

---

# DNA-SCHÄDIGUNG BEEINFLUSST DIE REGULATION DER AKTIVIERUNGS-INDUZIERTEN CYTIDIN-DEAMINASE

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von **Julia Jeschke**

aus Jarowoje

am 15.12.2011

angefertigt am

Helmholtz Zentrum München

Deutsches Forschungszentrum

für Gesundheit und Umwelt

und an der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Zentrum für molekulare

Biomedizin (CMB)

1. Gutachter:

Prof. Dr. Berit Jungnickel

2. Gutachter:

Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Februar 2012

Моим родителям посвящается.

Meinen Eltern gewidmet.

(A) Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

„Inhibition of nuclear degradation of activation-induced cytidine deaminase by DNA damage” (2011). Jeschke, J., Pfeil, I., Davari, K., Kremmer, E., and Jungnickel, B.

Manuskript eingereicht.

(B) Die Arbeit wurde auf folgenden wissenschaftlichen Symposien präsentiert:

- Helmholtz-PhD-Retreat in Scheyern, Deutschland, 2008 (Vortrag)
- „Interact“ PhD Symposium in München, Deutschland, 2008 (Poster)
- „Summer School JSPS-PhD-Program“ in Tokyo, Japan, 2009 (Poster und Vortrag)
- Keystone-Symposium „B Cells: New Insights into Normal versus Dysregulated Function“ in Whistler, Kanada, 2011 (Poster)

## INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VIII
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Die adaptive Immunantwort .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Der B-Zellrezeptor .....	3
2.1.2 Die Keimzentrumsreaktion .....	4
2.1.2.1 Somatische Hypermutation .....	7
<b>2.2 Reparatur der AID-induzierten DNA-Schäden .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Entstehung von B-Zelllymphomen .....	11
<b>2.3 Regulation von AID .....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Transkriptionelle Regulation von AID .....	13
2.3.2 Regulation der AID-Aktivität durch microRNA .....	14
2.3.3 Posttranslationale Regulation von AID .....	14
2.3.3.1 Die subzelluläre Verteilung von AID steuert den AID-Abbau .....	15
<b>2.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Analyse verschiedener AID-GFP Fusionsproteine in zwei Zelllinien .....</b>	<b>21</b>
3.1.1 Expression und Funktion der vier AID-GFP Fusionsproteine .....	22
3.1.2 Spezifischer AID-Abbau im Zellkern .....	24
<b>3.2 Analyse der Aktivität, der Lokalisation und des Abbaus von AID-GFP Mutanten. 28</b>	
3.2.1 Untersuchung der Expression und Funktion der AID-Mutanten .....	30
3.2.2 Untersuchung der Lokalisation und Degradation der AID-Mutanten .....	32
<b>3.3 AID-GFP Proteinstabilität bei exogen induzierten DNA-Läsionen .....</b>	<b>34</b>
3.3.1 Proteinstabilität der AID-GFP Mutanten bei exogen induzierten DNA-Läsionen .....	40
<b>3.4 Proteinlokalisierung des endogenen AID bei exogen induzierten DNA-Läsionen ...</b>	<b>43</b>
<b>3.5 AID-Anreicherung an DNA-Läsionsstellen im Zellkern von Hela-Zellen .....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 AID-Ubiquitinierung bei DNA-Läsionen .....</b>	<b>49</b>

<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1 Vergleichende Analyse verschiedener AID-GFP Konstrukte</b> .....	<b>50</b>
4.1.1 Lokalisation und Expression der AID-GFP Fusionsproteine.....	51
4.1.2 Funktion und Degradation der AID-GFP Fusionsproteine.....	52
<b>4.2 Der proteasomale Abbau von AID wird von seiner Aktivität beeinflusst</b> .....	<b>53</b>
4.2.1 Expression und Abbauverhalten verschiedener AID-Mutanten .....	53
<b>4.3 Die BER-aktivierenden Substanzen MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stören den AID-Abbau</b> .....	<b>54</b>
<b>4.4 Arbeitshypothese: Der nukleäre AID-Abbau wird bei BER-induzierenden DNA-Schäden gehemmt</b> .....	<b>56</b>
4.4.1 AID-Chromatinbindung als mögliche Ursache für Abbauehemmung.....	57
4.4.2 Signal-vermittelte Störung der Ubiquitinierung als mögliche Ursache für Abbauehemmung .....	60
<b>4.5 Ausblick</b> .....	<b>62</b>
<b>5 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>64</b>
<b>5.1 Material</b> .....	<b>64</b>
5.1.1 Chemikalien .....	64
5.1.2 Geräte .....	64
5.1.3 Verwendete Kits .....	65
5.1.4 Datenverarbeitung .....	65
5.1.5 Größenmarker .....	65
5.1.5.1 DNA-Größenstandard .....	65
5.1.5.2 Protein-Größenstandard.....	65
5.1.6 Plasmide.....	66
5.1.7 Bakterien.....	66
5.1.8 Zelllinien.....	66
5.1.9 Antikörper.....	66
5.1.10 Oligonukleotide .....	67
5.1.11 Enzyme.....	67
<b>5.2 Zellkultur</b> .....	<b>67</b>
5.2.1 Bestimmung der Zelldichte.....	68
5.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	69
5.2.3 Zellkulturbedingungen.....	69
5.2.4 Stabile Transfektion von Suspensionszellen.....	69
5.2.5 Transiente Transfektion von adhärennten Zellen .....	69
5.2.6 Bestimmung der Hypermutationsaktivität im FACS.....	70
<b>5.3 Techniken der DNA-Analyse</b> .....	<b>71</b>
5.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	71
5.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	71
5.3.3 DNA-Quantifizierung .....	71
5.3.4 DNA-Gelelektrophorese .....	71
5.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	72

5.3.6	DNA-Mutagenese .....	72
5.3.7	DNA-Sequenzierung und Datenauswertung .....	72
<b>5.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>73</b>
5.4.1	Präparation von Proteinen aus Zellen .....	73
5.4.2	Proteinquantifizierung.....	73
5.4.3	SDS-PA-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) .....	74
5.4.4	Western Blot.....	74
5.4.5	Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper .....	75
5.4.6	Fraktionierung .....	76
5.4.7	Immunpräzipitationsassay.....	76
<b>5.5</b>	<b>Abbaukinetik im FACS .....</b>	<b>77</b>
5.5.1	Behandlung der Zellen.....	77
5.5.2	Durchflusszytometrische Analyse.....	77
<b>5.6</b>	<b>Mikroskopische Methoden.....</b>	<b>78</b>
5.6.1	Konfokale Mikroskopie der fixierten Suspensionszellen.....	78
5.6.1.1	Immobilisierung der Suspensionszellen.....	78
5.6.1.2	Paraformaldehyd-Fixierung .....	78
5.6.1.3	Mikroskopische Analyse.....	78
5.6.2	Lebendzellmikroskopie der adhärennten Zellen nach UV-Bestrahlung.....	79
5.6.2.1	Konfokale Lebendzellaufnahme.....	79
5.6.2.2	Datenauswertung .....	79
<b>6</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>90</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>90</b>
<b>7.2</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>94</b>
<b>7.3</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>95</b>
<b>7.4</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>96</b>
<b>7.5</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>97</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Entwicklungsstadien der B-Zellen im Überblick (nach Küppers 2003).....	5
<b>Abbildung 2:</b> Sekundäre Antikörperdiversifikationsmechanismen (nach Jungnickel 2006) .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Modell der einzelnen Reparaturphasen nach der AID-bedingten Cytidin- Deaminierung der DNA (nach Di Noia und Neuberger 2007) .....	9
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der AID-Proteinstruktur und seiner funktionellen Domänen (nach Di Noia & Neuberger 2007).....	16
<b>Abbildung 5:</b> Ein Modell des konstitutiven Ubiquitin-Proteasom-Systems (nach Kostova & Wolf 2003) .....	18
<b>Abbildung 6:</b> Expression und Funktion der vier AID-GFP Fusionsproteine .....	23
<b>Abbildung 7:</b> Expressions- und Lokalisationsanalyse der AID-GFP Fusionsproteine.....	25
<b>Abbildung 8:</b> Lokalisations- und Abbauverhalten der AID-GFP Proteine .....	26
<b>Abbildung 9:</b> Proteasomaler Abbau von AID im Zellkern .....	27
<b>Abbildung 10:</b> Beschreibung und schematische Darstellung der hergestellten AID-Mutanten .....	29
<b>Abbildung 11:</b> Expressions- und Funktionsanalyse der AID $\Delta$ NES-GFP Mutanten.....	31
<b>Abbildung 12:</b> Lokalisationsanalyse und Abbauverhalten der AID $\Delta$ NES-GFP Mutanten.....	32
<b>Abbildung 13:</b> Aktivität und Abbauverhalten der AID-GFP Phosphorylierungsmutanten .....	33
<b>Abbildung 14:</b> Titrationsreihe der MMS-Lösung .....	36
<b>Abbildung 15:</b> AID-Abbau bei exogen induzierten DNA-Läsionen .....	37
<b>Abbildung 16:</b> AID-Lokalisation und -Abbau bei exogen induzierten DNA-Läsionen.....	39
<b>Abbildung 17:</b> Lokalisation und Stabilität des aktiven und inaktiven AID unter MMS- und Cisplatineinfluss (Mikroskopie) .....	41
<b>Abbildung 18:</b> Einfluss von MMS und Cisplatin auf die Proteinstabilität des aktiven und inaktiven AID (FACS) .....	42
<b>Abbildung 19:</b> Subzelluläre Verteilung des endogenen AID unter verschiedenen Bedingungen.....	43
<b>Abbildung 20:</b> Anreicherung von PCNA und AID an DNA-Läsionsstellen im Zellkern von Hela-Zellen.....	46
<b>Abbildung 21:</b> Differenzielle Anreicherung der AID-Mutanten an der UV-geschädigten DNA.....	48
<b>Abbildung 22:</b> AID-Ubiquitinierung nach MMS-induzierten DNA-Läsionen.....	49
<b>Abbildung 23:</b> Das Arbeitsmodell zur Stabilisierung von AID im Zellkern nach BER-induzierenden DNA-Läsionen .....	57

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete DNA-schädigende Agenzien .....	35
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Zelllinien .....	66
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Antikörper.....	66
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Oligonukleotide für Mutagenese und Sequenzierungen .....	67

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase (AID) leitet bei Infektionen zwei verschiedene mutagene Prozesse in Keimzentren ein: somatische Hypermutation (SHM) und Klassenwechselrekombination (*CSR, class switch recombination*). Durch fehlerhafte Reparatur von AID-induzierten DNA-Läsionen werden Genomveränderungen bewirkt, die die Affinität der Antikörper erhöhen und ihre Effektorfunktionen verbessern können.

Das AID-Protein befindet sich überwiegend im Cytoplasma, obwohl es seine entscheidende Funktion an der DNA im Zellkern ausübt. Eine der Ursachen für die asymmetrische AID-Lokalisation ist der nukleäre AID-Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).

Wir konnten in Studien mit inaktiven AID-Mutanten zeigen, dass AID-induzierte DNA-Läsionen mit der AID-Degradation im Zellkern interferieren können. Die Auswirkungen von bestimmten, auch durch AID induzierten DNA-Läsionen auf die Stabilität und auf die Lokalisation des AID-Proteins konnten ebenfalls in Experimenten bestätigt werden, bei denen diese DNA-Läsionen durch Behandlung mit genotoxischen Agenzien simuliert wurden. Diese Wechselwirkungen wurden sowohl für endogenes Wildtyp (WT)-AID als auch für ein AID-GFP Fusionsprotein in zwei verschiedenen B-Zelllinien gezeigt. Ferner wurden Hinweise auf eine verminderte Polyubiquitinierung von AID erhalten, die als Ursache für erhöhte AID-Proteinmengen im Zellkern bei exogenen DNA-Läsionen in Frage kommt.

Durch Lebendzellmikroskopie der UV-bestrahlten Zellen konnten wir eine Kolo­kalisierung von AID und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) an den geschädigten DNA-Bereichen in HeLa-Zellen feststellen. Während PCNA an den DNA-Läsionen eine starke und stabile Anreicherung erfuhr, war nach wenigen Minuten kein AID mehr an der geschädigten DNA detektierbar. Dabei konnten Unterschiede zwischen den einzelnen AID-Mutanten bei der Rekrutierung an die UV-bestrahlte DNA festgehalten werden.

Die Gesamtheit der Ergebnisse lieferte somit starke Anhaltspunkte für Wechselwirkungen zwischen Aktivität, Degradation und Lokalisation im posttranslationalen Regulationsnetzwerk von AID und ermöglichte Einblicke in ein noch nicht beschriebenes AID-Verhalten in einer Zelle, die einer starken DNA-Schädigung unterliegt. Diese Hypothese dient nun als Ausgangspunkt für weitere Analysen der Signalkaskaden, die zur nukleären Anreicherung und Abbauehemmung von AID bei DNA-Läsionen führen.

## 2. EINLEITUNG

Ein Leben ohne Immunsystem wäre in einer Umwelt voller pathogener Mikroorganismen undenkbar. Ständig muss sich der Körper gegen diese Bedrohung wehren und Keime spezifisch und zügig erkennen und eliminieren, ohne dabei das eigene Gewebe zu gefährden. Zusätzlich zum angeborenen Immunsystem, welches Krankheitserreger anhand ihrer Oberflächenmuster erkennt und schnell beseitigt, haben Vertebraten einen weiteren Schutzmechanismus in Form von erworbener (adaptiver) Immunität entwickelt, welcher vor allem zum Tragen kommt, wenn die Erreger die Schutzmechanismen der natürlichen Barrieren (z.B. Haut und Schleimhäute) und des angeborenen Immunsystems überwinden. Außer durch starke Spezifität zeichnet sich die erworbene Immunität durch z.T. lebenslange Gedächtnisbildung aus, die im Falle einer Neuinfektion mit demselben Erreger eine noch schnellere und effizientere Abwehr ermöglicht (Janeway 2002).

### 2.1 Die adaptive Immunantwort

Die Hauptakteure der adaptiven Immunität der Säuger sind T- und B-Zellen. Diese Zellen gehören zu den weißen Blutkörperchen (Lymphozyten) und entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*) im Knochenmark (Kondo 2010). Die weitere Differenzierung der T-Lymphozyten findet im Thymus statt, wo nur eine begrenzte Menge an T-Zellen in der frühen Lebensphase hergestellt wird und für die gesamte Lebensdauer ausreichen muss. Die B-Zellen dagegen entwickeln sich bis zu dem Stadium der reifen naiven B-Zelle im Knochenmark, aus welchem sie mit dem Blutstrom in die Peripherie entlassen werden.

Eine Gemeinsamkeit, die diese unterschiedlichen Zelltypen aufweisen, ist ein Antigenrezeptor (B- bzw. T-Zellrezeptor: BCR und TCR), der den Zellen die Antigenerkennung ermöglicht. Durch die Antigenbindung werden in B- und T-Zellen allerdings unterschiedliche funktionelle Prozesse in Gang gesetzt. Während T-Lymphozyten die Aktivierung von B-Lymphozyten und direkte Vernichtung der mit Pathogenen infizierten körpereigenen Zellen vermitteln (zelluläre Immunantwort), haben B-Zellen die Produktion der Antikörper im Zuge der humoralen Immunantwort zur Aufgabe (Janeway 2002). Um der enormen Vielfalt der Erreger standhalten zu können, muss der Organismus eine Reihe an genetischen

Veränderungen in seinen Antigenrezeptor-Genen vornehmen. Diese DNA-Veränderungen können unter Umständen zur Entstehung von affineren Antikörpern führen, sodass die Diversität erhöht und eine wirkungsvolle Abwehr ermöglicht werden kann (Neuberger 2008).

### 2.1.1 Der B-Zellrezeptor

Der BCR kann in sezernierter löslicher Form (Antikörper) und als Oberflächenrezeptor als integraler Membran-Proteinkomplex auf den B-Zellen vorliegen. Er gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus je zwei identischen schweren (IgH, *immunoglobulin heavy chain*) und leichten (IgL, *immunoglobulin light chain*) Polypeptidketten, die durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Beide Ketten weisen eine funktionelle Aufteilung auf. Die aminoterminalen Enden der Ketten werden als variabel (V) bezeichnet und dienen der Antigenbindung, wohingegen der C-terminale Bereich der Ketten als konstant (C, *constant*) bezeichnet wird. Neben strukturgebenden Eigenschaften definiert die konstante Region der schweren Kette den Isotyp des Antikörpers und somit seine Effektor-Eigenschaften (Kracker und Durandy 2011). Drei wesentliche genetische Mechanismen führen zu der enormen Vielfalt der Antikörper, die beim Menschen auf  $10^{11}$  geschätzt wird (Schatz, Oettinger et al. 1992). Zum einen wird die noch Antigen-unerfahrene Vorläuferzelle im Knochenmark durch somatische Rekombination verändert. In diesem ersten Schritt wird durch zufällige Neukombination des V-Region-Exons aus einer begrenzten Anzahl an Gensegmenten auf dem Genlocus der schweren und der leichten Ketten eine größere Vielfalt geschaffen. Diese Gensegmente liegen als V (*variable*)-, D (*diversity*)- und J (*joining*)-Abschnitte auf der DNA vor, wobei die D-Segmente nur auf dem Locus der schweren Kette vorzufinden sind. Bei der V(D)J-Umlagerung werden zufällig und irreversibel je ein V-, (D-), und J-Gensegment zu einem vollständigen und funktionellen V-Exon zusammengefügt (Jung und Alt 2004). Die Schlüsselenzyme sind dabei die B- und T-Zell-spezifischen RAG1/2-Proteine (*recombination activating genes*); sie ermöglichen den ersten Schritt der Spaltung an den Rekombinationssignalsequenzen (RSS), die die einzelnen Gensegmente flankieren. Die dazwischen liegende DNA wird als geschlossenes zirkuläres Fragment entfernt. Der ubiquitär vorkommende Komplex Ku70/80 bindet an die freien zu verknüpfenden DNA-Enden um sie vor Degradation zu schützen und um die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) zu rekrutieren. Die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) sowie Nukleasen wie Artemis sorgen durch Prozessierung der noch offenen DNA-Enden, das heißt durch Einbauen oder

Entfernen von P- und N-Nukleotiden, für weitere Diversität (Bassing, Swat et al. 2002). Im letzten Schritt werden die einzelnen Gensegmente durch Ligase IV verknüpft. Auch die kombinatorische Zusammenstellung verschiedener leichter und schwerer Ketten erhöht das Repertoire an verfügbaren Immunglobulinen (Tonegawa 1983).

Die naiven B-Zellen, die IgM und IgD als Antigenrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, verlassen nun das Knochenmark und zirkulieren in der Blutbahn. Sollten B-Zellen entstehen, die diese Oberflächenstrukturen nicht ausbilden, wird bei ihnen im Zuge der negativen Selektion die Apoptose eigenleitet, um Autoreaktivität zu vermeiden (Abb. 1).

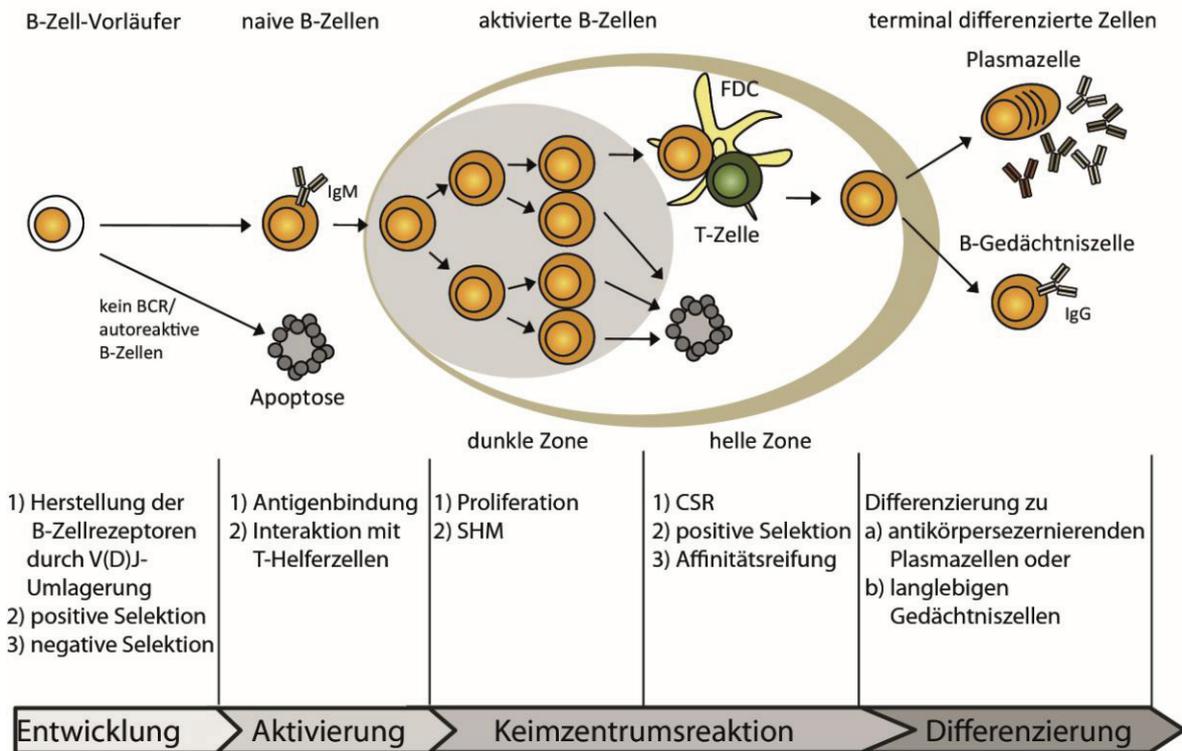
Für das Überleben der B-Zellen in der Peripherie bedarf es neben einer Induktion durch Antigenbindung auch einer Kostimulation durch T-Zellen (Parker 1993). Dabei können sich einige B-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen entwickeln und in den extrafollikulären Bereichen der sekundären Lymphorgane niedrigaffine Antikörper produzieren (MacLennan, Gulbranson-Judge et al. 1997).

Die B-Zellpopulation, die dagegen den Eintritt in die Lymphfollikel schafft, bildet Keimzentren aus (Liu, Zhang et al. 1991; Jacob und Kelsoe 1992; MacLennan 1994), wo zwei weitere Diversifikationsmechanismen stattfinden: somatische Hypermutation (SHM) und Klassenwechselrekombination (CSR, *class switch recombination*) (Abb. 1).

### 2.1.2 Die Keimzentrumsreaktion

Die Follikel in der Milz und den Lymphknoten, wo es zur Ausprägung der Keimzentren kommt, beherbergen neben den noch naiven B-Zellen und den T-Zellen auch follikuläre dendritische Zellen (FDC, *follicular dendritic cells*), die die B-Zellen mit zusätzlichen Überlebenssignalen versorgen (Kosco und Gray 1992).

Der direkte Kontakt zu den T-Zellen läuft auf zwei Ebenen ab. Zunächst präsentiert die B-Zelle ihr aufgenommenes und prozessiertes Antigen der T-Zelle, die bereits durch dasselbe Antigen aktiviert worden ist (Kosco, Monfalcone et al. 1988; Gray 1991). Daraufhin schüttet die T-Zelle den CD40-Liganden aus, der den CD40-Rezeptor auf der B-Zelloberfläche bindet und so der B-Zelle ein kostimulatorisches Signal vermittelt (Kelsoe 1995).



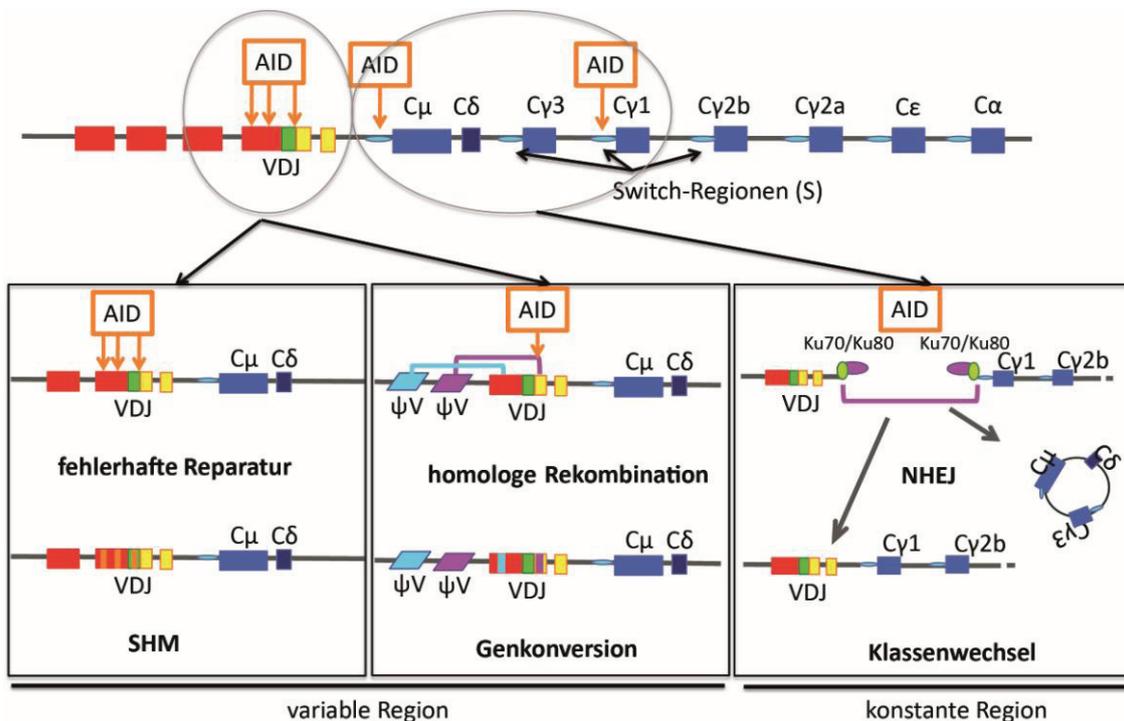
**Abbildung 1: Entwicklungsstadien der B-Zellen im Überblick (nach Küppers 2003)**

Schematische Darstellung von Differenzierungsstadien der B-Zellen nach Antigenbindung über T-Zell-abhängige Reifung im Keimzentrum bis zur terminalen Differenzierung zu langlebigen B-Gedächtniszellen oder Plasmazellen. BCR: B-Zellrezeptor, FDC: folliculäre dendritische Zelle; Ig: Immunglobulin; V: variable; D: diversity; J: joining; SHM: somatische Hypermutation; CSR: Klassenwechselrekombination.

In der sogenannten dunklen Zone der Keimzentren durchlaufen die reifen B-Zellen als Zentroblasten zunächst eine starke Zellteilung (Abb. 1). In dieser Phase läuft die SHM ab, ein Prozess, bei dem die durch V(D)J-Umlagerung gebildeten variablen Bereiche der Immunglobulingene durch zusätzliche Punktmutationen weiter modifiziert werden (Berek, Berger et al. 1991; Küppers, Zhao et al. 1993). SHM wird durch das B-Zell-spezifische Enzym Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase (AID) initiiert, welches spezifisch während der Keimzentrumreaktion induziert wird (Muramatsu, Sankaranand et al. 1999) (Abb. 1 und 2). Im weiteren Verlauf differenzieren Zentroblasten zu Zentrozyten, die sich durch langsamere Teilungsraten auszeichnen und sich nun in der hellen Zone der Keimzentren befinden (Liu, Zhang et al. 1991). Hier können die B-Zellen ihre Antikörper durch CSR mit anderen Effektor-Funktionen ausstatten (Liu, Grouard et al. 1996). Auch CSR-Prozesse werden von AID initiiert (Muramatsu, Kinoshita et al. 2000) (Abb. 1 und 2).

Ein Großteil der B-Zellen hat durch diese genetischen Veränderungen ihren Oberflächenrezeptor entweder verloren oder durch Mutationen die Affinität des Antikörpers eingebüßt und muss deswegen Apoptose einleiten (Liu, Joshua et al. 1989). Auch Selbst-Antigen erkennende B-Zellen werden in diesem Stadium durch Apoptose eliminiert (Kelsoe 1995). Die im Keimzentrum ansässigen sogenannten *tingible body* Makrophagen eliminieren diese Zellen (Hanayama, Tanaka et al. 2004).

Sowohl die FDC- und T-Zell-vermittelte Differenzierungssignale als auch der AID-abhängige genotoxische Stress während der Keimzentrumreaktion induzieren einen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*)-abhängigen Signalweg, der durch Inaktivierung von CRTC2 (Aktivator von CREB) zur weiteren B-Zelldifferenzierung führen kann (Sherman, Kuraishy et al. 2010). Die wenigen B-Zellen, die durch die zufällig gesetzten Mutationen im variablen Gensegment einen hochaffinen Antikörper ausbilden, werden nun positiv selektiert und verlassen das Keimzentrum entweder als langlebige terminal differenzierte Plasmazellen, die in eine Nische ins Knochenmark zurückwandern oder als B-Gedächtniszellen, die im Blut zirkulieren (Arpin, Dechanet et al. 1995; Hollowood und Goodlad 1998) (Abb. 1).



**Abbildung 2: Sekundäre Antikörperdiversifikationsmechanismen (nach Jungnickel 2006)**

Durch AID-bedingte Cytidin-Deaminierung kommt es in Ig-Loci zu DNA-Läsionen, die durch fehleranfällige Reparatur zur SHM in der variablen Region führen (links). Durch homologe Rekombination werden Pseudogensegmente in die umgelagerten und von AID geschädigten Stellen in der variablen Region eingeführt (Genkonversion, Mitte). In der konstanten Region des Ig-Locus kommt es durch nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ, *non-homologous end joining*) zum Klassenwechsel. Dabei entstehen neue Isotypen (hier IgG1) an den switch (s)-Regionen. Der Zwischenbereich der DNA wird als *switch circle* deletiert (rechts). AID: Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase; V: *variable*, D: *diversity*; J: *joining*; ψV: Pseudogene; Ku70/80: Schlüsselkomponente des NHEJ-Reparaturwegs.

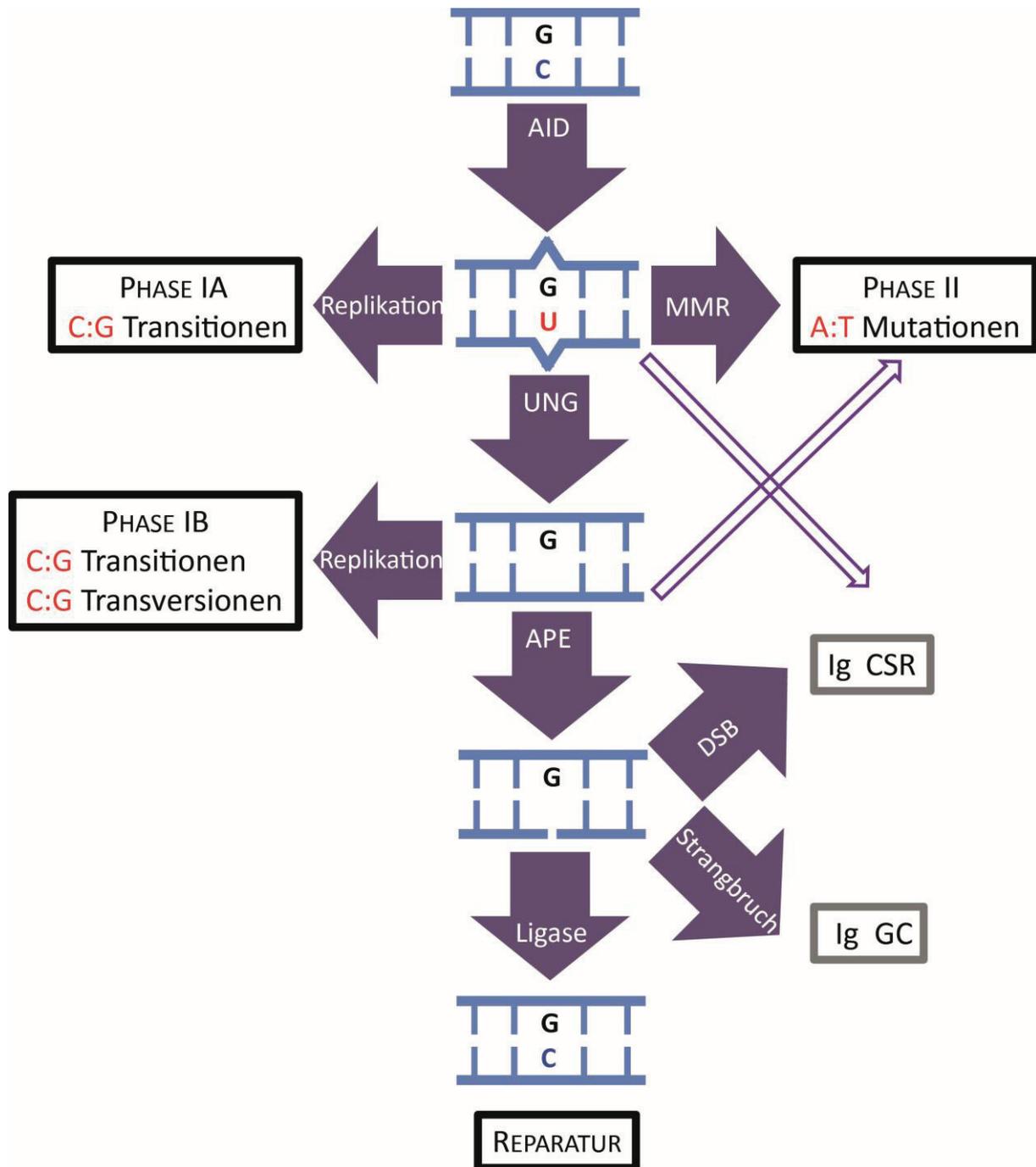
### 2.1.2.1 Somatische Hypermutation

Ein entscheidender Schritt bei der Affinitätsreifung der Antikörper im Keimzentrum ist die SHM in den umgeordneten V-Regionen der Immunglobulingene. Auf Grund sich anschließender Selektionsprozesse kann die genaue Mutationsrate *in vivo* nicht ermittelt werden, Schätzungen zu Folge liegt diese aber bei etwa  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  Mutationen/Basenpaar/Generation. Dieser Wert ist millionenfach höher als die spontane Mutationsrate im menschlichen Genom (McKean, Huppi et al. 1984; Rajewsky 1996). Eine Anhäufung der AID-induzierten Mutationen findet sich in einem circa zwei Kilobasenpaar langen stromabwärts vom  $V_H$ -Promotor gelegenen Abschnitt (Lebecque und Gearhart 1990), wobei dort insbesondere sogenannte DGYW-Hotspot-Motive (D = A/G/T, Y = C/T, W = A/T) Sequenzveränderungen, darunter hauptsächlich Transitionen, aufweisen (Rogozin and Kolchanov 1992; Betz, Neuberger et al. 1993). Neben Punktmutationen können seltener allerdings auch Deletionen, Duplikationen und Insertionen auftreten (Wilson, Liu et al. 1998). Die V-Gensequenz selbst ist nicht entscheidend für den Mutationsprozess, da beim Austausch dieser Sequenzen dennoch Mutagenese stattfindet (Yelamos, Klix et al. 1995). Es ist vielmehr die Transkription der Zielgene, die die SHM ermöglicht. Dabei greift AID den Einzelstrangbereich in der geöffneten DNA an (Peled, Kuang et al. 2008), wobei beide Stränge mit gleicher Frequenz verändert werden (Basu, Meng et al. 2011). Eine entsprechende Korrelation der Transkriptionsrate und der Mutationsfrequenz wurde nachgewiesen (Peters und Storb 1996; Fukita, Jacobs et al. 1998; Bachl, Carlson et al. 2001). DNA-Läsionen in anderen transkribierten Genen, wie *bcl-6*, *c-myc* und *fas* wurden ebenfalls gezeigt (Shen, Peters et al. 1998; Müschen, Re et al. 2000; Liu, Duke et al. 2008). Der genaue Mechanismus der AID-Bindung an Zielgene während der Keimzentrumsreaktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt, wobei jedoch in jüngster Zeit vermehrt Hinweise aufkommen, dass AID durch die Interaktion mit dem Elongationsfaktor Spt5 (*Suppressor of Ty*) an angehaltene RNA-Polymerase II in Ig- und nicht-Ig-Loci rekrutiert wird und so in der Lage ist, DNA-Schäden zu erzeugen (Canugovi, Samaranayake et al. 2009; Pavri, Gazumyan et al. 2010).

## 2.2 Reparatur der AID-induzierten DNA-Schäden

Die auf Grund von AID-vermittelter Deaminierung von Cytosin zu Uracil entstehenden DNA-Läsionen in den Immunglobulinloci können auf zahlreichen Wegen repariert werden. Dabei nutzt die Zelle Reparaturwege, mit denen sie auch DNA-Läsionen beseitigt, die durch mutagene Chemikalien sowie durch Umweltfaktoren wie UV oder radioaktive Strahlung entstehen (Lindahl 1993). Unsere DNA wird aber auch mit endogenen Gefahren, die vom Zellstoffwechsel ausgehen, konfrontiert; hier kann es durch die spontane Bildung von hochreaktiven Metaboliten zur Läsionen kommen (Hoeijmakers 2001). Die Art des DNA-Schadens und die Zellzyklusphase entscheiden, welcher Reparaturweg aus der Vielzahl der verfügbaren Mechanismen eingeleitet wird, um die genetische Integrität aufrecht zu erhalten. Diese Reparaturmechanismen sind in einem hochregulierten Netzwerk (DDR, *DNA damage response network*) organisiert, welches auch weitere lebenswichtige Prozesse wie Zellzyklus, Zellteilung und auch Zelltod koordiniert (Hoeijmakers 2007; Rai, Peng et al. 2007; Friedberg 2008).

Viele der zur Verfügung stehenden Reparaturmechanismen werden von der Zelle auch zur Reparatur AID-induzierter Schäden rekrutiert. Diese werden in Abbildung 3 im sogenannten Neuberger-Modell dargestellt (Di Noia und Neuberger 2007). Die Läsionen können aber auch ohne die Induktion von Reparaturmechanismen prozessiert werden, zum Beispiel ist dies während der Replikation in der Phase IA der Fall. Hier wird das durch AID entstandene Uracil als Thymin erkannt und mit Adenin gepaart. Die dU:dG Fehlpaarung kann dann zur Entstehung von Transitionsmutationen führen. Alternativ kann die Fehlpaarung durch die MSH2/6-Proteine der *mismatch*-Reparatur (MMR) erkannt werden (Phase II). Es folgt die Exzision eines größeren Abschnitts um die betroffene DNA-Stelle durch die Exonuklease I und anschließend die Resynthese überwiegend durch Polymerase  $\eta$ , wodurch bevorzugt Mutationen an A und T Basen eingeführt werden (Kolodner und Marsischky 1999; Harfe und Jinks-Robertson 2000; Delbos, Aoufouchi et al. 2007). Wenn aber das Uracil an der dG:dU Fehlpaarung durch die *Uracil-DNA glycosylase* (UNG) entfernt wird (Phase IB), entsteht zunächst eine abasische Stelle, die im nächsten Schritt durch AP Endonuklease (APE) zu einem Einzelstrangbruch (SSB, *single strand break*) prozessiert wird.



**Abbildung 3: Modell der einzelnen Reparaturphasen nach der AID-bedingten Cytidin-Deaminierung der DNA (nach Di Noia und Neuberger 2007)**

Die Prozessierung der G:U Fehlpaarung in der DNA kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen. In der Phase IA kann es zu C:G Transitionen kommen, wenn während der Replikation U mit A gepaart wird. Durch MMR kann es in der Phase II zu A:T Mutationen kommen, da die TLS-Pol  $\eta$  auf unbeschädigter DNA-Sequenz zu Fehlern an A- und T-Basen neigt. Alternativ kann durch Uracil-N-Glykosylase (UNG) eine abasische Stelle entstehen, die bei Replikation in der Phase IB zu Transitionen und Transversionen führen kann. Wenn an der abasischen Stelle durch APE ein Einzelstrangbruch generiert wird, kann die Läsion durch Basenexzisionsreparatur fehlerfrei repariert werden. Die Strangbrüche können aber auch zu Ig Genkonversion (GC) und CSR führen. AID: Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase; APE: Apurinische/apyrimidinische Endonuklease; MMR: *mismatch*-Reparatur; Ig: Immunglobulin; CSR: Klassenwechselrekombination; IgV: Variable Region des Immunglobulins; TLS: Transläsionssynthese.

Sogenannte Transläsions-Polymerasen wie Rev1 und Pol  $\theta$  replizieren direkt über die abasischen Stellen und führen so sowohl zu Transitionen als auch zu Transversionen (Diaz, Flajnik et al. 2001; Jansen, Langerak et al. 2006; Di Noia und Neuberger 2007; Martomo, Saribasak et al. 2008). UNG und APE sind Komponenten der Basenexzisionsreparatur; dieser Reparaturweg ist in der Lage, DNA-Methylierung oder spontane DNA-Veränderungen wie Basenoxidationen durch reaktive Sauerstoffspezies fehlerfrei zu reparieren.

Sollte es im Zuge der AID-Aktivität zu Einzelstrangbrüchen auf beiden Seiten der DNA-Doppelhelix kommen, kann dies zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen (DSB, *double strand breaks*) führen. Diese werden durch einen Mechanismus der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) repariert, wobei hier zwei Wege möglich sind: nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ, *non-homologous end joining*) und homologe Rekombination (HR). Wie aus den Bezeichnungen ersichtlich, werden beim NHEJ keine homologe DNA-Bereiche benötigt, während bei der HR ein homologer Bereich (z.B. Schwesterchromatid) zur Reparatur herangezogen wird.

Wenn eine DNA-Läsion nicht vor oder während der Replikation über die oben beschriebenen Wege repariert wurde, führt dies zum Zellzyklusarrest. So gewinnt die Zelle Zeit für die Reparatur beschriebener DNA-Schäden. Sollte die Menge an DNA-Läsionen sehr groß sein oder der Zellzyklusarrest zu lange dauern, wird Apoptose eingeleitet. Um diese zu umgehen, hat die Zelle eine weitere Möglichkeit zu überleben, indem sie sich der postreplikativen Reparatur (PRR) unterzieht. Dieser Weg wird auch als *DNA damage tolerance mechanism* bezeichnet und gibt der Zelle eine Chance sich trotz des Schadens zu replizieren (Broomfield, Hryciw et al. 2001), wobei in Kauf genommen werden muss, dass dabei Mutationen entstehen können.

Der Rad6-Weg (Jentsch, McGrath et al. 1987) organisiert die postreplikative Reparatur, indem er das ringförmige PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), das auch als Bindeplattform fungiert, auf zwei verschiedene Arten kovalent modifiziert. Zunächst kann PCNA durch Rad6/Rad18 an Lysin 164 (K164) monoubiquitiniert werden, was fehlerhafte Polymerasen rekrutiert und eine Transläsionssynthese (TLS) über den geschädigten DNA-Bereich einleitet. Wird PCNA allerdings durch die Ligase Rad5 polyubiquitiniert (K63-Verknüpfung der Ubiquitin-(Ub)-Moleküle in der Kette), wird eine fehlerfreie Umgehung durch Homologie-vermittelten Wechsel zum Schwesterchromatid ermöglicht (Gangavarapu, Prakash et al. 2007).

Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist ein Mechanismus, der im Gegensatz zu den oben beschriebenen Reparaturwegen nicht an der Beseitigung AID-induzierter DNA-Modifikationen beteiligt ist, dennoch kurz erläutert werden soll, da er in der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielt. Hierdurch werden größere DNA-Schädigungen repariert, die mehrere Basen betreffen und bisweilen zu DNA-Konformationsänderungen führen. Im Gegensatz zu BER wird hier ein größeres DNA-Fragment um die geschädigte Stelle entfernt und wieder ersetzt. Die Erkennung von DNA-Schädigungen übernehmen Proteine der XP (*xeroderma pigmentosum*)-Familie (Sancar 1996; Costa, Pinto et al. 2007). Dazu zählen Helikasen, die im Abstand von circa 30 Basenpaare zur Schadensstelle die DNA öffnen und Endonukleasen, die diesen Bereich auf dem geschädigten Strang entfernen. Während der unbeschädigte Strang durch Replikationsprotein A (RPA) stabilisiert wird, füllt die normale Replikationsmaschinerie die Lücke auf (Wood, Araujo et al. 2000).

Alle beschriebenen Reparaturmechanismen sind enorm wichtig für das Überleben des Organismus, der täglich mit schädlichen Einflüssen aus seiner Umwelt und toxischen Nebenprodukten aus seinem Stoffwechsel konfrontiert wird. Eine Vielzahl an Krankheiten und Krebsformen ist bekannt, die auf Defekte in der globalen DNA-Reparatur zurück zu führen sind. Wenn es zu zur Dysregulation von AID-Aktivität oder zu Abweichungen im Reparaturverlauf bei den AID-induzierten Läsionen kommt, kann es ebenfalls zu Entstehung von B-Zelllymphomen und -Leukämien kommen (Klemm, Duy et al. 2009).

### 2.2.1 Entstehung von B-Zelllymphomen

Die meisten B-Zelllymphome stammen aus dem Keimzentrum, wobei auch aus vorhergehenden Entwicklungsstadien der B-Zellen Neoplasien entstehen können. Eine Abstammungszuordnung kann auf zweierlei Wegen durchgeführt werden. Zum einen können Expressionsanalysen der Keimzentrum-charakteristischen Oberflächenrezeptoren wie z.B. CD77 oder des Gesamtgenoms Aufschluss über die Herkunft geben, denn eine Lymphomzelle trägt oft Merkmale des Differenzierungsstadiums, in dem sie entstanden ist (Küppers und Dalla-Favera 2001).

Zum anderen sind Sequenzierungstests dazu geeignet, den Status der V-Genmutationen zu bestimmen, was ebenfalls ein Marker für Keimzentrums-B-Zellen und ihre Nachkommen ist (Cleary, Meeker et al. 1986; Küppers, Rajewsky et al. 1997).

Die beschriebenen aus dem Keimzentrum abstammende Lymphome lassen sich in Non-Hodgkin-Lymphome [Diffuse Groß-Zelllymphome (DLCL), Burkitt-Lymphome (BL), Follikuläre Lymphome (FL)] und Hodgkin-Lymphome unterteilen (Küppers 2005).

Die entarteten Zellen können auch Mutationen in nicht-Ig-Genen aufweisen, wie Studien zu entarteter SHM in 5'-Promotorregionen von *c-myc*- und *Pax5*-Genen in DLCL zeigen (Pasqualucci, Neumeister et al. 2001). AID scheint aber auch in gesunden Zellen genomweite Läsionen einzuführen, die aber weitgehend fehlerfrei repariert werden, wie die im *c-myc*-Gen (Liu, Duke et al. 2008). Gene wie *bcl-6* hingegen häufen Mutationen an, weil hier eine unzureichende oder fehlerhafte Reparatur greift.

B-Zelllymphome zeichnen sich durch konstitutive AID-Expression und der damit einhergehenden ständigen SHM aus, ferner kommt es zur fehlgeleiteten Regulation von Onkogenen, welche durch Translokationen in den Ig-Locus kamen und dadurch unter Kontrolle von Ig-Promotoren gelangten (Blum, Lozanski et al. 2004).

Um den Mechanismus der Entstehung solcher Neoplasien zu begreifen und auch klinisch relevante Erkenntnisse zur AID-Funktionsweise zu gewinnen, ist die Erforschung der Regulationsmechanismen von AID von großer Bedeutung. Wie gefährlich AID für den Organismus sein kann, zeigte eine Studie in Mäusen, in denen eine AID-Überexpression zu T-Zelltumoren und frühem Tod führte (Okazaki, Hiai et al. 2003).

### 2.3 Regulation von AID

Seit der Entdeckung von AID Ende der Neunziger Jahre (Muramatsu, Sankaranand et al. 1999) wurden diverse Regulationsmechanismen auf mehreren Ebenen beschrieben. Die erste Ebene besteht aus Transkriptionskontrolle der mRNA (Crouch, Li et al. 2007), die Stabilität und/oder Translation der mRNA können anschließend auf der miRNA-Ebene kontrolliert werden (Kluiver, van den Berg et al. 2007). Es folgt die posttranslationale Kontrolle, die AID-Proteinmodifikationen, seine subzelluläre Lokalisation und Proteinstabilität umfasst. Neben Studien zu fehlerhafter Regulation von AID in Zelllinien und Mäusen finden sich viele Publikationen über gestörte Immunantwort in Menschen mit AID-Mutationen (Hyper-IgM-Syndrom II), die ebenfalls zur entarteten AID-Funktionen führen und somit eine korrekte Immunantwort erschweren bzw. unmöglich machen (Durandy, Revy et al. 2005; Imai, Zhu et al. 2005).

### 2.3.1 Transkriptionelle Regulation von AID

Ein positiver Regulator der AID-Expression ist das *lineage*-spezifische Protein E2A, welches zur E-Proteinfamilie der Transkriptionsfaktoren (TF) gehört. Dieses kommt in den zwei Splice-Formen E47 und E12 vor, wobei die E47-Variante die stärkeren Effekte auf AID-Transkription durch direkte Bindung an die konservierte E-Box in den Intronbereichen des AID-Locus, die als regulatorische Elemente bezeichnet werden, zeigt (Sayegh, Quong et al. 2003). Ähnlich wie E2A wird auch der HoxC4-Transkriptionsfaktor bei der Aktivierung der B-Zellen in den Zellkern transferiert, wo er seine spezifische Zielsequenz am AID-Promotor bindet und die AID-Expression initiiert (Park, Zan et al. 2009).

Ein weiterer Faktor, der an die 5'-Promotorregion von AID binden kann, ist Pax5. Dieser Regulator ist in der Lage, einen verstärkten Klassenwechsel durch Aktivierung der AID-Expression auszulösen (Gonda, Sugai et al. 2003). Die Aktivierung von B-Zellen führt ebenfalls zur nukleären Translokation von STAT-6 und NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren, die dort durch direkte Bindung an die regulatorischen Elemente die AID-Transkription aktivieren (Dedeoglu, Horwitz et al. 2004).

Es gibt aber auch Hemmmechanismen der AID-Transkription, wobei der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg eine Schlüsselrolle einnimmt (Omori und Rickert 2007). Diese Kinase wird durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert (z.B. bei BCR-Aktivierung) und initiiert eine Signalkaskade, die zunächst den Transkriptionsfaktor Blimp1 induziert, der seinerseits AID-Regulatoren (z.B. Pax5) und die für die Ausbildung der Keimzentren essentielle Faktoren wie Bcl-6 hemmt. Diese transkriptionelle Hemmung von AID führt zur Hemmung der CSR. Wie Studien an Mäusen zeigen, die defizient in einer katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase sind, ist PI3K unentbehrlich für das adaptive Immunsystem, denn diese Tiere sind nicht in der Lage Keimzentren auszubilden und zeigen gravierende Defekte in der B-Zelldifferenzierung (Jou, Carpino et al. 2002).

Eine hormonelle Regulation der AID-mRNA ist ebenfalls möglich. Der AID-Locus besitzt Östrogenrezeptorbindestellen in der Promotorregion, dort kann der Ligand/Rezeptor-Komplex nach der Translokation in den Zellkern binden und die AID-Expression aktivieren (Pauklin, Sernandez et al. 2009). Diese Regulationsmöglichkeit von Immunantworten durch das weibliche Geschlechtshormon Östrogen kann Einsichten in die stärkere Anfälligkeit der weiblichen Population für bestimmten Krebsarten und Autoimmunerkrankungen liefern (Karpuzoglu und Zouali 2011).

Zusammengenommen deutet die Fülle an negativen und positiven Regulatoren von AID-mRNA-Mengen auf ein komplexes Netzwerk der Expressionskontrolle und verdeutlicht somit die Bedeutung der AID-Regulation für die Zelle (Stavnezer 2011).

### 2.3.2 Regulation der AID-Aktivität durch microRNA

Durch den Mechanismus der microRNA-mRNA-Bindung findet eine Feineinstellung der AID-Expression und somit der AID-Aktivität durch einzelsträngige 20-23 nt lange nichtkodierende microRNAs statt.

Die microRNA-155 (miR-155) Moleküle werden in normalen Keimzentren produziert, fehlen aber in BL-Zelllinien, die sich durch eine c-myc:IgH-Translokation auszeichnen (Kluiver, van den Berg et al. 2007; Dorsett, McBride et al. 2008). MiR-155-negative Mäuse zeigen eine erhöhte AID-Expression und neigen ebenfalls zu Translokationen.

MiR-181b kann ebenfalls die mRNA- und Proteinmengen von AID senken, sodass die Rate des Klassenwechsels reduziert wird. Die miR-181b unterscheidet sich von miR-155 dadurch, dass sie nicht in den Zellen des Keimzentrums vorhanden ist (de Yebenes, Belver et al. 2008). Hier stellen die Autoren die Hypothese auf, dass miRNA-181b in früheren B-Zell-Entwicklungsstufen wirkt und somit eine vorzeitige AID-Aktivität unterbindet, während miR-155 später im Keimzentrum unerwünschte AID-Aktivität (z.B. Translokationen) hemmt, während CSR und SHM normal ablaufen sollen.

### 2.3.3 Posttranslationale Regulation von AID

Fünf Phosphorylierungstellen im AID-Protein sind bekannt (Basu, Chaudhuri et al. 2005; Stavnezer 2011). Davon werden die zwei Aminosäurereste Threonin27 (T27) und Serin38 (S38) durch die Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert (Pasqualucci, Kitaura et al. 2006). Es wurde beschrieben, dass das so modifizierte AID-Protein verstärkt an Chromatin bindet (McBride, Gazumyan et al. 2006). Die PKA-Phosphorylierung von AID läuft im Zellkern ab (Vuong, Lee et al. 2009) und führt zur Bindung von phosphoryliertem AID an Replikationsprotein A (RPA), welches seinerseits mit einzelsträngiger DNA assoziiert. Dieser Vorgang ermöglicht die Zielführung von AID an DNA und induziert CSR und SHM (Chaudhuri, Khuong et al. 2004; Cheng, Vuong et al. 2009). Neben diesem Aktivierungsweg gibt es Hinweise auf negative Regulation von AID durch Phosphorylierung am S3. Allerdings wird hierbei nicht die Proteinmenge von AID *per se* reduziert, sondern die Bindungsstärke von AID an die IgH-S $\mu$ -Region geschwächt (Gazumyan, Timachova et al. 2011).

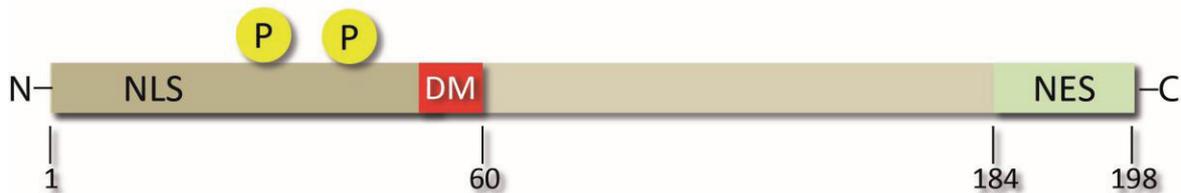
### 2.3.3.1 Die subzelluläre Verteilung von AID steuert den AID-Abbau

Das AID-Protein ist circa 24 kDa groß und damit klein genug, um ungehindert durch die Poren der Kernmembran in den Zellkern zu gelangen, da Proteine bis zu einem Gewicht von etwa 60 kDa die Kernporen passiv passieren können. Größere Proteine bedürfen dagegen einer Transportmaschinerie. Das Wildtyp (WT)-AID sammelt sich unter normalen Bedingungen jedoch vorwiegend im Cytoplasma an, was auf cytosolische Retention von AID in B-Zellen schließen lässt. Hierzu wurde eine umfassende Studie an zahlreichen AID-Mutanten durchgeführt, die zeigt, dass am C-Terminus des Proteins Bindestellen für Faktoren liegen müssen, die das Zurückbleiben von AID im Cytosol bewirken könnten (Patenaude, Orthwein et al. 2009).

Sequenz- und Strukturanalysen von AID ergaben eine nukleäre Exportsequenz (NES) und nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die es dem Protein ermöglichen, ständig zwischen Cytoplasma und Zellkern zu pendeln (Ito, Nagaoka et al. 2004; Bennett, Diner et al. 2006). Da eine ständige Bewegung von AID über die Kernmembranporen besteht, könnte man annehmen, dass neben der Retention auch aktive Transportmechanismen für die asymmetrische AID-Verteilung verantwortlich sein könnten. Wie in Abbildung 4 dargestellt, ist die Leucinreiche NES am C-Terminus von AID zu finden und umfasst in etwa die letzten 14 Aminosäuren des Proteins. In diesem Bereich befindet sich die Bindestelle für das Exportin 1 (CRM1), das die Translokation von AID aus dem Kern ins Cytoplasma steuert (McBride, Barreto et al. 2004; Geisberger, Rada et al. 2009). Wir und andere konnten zeigen, dass das AID-Protein durch die Deletion dieses Bereiches oder Mutationen in der NES den Kern nicht mehr verlassen kann (Barreto, Reina-San-Martin et al. 2003; Ito, Nagaoka et al. 2004; Aoufouchi, Faili et al. 2008). Interessanterweise ist dieser Bereich auch für CSR verantwortlich, SHM hingegen kann durch die NES-Mutanten ohne Weiteres induziert werden (Barreto, Reina-San-Martin et al. 2003).

Bei der NLS handelt es sich um eine untypische Domäne am aminoterminalen Ende (insbesondere der Bereich zwischen den Aminosäuren 19-57), die erst durch die richtig gefaltete Struktur des Proteins wirken kann (Patenaude, Orthwein et al. 2009). Dieser Bereich ist reich an basischen, positiv geladenen Aminosäurenresten (Di Noia und Neuberger 2007). In diesem Abschnitt können Importine binden und den Transport über die Kernmembran in den Zellkern bewirken (Patenaude, Orthwein et al. 2009). Die Bindung des RNA-Splicing-Proteins CTNNBL1 an diese Sequenz ist auch bekannt und die Beteiligung von

CTNNB1 am Import von AID in den Zellkern wird diskutiert; diese Funktion kann eventuell auch von anderen Faktoren ausgeführt werden (Ganesh, Adam et al. 2011). Ein möglicher Kandidat für den AID-Import ist das Keimzentrum-spezifische Protein GANP, welches auch an der Rekrutierung von AID an die DNA beteiligt sein soll (Maeda, Singh et al. 2010).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der AID-Proteinstruktur und seiner funktionellen Domänen (nach Di Noia & Neuberger 2007)**

Das AID Protein umfasst 198 Aminosäuren. In den ersten 60 Aminosäuren des Proteins befindet sich die NLS; Mutationen in diesem Bereich beeinträchtigen stark die SHM. Die letzten 14 Aminosäuren enthalten die NES und sind entscheidend für den Klassenwechsel. Im Deaminase-Motiv (rote Box) befinden sich Aminosäuren (Histidin 56 und Glutamat 58), die für die Zinkkoordinierung im katalytischen Zentrum von AID zuständig sind. Die Zahlen geben die Aminosäure-Position an; gelbe Kreise: Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A (PKA); N: aminoterminal Ende, C: carboxyterminal Ende des Proteins; NLS: nukleäre Lokalisationssequenz; DM: Deaminase-Motiv; NES: nukleäre Exportsequenz; SHM: somatische Hypermutation; CSR: Klassenwechselrekombination. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Die subzelluläre Verteilung von AID wirkt sich direkt auf seine Proteinstabilität aus. Die Halbwertszeit des AID-Proteins im Cytoplasma beträgt circa 10-12 Stunden (Eder 2007), wohingegen das nukleäre AID sehr instabil ist. Aoufouchi et al., konnten zeigen, dass im Zellkern von sowohl Maus-B-Zellen als auch in B-Zelllinien eine starke Polyubiquitinierung von AID stattfindet, die zum proteasomalen Abbau führt. In welchem zellulären Kompartiment diese Degradation stattfindet, ist bislang unklar. Kürzlich wurde auch eine Polyubiquitinierung von AID im Cytoplasma beschrieben, die durch Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) reduziert werden kann (Orthwein, Patenaude et al. 2010). Der Abbau der nukleären AID-Fraktion ist der stärkere und schnellere Mechanismus, der als eine weitere posttranslationale Kontrollmöglichkeit der AID-Funktion und vor allem der unerwünschten AID-bedingten DNA-Schäden in Frage kommt (Aoufouchi, Faili et al. 2008).

Die beschriebene subzelluläre Verteilung von AID und ihre Auswirkung auf die Proteinstabilität in den einzelnen Zellkompartimenten ist nicht B-Zell-spezifisch, denn wir und andere konnten ähnliche Ergebnisse in HEK293- und Hela-Zellen erzielen (Bennett, Diner et al. 2006; Aoufouchi, Faili et al. 2008).

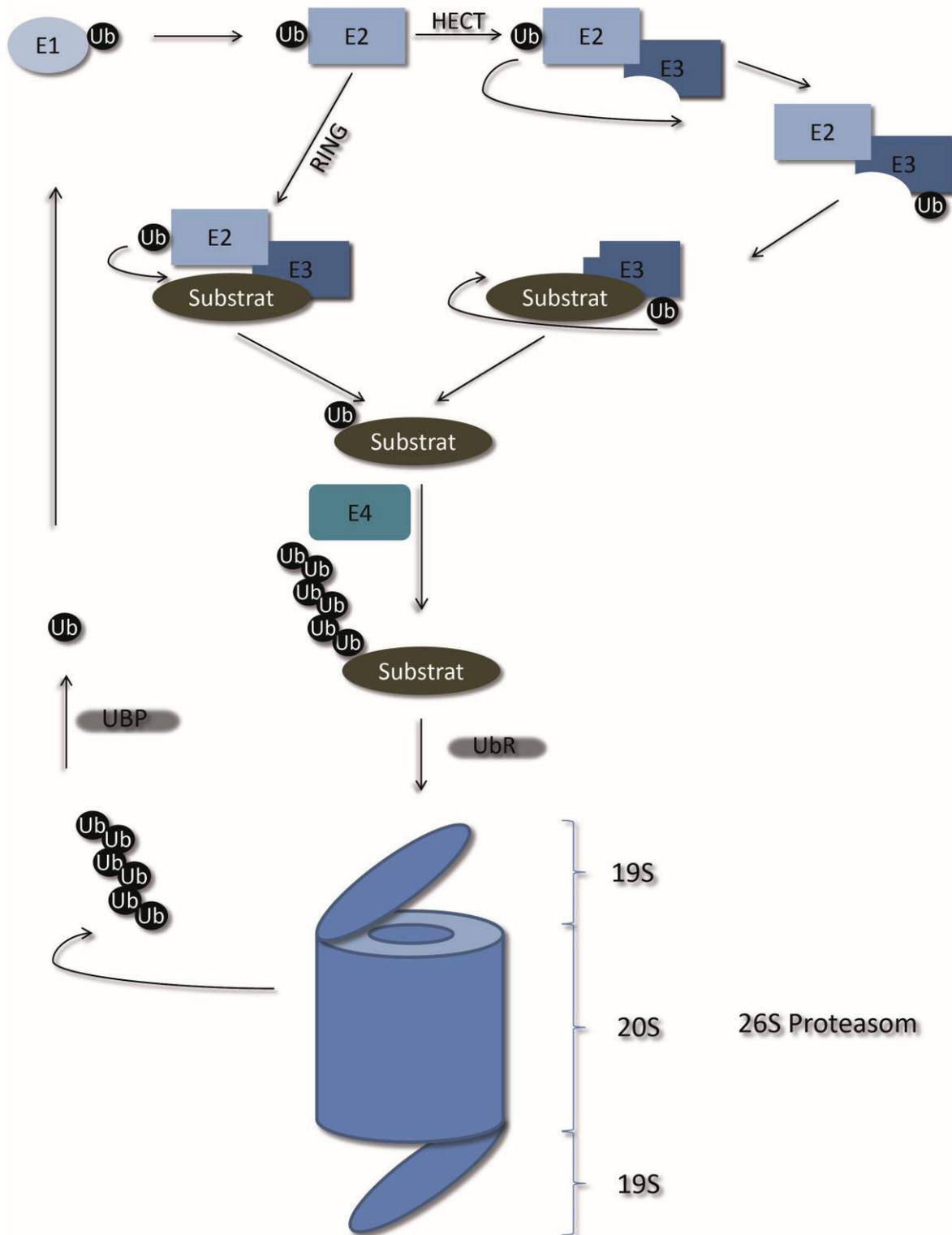
## 2.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Ubiquitinierung ist eine kovalente reversible posttranslationale Proteinmodifikation an Lysinresten, die nahezu alle biologischen Vorgänge der Zelle beeinflusst. Neben Degradation kann Ubiquitinierung auch DNA-Reparatur, den Zellzyklus, Proteintransport und diverse Signalkaskaden regulieren (Mukhopadhyay und Riezman 2007). Neben der Bindung von Ubiquitin (Ub)-Molekülen geben auch die Anzahl dieser Moleküle und die Art ihrer Verknüpfung in den Polyubiquitinketten das Signal für das weitere Schicksal des modifizierten Proteins.

Man unterscheidet zwischen Mono- (nur ein Ub-Molekül gebunden), Multi- (mehrere einzelne Ub-Moleküle an verschiedenen Lysinen eines Proteins gebunden) und Polyubiquitinierung (Ubiquitinketten an einem oder mehreren Lysinresten gebunden), wobei für das letztere mindestens vier Ub-Moleküle benötigt werden (Thrower, Hoffman et al. 2000). Das 8 kDa große Ub kann schrittweise in der Kette entweder am Lysin 48 (K48) oder 63 (K63) verknüpft werden. Während der K63-Modifikation regulierende Eigenschaften zugesprochen werden, werden Proteine mit K48-Polyubiquitinketten für den proteasomalen Abbau markiert (Pickart und Fushman 2004).

Das Proteasom ist ein hochkonservierter zylinderförmiger 26S-Proteinkomplex, welcher sich aus dem proteolytisch aktiven 20S-Kernkomplex und zwei regulatorischen 19S-Komplexen (auch „cap“ bezeichnet) zusammensetzt (Abb. 5). Der 20S-Kernkomplex weist eine Hydrolasefunktion auf, die *cap*-Struktur ist für die Erkennung, Bindung, Entfaltung und Einschleusung der Proteine zuständig (Glickman, Rubin et al. 1998). Die Proteolyse ist ATP-abhängig (Etlinger und Goldberg 1977).

Auf biochemischer Ebene läuft die ATP-abhängige Ubiquitinmarkierung des abzubauenen Proteins für das konventionelle Proteasom folgendermaßen ab (Abb. 5). Das Ub-aktivierende Enzym E1 bindet unter ATP-Verbrauch ein Ub-Molekül und überträgt dieses an das Ub-konjugierende Enzym E2, welches wiederum die Weitergabe des Ub-Moleküls an die E3-Ligase bewirkt, wenn es sich um eine HECT-Ligase handelt (Kostova und Wolf 2003). Die E3-Ligase kann neben dem Ub auch spezifisch das Substrat binden und führt die Kopplung von Ub am Protein durch (Ciechanover und Gonen 1990). Bei RING-Ligasen erfolgt die E3-abhängige Ubiquitinierung des Substrats im Komplex mit E2-Ligasen.



**Abbildung 5: Ein Modell des konstitutiven Ubiquitin-Proteasom-Systems (nach Kostova & Wolf 2003)**

Ein Ub-Molekül wird zunächst unter ATP-Verbrauch an das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 kovalent gekoppelt, um dann an das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) gebunden zu werden. Wenn anschließend eine RING-haltige E3-Ligase an den E2-Ub-Komplex bindet, findet eine direkte Übertragung des Ub-Moleküls an das abzubauenende Substrat statt. Bei E3-Ligasen mit einer HECT-Domäne läuft die Übertragung von Ub an das Substrat über einen Zwischenschritt der Ub-Kopplung an die E3-Ligase ab. Das monoubiquitinierte Substrat wird entweder direkt durch E3-Ligasen oder unter Einsatz von E4-Faktoren polyubiquitiniert, von Ubiquitinrezeptoren der 19S-Untereinheit erkannt, gebunden und in entfalteter Form dem Proteasom zugeführt. Die Polyubiquitinkette wird anschließend durch USP (Ubiquitin-spezifische Protease) in einzelne Ub-Moleküle zerlegt und dem Kreislauf wieder zugeführt. Ub: Ubiquitin, UbR: Ubiquitinrezeptor; HECT: *homologous to E6-AP carboxyterminus* und RING: *really interesting new gene*: unterschiedliche Domänen der E3-Ligasen.

Die 19S-Struktur des Proteasoms besitzt eine Reihe an ATPasen und Rezeptoren, die das Ub-Signal erkennen (Lam, Lawson et al. 2002; Deshaies und Joazeiro 2009), die Ub-Ketten entfernen, da diese vom Proteasom nicht abgebaut werden können (Verma, Aravind et al. 2002), und schließlich die entfaltete Peptidkette in die 20S-Proteasomeinheit einschleusen (Kohler, Cascio et al. 2001). Die Polyubiquitin-Kette wird danach durch Ub-spezifische Proteasen (USP) in einzelne Ub-Moleküle zerlegt und wiederverwertet (Love, Catic et al. 2007).

In Säugern findet man konstitutive und konditionelle Proteasomen. Letztere sind ein fester Bestandteil des adaptiven Immunsystems und sind auch als Immunoproteasomen bekannt. Ihre Bildung wird bei Infektionsreaktionen durch Ausschüttung von Cytokinen induziert (Wang und Maldonado 2006). Ihre Aufgabe ist es, die Fremddantigene in präsentierbare Peptide zu zerkleinern und so die Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APC) auf ihren MHC-Molekülen zu ermöglichen.

Konventionelle Proteasome befinden sich sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma der Zellen (Peters, Franke et al. 1994), wobei die Ubiquitinierung und der anschließende Abbau des gegebenen Substrats in verschiedenen Zellkompartimenten stattfinden können (Groulx und Lee 2002).

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die nützliche Funktion von AID bei der Antikörperreifung birgt auch ein potentielles Risiko, da eine entartete Aktivität von AID zu genomweiten DNA-Veränderungen führen kann und somit eine gesundheitliche Gefahr darstellt. Viele B-Zelltumore entstehen auf Grund von fehlgeleiteter AID-Aktivität bei der Keimzentrumsreaktion. Deshalb ist ein Beitrag zum Verständnis der Regulationsmechanismen von AID von großer Bedeutung.

Um die Wechselwirkungen zwischen AID-Proteinstabilität und -Lokalisation zu analysieren, sollte zunächst die Halbwertszeit verschiedener AID-GFP Fusionsproteine im Cytoplasma und im Zellkern vergleichend ermittelt werden. Davon ausgehend sollten kinetische AID-Abbaustudien in verschiedenen Zellsystemen im Durchflusszytometer durchgeführt werden, um die für BL2-Zelllinie gezeigte spezifische AID-Degradation im Zellkern (Aoufouchi, Faili et al. 2008) auch in unseren genetischen Systemen zu bestätigen und näher analysieren zu können.

Interessant war die Fragestellung, ob die AID-Aktivität auch eine Auswirkung auf den Proteinabbau im Zellkern hatte. Hierzu schien der Vergleich im Abbauverhalten von diversen AID-Mutanten zum WT-AID im konfokalen Mikroskop und FACS als geeignet, um diesen Zusammenhang zu beleuchten. Zusätzlich sollte durch DNA-schädigende Substanzen die AID-Aktivität simuliert werden, um durch einen anderen experimentellen Ansatz den Einfluss der AID-Funktion auf den nukleären AID-Abbau zu studieren.

Eine weiterführende Lebendzellmikroskopie-Analyse der AID-Anreicherung an Stellen der geschädigten DNA in Hela-Zellen hatte das Ziel, erste Aufschlüsse über den Mechanismus des bei DNA-Schädigung beobachteten Akkumulationsverhaltens von AID im Zellkern zu geben. Anschließend sollte durch Immunpräzipitations-Experimente untersucht werden, welcher Schritt im UPS für die Abbauphemmung von AID bei DNA-Läsionen in Frage kam.

Die Erkenntnisse aus diesen Studien können als Ausgangspunkt für spätere Analysen der Signaltransduktionswege dienen, die das komplexe Netzwerk aus AID-Aktivität,-Lokalisation und -Proteinstabilität induzieren und regulieren können.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Analyse verschiedener AID-GFP Fusionsproteine in zwei Zelllinien

Zum Zweck der Analyse der subzellulären Lokalisation und Expression des AID-Proteins wurde die humane AID-Gensequenz an eine eGFP-Markersequenz (*enhanced green fluorescence protein*) fusioniert und stabil in zwei verschiedene Zelllinien eingebracht. Nach der Transfektion wurde die Zellsuspension so verdünnt und ausplattiert, dass Populationen isoliert werden konnten, die aus einer einzelnen transfizierten Zelle herangewachsen sind (Einzelzellklone). Alle generierten Klone wurden anschließend mittels Western Blot, konfokaler Mikroskopieanalysen und Durchflusszytometrie auf die Expression, Lokalisation und Aktivität der AID-GFP Proteine getestet. Dabei konnten Unterschiede in AID-Proteinmengen und in der subzellulären Verteilung des AID-Proteins in einzelnen Klonen festgehalten und durch die große Anzahl an Proben statistisch ausgewertet werden.

Die hier verwendeten Zelllinien waren die humane Raji-Zelllinie und die Hühner-B-Zelllinie DT40. DT40-Zellen sind durch virale Transduktion (AL-Virus) immortalisiert worden, Raji-Zellen beherbergen das Epstein-Barr-Virus (EBV) und zeichnen sich durch eine Translokation des *c-myc*-Onkogens an den IgH-Lokus aus, sodass die Zellen eine ständige hohe *c-myc*-Expression (Klein 1983) und eine konstitutive SHM aufweisen. Raji-Zellen gehören zur Gruppe der BL-Zelllinien und zeichnen sich durch hohe AID-Proteinmengen aus; DT40 Zellen zeigen schnelle Teilungsraten (6-8 Std.). Zusätzlich sind beide Zelllinien leicht transfizierbar und damit für Expressions- und Funktionalitätsstudien geeignet. Neben dem WT-AID wurde auch eine um die letzten 14 Aminosäuren verkürzte AID-Variante für die Analysen verwendet. Da dieser Bereich am C-Terminus die NES enthält, sollte sich diese AID-Mutante im Zellkern anreichern. Im Gegensatz dazu würde das WT-AID Protein im Cytoplasma akkumulieren.

Alle AID-Konstrukte enthielten zusätzlich eine Hämagglutinin-Sequenz (HA-Tag) aus dem Influenza-Virus am N-Terminus von AID (Abb. 6A), die die Western Blot-Analyse auch bei NES-deletierten AID-Fusionsproteinen ermöglichen sollte. Da der NES-Bereich als Antigen zur Herstellung des  $\alpha$ -AID-Antikörpers verwendet wurde, konnten die NES-deletierten AID-Mutanten mit dem  $\alpha$ -AID-Antikörper nicht detektiert werden. Fusionen mit dem GFP Marker an beiden Enden von AID wurden durch F. Rückerl (Rueckerl, 2005) und J. Jescke

hergestellt und unter Verwendung der EcoRI-Restriktionsschnittstelle in den 141pCAG-3SIP Vektor (pCAGGs) inseriert, der sich durch einen starken Hühner  $\beta$ -Aktin Promotor auszeichnet (Niwa, Yamamura et al. 1991) (Abb. 6A). Die korrekte Orientierung der Konstrukte wurde durch Restriktions- und Sequenzierungsanalysen überprüft.

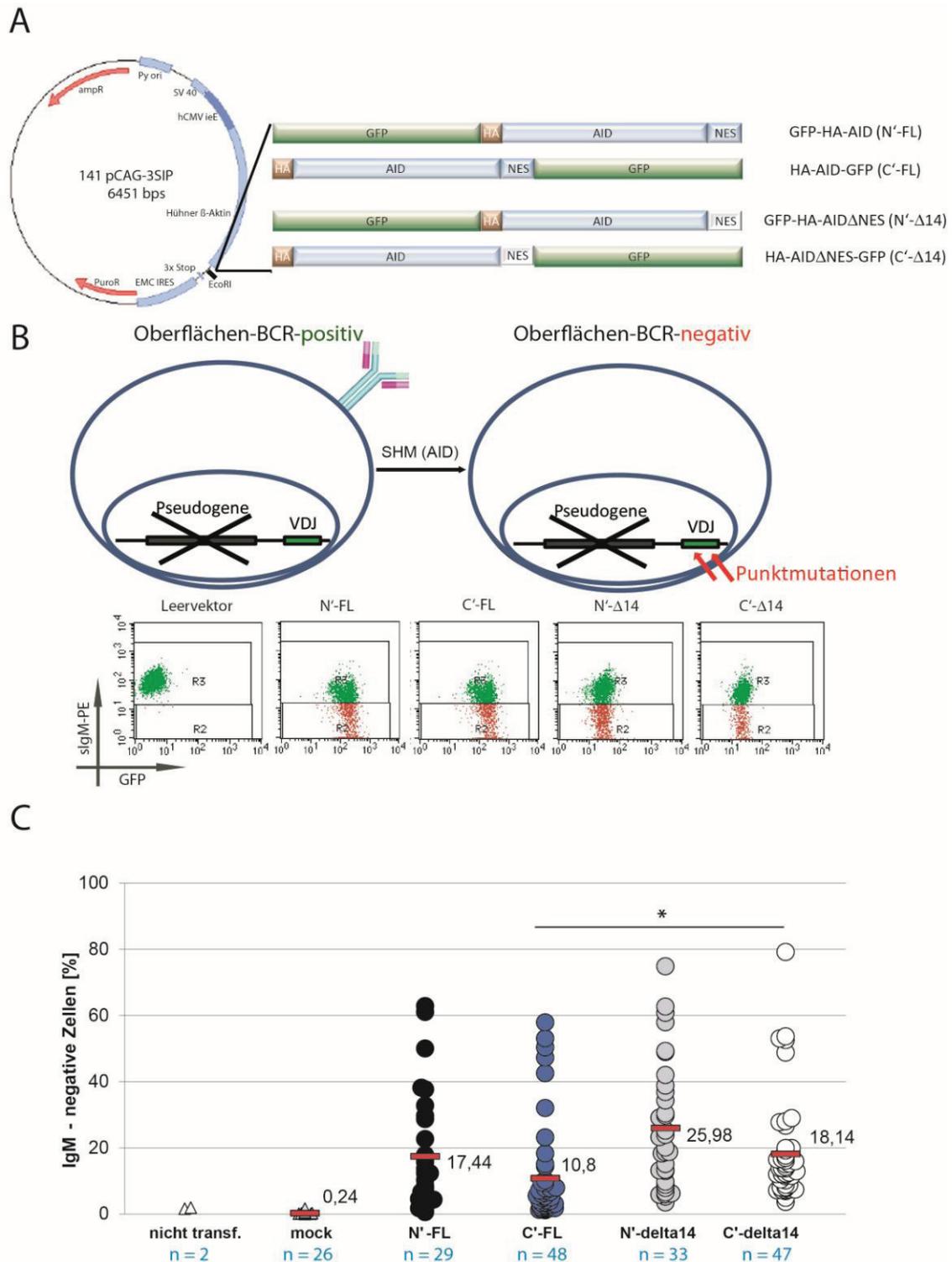
### 3.1.1 Expression und Funktion der vier AID-GFP Fusionsproteine

Das Prinzip des Funktionstests ist in Abbildung 6B schematisch und exemplarisch dargestellt. Hierzu wurde die Hühner B-Zelllinie DT40  $\Psi V/AID^{-/-}$  eingesetzt, die einen intakten Oberflächenrezeptor (IgM) aufweist. Da zusätzlich zum AID-Gen auch die Pseudogene dieser Zelllinie entfernt worden sind, können die Gene für den Antigenrezeptor nicht mehr durch Genkonversion (GC, *gene conversion*) oder SHM verändert bzw. gestört werden. Die eingebrachten AID-GFP Konstrukte könnten – je nach Aktivität – die Ig-Gene durch SHM so modifizieren, dass es zum Verlust des BCR an der Oberfläche kommen kann (Arakawa, Saribasak et al. 2004).

Je ein repräsentatives FACS-Ergebnis pro Konstrukt zeigt in Abbildung 6B (unten), wie die ursprünglich IgM-Rezeptor-positive Population (R3-Kasten, dargestellt in grün, ein Punkt steht für eine Zelle) durch Expression des pCAGGs-Leervektors 13 Tage nach Transfektion nicht verändert werden konnte, wohingegen AID-haltige Vektoren zu diesem Zeitpunkt den Verlust der Oberflächen-IgM-Struktur bei vielen Zellen herbeiführten (R2-Kasten, dargestellt in rot). Ferner konnte man die GFP-Marker in AID-positiven Zellen im FACS detektieren; die Leervektor-Population war erwartungsgemäß GFP-negativ.

Die quantitative Auswertung der 26 bis 47 Klone pro Konstrukt zeigte, dass alle AID-GFP Fusionen funktionell waren (Abb. 6C, ein Punkt stellt einen Klon dar). Die Durchschnittswerte lagen im Bereich von 17,44% bis 25,98% IgM-negativen Zellen im Vergleich zu Hintergrundwerten (0,24%) bei AID-negativen Klonen.

Die erhaltene Streuung der Klone in ihrem IgM-Status kann durch das Zusammenspiel zwischen AID-Aktivität und Zellteilungsrate erklärt werden. Wenn beispielsweise eine Zelle zu einem frühen Zeitpunkt nach Transfektion ihren BCR in Folge von AID-Aktivität verliert und sich anschließend teilt, ist der prozentuale Anteil dieser BCR-negativen Zellen in der gegebenen Population nach mehreren Zellteilungen höher als in einer Zellpopulation, in der der BCR erst zum späteren Zeitpunkt zerstört und nicht mehr detektiert wird. Im ersten Szenario erhält man stark IgM-negative Zellen, wohingegen im letzten Fall eher wenig IgM-Verlust registriert wird.



**Abbildung 6: Expression und Funktion der vier AID-GFP Fusionsproteine**

(A) Schematische Darstellung des pCAGGS-Vektors, sowie der jeweiligen HA-AID-GFP Fusionsproteine. (B) Experimentelle Herangehensweise für die Bestimmung der AID-Aktivität im Funktionalitäts-Assay in den  $\Psi V/AID^{-/-}$  Zellen, mit IgM-Verlust als direktes Maß für AID-bedingte SHM; exemplarische Darstellung der FACS-Daten. (C) Quantitative Auswertung des SHM-Funktionalitätstests der Konstrukte. Jeder Punkt stellt einen Klon dar; n: Anzahl der analysierten Klone; mock: Leervektor; rote Balken: Mittelwerte. AmpR & PuroR: Ampicillin & Puromycin-Resistenzen; SV40: Simian-Virus Promotor; Py ori: Polyoma origin of replication; hCMVieE: human cytomegalovirus immediate-early enhancer; EMC-IRES: *Encephalomyocarditis internal ribosomal entry site*; HA: Hämagglutinin; NES: Nukleäre Exportsequenz; FL: full length; delta14: NES-deletierte AID-Mutanten; C' und N': GFP-Marker am C und N-Terminus; SHM: somatische Hypermutation; sIgM: surface IgM; PE: Phycoerythrin; p: Signifikanzwert nach dem zweiseitigen Student's- T-Test; \*: Der Wert liegt zwischen 0,01 und 0,05 und ist signifikant.

Der Prozentsatz der BCR-negativen Zellen war bei NES-deletierten AID-Mutanten (Abb. 6C) insgesamt höher und im Falle von C-terminal fusionierten Konstrukten signifikant höher ( $p = 0,02$ ), was auf höhere AID-Aktivität bei nukleären Versionen von AID deutete. Diese Beobachtung entsprach den Erwartungen, denn im Zellkern kommt AID schneller an sein DNA-Substrat, was die höhere Aktivität erklären könnte.

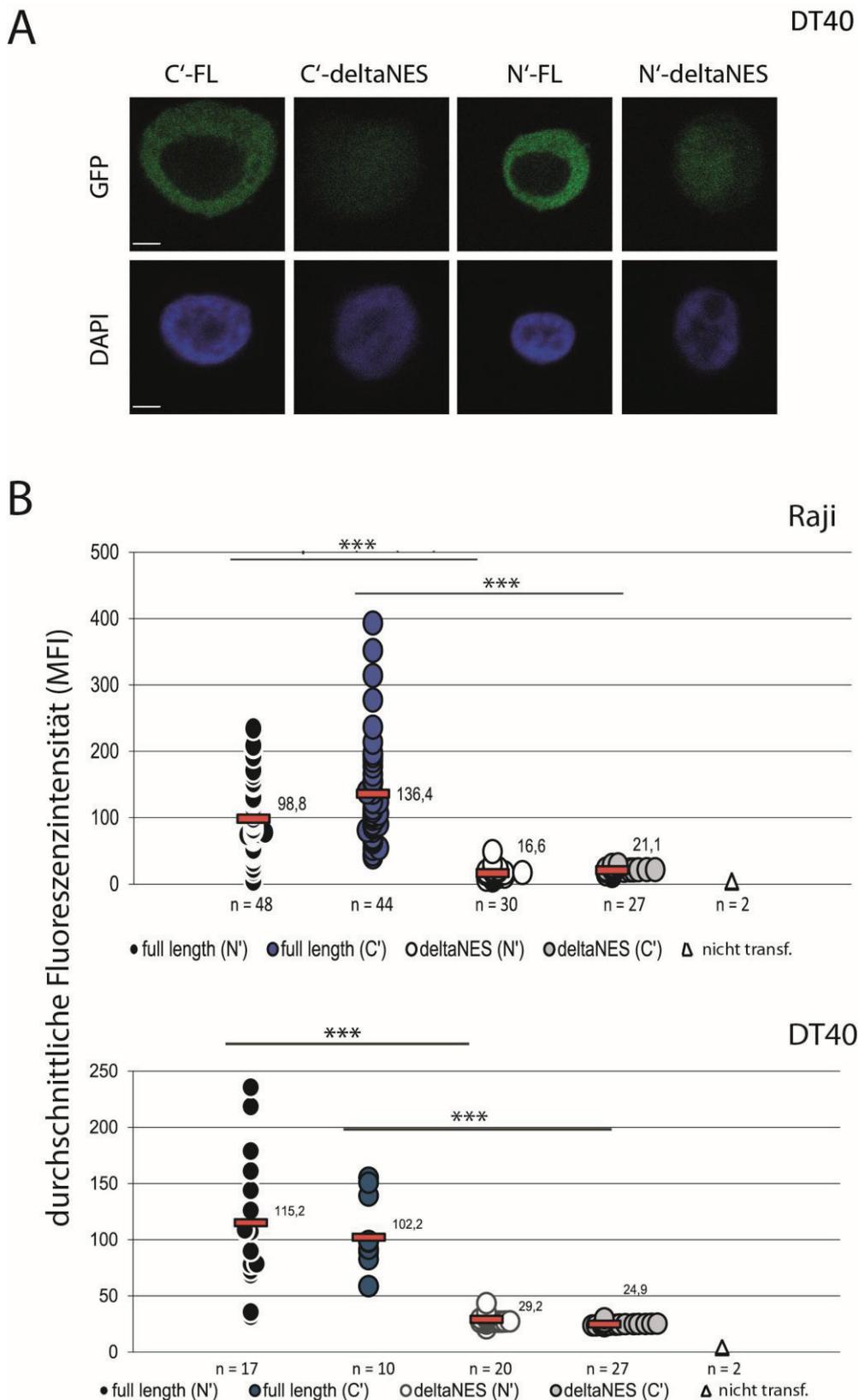
### 3.1.2 Spezifischer AID-Abbau im Zellkern

Die konfokale Mikroskopieanalyse bestätigte die cytoplasmische Lokalisation der WT-AID Proteine und die Anreicherung der NES-deletierten AID-Varianten im Zellkern in beiden GFP Fusionsformen (C- und N-terminal) (Abb. 7A).

Interessanterweise erschien die GFP-Fluoreszenzstärke deutlich schwächer im Zellkern. Daher wurde nach demselben Prinzip wie in Abbildung 6B und C jeder Klon nach seiner GFP-Fluoreszenzstärke auf der MFI-Achse (*mean fluorescence intensity*) eingetragen und der Durchschnittswert ermittelt (Abb. 7B, rote Balken). Der ungerichtete zweiseitige Student's T-Signifikanztest zeigte, dass die Fluoreszenzstärke der AID $\Delta$ NES-GFP Konstrukte in beiden Zelllinien hochsignifikant niedriger war und bestätigte somit die ursprüngliche Beobachtung der niedrigeren GFP-Intensität im Zellkern in Abbildung 7A. In DT40-Zellen handelte es sich um einen etwa 3-4-fachen Unterschied, während in Raji-Zellen eine circa 10-fache Abnahme der AID-GFP Proteinmengen im Zellkern verzeichnet werden konnte.

Da die verschiedenen Konstrukte von demselben Promotor abgelesen wurden, stellte sich die Frage, ob es sich bei den beobachteten kleineren AID-Proteinmengen im Zellkern um ein Phänomen der posttranslationalen Regulation in Form von verstärktem Proteinabbau handelt. Etwa zeitgleich wurde diese Frage durch die Arbeit von Aoufouchi et. al., beantwortet. In dieser Studie wurde eine verstärkte AID-Ubiquitinierung im Zellkern und damit erhöhte Degradation des nukleären AID durch FACS-Experimente und co-IP-Analysen gezeigt (Aoufouchi, Faili et al. 2008).

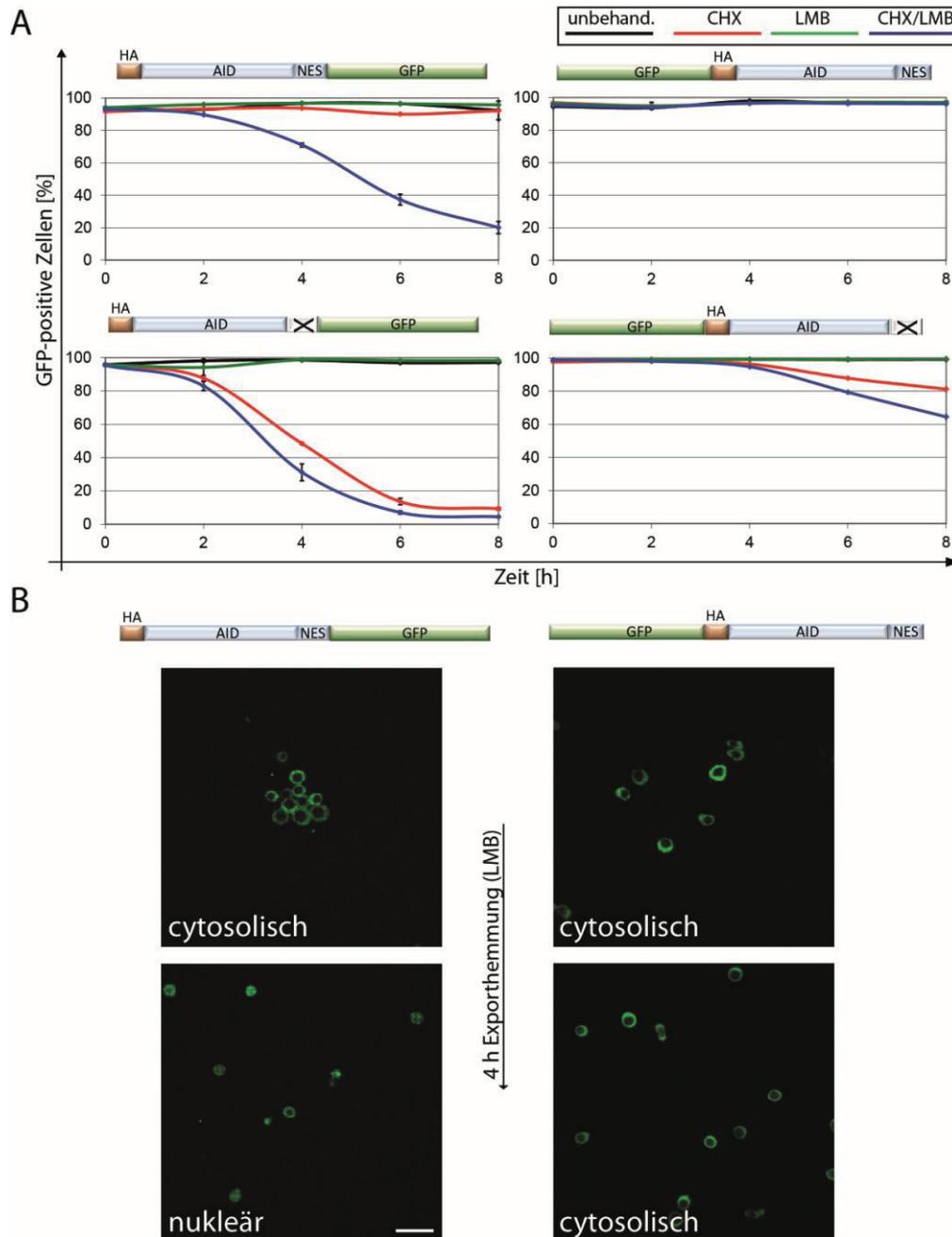
Wir wollten diese Ergebnisse in unseren Zelllinien mit unseren Konstrukten in FACS-Experimenten, in denen die überexprimierten AID-GFP Proteine durch spezifische Exporthemmung den Zellkern nicht verlassen konnten, reproduzieren. Hier konnte tatsächlich ein deutlicher Abbau im Zellkern über einen Zeitraum von 8 Stunden in DT40-Zellen (Abb. 8A) und ebenso Raji-Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt) festgestellt werden.



**Abbildung 7: Expressions- und Lokalisationsanalyse der AID-GFP Fusionsproteine**

(A) Konfokale Aufnahmen von AID- bzw. AID $\Delta$ NES-exprimierenden DT40 Zellen (C- und N- terminale Fusionen); DAPI: Zellkernfärbung; Maßbalken: 1  $\mu$ m. (B) Bestimmung der GFP-Fluoreszenzintensität aller generierten Klone mittels Durchflusszytometrie; MFI: *mean fluorescence intensity*; *full length*: WT-AID; deltaNES: AID $\Delta$ NES; rote Balken: Durchschnittswerte; n: Anzahl getesteter Klone pro Konstrukt, ein Klon wird von einem Punkt repräsentiert; \*\*\*: die durch zweiseitigen Student's T-Test ermittelte Signifikanzwerte sind <0,001.

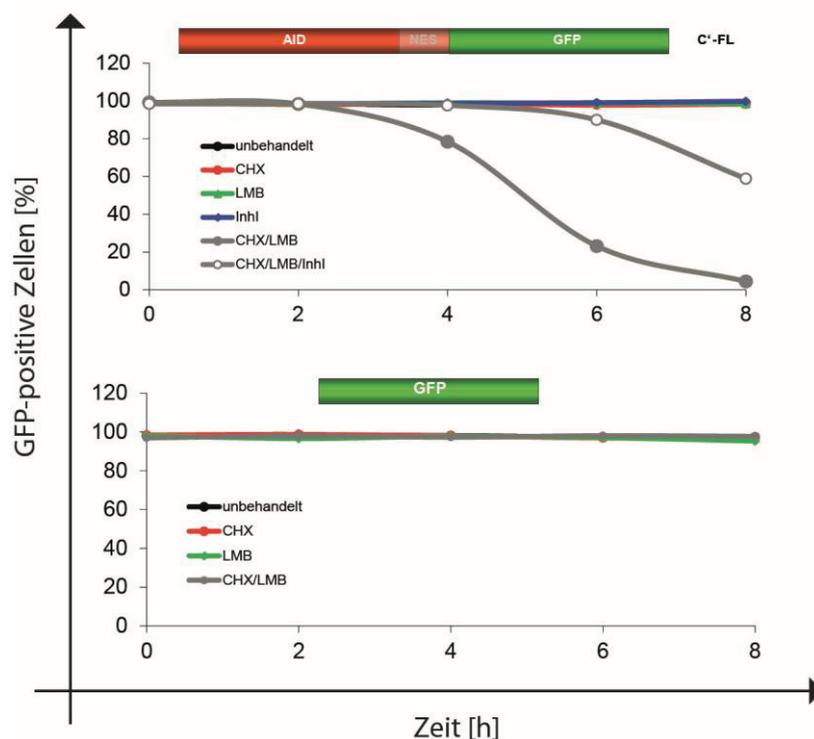
Für die Mengenabnahme der cytosolischen WT-AID-GFP Proteine war die Hemmung der *de novo* Proteinsynthese mit Cycloheximid (CHX) notwendig, und zusätzlich musste das AID-Protein durch Leptomycin B (LMB)-Behandlung im Zellkern angereichert werden. Durch die Kombination von CHX und LMB wurde die AID-GFP Proteinmenge um circa 80% reduziert (Abb. 8A links oben). Bei NES-deletierten AID-Fusionen reichte bereits die CHX-Behandlung aus, um die AID-Menge um etwa 90% zu minimieren (Abb. 8A links unten).



**Abbildung 8: Lokalisations- und Abbauverhalten der AID-GFP Proteine**

(A) Analyse des AID-Abbaus in verschiedenen AID-GFP Fusionsproteinen im FACS. Die Messung wurde in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Konfokale Mikroskopie zum Importverhalten der AID-GFP Proteine. CHX: Cycloheximid; LMB: Leptomycin B. Maßbalken: 20  $\mu$ M.

Allerdings war die bei C-terminalen Fusionsproteinen beobachtete Abnahme der AID-Mengen bei N-terminal fusionierten AID-GFP Konstrukten nicht bzw. bei AID $\Delta$ NES-GFP kaum zu sehen (Abb. 8A rechts). Wie sich durch die anschließende Mikroskopieanalyse unter Verwendung des Kernexporthemmstoffes LMB herausstellte, zeigten die N-terminalen Fusionen nach 4-stündiger Behandlung immer noch ausschließlich cytosolisches AID, was auf ein Importproblem deutete (Abb. 8B). Vermutlich wurde die AID-NLS am N-Ende des AID-Proteins durch die räumliche Nähe des GFP-Markers verdeckt und somit eingeschränkt funktional. Da die NES-deletierte Form von N-terminalem GFP-AID Protein dennoch in der Lage ist, im *steady state* in den Zellkern zu gelangen (Abb. 7A), ist es möglich, dass neben Importeinschränkungen weitere Faktoren für den beeinträchtigten Abbau im 8-stündigen FACS-Experiment verantwortlich gemacht werden können (Abb. 8A rechts). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Degradationsexperimente an den normal import- und exportfähigen C-terminal fusionierten AID-GFP Konstrukten durchgeführt.



**Abbildung 9: Proteasomaler Abbau von AID im Zellkern**

(Oben) Abbautests des AID-GFP Proteins über einen Zeitraum von 8 Stunden unter Zuhilfenahme des Proteasominhibitors Inhl. Die AID-Proteinmengen wurden als prozentuale Abnahme der GFP-positiven Zellen dargestellt. (Unten) Kontrollversuch mit GFP Protein unter denselben Versuchsbedingungen. Die Messungen erfolgten in Duplikaten. CHX: Cycloheximid; LMB: Leptomycin B; Inhl: Proteasominhibitor I.

Bei der beobachteten AID-Abnahme im Zellkern war offensichtlich der proteasomale Abbauprozess beteiligt, wie die spezifische Hemmung des Proteasoms durch den Inhibitor I (Inhi) zeigte (Abb. 9). Ferner konnten erste Hinweise auf AID-spezifischen Abbau gesammelt werden, da die Mengen eines GFP-Kontrollproteins bei denselben Behandlungsbedingungen stets gleich blieben (Abb. 9 unten).

### 3.2 Analyse der Aktivität, der Lokalisation und des Abbaus von AID-GFP Mutanten

Als Ursache für den beobachteten nukleären AID-Abbau wurde ein Zellmechanismus vermutet, durch den die Zelle die Mengen des DNA-schädigenden Enzyms AID im Zellkern möglichst gering zu halten versucht. Durch AID eingeführte Schäden könnten einen solchen Regulationsmechanismus auslösen. Diese Vermutung sollte mit inaktiven AID-Mutanten überprüft werden, die nicht in der Lage sein sollten, DNA-Läsionen einzuführen und somit keine Gefahr für die Zelle darstellen würden. Da der Abbau von AID im Zellkern stattfindet, wurden vier AID-Mutanten auf der Basis des nukleären AID $\Delta$ NES-GFP Konstrukts hergestellt. Diese Mutanten können in katalytische und Phosphorylierungsmutanten eingeteilt werden (Abb. 10).

Durch die Analyse der Kristallstruktur von APOBEC-2 (Prochnow, Bransteitter et al. 2007), welches strukturell und funktionell mit AID eng verwandt ist, konnten folgende Annahmen für AID-Mutanten getroffen werden. Bei der katalytischen Doppelmutante H56R/E58Q wurden beide unerlässlichen Aminosäuren für die Zn-Koordination im aktiven Zentrum mutiert. Hierzu finden sich Berichte über Hyper-IgM-Patienten (Durandy, Peron et al. 2006), die Mutationen am Histidin 56 und Glutamat 58 im AID-Protein tragen und somit ein nicht-funktionelles AID-Protein aufweisen. Die *in vitro*-Analyse der AID<sup>H56Y</sup>-Mutante in *E.coli* zeigte gehemmte SHM (Ta, Nagaoka et al. 2003). Ein *in vitro* Deaminaseassay mit der H65/E58-Doppelmutante zeigte, dass diese AID-Variante völlig inaktiv war (Papavasiliou und Schatz 2002; Vuong, Lee et al. 2009).

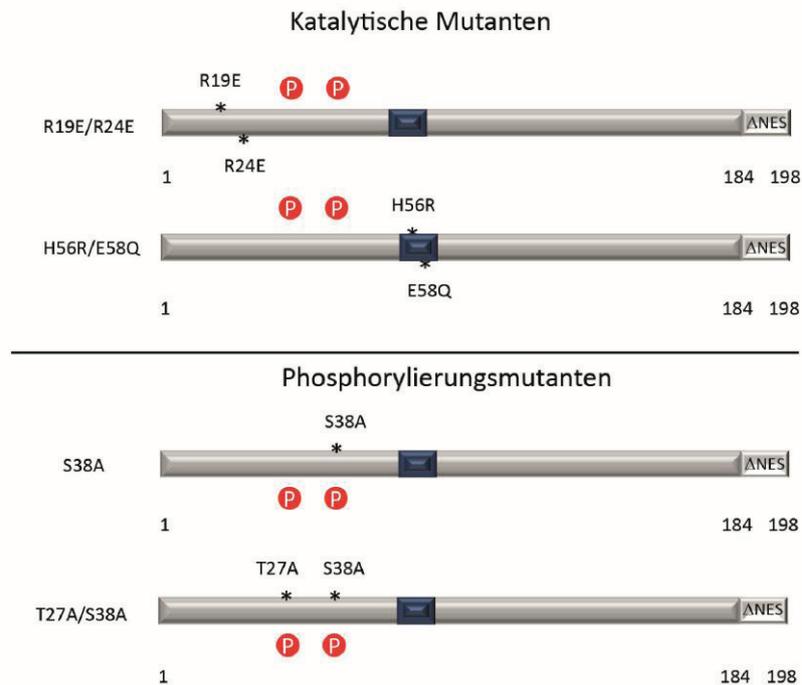
Die zweite katalytische Mutante R19E/R24E sollte eine Strukturveränderung aufweisen, bei der das katalytische Zentrum durch „Umklappen“ einer Schleifenstruktur verdeckt und unzugänglich gemacht wird (Abb. 10). Die in *E. coli* durchgeführten Funktionalitätstests zeigten für beide Einzelmutationen R19E und R24E eine stark eingeschränkte Deaminierungsaktivität (Prochnow, Bransteitter et al. 2007). Studien über Hyper-IgM-

Syndrom zeigen zudem, dass es Patienten mit AID-R24W-Mutationen gibt, die gravierende Funktionsstörungen bei der somatischen Hypermutation aufweisen (Durandy, Peron et al. 2006).

A

	Mutation	Konsequenz	<i>in vitro</i> Phänotyp
katalytische Mutanten	R19E/R24E	katalytisches Zentrum nicht zugänglich	keine Deaminaseaktivität (Prochnow et al., 2007)
	H56R/E58Q	Zn-Koordination im katalytischen Zentrum zerstört	keine Deaminaseaktivität (Papavasiliou et al., 2002; Ta et al., 2003)
Phosphorylierungsmutanten	S38A	eingeschränkte Phosphorylierung durch PKA	eingeschränkte Deaminaseaktivität (Basu et al., 2005)
	T27A/S38A	keine Phosphorylierung durch PKA	keine Klassenwechselrekombination (Pasqualucci et al., 2006)

B



**Abbildung 10: Beschreibung und schematische Darstellung der hergestellten AID-Mutanten**

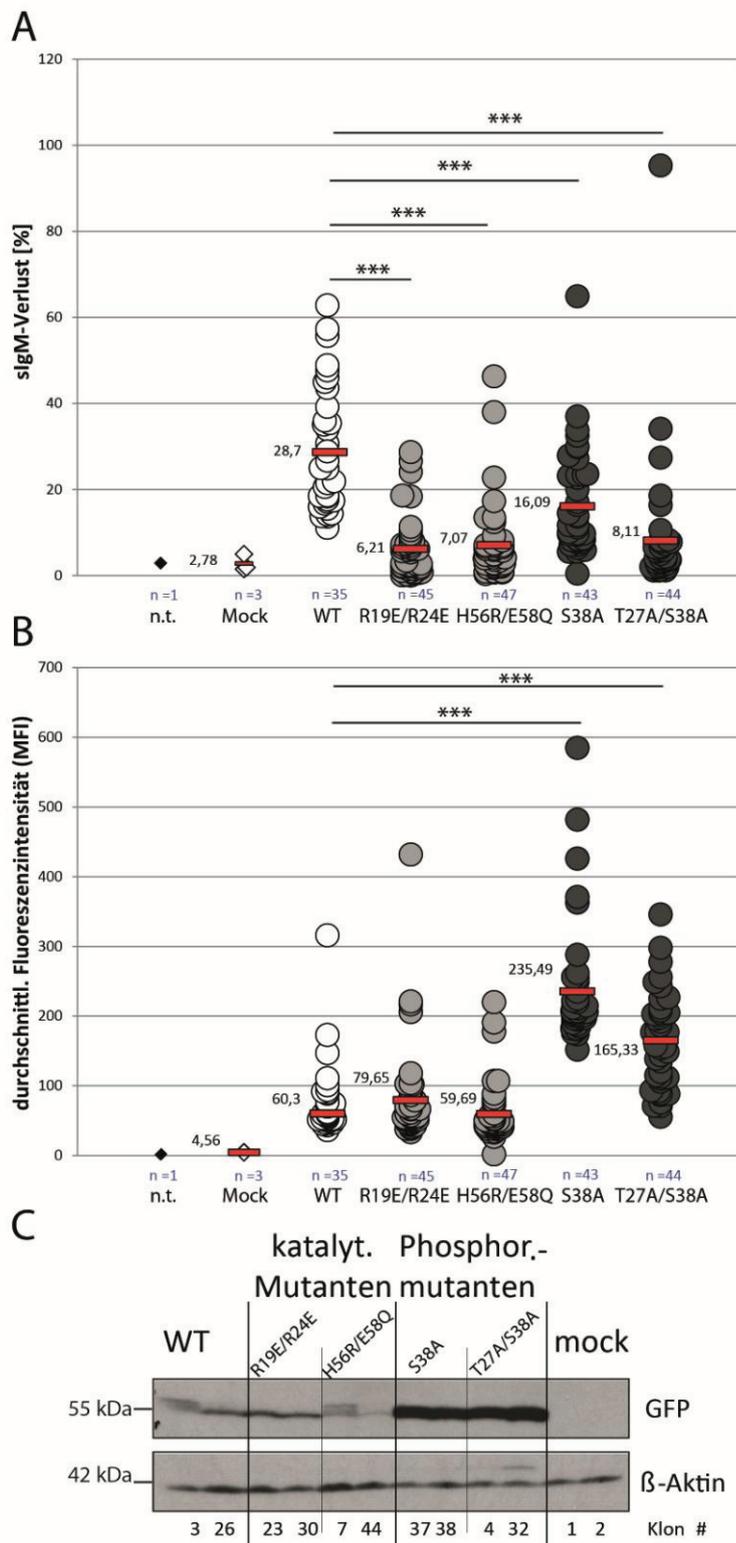
(A) Auflistung der generierten AID-Mutanten mit den einhergehenden phänotypischen Veränderungen. (B) Die vier Mutanten werden in zwei Gruppen eingeteilt: katalytische Mutanten (R19E/R24E und H56R/E58Q, oben) und Phosphorylierungsmutanten (S38A und T27A/S38A, unten). \*: mutierte Aminosäure; P: Ziel-Phosphorylierungsstelle der Protein Kinase A; blaue Box: das katalytische Zentrum von AID; ΔNES: deletierte nukleäre Exportsequenz; Zahlen: Anfang und Ende des Proteins und des entfernten C-terminalen Bereiches. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Die Phosphorylierungsmutanten AID<sup>S38A</sup> und AID<sup>T27A/S38A</sup> (sie werden im Folgenden auch als Aktivierungsmutanten bezeichnet) können auf Grund von mutierten Serin- bzw. Threoninresten nicht von PKA phosphoryliert und damit aktiviert werden, wodurch die Interaktion mit RPA und folglich Chromatinbindung gestört wird (Vuong, Lee et al. 2009). Basu et al., berichteten von einer eingeschränkten Deaminaseaktivität der Phosphorylierungsmutanten, die auf eine gestörte AID-RPA-Interaktion zurückgeführt werden konnte (Basu, Chaudhuri et al. 2005). Pasqualucci et. al., konnten zeigen, dass bereits die S38A-Einzelmutante zu einer eingeschränkten AID-Phosphorylierungsrate führte. Eine Phosphorylierung der T27A/S38A-Doppelmutante konnte in dieser Studie nicht mehr nachgewiesen werden und auch die CSR war dadurch nicht mehr detektierbar (Pasqualucci, Kitaura et al. 2006).

### 3.2.1 Untersuchung der Expression und Funktion der AID-Mutanten

Wie angenommen, zeigten alle Mutanten signifikant eingeschränkte Deaminierungsaktivität im *in vivo* Test der somatischen Hypermutation in DT40 Zellen (Abb. 11A, Durchführung wie in Abb. 6B und C erklärt). Überraschenderweise wurden bei der GFP-Expressionsanalyse der generierten Klone circa 3-4-fach höhere AID-GFP Proteinmengen im Fall der beiden Phosphorylierungsmutanten gemessen. Die katalytischen Mutanten zeigten dem Wildtyp entsprechende GFP-Werte (Abb. 11B und C). Diese Beobachtung konnte sowohl bei FACS-Analysen aller Klone (Abb. 11B) als auch durch Western Blot (WB)-Experimente gemacht werden, wobei beim letzteren je zwei Klone mit repräsentativen Funktionswerten pro Konstrukt analysiert wurden (Abb. 11C).

Die Sequenzanalyse aller Mutanten zeigte außer den entsprechenden Punktmutationen im AID-Abschnitt des Fusionsproteins keinerlei Abweichungen in der GFP-Sequenz. Da alle Proteine vom selben Promoter im pCAGGs-Vektor abgelesen werden, wurde hier ein physiologischer Grund für die Expressionsunterschiede bei den Phosphorylierungsmutanten vermutet (Abb. 11B und 12A).

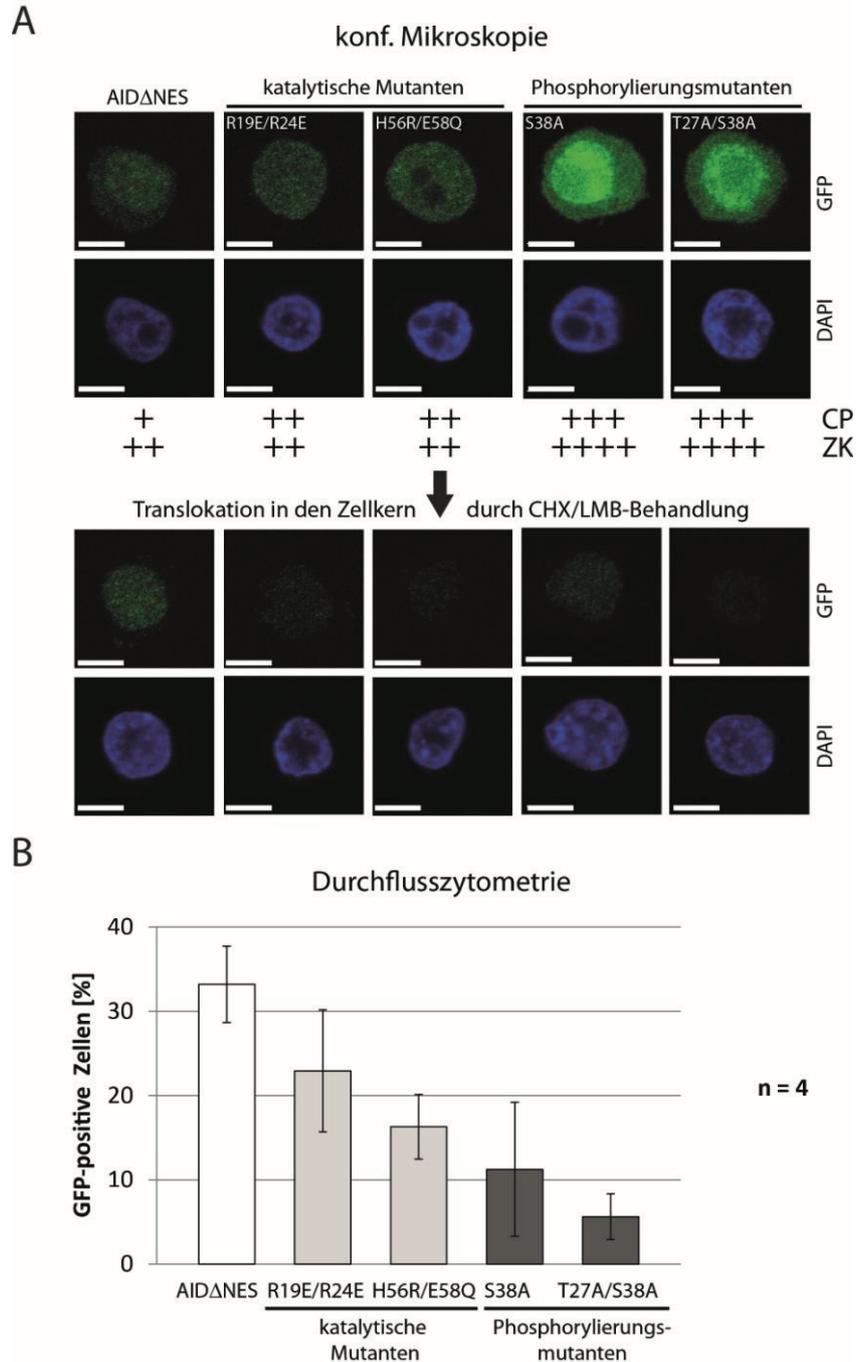


**Abbildung 11: Expressions- und Funktionsanalyse der AIDΔNES-GFP Mutanten**

(A) Funktionstest der generierten Klone (genaue Erklärung siehe Abb. 6). Jeder Einzelzellklon wird durch einen Kreis dargestellt; rote Balken: Durchschnittswerte; n: Anzahl getesteter Klone pro Mutantentyp; Signifikanzbestimmung: zweiseitiger Student's T-Test; \*\*\*: Der Wert liegt unter 0,001 und ist hochsignifikant. (B) Graphische Darstellung der im FACS ermittelten GFP-Fluoreszenzwerte der jeweiligen Klone; Darstellung wie in (A). (C) Western Blot-Analyse von je zwei repräsentativen Klone (durchschnittliche Werte im Funktionstest) pro Konstrukt; n.t.: nicht transfizierte Zellen; WT: AID-GFP exprimierende Klone; Mock: Leervektor-exprimierende Klone; Aktin: Ladekontrolle.

### 3.2.2 Untersuchung der Lokalisation und Degradation der AID-Mutanten

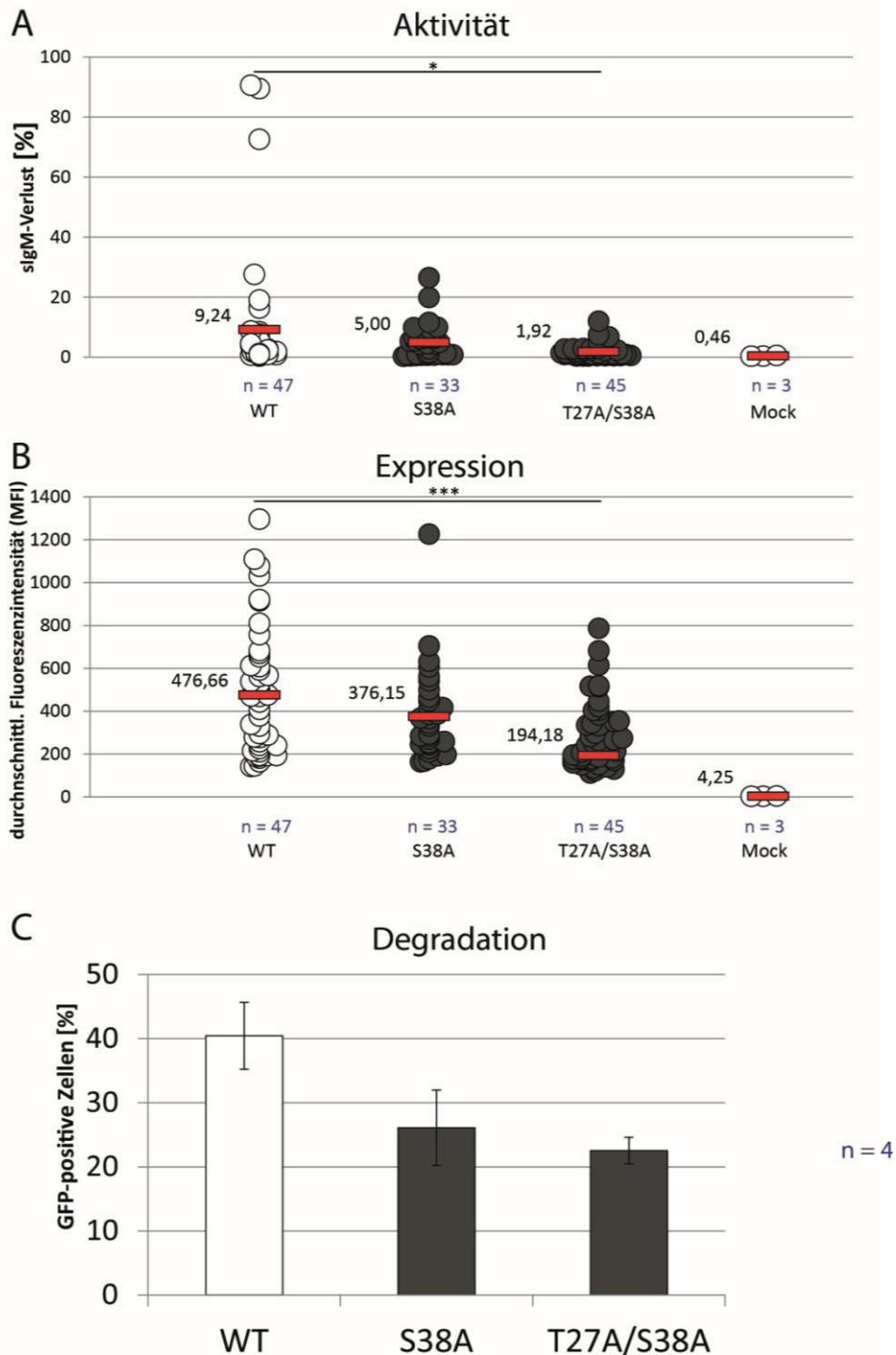
Die subzelluläre Lokalisation der Mutanten konnte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie ermittelt werden. Alle AID-GFP Konstrukte zeigten durch die fehlende NES wie erwartet hohe AID-Anteile im Zellkern, mit einer detektierbaren cytosolischen AID-Menge (Abb. 12A). Auch hier wurde die stärkere Expression der Phosphorylierungsmutanten deutlich.



**Abbildung 12: Lokalisationsanalyse und Abbauverhalten der AID $\Delta$ NES-GFP Mutanten**

(A) Repräsentative Bilder aus der konfokalen Mikroskopieanalyse der AID $\Delta$ NES-GFP exprimierenden DT40-Zellen. Maßbalken: 5  $\mu$ m; CP: GFP-Signale im Cytoplasma; ZK: GFP-Signale im Zellkern. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit der jeweils derselben Laserintensität (488 nm) ist dargestellt. (B) AID-Abbauanalyse von je vier Klonen der jeweiligen Mutanten nach 6-stündiger Behandlung mit CHX/LMB im FACS. Die prozentuale Abnahme der GFP-positiven Zellen diente als Marker für AID-Abbau. CHX/LMB: Cycloheximid/Leptomycin B.

Die katalytischen Mutanten, die im Funktionstest (Abb. 11A) einen nahezu vollständigen Aktivitätsverlust zeigten, schienen im Vergleich zum aktiven AID mehr AID im Cytoplasma aufzuweisen (Abb. 12A, Verhältnis Zellkern/Cytoplasma).



**Abbildung 13: Aktivität und Abbauverhalten der AID-GFP Phosphorylierungsmutanten**

(A) Funktionstest der generierten Klone (genaue Erklärung siehe Abb. 6). Jeder Einzelzellklon wird durch einen Kreis dargestellt; rote Balken: Durchschnittswerte; n: Anzahl getesteter Klone pro Mutantentyp; Signifikanzbestimmung durch den zweiseitigen Student's T-Test; \*: der Wert liegt unter 0,05; \*\*\*: der Wert liegt unter 0,001. (B) Graphische Darstellung der ermittelten GFP-Fluoreszenzwerte der jeweiligen Klone; Darstellung wie in (A). (C) AID-Abbauanalyse von je vier Klone der jeweiligen Mutanten nach 4-stündiger Behandlung mit CHX/LMB im FACS. Die prozentuale Abnahme der GFP-positiven Zellen diente als Marker für AID-Abbau. CHX/LMB: Cycloheximid/Leptomycin B.

Überraschenderweise konnte bei AID-Mutanten nach CHX/LMB-Behandlung weniger AID im Zellkern detektiert werden (Abb. 12A). Die quantitative Auswertung der GFP-Fluoreszenzsignale bestätigte den schnelleren Abbau von AID-Mutanten im Zellkern im Vergleich zum aktiven AID $\Delta$ NES-Protein (Daten nicht gezeigt). Obwohl die NES-defizienten AID<sup>S38A</sup> und AID<sup>T27A/S38A</sup>-Mutanten deutlich mehr AID im Zellkern zeigten, war die Proteinstabilität dieser Aktivierungsmutanten nach CHX/LMB-Behandlung niedriger als die der katalytisch beeinträchtigten AID-Proteine. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die FACS-Analyse der AID-Mutanten (Abb. 12B), auch hier konnte man für die Mutanten einen deutlich schnelleren Abbau registrieren.

Die Phosphorylierungsmutanten im NES-profizienten AID-GFP Konstrukt zeigten ebenfalls eine eingeschränkte Funktionalität (Abb. 13A), ihre Expressionsprofile zeigten aber keine erhöhten AID-Proteinmengen wie im Falle der NES-deletierten AID-Mutanten. Im Gegenteil, hier konnte sogar eine verminderte GFP-Expression beobachtet werden (Abb. 13B). Ein Expressionsprofil der katalytischen AID-Mutanten konnte im FL-AID-GFP Konstrukt nicht erstellt werden, da diese Mutanten (AID<sup>R19E/R24E</sup> und AID<sup>H56R/E58Q</sup>) zwar inaktiv waren, aber auch keine Expression zeigten.

Im Hinblick auf die AID-Degradation zeigten die AID-FL-Phosphorylierungsmutanten dieselbe verstärkte Abbautendenz im Vergleich zum WT-AID, wie sie auch bei NES-defizienten Konstrukten beobachtet wurde (vgl. Abb. 13C und 12B).

Beide Methoden (Durchflusszytometrie und Mikroskopie) lieferten starke Anhaltspunkte für einen Einfluss der AID-Aktivität auf den AID-Abbau im Zellkern an, wobei das aktive AID im Zellkern stabiler war, während die inaktiven AID-Mutanten in diesem Kompartiment einer schnelleren Abbaukinetik unterlagen.

### 3.3 AID-GFP Proteinstabilität bei exogen induzierten DNA-Läsionen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das aktive AID-Protein im Vergleich zu inaktiven AID-Mutanten im Zellkern stabiler war. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob man die AID-Aktivität durch exogen induzierten DNA-Schaden simulieren könnte, um auf diesem Wege die Auswirkung der AID-Aktivität auf den AID-Abbau untersuchen zu können. Zum einen sollte die AID-Aktivität durch mehrere unterschiedliche DNA-schädigende Substanzen simuliert werden; zum anderen sollten auch genotoxische Agenzien verwendet werden, die Reparaturwege induzieren (z.B. NER), welche DNA-Läsionen reparieren, die

nicht durch AID induziert werden. Durch diese Versuchsanordnung sollte man den Zusammenhang zwischen AID-bedingten DNA-Läsionen und AID-Stabilität im Zellkern beleuchten können.

Die vier verschieden verwendeten DNA-schädigenden Agenzien, die hauptsächlich drei unterschiedliche Reparaturwege induzieren, sind in der Tabelle 1 aufgezeigt.

Methylmethansulfonat (MMS) gehört zur Gruppe der Alkylalkansulfonate des S<sub>N</sub>2-Typs und transferiert eine Methylgruppe an Stickstoffatome von Guanin- und Adeninbasen, wobei N<sup>7</sup>-MetG mit 82% das häufigste Produkt der MMS-Behandlung darstellt (Wyatt und Pittman 2006). Diese Art von N-Methylschäden wird von der N-Methylpurin-DNA-Glycosylase (MPG) entfernt, die den BER-Weg initiiert (Bessho, Roy et al. 1993; Tang, Svilar et al. 2011). Hierbei kann es zu abasischen Stellen und während der Synthese (S)-Phase wahrscheinlich auch zu DSB kommen (Nikolova, Ensminger et al. 2010). Auch Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) initiiert durch oxidative Schäden den BER-Weg, wobei hier andere BER-Glycosylasen die geschädigte Base entfernen (Fortini, Pascucci et al. 2003). Durch die Verwendung des Topoisomerase II-Hemmers Etoposid werden primär DSB eingeführt, wobei auch über Entstehung von SSB berichtet wurde (Long, Musial et al. 1985).

**Tabelle 1: Verwendete DNA-schädigende Agenzien**

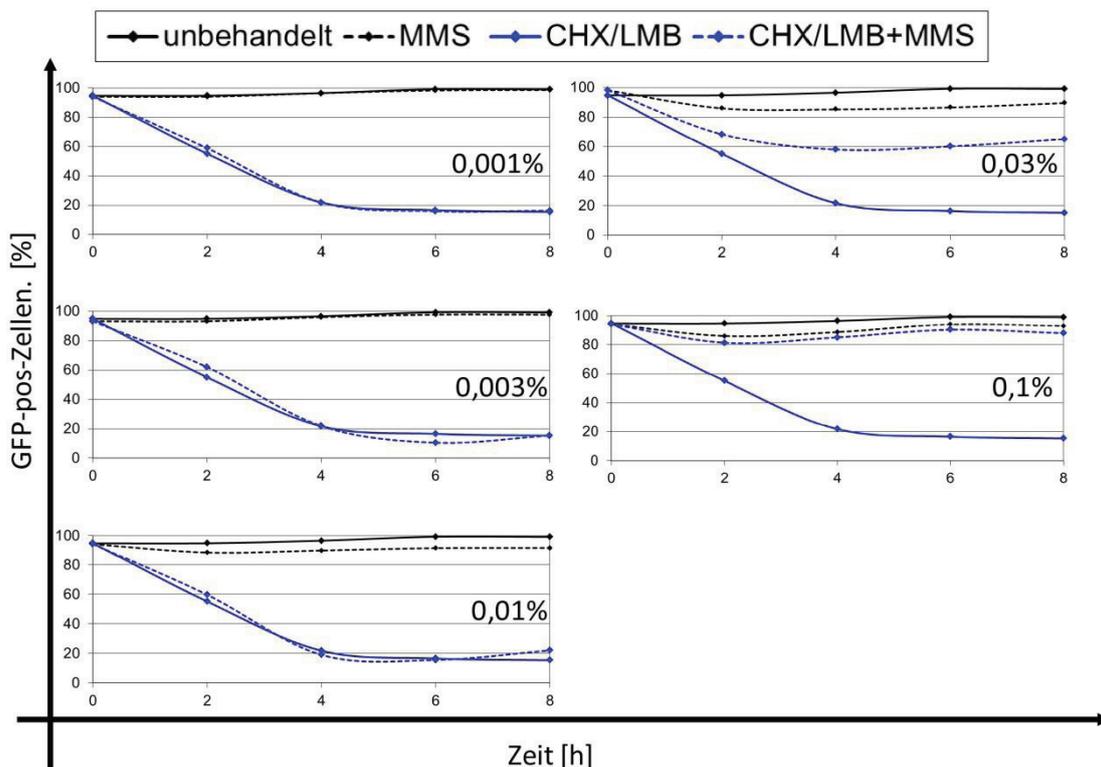
<b>Agens</b>	<b>Art der DNA-Läsion</b>	<b>aktivierter Reparaturweg</b>
MMS	Alkylierung von DNA-Basen → „bulky adducts“	<b><u>BER</u></b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidierung von DNA-Basen → „bulky adducts“	<b><u>BER</u></b>
Etoposid	Hemmung der Topoisomerase II → DSB	<b><u>DSBR</u></b>
Cisplatin	Querverknüpfung benachbarter Basen → Dimere	<b><u>NER</u></b>
AID	Cytidineaminierung → abasische Stellen	<b><u>BER, MMR, TLS, DSBR</u></b>

Aufstellung der verwendeten DNA-schädigenden Substanzen, sortiert nach der Art der DNA-Läsion und der dadurch induzierten Reparaturwege. Grau unterlegt: DNA-Schäden, die durch AID eingeführt werden und die entsprechenden Reparaturwege. MMS: Methylmethansulfonat; DSB: Doppelstrangbrüche; BER: Basenexzisionsreparatur, NER: Nukleotidexzisionsreparatur; DSBR: Doppelstrangbruchreparatur; MMR: *mismatch* Reparatur; TLS: Transläsionsssynthese.

Die verwendeten Substanzen wurden zunächst titriert, um die Konzentrationsspanne zu ermitteln, bei der die Zellpopulation nach 8-stündiger Versuchsdurchführung immer noch mind. 80% lebender Zellen aufwies. Die MMS-Titrationsreihe wird in Abbildung 14

exemplarisch erläutert. Im Experiment wurde die Stabilität der unbehandelten, überwiegend cytosolischen AID-GFP Population als schwarze durchgehende Linie dargestellt. Im Zellkern sah man die erwartete AID-Degradation (blaue durchgehende Linie): nach 8 Stunden CHX/LMB-Behandlung war nur noch circa 20% der ursprünglichen AID-Proteinmenge vorhanden. Durch die Behandlung mit aufsteigenden Dosen an MMS (schwarze gestrichelte Linie) konnte keine Verringerung der AID-Mengen bei keiner MMS-Konzentration erzielt werden. Die Behandlung der CHX/LMB-Fraktion mit MMS (blaue gestrichelte Linie) konnte bei MMS-Konzentrationen bis 0,01% ebenfalls keine Unterschiede im Vergleich zu CHX/LMB-behandelten Zellen auslösen.

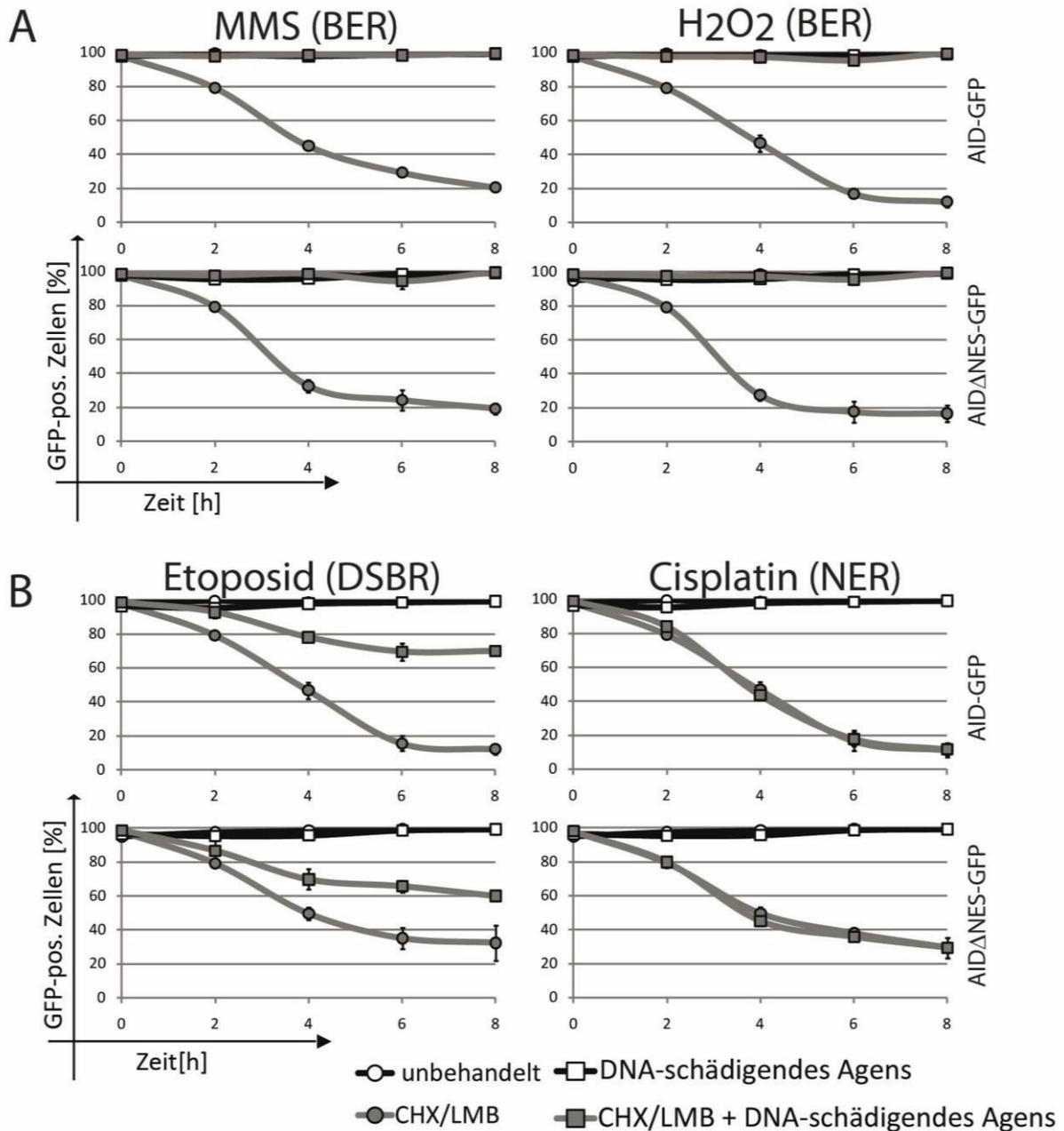
Bemerkenswerterweise konnte man bei MMS-Mengen ab 0,01% eine stetige Abnahme der AID-Degradation in den CHX/LMB/MMS-behandelten Proben feststellen. Bei der höchsten hier gezeigten Konzentration von 0,1% MMS erreichte die AID-Stabilität nahezu den Ausgangswert. Bei MMS-Dosen über 0,1% konnte ebenfalls eine schnelle Stabilisierung detektiert werden, allerdings führten diese hohen MMS-Mengen zum raschen Zelltod (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14: Titrationsreihe der MMS-Lösung**

DT40 $\Psi$ V/AID<sup>-/-</sup> Zellen mit stabil transfizierten AID-GFP Konstrukten wurden über einen Zeitraum von 8 Stunden wie oben angedeutet behandelt und dabei die relative Menge der GFP-positiven Zellen (Y-Achse) festgehalten. Die MMS-Konzentration ist angegeben. Ein repräsentatives Ergebnis aus 5 unabhängigen Experimenten ist dargestellt. CHX: Cycloheximid; LMB: Leptomycin B; MMS: Methylmethansulfonat.

In Abbildung 15A und B sind die Ergebnisse für sämtliche eingesetzten DNA-schädigenden Substanzen zusammengefasst.



**Abbildung 15: AID-Abbau bei exogen induzierten DNA-Läsionen**

(A) und (B) Abbauanalyse der AID-GFP Proteine (oben) und AIDΔNES-GFP Proteine (unten) in DT40-Zellen unter Einwirkung von CHX/LMB plus (A) MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. (B) Etoposid und Cisplatin. Die experimentelle Herangehensweise ist wie in Abbildung 14 erklärt. Die jeweiligen aktivierten Reparaturwege sind in Klammern angegeben. Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt, ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

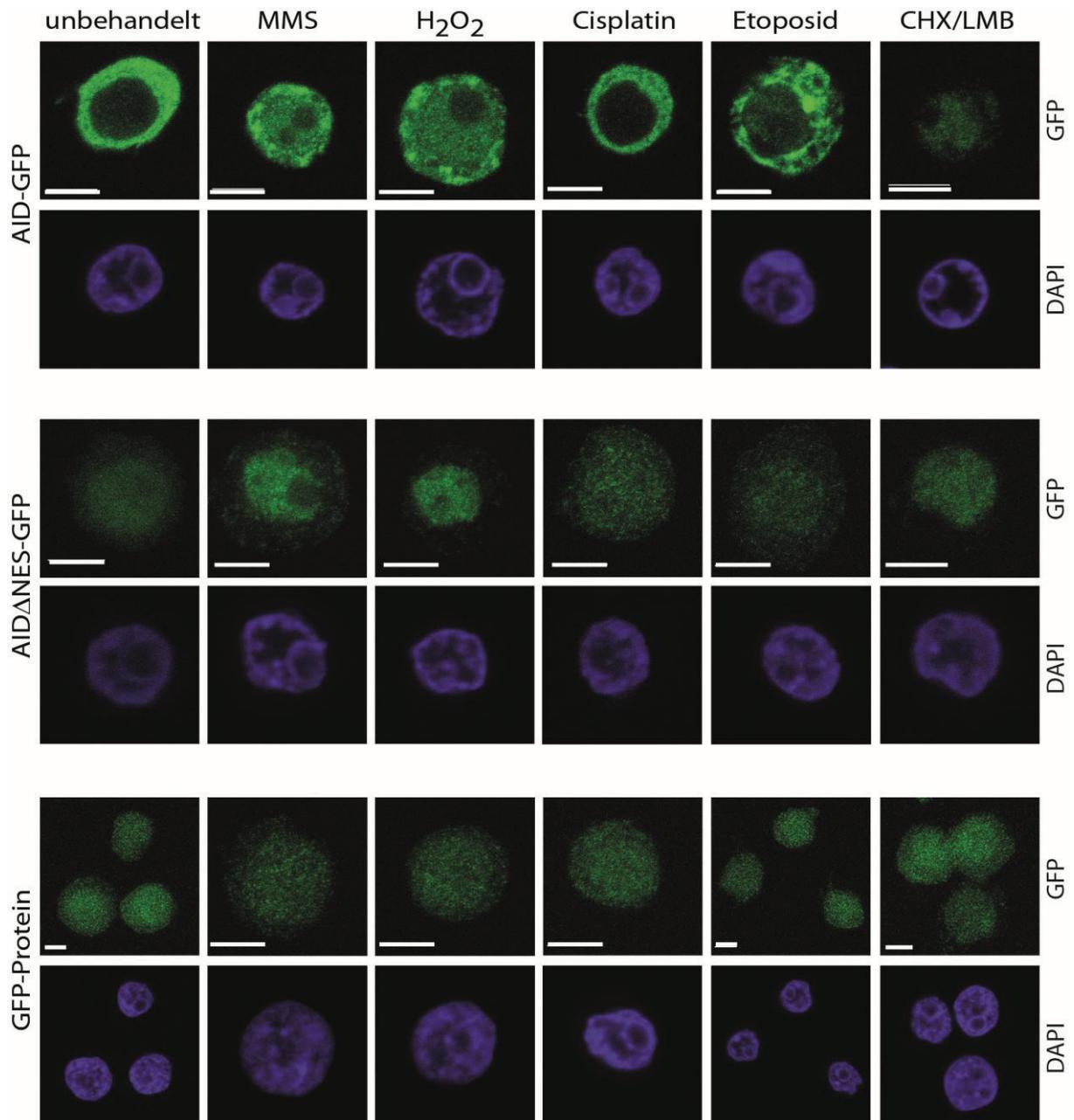
Durch Zugabe der beiden hier verwendeten BER-induzierenden Agenzien MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde keine Abnahme der Proteinstabilität des Gesamt-AID festgestellt (Abb. 15A, „DNA-schädigendes Agens“), allerdings konnte eine deutliche AID-Stabilisierung von WT-AID und der NES-deletierten AID-Version in der CHX/LMB-Population durch den Einsatz von MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gezeigt werden (Abb. 15A, „CHX/LMB+DNA-schädigendes Agens“).

Durch Etoposid-Zugabe wurde eine partielle Stabilisierung von AID in der CHX/LMB-Fraktion bei beiden AID-Varianten detektiert (Abb. 15B links). Hingegen zeigte die Anwendung des BER-induzierenden Chemotherapeutikums Cisplatin keine Auswirkung auf die AID-Proteinstabilität unter CHX/LMB-Einwirkung (Abb. 15B rechts).

Somit konnten erste Hinweise auf Zusammenhänge zwischen AID-Proteinstabilität im Zellkernkompartiment und DNA-Läsionen gesammelt werden. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass im C-Terminus von AID die für diesen Vorgang wichtige Informationen oder Bindestellen zu finden wären, da die NES-deletierten AID-GFP Fusionsproteine in der beschriebenen Experimentreihe ein WT-ähnliches Verhalten zeigten (Abb. 15A und B).

Bei der mikroskopischen Untersuchung schien interessanterweise auch die AID-Lokalisation unterschiedlich von den jeweiligen Substanzen beeinflusst worden zu sein (Abb. 16). Beim AID-GFP Konstrukt bewirkte sowohl die CHX/LMB- als auch MMS-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung eine Verschiebung von cytosolischem AID in den Zellkern. Bei letzterem reichte die Verabreichung der genotoxischen Substanz alleine, ohne CHX/LMB-Zugabe, um das sonst cytosolische AID im Zellkern zu detektieren. Während jedoch bei der CHX/LMB-Probe eine deutliche Abnahme der AID-Konzentration im Zellkern in Folge des proteasomalen AID-Abbaus erwartet und sichtbar wurde, bewirkte sowohl MMS als auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> offensichtlich eine Abbau-Hemmung der AID-Zellkernfraktion (Abb. 16).

Wie bei den FACS-Analysen, in denen nur eine partielle Abbauhemmung von AID durch Etoposid-Behandlung festgestellt werden konnte (Abb. 15B links), zeigte die Behandlung mit diesem Agens auch in dem Mikroskopie-Experiment nur einen sehr geringen Einfluss auf die AID-Lokalisation. Durch Cisplatinbehandlung konnten weder Stabilitäts- noch Lokalisationsänderungen herbeigeführt werden. Da dieses Chemotherapeutikum BER aktiviert, welches nicht an der Reparatur AID-induzierter DNA-Läsionen beteiligt ist, konnten wir bei den in Abbildungen 15 und 16 festgehaltenen Daten vermuten, dass nur bestimmte DNA-Läsionen, die auch durch AID-Aktivität induziert werden können, den proteasomalen AID-Abbau regulieren könnten.



**Abbildung 16: AID-Lokalisation und -Abbau bei exogen induzierten DNA-Läsionen**

Konfokale Mikroskopie der verschiedenen AID-GFP- bzw. GFP- exprimierenden DT40 Klone. Repräsentative Aufnahmen sind dargestellt. DAPI: Zellkernfärbung; Maßbalken: 5 μm. MMS: Methylmethansulfonat, CHX/LMB: Cycloheximid/Leptomycin B; BER: Basenexzisionsreparatur, NER: Nukleotidexzisionsreparatur; DSBR: Doppelstrangbruchreparatur.

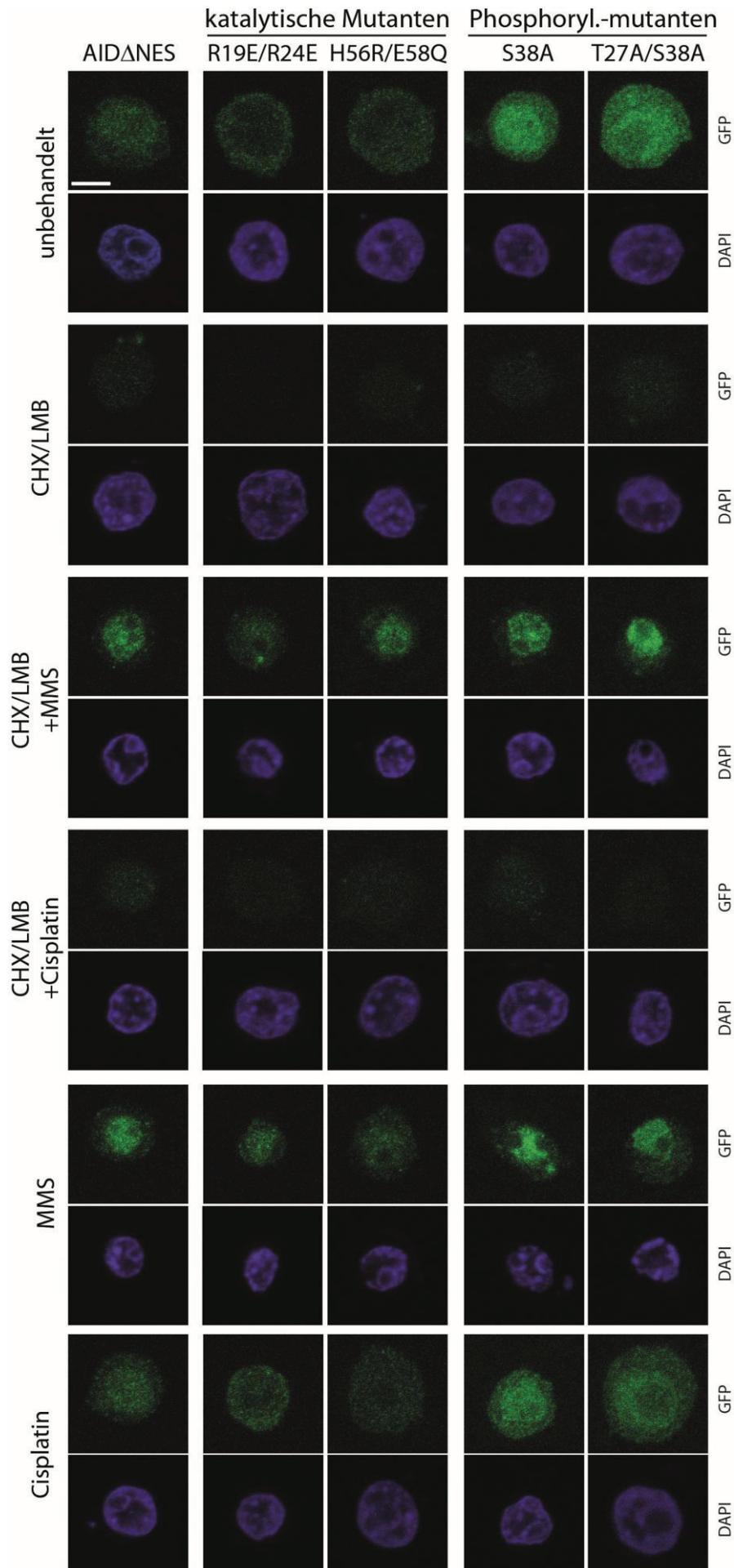
Die Änderungen in der Proteinverteilung des AID $\Delta$ NES-GFP Konstrukts waren nicht so deutlich, da sich diese AID-Variante bereits im Zellkern anreichert und durch den dortigen Abbau schwächere GFP-Intensitäten detektiert werden konnten. Jedoch konnte man deutlich die nukleäre Stabilisierung von AID $\Delta$ NES in MMS- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen erkennen (Abb. 16 mittlere Reihe). Das GFP-Markerprotein änderte seine homogene Verteilung durch die ganze Zelle, die auf Grund von natürlicher Diffusion des 25 kDa-großen GFP Proteins durch die Kernporen zustande kommt, unter keiner der hier angewandten Behandlungsbedingungen (Abb. 16 untere Reihe). Diese Kontrolle deutete auf AID-spezifische Lokalisationsverschiebung und Anreicherung bzw. Abbauhemmung des AID-Moleküls im Zellkern.

### 3.3.1 Proteinstabilität der AID-GFP Mutanten bei exogen induzierten DNA-Läsionen

Aus vorhergehenden Experimenten wurde ersichtlich, dass das aktive AID-Protein im Zellkern langsamer abgebaut wurde als die katalytischen und Phosphorylierungsmutanten (Abb. 12 und 13). Ferner konnte gezeigt werden, dass bei bestimmten exogen induzierten DNA-Schäden (MMS- bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung) überexprimierte funktionelle AID-GFP Fusionsproteine ebenfalls im Zellkern akkumulierten und nicht abgebaut wurden (Abb. 15 und 16). Die sich daraus ergebende Fragestellung, ob und in welchem Ausmaß inaktive AID-GFP Mutanten bei MMS-Behandlung ebenfalls im Zellkern stabilisiert werden würden, wurde mikroskopisch (Abb. 17) und in mit Hilfe von Durchflusszytometrie (Abb. 18) untersucht.

Der Abbau des aktiven AID und der inaktiven Mutanten im Zellkern war deutlich (Abb. 17, CHX/LMB-Fraktion). Die zusätzliche Verabreichung von MMS führte bei allen Konstrukten zu Abbauhemmung von AID im Zellkern, wobei Cisplatin dies nicht bewirken konnte.

Aus Abbildung 17 war zudem ersichtlich, dass eine Cisplatin-Verabreichung auch bei inaktiven AID-Mutanten nichts an der ursprünglichen AID-Menge änderte, während durch MMS-Behandlung eine größere Menge von aktivem und inaktivem AID im Zellkern detektiert werden konnte (vgl. Abb. 15). Für diese subzelluläre Umverteilung von AID wurde kein Zusatz von LMB benötigt. Somit konnten wir den Einfluss von MMS-induziertem genotoxischen Stress auch auf inaktives AID beobachten, welches selbst nicht in der Lage wäre, DNA-Läsionen zu initiieren.



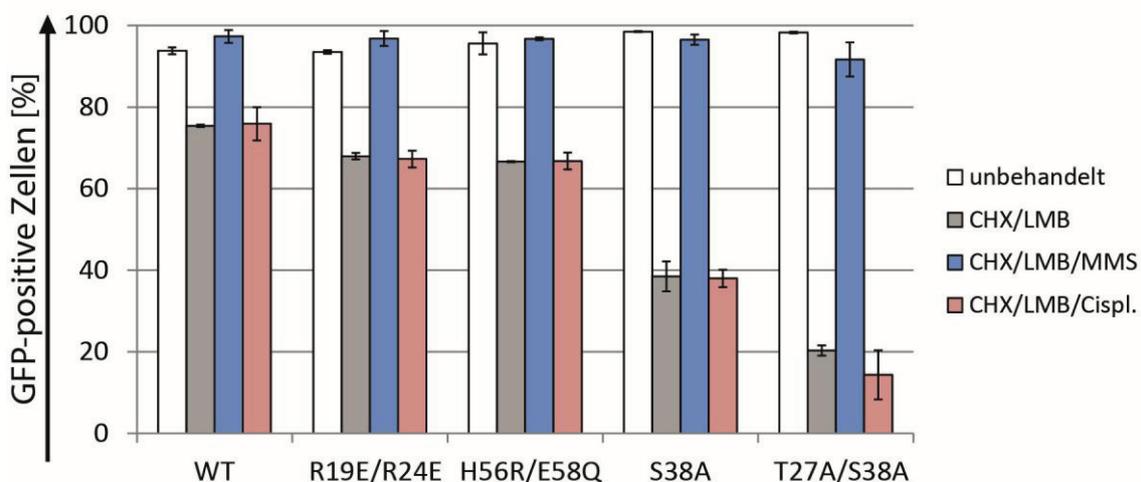
**Abbildung 17: Lokalisation und Stabilität des aktiven und inaktiven AID unter MMS- und Cisplatin einfluss (Mikroskopie)**

Bestimmung der AID-Lokalisation nach 6-stündiger Behandlung in stabil transkribierten DT40 $\Psi$ V/AID $^{-/-}$ -Einzelzellklonen. Ein repräsentatives Bild pro Bedingung/Konstrukt aus je drei Aufnahmen ist dargestellt. CHX: Cycloheximid; LMB: Leptomycin B; MMS: Methylmethansulfonat. DAPI: Zellkernfärbung; Maßbalken: 5  $\mu$ m.

Bei der anschließenden FACS-Analyse (Abb. 18) wird die CHX/LMB-behandelte Zellpopulation durch graue Balken dargestellt. Auch hierbei war deutlich zu sehen, dass das mutierte AID durch diese Behandlung einem schnelleren Abbau unterlag im Vergleich zum WT-AID, wobei die Phosphorylierungsmutanten AID<sup>S38A</sup> und AID<sup>T27A/S38A</sup> (beide rechten Gruppen) eine im Vergleich zu katalytischen Mutanten beschleunigte Degradation aufwiesen. Dies entsprach den Daten aus Abbildung 12.

Die Ergebnisse des Experiments (Abb. 15), in dem eine Kombination aus CHX/LMB/MMS-Behandlung eine Stabilisierung von AID zu Folge hatte, wurden auch bestätigt (Abb. 18, blaue Balken). Bei den AID-Mutanten löste die zusätzliche Verabreichung von MMS in Anwesenheit von CHX/LMB ebenfalls eine vollständige Stabilisierung von AID aus. Dabei spielte es offensichtlich keine Rolle, wie stark das AID-Protein bei CHX/LMB-Einsatz abgebaut wurde. Die Verabreichung von Cisplatin konnte die AID-Proteinstabilität – wie in den vorangegangenen Tests - nicht beeinflussen.

Die Summe der Ergebnisse (Abb. 12, 13, 16, 17 und 18) ließ schlussfolgern, dass sowohl AID-abhängige als auch exogen induzierte DNA-Läsionen zu einer AID-Abbauhemmung im Zellkern führten. Der Abbau in der CHX/LMB-Fraktion hing von der AID-Aktivität ab und war beim aktiven AID am niedrigsten. Allerdings bewirkten exogene, MMS-induzierte DNA-Schäden eine vergleichbar starke Abbauhemmung für inaktive und aktive AID-Formen. Offensichtlich spielte die Funktionalität von AID bei exogenen DNA-Läsionen keine Rolle für sein Abbauverhalten.

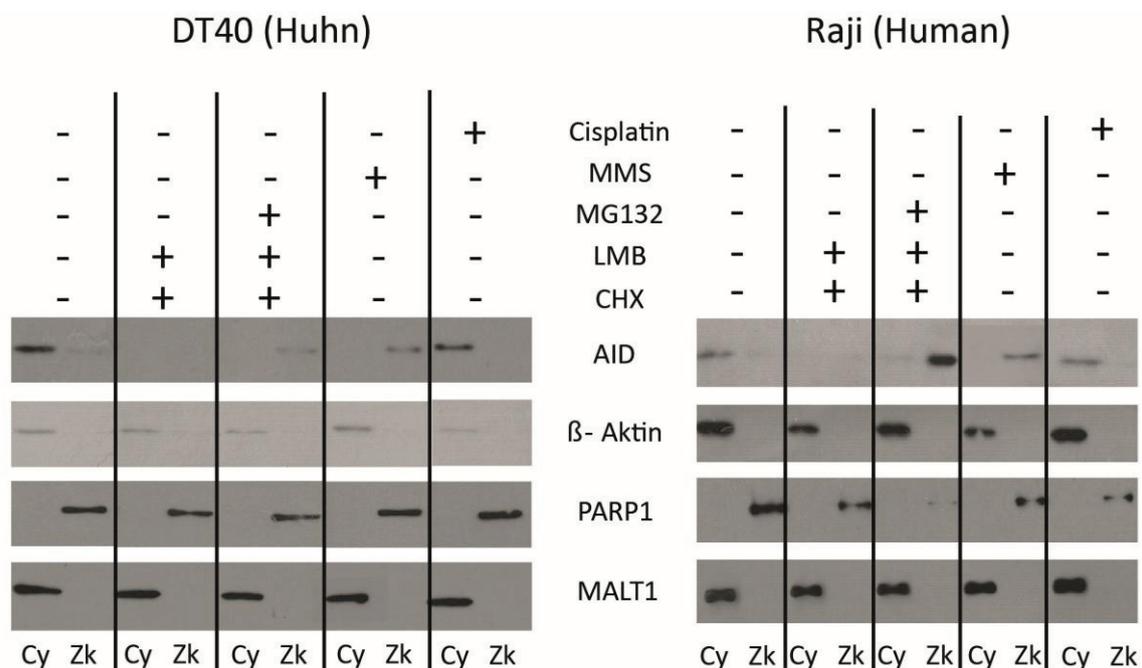


**Abbildung 18: Einfluss von MMS und Cisplatin auf die Proteinstabilität des aktiven und inaktiven AID (FACS)**  
 Bestimmung der AID-Proteinmengen in stabil transfizierten DT40ΨV/AID<sup>-/-</sup>-Einzelzellklonen nach 6-stündiger Behandlung im FACS. Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt, ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. WT: AIDΔNES-GFP; CHX: Cycloheximid; LMB: Leptomycin B; MMS: Methylmethansulfonat; Cispl: Cisplatin.

### 3.4 Proteinlokalisierung des endogenen AID bei exogen induzierten DNA-Läsionen

Um die Erkenntnisse aus den Analysen von überexprimierten AID-GFP Konstrukten für das endogene WT-AID bestätigen zu können, wurde die subzelluläre WT-AID-Lokalisation in Hühner DT40- und humanen Raji-Zelllinien mit Hilfe von Fraktionierungsexperimenten untersucht.

Bei dieser experimentellen Herangehensweise ist die Überprüfung der Reinheitsgrade der jeweiligen Fraktionen entscheidend für die Aussagen zur subzellulären Verteilung des untersuchten AID-Proteins. Die Fraktionen Cytosol (Cy) und Zellkern (Zk), die mittels Zentrifugation getrennt wurden, ließen sich mit dem Nachweis der Proteinmarker überprüfen, die jeweils nur in einem Kompartiment vorkommen (cytosolisches Aktin und nukleäres PARP) (Abb. 19). Die Ergebnisse aus beiden Zelllinien zeigten, dass die Auftrennung erfolgreich und ohne Verunreinigung zwischen den Fraktionen verlaufen ist.



**Abbildung 19: Subzelluläre Verteilung des endogenen AID unter verschiedenen Bedingungen**

Western Blot Analyse des endogenen AID Proteins in DT40 Cre1-Zellen (links) und Raji-Zellen (rechts) nach Fraktionierung. Kontrolle der Cytoplasmafraktion mit Aktin- und der Zellkernfraktion mit PARP-Antikörpern. Cy: Cytoplasma; Zk: Zellkern. Die Inkubationszeit mit den angegebenen Substanzen betrug 5 Stunden. MMS: Methylmethansulfonat; MG132: Proteasom-inhibitor; LMB: Leptomycin B; CHX: Cycloheximid.

Die unbehandelten Zellen zeigten fast ausschließlich cytosolisches AID, mit einem kaum detektierbaren Anteil von AID im Zellkern (Abb. 19). Bei CHX/LMB-Behandlung wurde erwartungsgemäß ein nahezu vollständiges Verschwinden von AID im Zellkern festgestellt, das mit Zugabe des Proteasominhibitors MG132 zum Teil verhindert werden konnte. Dabei wurde das AID in unterschiedlichem Maße in verschiedenen Zelllinien stabilisiert. Eine Fraktionierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen konnte nicht durchgeführt werden, da diese Population eine zum Teil lysierte Membran als Folge des oxidativen Stresses aufwies, sodass die spätere Detergenzbehandlung zur Trennung der Fraktionen nicht mehr möglich war.

Wie auch schon für die exogene AID-GFP Fusion gezeigt (Abb. 16) führte die Inkubation mit MMS in beiden untersuchten Zelllinien zu einer stabilen Anreicherung von endogenem AID im Zellkern (Abb. 19). Diese Beobachtung lieferte einen starken Hinweis auf ein AID-spezifisches Verhalten bei BER-induzierenden DNA-Läsionen in B-Zellen und schloss GFP-Artefakte aus. Ebenfalls vergleichbar zu den AID-GFP-Daten waren die Ergebnisse im Fall der Cisplatin-Behandlung, wo sich keine Änderungen in der subzellulären Verteilung und Stabilität von AID ereigneten (Abb. 19).

Da sich die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Zelllinien sehr ähnelten und sie die Beobachtungen aus den Experimenten mit exogenem AID bestätigten, konnten wir annehmen, dass durch bestimmte DNA-Läsionen AID im Zellkern akkumuliert und es dort nicht zur üblichen proteasomalen AID-Degradation kommt. Um diese Erkenntnisse zu bestätigen, wurde zusätzlich ein cytosolisches Protein, MALT1, untersucht, welches ebenfalls im Stande ist, zwischen Cytosol und Zellkern zu pendeln, und bei Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionswegs in den Zellkern transloziert wird (Nakagawa, Hosokawa et al. 2005). Es sollte ermittelt werden, ob dieses Kontrollprotein bei DNA-Läsionen seine subzelluläre Verteilung ändern und/oder eine Stabilisierung im Zellkern erfahren würde. Bei dem Experiment änderte das cytosolische MALT1-Protein bei keiner der angewandten Bedingungen seine cytosolische Lokalisation oder seine Proteinmengen (Abb. 19). Dieses Resultat bestärkte die Annahme einer AID-spezifischen Abbauehemmung im Zellkern bei MMS-induzierten DNA-Läsionen.

Die Gesamtheit der Ergebnisse deutete stark auf einen physiologischen Zellvorgang hin, bei dem sich das AID Protein nur durch bestimmte, BER-induzierende DNA-Läsionen im Zellkern stabil anreicherte. Diese Beobachtung wurde auch für die inaktiven AID-Versionen im Zellkern gemacht (Abb. 18).

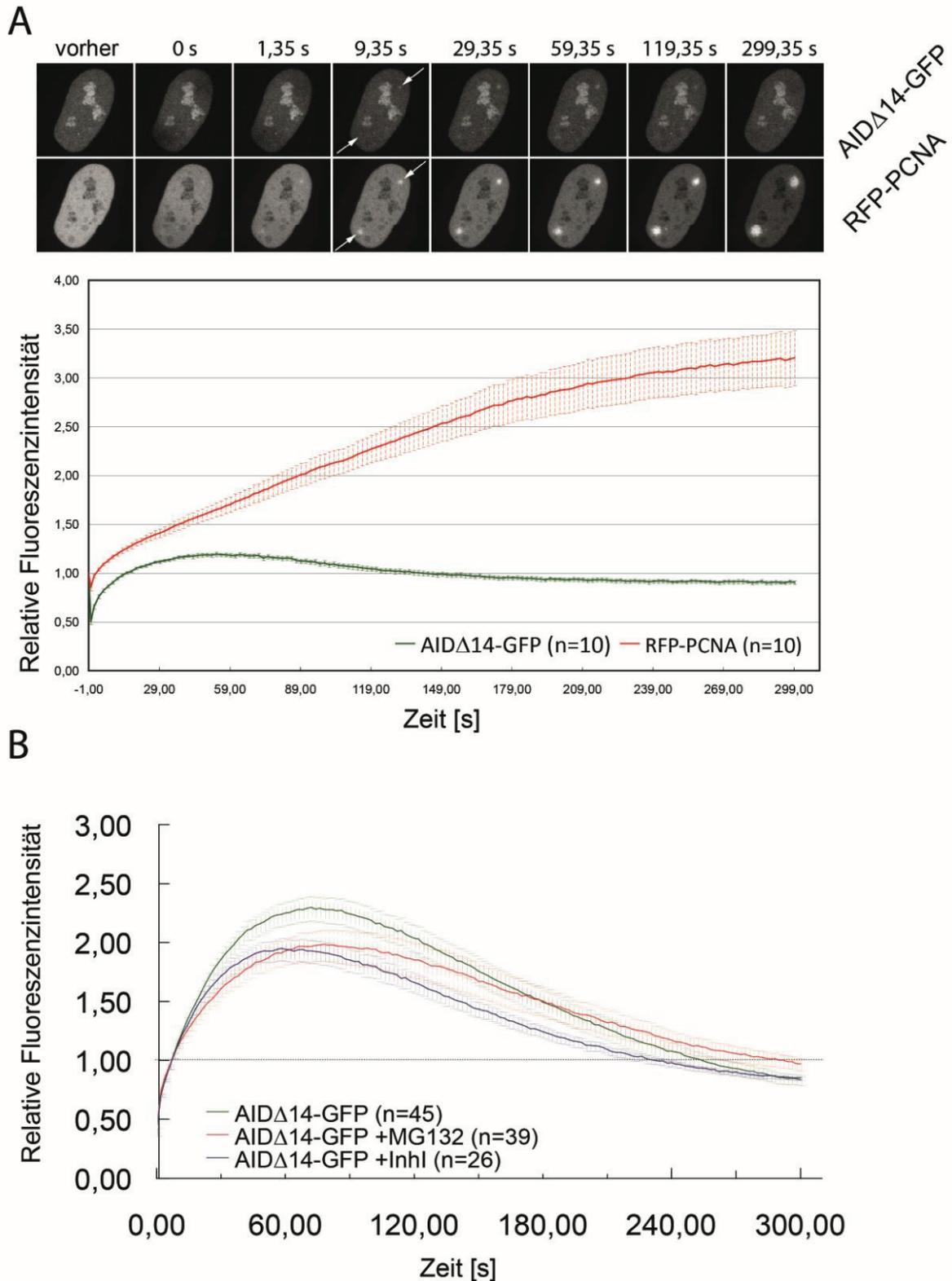
Hypothetisch könnte dieser Prozess durch Signaltransduktionskaskaden, ausgehend von der geschädigten DNA, initiiert werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre die Anreicherung von AID am Chromatin, welches in Folge der MMS-Behandlung als einzelsträngige DNA vorliegen würde und damit von dem AID-Protein leichter gebunden werden könnte. Diese AID-DNA-Bindung könnte den Zugang zur proteasomalen Maschinerie erschweren und somit den AID-Abbau indirekt hemmen.

Um diese beiden Hypothese zu testen, wurden Versuche zur Anreicherung von AID-GFP Fusionsproteinen an DNA-Schäden in lebenden Hela-Zellen durchgeführt (Kapitel 3.5). Ferner wurde untersucht ob MMS-induzierte DNA-Schädigung die Ubiquitinierung von AID beeinflusst (Kapitel 3.6).

### 3.5 AID-Anreicherung an DNA-Läsionsstellen im Zellkern von Hela-Zellen

Eine der möglichen Ursachen für die Stabilisierung von AID im Zellkern wäre die Bindung von AID an geschädigte DNA und dadurch ein erschwerter Export oder eingeschränkter Abbau. Um diese Hypothese zu testen, wurden Hela-Zellen, die das NES-deletierte AID-GFP Fusionsprotein transient exprimierten, einer UV-Bestrahlung unterzogen. Die Anreicherung von AID an den geschädigten DNA-Bereichen wurde durch Lebendzellmikroskopie visualisiert. Die in Abbildungen 20 und 21 dargestellten Experimente und die quantitative Auswertung wurden in Kooperation mit O. Mortusewicz in der Arbeitsgruppe von Prof. Leonhardt an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

UV-Bestrahlung führt in erster Linie zur Ausbildung von Thymin-Dimeren, die durch NER repariert werden (Palomera-Sanchez und Zurita 2011). Ferner kann es in Folge der UV-Behandlung zu Entstehung von SSB und DSB kommen.



**Abbildung 20: Anreicherung von PCNA und AID an DNA-Läsionsstellen im Zellkern von HeLa-Zellen**

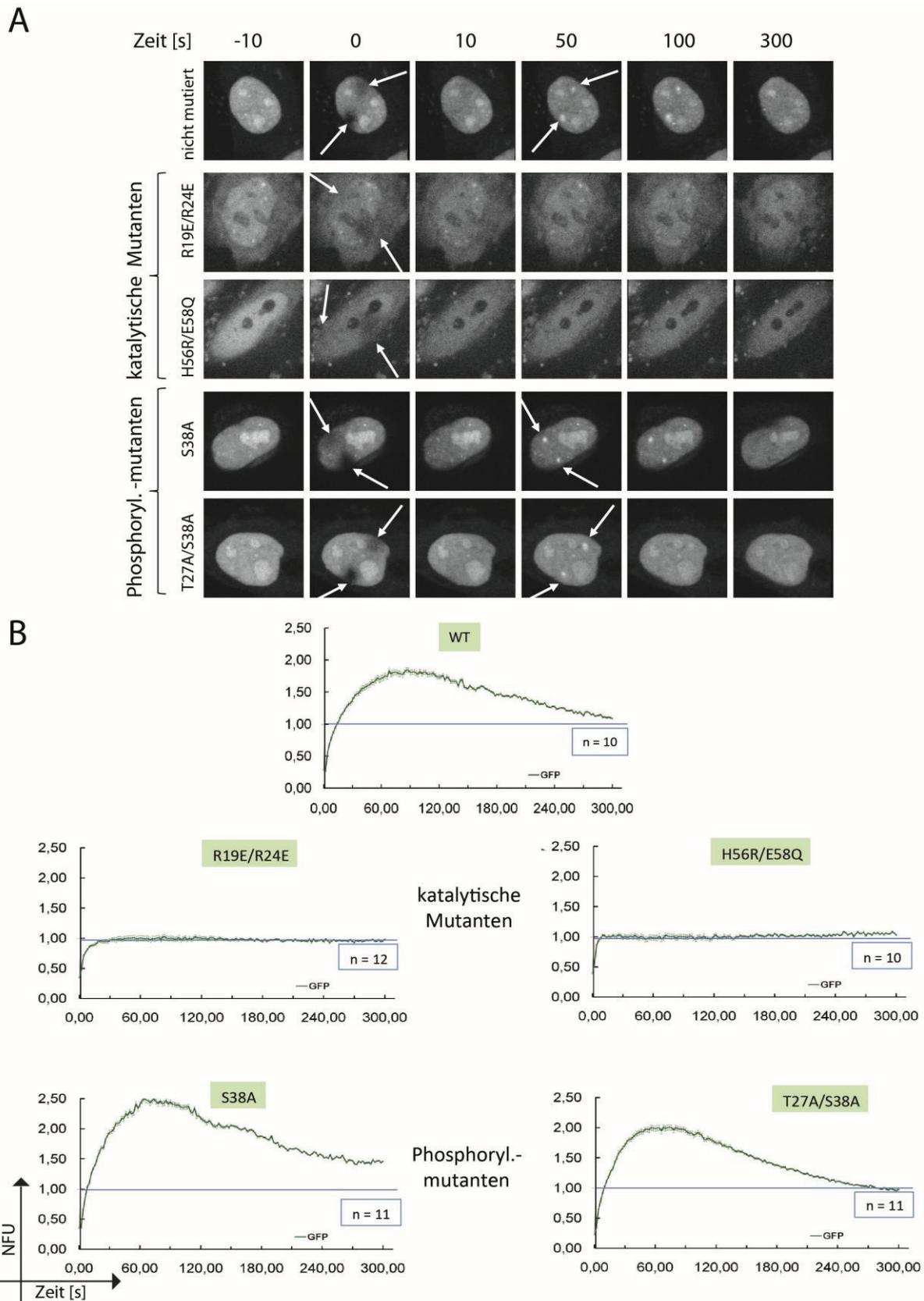
(A) Lebendzellmikroskopie der transient transfizierten HeLa-Kyoto-Zellen mit AID $\Delta$ 14-GFP und PCNA-RFP und quantitative Auswertung der Anreicherung der AID- und PCNA-Proteine an UV-geschädigten DNA-Stellen im Zellkern als Funktion der Zeit (Pfeile). (B) Versuchsdurchführung wie in (A) plus Hemmung des Proteasoms durch Inhibitor I (Inhl) und MG132. n: Anzahl ausgewerteter Aufnahmen. Die Experimente wurden von O. Mortusewicz, AG H. Leonhardt, LMU München durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse (Abb. 20A) eine deutliche Akkumulation von AID $\Delta$ NES-Protein zusammen mit PCNA an den definierten DNA-Läsionsstellen im Zellkern. Während die PCNA-Proteinmenge über einen Zeitraum von fünf Minuten anstieg, verschwand das AID-GFP Protein, nachdem ein GFP-Signal an der geschädigten DNA detektiert werden konnte, nach circa 1,5 Minuten von diesen DNA-Bereichen. Wie die Behandlung mit zwei verschiedenen Proteasominhibitoren zeigte, wirkte sich die Hemmung des Proteasoms nicht auf den Verlauf der transienten Anreicherung von AID (Abb. 20B) aus. Somit musste es andere mechanistische Ursachen für die beobachtete Abnahme der AID-Proteinmenge an der geschädigten DNA geben.

Die UV-Bestrahlung der nukleären AID-Mutanten führte zu unterschiedlichen Ergebnissen (Abb. 21). Während beide katalytischen Mutanten nicht an die Schadensstellen rekrutiert wurden (Abb. 21A, Pfeile), konnte bei Phosphorylierungsmutanten eine dem WT-AID ähnliche vorübergehende Anreicherung an geschädigter DNA festgestellt werden (Abb. 21A und B). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Mutanten-Typen lag in der subzellulären Verteilung von AID in unbehandelten Zellen. In diesen nicht-B-Zellen zeigten die katalytischen Mutanten AID<sup>R19E/R24E</sup> und AID<sup>H56R/E58Q</sup> Rest-AID im Cytoplasma, während bei den Aktivierungsmutanten AID<sup>S38A</sup> und AID<sup>T27A/S38A</sup>, deren katalytische Zentrum intakt ist, ebenso wie beim Wildtyp kein AID außerhalb des Zellkerns detektierbar war (Abb. 21A). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in B-Zellen gemacht, wo bei katalytischen Mutanten anteilig mehr Protein im Cytoplasma gefunden wurde im Vergleich zu Aktivierungsmutanten (Abb. 12).

Zusammenfassend ließ sich eine transiente Anreicherung von AID zusammen mit PCNA an UV-geschädigter DNA in Hela-Zellen feststellen, wobei AID-Mutanten die kein intaktes katalytisches Zentrum aufwiesen (AID<sup>R19E/R24E</sup> und AID<sup>H56R/E58Q</sup>) nicht in der Lage waren, an diesen Stellen zu akkumulieren.

Als Nächstes wurde das Ubiquitinierungsverhalten des AID-GFP Proteins unter MMS-Einwirkung untersucht, um zu überprüfen, ob vielleicht Signaltransduktionkaskaden durch Hemmung von AID-Polyubiquitinierung den Abbau von AID beeinträchtigen.

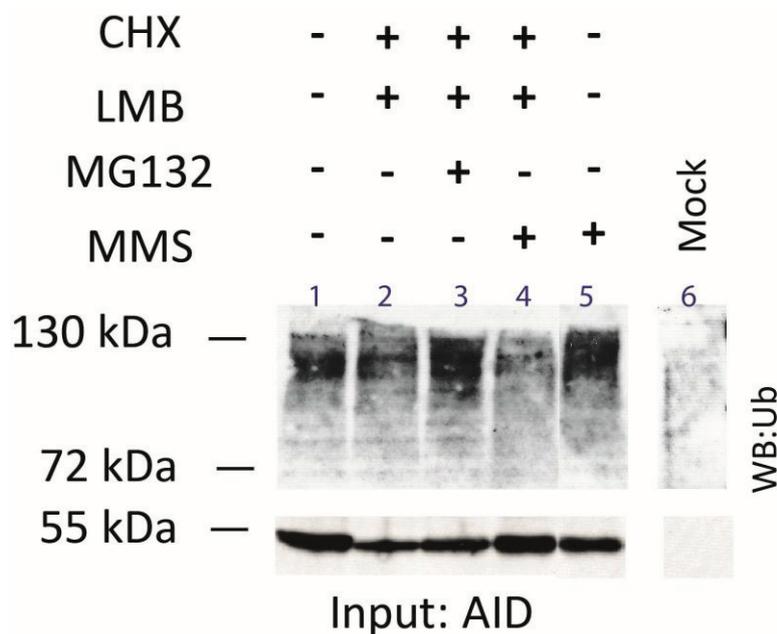


**Abbildung 21: Differenzielle Anreicherung der AID-Mutanten an der UV-geschädigten DNA**

DNA von lebenden, transient transfizierten Hela-Kyoto-Zellen mit AID $\Delta$ 14-GFP und AID-Mutanten wurden durch einen 405 nm-UV-Laser an zwei Stellen im Zellkern geschädigt (Pfeile) und 300 Sekunden lang mikroskopiert. Repräsentative Bilder aus je mindestens 10 Aufnahmen sind dargestellt. (B) Quantitative Auswertung der in (A) erhaltenen Daten für GFP-Fluoreszenzintensität an den geschädigten Bereichen als Funktion der Zeit. n: Anzahl der durchgeführten Aufnahmeserien, NFU: normierte Fluoreszenzeinheiten.

### 3.6 AID-Ubiquitinierung bei DNA-Läsionen

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich wurde, nahm die AID-Proteinmenge bei CHX/LMB-behandelten Proben ab (Spur 2), wobei die gleichzeitige Hemmung des Proteasoms durch MG132 (Abb. 22, Input) die AID-Menge stabilisierte (vgl. Abb. 19). Die so behandelten Zellen (Spur 3) zeigten bei der Immunpräzipitation des ubiquitinierten AID-Proteins erwartungsgemäß die stärksten Polyubiquitinierungsbanden (Abb. 22, WB).



**Abbildung 22: AID-Ubiquitinierung nach MMS-induzierten DNA-Läsionen**

Immunpräzipitationsassay in mit HA-AID-GFP stabil transfizierten DT40 $\Psi$ V/AID<sup>-/-</sup> Zellen nach 5-stündiger Behandlung. 1% des verwendeten Lysats wurde als Input aufgetragen und mit  $\alpha$ -AID detektiert. WB:  $\alpha$ -Ubiquitin. Mock: Agarose-gekoppelte HA-beads nur mit Lysepuffer inkubiert, CHX: Cycloheximid, LMB: Leptomycin B, MMS: Methylmethansulfonat, Ub: Ubiquitin, WB: Western Blot.

In der CHX/LMB/MMS-Spur (4. Spur) konnte man im Vergleich zur CHX/LMB-Fraktion mehr AID-Protein in der Inputfraktion detektieren, vergleichbar zu Abbildungen 17 und 18. Gleichzeitig konnte eine leichte Abnahme der AID-Polyubiquitinierung festgestellt werden (vgl. Spur 2 und 4), die eventuell für die beobachtete AID-Abbauhemmung bei DNA-Läsionen in Frage kommen könnte.

## 4. DISKUSSION

Das Enzym AID reguliert im Menschen zwei unterschiedliche und für das adaptive Immunsystem unentbehrliche Prozesse: CSR und SHM. AID könnte aber auch in transkribierten nicht-Ig-Genen im Keimzentrum zu DNA-Sequenzänderungen führen. Um die genomische Integrität der B-Zellen zu gewährleisten, muss die AID-Aktivität daher strenger Regulation unterliegen. Transkriptionelle Kontrolle von AID ist die am meist untersuchte Ebene der AID-Regulation (Crouch, Li et al. 2007) und ein wichtiger posttranslationaler Regulationsfaktor, PKA, ist im Zusammenhang mit der AID-Aktivierung im Zellkern ebenfalls gut analysiert (Chatterji, Unniraman et al. 2007). Wie AID im Zellkern seine Ziel-DNA findet und bindet, ist bislang nur teilweise aufgeklärt. Ebenfalls unklar ist, welche Mechanismen zur Umgehung der fehlerfreien Reparaturwege in Immunglobulin-Loci im Gegensatz zum restlichen transkribierten Genom führen, welches überwiegend fehlerfrei repariert wird.

Da dereguliertes AID häufig zu Lymphomentstehung führen kann, war ein besseres Verständnis des Regulationsnetzwerkes des AID-Proteins das Ziel dieser Dissertation. Im Fokus meiner Arbeit lag die Regulationsanalyse des beschriebenen nukleären AID-Abbaus (Aoufouchi, Faili et al. 2008). Insbesondere sollte der Einfluss von AID-Aktivität auf AID-Lokalisation und -Degradation beleuchtet werden, um somit Einblicke in mögliche weitere Ebenen und Mechanismen im Netzwerk der posttranslationalen AID-Regulation gewinnen zu können.

### 4.1 Vergleichende Analyse verschiedener AID-GFP Konstrukte

In früheren *in vivo* Studien in unserem Labor konnte in den tonsillären Zellen von Mononukleose-Patienten das endogene AID ausschließlich im Cytoplasma detektiert werden (Tobollik, Meyer et al. 2006). Eine Variante des eng mit AID verwandten APOBEC3-Proteins, ABOBEC3F, ist ebenfalls cytoplasmatisch, wohingegen die Varianten 3A und 3B im Zellkern lokalisiert sind (Bennett, Diner et al. 2006). Von der am besten untersuchten Variante 3G weiß man, dass sie aktiv im Cytosol zurückgehalten wird (Stenglein, Matsuo et al. 2008). Eine zunächst vermutete Funktion für AID im Cytoplasma wäre die mRNA-Editierung (Muramatsu, Sankaranand et al. 1999; Ito, Nagaoka et al. 2004); diese Ansicht wird aber sehr kontrovers

diskutiert, da mittlerweile eine AID-Funktion als DNA-editierendes Enzym im Zellkern gezeigt ist (Petersen-Mahrt, Harris et al. 2002; Dickerson, Market et al. 2003).

Meine Aufgabe war es zu untersuchen, ob und welche AID-GFP Fusionsproteine, wenn stabil in B-Zelllinien exprimiert, diese cytosolische Verteilung ebenfalls zeigen würden. Auch die Aktivität dieser überexprimierten Konstrukte wurde analysiert.

Wir vermuten, dass die cytosolische Anreicherung von AID als Folge von zellulären Schutzmechanismen zu verstehen ist, durch die eine Zelle die DNA und das mutagene und somit potenziell gefährliche AID-Enzym getrennt in verschiedenen Kompartimenten hält und somit den AID-Zugang zur DNA streng kontrolliert.

#### 4.1.1 Lokalisation und Expression der AID-GFP Fusionsproteine

Vergleichbar zum endogenen AID-Protein akkumulierten die GFP-AID und AID-GFP Fusionsvarianten in beiden Zellsystemen fast ausschließlich im Cytoplasma. Beide Proteine zeigten wegen des starken  $\beta$ -Aktin-Promoters erwartungsgemäß eine im Vergleich zum endogenen AID-Protein höhere Expression. Die cytosolische Verteilung war nicht B-Zell-spezifisch, wie wir und andere bei Untersuchungen an HeLa und HEK293-Zellen zeigen konnten (Rada, Jarvis et al. 2002).

Bei der vergleichenden Analyse der subzellulären Verteilung von N- vs. C-terminal fusionierten AID-GFP Proteinen wurde eine deutlich schwächere nukleäre Lokalisation des N-terminalen GFP-AID Konstrukts bei Hemmung des nukleären Exports festgestellt. Es gibt ähnliche Beobachtungen zur geringeren Anreicherung von N-terminalem GFP-AID Fusionsprotein in den Zellkernen von HEK293-Zellen bei Exporthemmung (McBride, Barreto et al. 2004); als mögliche Ursache dafür wurden der aktive AID-Export aus dem Zellkern oder eine cytoplasmische Bindung von GFP-AID angeführt. Nichtsdestotrotz war dieses Protein im unbehandelten *steady state* Zustand in der Lage, im Zellkern zu lokalisieren sowie SHM in DT40 B-Zellen zu induzieren.

Da wir wissen, dass eine NLS am aminoterminalen Ende von AID vorhanden ist (Patenaude, Orthwein et al. 2009), gehen wir davon aus, dass die Maskierung von diesem Proteinbereich durch GFP den nukleären AID-Import hemmen könnte und dadurch die beobachtete subzelluläre Verteilung bei Exporthemmung erklären könnte.

#### 4.1.2 Funktion und Degradation der AID-GFP Fusionsproteine

Bei der Funktionsanalyse der WT-AID Proteine im Vergleich zu den NES-deletierten Konstrukten in DT40 B-Zellen konnte man feststellen, dass die SHM-Aktivität bei den nukleären AID-Formen leicht erhöht war. Man könnte an dieser Stelle schlussfolgern, dass die physische Nähe von AID zu DNA die Zielführung bzw. die Aktivität von AID positiv beeinflussen würde. Allerdings zeugten vergleichbare Ergebnisse zu den NES-deletierten AID-Konstrukten in prokaryotischen Zellen (*E.coli*) davon, dass der C-terminale Bereich neben der Exportfunktion über die Zellkernmembran auch weitere Funktionen haben könnte (Barreto, Reina-San-Martin et al. 2003; McBride, Barreto et al. 2004). Ta et al., konnte in einer *E.coli*-Studie allerdings keine Unterschiede feststellen (Ta, Nagaoka et al. 2003). Während in NIH3T3-Zellen eine erhöhte SHM-Rate von NES-depletierten AID-Proteinen beschrieben wurde (Ito, Nagaoka et al. 2004), finden sich auch Berichte über eine erhöhte Genkonversionsrate bei diesen AID-Varianten in DT40-Zellen (Barreto, Reina-San-Martin et al. 2003). Interessanterweise gibt es Hinweise, dass die SHM-Aktivität von NES-deletierten AID-Proteinen auch in nicht-Ig-Genen erhöht ist (Aoufouchi, Faili et al. 2008). Da hier gegenläufige Ergebnisse vorliegen, lassen sich keine konsistenten Aussagen zu der erhöhten SHM bei Akkumulation von AID im Zellkern treffen.

Nach der Deletion der letzten 14 Aminosäuren, die die NES-Sequenz umfassen, konnte ich eine Anreicherung von AID im Zellkern von Raji und DT40-Zellen zeigen. Die Expressionstärke dieser nukleären AID-GFP Konstrukte war, wie auch durch Aoufouchi et. al., beschrieben, deutlich schwächer. Die Vermutung, dass es sich bei diesem Phänomen um nukleären AID-Abbau handeln könnte, wurde durch diese Studie aufgeklärt (Aoufouchi, Faili et al. 2008). Hier wurde an überexprimierten AID-GFP Proteinen der proteasomale AID-Abbau nach AID-Ubiquitinierung im Zellkern gezeigt. Diese Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen aus meiner Studie an endogenem AID, überexprimierten WT-AID und AID-GFP Proteinen überein. Dabei wurde die nukleäre Degradation von AID sowohl in B- als auch in nicht-B-Zellen nachgewiesen.

Bei der Analyse der AID-Lysinreste, die für die proteasomale Degradation im Zellkern ubiquitiniert werden konnten, stellten wir fest, dass keines der 3 konservierten Lysinreste, wenn einzeln mutiert, für die Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau in Frage kam. Auch Aoufouchi et al., haben keine Änderung der AID-Ubiquitinierung für 5 mutierte Lysinreste detektieren können (Aoufouchi, Faili et al. 2008). Allerdings konnte in dieser

Studie die Ubiquitinierung und der Abbau deutlich gesenkt aber nicht komplett verhindert werden, wenn man alle 8 vorhandenen AID-Lysine mutiert hatte (K-null-Mutante).

Während die Autoren die Möglichkeit der aminoterminalen Ubiquitinierung des AID-Proteins, welches kein Lysinrest erfordert, für den beobachteten Abbau des AID-Proteins in Betracht zogen, muss an dieser Stelle die für diese Studie verwendete AID-GFP Fusion kritisch diskutiert werden. Der GFP-Marker selbst enthält 20 Lysinreste, die ebenfalls für den Abbau hätten verwendet werden können; insofern steht eine eindeutige mechanistische Beschreibung des AID-Ubiquitinierungsprozesses noch aus.

## 4.2 Der proteasomale Abbau von AID wird von seiner Aktivität beeinflusst

Der nukleäre proteasomale AID-Abbau könnte eine weitere Ebene in unserer Hypothese vom Schutzmechanismus der Zelle darstellen, bei dem die nukleären AID-Mengen möglichst gering gehalten werden. Zusätzlich zum AID-Export und dem aktiven Zurückhalten von AID im Cytoplasma (Patenaude und Di Noia 2010) könnten durch den AID-Abbau im Zellkern die AID-Proteinmenge ebenfalls effizient minimiert werden. Unserer ursprünglichen Hypothese nach würde das funktionelle AID im Zellkern z.B. mit Hilfe von Rückkopplungsmechanismen abgebaut werden, da es auf Grund seiner mutagenen Eigenschaft für die Zelle gefährlich sein könnte.

Um diese Hypothese zu testen, wurde das Abbauverhalten von inaktiven AID-Mutanten untersucht, die nicht mehr in der Lage waren, DNA-Läsionen einzuführen und somit SHM zu induzieren. Unserem Arbeitsmodell nach könnten diese nicht-mutagene AID-Mutanten nicht oder weniger gut einen solchen Schutzmechanismus auslösen und wären somit stabiler als aktives AID im Zellkernkompartiment.

### 4.2.1 Expression und Abbauverhalten verschiedener AID-Mutanten

Erwartungsgemäß zeigten alle generierten AID-Mutanten eine hochsignifikant eingeschränkte Funktionalität. Die Expressionsanalyse der NES-deletierten Mutanten zeigte allerdings eine erhöhte AID-GFP Fluoreszenzstärke bei Phosphorylierungsmutanten auf. Da diese Unterschiede bei NES-profizienten AID-Proteinen nicht auftraten, haben wir die Ursachen für die Beobachtung an dieser Stelle nicht weiterführend untersucht, sondern sichergestellt, dass sie nicht in weiteren Mutationen der entsprechenden Konstrukte begründet liegen. Trotz dieser noch ungeklärten Fluoreszenzintensitätsunterschiede konnte

man mit Hilfe dieser Mutanten Erkenntnisse zur Regulation der AID-Degradation durch AID-Aktivität gewinnen.

Die vergleichende Abbauanalyse sowohl durch konfokale Mikroskopie als auch durch eine FACS-Studie zeigte überraschenderweise einen quantitativ schnelleren Abbau der AID-Mutanten im Vergleich zum WT-AID. Somit konnte postuliert werden, dass entgegen unserer ursprünglichen Annahme, bei der die Mengen des aktiven AID-Proteins im Zuge einer Schutzreaktion vor DNA-Schädigung im Zellkern minimiert werden würden, das aktive AID Protein im Zellkern stabilisiert wurde.

Die Stabilisierung von aktivem AID erfolgte ebenfalls, wenn NES-deletiertes AID-Protein, welches nur SHM, aber nicht mehr CSR initiieren kann, untersucht wurde. Das sprach dafür, dass die 14 C-terminalen Aminosäuren vermutlich nicht ursächlich für diese Stabilisierung waren.

Die anfänglich beobachtete Erhöhung der AID-Menge bei den NES-defizienten Phosphorylierungsmutanten AID<sup>S38A</sup> und AID<sup>T27A/S38A</sup> konnte nicht auf verstärkte Proteinstabilität dieser Mutanten zurückgeführt werden, da diese ebenfalls schneller als das WT-AID Protein abgebaut wurden.

#### 4.3 Die BER-aktivierenden Substanzen MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stören den AID-Abbau

Im nächsten Schritt musste ausgeschlossen werden, dass das verstärkte Abbauverhalten durch mutationsbedingte Strukturveränderung der Mutanten zustande kam, die zu Faltungsstörungen und somit zu Abbaubeschleunigung führen könnte (Goldberg 1972; Sherman und Goldberg 2001). Um zusätzlich sicherzustellen, dass DNA-Läsionen durch AID als Trigger ausgelöst werden, wurde versucht, AID-Aktivität durch exogene Substanzen zu simulieren.

Bei den durch MMS- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung eingeführten DNA-Schäden konnten wir zwei Effekte beobachten: (i) Translokation von AID in den Zellkern und (ii) die dortige Stabilisierung des AID-Proteins (wie schon für aktives AID detektiert). Diese Ergebnisse lieferten starke Evidenzen für den Einfluss von AID-Aktivität auf seine Lokalisation und Proteinstabilität. Die SSBs- und abasische Stellen induzierenden Substanzen MMS und Wasserstoffperoxid bewirkten eine deutlich stärkere Hemmung des AID-Abbaus im Vergleich zum primär DSB- und somit DSBR-induzierenden Etoposid. Dieses Agens führte zwar zu einer

leichten Hemmung des AID-Abbaus, bewirkte allerdings so gut wie keine Lokalisationsänderung von AID in den Zellkern.

Da Cisplatin-induzierte DNA-Schädigung, die durch Quervernetzungen der DNA den NER-Weg induziert, keine Effekte zeigte, konnte die Art der DNA-Läsionen, die Änderungen in AID-Lokalisation und –Stabilität hervorrufen, auf abasische Stellen und DNA-Strangbrüche (überwiegend Einzelstrangbrüche) eingegrenzt werden. Diese Art von DNA-Schäden entsteht auch durch AID-Aktivität.

Ob die Lokalisationsänderung vom Cytosol in den Zellkern durch verstärkten AID-Import, gehemmte AID-Degradation oder nukleäre Retention zu Stande kommt, haben wir untersucht und zum Teil geklärt. Da nach zweistündiger MMS-Behandlung die subzelluläre AID-Verteilung der AID-Lokalisation bei Exporthemmung sehr ähnelte (Daten nicht gezeigt), konnten wir annehmen, dass AID durch MMS-Einwirkung im Zellkern zurückgehalten wird. Der in FACS-Studien beobachtete AID-Abbau trat zu einem späteren Zeitpunkt auf, auch die spezifische Proteasomhemmung konnte eine AID-Stabilisierung erst nach vier Stunden bewirken. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es ein Zusammenspiel aus den Faktoren Exporthemmung und proteasomaler Abbau ist, das für die beobachteten AID-Effekte verantwortlich gemacht werden könnte. Dabei wird vermutlich zunächst das Transportverhalten von AID und erst später der proteasomale AID-Abbau durch genotoxischen Stress gestört.

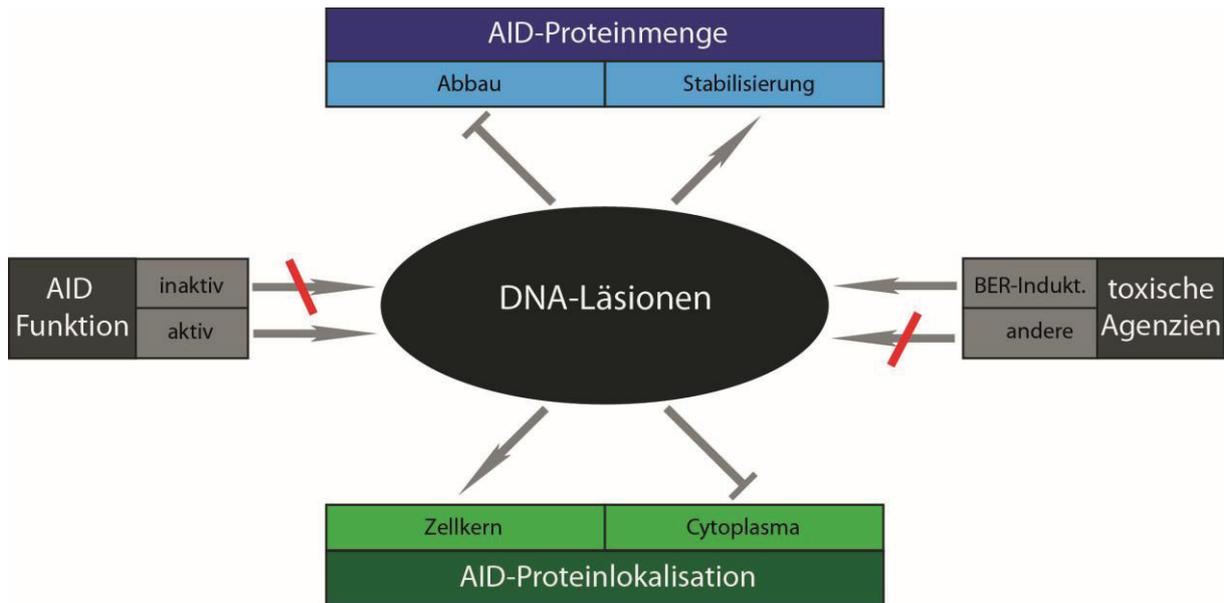
Artefakte, die durch Überexpression und/oder durch den GFP-Marker zu Stande kommen könnten, wurden durch Experimente an endogenem AID ausgeschlossen. Auch das endogene AID wurde in zwei verschiedenen Zelllinien bei den durch MMS verursachten DNA-Läsionen im Zellkern lokalisiert und dort nicht abgebaut.

Durch die zusätzliche Analyse von einem weiteren Shuttling-Protein, MALT1 (Nakagawa, Hosokawa et al. 2005), das in unbehandelten Zellen eine cytosolische Lokalisation zeigt, konnte bestätigt werden, dass es sich bei der beobachteten AID-Lokalisationsänderung um einen AID-spezifischen Vorgang handeln muss. MALT1 blieb bei MMS-, Cisplatin- und MG132-Behandlung stets cytosolisch und auch seine Proteinmengen blieben unverändert. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass DNA-Schäden einen globalen und unspezifischen Einfluss auf den Transport über die Kernmembran ausübten. Ferner konnte davon ausgegangen werden, dass es eine physiologische Basis für die AID-Stabilisierung im Zellkern geben müsste.

Eine verstärkte nukleäre Lokalisation von AID konnte bei Wasserstoffperoxid-Behandlung ebenfalls in nicht-B-Zellen beobachtet werden (Brar, Watson et al. 2004). Hierbei konnten auch weitere Strangbruch-induzierende Agenzien wie Bleomycin und  $\gamma$ -Strahlung die AID-Mengen im Zellkern deutlich erhöhen. Daher wurden in dieser Studie ebenfalls die DNA-Strangbrüche als Ursache für die beobachtete AID-Lokalisation im Zellkern vermutet. Die AID-Proteinstabilität und der physiologische Vorgang, der zu der nukleären Anreicherung von AID führen könnte, wurden in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht. Die Autoren mutmaßten, dass sich DNA-Strangbrüche als affin für AID erweisen könnten und somit während der Antikörperherstellung AID-abhängige Prozesse (CSR und SHM) initiieren könnten.

#### 4.4 Arbeitshypothese: Der nukleäre AID-Abbau wird bei BER-induzierenden DNA-Schäden gehemmt

Die leicht stärkere Aktivität der AID-Phosphorylierungsmutanten im Vergleich zu katalytischen Mutanten (Abb. 11A) und die gleichmäßige subzelluläre Verteilung von katalytischen AID $\Delta$ NES-Mutanten im Vergleich zu dem vorwiegend nukleären aktiven AID $\Delta$ NES-Protein (Abb. 12A) deuteten einen ersten Zusammenhang zwischen AID-Aktivität und -Lokalisation an. Zusammen mit weiteren Erkenntnissen aus Experimenten mit exogen geschädigter DNA bekamen wir ein umfassendes deskriptives Bild zur subzellulären Verteilung des AID-Proteins und seiner Halbwertszeit unter Einwirkung von AID-Aktivität oder genotoxischen Substanzen wie MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 23). Die Auswirkungen der AID-Aktivität auf seine subzelluläre Verteilung und Proteinstabilität konnten sowohl für das endogene WT-AID als auch für AID-GFP Fusionsproteine beobachtet werden, was Fusionsartefakte und Abhängigkeit von der Proteingröße bei der subzellulären Umverteilung des AID-Proteins ausschließt.



**Abbildung 23: Das Arbeitsmodell zur Stabilisierung von AID im Zellkern nach BER-induzierenden DNA-Läsionen**

Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen der AID-Aktivität, -Lokalisation und -Proteindegradation. Das aktive AID oder BER-induzierende Agenzien wie MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und z.T. Etoposid verursachen DNA-Läsionen, bei denen es sich hauptsächlich um abasische Stellen und/oder Einzelstrang-DNA handelt. Diese DNA-Schäden führen durch eine Feedback-Regulation dazu, dass das AID-Protein aus dem Cytoplasma in den Zellkern wandert und dort durch Hemmung der AID-Degradation stabilisiert wird.

Zwei mögliche Wege für die beobachtete Stabilisierung von aktivem AID kommen in Betracht und werden im nächsten Abschnitt ausführlich diskutiert: Einerseits könnte AID unzugänglich für das Ubiquitin-Proteasom-System sein, weil es möglicherweise an die DNA-Chromatinstruktur gebunden ist. Andererseits könnten Signalwege, ausgehend von AID-gesetzten DNA-Schäden, die AID-Ubiquitinierung beeinflussen und schließlich zum eingeschränkten Abbau führen.

#### 4.4.1 AID-Chromatinbindung als mögliche Ursache für Abbauhemmung

Eine mögliche Regulationsebene des proteasomalen Abbaus ist die physische Abschirmung des AID-Proteins von beispielsweise Ubiquitinierungsenzymen oder dem Proteasom selbst. Um verstehen zu können, in welchen Bereichen das AID-Protein bei DNA-Läsionen im Zellkern akkumuliert, wurde die Proteinverteilung von AID in lebenden Hela-Zellen bei DNA-Schädigung durch UV-Strahlung untersucht.

Die Lebendzellmikroskopie-Analyse der UV-bestrahlten Zellkerne zeigte, dass das WT-AID sich innerhalb von einer Minute zusammen mit dem PCNA-Molekül an den Stellen der geschädigten DNA anreicherte. Das AID-Protein war dort innerhalb von 5 Minuten nicht

mehr detektierbar. Dieser Vorgang war allerdings nicht auf den proteasomalen Abbau zurückzuführen, da er auch bei gehemmtem Proteasom stattfand.

Die bis *dato* nicht beschriebene Kolo-kalisation von AID mit PCNA an den Bereichen der DNA-Schäden könnte einerseits auf Grund von passiver AID-Bindung an geschädigte (einzels-trängige) DNA passieren, z.B. durch AID-RPA-Bindung (Weill und Reynaud 2004). Andererseits könnte diese Beobachtung einen Anhaltspunkt für die Hypothese liefern, dass das AID in irgendeiner Form an der Prozessierung oder Reparatur der DNA beteiligt sein könnte. Diese Beteiligung könnte positiv sein, da AID bekanntermaßen BER-Reparatur-faktoren (Mbd4-Glykosylase) binden kann (Rai, Huggins et al. 2008) und somit als Plattform für BER dienen kann.

Aus Interaktionsstudien über TAP-markiertes AID und coIP-Experimenten konnte in unserem Labor in vorangegangenen Studien ebenfalls eine AID-PCNA-Interaktion nachgewiesen werden. Da viele Reparaturproteine PCNA als Bindeplattform nutzen, könnte die Bindung von AID an den geschädigten Stellen auch die Entscheidung zwischen fehlerfreier und fehlerhafter Reparatur beeinflussen, indem durch PCNA-AID-Bindung die Bindungsaffinität von PCNA zu bestimmten Polymerasen beeinflusst und so der Reparaturmodus bestimmt wird. Das gebundene AID könnte alternativ bestimmte Reparaturwege sterisch behindern. Dies wäre eine Möglichkeit, eine fehlerhafte Reparatur der AID-induzierten Schäden zu bevorzugen, was SHM oder CSR begünstigen würde.

Ob das AID von PCNA an die DNA-Schäden rekrutiert wird oder durch einen anderen Mechanismus dorthin gelangt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Jüngsten Erkenntnissen zu Folge fungiert AID nicht nur als Cytidin-Deaminase, es kann auch durch Desaminierung von <sup>Met</sup>Cytidinen diese zu Thyminen umwandeln (Morgan, Dean et al. 2004; Popp, Dean et al. 2010). Diese AID-Funktion wird offensichtlich zur epigenetischen Modulierung von u.a. Keimbahnzellen genutzt (Chahwan, Wontakal et al. 2010), was die Expression von AID in diesen Zellen erklären könnte (Schreck, Buettner et al. 2006). Mittlerweile hat sich diese Eigenschaft von AID auch als wichtig für die Reprogrammierung von somatischen Zellen zu pluripotenten Stammzellen erwiesen (Bhutani, Brady et al. 2010; De Carvalho, You et al. 2010).

Es ist bekannt, dass durch Rekrutierung von oxidativen Demethylierungsenzymen an alkylierende Schäden Reparaturvorgänge initiiert werden können (Aas, Otterlei et al. 2003).

Das Szenario einer AID-Rekrutierung an geschädigte DNA, um dort durch seine Demethylase-Funktion an DNA-Reparaturprozessen beteiligt zu sein, wäre daher auch denkbar.

Auf der Suche nach Mechanismen der Zielführung von AID an die DNA entstand in den letzten Jahren die Hypothese, dass die angehaltene RNA-Polymerase II bei DNA-Schäden das AID-Protein - via Bindung an den Elongationsfaktor Spt5 - an die einzelsträngige DNA in den geöffneten Transkriptionsblasen rekrutiert (Canugovi, Samaranayake et al. 2009; Pavri, Gazumyan et al. 2010). So könnte man sich den Ablauf der AID-abhängigen SHM in transkribierten Ig-Genen vorstellen. Ob durch die Rekrutierung von AID an die UV-geschädigte DNA in unserem Experiment AID-abhängige DNA-Läsionen und später Mutationen eingeführt werden sollten, könnte eine Untersuchung der DNA-Mutationsrate an den geschädigten Loci vor und nach der Bestrahlung beantworten.

Das Rekrutierungsmuster der AID-Mutanten an die UV-geschädigte DNA fiel unterschiedlich aus. Während die beiden katalytisch inaktiven AID-Formen AID<sup>R19E/R24E</sup> und AID<sup>H56R/E58Q</sup> keine Rekrutierung zu diesen DNA-Bereichen zeigten, waren die Phosphorylierungsmutanten AID<sup>S38A</sup> und AID<sup>T27A/S38A</sup> wie auch das WT-AID innerhalb von 60 Sekunden an den UV-geschädigten Stellen im Zellkern zu sehen.

Das AID-Protein ist mit 24 kDa verhältnismäßig klein und weist eine kompakte „Fass“-Struktur auf. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die katalytischen Doppelmutationen die Faltung und somit die Expression des Proteins stören könnten, was die fehlende Rekrutierung an die geschädigten DNA-Bereiche erklären könnte. Allerdings gehen die Autoren, die die Kristallstruktur des naheverwandten APOBEC-2-Proteins aufgelöst haben und darauf ihre Vorhersagen zur Struktur von AID treffen, davon aus, dass die Mutationen R24, H56 und E58 die Faltung nicht stören sollten (Prochnow, Bransteitter et al. 2007); diese AID-Mutationen werden auch in B-Zellen der Hyper-IgM-2-Patienten gefundenen. Vielmehr könnten Mutationen in großen hydrophoben AID-Aminosäuren wie W80 und L106, die im Inneren des gefalteten AID-Proteins liegen, eine Faltungsstörung verursachen.

Eine funktionelle Erklärungsmöglichkeit für das differentielle Akkumulationsverhalten von unterschiedlichen AID-Mutanten an den geschädigten DNA-Bereichen wäre die Integrität des aktiven Zentrums (Deaminase-Motiv) von AID. Das WT-Protein und die beiden Aktivierungsmutanten haben ein intaktes Deaminase-Motiv; die Inaktivität der Phosphorylierungsmutanten kommt durch die gehemmte Aktivierung des AID-Proteins und nicht durch die

Hemmung des aktiven Zentrums *per se* zu Stande. Im Gegensatz dazu haben beide katalytischen Mutanten ein zerstörtes bzw. ein strukturell bedingt unzugängliches aktives Zentrum, sodass die Substratbindung durch Zn-Koordination dort nicht möglich ist.

Die AID-DNA-Bindung kann beim WT-AID beobachtet werden, welches die PKA-abhängige AID-RPA-Interaktion eingehen kann, sowie bei Phosphorylierungsmutanten, die das RPA-Protein nicht binden können. Dies weist darauf hin, dass AID-Akkumulation an geschädigter DNA nicht PKA- bzw. RPA-abhängig ist. Da die katalytischen Mutanten zwar nicht an der UV-geschädigten DNA akkumulieren, dennoch bei MMS-bedingten DNA-Schäden im Zellkern stabilisiert werden, können wir davon ausgehen, dass die AID-DNA-Bindung nicht für nukleäre AID-Stabilisierung verantwortlich gemacht werden kann.

Da katalytische Mutanten bei MMS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung im Zellkern von B-Zellen akkumulieren aber nicht an der UV-geschädigten DNA in HeLa-Zellen detektiert werden konnten, ist es unwahrscheinlich, dass zwischen der beobachteten Akkumulation an DNA-Schadensstellen und der Stabilisierung von WT-AID im Zellkern mechanistische Gemeinsamkeiten bestehen. Ferner muss man hierbei beachten, dass UV-Bestrahlung andere DNA-Schäden als MMS verursacht und deshalb nicht optimal geeignet ist, um die MMS-Effekte aufzuklären. Nichtsdestotrotz konnte man mit dem UV-Experiment interessante Erkenntnisse zu Interaktion von AID und PCNA an den geschädigten DNA-Bereichen sammeln, die in weiterführenden Studien unseres Labors im Detail untersucht werden.

Eine Mobilitätsstudie des WT-AID im Zellkern mit Hilfe von FRAP-Experimenten könnte Aufschluss über die Mobilitätssituation und/oder Bindungsverhalten von AID am Chromatin auch bei MMS-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Etoposid-induzierten DNA-Schäden geben. Ferner könnten vergleichende Experimente mit AID-Mutanten durchgeführt werden, um die Daten mit den Ergebnissen aus den UV-bestrahlten Zellen zu vergleichen, bzw. eventuelle Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Mutanten festzuhalten.

#### 4.4.2 Signal-vermittelte Störung der Ubiquitinierung als mögliche Ursache für Abbauhemmung

Ein wichtiger mechanistischer Schritt zur AID-Stabilisierung bei MMS-induzierten DNA-Läsionen wurde durch Betrachtung der Ubiquitinierungsmuster von AID in IP-Experimenten detaillierter analysiert. Die stärkste AID-Polyubiquitinierung wurde durch die Hemmung des Proteasoms erreicht. Da durch die MMS-Behandlung eine schwächere AID-Polyubiquitinierung erreicht wurde, können wir schlussfolgern, dass die beobachtete

AID-Stabilisierung in Folge von MMS-induzierten DNA-Schäden nicht nur auf die Hemmung des Proteasoms zurückgeführt werden kann. Zusammen mit den Erkenntnissen aus der Mikroskopiestudie über MMS-abhängige Translokation von AID in den Zellkern und der dortigen Abbauhemmung des Proteins lieferte die beobachtete schwächere AID-Polyubiquitinierung nach MMS-Behandlung erste Anhaltspunkte dafür, dass MMS-induzierte DNA-Läsionen auch die Polyubiquitinierung von AID im Zellkern beeinträchtigen könnten.

Eine negative Regulation von Protein-Ubiquitinierung kann auf zwei Wegen erfolgen: zum einen könnten die Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) die Polyubiquitin-Kette abspalten (Wilkinson 1997), diese Proteasen spielen bekanntermaßen eine große Rolle bei der DNA-Schadensregulierung (Komander, Clague et al. 2009). Zum anderen könnte die Bildung der Polyubiquitin-Kette am AID-Protein durch Bindungspartner oder Proteinmodifikationen gehemmt werden, wie es für andere Proteine bereits beschrieben wurde (Chen, Shinde et al. 2001; Hino, Tanji et al. 2005).

Darüber, welcher physiologische Mechanismus der AID-Translokation in den Zellkern zu Grunde liegt bzw. welche Funktionen AID bei DNA-Schäden nach der Translokation in den Zellkern ausführen würde, kann nur spekuliert werden. Ferner bleibt die Frage, ob diese Funktion das intakte katalytische Zentrum benötigt, da auch inaktive AID-Mutanten die gleiche Lokalisationsänderung bei MMS-abhängigen DNA-Schäden erfuhren. Eine mögliche Ursache für AID-Translokation in den Zellkern bei DNA-Strangbrüchen wäre die Beteiligung von AID an Reparaturprozessen. Hierzu gibt es zahlreiche Beispiele für nukleäre Translokation von Reparatur- bzw. Zellzyklus-Proteinen bei DNA-Läsionen (Li, Chen et al. 2002; Wood, Thornton et al. 2009; Gorsler, Murzik et al. 2010). Allerdings konnte ebenfalls beobachtet werden, dass auch einige nicht an der Reparatur beteiligte Proteine durch Aktivierung, Spaltung oder bestimmte Stimuli in den Zellkern einwandern, um dort z.B. Signalkaskaden auszulösen (Deisseroth, Heist et al. 1998; Chauvet, Tian et al. 2004).

Ferner wird das Szenario eines indirekten Schutzmechanismus in Betracht gezogen: dabei gehen wir von einer Zelle aus, die sich im Transformationsstadium befindet oder eine große Menge an Mutationen angehäuft hat und dadurch verschiedene Regulationsmechanismen möglicherweise nicht mehr adäquat unter Kontrolle hat. Wenn man annimmt, dass es durch starke DNA-Schädigung zu einer signalvermittelten AID-Anreicherung im Zellkern kommt, könnte diese nicht-signalfähige Zelle ihr AID unter diesen Umständen nicht mehr im Zellkern stabilisieren, sodass es zum Abbau von AID kommt. In dieser Form würde es sich um eine Art

Ersatz- oder Notlösung handeln, bei der sichergestellt wird, dass im Falle eines Versagens der Signalvermittlung die Mengen des mutagenen AID im Zellkern gering gehalten werden. In diesem Sinne war es zu erwarten, dass die AID-Anreicherung im Zellkern bei MMS-Behandlung dosenabhängig war, und die stärkste Stabilisierung von AID wurde bei der größten Menge an DNA-Läsionen erreicht.

Zum anderen könnte die nukleäre Anreicherung von mutagenem AID bei DNA-Läsionen einen ultimativen und irreversiblen Schritt zum direkten Schutz des Organismus vor einer einzelnen stark geschädigten Zelle darstellen. Dabei würde die Zelle ab einer bestimmten irreparablen Menge an entarteter DNA-Sequenz in Folge von genotoxischem Stress die AID-Ubiquitinierung im Zellkern hemmen, damit die AID-Mengen erhöht und so noch mehr DNA-Läsionen eingeführt werden, sodass Apoptose eingeleitet und die betroffene Zelle eliminiert wird. Der Mechanismus einer solchen AID-induzierten Mutagenese, die das angeborene Immunsystem zu Beseitigung von viral transfizierten Zellen aktiviert, wurde bereits beschrieben (Gourzi, Leonova et al. 2006). Es ist ferner bekannt, dass in HIV-infizierten Zellen Deaminasen aus AID/APOBEC-Proteinfamilie im Zuge der angeborenen Immunität zu Schädigung der retroviralen cDNA zum Schutz der betroffenen Zelle rekrutiert werden, um durch DNA-Läsionen die virale Replikation zu hemmen (Harris und Liddament 2004).

#### 4.5 Ausblick

Die aberrante Expression von AID in diversen Erkrankungen des Immunsystems (Albesiano, Messmer et al. 2003; McCarthy, Wierda et al. 2003; Hardianti, Tatsumi et al. 2005; Babbage, Ottensmeier et al. 2006) und die Rolle dieses mutagenen Enzyms bei der Krebsentstehung (Okazaki, Hiai et al. 2003; Babbage, Ottensmeier et al. 2006; Kotani, Kakazu et al. 2007) zeigen, wie wichtig die Studien zu Regulationsmöglichkeiten von AID für die Ursachenforschung und die Entwicklung von klinischen Ansätzen zur Behandlung von diesen Erkrankungen ist.

In meiner Studie sind wir auf einen bis dahin unbekanntem Mechanismus der DNA-Schadensabhängigen posttranslationalen Regulierung von AID gestoßen. Dabei scheint eine starke DNA-Schädigung den beschriebenen nukleären AID-Abbau (Aoufouchi, Faili et al. 2008) zu hemmen und dadurch die Menge an nukleärem AID zu steigern. Ob es sich um einen Vorgang handelt, der mit der AID-Funktion als Deaminase, Demethylase (Morgan,

Dean et al. 2004) oder einer potentiellen Beteiligung von AID an DNA-Reparatur handelt, muss im weiteren Verlauf dieser Studie geklärt werden.

Im Einzelnen könnte die Identifizierung der verantwortlichen Lysine für die nukleäre Ubiquitinierung von AID und die Fragestellung nach dem Kompartiment, wo die anschließende proteasomale Degradation stattfindet, von großer Bedeutung für das Verständnis der biochemischen Reaktion des AID-Abbaus und der Regulation dieses Vorgangs sein.

Der Einfluss von AID-Funktion auf AID-Stabilität und –Lokalisation könnte in weiteren Experimenten durch AID-Inhibierung durch Tetrahydrouridin (Muramatsu, Sankaranand et al. 1999) oder durch spezifische Hemmung der PKA-abhängigen Aktivierung von AID (Murray 2008) bestätigt und detaillierter aufgeklärt werden.

FRAP-Experimente könnten durch Untersuchungen der verschiedenen Mobilitätszustände der jeweiligen AID-Mutanten zur Aufklärung der differenziellen Anreicherung von Mutanten an Stellen der geschädigten DNA beitragen und somit wichtige Anhaltspunkte zum Abbauverhalten des aktiven und inaktiven AID liefern.

Durch Inhibitor- und/oder Knockout-Studien könnten auch die Signalkaskaden, die durch den genotoxischen Stress die Hemmung des AID-Abbaus im Zellkern auslösen könnten, analysiert werden und so zur Aufschlüsselung des Zusammenhangs zwischen der DNA-Schadensregulierung und dem AID-Abbau beitragen.

Durch die weitere Erforschung der Wechselwirkung zwischen den DNA-Schäden und der dabei beobachteten AID-Stabilisierung im Zellkern könnten neue Kenntnisse auf dem noch weitgehend unerforschten Gebiet einer möglichen AID-Beteiligung an DNA-Reparatur erworben werden um so das Dogma von AID als mutagenem und gefährlichem Enzym zu differenzieren und zu relativieren.

## 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 Canto	Becton Dickinson, USA
Inkubator	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Mikroskope	Zeiss, Leica
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Köln
Power Pac 3000/Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sonifikator	Bandelin Sonopuls, Papenburg
Sterilbank	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Tischzentrifuge	Eppendorf, Köln
Zentrifuge	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Zählkammer	Schubert & Weiss, München

### 5.1.3 Verwendete Kits

DC Protein Assay (BioRad, München); ECL Kit (GE Healthcare, Europa); super ECL Kit (GE Healthcare, Europa); Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit (Genomed, Löhne); QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden); QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden).

### 5.1.4 Datenverarbeitung

Adobe Photoshop	Bildverarbeitung
Adobe Illustrator	Herstellen von Abbildungen
BLAST Clustal W	Sequenzverarbeitung
Chromas, Geneious	Sequenzauswertung
ImageJ	Auswertung von Mikroskopiebildern
Flowjo	FACS-Datenaquisition und -auswertung
IMGT Internetseite	Vergleichsanalyse von Ig-DNA-Sequenzen
Microsoft Excel	Tabellenkalkulation
Microsoft Word	Textverarbeitung
Microsoft Power Point	Herstellen von Abbildungen
LSM, Volocity, Zen	Auswertung von Mikroskopiebildern

### 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 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Der verwendete Größenstandard ist der „Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix“ (MBI Fermentas).

#### 5.1.5.2 *Protein-Größenstandard*

Zur Bestimmung des molekularen Gewichts von Proteinen wurden diese gleichzeitig mit einem Protein-Größenstandard, der verschiedene Proteine mit einer Größe zwischen 11 und 170 kDa enthält („Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder“ [Invitrogen, Karlsruhe]), in einem SDS-PA-Gel aufgetrennt. Um die Standardproteine sichtbar zu machen, wurden diese kovalent an einen blauen Farbstoff gebunden. Zur Orientierung wurde die circa 72 kDa-Proteinbande mit einem roten Farbstoff markiert.

### 5.1.6 Plasmide

Das hier für Expressions- und Lokalisationsstudien verwendete Plasmid pCAGGs wurde von Timm Schröder zur Verfügung gestellt, es enthält eine Puromycinselektion.

Für die Mutagenese in *E.coli* wurde das Plasmid pBluescript II KS (+/-) von Fermentas verwendet.

### 5.1.7 Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 $\alpha$  benutzt. Genotyp: F-,  $\Phi$ dlacZ  $\Delta$  M15, endA1, recA1, hsdR17 (rk-, mk-), supE44, Thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169,  $\lambda$ -.

### 5.1.8 Zelllinien

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Bezugsquelle	Organismus	Art der Zelllinie
Raji	J. Bachl	Human	B-Zelle
DT40	I. Ertongur	Huhn	B-Zelle
Hela Kyoto	O. Mortusewicz	Human	Epithelzelle

### 5.1.9 Antikörper

**Tabelle 3: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Verdünnung	Organismus	Bezugsquelle	Art	Anwendung
$\alpha$ -AID	1:5	Ratte	E. Kremmer	Erstantikörper	Western B.
$\alpha$ -Aktin	1:5.000	Kaninchen	Sigma-Aldrich	Erstantikörper	Western B.
$\alpha$ -GFP	1:500	Maus	Santa Cruz	Erstantikörper	Western B.
$\alpha$ -HA	1:5	Ratte	E. Kremmer	Erstantikörper	Western B.
$\alpha$ -HA (Agarose)	1:1.000	Kaninchen	Santa Cruz	Erstantikörper	coIP
$\alpha$ -IgM-PE	1:40	Maus	S.Biotech	Erstantikörper	FACS
$\alpha$ -MALT1	1:3.000	Kaninchen	Abcam	Erstantikörper	Western B.
$\alpha$ -PARP	1:1.000	Kaninchen	Epitomics	Erstantikörper	Western B.
$\alpha$ -Ub	1:1.000	Maus	Enzo Lifesc.	Erstantikörper	Western B.
$\alpha$ -Kaninchen	1:3.000	Ziege	Promega	Zweitantikörper	Western B.
$\alpha$ -Maus	1:5.000	Ziege	Promega	Zweitantikörper	Western B.
$\alpha$ -Ratte	1:5.000	Ziege	Promega	Zweitantikörper	Western B.

### 5.1.10 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys, Steinheim bezogen. Die für Mutagenese benötigten Primer enthielten eine Phosphorylierung am 5'-Ende.

**Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für Mutagenese und Sequenzierungen**

<b>Name</b>	<b>3' -&gt; 5' Sequenz</b>	<b>PCR-Bedingungen</b>	<b>Anwendung</b>
R19E/R24E forward	AAGGGTgaGCGTGAGACCTACCT	30 Zyklen	Mutagenese
R19E/R24E reverse	AGCCCActcGACATTTTTGAATTGG	30 sec bei 98°C	
S38A forward	ACgccGCTACATCCTTTTCACTGG	7 min bei 60°C	
S38A reverse	CACGCCTCTTCACTACGTAGCACA	60 sec bei 72°C	
T27A forward	gCCTACCTGTGCTACGTAGTGAAGA		
T27A reverse	CTCACGCCGACCCTTAGCCCAG		
H56R/E58Q forward	GcagTTGCTCTTCCCTCCGCTACAT		
H56R/E58Q reverse	ACTctGCAGCCGTTCTTATTGCGAA		
HA_for	GACTATGCCGACAGCCTCTTG		
GFP_rev	CTTGACAGCTCGTCCATGCC		

Die für die Mutagenese abgeänderten Nukleotide sind in Kleinbuchstaben geschrieben.

### 5.1.11 Enzyme

<u>Enzyme</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Phusion	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas

## 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 (humane Zellen) bzw. 42°C (Hühnerzellen), 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit. Zentrifugationen fanden stets bei 4°C mit 1200 rpm für 5 Minuten in einer Megafuge 40R (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) statt.

### Zellkulturmedium für humane Suspensionszelllinien

- 500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Schottland)
- 50 ml FKS (10%) (Biochrom KG, Berlin)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 5 ml Glutamin (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 5 ml Natriumpyruvat (1%) (Gibco BRL, Schottland)

### Zellkulturmedium für adhärente humane Zelllinien

- 500 ml D-MEM Medium (Gibco BRL, Schottland)
- 50 ml FKS (10%) (Biochrom KG, Berlin)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 5 ml Glutamin (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 5 ml Natriumpyruvat (1%) (Gibco BRL, Schottland)

### Kulturmedium für DT40-Zellen

- 500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Schottland)
- 50 ml FKS (10%) (Biochrom KG, Berlin)
- 5 ml Hühnerserum (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 5 ml Glutamin (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 5 ml Natriumpyruvat (1%) (Gibco BRL, Schottland)
- 50 µl β-Mercaptoethanol (0,1 mM) (Gibco BRL, Schottland)

#### 5.2.1 Bestimmung der Zelldichte

Zur Ermittlung der Zelldichte wurde ein Tropfen (circa 15 µl) 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 µl umfasst.

### 5.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

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

Zum Auftauen von Zellen wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort in 10 ml frisches Kulturmedium überführt. Einmaliges Waschen mit Medium entfernte DMSO, so dass die Zellen anschließend in 5-20 ml neuem Kulturmedium aufgenommen und kultiviert werden konnten.

### 5.2.3 Zellkulturbedingungen

Humane Burkitt-Linien wachsen einzeln in Suspension und teilen sich täglich einmal. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von  $> 5 \times 10^5$  pro ml gehalten, da eine geringe Zelldichte tödlich für diese Zelllinien ist. Hela-Zellen wachsen adhärent und weisen einen Teilungszyklus von etwa 20 Stunden auf. Sie wurden bei einer Konfluenz von etwa 70% durch Behandlung mit Trypsin (Gibco BRL, Schottland) geerntet und 1:20 gesplittet.

DT40-Zellen wachsen einzeln in Suspension und haben einen Zellzyklus von etwa 12 Stunden. Sie wurden bei einer Zelldichte von  $1-5 \times 10^5$  Zellen/ml gehalten.

### 5.2.4 Stabile Transfektion von Suspensionszellen

Bei Suspensionszellen wurden  $1 \times 10^7$  Zellen pro Transfektion verwendet. Die Zellen wurden in 5 ml PBS gewaschen, in 400  $\mu\text{l}$  kaltem PBS aufgenommen und in Küvetten mit 0,4 cm Elektrodenabstand transferiert. In die Küvetten wurde 50  $\mu\text{g}$  DNA in 300  $\mu\text{l}$  PBS pro  $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben und das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Transfektion im Elektroporator (BioRad) bei 50  $\mu\text{F}$  und 800 V (DT40) und 850  $\mu\text{F}$  und 250 V (Raji) durchgeführt wurde. Die transfizierten Zellen wurden anschließend in 10 ml Kulturmedium (DT40) und 50 ml (Raji) überführt und in 96-Lochplatten á 100  $\mu\text{l}$  pro Loch ausgesät. 10-13 Tage (DT40) und 30 Tage (Raji) später wurden einzelne sichtbare Kolonien im Medium gelöst und in 24-Lochplatten in 1 ml Medium mit Selektion überführt.

### 5.2.5 Transiente Transfektion von adhärenenten Zellen

Für die transiente Transfektion von adhärenenten Hela Kyoto-Zellen wurden die Zellen einer 10 cm Schale mit circa 70% Konfluenz durch Trypsinbehandlung geerntet, mit PBS gewaschen und in 2 ml D-MEM-Medium (+10% FKS) resuspendiert. Pro Transfektion wurde

30  $\mu$ l Zellsuspension in das Reservoir einer Ibidi-Zellkammer (Martinsried, Deutschland) gegeben und 40 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die abgesetzten Zellen mit 120  $\mu$ l D-MEM-Medium + 10 mg/ml BrdU versetzt und im Dunkeln bei 37°C über Nacht sensibilisiert.

Die Transfektion fand am nächsten Tag im serumfreien D-MEM-Medium statt:

Serumfreies D-MEM-Medium	20 $\mu$ l
DNA (1 mg/ml)	1 $\mu$ l
PEI, pH 10	1,2 $\mu$ l

Dieser Transfektionsmix wurde gut durchgemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach mit 98  $\mu$ l DMEM-Medium (+ 10 mg/ml BrdU) versetzt und erneut durchgemischt. Das Medium in der Kammer wurde durch das Transfektionsmix (Gesamtvolumen circa 120  $\mu$ l) ausgetauscht. Es folgte eine weitere über Nacht-Inkubation bei 37°C im Dunkeln.

Am darauffolgenden Tag wurde der Transfektionsmix durch 120  $\mu$ l D-MEM-Medium (+10% FKS, 5% L-Glutamin, 5% Pen/Strep, 25 nM HEPES) ohne Phenolrot ausgetauscht, so dass der Farbzusatz des Mediums den anschließenden Mikroskopievorgang nicht stören konnte.

#### 5.2.6 Bestimmung der Hypermutationsaktivität im FACS

Nach der stabilen Transfektion der  $\Psi$ V<sup>AID</sup><sup>-/-</sup> Zellen (siehe 5.2.4) wurden 11 Tage später Einzelzellklone als sichtbare Kolonien gesammelt, in 24-Lochplatten in 1 ml Medium mit Selektion überführt und zwei Tage später im Durchflusszytometer auf den IgM-Status und GFP-Intensität hin untersucht.

Für die Bestimmung des IgM-Status wurden circa  $5 \times 10^4$ -Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert, gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde mit dem PE-gekoppelten IgM-Antikörper (siehe Abschnitt 5.1.9, Tabelle 3), Endkonzentration 1:40, 15 min lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Restfarbstoff durch einen Waschschrift mit PBS entfernt, die Zellen in 150  $\mu$ l PBS aufgelöst und im FACS analysiert (siehe Abschnitt 5.5.2).

Die PE-Werte waren direkt proportional zu den auf der Oberfläche der Zellen vorhandenen IgM-Rezeptoren. Der IgM-Status der nicht-transfezierten Zellen wurde als 100% IgM-positiv gesetzt, die Abnahme der IgM-Werte im Zuge der Hypermutation nach der Transfektion mit AID-Vektoren wurde als IgM-Verlust in einem Excel-Graph in Prozent wiedergegeben,

normiert um den Hintergrundwert der nicht-gefärbten Zellen. Die Signifikanz wurde mithilfe eines ungerichteten zweiseitigen Student's T-Test unter der Annahme der ungleichen Varianz durchgeführt.

### 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).

#### 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-Quantifizierung

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Absorption bei einer Lichtwellenlänge von 260 nm gemessen (A260). Licht dieser Wellenlänge wird von den zyklischen Basen in der DNA mit dem durchschnittlichen Faktor 50 absorbiert. So ergibt sich die Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{A260} \times 50 \times \text{Verdünnung}$$

#### 5.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Um das Ergebnis einer Restriktion, PCR-Reaktion oder DNA-Reinigung zu überprüfen, wurde ein Anteil der Proben auf ein 0,8% bis 1,5%iges Agarosegel [w/v] geladen. Dazu wurden die Proben zuvor mit Ladepuffer versetzt. Die DNA-Fragmente wurden in einem elektrischen Feld mit bis zu 100 V aufgetrennt.

<u>1xTAE</u>	<u>Ladepuffer (10x)</u>	<u>Agarosegel</u>
0,04 M Tris-Acetat	0,25% Bromphenolblau	0,8-1,5 mg Agarose
1 mM EDTA	30% Glycerin	pro 100 ml 1xTAE
	50 mM Tris	1,5 µl 100 mg/ml Etbr

### 5.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die AID-Mutagenese im pBluescript wurde die Phusion Polymerase (NEB) verwendet und die PCR nach den folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 5.1.10, Tabelle 4 veranschaulicht.

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>Bedingungen</u>
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl	Start
5x PCR Puffer	1x	98°C 2 min
2 mM dNTP	0,2 mM	30 Zyklen:
2 µM Primer forward	2,5 µM	98°C 30 sec
2 µM Primer reverse	2,5 µM	60°C 7 min
5 U/µl Phusion	0,025 U/µl	72°C 60 sec
DNA	10 ng	final
		72°C 10 min
		4°C ∞

### 5.3.6 DNA-Mutagenese

Nach der EcoRI-Umklonierung des AID-GFP Konstrukts in den pBluescript-Vektor (Abschnitt 5.1.6) wurde in der PCR-Reaktion mit den Primern, die die jeweiligen Basensubstitutionen enthielten (Abschnitte 5.1.10, Tabelle 4 und 5.3.5), ein PCR-Produkt mit mutierter AID-Sequenz hergestellt. Der nicht mutierte Strang der gereinigten DNA-Fragmente wurde durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym DpnI gespalten. Nach der anschließenden Reinigung der mutierten einzelsträngigen DNA wurde diese durch Ligation zirkularisiert und durch Hitzeschock (45 sec bei 42°C) in hitzekompetente *E.coli* transformiert. Nach der DNA-Extraktion aus einzelnen Kolonien wurde durch Sequenzierung die Mutation geprüft und im Falle der S38A-Einzelmutante nach demselben Prinzip die T27A/S38A-Doppelmutante hergestellt. Die Doppelmutanten R19E/R24E und H56R/E58Q wurden in einem Mutagenese-Schritt hergestellt.

### 5.3.7 DNA-Sequenzierung und Datenauswertung

Die DNA-Sequenzierung einzelner Bakterien-Subklone nach Klonierung des PCR-Produktes erfolgte beim VWR-Sequenzierungsservice in Ebersberg oder 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 Kapillarsequencer (Applied Biosystems) und der entsprechende Primer (Abschnitt 5.1.10, Tabelle 4) 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. Vergleich WT-AID-Sequenz mit den AID-Mutanten) mit den Programmen ClustalW und Geneious nach Mutationen und auf Orientierung des Inserts im Vektor analysiert.

## 5.4 Proteinbiochemische Methoden

### 5.4.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung der Proteine wurden  $3 \times 10^6$  Zellen bei 1200 rpm für 5 Minuten sedimentiert und mit PBS gewaschen. Zu dem Zellpellet wurden 60 µl heißen 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 95°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

250 mM Tris

### 5.4.2 Proteinquantifizierung

Die Menge des Proteins wurde mit Hilfe des DC Protein Assay (Bio-Rad) photometrisch bestimmt. Dieser Assay funktioniert ähnlich wie der Lowry Assay (Lowry, Rosebrough 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 unter Nutzung des mitgelieferten Proteinkonzentrationsstandards durchgeführt.

### 5.4.3 SDS-PA-Gelelektrophorese nach Lämmli (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 1 M DTT und 1/10 Volumen Bromphenolblau-Lösung gegeben und diese 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. 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 90 V-150 V durchgeführt.

<u>Trenngel</u>	<u>12%</u>
H <sub>2</sub> O	3,3 ml
30% Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Roth)	4 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	100 µl
10% TEMED (N,N,N',N'- Tetramethyldiamin)	4 µl

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

### 5.4.4 Western Blot

Bei der Western-Blot Analyse handelt es sich um den elektrischen Transfer von den in einem SDS-PA-Gel aufgetrennten Proteinen auf eine proteinbindende PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham Pharmacia, Braunschweig). Es wurde ein sogenannter „Nass-Blot“ in einem Bio-Rad-Tank durchgeführt. Vor dem Blotvorgang wurde die PVDF-Membran in Methanol

angefeuchtet. Anschließend wurde die Membran in Wasser gewaschen und fünf Minuten in Blotpuffer equilibriert. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls einige Minuten in Blotpuffer equilibriert und dann auf drei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurde die PVDF-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 400 mA 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)

250 mM Tris

1,92 M Glycin

1x Blotpuffer

1x Blotpuffer

20% Methanol

10x Ponceau S

2% Ponceau S

30% Trichloressigsäure

30% Sulfosalicylsäure

#### 5.4.5 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 30 und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der in einer 5%-Milchpulver-Lösung (+ 0,05% Azid) verdünnt wurde, über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran 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 bei 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 der Entwicklungsmaschine entwickelt.

Die für die Immundetektion verwendeten Antikörper, deren Verdünnungen und benutzte Inkubationslösungen sind in Abschnitt 5.1.9, Tabelle 3 aufgelistet.

#### 5.4.6 Fraktionierung

Für die Fraktionierung von humanen Zellen wurden  $3 \times 10^6$  Zellen (DT40 Zellen:  $8 \times 10^6$  Zellen) durch Sedimentation geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 90  $\mu$ l Mendez-A-Puffer aufgelöst, dabei wurde die Cytoplasmamembran durch das darin enthaltene Detergenz Triton-X-100 (0,04%) 10 min auf Eis gelöst. Die Cytoplasmafraktion wurde durch langsame Zentrifugation (5 min, 1300 rpm, 4°C) von der Zellkernfraktion getrennt und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt 1 h bei 15000 rpm von den Zelldebris gereinigt. Das Zellkernpellet wurde mit 150  $\mu$ l Mendez-A-Puffer gewaschen. Für die Western Blot-Analyse wurden jeweils 5% der Fraktionen im SDS-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C erhitzt und aufgetragen.

#### Mendez-A-Puffer

Hepes, pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Glycerin	10%
Saccharose	0,34 M
Triton-X-100	0,04%
DTT	0,5 mM
Proteaseinhibitor	Mini Tabletten, 1x (Roche)

#### 5.4.7 Immunpräzipitationsassay

Pro Ansatz wurden  $8 \times 10^7$  DT40-Zellen per Sedimentation geerntet und einmal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und 10  $\mu$ l (1%) davon wurden für die spätere Western Blot-Analyse als Input-Fraktion

entnommen. Die restliche Suspension wurde 30 min auf Eis lysiert. Danach wurde die Lösung mit 2x20 Pulsen sonifiziert und wieder 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend mit 10 µl HA-gekoppelten Agarose-Beads (Klon Y-11, Santa Cruz) über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert.

Die Beads wurden am nächsten Tag 4x durch Zentrifugation (30 sec, 5000 rpm, 4°C) mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen und mit 30 µl SDS-Laemmli-Probenpuffer eluiert (5 min, 95°C). Nach Sonifikation der Eluate wurden diese auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und analysiert.

#### Lysepuffer

Tris-HCl, pH 7,5	30 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10%
ZnCl <sub>2</sub>	10 µM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
β-Mercaptoethanol	1 µM
IGEPAL	0,5%
PMSF	0,1 mM

## 5.5 Abbaukinetik im FACS

### 5.5.1 Behandlung der Zellen

Am Vortag des Experiments wurden die Zellen bei einer Konzentration von  $2 \times 10^5$ - $4 \times 10^5$ /ml in 24-Lochplatten zu je 800 µl im Zellkulturmedium ohne Selektion ausgesät. Am nächsten Tag wurden je nach Versuchsanordnung folgende Substanzen in je 200 µl Medium gelöst, gut durchgemischt und zu den Zellen gegeben (Zeitpunkt = 0):

CHX	20 µg/ml
LMB	5 ng/ml
MG132	10 µM
Inh1	10 µM
MMS	0,1%
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	800 µM
Cisplatin	30 µM
Etoposid	30 µM

### 5.5.2 Durchflusszytometrische Analyse

Für die FACS-Analyse wurden 150 µl (circa  $5 \times 10^4$ ) Zellen entnommen und mit PBS gewaschen. Die gemessene Intensität des Vorwärtsstreulichts (*forward scatter*, FSC) ist proportional zur Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) ist von der

Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zellen abhängig. Mit diesen zwei Parametern konnte die Lebendzellpopulation bestimmt und eingegrenzt werden. Die GFP-Intensität wurde entweder als prozentualer Anteil der Gesamtzellpopulation oder als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*) ausgewertet. Die Analyse wurde im zwei-Stunden-Takt 8 Stunden lang wiederholt.

## 5.6 Mikroskopische Methoden

### 5.6.1 Konfokale Mikroskopie der fixierten Suspensionszellen

#### 5.6.1.1 *Immobilisierung der Suspensionszellen*

Zur Fixierung der Suspensionszellen wurden am Vortag der Versuchsdurchführung die runden Deckgläschen in 6-Lochplatten mit 400 µl Poly-L-Lysin Lösung (Sigma-Aldrich) für 1 Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde die Lösung mit dest. Wasser abgewaschen und die Deckgläschen bei Raumtemperatur getrocknet. Unmittelbar vor der Fixierung wurden die Deckgläschen mit PBS äquilibriert.

#### 5.6.1.2 *Paraformaldehyd-Fixierung*

Die Zellfixierung erfolgte durch Behandlung der abgesetzten Zellen (1 ml, 15 min RT) mit frischer 2%-iger Paraformaldehyd-Lösung (bei 72°C in PBS gelöst) (Fluka) für 15 min bei Raumtemperatur. Es folgte ein Waschschriff mit PBS. Für die anschließende DAPI-Färbung mussten die Zellen durch 3x 5-minütige Behandlung mit 0,15% Triton-X-100/PBS permeabilisiert werden. Danach wurden die Zellen im Dunkeln mit DAPI (0,1 µg/ml) gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen kopfüber in Vectashield-Tropfen auf Objektträger platziert und mit Nagellack luftdicht versiegelt. Die Objektträger wurden bis zu einem Jahr bei -20°C gelagert.

#### 5.6.1.3 *Mikroskopische Analyse*

Die fixierten Zellproben wurden mit einem Konfokalen Zeiss LSM 510 Lasermikroskop (Axioplan 2) mit einem 63x Plan-Apochromat Öl-Objektiv mikroskopiert. GFP wurde mit Laser von 488 nm und DAPI mit 405 nm Wellenlänge angeregt. Um Artefakte zu vermeiden, wurde jeder Kanal unabhängig und nacheinander durch die *multitracking*-Funktion des LSM 510 Geräts aufgenommen. Maßbalken wurden mit der LSM 510-Software hinzugefügt, die Fluoreszenzintensität der GFP-Signale wurde mit der Zen-Software (UK) bestimmt.

## 5.6.2 Lebendzellmikroskopie der adhärennten Zellen nach UV-Bestrahlung

### 5.6.2.1 *Konfokale Lebendzellaufnahme*

Die Mikrobestrahlung nach der transienten Transfektion (Abschnitt 5.2.5) erfolgte unter Anleitung von Oliver Mortusewicz aus der AG H. Leonhardt, LMU München am Spinning Disc Lasermikroskop Leica TCS SP5/AOBS, welches mit UV-gängigem HCX PL 63x/1,4 Ölobjektiv ausgestattet war. GFP und RFP wurden durch 488 nm Argon Laser und 561 nm DPSS Laser angeregt. Die Lebendzellmikroskopie während und nach der Bestrahlung erfolgte in einer beheizten 37°C-Kammer unter einem konstanten CO<sub>2</sub>-Druck. Konfokale Bilderserien der Größe 256x256 Pixeln mit Pixelgröße von 90 nm wurden aufgenommen.

Für die Mikrobestrahlung der Zellkerne wurden zwei Kreise von etwa 1 µM Durchmesser an entgegengesetzten Stellen des Kerns ausgewählt und 1000 msec lang mit dem 405 nm Laser bei 90%-iger Laserintensität (etwa 80 µW) bestrahlt. Die Aufnahmeserie erfolgte im 2 Sekunden-Intervall mit 6 Aufnahmen vor der DNA-Schädigung und 150 Aufnahmen nach der Bestrahlung.

### 5.6.2.2 *Datenauswertung*

Die GFP-Intensität des ersten bestrahlten Punkts wurde mit Hilfe der ImageJ-Software ausgewertet. Dabei wurde die bestrahlte Region um den Hintergrundwert und den Verlust der GFP-Intensität im Kern über den Zeitraum von 5 min korrigiert und mit dem Mittelwert aus den Aufnahmen vor der Bestrahlung normiert.

Wert<sub>Zellkern</sub>(t = 0) wurde aus den ersten 6 Aufnahmen gemittelt.

Die Excel-Kalkulation erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\frac{\text{Wert}_{\text{Zellkern}}(t = 0)}{\text{Wert}_{\text{Zellkern}}(t = x)} \times \frac{\text{Wert}_{\text{bestrahlter Punkt}}(t = x)}{\text{Wert}_{\text{bestrahlter Punkt}}(t = 0)}$$

x ist dabei eine beliebige Aufnahme zum Zeitpunkt (t = x) nach der Bestrahlung. Die ermittelten Werte für mittlere Fluoreszenzintensität an der bestrahlten Region für jeden Zeitpunkt wurden als Funktion der Zeit im Excel-Graphen ausgegeben. Ein Mittelwert aus mindestens 10 Aufnahmeserien pro Transfektion mit errechneten Standardabweichungen wurde ermittelt.

## 6 LITERATUR

- Aas, P. A., M. Otterlei, et al. (2003). "Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA." *Nature* **421**(6925): 859-863.
- Albesiano, E., B. T. Messmer, et al. (2003). "Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone." *Blood* **102**(9): 3333-3339.
- Aoufouchi, S., A. Faili, et al. (2008). "Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID." *J Exp Med* **205**(6): 1357-1368.
- Arakawa, H., H. Saribasak, et al. (2004). "Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate." *PLoS Biol* **2**(7): E179.
- Arpin, C., J. Dechanet, et al. (1995). "Generation of memory B cells and plasma cells in vitro." *Science* **268**(5211): 720-722.
- Babbage, G., C. H. Ottensmeier, et al. (2006). "Immunoglobulin heavy chain locus events and expression of activation-induced cytidine deaminase in epithelial breast cancer cell lines." *Cancer Res* **66**(8): 3996-4000.
- Bachl, J., C. Carlson, et al. (2001). "Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line." *J Immunol* **166**(8): 5051-5057.
- Barreto, V., B. Reina-San-Martin, et al. (2003). "C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion." *Mol Cell* **12**(2): 501-508.
- Bassing, C. H., W. Swat, et al. (2002). "The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination." *Cell* **109 Suppl**: S45-55.
- Basu, U., J. Chaudhuri, et al. (2005). "The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation." *Nature* **438**(7067): 508-511.
- Basu, U., F. L. Meng, et al. (2011). "The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates." *Cell* **144**(3): 353-363.
- Bennett, R. P., E. Diner, et al. (2006). "APOBEC-1 and AID are nucleo-cytoplasmic trafficking proteins but APOBEC3G cannot traffic." *Biochem Biophys Res Commun* **350**(1): 214-219.
- Berek, C., A. Berger, et al. (1991). "Maturation of the immune response in germinal centers." *Cell* **67**(6): 1121-1129.
- Bessho, T., R. Roy, et al. (1993). "Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 8901-8904.
- Betz, A. G., M. S. Neuberger, et al. (1993). "Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes." *Immunol Today* **14**(8): 405-411.
- Bhutani, N., J. J. Brady, et al. (2010). "Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation." *Nature* **463**(7284): 1042-1047.

- Blum, K. A., G. Lozanski, et al. (2004). "Adult Burkitt leukemia and lymphoma." Blood **104**(10): 3009-3020.
- Brar, S. S., M. Watson, et al. (2004). "Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks." J Biol Chem **279**(25): 26395-26401.
- Broomfield, S., T. Hryciw, et al. (2001). "DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Mutat Res **486**(3): 167-184.
- Canugovi, C., M. Samaranayake, et al. (2009). "Transcriptional pausing and stalling causes multiple clustered mutations by human activation-induced deaminase." FASEB J **23**(1): 34-44.
- Chahwan, R., S. N. Wontakal, et al. (2010). "Crosstalk between genetic and epigenetic information through cytosine deamination." Trends Genet **26**(10): 443-448.
- Chatterji, M., S. Unniraman, et al. (2007). "Role of activation-induced deaminase protein kinase A phosphorylation sites in Ig gene conversion and somatic hypermutation." J Immunol **179**(8): 5274-5280.
- Chaudhuri, J., C. Khuong, et al. (2004). "Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets." Nature **430**(7003): 992-998.
- Chauvet, V., X. Tian, et al. (2004). "Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus." J Clin Invest **114**(10): 1433-1443.
- Chen, L., U. Shinde, et al. (2001). "Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly." EMBO Rep **2**(10): 933-938.
- Cheng, H. L., B. Q. Vuong, et al. (2009). "Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2717-2722.
- Ciechanover, A. and H. Gonen (1990). "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: enzymology and mechanisms of recognition of the proteolytic substrates." Semin Cell Biol **1**(6): 415-422.
- Cleary, M. L., T. C. Meeker, et al. (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.
- Costa, S., D. Pinto, et al. (2007). "Importance of xeroderma pigmentosum group D polymorphisms in susceptibility to ovarian cancer." Cancer Lett **246**(1-2): 324-330.
- Crouch, E. E., Z. Li, et al. (2007). "Regulation of AID expression in the immune response." J Exp Med **204**(5): 1145-1156.
- De Carvalho, D. D., J. S. You, et al. (2010). "DNA methylation and cellular reprogramming." Trends Cell Biol **20**(10): 609-617.
- de Yébenes, V. G., L. Belver, et al. (2008). "miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells." J Exp Med **205**(10): 2199-2206.
- Dedeoglu, F., B. Horwitz, et al. (2004). "Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB." Int Immunol **16**(3): 395-404.

- Deisseroth, K., E. K. Heist, et al. (1998). "Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons." Nature **392**(6672): 198-202.
- Delbos, F., S. Aoufouchi, et al. (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.
- Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." Annu Rev Biochem **78**: 399-434.
- Di Noia, J. M. and M. S. Neuberger (2007). "Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation." Annu Rev Biochem **76**: 1-22.
- Diaz, M., M. F. Flajnik, et al. (2001). "Evolution and the molecular basis of somatic hypermutation of antigen receptor genes." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1405): 67-72.
- Dickerson, S. K., E. Market, et al. (2003). "AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA." J Exp Med **197**(10): 1291-1296.
- Dorsett, Y., K. M. McBride, et al. (2008). "MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation." Immunity **28**(5): 630-638.
- Durandy, A., S. Peron, et al. (2006). "Hyper-IgM syndromes." Curr Opin Rheumatol **18**(4): 369-376.
- Durandy, A., P. Revy, et al. (2005). "Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects." Immunol Rev **203**: 67-79.
- Eder, M. (2007). Untersuchungen zur Regulation der Aktivierungs-induzierten Cytidineaminase. München: 1-88.
- Etlinger, J. D. and A. L. Goldberg (1977). "A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(1): 54-58.
- Fortini, P., B. Pascucci, et al. (2003). "8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways." Mutat Res **531**(1-2): 127-139.
- Friedberg, E. C. (2008). "A brief history of the DNA repair field." Cell Res **18**(1): 3-7.
- Fukita, Y., H. Jacobs, et al. (1998). "Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription." Immunity **9**(1): 105-114.
- Ganesh, K., S. Adam, et al. (2011). "CTNNB1 Is a Novel Nuclear Localization Sequence-binding Protein That Recognizes RNA-splicing Factors CDC5L and Prp31." J Biol Chem **286**(19): 17091-17102.
- Gangavarapu, V., S. Prakash, et al. (2007). "Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **27**(21): 7758-7764.
- Gazumyan, A., K. Timachova, et al. (2011). "Amino-terminal phosphorylation of activation-induced cytidine deaminase suppresses c-myc/IgH translocation." Mol Cell Biol **31**(3): 442-449.
- Geisberger, R., C. Rada, et al. (2009). "The stability of AID and its function in class-switching are critically sensitive to the identity of its nuclear-export sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(16): 6736-6741.

- Glickman, M. H., D. M. Rubin, et al. (1998). "The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome." Mol Cell Biol **18**(6): 3149-3162.
- Goldberg, A. L. (1972). "Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli* (protein breakdown-protein structure-mistranslation-amino acid analogs-puromycin)." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(2): 422-426.
- Gonda, H., M. Sugai, et al. (2003). "The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression." J Exp Med **198**(9): 1427-1437.
- Gorsler, T., U. Murzik, et al. (2010). "DNA damage-induced translocation of S100A11 into the nucleus regulates cell proliferation." BMC Cell Biol **11**: 100.
- Gourzi, P., T. Leonova, et al. (2006). "A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus." Immunity **24**(6): 779-786.
- Gray, D. (1991). "Understanding germinal centres." Res Immunol **142**(3): 237-242.
- Groulx, I. and S. Lee (2002). "Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." Mol Cell Biol **22**(15): 5319-5336.
- Hanayama, R., M. Tanaka, et al. (2004). "Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice." Science **304**(5674): 1147-1150.
- Hardianti, M. S., E. Tatsumi, et al. (2005). "Presence of somatic hypermutation and activation-induced cytidine deaminase in acute lymphoblastic leukemia L2 with t(14;18)(q32;q21)." Eur J Haematol **74**(1): 11-19.
- Harfe, B. D. and S. Jinks-Robertson (2000). "DNA polymerase zeta introduces multiple mutations when bypassing spontaneous DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell **6**(6): 1491-1499.
- Harris, R. S. and M. T. Liddament (2004). "Retroviral restriction by APOBEC proteins." Nat Rev Immunol **4**(11): 868-877.
- Hino, S., C. Tanji, et al. (2005). "Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination." Mol Cell Biol **25**(20): 9063-9072.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.
- Hoeijmakers, J. H. (2007). "Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases." Mech Ageing Dev **128**(7-8): 460-462.
- Hollowood, K. and J. R. Goodlad (1998). "Germinal centre cell kinetics." J Pathol **185**(3): 229-233.
- Imai, K., Y. Zhu, et al. (2005). "Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2." Clin Immunol **115**(3): 277-285.
- Ito, S., H. Nagaoka, et al. (2004). "Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 1975-1980.

- Jacob, J. and G. Kelsoe (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.
- Janeway, C. A., Jr.; Walport, M.; Travers, P. (2002). "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." Annu Rev Immunol **5th edition**: 1-600.
- Jansen, J. G., P. Langerak, et al. (2006). "Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice." J Exp Med **203**(2): 319-323.
- Jentsch, S., J. P. McGrath, et al. (1987). "The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme." Nature **329**(6135): 131-134.
- Jou, S. T., N. Carpino, et al. (2002). "Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex." Mol Cell Biol **22**(24): 8580-8591.
- Jung, D. and F. W. Alt (2004). "Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation." Cell **116**(2): 299-311.
- Karpuzoglu, E. and M. Zouali (2011). "The multi-faceted influences of estrogen on lymphocytes: toward novel immuno-interventions strategies for autoimmunity management." Clin Rev Allergy Immunol **40**(1): 16-26.
- Kelsoe, G. (1995). "The germinal center reaction." Immunol Today **16**(7): 324-326.
- Klein, G. (1983). "Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men." Cell **32**(2): 311-315.
- Klemm, L., C. Duy, et al. (2009). "The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia." Cancer Cell **16**(3): 232-245.
- Kluiver, J., A. van den Berg, et al. (2007). "Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma." Oncogene **26**(26): 3769-3776.
- Kohler, A., P. Cascio, et al. (2001). "The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release." Mol Cell **7**(6): 1143-1152.
- Kolodner, R. D. and G. T. Marsischky (1999). "Eukaryotic DNA mismatch repair." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 89-96.
- Komander, D., M. J. Clague, et al. (2009). "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 550-563.
- Kondo, M. (2010). "Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors." Immunol Rev **238**(1): 37-46.
- Kosco, M. H. and D. Gray (1992). "Signals involved in germinal center reactions." Immunol Rev **126**: 63-76.
- Kosco, M. H., A. P. Monfalcone, et al. (1988). "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.
- Kostova, Z. and D. H. Wolf (2003). "For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection." EMBO J **22**(10): 2309-2317.

- Kotani, A., N. Kakazu, et al. (2007). "Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(5): 1616-1620.
- Kracker and A. Durandy (2011). "Insights into the B cell specific process of immunoglobulin class switch recombination." Immunol Lett **138**(2): 97-103.
- Küppers, R. (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." Nat Rev Cancer **5**(4): 251-262.
- Küppers, R. and R. Dalla-Favera (2001). "Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas." Oncogene **20**(40): 5580-5594.
- Küppers, R., K. Rajewsky, et al. (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.
- Küppers, R., M. Zhao, et al. (1993). "Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction." Am J Pathol **143**(1): 230-239.
- Lam, Y. A., T. G. Lawson, et al. (2002). "A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal." Nature **416**(6882): 763-767.
- Lebecque, S. G. and P. J. Gearhart (1990). "Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene." J Exp Med **172**(6): 1717-1727.
- Li, C., L. Chen, et al. (2002). "DNA damage induces MDMX nuclear translocation by p53-dependent and -independent mechanisms." Mol Cell Biol **22**(21): 7562-7571.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.
- Liu, M., J. L. Duke, et al. (2008). "Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation." Nature **451**(7180): 841-845.
- Liu, Y. J., G. Grouard, et al. (1996). "Follicular dendritic cells and germinal centers." Int Rev Cytol **166**: 139-179.
- Liu, Y. J., D. E. Joshua, et al. (1989). "Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres." Nature **342**(6252): 929-931.
- Liu, Y. J., J. Zhang, et al. (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.
- Long, B. H., S. T. Musial, et al. (1985). "Single- and double-strand DNA breakage and repair in human lung adenocarcinoma cells exposed to etoposide and teniposide." Cancer Res **45**(7): 3106-3112.
- Love, K. R., A. Catic, et al. (2007). "Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes." Nat Chem Biol **3**(11): 697-705.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- MacLennan, I. C. (1994). "Germinal centers." Annu Rev Immunol **12**: 117-139.

- MacLennan, I. C., A. Gulbranson-Judge, et al. (1997). "The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop." Immunol Rev **156**: 53-66.
- Maeda, K., S. K. Singh, et al. (2010). "GANP-mediated recruitment of activation-induced cytidine deaminase to cell nuclei and to immunoglobulin variable region DNA." J Biol Chem **285**(31): 23945-23953.
- Martomo, S. A., H. Saribasak, et al. (2008). "Reevaluation of the role of DNA polymerase theta in somatic hypermutation of immunoglobulin genes." DNA Repair (Amst) **7**(9): 1603-1608.
- McBride, K. M., V. Barreto, et al. (2004). "Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase." J Exp Med **199**(9): 1235-1244.
- McBride, K. M., A. Gazumyan, et al. (2006). "Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8798-8803.
- McCarthy, H., W. G. Wierda, et al. (2003). "High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia." Blood **101**(12): 4903-4908.
- McKean, D., K. Huppi, et al. (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.
- Morgan, H. D., W. Dean, et al. (2004). "Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming." J Biol Chem **279**(50): 52353-52360.
- Mukhopadhyay, D. and H. Riezman (2007). "Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling." Science **315**(5809): 201-205.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, et al. (2000). "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme." Cell **102**(5): 553-563.
- Muramatsu, M., V. S. Sankaranand, et al. (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, A. J. (2008). "Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems." Sci Signal **1**(22): re4.
- Müschen, M., D. Re, et al. (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.
- Nakagawa, M., Y. Hosokawa, et al. (2005). "MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10." Blood **106**(13): 4210-4216.
- Neuberger, M. S. (2008). "Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards." Immunol Cell Biol **86**(2): 124-132.

- Nikolova, T., M. Ensminger, et al. (2010). "Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate." DNA Repair (Amst) **9**(10): 1050-1063.
- Niwa, H., K. Yamamura, et al. (1991). "Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector." Gene **108**(2): 193-199.
- Okazaki, I. M., H. Hiai, et al. (2003). "Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis." J Exp Med **197**(9): 1173-1181.
- Omori, S. A. and R. C. Rickert (2007). "Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling and regulation of the antibody response." Cell Cycle **6**(4): 397-402.
- Orthwein, A., A. M. Patenaude, et al. (2010). "Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90." J Exp Med **207**(12): 2751-2765.
- Palomera-Sanchez, Z. and M. Zurita (2011). "Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage." DNA Repair (Amst) **10**(2): 119-125.
- Papavasiliou, F. N. and D. G. Schatz (2002). "The activation-induced deaminase functions in a postcleavage step of the somatic hypermutation process." J Exp Med **195**(9): 1193-1198.
- Park, S. R., H. Zan, et al. (2009). "HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation." Nat Immunol **10**(5): 540-550.
- Parker, D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." Annu Rev Immunol **11**: 331-360.
- Pasqualucci, L., Y. Kitaura, et al. (2006). "PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(2): 395-400.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, et al. (2001). "Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas." Nature **412**(6844): 341-346.
- Patenaude, A. M. and J. M. Di Noia (2010). "The mechanisms regulating the subcellular localization of AID." Nucleus **1**(4): 325-331.
- Patenaude, A. M., A. Orthwein, et al. (2009). "Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase." Nat Struct Mol Biol **16**(5): 517-527.
- Pauklin, S., I. V. Sernandez, et al. (2009). "Estrogen directly activates AID transcription and function." J Exp Med **206**(1): 99-111.
- Pavri, R., A. Gazumyan, et al. (2010). "Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5." Cell **143**(1): 122-133.
- Peled, J. U., F. L. Kuang, et al. (2008). "The biochemistry of somatic hypermutation." Annu Rev Immunol **26**: 481-511.
- Peters, A. and U. Storb (1996). "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation." Immunity **4**(1): 57-65.
- Peters, J. M., W. W. Franke, et al. (1994). "Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm." J Biol Chem **269**(10): 7709-7718.

- Petersen-Mahrt, S. K., R. S. Harris, et al. (2002). "AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification." Nature **418**(6893): 99-103.
- Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Curr Opin Chem Biol **8**(6): 610-616.
- Popp, C., W. Dean, et al. (2010). "Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency." Nature **463**(7284): 1101-1105.
- Prochnow, C., R. Bransteitter, et al. (2007). "The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID." Nature **445**(7126): 447-451.
- Rada, C., J. M. Jarvis, et al. (2002). "AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7003-7008.
- Rai, K., I. J. Huggins, et al. (2008). "DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45." Cell **135**(7): 1201-1212.
- Rai, R., G. Peng, et al. (2007). "DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression." Cancer Genomics Proteomics **4**(2): 99-106.
- Rajewsky, K. (1996). "Clonal selection and learning in the antibody system." Nature **381**(6585): 751-758.
- Rogozin, I. B. and N. A. Kolchanov (1992). "Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis." Biochim Biophys Acta **1171**(1): 11-18.
- Sancar, A. (1996). "DNA excision repair." Annu Rev Biochem **65**: 43-81.
- Sayegh, C. E., M. W. Quong, et al. (2003). "E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells." Nat Immunol **4**(6): 586-593.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger, et al. (1992). "V(D)J recombination: molecular biology and regulation." Annu Rev Immunol **10**: 359-383.
- Schreck, S., M. Buettner, et al. (2006). "Activation-induced cytidine deaminase (AID) is expressed in normal spermatogenesis but only infrequently in testicular germ cell tumours." J Pathol **210**(1): 26-31.
- Shen, H. M., A. Peters, et al. (1998). "Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes." Science **280**(5370): 1750-1752.
- Sherman, M. H., A. I. Kuraishy, et al. (2010). "AID-induced genotoxic stress promotes B cell differentiation in the germinal center via ATM and LKB1 signaling." Mol Cell **39**(6): 873-885.
- Sherman, M. Y. and A. L. Goldberg (2001). "Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases." Neuron **29**(1): 15-32.
- Stavnezer, J. (2011). "Complex regulation and function of activation-induced cytidine deaminase." Trends Immunol **32**(5): 194-201.
- Stenglein, M. D., H. Matsuo, et al. (2008). "Two regions within the amino-terminal half of APOBEC3G cooperate to determine cytoplasmic localization." J Virol **82**(19): 9591-9599.
- Ta, V. T., H. Nagaoka, et al. (2003). "AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors." Nat Immunol **4**(9): 843-848.

- Tang, J. B., D. Svilar, et al. (2011). "N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase beta modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide." Neuro Oncol **13**(5): 471-486.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." EMBO J **19**(1): 94-102.
- Tobollik, S., L. Meyer, et al. (2006). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 inhibits AID expression during EBV-driven B-cell growth." Blood **108**(12): 3859-3864.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-581.
- Verma, R., L. Aravind, et al. (2002). "Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome." Science **298**(5593): 611-615.
- Vuong, B. Q., M. Lee, et al. (2009). "Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination." Nat Immunol **10**(4): 420-426.
- Wang, J. and M. A. Maldonado (2006). "The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases." Cell Mol Immunol **3**(4): 255-261.
- Weill, J. C. and C. A. Reynaud (2004). "RPA tightens AID to DNA...editing." Nat Immunol **5**(9): 876-878.
- Wilkinson, K. D. (1997). "Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes." FASEB J **11**(14): 1245-1256.
- Wilson, P., Y. J. Liu, et al. (1998). "Amino acid insertions and deletions contribute to diversify the human Ig repertoire." Immunol Rev **162**: 143-151.
- Wood, C. D., T. M. Thornton, et al. (2009). "Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage." Int J Biol Sci **5**(5): 428-437.
- Wood, R. D., S. J. Araujo, et al. (2000). "DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **65**: 173-182.
- Wyatt, M. D. and D. L. Pittman (2006). "Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks." Chem Res Toxicol **19**(12): 1580-1594.
- Yelamos, J., N. Klix, et al. (1995). "Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation." Nature **376**(6537): 225-229.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungen

%	Prozent	ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius	ATPase	Adenosintriphosphatase
α	anti	ATR	<i>Ataxia telangiectasia related</i>
β	Beta	<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i> Daxx
γ	Gamma	BCR	B-Zellrezeptor
δ	Delta	BER	Basenexzisionsreparatur
ε	Epsilon	BL	Burkitt's Lymphom
μ	micro	bp	Basenpaare
μF	Microfarad	BSA	<i>bovine serum albumine</i>
μg	Mikrogramm	<b>C</b>	<i>constant region</i>
μ-Kette	schwere Kette des IgM	C'	Carboxy-Terminus des Proteins
μl	Mikroliter	cDNA	<i>complementary DNA</i>
μM	mikromolar	Chk1/Chk2	<i>checkpoint homolog 1/2</i>
η	Eta	CHX	Cycloheximid
θ	Theta	CD	<i>clusters of differentiation</i>
ΨV	Psi (Pseudogene der variable Region)	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<b>A</b>	Alanin	coIP	Co-Immunopräzipitation
A	Adenosin	Cre	<i>cause of recombination</i>
aa	<i>Aminoacid</i> , Aminosäure	CRM1	<i>chromosome region maintenance</i>
Abb.	Abbildung	CSR	<i>class switch recombination</i>
Ag	Antigen	CT	<i>circular transcripts</i>
AID	Activierungsinduzierte Cytidin Deaminase	<b>D</b>	<i>diversity</i>
AL	<i>avian leucosis</i>	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Amp	Ampicillinresistenzgen	DEPC	Diethylpyrocarbonat
APOBEC1	Apolipoprotein B mRNA editie- rendes Enzym	dG	desoxy-Guanin
APC	<i>antigen presenting cell</i>	DLCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>
APE	Apurinische Stelle Endonuklease	DM	<i>deaminase motif</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat	D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle-</i> Medium
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
		DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i>
		DNA-PK	DNA-Proteinkinase
		DNase	Desoxyribonuklease
		dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

dsb	<i>double strand break,</i> Doppelstrangbruch	HEK	<i>carboxyterminus</i> <i>human embryonic kidney</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA	Hela	Henriette Lachs
DTT	Dithiothreitol	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
dU	desoxy-Uracil	HL	Hodgkin-Lymphom
<b>E</b>	Glutaminsäure	HR	homologe Rekombination
E	Enzym	HRP	Horseradish-Peroxidase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Hsp	Hitzeschockprotein
EBNA	(EBV- <i>nuclear-antigen</i> )	Ig	Immunglobulin
EBV	Epstein-Barr-Virus	IgH	schwere Ig-Kette
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	IgL	leichte Ig-Kette
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat	IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle
ER	<i>estrogen receptor</i>	<b>J</b>	<i>joining</i>
EtBr	Ethidiumbromid	JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
Exon	<i>expressed region</i>	<b>K</b>	Lysin
E $\mu$	IgH-Enhancer	kb	Kilobasenpaare
et. al.	<i>et alii</i> , und andere	kDa	Kilodalton
<b>F</b>	Farad, phys. Einheit der Kapazität	<b>I</b>	Liter
FDC	<i>follicular dendritic cells</i>	LMB	Leptomycin B
FACS	<i>fluorescence activated cell scan</i>	LMP1	latentes Membranprotein 1
FCS	<i>Fetal calf serum</i>	LSM	<i>laser scan microscopy</i>
FDC	follikuläre dendritische Zelle	LTR	<i>long terminal repeats</i>
FL	Follikuläres Lymphom	<b>M</b>	molar
FL	<i>full length</i>	MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>	mg	Milligramm
<b>g</b>	Gramm	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
G	Guanin	min	Minute
GC	<i>gene conversion</i>	miRNA	microRNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein	ml	Milliliter
<b>h</b>	<i>hours</i> , Stunden	mm	Millimeter
H	Histidin	mM	Millimolar
HA	Hämagglutinin	MMR	<i>mismatch repair</i>
H <sub>2</sub> O	bidest. zweifach destilliertes Wasser	mRNA	<i>messenger RNA</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	MSH	<i>mut S-homolog</i>
HECT	<i>homologous to E6-AP</i>	<b>N'</b>	Amino-Terminus des Proteins
		NER	Nukleotidexzisionsreparatur

NES	nukleäre Exportsequenz	RPA	Replikationsprotein A
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>	rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro min
ng	Nanogramm		
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Zellkultur-Medium
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenz		
nm	Nanometer	RSS	Rekombinationssignalsequenz
N-Nukleotide	nicht matrizen-kodierte Nukleotide	RT	Raumtemperatur
		RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
OD	Optische Dichte	<b>S</b>	<i>switch</i>
		S	Serin
<b>P</b>	Phosphorylierungsstelle	S	Svedberg
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel	S	Synthese
Pax-5	<i>paired box protein</i>	SDS	sodium dodecyl sulphate, Natriumdodecylsulfat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>		
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	sec	Sekunde
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion	SHM	somatische Hypermutation
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase	Spt5	<i>suppressor of Ty</i>
PKA	Proteinkinase A	ssb	<i>single strand break</i> Einzelstrangbruch
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	SSC	<i>Sideward Scatter</i>
P-Nukleotide	Palindromische Nukleotide	STAT-6	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Pol	Polymerase		
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase	Std.	Stunden
		Strep	Streptomycin
PRR	<i>postreplikative repair</i>	<b>T</b>	Thymin
Puro	Puromycin	T	Threonin
PVDF	Polyvinylidenfluorid	TAE	Tris-Acetat
<b>Q</b>	Glutamin	TCR	<i>T cell receptor</i>
<b>R</b>	Arginin	TdT	terminale Disoxynukleotidyltransferase
R	Purinbasen: Adenin oder Guanin	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Rad	<i>radiation sensitivity abnormal</i>	Tet	Tetracyclin
Rag	Rekombinationsaktivierende Gene	TF	Transkriptionsfaktor
RFP	rot fluoreszierendes Protein	TLS	Transläsionssynthese
RING	<i>really interesting new gene</i>	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
RNA	<i>ribonucleid acid</i>	<b>U</b>	Uracil
RNase	Ribonuklease	Ub	Ubiquitin-Molekül
		UBP	Ubiquitin-spezifische Protease

---

UbR	Ubiquitin-Rezeptor
UNG	Uracil-Glykosylase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
<b>V</b>	variable
V	Volt
V <sub>H</sub>	variables Segment der schweren Kette
V <sub>L</sub>	variables Segment der leichten Kette
<b>W</b>	Adenin oder Thymin
WT	Wildtyp
<b>XP</b>	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
<b>Y</b>	Pyrimidinbasen: Thymin oder Cytosin
z. B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 7.2 Danksagung

In diesem Abschnitt möchte ich all den Helfern und Unterstützern danken, ohne die die Fertigstellung der Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst einen Riesendank an die wichtigste Antriebskraft und den Mastermind dieses Unterfangens Prof. Dr. Berit Jungnickel. Neben den fachlichen genialen Einfällen möchte ich mich für die unkomplizierte und familiäre Atmosphäre bei den „Jungnickels“ bedanken und einen großes Dankeschön für die Hilfe in der Zeit der großen und kleinen Krisen in jeder Lebenslage aussprechen. Deine Unterstützung war stets beispielhaft!

Großer Dank an Prof. Dr. Heinrich Leonhardt für die Übernahme des Gutachtens und für interessante Ideen für eine Kollaboration. Insbesondere die unermüdliche Hilfestellung von dem Postdoc Oliver Mortusewicz hat mir spannende Erkenntnisse bei der Erforschung von AID ermöglicht. Viel Erfolg in Großbritannien, Olli!

Sylvia Manglkammer möchte ich ein herzliches Dankeschön für die Übernahme von anstrengenden bürokratischen Angelegenheiten auch während des Umzugs aussprechen und mich zeitgleich für die immer fröhliche und unbeschwerte Stimmung bedanken, die sie in jeder Situation ausgestrahlt hatte.

Die helfenden Hände von André, Sabine, Katrin, Angelika waren von unschätzbarem Wert, dafür ein Dankeschön. Die langen und fruchtbaren (meistens wissenschaftlichen) Diskussionen mit Irina, Nils, Samantha, Kerstin, Isha, Stephi, Anne, Kathrin und Ines haben mich sehr motivieren können, Danke!

Nils gilt ein besonderer Dank für die coole Reise nach und in Kanada! So macht Forschung wirklich Spaß! Auch den schwierigen Umzug von München nach Jena hätte ich ohne dich, deine Motivation, dein Durchhaltevermögen und deinen (Galgen-)Humor kaum schaffen können. Tausend Dank!

Die meiste Anerkennung verdienen meine Familie und mein Mann, die mich in diesen nicht immer einfachen vier Jahren nach besten Möglichkeiten und in jeder Situation unterstützt haben. Eure schier endlose Geduld, Motivation und Interesse haben mich nicht verzagen lassen und euch habe ich die wichtigste Lektion zu verdanken, dass bestimmte Schwierigkeiten eigentlich nur mit Humor zu meistern sind. Jetzt, nach der Beendigung der Dissertation bin ich davon überzeugt, dass ihr Recht hattet!

### 7.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, 15.12.11

Julia Jeschke

## 7.4 Erklärung

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

München, den 15.12.11

Julia Jeschke

## 7.5 Lebenslauf

### Julia Jeschke (geb. Janzen)

	<h4>Persönliche Daten</h4> <p>Geburtsdatum 02 September 1980  Geburtsort Jarowoje/Russland  Staatsangehörigkeit Deutsch  Familienstand verheiratet</p>
	<h4>Berufliche Tätigkeiten</h4> <p>seit 15.11.2010 <u>Friedrich-Schiller-Universität Jena</u>  Institut für Biochemie und Biophysik  (Laborumzug aus München)  AG Prof. Dr. Berit Jungnickel  <b>Wissenschaftliche Angestellte / Doktorandin</b>  Weiterführung der Doktorarbeit</p> <p>2007 - 2010 <u>Helmholtz-Zentrum München</u>  Institut für Klinische Molekularbiologie  AG PD. Dr. Berit Jungnickel  <b>Wissenschaftliche Angestellte / Doktorandin</b>  Thema der Dissertation:  DNA-Schädigung beeinflusst die Regulation der Aktivierungs-  induzierten Cytidin-Deaminase</p>
	<h4>Studium</h4> <p>2002 – 2007 <u>Ludwig-Maximilians-Universität München</u>  <b>Diplomstudium der Biologie</b> (Note: 1,3)  Schwerpunkt: Zellbiologie  Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Mikrobiologie  Thema der Diplomarbeit: Regulation of actin-cytoskeleton of  <i>Dictyostelium discoideum</i> by two different kinases</p>
	<h4>Schulausbildung</h4> <p>1996 – 2002 <u>Landschulheim Schloss Ising</u>  <b>Allgemeine Hochschulreife</b>, Gesamtnote: 1,9</p> <p>1987 – 1995 <u>Allgemeine Mittelschule in Jarowoje/Russland</u>  Abschlussnote: 1,0</p>
	<h4>Stipendien</h4> <p>Sommer 2009 <b>Stipendiatin</b> der JSPS/DAAD PhD summer school, Kyoto, Japan  10 Wochen Laborerfahrung bei Prof. Dr. S. Nagata</p>