinität gegenüber einem spezifischen Antigen aufweisen.

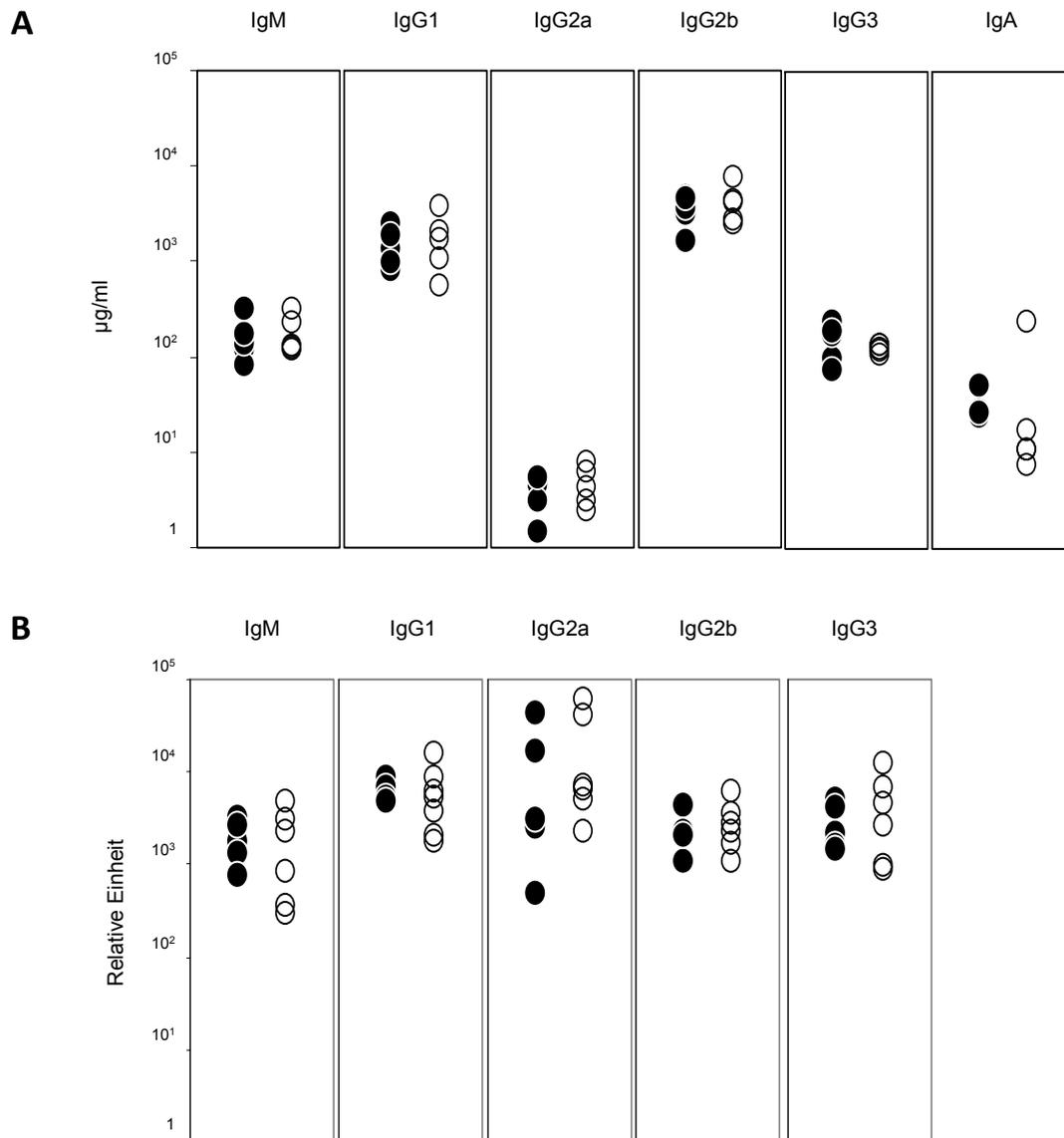


Abbildung 14 Gesamtmenge an verschiedenen Immunglobulinen im Serum

(A) Gesamttitert ($\mu\text{g/ml}$) der Immunglobuline im Serum von nicht immunisierten $p53^{+/+}$ (schwarze Punkte) und $p53^{-/-}$ Mäusen (weiße Punkte). (B) Relative Werte NP-spezifischer Antikörper im Serum am Tag 28 nach der Immunisierung. Analysiert wurden 5 bis 7 Mäuse pro Genotyp.

Für die Bestimmung der im Keimzentrum stattfindenden Affinitätsreifung wurden $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Mäuse mit NP-CGG immunisiert und Blut an Tag 7, 14, 21 und 28 nach Immunisierung entnommen. Das aus dem Blut erhaltene Serum wurde anschließend mittels ELISA auf ein Gehalt an NP-spezifischen IgG1 Antikörpern untersucht. Diese Antikörper können darauf getestet werden, ob sie eine hohe oder eine geringe Affinität gegenüber NP zeigen, indem sie an ein Hapten mit geringer Dichte (NP3) bzw. mit hoher Dichte (NP17) binden. Abbildung 15A und B veranschaulicht die Produktion von IgG1 Antikörpern einzelner Mäuse mit geringer (NP17, rechts) und hoher (NP3, links) Affinität gegenüber dem Antigen während der Immunreaktion. Sowohl $p53^{+/+}$ als auch $p53^{-/-}$ Mäuse zeigen während der Immunantwort die

erwartete Bildung von NP-spezifischen IgG1 Antikörpern, deren Menge am Tag 28 den maximalen Wert erreicht. Bei Betrachtung von IgG1 mit hoher Affinität (NP3) gegenüber dem Antigen fällt insbesondere am Tag 28 auf, dass die p53-defizienten Mäuse eine vergleichbar geringere Konzentration von Antikörpern aufweisen. Anschaulicher wird diese Beobachtung bei Berechnung des Verhältnis von NP3 bindenden und NP17 bindenden IgG1 Antikörpern, womit die Affinitätsreifung über die Zeit dargestellt werden kann (Abbildung 15C und D). In den zwei unabhängig voneinander durchgeführten Analysen ist deutlich erkennbar, dass die p53^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen einen geringeren Anstieg des Verhältnis von NP3/NP17 zeigen.

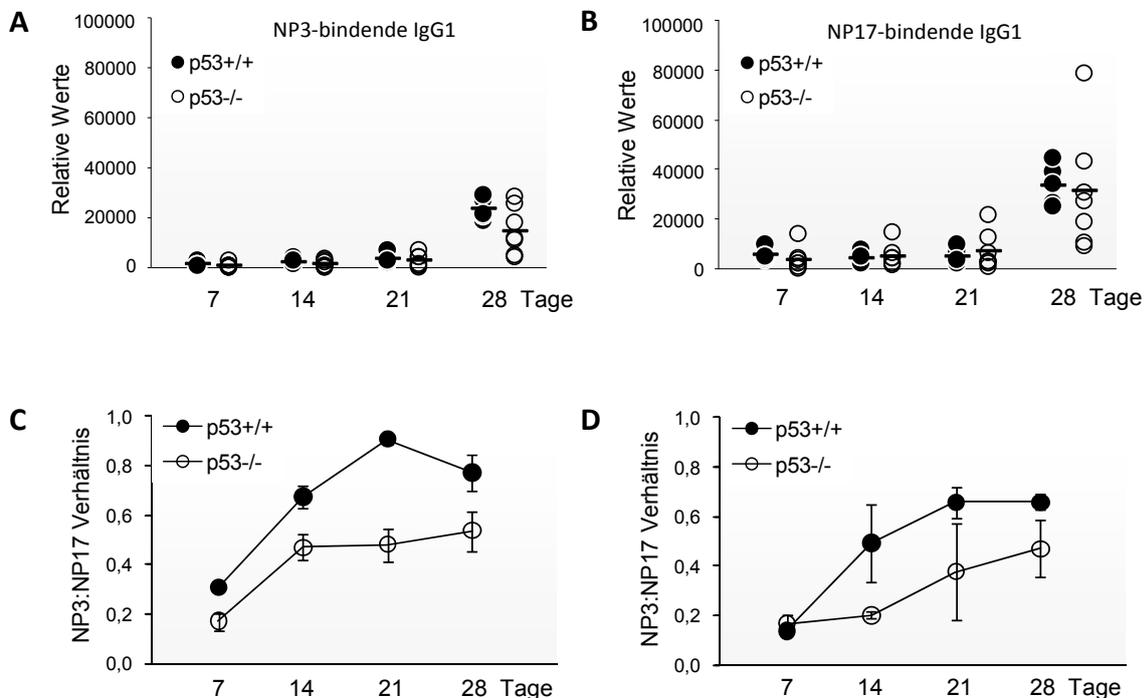


Abbildung 15 Bildung NP-spezifischer IgG1 Antikörper während der Immunantwort

Bestimmung der NP-spezifischen IgG1-Konzentrationen individueller p53^{+/+} (schwarze Punkte) und p53^{-/-} (weiße Punkte) Mäuse am Tag 7, 14, 21 und 28 nach der NP-CGG-Immunisierung. (A) Dargestellt sind die relativen Werte von hochaffinen IgG1 Antikörper, die an Hapten mit geringer Dichte (NP3) binden und von (B) niedrigaffinen IgG1 Antikörper, die an Hapten mit hoher Dichte (NP17) binden. (C) und (D) Affinitätsreifung von NP-spezifischen IgG1 Antikörpern an Tag 7, 14, 21 und 28 nach Immunisierung. Gezeigt ist das Verhältnis von NP3 zu NP17 Werten von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Analysen mit (C) 2-3 Mäusen bzw. mit (D) 3-4 Mäusen pro Genotyp.

Die in den p53-defizienten Mäusen beobachtete gestörte Affinitätsreifung gibt deutlich einen Hinweis darauf, dass in diesen Mäusen ein Problem während der Keimzentrumsreaktion besteht, so dass p53 eine wichtige neuartige Funktion im Keimzentrum zugeschrieben werden kann.

3.2.6 Mutationsanalyse von *Ig*-Genen und nicht *Ig*-Genen in $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Keimzentrumszellen

Bisher konnte für $p53^{-/-}$ Mäuse gezeigt werden, dass die Entwicklung der an der T-Zellabhängigen Immunantwort beteiligten T- und B-Zellpopulationen normal verläuft und die *Ig*-Klassenwechsel-Rekombination funktionell ist. Dass diese Mäuse definitiv ein Keimzentrumsproblem haben, konnte mit der beeinträchtigten Affinitätsreifung von IgG1 Antikörpern gezeigt werden. Es bleibt zu klären bei welcher Phase der Keimzentrumsreaktion die Ursache für den Phänotyp zu suchen ist. Die Initiierung der Reaktion kann ausgeschlossen werden, da alle Voraussetzungen erfüllt sind, wie eine normale Entwicklung der wichtigsten T- und B-Zellpopulationen, die für die Aktivierung der B-Zellen und für die Keimzentrumsbildung benötigt werden. Eine mögliche Ursache für die gestörte Affinitätsreifung in $p53$ -defizienten Mäuse könnte beim Prozess der SHM zu finden sein. Aus diesem Grund soll in den nachfolgenden Abschnitten der Einfluss von $p53$ auf die somatische Hypermutation sowohl in *Ig*-Genen als auch in anderen Genen untersucht werden.

Die Abbildung 16A zeigt schematisch das experimentelle Vorgehen. 14 Tage nach Immunisierung mit NP-CGG wurde die Milz von $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Mäuse entnommen und die B-Zellen wurden isoliert. Anschließend wurden diese in zwei Fraktionen mit Hilfe des FACSaria sortiert, die Keimzentrums-B-Zellen und die naiven B-Zellen. Die aus den B-Zell-Fractionen erhaltene genomische DNA wurde für die Amplifikation des entsprechenden Gens verwendet und das Produkt anschließend in den pGEMT Vektor kloniert und in *E.coli* transformiert. Die Plasmide verschiedener Klone wurden präpariert und zur Sequenzierungsanalyse gegeben.

3.2.6.1 Analyse der Mutationsfrequenz und des Mutationsmusters in Immunglobulinen

Für die Bestimmung der Mutationsfrequenz wurde ein Bereich von 550 bp Länge stromabwärts vom J_H4 Segment in dem umgelagerten Immunglobulinen der schweren Kette analysiert (Abbildung 16B). Für die Amplifikation dieses Bereiches wurden Oligonukleotide verwendet, die in der FR3 (*framework region 3*) der meisten V_HJ558 -Gene und im Intron stromabwärts vom J_H4 -Segment der schweren Immunglobulinkette binden (Jolly *et al.*, 1997).

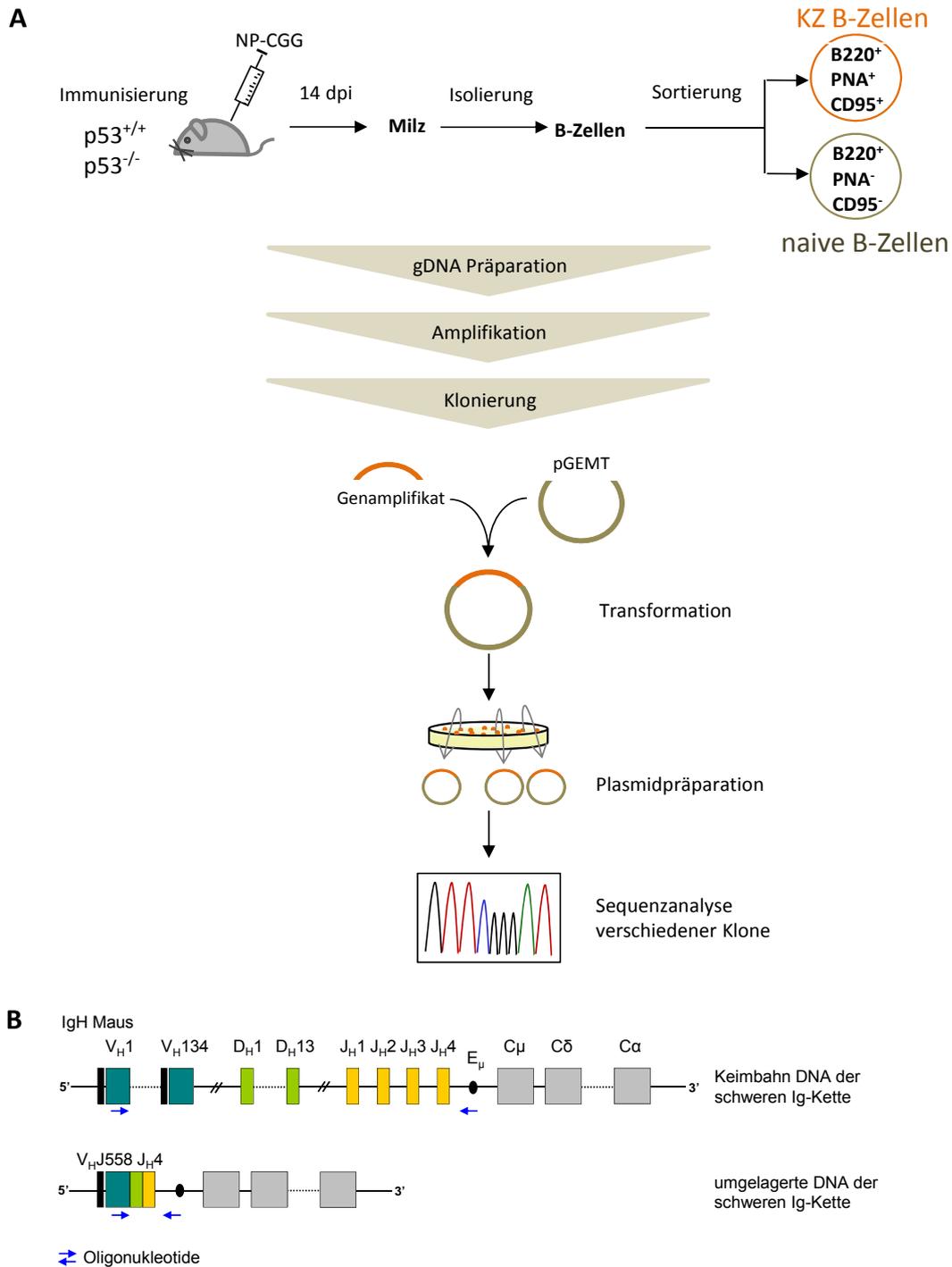


Abbildung 16 Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus

(A) 14 Tage nach Immunisierung wurde die Milz von $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Mäusen entnommen und aufbereitet. Aus der Zellsuspension wurden B-Zellen isoliert und anschließend in die Keimzentrums-B-Zellfraktion und in die naive B-Zellfraktion sortiert. Genomische DNA von beiden Fraktionen wurde präpariert, amplifiziert, in einen Vektor kloniert und dann in *E.coli* transformiert. Präparierte Plasmide verschiedener Klone wurden zur Sequenzierungsanalyse gegeben. (B) Genomische Organisation der Loci der schweren Immunglobulinkette der Maus. Schematische Darstellung der Oligonukleotide (blaue Pfeile) in der umgelagerten DNA der schweren Ig-Kette, die für die Amplifikation des J_H4 -Intronbereich verwendet wurden.

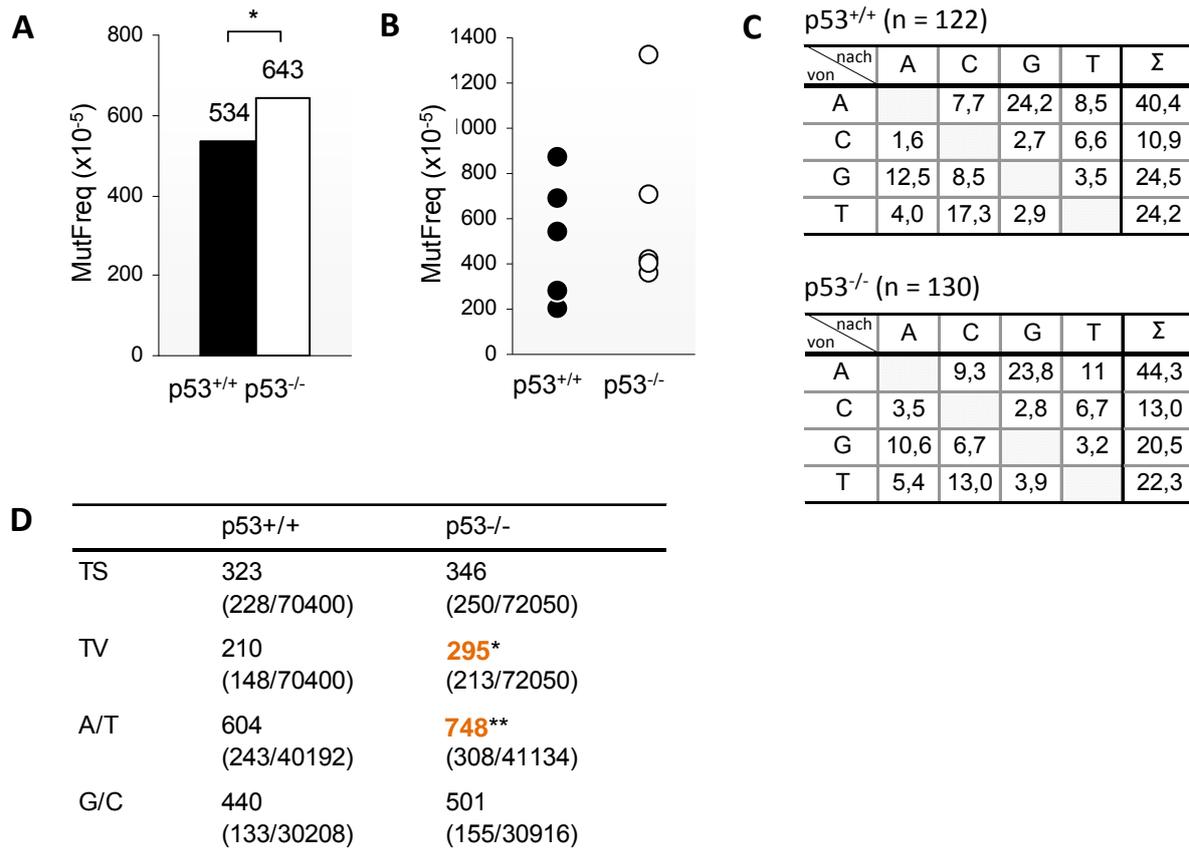


Abbildung 17 Mutationsanalyse des J_H4 Intronbereichs

Keimzentrums-B-Zellen der Milz wurden 14 Tage nach NP-CGG-Immunsierung von 5 Mäusen pro Genotyp isoliert. Der Intronbereich stromabwärts des JH4-Segments wurde amplifiziert und insgesamt 122 Klone von p53^{+/+} und 130 Klone von p53^{-/-} Mäusen analysiert. (A) Durchschnittliche MutFreq, Mutationsfrequenz ($\times 10^{-5}$ Mutationen pro bp) von 5 Mäusen und (B) Mutationsfrequenzen einzelner Mäuse pro Genotyp. Schwarze(r) Balken bzw. Punkte entsprechen den p53^{+/+} Mäusen und weiße(r) Balken bzw. Punkte entsprechen den p53^{-/-} Mäusen. (C) Basenaustauschmuster der SHM von 122 (p53^{+/+}) und 130 (p53^{-/-}) ausgewerteten Klonen. Prozentuale Angaben. (D) Mutationsfrequenzen ($\times 10^{-5}$) für Transitionen (TS), Transversionen (TV) und Mutationen an den Basen A/T und G/C. In Klammern ist die gesamte Anzahl der Mutationen pro untersuchter Basenzahl angegeben. *p<0,01; **p<0,05 (Chi-Quadrat-Test).

Es wurden zwei voneinander unabhängige Immunsierungen und anschließende Analysen durchgeführt, mit 2 Mäusen (1. Analyse) und mit 3 Mäusen (2. Analyse) pro Genotyp. Die bei der Sequenzanalyse erhaltenen Sequenzen zahlreicher Klone wurden mit Hilfe des SHMTool (<http://scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1>) ausgewertet (Maccarthy *et al.*, 2009). Die zusammengefassten Ergebnisse und die Ergebnisse jeder einzelnen Analyse für Keimzentrums-B-Zellen der Milz sind in Abbildung 17 und 18 dargestellt.

Bei Betrachtung der zusammengefassten Daten von 5 Mäusen pro Genotyp in Abbildung 17A-D ist ein klarer, wenn auch geringer Anstieg der somatischen Hypermutation zu erkennen, wobei besonders die Menge an Transversionen und generell Mutationen an den Basen A/T in p53-defizienten Mäusen erhöht sind.

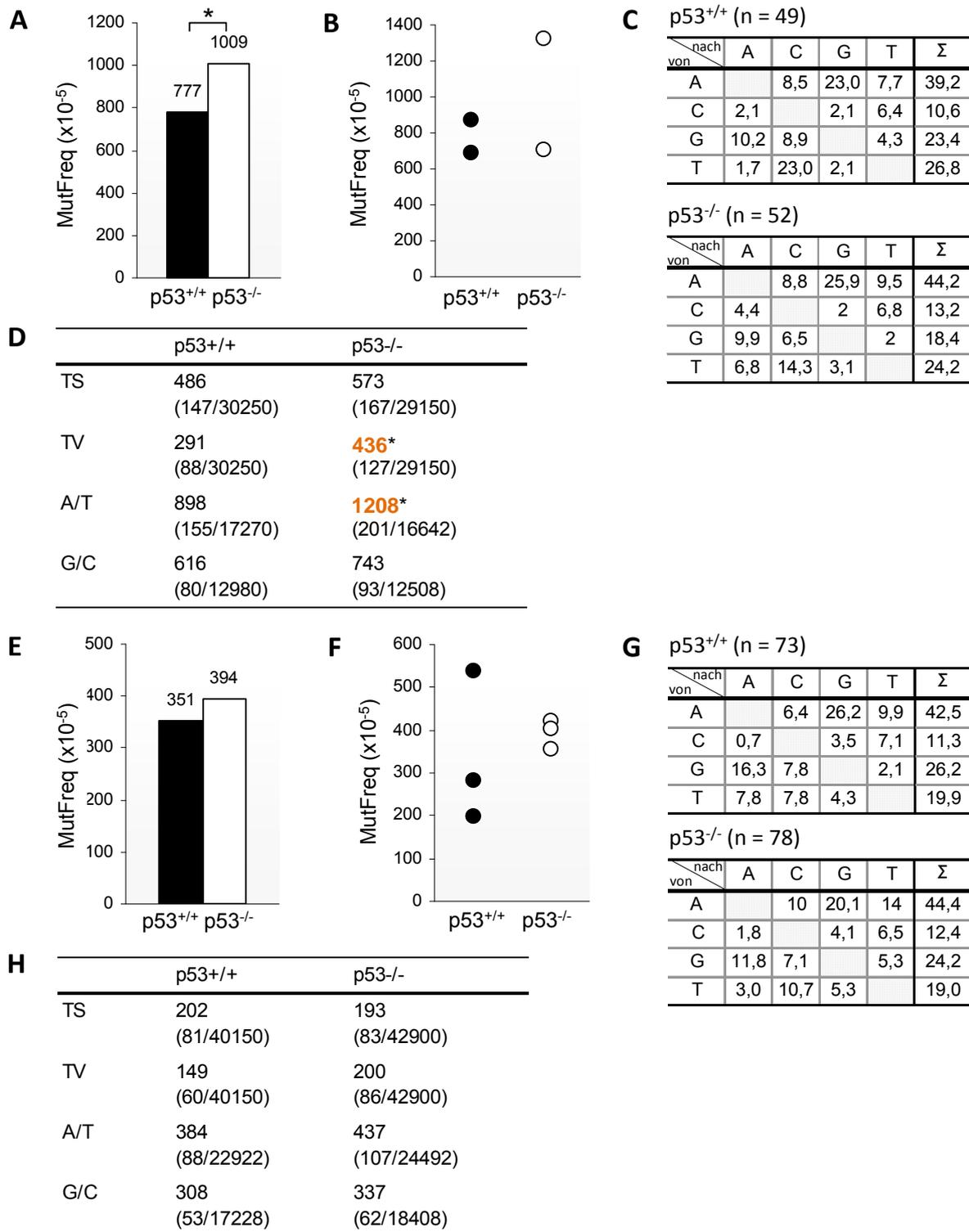


Abbildung 18 Mutationsanalyse des J_H4 Intronbereichs zweier separater Analysen

Keimzentrums-B-Zellen der Milz wurden 14 Tage nach NP-CGG-Immunsierung von 2 Mäusen (1. Analyse; A-D) und 3 Mäusen (2. Analyse; E-H) pro Genotyp isoliert. Der Intronbereich stromabwärts des JH4-Segments wurde amplifiziert und analysiert. (A) und (E) Durchschnittliche MutFreq, Mutationsfrequenz ($\times 10^{-5}$ Mutationen pro bp) von 2 bzw. 3 Mäusen pro Genotyp und (B) und (F) Mutationsfrequenzen einzelner Mäuse pro Genotyp. Schwarze(r) Balken bzw. Punkte entsprechen den p53^{+/+} Mäusen und weiße(r) Balken bzw. Punkte entsprechen den p53^{-/-} Mäusen. (C) und (G) Basenaustauschmuster der SHM von 49 bzw. 73 (p53^{+/+}) und 52 bzw. 78 (p53^{-/-}) ausgewerteten Klonen. Prozentuale Angaben. (D) und (H) Mutationsfrequenzen ($\times 10^{-5}$) für Transitionen (TS), Transversionen (TV) und Mutationen an den Basen A/T und G/C. In Klammern ist die gesamte Anzahl der Mutationen pro untersuchter Basenzahl angegeben. * $p < 0,01$ (Chi-Quadrat-Test).

Die durchschnittliche Mutationsfrequenz von 130 analysierten Klonen der p53^{-/-} Mäuse ist signifikant höher im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Beim Blick auf die Mutationsfrequenzen der einzelnen Mäuse beider Genotypen jedoch wird deutlich, dass die Frequenzen einer starken Streuung unterliegen (Abbildung 17B). Aufgrund dieser Tatsache ist es schwer zu beurteilen, ob die beobachtete veränderte SHM tatsächlich eine biologische Auswirkung in den p53-defizienten Mäusen zur Folge hat.

Auch bei Betrachtung der einzelnen Analysen separat macht sich die hohe Variabilität der Mäuse bemerkbar. Während bei der 1. Analyse die erhöhte Mutationsfrequenz und ebenso der Anstieg der Transversionen und der Mutationen an den Basen A und T signifikant sind, zeichnen sich bei der 2. Analyse nur die gleichen Tendenzen ab (Abbildung 18). Des Weiteren war auch ein großer Unterschied im Mutationsfrequenzbereich zwischen den Analysen (1. Analyse: ca. 800-1000; 2. Analyse: ca. 350-400) zu sehen, welcher stark von der Immunisierung abhängig sein könnte. Aber auch die Individualität der Mäuse und natürlich technische Details bei der Durchführung der Analysen dürfen nicht außer Acht gelassen werden, welche genauer in der Diskussion betrachtet werden.

Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass in den p53-defizienten Mäusen zwar eine moderate aber signifikante Erhöhung der SHM zu beobachten war. Bei Betrachtung des Mutationsmusters fiel auf, dass vor allem die Transversionen und die Mutationen an den Basen A und T signifikant erhöht waren. Dennoch bleibt zu klären, ob dieser Phänotyp tatsächlich einen biologischen Einfluss auf die gestörte Affinitätsreifung hat.

3.2.6.2 SHM-Analyse in nicht Ig-Genen (*bcl-6* und *c-myc*)

Neben der Einführung von Mutationen durch AID in die *Ig*-Gene während der SHM, was zur Generierung von B-Zellen mit hochaffinen B-Zellrezeptoren führen kann, konnten auch mehrere nicht *Ig*-Gene identifiziert werden, die ebenfalls in normalen B-Zellen von AID deaminiert werden. Diese Gene können dann entweder fehlerfrei repariert werden oder häufen Mutationen an (Liu und Schatz, 2009). Um herauszufinden, ob p53 auch in nicht *Ig*-Genen einen Einfluss auf die AID gerichtete Mutagenese hat, wurden exemplarisch die Gene *bcl-6* und *c-myc* auf Mutationen untersucht.

Dazu wurde ein Bereich von 500 bp (*bcl-6*) bzw. von 700 bp (*c-myc*), der in einer 1,5 kb Region stromabwärts der Transkriptions-Startstelle lokalisiert ist, auf Punktmutationen

analysiert (Abbildung 19). In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Analyse von je 3 Mäusen pro Genotyp für beide Gene zusammengefasst.

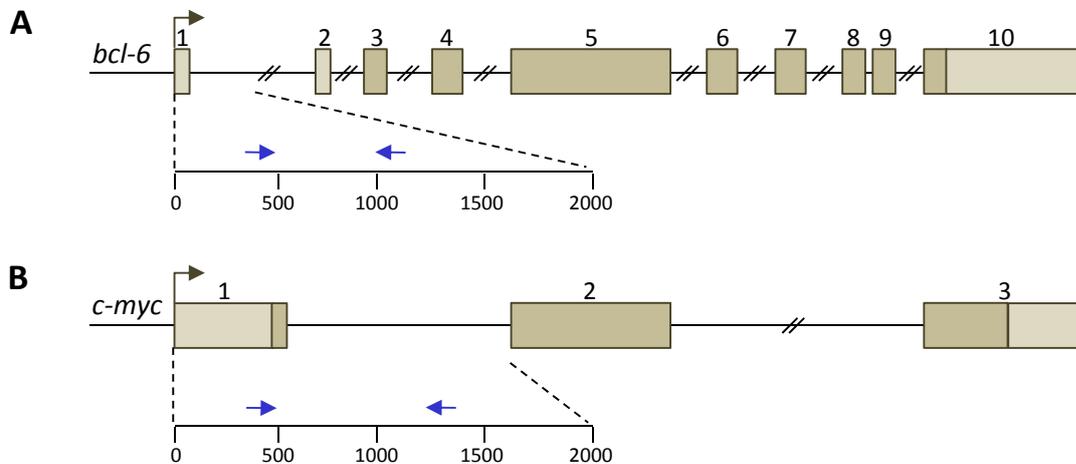


Abbildung 19 Genomische Organisation von *bcl-6* und *c-myc*

Schematische Darstellung der Gene (A) *bcl-6* und (B) *c-myc*. Kodierende und nicht kodierende Exons sind durch die Farben dunkelgrau bzw. hellgrau markiert. Der schwarze Pfeil repräsentiert die Transkriptions-Startstelle. Blaue Pfeile entsprechen den verwendeten Oligonukleotiden.

Die Mutationsfrequenzen für *bcl-6* und *c-myc* mit durchschnittlich 25×10^{-5} Mutationen/bp sind im Vergleich zu den *Ig*-Genen um ein vielfaches geringer. Überraschenderweise unterscheiden sich die Frequenzen für *bcl-6* und *c-myc* nicht stark voneinander. Bezugnehmend auf die Studie von Liu *et al.*, müsste *bcl-6* mehr als 10-fach stärker mutiert vorliegen als *c-myc*. In beiden Genen werden durch AID gerichtete Mutagenese Läsionen eingeführt, die im *c-myc*-Gen im Wesentlichen fehlerfrei repariert werden, während *bcl-6* Mutationen akkumuliert (Liu *et al.*, 2008). Ein möglicher Grund dafür könnten die in dieser Studie verwendeten Keimzentrumszellen des Peyerscher Plaque sein.

Tabelle 2 Mutationsfrequenzen ($\times 10^{-5}$ Mutationen pro bp)

	<i>Bcl-6</i>	<i>c-myc</i>	<i>J_H4</i> Intron
p53 ^{+/+}	35,1 (10/28500) ¹	20,4 (74/51800)	534,1 (376/70400)
p53 ^{-/-}	19,2 (5/26000)	25,6 (70/49000)	642,6* (463/72050)

Mutationsfrequenzen sind von je 3 Mäusen (*bcl-6* und *c-myc*) bzw. von je 5 Mäusen (*J_H4* Intron) zusammengefasst. ¹Anzahl der Punktmutationen pro untersuchter Basenzahl (in Klammern dargestellt). *p<0,01 (Chi-Quadrat-Test).

Während die Mutationsfrequenz für *bcl-6* in den $p53^{-/-}$ Mäusen geringer war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, lag die Mutationsfrequenz für *c-myc* in den $p53^{-/-}$ Mäusen minimal erhöht vor. Nichtsdestotrotz zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse, dass sowohl für *bcl-6* als auch *c-myc* die beobachteten Unterschiede in der Mutationsrate zwischen $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Mäusen nicht signifikant sind.

3.2.7 Mutationsanalyse des selektierten $V_H186.2$ Gens in $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Keimzentrumzellen

Im folgenden Abschnitt soll die Frage beantwortet werden, ob eine gestörte Selektion für Antikörperfunktionalität und -affinität von B-Zellen während der Keimzentrumreaktion die Ursache für die beeinträchtigte Affinitätsreifung ist. Die Untersuchung des Selektionsprozesses bezieht sich daher auf das selektierte $V_H186.2$ Gen, welches während der T-Zellabhängigen NP-Immunantwort dominiert.

Dazu wurde das Gen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, von Keimzentrum-B-Zellen und naiven B-Zellen von je 3 Mäusen pro Genotyp amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse wurde sowohl manuell nach Abgleich aller Sequenzen als auch mit Hilfe einer Vergleichsanalyse auf der IMGT Homepage (<http://imgt.cines.fr/>) durchgeführt.

Zunächst wurde eine Punktmutation im Codon 33 der CDR 1 (*complementarity determining region 1*) des $V_H186.2$ Gens überprüft, die einen Austausch von Tryptophan durch Leucin zur Folge hat. Diese Tryptophan→Leucin Substitution (W33L) erhöht die Affinität der NP-bindenden Antikörper um das 10-fache (Allen *et al.*, 1988) und ist somit kennzeichnend für eine positive Selektion der NP-spezifischen B-Zellen.

Ausgehend von insgesamt 86 untersuchten Sequenzen der Keimzentrum-B-Zellen aller $p53^{+/+}$ Mäuse zeigten 53 % die W33L Substitution. (Tabelle 3). Als Kontrolle wurden die naiven B-Zellen herangezogen, die diese Substitution nicht aufweisen (Daten nicht gezeigt). Bei $p53^{-/-}$ Mäusen allerdings besitzen nur 36 % der untersuchten 116 Klone die W33L Substitution, was deutlich eine signifikante Beeinträchtigung der Selektion für die W33L-Mutation in diesen Mäusen zeigt. Somit konnte auch auf Sequenzebene die beobachtete gestörte Affinitätsreifung von IgG1 in $p53$ -defizienten Mäusen während der NP-Immunantwort bestätigt werden.

Ein weiterer wichtiger Indikator für eine stattfindende Selektion kann mit dem Verhältnis von Substitutionsmutationen zu stummen Mutationen (*R/S, replacement to silent*) in der

Gerüstregion (FW-Region, *framework region*) und der CDR des $V_H186.2$ Gens dargestellt werden. Während das R/S-Verhältnis von ungefähr 9:1 in der CDR 1+2 der Mäuse beider Genotypen vergleichbar war, konnte beim R/S-Verhältnis in der FW-Region ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 3). Bei zufälliger Mutagenese in Keimzentrums-B-Zellen ist ein R/S-Verhältnis von 3:1 zu finden, während nach abgeschlossener Selektion ein Verhältnis von 1:1 für B-Gedächtniszellen charakteristisch ist (Weiss und Rajewsky, 1990). Da allerdings bei den Wildtyp-Mäusen dieses Verhältnis nur bei 1,2:1 liegt, scheint in den Mäusen die Selektion für funktionelle Antikörper schon fast vollendet zu sein (Tabelle 3). Im Gegensatz dazu ist der Wert für das R/S-Verhältnis mit 1,7:1 bei den $p53^{-/-}$ Mäusen signifikant erhöht, was ein deutliches Zeichen dafür ist, dass die Selektion von NP-spezifischen B-Zellen in diesen Mäusen beeinflusst ist.

Tabelle 3 Analyse der $V_H186.2$ Sequenzen von Keimzentrums-B-Zellen

	p53 ^{+/+}	p53 ^{-/-}
Klone	86	116
W33L (%)	53	36*
R/S		
CDR1+2	9,1	9,4
FW1-3	1,2	1,7*
InDels	7	8
Stopp	5	11
LR	3	7
DFL16.1 (%) ¹	86	80
YYGS (%) ²	23	28
V186.2 (%)	81	81

R/S: Verhältnis von Substitutionsmutationen zu stummen Mutationen. InDels: Insertionen und Deletionen. Stopp: vorzeitiges Stoppcodon. LR: Leserasterverschiebung. ¹Verwendung des Motifs DFL16.1 bei Genumlagerung von $V_H186.2$. ²Verwendung des YYGS-Motifs in der CDR3 bei Genumlagerung von $V_H186.2$. *p<0,05 (Fischer's Exact Test)

Die Verwendung bestimmter Genmotife, wie beispielsweise DFL16.1 und YYGS, welche aussagekräftig für die früh stattfindende Selektion während der Immunantwort sind, ist vergleichbar und normal in den p53-defizienten Mäusen (Tabelle 3). Auch bei den Mutationen, wie Deletionen, Insertionen, vorzeitigen Stoppcodons oder Leserasterverschiebung sind keine Unterschiede feststellbar, die die frühe Phase der Selektion beeinflussen könnten.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Selektion für B-Zellen mit funktionellen und hochaffinen NP-bindenden Antikörpern in $p53^{-/-}$ Mäusen zwar stattfindet, jedoch verlangsamt ist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten somit auf eine neuartige Rolle von p53 beim Selektionsprozess während der Keimzentrumsreaktion hin, welche für die beobachtete verminderte Affinitätsreifung verantwortlich ist.

4 DISKUSSION

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass p53 sowohl einen Einfluss auf die somatische Hypermutation als auch auf die Selektion von Keimzentrums-B-Zellen hat.

Für die Untersuchung der somatischen Hypermutation in Abhängigkeit von p53 *in vitro* wurde eine Burkitt-Lymphomzelllinie (BL100) identifiziert, die noch funktionelles p53 besitzt. Mit Hilfe eines Hypermutationsreporters konnte bei der Inaktivierung von p53 durch einen spezifischen Inhibitor (Pifithrin- α) in BL100 eine deutliche Zunahme der somatischen Hypermutationsrate beobachtet werden.

In p53-defizienten Mäusen zeigte die Mutationsanalyse des JH4-Intronbereich in dem Immunglobulinen der schweren Kette von Keimzentrums-B-Zellen 14 Tage nach der Immunisierung nur eine moderate Erhöhung der Mutationsfrequenz. Zudem wurde deutlich, dass es sich bei den zusätzlichen Mutationen hauptsächlich um Transversionen handelt. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die p53-defizienten Mäuse eine gestörte Affinitätsreifung von IgG1 Antikörpern während der Immunantwort aufwiesen. Diese Beobachtung konnte sowohl durch Bestimmung des IgG1-Titers im Serum als auch durch die Betrachtung der W33L-Substitution im selektierten VH186.2 Gens, welches spezifisch für die Generation hochaffiner Antikörper ist, bestätigt werden. Auch der Selektionsprozess von Keimzentrums-B-Zellen mit hochaffinen Antikörpern in Mäusen, die kein p53 besitzen, ist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen beeinträchtigt. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Inaktivierung von p53 in Mäusen eine funktionelle Störung von wichtigen Prozessen während der Keimzentrumsreaktion zur Folge hat.

4.1 Funktionelle Analyse von Burkitt-Lymphomzelllinien mit unterschiedlichem p53 Status

Im ersten Teil der Doktorarbeit wurde der für p53 kodierende Bereich von geeigneten humanen B-Zelllinien sequenziert, um erste Hinweise auf die Funktionalität von p53 in diesen Zelllinien zu bekommen. In den Burkitt-Lymphomzelllinien BL100, Raji und P3HR1 konnte ein gut beschriebener Polymorphismus in nur jeweils einem p53-Allel identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine G/C-Basen-Variation an der zweiten Stelle des Codons 72 in Exon 4 des p53 Gens, was zu Arginin (Arg72)- oder Prolin (Pro72)-Proteinvarianten an Position 72 in der Prolinreichen Domäne von p53 führt. Für diesen

Polymorphismus konnte beobachtet werden, dass die Arg72 Wildtypvariante hauptsächlich in der weißen Bevölkerung vorkommt, während die Pro72 Wildtypvariante vorwiegend in der chinesischen und afrikanisch-amerikanischen Bevölkerung auftritt (Beckman *et al.*, 1994). Funktionelle Beeinträchtigungen des p53 Proteins durch diesen Polymorphismus sind nicht bekannt, jedoch zeigen die Wildtypvarianten eine unterschiedliche biologische Aktivität. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Arg72 Proteinvariante viel effizienter darin ist Apoptose zu induzieren (Dumont *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist die Pro72 Variante wirkungsvoller bei der Einleitung des Zellzyklusarrests (Pim und Banks, 2004) und bei der DNA-Reparatur (Siddique und Sabapathy, 2006).

Des Weiteren zeigte die Sequenzierungsanalyse, dass in beiden *p53*-Allelen der Zelllinien Raji und HH514 Punktmutationen auftreten, die zu einem Austausch einer Aminosäure in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) des Proteins führen. Bei Raji handelt es sich um verschiedene Mutationen, bei denen im Protein Tyrosin durch Histidin an Position 234 (Tyr234His) und Arginin durch Glutamin (Arg213Gln) ersetzt wurde. Diese Ergebnisse bestätigten die in der Literatur beschriebenen Mutationen für Raji (Farrell *et al.*, 1991; Duthu *et al.*, 1992). Unbekannt dagegen ist die hier gefundene Punktmutation für HH514, die auf beiden Allelen zu finden ist. Der Austausch von Tyrosin durch Histidin an Position 163 (Tyr163His) betrifft ebenfalls die DBD. Da beide *p53*-Allele in diesen Zelllinien mutiert vorliegen ist es wahrscheinlich, dass das p53 Protein nicht mehr funktionell ist. Die meisten Missense-Mutationen führen zwar zur Synthese des Proteins, jedoch haben diese Proteine durch eine veränderte Konformation die spezifische DNA-Bindungsfunktion verloren und akkumulieren aufgrund der gestörten Regulation durch Mdm2 im Zellkern (Soussi und Beroud, 2001).

Eine bessere Prognose für eine p53-Funktionalität liefern die Sequenzierungsergebnisse für die Burkitt-Lymphomzelllinien BL100 und P3HR1, da in diesen Linien nur jeweils ein *p53*-Allel mutiert vorliegt. Wie auch in der Literatur beschrieben, konnte für P3HR1 der Austausch von Tyrosin durch Histidin an Position 163 (Tyr163His) in der DBD des Proteins bestätigt werden (Farrell *et al.*, 1991). Bei BL100 handelt es sich ebenfalls um eine Punktmutation, bei der Asparagin durch Aspartat an Position 239 (Asn239Asp) in der DBD ersetzt wurde.

Es gibt auch Mutationen in *p53*, die nicht zum Verlust der Funktion bzw. zu einer veränderten Funktionsweise führen. Einige p53-Mutanten haben nur zum Teil ihre DNA-Bindungs Kapazität verloren, wodurch sie nur an Promotoren ganz bestimmter p53-Zielgene binden können und somit unterschiedliche Transaktivierungsaktivitäten aufweisen (Rowan

et al., 1996; Friedlander *et al.*, 1996). Beispielsweise zeigen einige p53-Mutanten Defekte in der Aktivierung des Promotors vor dem apoptotischen Zielgen Bax, während die Aktivierung der p21-Transkription unbeeinflusst bleibt. Dadurch sind diese Mutanten zwar unfähig Apoptose einzuleiten, jedoch induzieren sie den Zellzyklusarrest vergleichbar mit dem Wildtyp (Ryan und Vousden, 1998; Campomenosi *et al.*, 2001). Mutiertes p53 kann aber auch einen dominant-negativen Einfluss auf die Wildtypfunktion haben, wenn es exprimiert wird und zusammen mit dem funktionellen p53-Protein Komplexe bildet (Soussi und Beroud, 2001). Da noch keine genaue Beschreibung über die Auswirkung der gefundenen p53-Mutationen in BL100 und P3HR1 auf die Proteinfunktion vorliegt, war es umso wichtiger den p53-Status in diesen Zelllinien genauer zu bestimmen. Dazu wurden die Zellen mit Gammastrahlung behandelt und die Proteinexpression von p53 und dessen Zielgen p21 untersucht.

Unter normalen physiologischen Bedingungen werden p53-Proteinmengen in der Zelle gering gehalten. Einer der Hauptregulatoren von p53 ist Mdm2. Mdm2 kann direkt die Region von p53 binden, die wichtig ist für die Transaktivierung verschiedener Zielgene und unterdrückt somit die transkriptionale Aktivität von p53 (Chen *et al.*, 1993; Oliner *et al.*, 1993; Picksley *et al.*, 1994). Als Ubiquitinligase reguliert Mdm2 auch direkt die Proteindegradation von p53 durch die Verknüpfung mit Ubiquitin (Brooks und Gu, 2006; Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). DNA-Schäden oder andere Arten von Stress aktivieren verschiedene Proteinkinasen, wie ATM, ATR, DNA-PK, Chk1 und Chk2, die somit Ser15 und Ser20 in der N-terminalen Domäne von p53 phosphorylieren (Appella und Anderson, 2001; Shieh *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 2000). Diese Phosphorylierung beeinträchtigen die Interaktion von p53 und Mdm2, wodurch p53 stabilisiert wird, und es kommt zur Erhöhung der p53-Proteinmengen in der Zelle.

Die Kontrollzelllinien mit funktionellem p53 (Rosi und P4936) zeigten wie erwartet geringe bis kaum detektierbare p53-Mengen im unbehandelten Zustand, während bei den bestrahlten Zellen eine Induktion der p53- wie auch p21-Expression zu beobachten war. Raji und HH514 dagegen wiesen schon unter normalen Bedingungen hohe Mengen an p53 auf, was ein Hinweis auf nicht funktionelles p53 in diesen Zelllinien ist (Soussi und Beroud, 2001). Auch die Induktion der p21-Expression in diesen Zelllinien bleibt aus, da hier p53 aufgrund der Mutation möglicherweise keine Transaktivierungaktivität mehr besitzt. BL100 und P3HR1, vergleichbar mit den Kontrollzelllinien, haben geringe basale p53-Proteinmengen,

und nach der Bestrahlung ist eine deutliche Zunahme von p53 zu beobachten. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die gebildeten p53-Tetramere, bestehend aus den Produkten des Wildtypallels und des mutierten Allel, noch funktionell sind. Auch die Induktion der p21-Expression nach Bestrahlung der Zellen bestätigt die, wenn auch abgeschwächte, Wildtypfunktion von p53. Die geringere p21-Induktion, im Vergleich zu den Kontrollen, könnten zum einem durch die gemischten p53-Tetramere mit verminderter p53-Funktion erklärt werden. Aber auch die Bindung von Bcl-6 an den *p21*-Promotor könnte ein möglicher Grund für die verminderte p21-Expression sein. Burkitt-Lymphomzellen stammen ursprünglich von Keimzentrums-B-Zellen ab (Cleary *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1995). Der in Keimzentrums-B-Zellen exprimierte Transkriptionsrepressor Bcl-6 (Cattoretti *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995), welcher wichtig für die Bildung von Keimzentren ist (Ye *et al.*, 1997), unterdrückt in diesen Zellen die p21-Expression (Phan *et al.*, 2005).

4.2 Bestimmung der Hypermutationsaktivität in Abhängigkeit von p53 in Burkitt-Lymphomzelllinien

Die Bestimmung der somatischen Hypermutation erfolgt mit einem weiterentwickelten episomalen Reportersystem (Scheller *et al.*), welches vor allem G zu C Transversionen in der Zelle misst (Bachl und Olsson, 1999). Diese Mutationsereignisse resultieren in der Expression von GFP, und die kontinuierliche Zunahme an grünen Zellen im Verlauf der Zeit ist ein Anzeichen für fortlaufende Hypermutation.

Das isogene Zelllinienpaar P3HR1 (anscheinend funktionelles p53) und HH514 (nicht funktionelles p53) wäre ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der SHM in Bezug auf p53. Jedoch wiesen beide Zelllinien eine geringe Transfektionseffizienz des Reporters auf. Zusätzlich war eine starke Abnahme an lebenden Zellen während mehrerer Versuche zu beobachten, sodass diese vorzeitig abgebrochen werden mussten.

Bessere Resultate waren bei BL100 und Raji zu sehen. Beide Zelllinien zeigten nach erfolgreicher Transfektion des Reportersystems einen kontinuierlichen Anstieg der SHM in einem Zeitraum von 30 bis 35 Tagen. Im Falle von BL100 war dieser im Vergleich zu Raji etwas geringer. Nach Zugabe des für p53 spezifischen Inhibitors Pifithrin- α (Komarov *et al.*, 1999) konnte nur für BL100 eine deutliche Zunahme der SHM-Aktivität beobachtet werden, während bei Raji der umgekehrte Effekt bei der Hypermutation zu sehen war. Eine Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen durch den Inhibitor konnte bei beiden Zelllinien

nicht festgestellt werden, da die Lebendzellzahl der mit PFT versetzten Kultur vergleichbar mit der der unbehandelten Zellen war. Interessanterweise konnte bei BL100 wie auch bei Raji eine Reduzierung der Proliferationsgeschwindigkeit durch PFT beobachtet werden. Die Zellteilungsrate der unbehandelten Kultur beträgt durchschnittlich 30 Stunden und die Zugabe von PFT setzte diese auf ca. 40 Stunden (BL100) bzw. auf ca. 50 Stunden (Raji) herauf. Da die SHM traditionell in Mutationen pro Zellteilung gemessen wird, wäre eine vermehrte SHM bei erhöhter Proliferation zu erwarten, auch wenn es Hinweise auf Mutagenese in der G1-Phase wie auch proliferationsunabhängige Mutagenese gibt (Faili *et al.*, 2002b; Wang und Wabl, 2005). Da aber mit PFT behandelte BL100-Zellen eine deutlich verminderte Proliferation zeigen, erklärt das nicht die hohe beobachtete SHM-Aktivität. Bei den Raji-Zellen dagegen wäre diese Beobachtung möglicherweise eine Erklärung für die anscheinend abnehmende Hypermutation.

Pifithrin- α (PFT) wurde als chemischer Inhibitor von p53 identifiziert. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass PFT reversibel die p53-abhängige Apoptose und die transkriptionelle Aktivierung, vor allem von *Cyclin G*, *p21* und *mdm2*, blockiert (Komarov *et al.*, 1999). Der genaue Wirkungsmechanismus des Inhibitors ist allerdings heute noch unklar. Der Inhibitor Pifithrin- α ist hinsichtlich der Spezifität und Stabilität teilweise in der Literatur umstritten (Komarova *et al.*, 2003; Walton *et al.*, 2005). Jedoch findet der kommerziell erhältliche Inhibitor immer mehr Verwendung für verschiedene Experimente (Nagy *et al.*, 2004; Fraser *et al.*, 2006). Sicherlich bleibt die Frage zur Spezifität des Inhibitors nicht ganz geklärt, wobei das letztendlich auf jeden chemischen Inhibitor zutreffen könnte. Dennoch konnten wir in unserem Versuchsaufbau bestätigen, dass PFT funktionell ist. Die Westernblotanalyse von behandelten und unbehandelten Zellaliquots am Tag 17 des SHM-Experiments zeigte für BL100 eine verminderte p53- und auch p21-Expression in der mit PFT versetzten Kultur.

Ein genetisch klareres System bezüglich p53 wäre das HCT-116 Zellsystem, bei dem durch einen kompletten knockout von *p53* in HCT-116 *p53*^{-/-} kein p53-Protein mehr gebildet werden kann (Vogelstein und Kinzler, 1992). Die Untersuchung der SHM erfolgt hier ebenfalls durch einen episomalen Reporter, der auch AID exprimiert und dazu konditional in diese Zellen transfiziert wird. Jedoch haben verschiedenste Transfektionsmethoden nicht zum gewünschten Erfolg geführt. Aufgrund der sehr geringen Transfektionseffizienz und

durch Probleme mit der Selektion reportertragender Zellen konnten keine auswertbaren Ergebnisse erhalten werden.

Aus diesem Grund erschien es umso wichtiger weitere Untersuchungen in einem ebenso genetisch klar definierten Modellsystem, p53-profizienten und p53-defizienten Mäusen (Jacks *et al.*, 1994), fortzusetzen.

4.3 Expression und Funktionalität von p53 in murinen Keimzentrums-B-Zellen

Die Frage, ob p53 in Keimzentrums-B-Zellen exprimiert wird und dort funktionell ist, ist immer noch nicht ausreichend geklärt, da widersprüchliche Publikationen in der Literatur existieren. Beispielsweise konnte die transkriptionelle Hemmung der p53-Expression durch Bcl-6 gezeigt werden (Phan und Dalla-Favera, 2004). Bekannt ist auch, dass Bcl-6 als wichtiger Transkriptionsrepressor hauptsächlich in Keimzentrums-B-Zellen gebildet wird (Cattoretti *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995). In anderen Studien konnte dagegen deutlich gezeigt werden, dass p53 sowohl in Zentroblasten als auch in Zentrozyten des Keimzentrums exprimiert wird (Martinez-Valdez *et al.*, 1996; Ranuncolo *et al.*, 2007). Aber auch die Beobachtung, dass B-Zellen vor chromosomalen Translokationen während der CSR durch p53 geschützt werden (Ramiro *et al.*, 2006), gibt Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von p53 in der Keimzentrumsreaktion.

Um zu klären, wie es sich in den naiven B-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen der Milz unserer Mäuse verhält, wurden die mRNA-Mengen von p53 und Bcl2 bestimmt. Erstaunlicherweise konnte in beiden B-Zellpopulationen vergleichbare p53-Mengen nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente Bcl2, da es hauptsächlich in naiven B-Zellen gebildet wird, jedoch nicht in den Keimzentrums-B-Zellen (Martinez-Valdez *et al.*, 1996), was durch das Experiment bestätigt werden konnte.

Die Untersuchung auf transkriptioneller Ebene zeigte, dass p53 definitiv im Keimzentrum exprimiert wird. Eine Möglichkeit für die Bestimmung der Funktionalität von p53 wäre die Betrachtung der Proteinmengen an p53. Allerdings ist die Anzahl der Keimzentrums-B-Zellen, die aus einer Maus isoliert werden können, mit 5×10^4 bis maximal 1×10^5 Zellen pro Milz viel zu gering, um damit Westernblotanalysen durchführen zu können. Zudem liegen die p53-Proteinmengen nicht gestresster Zellen unter der Detektierungsgrenze, aufgrund der negativen Regulation durch MDM2 (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*,

1997; Brooks und Gu, 2006). Die zweite Möglichkeit ist die Analyse von verschiedenen p53-Zielgenen (z.B. Bax, Puma, Noxa) ebenfalls auf transkriptioneller Ebene, welche momentan durchgeführt werden. Das Zielgen p21 sollte in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigt werden, da p21 unabhängig von p53 im Keimzentrum durch Bcl-6 reprimiert wird (Phan *et al.*, 2005).

4.4 Verminderte Anzahl der B1-Zellen in p53^{-/-} Mäusen

Normal entwickelte B- und T-Zellen bilden die Grundlage für die Entstehung von Keimzentren und das Stattfinden einer Keimzentrumsreaktion im Rahmen einer T-Zellabhängigen Immunantwort. Daher wurden B-Zellpopulationen der frühen und späten B-Zellentwicklung und auch T-Zellpopulationen p53-defizienter Mäuse untersucht. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen konnten fast keine Auffälligkeiten bezüglich der T- und B-Zellzahlen in verschiedenen Organen und auch der Verteilung der B- und T-Zelluntergruppen festgestellt werden.

Eine Ausnahme stellten die B1-Zellen dar, welche allerdings hauptsächlich an T-Zellunabhängigen Immunreaktionen beteiligt sind (Berland und Wortis, 2002) und somit keinen negativen Einfluss auf die Keimzentrumsreaktion ausüben. In der Bauchhöhle p53-defizienter Mäuse konnte eine signifikante Abnahme der B1a- und B1b-Zellen (B1-Zellen) beobachtet werden, während die konventionellen B-Zellen (B2-Zellen) erhöht vorlagen.

Bisher gibt es noch keine Erklärungsansätze für die verminderte Anzahl der B1-Population in den p53^{-/-} Mäusen. Interessant jedoch ist es, dass B1-Zellen sekundäre V(D)J-Rekombination der Immunglobuline durchführen (Qin *et al.*, 1999). Das bedeutet, dass diese Zellen stetig Brüche in die *Ig*-Gene einführen. Wenn dieser Prozess nicht mehr korrekt durch p53 kontrolliert wird, so könnten die Brüche zu so großem Schaden führen, dass die Zellen in Apoptose eintreten. Das würde möglicherweise dann die geringere Anzahl der B1-Zellen in den p53-defizienten Mäusen erklären.

4.5 Bildung von Keimzentrums-B-Zellen

Zusätzlich zu den Untersuchungen der T- und B-Zellpopulationen sollte noch geklärt werden, ob eventuelle Defekte in der Entstehung von Keimzentren in p53^{-/-} Mäusen existieren. Dazu wurden immunhistologische Färbungen der Milz von Tag 7, 14 und 21 nach der Immunisierung durchgeführt. Vergleichbar mit den Wildtyp-Mäusen zeigten p53-defiziente

Mäuse eine normale Entwicklung von Keimzentren, welche schon am Tag 7 zu sehen sind, bis hin zur allmählichen Abnahme der Keimzentren am Tag 21.

Auch die Darstellung der aktivierten Keimzentrums-B-Zellen ($CD95^+PNA^+$) der Milz mit dem FACS über einem Zeitraum von Tag 7 bis Tag 28 deuten auf eine normale Entstehung dieser Zellen in $p53^{-/-}$ Mäusen hin. Auffällig waren jedoch die großen Schwankungen der erhaltenen Werte bei Betrachtung aller Mäuse jedes Genotyps. Aus diesem Grund konnte erst nach Analyse einer Vielzahl von Mäusen mit Bestimmtheit gesagt werden, dass keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Keimzentrums-B-Zellen zwischen $p53^{+/+}$ Mäusen und $p53^{-/-}$ Mäusen bestehen. Diese Problematik könnte sich später auf die SHM-Analyse auswirken, da meist in der Literatur ein bis zwei Mäuse und nur selten vier Mäuse pro Genotyp für solche Analysen herangezogen werden.

Ungewöhnlich war auch die Tatsache, dass schon am Tag 7 eine hohe Anzahl an Keimzentrums-B-Zellen (knapp 3 %) vorhanden war, was auch bei den histologischen Daten zu sehen war. Die anderen Zeitpunkte nach der Immunisierung wiesen dagegen nur zirka 1 % Keimzentrums-B-Zellen auf. Ein Vergleich von C57BL/6-Mäusen und BALB/c-Mäusen zeigte, dass es tatsächlich eine Eigenschaft der C57BL/6-Mäuse ist, schon früh so viele Keimzentrums-B-Zellen zu bilden und dass sie vergleichsweise weniger Keimzentrums-B-Zellen am Tag 14 aufweisen (Daten nicht gezeigt). *In situ* Untersuchungen zeigten, dass das Auftreten von Mutationen in den *Ig*-Genen nicht mit dem Erscheinen von Keimzentren, die schon am Tag 4 auftauchen, korreliert (Jacob *et al.*, 1993). Erste Mutationen sind ab Tag 8 zu beobachten und akkumulieren bis zum Tag 14 nach der Immunisierung, was eine wichtige Voraussetzung für die spätere SHM-Analyse ist.

4.6 Normal funktionierende *Ig*-Klassenwechselrekombination in $p53^{-/-}$ Mäusen

Die Klassenwechselrekombination ist neben der somatischen Hypermutation ein ebenso wichtiger Prozess bei der Generierung von spezifischen Antikörpern mit verschiedenen Funktionen im Rahmen einer Immunantwort. Dabei werden unterschiedliche Antikörper-Isotypen gebildet, welche verschiedenartige Effektorfunktionen besitzen. Die Bestimmung der Gesamttiter aller *Ig*-Isotypen nicht immunisierter Mäuse zeigte vergleichbare und normale Mengen im Serum der $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Mäuse. Auch der Wechsel zu den einzelnen Isotypen nach der Immunisierung war ebenso funktionell in den $p53$ -defizienten Mäusen.

Die Klassenwechselrekombination kann aber auch in extrafollikulären B-Zell-Foci stattfinden (Jacob und Kelsoe, 1992). Diese B-Zell-Foci können während der Immunantwort von aktivierten B-Zellen geformt werden, die hauptsächlich IgG1 bilden (MacLennan *et al.*, 2003). Die normalen IgG1-Titer in p53-defizienten Mäusen implizieren folglich auch die unbeeinträchtigte Bildung von extrafollikulären Foci. Auch die von Jeroen E.J. Guikema beobachtete Zunahme von IgG2a in Abwesenheit von p53 (Guikema *et al.*, 2010) konnte hier nicht beobachtet werden. Es müsste geklärt werden, ob Unterschiede in den experimentellen Ansätzen bestehen oder das biologische System dafür verantwortlich ist.

Die Einleitung der Klassenwechselrekombination setzt die Interaktion von B-Zellen mit den sogenannten T-Helferzellen voraus. Dabei erhalten die B-Zellen zum einem Signale, die zum Überleben der B-Zellen beitragen (Kelsoe, 1995), und zum anderen werden Zytokine ausgeschüttet, die den Klassenwechsel einleiten und die Isotypspezifität regulieren (Liu *et al.*, 1996). Anhand der Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass in p53^{-/-} Mäusen sowohl die Interaktion mit T-Helferzellen als auch der Antikörper-Klassenwechsel normal funktionell sind.

4.7 Gestörte Affinitätsreifung in p53^{-/-} Mäusen

Eine wichtige Eigenschaft der Keimzentrumsreaktion ist die Affinitätsreifung. Dabei werden nach erfolgter SHM die B-Zellen selektiert, die eine erhöhte Affinität des B-Zell-Rezeptors für das Antigen aufweisen. Um die Affinitätsreifung in immunisierten p53^{+/+} und p53^{-/-} Mäusen zu bestimmen, wurden die Konzentrationen der NP-spezifischen IgG1-Antikörper am Tag 7, 14, 21 und 28 nach Immunisierung gemessen. Das Verhältnis von hochaffinen zu niederaffinen IgG1-Antikörpern veranschaulicht die Affinitätsreifung im Verlauf der Immunreaktion.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zeigen die p53-defizienten Mäuse ebenfalls eine stetige Zunahme der IgG1-Antikörper mit hoher bzw. niedriger Affinität gegenüber NP über die Zeit. Allerdings ist der Durchschnittswert der hochaffinen IgG1-Molekülen vor allem am Tag 28 bei den p53^{-/-} Mäusen etwas geringer. Bei Betrachtung der Affinitätsreifung von IgG1 während der NP-spezifischen Immunreaktion wird deutlich, dass diese bei den p53-defizienten Mäusen ganz klar vermindert ist.

Da kurzlebige Plasmazellen in extrafollikulären Foci ebenfalls IgG1-Antikörper produzieren (MacLennan *et al.*, 2003), kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese ebenso wie die von

den Keimzentrums-B-Zellen erzeugten IgG1-Antikörper in die Ergebnisse mit eingehen. Eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen, wäre die Betrachtung anderer Antikörperisotypen. Des Weiteren ist auch die genetische Untersuchung des selektionierten V186.2 Gens möglich, auf die später noch einmal eingegangen wird. Jedoch handelt es sich bei den IgG1-Antikörper von Plasmazellen extrafollikulären Ursprungs hauptsächlich um niederaffine Antikörper (MacLennan *et al.*, 2003; Tarlinton, 2008). Die Beobachtung, dass nur die die hochaffinen IgG1-Antikörper zu einem gewissen Maß in p53-defizienten Mäusen verringert waren, verdeutlicht, dass im Wesentlichen die Keimzentrums-B-Zellen betroffen sind.

Da die Affinitätsreifung von Immunglobulinen eine zentrale Funktion in Keimzentrums-B-Zellen darstellt und die p53^{-/-} Mäuse eine gestörte Affinitätsreifung von IgG1 aufweisen, wird deutlich dass ein Problem der Keimzentrumsreaktion in diesen Mäusen existiert.

Ein Grund für eine verminderte Affinität der Antikörper in p53-defizienten Mäusen könnte in der Initiierung der Keimzentrumsreaktion liegen. Jedoch erscheint das unwahrscheinlich, da die bisherigen Untersuchungen der an der T-Zellabhängigen Immunantwort beteiligten T- und B-Zellpopulationen, die wichtig für die Entstehung von Keimzentren sind, eine normale Entwicklung in p53^{-/-} Mäusen zeigten. Auch die histologischen Analysen zeigten keine Beeinträchtigung der Keimzentrumsbildung in diesen Mäusen. Weitere Gründe könnten auch in der Einführung von Mutationen in *Ig*-Genen während der SHM, die für die Diversität der Antikörper verantwortlich ist, zu finden sein. Aber auch ein veränderter Selektionsprozess der B-Zellen mit höheraffinen B-Zell-Rezeptor könnte zur einer gestörten Affinitätsreifung beitragen. Beide Prozesse, die SHM und die Selektion, werden in den nachfolgenden Abschnitten genauer betrachtet.

4.8 Mutationsanalyse der *Ig*-Gene in Keimzentrums-B-Zellen

Während der somatischen Hypermutation im Keimzentrum werden Mutationen in den variablen Regionen der schweren und leichten Immunglobulinkette in einer Häufigkeit von ca. 10^{-3} Mutationen/bp pro Zellteilung eingeführt (McKean *et al.*, 1984; Rajewsky, 1996). Bei der NP-spezifischen Immunantwort dominieren Antikörper, die das V_H-Gen V186.2, welches der V_HJ558-Genfamilie angehört, in Kombination mit dem D-Element DFL16.1 exprimieren (Cumano und Rajewsky, 1986; Weiss und Rajewsky, 1990). Mit Primern, die in der FR3 der meisten V_HJ558-Gene und im Intron stromabwärts vom JH4-Segment der schweren

Immunglobulinkette binden (Jolly *et al.*, 1997), wurde ein 550 bp langer Bereich amplifiziert und anschließend auf Mutationen hin untersucht.

Die erste Analyse mit je zwei Mäusen/Genotyp zeigte eine moderate, aber signifikante Erhöhung der Mutationsfrequenz bei den p53^{-/-} Mäusen. Auch beim Blick auf das Mutationsmuster ist eine signifikante Steigerung von Transversionen erkennbar und ebenso liegen Mutationen an den Basen A und T signifikant erhöht vor. Die zweite Analyse dagegen, bei der drei Mäuse/Genotyp untersucht wurden, zeigte zwar die gleichen Tendenzen, jedoch waren die Unterschiede zwischen den Wildtyp-Mäusen und den p53-defizienten Mäusen nicht signifikant.

Ein Vergleich beider Analysen machte deutlich, dass ein großer Unterschied des Mutationsfrequenzbereichs zwischen den Analysen (1. Analyse: ca. 800-1000; 2. Analyse: ca. 350-400) besteht. Gründe dafür könnten in der unabhängigen Immunisierung liegen, die möglicherweise bei den Analysen unterschiedlich stark ausgefallen ist. Aber auch die Tatsache, dass es sich um individuelle Mäuse handelt, sollte nicht außer Acht gelassen werden. Ein weiterer Unterschied bei den zwei Analysen ist die bei der Amplifikation verwendete Polymerase. Bei der ersten Analyse wurde ein Polymerasemix verwendet, welcher unter anderem die Taq Polymerase enthält, während bei der zweiten Analyse die höchst fehlerfreie Phusion Polymerase angewandt wurde. Trotz Verwendung der Taq Polymerase, die eine Fehlerrate von $\sim 10^{-4}$ besitzt (Saiki *et al.*, 1988; Tindall und Kunkel, 1988), haben die durch PCR Fehler entstandenen Mutationen keinen großen Einfluss auf die Auswertung und Betrachtung der Mutationsfrequenzen. Die Mutationsfrequenz der sogenannten PCR Fehler der ersten Analyse liegt bei ungefähr 100 ($\times 10^{-5}$ Mutationen pro bp), welche mit Hilfe der naiven B-Zellfraktion ermittelt werden konnte. Die Fehlerquote der Phusion Polymerase dagegen liegt bei nahezu null.

Auffällig waren auch die großen Unterschiede zwischen den Mutationsfrequenzen der einzelnen Mäuse jeden Genotyps bei beiden Analysen, was die Interpretation der Daten als Gesamtaussage deutlich erschwert. Daher erscheint es sinnvoll die Daten beider Analysen zusammenzufassen, wie es oft in der Literatur gemacht wird. Dabei konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Mutationsfrequenzen, der Transversionen und Mutationen an den A/T-Basen in den p53-defizienten Mäusen beobachtet werden. Die erhöhten Transversionen und die Mutationen an den Basen A und T, wofür hauptsächlich die Transläsionspolymerase Pol η verantwortlich ist (Delbos *et al.*, 2007), lassen vermuten, dass

eine vermehrte Translänionssythese bei eingefügten Schäden stattfindet. Dennoch bleibt zu klären, ob der beobachtete moderate Anstieg der somatischen Hypermutation überhaupt eine biologische Auswirkung hat.

4.9 Mutationsanalyse von nicht *Ig*-Genen

Während der SHM werden Mutationen durch AID in Gene eingefügt, die für die variablen Regionen der schweren und leichten Immunglobulinkette kodieren, um Antikörper mit höherer Antigenaffinität zu generieren (Delker *et al.*, 2009). Mittlerweile konnten aber auch mehrere nicht *Ig*-Gene identifiziert werden, die in normalen B-Zellen häufig von AID deaminiert werden und entweder Mutationen anhäufen oder hauptsächlich fehlerfrei repariert werden (Liu und Schatz, 2009). Um herauszufinden, ob p53 einen Einfluss auf die Einführung von Läsionen in nicht *Ig*-Genen durch die AID gerichtete Mutagenese hat, wurden die Gene *bcl-6* und *c-myc* auf Mutationen untersucht.

Im Vergleich zu den *Ig*-Genen sind die Mutationsfrequenzen für *bcl-6* und *c-myc* um ein vielfaches geringer. Überraschenderweise sind die Frequenzen für *bcl-6* und *c-myc* untereinander vergleichbar. In einer anderen Studie jedoch liegen *bcl-6* mehr als 10-fach stärker mutiert vor als *c-myc*. In beiden Genen werden durch AID Läsionen eingeführt, die im *c-myc*-Gen vor allem fehlerfrei repariert werden, während *bcl-6* Mutationen akkumuliert (Liu *et al.*, 2008). Möglicherweise ist der Unterschied auf die Verwendung von Keimzentrums-B-Zellen des Peyerschen Plaque in dieser Studie zurückzuführen. Im Gegensatz zur Generierung von Keimzentrums-B-Zellen in der Milz wird für die im Peyerscher Plaque keine Immunisierung benötigt. Diese Fragestellung könnte in einer anderen Analyse geklärt werden, bei der die Keimzentrums-B-Zellen beider Organe getrennt untersucht werden.

Während die Mutationsfrequenz für *bcl-6* in den $p53^{-/-}$ Mäusen geringer war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, lag die Mutationsfrequenz für *c-myc* in den $p53^{-/-}$ Mäusen minimal erhöht vor. Jedoch waren die beobachteten Unterschiede nicht signifikant, sodass wahrscheinlich kein Einfluss auf den SHM-Prozess bei den nicht *Ig*-Genen durch p53 besteht. Fragwürdig bleibt damit weiterhin, ob die bei der Affinitätsreifung beobachteten Probleme tatsächlich auf die erhöhte Hypermutation in den *Ig*-Genen und die veränderte SHM in den nicht *Ig*-Genen zurückgeführt werden können.

4.10 Beeinträchtigte Selektion von Keimzentrums-B-Zellen in p53^{-/-} Mäusen

Um den Selektionsprozess von Keimzentrums-B-Zellen genauer zu untersuchen, wurde das während der T-Zellabhängigen NP-Immunantwort dominierende und selektierte V_H186.2 Gen hinsichtlich verschiedener Parameter analysiert. Eine Punktmutation im Codon 33 der CDR 1 des V_H186.2 Gens resultiert in einen Austausch von Tryptophan durch Leucin (W33L). Dieser Aminosäureaustausch erhöht die Affinität der anti-NP Antikörper um das 10-fache (Allen *et al.*, 1988). Das Vorhandensein dieser Mutation im umgelagerten V_H186.2 Gen ist somit kennzeichnend für eine positive Selektion der entsprechenden B-Zelle auf NP-Bindung. Die Bestimmung der Frequenz der W33L-Substitution zeigte, dass mehr als die Hälfte (53 %) aller untersuchten V_H186.2 Gensequenzen der p53-profizienten Mäuse diese Mutation aufwiesen. Bei den p53-defizienten Mäusen dagegen waren nur 36 % für die W33L-Substitution positiv. Folglich ist die Selektion für die W33L-Mutation in den p53^{-/-} Mäusen signifikant beeinträchtigt und bestätigt somit die beobachtete gestörte Affinitätsreifung in diesen Mäusen.

Wie schon im vorherigen Abschnitt diskutiert, kann die Initiierung der Keimzentrumsreaktion als möglicher Grund für die Störung der Affinitätsreifung ausgeschlossen werden. Die SHM selbst könnte dazu beitragen, allerdings war die beobachtete Erhöhung der Mutationsfrequenz in den p53-defizienten Mäusen nur moderat. Bestehende Probleme bei der Differenzierung zu Plasmazellen sind ebenso unwahrscheinlich, da alle Sequenzanalysen mit Keimzentrums-B-Zellen 14 Tage nach Immunisierung durchgeführt wurden. Eine ganz zentrale Stellung nimmt jedoch der Selektionsprozess ein.

Eine genauere Aussage über die stattfindende Selektion kann mit Hilfe des Verhältnisses von Substitutionsmutationen zu stummen Mutationen (R/S, *replacement to silent*) in der Gerüstregion (FW-Region, *framework region*) und CDR der Immunglobulingene getroffen werden (Weiss und Rajewsky, 1990). Während das R/S-Verhältnis in der CDR1+2 der Mäuse beider Genotypen vergleichbar war, lag das R/S-Verhältnis mit 1,7 in der FW-Region 1-3 in p53-defizienten Mäusen signifikant erhöht vor. Bei zufälliger Mutagenese in Keimzentrums-B-Zellen wäre ein R/S-Verhältnis von 3:1 zu erwarten, während nach vollendeter Selektion ein Verhältnis von 1:1 für B-Gedächtniszellen charakteristisch ist (Weiss und Rajewsky, 1990). In der FW-Region der Immunglobulingene bei den Wildtyp-Mäusen beträgt das R/S-Verhältnis 1,2, was für eine fast vollendete Selektion der Antikörper spricht.

Auch in der Studie von J. Jacob et al konnte gezeigt werden, dass die Ig-Hypermutation schon am Tag 7 der Immunantwort beginnt und Mutationen stetig bis Tag 14 zunehmen. Gleichzeitig findet auch eine starke Selektion der mutierten Keimzentrums-B-Zellen statt, sodass bis Tag 14 die SHM und die Selektion abgeschlossen ist (Jacob *et al.*, 1993). Der errechnete R/S-Wert von 1,7 bei den p53-defizienten Mäusen hingegen zeigt, dass die Selektion der Keimzentrums-B-Zellen in diesen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen substantiell beeinflusst ist.

Ein weiteres Kennzeichen für hochaffine NP-spezifische B-Zellen ist die Verwendung bestimmter Motive, wie DFL16.1 und YYGS in der CDR3 des umgelagerten V_H186.2 Gens. Doch hier liegen keine nennenswerte Unterschiede zwischen den p53^{+/+} Mäusen und p53^{-/-} Mäusen vor. Ebenso waren keine Auffälligkeiten bei vorkommenden Insertionen, Deletionen, vorzeitigen Stoppcodons oder auch Leserasterverschiebung bei den p53-defizienten Mäusen erkennbar, die meist auf Probleme in der frühen Selektion hindeuten.

Aufgrund dieser Tatsachen kann geschlossen werden, dass die Selektion hochaffiner NP-spezifischer B-Zellen in p53^{-/-} Mäusen nicht komplett defekt ist, allerdings verlangsamt stattfindet. Es bleibt nur noch zu klären, welche Faktoren zu einer Verlangsamung der Selektion führen könnten.

Grundsätzlich kann zwischen der negativen und der positiven Selektion von Keimzentrums-B-Zellen unterschieden werden. Während der negativen Selektion werden die B-Zellen durch Apoptose eliminiert, bei denen Mutationen zu einem nicht produktiven BCR oder einen mit geringerer Affinität für das Antigen geführt haben (Gray, 1991; Kosco *et al.*, 1988b). Obwohl der dabei stattfindende Selektionsprozess noch immer nicht im Detail geklärt ist, konnten Faktoren des intrinsischen Weg der Apoptose, wie Bcl-2 und Bcl-xL, (Tuscano *et al.*, 1996; Kondo und Yoshino, 2007; Smith *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1999; Hande *et al.*, 1998) sowie Fas beim extrinsischen Weg (Smith *et al.*, 1995; van Eijk *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2001) identifiziert werden, die dabei eine Rolle spielen. Dabei könnte möglicherweise p53 einen Einfluss auf das Gleichgewicht der exprimierten anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Faktoren ausüben. Zudem konnte auch ein Zusammenhang zwischen AID-induzierten DNA-Schäden und dem Zelltod innerhalb des Keimzentrums bestätigt werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von AID die Apoptose von B-Zellen reduziert ist, was auch die vergrößerten Keimzentren erklärt (Zaheen *et al.*, 2009). Bezugnehmend auf p53, könnten so beispielsweise die bei der SHM

eingefügten DNA-Schäden zu einem verminderten Absterben der B-Zellen bei den p53-defizienten Mäusen führen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Das würde bedeuten, dass zwar viele B-Zellen überleben, aber nur wenige mit einem hochaffinen B-Zellrezeptor.

Einige Mutationen verbessern jedoch die Fähigkeit des BCR ein Antigen zu binden und schließlich erhöhen sich damit die Überlebenschancen der B-Zellen (positive Selektion). Grundlage dafür ist die direkte Wechselwirkung der B-Zellen mit T-Helferzellen über den CD40-Liganden (CD40L auf T-Zellen) mit dem CD40-Rezeptor (CD40 auf B-Zellen). Über diese Interaktion werden der kanonische und der nicht-kanonische NF κ B-Signalweg (*nuclear factor- κ B*), (Berberich *et al.*, 1994; Coope *et al.*, 2002), der Jak-STAT-Signalweg (Janus-Kinase; „signaltransduktions aktivierter Transkriptionsfaktor“) sowie Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (MAPK) wie p38, JNK und ERK aktiviert (Dallman *et al.*, 2003; Harnett, 2004; van Kooten und Banchereau, 2000) und vermitteln so Überlebenssignale. Bei diesem Selektionsprozess könnten auch B-Zellen mit hochaffinen Antikörpern in p53^{-/-} Mäusen eliminiert werden. Ein möglicher Grund dafür wäre ein zu schwaches Überlebenssignal der T-Zellen, welches auf die fehlende NF κ B-Aktivierung bei nicht funktionalen p53 zurückzuführen sein könnte (Schneider *et al.*). Jedoch zeigten die p53-defizienten Mäuse eine normale Initiierung der Keimzentrumsreaktion, bei der ebenfalls die CD40L-CD40-Interaktion benötigt wird (Parker, 1993).

Es bleibt zu klären ob Defekte in der Apoptose oder fehlende bzw. unzureichende Überlebenssignale für den beeinträchtigten Selektionsprozess in p53^{-/-} Mäusen verantwortlich sind.

4.11 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte eine neue Rolle von p53 während der Keimzentrumsreaktion aufgezeigt werden. *In vitro* Untersuchungen in Burkitt-Lymphomzelllinien ergaben eine Korrelation zwischen funktionellem p53 und der somatischen Hypermutation. Dabei wurde eine starke Zunahme der Mutationsaktivität bei Inhibierung von p53 in diesen Zellen beobachtet. Während im p53^{-/-}-Mausmodell nur eine moderate Erhöhung der SHM-Frequenz in den *Ig*-Genen von Keimzentrums-B-Zellen zu sehen war, scheint die beeinträchtigte Selektion von hochaffinen NP-spezifischen B-Zellen im Keimzentrum die Ursache für die beobachtete gestörte Affinitätsreifung von Antikörpern zu

sein. Jedoch bleibt zu klären, ob der Einfluss von p53 auf die Selektion entweder ein Effekt auf die negative Selektion oder aber auf die positive Selektion im Keimzentrum sein könnte.

Ein mögliches Folgeprojekt wäre die Identifizierung von Molekülen bzw. Signalen, die den p53-Effekt hervorrufen. Dabei könnten beispielsweise ATM, ATR oder auch JNK genauer untersucht werden, die in der Signalkaskade oberhalb von p53 liegen. Dazu könnten *in vitro* Experimente durchgeführt werden, in denen die genannten Signalmoleküle z.B. durch chemische Inhibitoren gehemmt werden. Auch die Untersuchung des Einfluss dieser Faktoren in entsprechenden Mausmodellen wären denkbar. Letzlich könnten auch Knockout-Studien in der Hühner-B-Zelllinie (DT40) durchgeführt werden.

Um die Frage zu beantworten, ob die Selektion durch die Auswirkung von p53 auf die Apoptose oder aber auf das Überleben der Zellen via NFκB-Aktivierung beeinflusst wird, könnten p53-Zielgene, die in der Apoptose involviert sind, aber auch NFκB-Zielgene, die für das Zellüberleben verantwortlich sind, in Keimzentrums-B-Zellen p53^{+/+} und p53^{-/-} Mäusen untersucht werden.

Die Erkenntnis, dass in Burkitt-Lymphomzelllinien mit noch funktionellem p53 die Hemmung von p53 zur Erhöhung der Hypermutation führte, könnte sicherlich in der Krebspathogenese mit p53 als Tumorsuppressor von Bedeutung sein. Um das zu untersuchen könnte der p53- und auch der SHM-Status in verschiedenen Lymphomen *in vivo* festgestellt werden. Des Weiteren könnte getestet werden, ob es durch die Inaktivierung von p53 in diesen B-Zelllymphomen ebenfalls zu einer erhöhten SHM kommt.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applied Biosystems (Foster City, USA), BD Biosciences (Heidelberg), Biochrom (Berlin), BioRad (München), Bruker Daltonik (Bremen), Costar (Bodenheim), Dianova (Hamburg), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Taufkirchen-München), GE Healthcare Europe (ehemalig Amersham Biosciences, Freiburg), Greiner (Frickenhausen, Nürtlingen), Integra Biosciences (Fernwald), Invitrogen (Karlsruhe), Kodak (Rochester, USA), Labor Schubert & Weiß GmbH (München), Laborteam K+K (München), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Millipore (Bedford, USA), MP Biomedicals (Eschwege), NEB (Schwalbach), neolab (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden), PAA (Pasching, Österreich), Perbio Science (Bonn), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen-München), Stratagene (Amsterdam, Niederlande).

5.1.2 Geräte

Blot-Tank / Mighty Small	Transphor Hoefer, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules, USA
Elektroporator	BioRad, Hercules, USA
Entwicklermaschine	CAVOMAT Christiansen GmbH, München
FACS Aria	Becton Dickinson, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson, USA
Inkubator	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
MACS-System	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Zeiss, Jena
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Köln
Power Pac 3000/Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Tischzentrifuge	Eppendorf, Köln
Zentrifuge	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Zählkammer	Schubert & Weiss

5.1.3 Verwendete Kits

DC Protein Assay (BioRad, München); ECL Kit (GE Healthcare, Europa); super ECL Kit (GE Healthcare, Europa); FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science, Mannheim); 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim); Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit (Genomed, Löhne); pGEMT Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe); QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden); QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden); RNeasy Kit (Qiagen, Hilden).

5.1.4 Datenverarbeitung

Adobe Photoshop	Bildverarbeitung
CellQuest FACS	Datenaquisition und -auswertung
Chromas	Sequenzauswertung
Clustal W	Sequenzverarbeitung
IMGT Internetseite (http://imgt.cines.fr/)	Vergleichsanalyse von Ig-DNA-Sequenzen
Microsoft Excel	Tabellenkalkulation
Microsoft Word	Textverarbeitung
Power Point	Herstellen von Abbildungen
“SHM-Tool” (http://scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1)	Mutationsanalyse von DNA-Sequenzen

5.1.5 Größenmarker

5.1.5.1 DNA-Größenstandard

Für die Größenbestimmung der DNA-Fragmente, wurden diese gleichzeitig mit einem DNA-Größenstandard in einem Agarosegel aufgetrennt. Der verwendete Größenstandard ist der „Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix“ (MBI Fermentas, St.Leon-Rot).

5.1.5.2 Proteingrößenstandard

„Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe).

Zur Bestimmung des molekularen Gewichts von Proteinen wurden diese gleichzeitig mit einem Proteingrößenstandard, der verschiedene Proteine mit einer Größe zwischen 11 und 170 kDa enthält, in einem SDS-PA-Gel aufgetrennt. Um die Standardproteine sichtbar zu machen, wurden diese kovalent an einen blauen Farbstoff gebunden. Zur Orientierung wurde die ca.72kDa-Proteinbande mit einem roten Farbstoff markiert.

5.1.6 Plasmide

Die hier in der Arbeit verwendeten Plasmide wurden für die Analyse der SHM in verschiedenen B-Zelllinien verwendet. Der Hypermutationsreporter pSHM-SV wurde von H. Scheller (Doktorarbeit) und die Positivkontrolle pAK6 wurde von M. Mierau (Doktorarbeit) bezogen. Beide Plasmide enthalten eine Hygromycinresistenz.

5.1.7 Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α benutzt. Genotyp: F-, Φ lacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (rk-, mk-), supE44, Thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF) U169, λ -.

5.1.8 Zelllinien

Tabelle 4 Verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Eigenschaften
<i>Burkitt-Lymphomzelllinien EBV-negativ</i>		
BL100	B. Jungnickel	
<i>Burkitt-Lymphomzelllinien EBV-positiv</i>		
Raji	J. Bachl	
P3HR1	G. Bornkamm	EBNA2 nicht funktional
HH514	G. Bornkamm	EBNA2 nicht funktional
<i>Lymphoblastoide Zelllinie</i>		
Rosi	J. Mautner	funktionelles p53
<i>konditional immortalisierte Zelllinien</i>		
P493.6	H. Scheller	mit Östrogen regulierbares EBNA2 und Tet-regulierbares c-Myc; funktionelles p53
<i>Hühner-B-Zelllinie</i>		
DT40cre	I. Ertongur	
<i>andere Zelllinien</i>		
HCT116 p53 ^{+/+}	I. Jeremias	
HCT116 p53 ^{-/-}	I. Jeremias	

5.1.9 Antikörper

Antikörper für die Westernblot-Analyse

Erstantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
α -p53 DO-1 Maus	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
α -p21 Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology
α -tubulin Kaninchen	1:1000	Abcam
Sekundärantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
α -Kaninchen-IgG-HRP Ziege	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
α -Maus-IgG-HRP Ziege	1:5000	Promega

Tabelle 5 FACS-Antikörper für die Mauseanalyse

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
AA4.1-PE	1:200	BD Biosciences
B220-APC	1:200	BD Biosciences
B220-FITC	1:200	BD Biosciences
B220-PE	1:600	BD Biosciences
B220-PerCP	1:100	BD Biosciences
CD21-FITC	1:400	BD Biosciences
CD23-Bio	1:100	BD Biosciences
CD23-PE	1:400	BD Biosciences
CD3e-PE	1:50	BD Biosciences
CD43-FITC	1:100	BD Biosciences
CD4-FITC	1:1000	BD Biosciences
CD5-APC	1:300	BD Biosciences
CD8a-PerCP	1:50	BD Biosciences
CD95-PE	1:200	BD Biosciences
IgD-Bio	1:400	BD Biosciences
IgM-APC	1:200	BD Biosciences
IgM-FITC	1:50	BD Biosciences
PNA-FITC	1:500	Vector Laboratories
SA-PerCP	1:100	BD Biosciences

Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
PNA („peanut agglutinin“)-Biotin	1:2500	Vector laboratories (B-1075)
Streptavidin-Alkaline Phosphatase	1:400	Sigma (S-2890)
Ziege- α -Maus-IgM-Peroxidase	1:100	Sigma (A-8786)

Tabelle 6 Antikörper für ELISA

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>Kopplungsantikörper</i>		
α -Maus IgM	1:50	Becton Dickinson GmbH
α -Maus IgG1	1:50	Becton Dickinson GmbH
α -Maus IgG2a	1:50	Becton Dickinson GmbH
α -Maus IgG2b	1:50	Becton Dickinson GmbH
α -Maus IgG3	1:50	Becton Dickinson GmbH
α -Maus IgA	1:50	Becton Dickinson GmbH
α -Maus IgE	1:50	Becton Dickinson GmbH
<i>Standardseren</i>		
Purified Maus IgM	1:100	Becton Dickinson GmbH
Purified Maus IgG1	1:100	Becton Dickinson GmbH
Purified Maus IgG2a	1:25	Becton Dickinson GmbH
Purified Maus IgG2b	1:25	Becton Dickinson GmbH
Purified Maus IgG3	1:100	Becton Dickinson GmbH
Purified Maus IgA	1:100	Becton Dickinson GmbH
Purified Maus IgE	1:50	Becton Dickinson GmbH
<i>Bio-Antikörper</i>		
Biotin Ratte α -Maus IgM	1:500	Becton Dickinson GmbH
Biotin Ratte α -Maus IgG1	1:500	Becton Dickinson GmbH
Biotin Ratte α -Maus IgG2a	1:500	Becton Dickinson GmbH
Biotin Ratte α -Maus IgG2b	1:500	Becton Dickinson GmbH
Biotin Ratte α -Maus IgG3	1:500	Becton Dickinson GmbH
Biotin Ratte α -Maus IgA	1:500	Becton Dickinson GmbH
Biotin Ratte α -Maus IgE	1:500	Becton Dickinson GmbH

5.1.10 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von Sigma-Genosys, Steinheim oder von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Human p53 für Sequenzierung

hp53for3: 5'- TTC CCT GGA TTG GCA GCC AG-3'

hp53rev4: 5'- GGG TGG GAG GCT GTC AGT G -3'

Maus p53 Genotypisierung

oIMR 36: 5'- ACA GCG TGG TGG TAC CTT AT -3'

oIMR 37: 5'- TAT ACT CAG AGC CGG CTT -3'

oIMR 38: 5'- CTA TCA GGA CAT AGC GTT GG -3'

400 bp wt Trp53 Allel

600 bp Trp53_tm1 Tyj mutant Allel

Tabelle 7 Oligonukleotide für die SHM-Analyse

Gen	Oligonukleotide	Bedingungen	
<i>JH4 intron</i>	5- CAG CCT GAC ATC TGA GGA CTC TGC-3'	35 Zyklen 30 sec bei 94°C 45 sec bei 60°C 2 min bei 72°C	High fidelity PCR Master Kit (1. Analyse)
	5- CTC CAC CAG ACC TCT CTA GAC AGC-3'		
<i>V186.2</i>	5-CAG TAG CAG GCT TGA GGT CTG GAC-3'	35 Zyklen 10 sec bei 98°C 30 sec bei 70°C 2 min bei 72°C	Phusion
	5-GGG TCT AGA GGT GTC CCT AGT CCT TCA TGA CC-3'		
<i>bcl-6</i>	5-GTT GTT TCG GTG TTT GGA GAC G-3'	30 Zyklen 10 sec bei 98°C 30 sec bei 60° 1 min bei 72°C	Phusion
	5-GAA CTA CCG CTG AGA GCC AAC-3'		
<i>c-myc</i>	5-GCA GAC ACT TCT CAC TGG AAC-3'	35 Zyklen 10 sec bei 98°C 30 sec bei 65°C 30 sec bei 72°C	Phusion
	5-CGG ATC CCA AGT AGG AAT GTG-3'		

Tabelle 8 Oligonukleotide für die RT-PCR

Gen	Oligonukleotide	Bedingungen
<i>bcl-2</i>	5'-CCC TGT GGA TGA CTG AGT ACC-3'	Annealing: 60°C
<i>bcl-2</i>	5'-CAG CCA GGA GAA ATC AAA CAG-3'	Elongation: 5 sec
<i>GAPDH</i>	5'-TCG TCC CGT AGA CAA AAT G-3'	Annealing: 60°C
<i>GAPDH</i>	5'-GAG ATG ATG ACC CTT TTG G-3'	Elongation: 15 sec
<i>p53</i>	5'-CAG CCA AGT CTG TTA TGT GC-3'	Annealing: 60°C
<i>p53</i>	5'-CTT CTT GTA GAT GGC CAT GG-3'	Elongation: 6 sec

5.1.11 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
High fidelity PCR Master Kit	Roche Diagnostics GmbH
Taq-Polymerase	Invitrogen
Phusion (Finnzymes)	New England Biolabs
Proteinase K	Fermentas
Restriktionsenzyme	Fermentas und New England Biolabs

5.1.12 Mausstamm

Die Mauslinie B6.129S2-Trp53^{tm1Tyj} (The Jackson Laboratory) wurde uns freundlicherweise überlassen von Armin Gerbitz (Berlin).

Der C57BL/6 Mausstamm trägt eine Keimbahn-Mutation in dem p53 Gen. Diese Mutation resultiert in die Deletion von ungefähr 40 % der p53-kodierenden Region (Exon 2-6) und inhibiert die Proteinproduktion komplett (Jacks *et al*, 1994).

5.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Umluft-Sterilbank (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen für die Zellen entsprachen dabei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Zentrifugationen fanden stets bei 4°C mit 1200rpm für 5 Minuten in einer Minizentrifuge (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) statt.

Zellkulturmedium für humane Zelllinien

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)

Kulturmedium für DT40-Zellen

500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Schottland)

10 % FCS/FKS (Gibco BRL, Schottland)

1 % Hühnerserum (Gibco BRL, Schottland)

100µg/µl Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco BRL, Schottland)

2 mM Glutamin (200 mM) (Gibco BRL, Schottland)

1 mM Natriumpyruvat (100 mM) (Gibco BRL, Schottland)

0,1 µM β-Mercaptoethanol (1M) (Gibco BRL, Schottland)

5.2.1 Bestimmung der Zelldichte

Zur Ermittlung der Zelldichte wurde ein Tropfen einer Zellsuspension durch Kapillarkräfte unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden 4 x 16 Kleinquadrate ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Der Kammerfaktor

zur Berechnung der Zelldichte (Zellen/ml) beträgt 10^4 , da das Volumen von 16 Kleinquadraten $0,1\mu\text{l}$ umfasst. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden $18\mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $2\mu\text{l}$ einer 0,4%igen Trypanblaulösung versetzt. Dieser Farbstoff färbt dabei nur die toten Zellen.

5.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren wurden 20ml einer Zellsuspension zentrifugiert und das Sediment in etwa 1 bis $1,5\text{ml}$ FKS mit 10% DMSO aufgenommen. Lagerung erfolgte bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff.

Zum Auftauen von Zellen wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort in 10ml frisches Kulturmedium überführt. Einmaliges Waschen mit Medium entfernt DMSO, so dass die Zellen anschließend in 10ml neuem Kulturmedium aufgenommen und kultiviert werden konnten.

5.2.3 Zellkulturbedingungen

EBV-negative Burkitt-Linien wachsen einzeln in Suspension und teilen sich täglich einmal. EBV-positive Burkitt-Linien wachsen abhängig von der Zelldichte und dem EBV-Latenzprogramm teils klumpend, teils einzeln. Sie wachsen langsamer als EBV-negative BL-Linien. Generell wurden für diese humanen Zelllinien eine Zelldichte zwischen 3×10^5 und $1,5 \times 10^6$ pro ml eingehalten. Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) wachsen sehr langsam und in riesigen Zellklumpen. Sie wurden bei einer Zelldichte von $\geq 5 \times 10^5$ pro ml gehalten, da eine geringe Zelldichte tödlich für diese Zelllinien ist.

DT40-Zellen wachsen einzeln in der Suspension und haben einen sehr schnellen Zellzyklus, so dass sie sich ungefähr zweimal am Tag teilen. Sie wurden jeden zweiten Tag mit frischem Hühner-Medium verdünnt und eine Zelldichte zwischen 2×10^4 und $1-2 \times 10^6$ wurde eingehalten.

Die adhärent wachsenden HCT116-Zellen wurden in Schalen kultiviert. Für die Vermehrung wurden diese Zellen mit Trypsin (Gibco BRL, Schottland) vom Untergrund gelöst und auf neue Schalen aufgeteilt.

5.2.4 Induktion von p53 durch IR

Die benötigte Menge an Zellen wurde entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellkulturflasche wurde liegend mit 8 Gy (Gray) = 800 rad ($t[\text{min}] = x \text{ rad/Verfall}$) bestrahlt und anschließend 2 h bei 37°C inkubiert.

5.2.5 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von Suspensionszellen wurden zwischen 1×10^7 und 2×10^7 Zellen pro Transfektion verwendet. Die Zellen wurden in 20ml PBS gewaschen, in 400µl PBS aufgenommen und in Küvetten mit 0,4cm Elektrodenabstand transferiert. In die Küvetten wurde 10µg DNA pro 1×10^7 Zellen zugegeben und das Gemisch für 15 min auf Eis inkubiert, bevor die Transfektion im Elektroporator (BioRad) bei 850µF und 250 V durchgeführt wurde. Die transfizierten Zellen wurden anschließend in 10ml Kulturmedium überführt.

Für die Transfektion von HCT116-Zellen wurde eine 70%ige konfluente Zellkulturschale mit DMEM Medium (+1% FCS) versetzt. In zwei separaten Ansätzen wurde je 300µl DMEM Medium (+1% FCS) zum einem mit 10µg DNA und zum anderen mit 30µl Polyethylenimin (1mg/ml) versetzt. Anschließend wurden beide Ansätze mit einander vereint, gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Der 600µl Mix wurde dann vorsichtig zu den Zellen gegeben und bei 37°C für 4 h inkubiert. Im Anschluss wurde das Transfektionsmedium wieder durch normales Medium ersetzt.

5.2.6 Bestimmung der Hypermutationsaktivität

Die Zellen wurden mit dem Hypermutationsreporter (pSHM-SV) oder einer GFP-Kontrolle (pAK6) transfiziert und in Zellkulturmedium überführt. Nach drei bis vier Tagen wurde eine abgestimmte Menge Hygromycin als Selektionsmedium zugesetzt und ungefähr zwei Wochen nach der Transfektion war die Selektion in der Regel abgeschlossen, was anhand der GFP-Kontrolle, in der sich nur noch GFP-positive Zellen befanden, zu erkennen ist.

Mit Beginn der Selektion wurde für etwa einen Monat alle zwei bis drei Tag eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der Zellen abgenommen und mit Propidiumiodid versetzt, das eine Unterscheidung der toten von den lebenden Zellen ermöglicht. Bei jeder FACS-Messung wurde nach Möglichkeit eine Million lebende Zellen untersucht und der Anteil GFP-positiver Zellen ermittelt. Die Zahl GFP-positiver Zellen pro 100.000 lebende

Zellen wurde über den gesamten Verlauf des Experimentes aufgetragen, was die Hypermutationsaktivität der Zellen veranschaulicht.

Bei der Untersuchung der Hypermutationsaktivität in Abhängigkeit von p53 wurde nach Abschluss der Selektion ein Teil der Kultur mit 10µM bzw. 20µM Pifithrin-α (PFT; Sigma-Aldrich) versetzt.

5.2.7 Proliferationsassay

Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA SE bzw. kurz CFSE) wird stabil in die Zelle aufgenommen. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen übertragen und die Geschwindigkeit der abnehmenden Fluoreszenzintensität kann mittels der FACS-Analyse beobachtet werden (Quah et al., 2007).

Es wurden je 4×10^6 Zellen für die CFSE-Färbung und für die Kontrolle (ungefärbt) abgenommen und einmal mit warmem PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Zellpellet in 2 ml CFDA-PBS-Lösung resuspendiert, wobei die CFDA-PBS-Lösung durch eine 1:10000 Verdünnung der 10 mM CFDA-Stammlösung in warmem PBS (37°C) erhalten wurde. Zu den Kontroll-Zellen wurde nur 1 ml warmes PBS (37°C) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 5 min im 37 °C Inkubator. Anschließend wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 10 ml kaltem Kulturmedium (4 °C) gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml warmem Kulturmedium (37°C) aufgenommen und erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 10 ml Kulturmedium mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml aufgenommen. Nach frühestens 5 Stunden und dann täglich zweimal (Tag 1 bis 3) bzw. einmal (ab Tag 4) wurden Zellen abgenommen und mit dem FACS gemessen. Die Dauer des Assays wurde durch das Erreichen der Eigenfluoreszenz der Zellen, welche durch eine ungefärbte Probe ermittelt wurde, bestimmt.

Die mit Hilfe der Software *Cell Quest* ermittelte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde graphisch in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden dargestellt (Abbildung 7C und 8C). Durch Interpolation der erhaltenen Messwerte wurden die jeweiligen Exponentialfunktionen mit *Excel* ermittelt. Der Exponent dieser Funktion entspricht der Konstante k und kann für die Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeit v_p in folgende Gleichung eingesetzt werden:

$$v_p = -\frac{1}{k} \cdot \ln\left(\frac{1}{2}\right)$$

5.3 Techniken der DNA-Analyse

5.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Diese Art der Präparation wurde verwendet wenn besonders reine Plasmid-DNA aus einer geringen Menge an Zellen benötigt wurde. Dazu wurde das Qiagen-Kit gemäß Herstellerangaben verwendet (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden).

Für die Präparation von einer großen Anzahl an Mini-Bakterienkulturen in 96er Plattenformat wurde das Vakuum Manifold Kit mit entsprechendem Equipment und Lösungen nach Herstellerangaben verwendet (Vakuum Manifold Kit, Milipore GmbH, Schwalbach).

5.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das JetStar-System nach Herstellerprotokoll verwendet (Jetstar-Kit, Genomed, Löhne).

5.3.3 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 50µl Lysepuffer aus 10mM Tris und 0,5µg/µl Proteinase K auf 1×10^5 Zellen gegeben und 2,5 h. 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.

5.3.4 DNA-Präparation aus Mäuseschwänzen

Schwanzspitzen (max. 0,5 cm Länge) von den zu untersuchenden Mäusen wurden mit 500µl Lysepuffer (frisch versetzt mit 60µg/ml Proteinase K) versetzt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ca. 1/3 des Volumens an 5M NaCl zugegeben und für 10 min bei RT zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15000rpm). Der Überstand wurde mit 600µl Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert. Anschließend wird die DNA einmal mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und dann für 30-60 min getrocknet. Die DNA wird dann in 100µl TE-Puffer für 1 h bei 37°C im Schüttler gelöst.

Lysepuffer:

100 mM Tris HCL pH 8,5	(25 ml 1 M)	
5 mM EDTA	(2,5 ml 0,5 M)	
0,2% SDS	(5 ml 10%)	
200 mM NaCl	(10 ml 5 M)	ad 250 ml mit H ₂ O

1xTE

10 mM Tris	(2 ml 1M Tris pH 8)	
1 mM EDTA	(400 µl 0,5 M EDTA)	ad 200 ml mit H ₂ O und autoklavieren

5.3.5 DNA-Quantifizierung

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt. Dabei 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:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnung}$$

5.3.6 DNA-Gelelektrophorese

Um das Ergebnis einer Restriktion, PCR-Reaktion oder DNA-Reinigung zu überprüfen, wurde ein Anteil der Proben auf ein 1% bis 1,5%iges Agarosegel [w/v] geladen. Dazu wurde die Probe zuvor mit Ladepuffer versetzt. Die DNA-Fragmente wurden in einem elektrischen Feld mit bis zu 100V aufgetrennt.

1xTAE	Ladepuffer (10x)	Agarosegel
0,04 M Tris-Acetat	0,25% Bromphenolblau	1-1,5mg Agarose
1 mM EDTA	30 % Glycerin	pro 100ml 1xTAE
	50mM Tris	1,5µl 100mg/ml Etbr

5.3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die p53-Genotypisierungen von Mäusen wurde die Taq-Polymerase (Invitrogen) verwendet und die PCR nach folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 5.1.10 veranschaulicht.

Reaktionsansatz		Bedingungen
H ₂ O	ad 12 µl	Start
10x PCR Puffer	1x	94°C 3 min
50 mM MgCl ₂	2 mM	35 Zyklen
2 mM dNTP	0,2 mM	94°C 30 sec
10 µM oIMR 36	0,083 µM	66°C 1 min
20 µM oIMR 37	1 µM	72°C 90 sec
20 µM oIMR 38	1,17 µM	final
5 U/µl Taq	0,025 U/µl	72°C 2 min
Mausschwanz DNA	5-20ng	10°C ∞

Das High Fidelity (HiFi) PCR Master Kit (Roche Diagnostics GmbH), die Pfu Polymerase (Fermentas) und die Phusion-Polymerase (Finnzymes, New England Biolabs) wurden aufgrund ihrer geringen Fehlerrate für die PCR verwendet, bei denen im Anschluss die Sequenzierung der DNA folgte. Im Anschluss an die PCR wurde 0,5 µl Taq-Polymerase in den Reaktionsansatz gegeben und für 30 min bei 72°C inkubiert, was die Voraussetzung für die Klonierung in den pGEMT-Vektor ist. Die PCR erfolgte nach Herstellerangaben. Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die SHM-Analyse sind in Tabelle 7 angegeben und die verwendeten Primer für die humane p53-PCR für verschiedene humane BL-Zelllinien sind in Abschnitt 5.1.10 gezeigt.

Reaktionsansatz (humane p53-PCR)		Bedingungen
H ₂ O	ad 50 µl	Start
10x Pfu Puffer(MgSO ₄)	1x	94°C 2 min
2 mM dNTP	0,2 mM	30 Zyklen
10 µM hp53for3	0,4 µM	94°C 30 sec
10 µM hp53rev4	0,4 µM	60°C 45 sec
2,5 U/µl Pfu Pol	0,025 U/µl	72°C 2 min
cDNA (1:10 verd.)		final
verschiedener BL-Zelllinien	~1 µl	72°C 10 min
		10°C ∞

Reaktionsansatz (1. SHM-Analyse; JH4 intron)

H ₂ O	ad 50 µl
10 µM Primer 1	0,3 µM
10 µM Primer 2	0,3 µM
gDNA (Keimzentrums-B-Zellen)	50 ng
HiFi PCR Master Mix	25 µl

Reaktionsansatz (2. SHM-Analyse für JH4 intron, bcl-6, c-myc und V186.2)

H ₂ O	ad 50 µl	
5x HF Puffer	1x	
10 mM dNTPs	0,2 mM	
10 µM Primer 1	0,5 µM	
10 µM Primer 2	0,5 µM	
50 mM MgCl ₂	0,5 mM	
2 U/µl Phusion Pol	0,02 U/µl	
DMSO*	3 %	(*nur für bcl-6)
gDNA (Keimzentrums-B-Zellen)	50 ng	

5.3.8 pGEM-T-Klonierung

Für eine DNA-Sequenzanalyse wurde das PCR-Amplifikat verschiedener Gene mittels QIAquick-System aus dem Agarosegel aufgereinigt. Nach anschließender DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die entsprechende Menge an DNA mit dem Vektor pGEM-T (Promega) laut Herstellerangaben über Nacht mit der T4-Ligase ligiert und durch Hitzeschock in Bakterien transformiert.

5.3.9 DNA-Sequenzierung und Datenauswertung

Die DNA-Sequenzierung einzelner Bakterien-Subklone nach Klonierung des PCR-Produktes verschiedener Gene in den pGEM-T-Vektor erfolgte beim Sequenzierungsservice der LMU in München. Dazu wurde eine Abwandlung der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger, die *ABI BigDye Kit* Version 3.1, auf einem Kapillarsequenzier (Applied Biosystems) und der entsprechende Primer verwendet.

Nach Erhalt der DNA-Sequenzen wurden diese einzeln im Programm Chromas überprüft und bei Bedarf editiert. Die DNA-Sequenzen wurden entweder einzeln oder als Gruppierungen (z.B. bezüglich einer Maus oder des entsprechenden Genotyps) mit einer Konsensus-Sequenz mit dem Programm ClustalW verglichen und es wurde nach Mutationen gesucht. Für die Auswertung einer Vielzahl von Sequenzen verschiedener Gruppen wurde zusätzlich das „SHM-Tool“ (<http://scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1>) verwendet.

5.4 Techniken zur Isolierung und Analyse von RNA

5.4.1 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 40 μ g/ml. So ergibt sich die Formel:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$$

5.4.2 Qualitätskontrolle von RNA

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

RNA-Laufpuffer

1x MOPS
in DEPC- H₂O

DEPC-H₂O

0,01% Diethylpyrocarbonat
in H₂O_{bid.} und autoklavieren

5x RNA-Ladepuffer

62,5% Formamid
9,25% Formaldehyd
1,25x MOPS
50 μ g/ml Bromphenolblau
in DEPC- H₂O
500 μ g Ethidiumbromid

RNA-Agarosegel

1g Agarose
1x MOPS
5% Formaldehyd
in DEPC- H₂O

10x MOPS-Puffer

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

5.4.3 Präparation von RNA aus Zellen

5.4.3.1 RNeasy Mini Kit

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 3×10^6 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.

5.4.3.2 *peqGOLD TriFast™-Kit*

Das peqGOLD TriFast™-Kit (peqlab) wurde hauptsächlich für die RNA-Extraktion aus Keimzentrums-B-Zellen der Milz aus Mäusen verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

5.4.4 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	2µl
dNTP-Mix	4µl
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	2µl
RNase Inhibitor	1µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8µl
H ₂ O	auf 20µl auffüllen

5.4.5 Quantitative RT-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 Green 1 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 Oligonukleotide und die jeweiligen Bedingungen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem LightCycler (Roche) mit folgender Temperaturabfolge mit 45 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	95°C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95°C	für 5 sec
Zyklische Anlagerung	58-60°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	1µl
Roche-Mix	1µl
25mM MgCl ₂	0,8µl
je Primer (10mM)	0,5µl
H ₂ O	6,2µl

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 errechnet 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 C_p die Anzahl der Zyklen, die nötig sind um die definierte Menge an PCR-Produkt zu erhalten, dann ergibt sich folgende Gleichung:

$$K = T_0 (E)^{C_p}$$

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

$$T_{0, gesucht} \times (E_{gesucht})^{C_{p, gesucht}} = T_{0, Referenzgen} \times (E_{Referenzgen})^{C_{p, Referenzgen}}$$

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:

$$T_{0, gesucht} = \frac{(E_{Referenzgen})^{C_{p, Referenzgen}}}{(E_{gesucht})^{C_{p, gesucht}}} (\times 2)$$

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

$$T_{0, gesucht} = 100 \times \frac{(E_{Referenzgen})^{C_{p, Referenzgen}}}{(E_{gesucht})^{C_{p, gesucht}}}$$

Als Referenzgen wurde GAPDH für die Normalisierung herangezogen. Alle mRNA-Analysen wurden als Duplikate innerhalb desselben Reaktionsansatzes durchgeführt und daraus ein Mittelwert und eine Standardabweichung berechnet.

5.5 Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung der Proteine wurden 3×10^6 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 (BPB) 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% SDS

20% Glycerin

250mM Tris

5.5.2 Proteinquantifizierung

(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.

5.5.3 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 aufgeköcht. Durch das Aufkochen wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und die erneute Faltung durch das Detergenz SDS verhindert. Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten wurden durch DTT reduziert. 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 5.1.5.2). Die Elektrophorese wurde in einer Höfer-Vorrichtung (Amersham Pharmacia, Braunschweig) bei 80mA durchgeführt.

Trenngel	10%	12%
H ₂ O	4ml	3,3ml
30% Acrylamid (rotiphorese Gel 30, Roth)	3,3ml	4ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5ml	2,5ml
10% SDS	100µl	100µl
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	100µl	100µl
10% TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylendiamin)	4µl	4µl

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

5.5.4 Westernblot

Bei der Western-Blot Analyse handelt es sich um den elektrischen Transfer von den in einem SDS-PA-Gel aufgetrennten Proteinen auf eine proteinbindende PDF-Membran. Es wurde ein sogenannter „Nass-Blot“ in einem Bio-Rad-Tank durchgeführt. Vor dem Blotvorgang wurde die PDF-Membran (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 equilibriert und dann auf drei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurde die PDF-Membran gelegt und auf diese drei 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 400mA bei 4°C 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 Tris
1,92M Glycin

1x Blotpuffer

1x Blotpuffer
20% Methanol

10x Ponceau S

2% Ponceau S
30% Trichloressigsäure
30% Sulfosalicylsäure

5.5.5 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper

Spezifische Proteine wurden durch Färbung mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Auf diese Weise konnte das gesuchte Protein 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 15 und 30 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 5%-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 5% Milchpulver-Lösung verdünnt wurde, für 1 bis 3 Stunden und je nach Herstellerangabe bei 4°C oder Raumtemperatur 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 Abschnitt 5.1.5 aufgelistet.

5.6 Mausanalysen

5.6.1 Mausverpaarungen

Für alle folgenden Analysen wurden $p53^{+/+}$ und $p53^{-/-}$ Mäuse benötigt, die aus den Verpaarungen von $p53^{+/-}$ Mäusen (siehe 5.1.12) erhalten wurden. Diese Mäuse wurden unter SPF (specific pathogen free)- Bedingungen gehalten. Für Analysen wurden Tiere verwendet, die in der Regel 8 bis 16 Wochen alt waren. Der Genotyp jeder Maus wurde durch PCR-Analysen mit Schwanz-DNA bestimmt (siehe 5.3.4 und 5.3.7).

5.6.2 Immunisierung von Mäusen

Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen wurden mit 100 μ g NP-CGG (nitrophenylacetyl chicken gamma globulin; Biosearch Technologies) intraperitoneal (i.p.) immunisiert.

Vor Verabreichung wurde das Antigen mit gleichem Volumen 10% (w/v) $KAl(SO_4)_2$ gefällt und mit 1 NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgten je drei Zentrifugations- und Waschschrte (mit sterilem PBS; 10min bei 5000 rpm). Das Antigen wurde letztlich in 200 μ l sterilem PBS aufgenommen und der Maus i.p. injiziert

5.6.3 Präparation primärer Maus-Lymphozyten

Mäuse wurden durch 2 min CO_2 -Begasung eingeschlafert und anschließend durch Genickbruch getötet. Milz, Lymphknoten und Thymus wurden als ganze Organe präpariert und in Zellmedium (RPMI 1640, 5% FKS, 1% Natriumpyruvat, 1% Glutamin) überführt. Für die Vereinzelung der Zellen wurden diese Gewebe durch ein feines Sieb gedrückt. Präparierte Schienbeinknochen wurden mit Medium durchspült, um Knochenmarkszellen zu isolieren. Für die Gewinnung von Zellen des Peritoneums wurde der Bauchraum mit Zellmedium gespült. Blutreiche Gewebe, wie Milz und Knochenmark, wurden von den Erythrozyten befreit. Dazu wurden die Zellen bei 1200 rpm, 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend in 1ml Lysepuffer (155 mM NH_4Cl ; 170 mM Tris, pH 7,65 im Verhältnis 9:1 frisch angesetzt) resuspendiert. Nach 3 min wurde die Lyse Reaktion mit 9 ml Zellmedium gestoppt und die Zellen nach erneuter Zentrifugation in 1 ml Medium aufgenommen.

5.6.4 Isolierung von B-Zellen aus der Milz

B-Zellen wurden mit Hilfe der „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) aus den Milzzellen isoliert. Dazu wurden 1×10^7 Milzzellen mit 10 μ l CD43 Microbeads in

einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert (siehe Herstellerprotokoll) und anschließend auf LS-Säulen gegeben. Dabei wurden die CD43-positiven Nicht-B-Zellen an die Säule gebunden und im Durchfluss befanden sich die gewünschten B-Zellen (CD43⁻).

5.6.5 Isolierung von Keimzentrums-B-Zellen

14 Tage nach Immunisierung mit 100µg NP-CGG wurde die Milz der Maus entnommen, B-Zellen isoliert und diese mit anti-PNA-FITC, anti-CD95-PE und anti-B220-APC inkubiert. Mit Hilfe des FACSAria Zellsortierers (BD Biosciences) konnten anschließend die B-Zellen in naive B-Zellen (B220⁺CD95⁻PNA⁻) und in Keimzentrums-B-Zellen (B220⁺CD95⁺PNA⁺) sortiert werden. Die so erhaltenen Zellfraktionen konnten anschließend entweder für die Isolierung von RNA (siehe 5.4.3.2) oder für die Isolierung von genomischer DNA (siehe 5.3.3) verwendet werden.

5.6.6 FACS-Analyse von verschiedenen Zellpopulationen

Für die Analyse über Durchflusszytometrie müssen die Zellen als Einzelzellen vorliegen (siehe 5.6.3). Zunächst wurden die Zellen mit FACS-Puffer (PBS; 1% BSA) gewaschen, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen mit einer Kombination von FITC-, PE-, Cy-Chrome-(Cyc) oder FITC-, PE-, PerCP- und APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern für 20 Minuten gefärbt, die in FACS-Puffer verdünnt waren. Im Anschluss wurden sie noch einmal mit FACS-Puffer gewaschen, bevor die Zellen in FACS-Puffer für die Analyse aufgenommen wurden.

Alle Analysen wurden mit einem FACSCaliburTM (BD-Biosciences) durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuestTM Software ausgewertet. Es wurden je Färbung $3-5 \times 10^4$ lebendige Zellen aufgenommen. Da die Färbungen teilweise in ihrer Intensität variierten, wurden bei jeder Analyse Zellen von Kontrollen mit gefärbt um die Populationen in den Mäusen definieren zu können.

Antikörper für FACS-Färbungen und deren Verdünnungen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Antikörperkombinationen für verschiedene Zellpopulationen sind im nachfolgenden aufgeführt:

B-Zellentwicklung im Knochenmark

(CD43-FITC; B220-PE; IgD-Bio; SA-PerCP und IgM-APC)

Transitionale B-Zellen der Milz

(IgM-FITC; AA4.1-PE; CD23-Bio; B220-APC und SA-PerCP)

Marginalzonen- und folliculäre B-Zellen der Milz

(CD21-FITC; CD23-PE; B220-PerCP und IgM-APC)

Folliculäre B-Zellen, B1-Zellen und T-Zellen der Milz, Lymphknoten und des Peritoneums

(IgM-FITC; B220-PE; IgD-Bio; SA-PerCP und CD5-APC)

CD4/CD8-T-Zellen der Milz und des Lymphknotens

(CD4-FITC; CD8-PerCP; CD3-PE und B220-APC)

B1-Zellen des Peritoneums

(CD43-FITC; CD23-PE; B220-PerCP und CD5-APC)

T-Zellen des Thymus

(CD5-APC; CD4-FITC; CD8-PerCP und B220-PE)

Keimzentrums-B-Zellen der Milz

(CD95-PE; PNA-FITC; IgM-APC und B220-PerCP)

5.6.7 Immunohistochemie von Gefrierschnitten

Um gute Gefrierschnitte der Organe zu erhalten, wurden diese schnellstmöglichst nach der Präparation in Tissue Tek (A.Hartenstein GmbH) eingelegt und zum Gefrieren auf Trockeneis gestellt und dann bei -80 °C gelagert. Für die Färbungen wurden 8-10µm dicke Schnitte mit einem Kryotom angefertigt, diese danach getrocknet und in 100% Aceton fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut 20 min getrocknet, kurz in PBS gewaschen und dann 20 min mit Blockierungslösung (10 % Ziegenserum, 0,1 % H₂O₂, 1 % BSA in PBS) in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre bei RT inkubiert. Auch alle folgenden Blockierungs- und Färbeschritte wurden in einer Kammer mit gesättigter Atmosphäre durchgeführt. Danach wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Biotin- oder Avidin-Bindestellen nochmals mit zwei verschiedenen Blockierungslösungen (Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Laboratories) je 15 Minuten inkubiert, gefolgt jeweils von einem Waschschrift 5 min in PBS. Anschließend wurden die verschiedenen Antikörper für je eine Stunde bei RT inkubiert. Zwischen der Zugabe verschiedener Antikörper wurde jeweils dreimal für 5 min mit PBS gewaschen.

Streptavidin gekoppelte Antikörper wurden mit Hilfe des „Alkaline Phosphate Substrate Kit“ (Vector laboratories) in Blau und Peroxidase gekoppelte Antikörper durch eine Reaktion mit

3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) „Peroxidase Substrate Kit“ (Vector laboratories) in Rot nachgewiesen. Die Farbreaktionen wurden durch Waschen der Schnitte in PBS gestoppt, die gefärbten Schnitte danach getrocknet und anschließend eingebettet. Digitale Bilder wurden in einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt.

Nachweis der Keimzentren und der folliculären Struktur

1. Antikörper: biotinyliertes „peanut agglutinin (PNA) (Vector)
2. Antikörper: Peroxidase konjugierter α -Maus-IgM (Sigma)
3. Antikörper: Streptavidin gekoppelte Phosphatase (Sigma)
(siehe auch Abschnitt 5.1.9)

5.6.8 Präparation von Blutserum aus Mäuseblut

Für die Serumgewinnung wurde den Mäusen vor und nach der Immunisierung Blut von der Schwanzvene abgenommen. Bei der Präparation der Mäuse wurde das Blut direkt dem Herzen entnommen. Das Blut wurde für 2-3 h auf Eis stehen gelassen und anschließend bei 4°C für 10 min bei 15000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und nochmals zentrifugiert.

5.6.9 „Enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA)

Mit dieser Methode kann die Serum-Konzentration von sezernierten Antikörpern mit einer bestimmten Antigenspezifität und/oder einem bestimmten Ig-Isotyp bestimmt werden. Dazu werden die entsprechenden Antigene bzw. isotypspezifischen Antikörper an eine 96-Lochplatte gekoppelt. Anschließend inkubiert man die Platten mit den zu untersuchenden Seren in verschiedenen Verdünnungen. Die spezifisch gebundenen Antikörper können dann mit Hilfe von biotinylierten Ig-isotypspezifischen Antikörpern und einer streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase in einer enzymatischen Farbreaktion quantifiziert werden.

5.6.9.1 Bestimmung der spezifischen Standard Ig-Titer

96er Lochplatten wurden mit 5 μ g/ml der Ig-isotypspezifischen anti-Maus Kopplungs-Antikörper (siehe Tabelle 6) in 0,1 M NaHCO₃ Puffer (pH 9,2) beschichtet. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Für die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Platten mit Blockierungspuffer (1% Magermilch in PBS) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Standardseren (siehe Tabelle 6), für die Quantifizierung

der Ig-Mengen, und die zu untersuchenden Mausseren aufgetragen und in 1:2-Schritten in den Platten titriert. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT und anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS wurde je nach Isotyp der biotinylierte sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 6) zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen der Platten mit PBS wurde Streptavidin-gekoppelte Alkaline Phosphatase zugegeben. Nach 30 Minuten wurde nochmals dreimal mit PBS gewaschen und die Anwesenheit der Phosphatase durch Zugabe von o-Phenyldimine (Sigma) in 0,1 M Citric Acid-Puffer mit 0,015% H₂O₂ als Substrat nachgewiesen. Die auftretende Farbreaktion wurde bei 405nm mit einem Mikrotiterplatten-Leser (Photometer Sunrise RC, Tecan) gemessen.

5.6.9.2 Bestimmung der NP-spezifischen Ig-Titer

Für den Nachweis NP-spezifischer Antikörper wurden die 96er Platten mit 5µg/ml NP17-BSA (Biosearch Technologies) und für den Nachweis hoch affiner Antikörper mit 5µg/ml NP3-BSA (Biosearch Technologies) beschichtet. Die Zugabe der Seren sowie die weiteren Schritte erfolgten genau wie beim Nachweis der spezifischen Antikörper (siehe 5.6.9.1). Es wurden nur NP-spezifische Antikörper mit den Isotypen IgM und IgG1 bestimmt. Für eine relative Quantifizierung der α-NP-IgM- und IgG1-Antikörper wurden schon vermessene Mausseren als Standards verwendet.

6 LITERATUR

- Allen, D., Simon, T., Sablitzky, F., Rajewsky, K. & Cumano, A. (1988). Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. *EMBO J* 7(7): 1995-2001.
- Appella, E. & Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268(10): 2764-2772.
- Arakawa, H. & Buerstedde, J. M. (2004). Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. *Dev Dyn* 229(3): 458-464.
- Arakawa, H., Moldovan, G. L., Saribasak, H., Saribasak, N. N., Jentsch, S. & Buerstedde, J. M. (2006). A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* 4(11): e366.
- Arakawa, H., Saribasak, H. & Buerstedde, J. M. (2004). Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol* 2(7): E179.
- Avkin, S., Sevilya, Z., Toubé, L., Geacintov, N., Chaney, S. G., Oren, M. & Livneh, Z. (2006). p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol Cell* 22(3): 407-413.
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M. & Olsson, C. (2001). Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol* 166(8): 5051-5057.
- Bachl, J., Ertongur, I. & Jungnickel, B. (2006). Involvement of Rad18 in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12081-12086.
- Bachl, J. & Olsson, C. (1999). Hypermutation targets a green fluorescent protein-encoding transgene in the presence of immunoglobulin enhancers. *Eur J Immunol* 29(4): 1383-1389.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. & Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 12(2): 461-468.
- Bassing, C. H., Swat, W. & Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl: S45-55.
- Beckman, G., Birgander, R., Sjalander, A., Saha, N., Holmberg, P. A., Kivela, A. & Beckman, L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44(5): 266-270.
- Bemark, M. & Neuberger, M. S. (2000). The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line. *Oncogene* 19(30): 3404-3410.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E. & Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126(1): 107-120.
- Bensaad, K. & Vousden, K. H. (2005). Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med* 11(12): 1278-1279.
- Berberich, I., Shu, G. L. & Clark, E. A. (1994). Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 153(10): 4357-4366.
- Berek, C., Berger, A. & Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67(6): 1121-1129.

- Berland, R. & Wortis, H. H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20: 253-300.
- Betz, A. G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C. & Neuberger, M. S. (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(6): 2385-2388.
- Blum, K. A., Lozanski, G. & Byrd, J. C. (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104(10): 3009-3020.
- Bode, A. M. & Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4(10): 793-805.
- Bossy, D., Milili, M., Zucman, J., Thomas, G., Fougereau, M. & Schiff, C. (1991). Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol* 3(11): 1081-1090.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M. D. & Goodman, M. F. (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(7): 4102-4107.
- Brooks, C. L. & Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21(3): 307-315.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T. & Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377(6549): 552-557.
- Buschmann, T., Minamoto, T., Wagle, N., Fuchs, S. Y., Adler, V., Mai, M. & Ronai, Z. (2000). Analysis of JNK, Mdm2 and p14(ARF) contribution to the regulation of mutant p53 stability. *J Mol Biol* 295(4): 1009-1021.
- Campomenosi, P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold, B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M. A., Iggo, R. & Fronza, G. (2001). p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene* 20(27): 3573-3579.
- Cannon, J. P., Haire, R. N., Rast, J. P. & Litman, G. W. (2004). The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. *Immunol Rev* 200: 12-22.
- Cattoretti, G., Chang, C. C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B. H., Falini, B., Louie, D. C., Offit, K., Chaganti, R. S. & Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86(1): 45-53.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E. & Alt, F. W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422(6933): 726-730.
- Chen, J., Marechal, V. & Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 13(7): 4107-4114.
- Chen, J. & Sadowski, I. (2005). Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(13): 4813-4818.
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D. & Green, D. R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309(5741): 1732-1735.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M. & Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303(5660): 1010-1014.

- Cleary, M. L., Meeker, T. C., Levy, S., Lee, E., Trela, M., Sklar, J. & Levy, R. (1986). Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell* 44(1): 97-106.
- Coope, H. J., Atkinson, P. G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., Klaus, G. G., Johnston, L. H. & Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* 21(20): 5375-5385.
- Cory, S. & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-656.
- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T. & Ryan, K. M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126(1): 121-134.
- Cumano, A. & Rajewsky, K. (1986). Clonal recruitment and somatic mutation in the generation of immunological memory to the hapten NP. *EMBO J* 5(10): 2459-2468.
- Dallman, C., Johnson, P. W. & Packham, G. (2003). Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis* 8(1): 45-53.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
- de Yebenes, V. G. & Ramiro, A. R. (2006). Activation-induced deaminase: light and dark sides. *Trends Mol Med* 12(9): 432-439.
- Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J. C. & Reynaud, C. A. (2007). DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* 204(1): 17-23.
- Delker, R. K., Fugmann, S. D. & Papavasiliou, F. N. (2009). A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nat Immunol* 10(11): 1147-1153.
- Di Noia, J. M. & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76: 1-22.
- Diaz, M., Verkoczy, L. K., Flajnik, M. F. & Klinman, N. R. (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(1): 327-335.
- Dumont, P., Leu, J. I., Della Pietra, A. C., 3rd, George, D. L. & Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33(3): 357-365.
- Duthu, A., Debuire, B., Romano, J., Ehrhart, J. C., Fiscella, M., May, E., Appella, E. & May, P. (1992). p53 mutations in Raji cells: characterization and localization relative to other Burkitt's lymphomas. *Oncogene* 7(11): 2161-2167.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4): 817-825.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Gueranger, Q., Reynaud, C. A. & Weill, J. C. (2002a). Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature* 419(6910): 944-947.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Gueranger, Q., Zober, C., Leon, A., Bertocci, B., Weill, J. C. & Reynaud, C. A. (2002b). AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat Immunol* 3(9): 815-821.
- Farrell, P. J., Allan, G. J., Shanahan, F., Vousden, K. H. & Crook, T. (1991). p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J* 10(10): 2879-2887.
- Fields, S. & Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249(4972): 1046-1049.

- Fotedar, R., Bendjennat, M. & Fotedar, A. (2004). Role of p21WAF1 in the cellular response to UV. *Cell Cycle* 3(2): 134-137.
- Fraser, M., Chan, S. L., Chan, S. S., Fiscus, R. R. & Tsang, B. K. (2006). Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 25(15): 2203-2212.
- Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C. & Oren, M. (1996). A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 16(9): 4961-4971.
- Fukita, Y., Jacobs, H. & Rajewsky, K. (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 9(1): 105-114.
- Gatz, S. A. & Wiesmuller, L. (2006). p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* 13(6): 1003-1016.
- Giaccia, A. J. & Kastan, M. B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12(19): 2973-2983.
- Golding, G. B., Gearhart, P. J. & Glickman, B. W. (1987). Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics* 115(1): 169-176.
- Goodman, M. F. & Tiffin, B. (2000). Sloppier copier DNA polymerases involved in genome repair. *Curr Opin Genet Dev* 10(2): 162-168.
- Goossens, T., Klein, U. & Kuppers, R. (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(5): 2463-2468.
- Gray, D. (1991). Understanding germinal centres. *Res Immunol* 142(3): 237-242.
- Gray, D., Kosco, M. & Stockinger, B. (1991). Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory. *Int Immunol* 3(2): 141-148.
- Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94(6): 695-698.
- Gudkov, A. V. & Komarova, E. A. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 3(2): 117-129.
- Guikema, J. E., Schrader, C. E., Brodsky, M. H., Linehan, E. K., Richards, A., El Falaky, N., Li, D. H., Sluss, H. K., Szomolanyi-Tsuda, E. & Stavnezer, J. p53 represses class switch recombination to IgG2a through its antioxidant function. *J Immunol* 184(11): 6177-6187.
- Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* 87(2): 297-306.
- Hainaut, P., Hall, A. & Milner, J. (1994). Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding. *Oncogene* 9(1): 299-303.
- Hamroun, D., Kato, S., Ishioka, C., Claustres, M., Beroud, C. & Soussi, T. (2006). The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum Mutat* 27(1): 14-20.
- Hande, S., Notidis, E. & Manser, T. (1998). Bcl-2 obstructs negative selection of autoreactive, hypermutated antibody V regions during memory B cell development. *Immunity* 8(2): 189-198.
- Hao, Z., Duncan, G. S., Seagal, J., Su, Y. W., Hong, C., Haight, J., Chen, N. J., Elia, A., Wakeham, A., Li, W. Y., Liepa, J., Wood, G. A., Casola, S., Rajewsky, K. & Mak, T. W. (2008). Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. *Immunity* 29(4): 615-627.
- Harms, K. L. & Chen, X. (2005). The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol Cell Biol* 25(5): 2014-2030.
- Harnett, M. M. (2004). CD40: a growing cytoplasmic tale. *Sci STKE* 2004(237): pe25.

- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387(6630): 296-299.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H. & Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev* 9(17): 2170-2183.
- Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A. J. & Ott, J. (2002). The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8467-8472.
- Hollowood, K. & Goodlad, J. R. (1998). Germinal centre cell kinetics. *J Pathol* 185(3): 229-233.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015): 49-53.
- Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420(1): 25-27.
- Inga, A., Storici, F., Darden, T. A. & Resnick, M. A. (2002). Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol Cell Biol* 22(24): 8612-8625.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. & Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4(1): 1-7.
- Jacob, J. & Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 176(3): 679-687.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. (1991). Intracлонаl generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354(6352): 389-392.
- Jacob, J., Przylepa, J., Miller, C. & Kelsoe, G. (1993). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp Med* 178(4): 1293-1307.
- Jansen, J. G., Langerak, P., Tsaalbi-Shtylik, A., van den Berk, P., Jacobs, H. & de Wind, N. (2006). Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med* 203(2): 319-323.
- Jolly, C. J., Klix, N. & Neuberger, M. S. (1997). Rapid methods for the analysis of immunoglobulin gene hypermutation: application to transgenic and gene targeted mice. *Nucleic Acids Res* 25(10): 1913-1919.
- Jung, D. & Alt, F. W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116(2): 299-311.
- Jung, H. J., Kim, E. H., Mun, J. Y., Park, S., Smith, M. L., Han, S. S. & Seo, Y. R. (2007). Base excision DNA repair defect in Gadd45a-deficient cells. *Oncogene* 26(54): 7517-7525.
- Kamer, I., Sarig, R., Zaltsman, Y., Niv, H., Oberkovitz, G., Regev, L., Haimovich, G., Lerenthal, Y., Marcellus, R. C. & Gross, A. (2005). Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell* 122(4): 593-603.
- Kelsoe, G. (1995). The germinal center reaction. *Immunol Today* 16(7): 324-326.
- Klein, U., Klein, G., Ehlin-Henriksson, B., Rajewsky, K. & Kuppers, R. (1995). Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol Med* 1(5): 495-505.
- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V. & Gudkov, A. V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285(5434): 1733-1737.

- Komarova, E. A., Neznanov, N., Komarov, P. G., Chernov, M. V., Wang, K. & Gudkov, A. V. (2003). p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 278(18): 15465-15468.
- Kondo, E. & Yoshino, T. (2007). Expression of apoptosis regulators in germinal centers and germinal center-derived B-cell lymphomas: insight into B-cell lymphomagenesis. *Pathol Int* 57(7): 391-397.
- Kortlever, R. M., Higgins, P. J. & Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 8(8): 877-884.
- Kosco, M. H. & Gray, D. (1992). Signals involved in germinal center reactions. *Immunol Rev* 126: 63-76.
- Kosco, M. H., Monfalcone, A. P., Szakal, A. K. & Tew, J. G. (1988a). Germinal center B cells present antigen obtained in vivo to T cells in vitro and stimulate mixed lymphocyte reactions. *Adv Exp Med Biol* 237: 883-888.
- Kosco, M. H., Szakal, A. K. & Tew, J. G. (1988b). In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J Immunol* 140(2): 354-360.
- Kroese, F. G., Timens, W. & Nieuwenhuis, P. (1990). Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol* 84 (Pt 1): 103-148.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387(6630): 299-303.
- Kudo, A. & Melchers, F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J* 6(8): 2267-2272.
- Kuppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5(4): 251-262.
- Kuppers, R. & Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20(40): 5580-5594.
- Kuppers, R., Rajewsky, K. & Hansmann, M. L. (1997). Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur J Immunol* 27(6): 1398-1405.
- Kuppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L. & Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 12(13): 4955-4967.
- Lane, D. P. & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278(5701): 261-263.
- Langerak, P., Krijger, P. H., Heideman, M. R., van den Berk, P. C. & Jacobs, H. (2009). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: lessons from proliferating cell nuclear antigenK164R mutant mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1517): 621-629.
- Lebecque, S. G. & Gearhart, P. J. (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(6): 1717-1727.
- Linzer, D. I. & Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17(1): 43-52.
- Liu, M., Duke, J. L., Richter, D. J., Vinuesa, C. G., Goodnow, C. C., Kleinstein, S. H. & Schatz, D. G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451(7180): 841-845.

- Liu, M. & Schatz, D. G. (2009). Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol* 30(4): 173-181.
- Liu, Y. J., de Bouteiller, O. & Fugier-Vivier, I. (1997). Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 9(2): 256-262.
- Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J. & MacLennan, I. C. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342(6252): 929-931.
- Liu, Y. J., Malisan, F., de Bouteiller, O., Guret, C., Lebecque, S., Banchereau, J., Mills, F. C., Max, E. E. & Martinez-Valdez, H. (1996). Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* 4(3): 241-250.
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y. & MacLennan, I. C. (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(12): 2951-2962.
- Lowe, S. W. & Sherr, C. J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13(1): 77-83.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Lu, H. & Levine, A. J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 5154-5158.
- Maccarthy, T., Roa, S., Scharff, M. D. & Bergman, A. (2009). SHMTool: a webserver for comparative analysis of somatic hypermutation datasets. *DNA Repair (Amst)* 8(1): 137-141.
- MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12: 117-139.
- MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C. & Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194: 8-18.
- Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J. & Liu, Y. J. (1996). Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med* 183(3): 971-977.
- Martomo, S. A., Saribasak, H., Yokoi, M., Hanaoka, F. & Gearhart, P. J. (2008). Reevaluation of the role of DNA polymerase theta in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *DNA Repair (Amst)* 7(9): 1603-1608.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W. & Weigert, M. (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(10): 3180-3184.
- Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B. & Rolink, A. (1993). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* 14(2): 60-68.
- Midgley, C. A. & Lane, D. P. (1997). p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene* 15(10): 1179-1189.
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D. & Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17(6): 631-636.
- Momand, J., Wu, H. H. & Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242(1-2): 15-29.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102(5): 553-563.

- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. & Honjo, T. (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(26): 18470-18476.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P. & Bourdon, J. C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 13(6): 962-972.
- Muschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K. & Kuppers, R. (2000). Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med* 192(12): 1833-1840.
- Nagy, N., Takahara, M., Nishikawa, J., Bourdon, J. C., Kis, L. L., Klein, G. & Klein, E. (2004). Wild-type p53 activates SAP expression in lymphoid cells. *Oncogene* 23(53): 8563-8570.
- Offer, H., Erez, N., Zurer, I., Tang, X., Milyavsky, M., Goldfinger, N. & Rotter, V. (2002). The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis* 23(6): 1025-1032.
- Offer, H., Wolkowicz, R., Matas, D., Blumenstein, S., Livneh, Z. & Rotter, V. (1999). Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett* 450(3): 197-204.
- Offer, H., Zurer, I., Banfalvi, G., Reha'k, M., Falcovitz, A., Milyavsky, M., Goldfinger, N. & Rotter, V. (2001). p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* 61(1): 88-96.
- Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362(6423): 857-860.
- Onizuka, T., Moriyama, M., Yamochi, T., Kuroda, T., Kazama, A., Kanazawa, N., Sato, K., Kato, T., Ota, H. & Mori, S. (1995). BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 86(1): 28-37.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10(4): 431-442.
- Pancer, Z. & Cooper, M. D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 24: 497-518.
- Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11: 331-360.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Kuppers, R. & Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412(6844): 341-346.
- Peters, A. & Storb, U. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 4(1): 57-65.
- Petitjean, A., Achatz, M. I., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P. & Olivier, M. (2007). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26(15): 2157-2165.
- Phan, R. T. & Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432(7017): 635-639.
- Phan, R. T., Saito, M., Basso, K., Niu, H. & Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 6(10): 1054-1060.

- Picksley, S. M., Vojtesek, B., Sparks, A. & Lane, D. P. (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* 9(9): 2523-2529.
- Pietenpol, J. A., Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1994). Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 1998-2002.
- Pim, D. & Banks, L. (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108(2): 196-199.
- Qin, X. F., Schwers, S., Yu, W., Papavasiliou, F., Suh, H., Nussenzweig, A., Rajewsky, K. & Nussenzweig, M. C. (1999). Secondary V(D)J recombination in B-1 cells. *Nature* 397(6717): 355-359.
- Quah, B. J., Warren, H. S. & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2(9): 2049-2056.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381(6585): 751-758.
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H. T., McBride, K. M., Eisenreich, T. R., Chen, J., Dickins, R. A., Lowe, S. W., Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M. C. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* 440(7080): 105-109.
- Ranuncolo, S. M., Polo, J. M., Dierov, J., Singer, M., Kuo, T., Greally, J., Green, R., Carroll, M. & Melnick, A. (2007). Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 8(7): 705-714.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. & Durandy, A. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102(5): 565-575.
- Roa, S., Avdievich, E., Peled, J. U., Maccarthy, T., Werling, U., Kuang, F. L., Kan, R., Zhao, C., Bergman, A., Cohen, P. E., Edelman, W. & Scharff, M. D. (2008). Ubiquitylated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class-switch recombination and is required for meiotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(42): 16248-16253.
- Rogozin, I. B. & Kolchanov, N. A. (1992). Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1171(1): 11-18.
- Ross, A. L. & Sale, J. E. (2006). The catalytic activity of REV1 is employed during immunoglobulin gene diversification in DT40. *Mol Immunol* 43(10): 1587-1594.
- Rousseau, D., Cannella, D., Boulaire, J., Fitzgerald, P., Fotedar, A. & Fotedar, R. (1999). Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 18(30): 4313-4325.
- Rowan, S., Ludwig, R. L., Haupt, Y., Bates, S., Lu, X., Oren, M. & Vousden, K. H. (1996). Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J* 15(4): 827-838.
- Ryan, K. M. & Vousden, K. H. (1998). Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 18(7): 3692-3698.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A. & Schlessel, M. S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 10: 359-383.
- Scheller, H., Tobollik, S., Kutzera, A., Eder, M., Unterlehberg, J., Pfeil, I. & Jungnickel, B. c-Myc overexpression promotes a germinal center-like program in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 29(6): 888-897.
- Scherer, S. J., Maier, S. M., Seifert, M., Hanselmann, R. G., Zang, K. D., Muller-Hermelink, H. K., Angel, P., Welter, C. & Scharl, M. (2000). p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J Biol Chem* 275(48): 37469-37473.
- Schneider, G., Henrich, A., Greiner, G., Wolf, V., Lovas, A., Wieczorek, M., Wagner, T., Reichardt, S., von Werder, A., Schmid, R. M., Weih, F., Heinzl, T., Saur, D. & Kramer, O. H. Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29(19): 2795-2806.
- Schwickert, T. A., Lindquist, R. L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M. H., Dustin, M. L. & Nussenzweig, M. C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446(7131): 83-87.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A. & Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10(12): 6565-6577.
- Shen, H. M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X. & Storb, U. (1998). Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280(5370): 1750-1752.
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14(3): 289-300.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91(3): 325-334.
- Siddique, M. & Sabapathy, K. (2006). Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene* 25(25): 3489-3500.
- Smith, K. G., Light, A., O'Reilly, L. A., Ang, S. M., Strasser, A. & Tarlinton, D. (2000). bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J Exp Med* 191(3): 475-484.
- Smith, K. G., Nossal, G. J. & Tarlinton, D. M. (1995). FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11628-11632.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M. & Fornace, A. J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266(5189): 1376-1380.
- Soussi, T. & Beroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1(3): 233-240.
- Steegenga, W. T., van der Eb, A. J. & Jochemsen, A. G. (1996). How phosphorylation regulates the activity of p53. *J Mol Biol* 263(2): 103-113.
- Takahashi, Y., Cerasoli, D. M., Dal Porto, J. M., Shimoda, M., Freund, R., Fang, W., Telander, D. G., Malvey, E. N., Mueller, D. L., Behrens, T. W. & Kelsoe, G. (1999). Relaxed

- negative selection in germinal centers and impaired affinity maturation in bcl-xL transgenic mice. *J Exp Med* 190(3): 399-410.
- Takahashi, Y., Ohta, H. & Takemori, T. (2001). Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14(2): 181-192.
- Takao, N., Kato, H., Mori, R., Morrison, C., Sonada, E., Sun, X., Shimizu, H., Yoshioka, K., Takeda, S. & Yamamoto, K. (1999). Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 18(50): 7002-7009.
- Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., Kanei-Ishii, C., Nakai, A., Matsuzawa, S., Reed, J. C. & Ishii, S. (2000). p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* 275(20): 15578-15585.
- Tarlinton, D. M. (2008). Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunol Cell Biol* 86(2): 133-138.
- Teodoro, J. G., Parker, A. E., Zhu, X. & Green, M. R. (2006). p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* 313(5789): 968-971.
- Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R. & Tjian, R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267(5194): 100-104.
- Tindall, K. R. & Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27(16): 6008-6013.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302(5909): 575-581.
- Tuscano, J. M., Druey, K. M., Riva, A., Pena, J., Thompson, C. B. & Kehrl, J. H. (1996). Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center. *Blood* 88(4): 1359-1364.
- van Eijk, M., Defrance, T., Hennino, A. & de Groot, C. (2001). Death-receptor contribution to the germinal-center reaction. *Trends Immunol* 22(12): 677-682.
- van Kooten, C. & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67(1): 2-17.
- Varley, J.M. (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat.* 21(3): 313-20
- Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70(4): 523-526.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369(6481): 574-578.
- Walton, M. I., Wilson, S. C., Hardcastle, I. R., Mirza, A. R. & Workman, P. (2005). An evaluation of the ability of pifithrin-alpha and -beta to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther* 4(9): 1369-1377.
- Wang, C. L. & Wabl, M. (2005). Hypermutation rate normalized by chronological time. *J Immunol* 174(9): 5650-5654.
- Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J. E., Anderson, M. E., Schwedes, J. F. & Tegtmeyer, P. (1994). p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol* 14(8): 5182-5191.
- Wang, X., Kua, H. Y., Hu, Y., Guo, K., Zeng, Q., Wu, Q., Ng, H. H., Karsenty, G., de Crombrughe, B., Yeh, J. & Li, B. (2006). p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol* 172(1): 115-125.

- Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G. & et al. (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10(2): 188-195.
- Warnick, C. T., Dabbas, B., Ford, C. D. & Strait, K. A. (2001). Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 276(29): 27363-27370.
- Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. & Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1(1): 20-26.
- Weiss, U. & Rajewsky, K. (1990). The repertoire of somatic antibody mutants accumulating in the memory compartment after primary immunization is restricted through affinity maturation and mirrors that expressed in the secondary response. *J Exp Med* 172(6): 1681-1689.
- Wilson, P. C., de Bouteiller, O., Liu, Y. J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J. D. & Pascual, V. (1998). Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med* 187(1): 59-70.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. & Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7(7A): 1126-1132.
- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., Rothman, P., Stall, A. M., Pandolfi, P. P. & Dalla-Favera, R. (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16(2): 161-170.
- Yee, K. S. & Vousden, K. H. (2005). Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* 26(8): 1317-1322.
- Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y. L., Gonzalez Fernandez, A., Pannell, R., Neuberger, M. S. & Milstein, C. (1995). Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* 376(6537): 225-229.
- Yew, P. R. & Berk, A. J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 357(6373): 82-85.
- Yu, J. & Zhang, L. (2003). No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 4(4): 248-249.
- Zaheen, A., Boulianne, B., Parsa, J. Y., Ramachandran, S., Gommerman, J. L. & Martin, A. (2009). AID constrains germinal center size by rendering B cells susceptible to apoptosis. *Blood* 114(3): 547-554.
- Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M. F., Diaz, M. & Casali, P. (2001). The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity* 14(5): 643-653.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H. & Prives, C. (2001). A role for p53 in base excision repair. *EMBO J* 20(4): 914-923.
- Zhu, Y., Nonoyama, S., Morio, T., Muramatsu, M., Honjo, T. & Mizutani, S. (2003). Type two hyper-IgM syndrome caused by mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Med Dent Sci* 50(1): 41-46.
- Zinkel, S. S., Hurov, K. E., Ong, C., Abtahi, F. M., Gross, A. & Korsmeyer, S. J. (2005). A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell* 122(4): 579-591.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

%	Prozent	DNase	Desoxyribonuklease
°C	Grad Celsius	dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
A	Adenin	Dox	Doxycyclin
Ag	Antigen	dsDNA	doppelsträngige DNA
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase	D-Segment	<i>Diversity</i> -Segment des V-Gens
Ak	Antikörper	DTT	Dithiothreitol
Amp	Ampicillinresistenzgen	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
APOBEC1	Apolipoprotein B mRNA editierendes Enzym	EBNA	Epstein-Barr virales Kern Antigen (EBV- <i>nuclear-antigen</i>)
APS	Ammoniumperoxidsulfat	EBV	Epstein-Barr-Virus
AP-Stelle	Apurinische/Apyrimidinische Stelle	ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
AS	Aminosäure/n	EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>	ER	<i>estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat	et al.	<i>et alii</i> , und andere
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	EtBr	Ethidiumbromid
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	Exon	<i>expressed region</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 Daxx</i>	E μ	IgH-Enhancer
Bcl-xL	<i>Basal cell lymphoma-extra</i>	F	Farad, physikalische Einheit der Kapazität
BCR	<i>B cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenzgekoppelte Zellanalyse
BER	<i>base excision repair</i> , Basenexzisionsreparatur	FCS/FKS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>	FDC	follikuläre dendritische Zelle
BL	Burkitt-Lymphom	FL	Follikuläres Lymphom
bp	Basenpaar(e)	FSC	<i>Forward Scatter</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserum Albumin	g	Gramm
C	Cytosin	G	Guanin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Chk1/Chk2	<i>checkpoint homolog 1/2</i>	GC	<i>gene conversion</i> , Genkonversion
cm	Zentimeter	GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grün- fluoreszierendes Protein
CMV	Cytomegalovirus	h	Stunde
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	H ₂ O	bidest zweifach destilliertes Wasser
C-Region	<i>constant region</i> , konstante Region	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
CSR	<i>class switch recombination</i> , Klassenwechselrekombination	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- Piperazinethan-Sulfonsäure
D	Adenin, Guanin oder Thymin	HL	Hodgkin Lymphom
DEPC	Diethylpyrocarbonat	HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl- Transferase
DLCL	<i>diffuse large B cell lymphoma</i> , Diffuses großzelliges Lymphom	HR	Homologe Rekombination
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle- Medium</i>	HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	HU	<i>hydroxyurea</i> , Hydroxyharnstoff
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i> , Desoxyribonukleinsäure	Ig	Immunglobulin
		IgH	schwere Ig-Kette
		IgL	leichte Ig-Kette

Intron	<i>intervening sequence</i>	Rag	Rekombinationsaktivierende Gene
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle	RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>	RNase	Ribonuklease
J-Segment	<i>joining</i> -Segment des V-Gens	RPA	Replikationsprotein A
kb	Kilobasen	rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro min
kDa	Kilodalton	RT	Raumtemperatur
l	Liter	RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
LCL	<i>lymphoblastoid cell line</i> , Lymphoblastoide Zelllinie	SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
LTR	<i>long terminal repeats</i>	sec	Sekunde
M	Molar	SHM	Somatische Hypermutation
MACS	<i>Magnetic associated cell sorting</i> , Zellsortierung nach magnetischer Markierung	S-Phase	Synthese-Phase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>	S-Region	Schalter-Region
mg	Milligramm	SSC	<i>Sideward Scatter</i>
min	Minute	Strep	Streptomycin
ml	Milliliter	T	Thymin
mm	Millimeter	TAE	Tris-Acetat
mM	Millimolar	TCR	<i>T cell receptor</i>
MMR	<i>mismatch repair</i> , Fehlpaarungsreparatur	TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
MMS	Methylmethansulfonat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA	Tet	Tetracyclin
MSH	<i>mut S-homolog</i>	TLS	Transläsionssynthese
NER	<i>nucleotide excision repair</i>	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
NFκB	<i>nuclear factor-κB</i> , Kernfaktor-κB	U	Uracil
ng	Nanogramm	UNG	Uracil-Glykosylase
NHEJ	<i>non homologous endjoining</i> , nicht homologe Endverknüpfung	UV	ultraviolettes Licht
nm	Nanometer	V	Volt
N-Nukleotide	nicht matrizen-kodierte Nukleotide	V-Gen	Gen der variablen Region
N-terminal	aminoterminal Ende	V _H	Variablen Segment der schweren Kette
OD	Optische Dichte	V _L	Variablen Segment der leichten Kette
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel	W	Adenin oder Thymin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	Y	Pyrimidinbasen: Thymin oder Cytosin
PCNA	<i>proliferation cell nuclear antigen</i>	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , Gelb- fluoreszierendes Protein
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion	μF	Microfarad
P-Nukleotide	Palindromische Nukleotide	μg	Mikrogramm
Primer	Startoligonukleotid für die DNA- Polymerase	μ-Kette	schwere Kette des IgM
Puro	Puromycin	μl	Mikroliter
PVDF	Polyvinylidenfluorid	μM	Mikromolar
R	Purinbasen: Adenin oder Guanin		

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Berit Jungnickel für eine großartige Betreuung und natürlich auch für ein angenehmes und unkompliziertes Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe bedanken.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Dirk Eick, der mich ein Großteil meiner Doktorarbeit als offizieller Doktorvater betreut hat.

Ein großes Dankeschön an Dr. Ulla Strobl, welche mir als Mausexpertin mit Rat, Ideen und Anregungen eine große Hilfe bezüglich meines Mausprojektes war.

Gleichzeitig möchte ich mich bei Gabi Marschall für die Versorgung mit etlichen Protokollen und für die Hilfe bei einigen Experimenten und spontanen Immunisierungen bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den ehemaligen und aktuellen Kollegen(innen) meiner Arbeitsgruppe und auch der KMOLBI für ein entspanntes und kollegiales Arbeitsklima, welches sowohl mit fachlichen Diskussionen als auch mit gemeinschaftlichen Ereignissen bereichert wurde.

Sabine Fischer-Burkart möchte ich ebenfalls ganz herzlich danken, dass sie mir jederzeit eine große Unterstützung im Labor war und vor allem immer mit einem Lächeln auf den Lippen die unzählig vielen Minipreps verarbeitet hat.

Einen riesen Dank möchte ich meinem Mann aussprechen, der mich schon seit meinem Studium stets in allen Lebenslagen unterstützt und motiviert hat. Zudem bedanke ich mich für Dein immer vorhandenes Interesse an meiner Arbeit, Deine Geduld und Ausdauer bei privaten Probevorträgen und vor allem für Deine „planerischen Fähigkeiten“, die mir stets die Zuversicht gegeben haben, alles so zu schaffen, wie „wir“ uns das vorgestellt haben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen ehemaligen Göttinger Kommilitoninnen Ankath und Schanni danken, die seit unserem „intensiven“ Grundstudium für mich unser Motto „Das wäre doch gelacht“ aufrecht erhalten haben.

7.3 Ehrenwörtliche Erklärung

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

München, den 16. August 2010

Kerstin Braunschmidt

7.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 16. August 2010

Kerstin Braunschmidt

7.5 Lebenslauf

Kerstin Braunschmidt

Persönliche Daten

Geburtsdatum 16.12.1979
 Geburtsort Bad Muskau
 Familienstand verheiratet
 Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

09/ 1986 - 07/ 1992 Polytechnische Oberschule, Weißwasser
 10/ 1992 - 06/ 1998 städtisches Gymnasium, Weißwasser; **Abitur** (2,2)

Berufsausbildung

10/ 1998 - 01/ 2001 MEMOREC (Medical Molecular Research Cologne) Stoffel GmbH, Köln; **Ausbildung zur Biologielaborantin** (sehr gut)

Berufserfahrung

02/ 2001 - 07/ 2001 MEMOREC (Medical Molecular Research Cologne) Stoffel GmbH, Köln; **Biologielaborantin**
 Aufgabenbereich: Optimierung der händischen und automatisierten Produktionsschritte in der cDNA Array Applikation

Studium

10/ 2001 - 09/ 2003 Georg-August-Universität, Göttingen; **Studium der Biologie (Diplom)** Vordiplom (gut)
 10/ 2003 - 12/ 2005 Ludwig-Maximilians-Universität, München; **Hauptstudium Biologie** (1,4)
 01/ 2006 - 10/ 2006 Helmholtz Zentrum München; Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt München; **Diplomarbeit** (1,5)
 Thema: Regulation von Rekombination und Mutagenese in humanen B-Zellen durch die Expression von DNA-Reparaturfaktoren
 seit 02/ 2007 Helmholtz Zentrum München; Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt München; **Doktorarbeit**
 Thema: Die Rolle von p53 während der Keimzentrumsreaktion

Praktikum

08/ 2004 - 09/2004 Wellcome Centre for Molecular Parasitology, University of Glasgow, Schotland
 Projekt: Analyse der Interaktionspartner bestimmter Kinasen (yeast two-hybrid system)