

Funktionelle Analyse der PCNA- Polyubiquitinierung und der E3-Ligase SHPRH

Dissertation

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

Vorgelegt von
Nils-Sebastian Tomi
aus Donauwörth

angefertigt am
Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt,
Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik
und der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Zentrum für Molekulare Biomedizin (CMB)

München, den 15. September 2014

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Berit Jungnickel

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der Abgabe: 15. September 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 16. März 2015

Gewidmet meiner Mutter
und meiner Freundin Kathrin

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Analysis of SHPRH functions in DNA repair and immunoglobulin diversification

Tomi N.S., Davari K., Grotzky D., Loos F., Böttcher K., Frankenberger S., Jungnickel B.

DNA Repair (Amst). Dec 2014; 24:63-72

Im Rahmen der Promotion wurden folgende weitere Beiträge erbracht:

Ubc13 dosage is critical for immunoglobulin gene conversion and gene targeting in vertebrate cells

Ertongur I., Tomi N.S., Kutzera A., Fischer-Burkart S., Jungnickel B.

Nucleic Acids Res. Aug 2010; 38(14): 4701–4707

Checkpoint kinase 1 negatively regulates somatic hypermutation

Frankenberger S., Davari K., Fischer-Burkart S., Böttcher K., Tomi N.S., Zimmer-Strobl U., Jungnickel B.

Nucleic Acids Res. Apr 2014; 42(6): 3666–3674

Checkpoint kinase 2 is required for efficient immunoglobulin diversification

Davari K., Frankenberger S., Schmidt A., Tomi N.S., Jungnickel B.

Cell Cycle Sep 2014; published online

Die Arbeit wurde auf folgendem wissenschaftlichen Kongress präsentiert:

Ubc13 dosage is critical for immunoglobulin gene conversion and gene targeting in vertebrate cells

Tomi N.S., Ertongur I., Kutzera A., Fischer-Burkart S., Jungnickel B.

Poster: 354 Keystone-Symposium, Whistler, Kanada, 2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
ZUSAMMENFASSUNG	9
1 EINLEITUNG.....	10
1.1 Das adaptive Immunsystem	10
1.2 Die B-Zellentwicklung und der B-Zell-Rezeptor	11
1.2.1 Die primäre Immunglobulin-Diversifizierung von B-Zellen	12
1.2.2 Die sekundäre Diversifizierung während der Keimzentrumsreaktion	13
1.2.3 Die somatische Hypermutation.....	16
1.2.4 Die Ig-Genkonversion, ein alternativer Weg der Ig-Diversifizierung.....	16
1.3 Molekulare Mechanismen der sekundären Ig-Diversifizierung.....	17
1.3.1 Die AID-Expression wird auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene reguliert	18
1.3.2 Regulation von AID durch die Lokalisation in der Zelle und durch Phosphorylierung	18
1.3.3 Zielführung von AID an die Ig-Loci.....	19
1.3.4 Fehlleitung von AID	20
1.3.5 Die Prozessierung AID-induzierter Läsionen	20
1.4 Der Rad6-Signalweg	23
1.4.1 Die PCNA-Monoubiquitinierung.....	24
1.4.2 Die PCNA-Polyubiquitinierung	25
1.4.3 Die E3-Ligase SHPRH	26
1.4.4 Der Rad6-Weg und die Ig-Diversifizierung	28
1.5 Die DT40-Zelllinie, ein Modellorganismus für die somatische Hypermutation und die Ig-Genkonversion	29
1.6 Zielsetzung der Arbeit	30

2	ERGEBNISSE	32
2.1	Inaktivierung der SHPRH-Allele mit Strategie A.....	33
2.1.1	Untersuchung der somatischen Hypermuation in der DT40- Ψ V-Zelllinie nach dem Entfernen des ersten Allels mit Strategie A	36
2.2	Deletion der funktionellen PHD- bzw. RING-Domäne von SHPRH in der ΨV-Zelllinie	36
2.2.1	Untersuchung der SHPRH-Proteinexpression nach dem Entfernen verschiedener Domänen	41
2.2.2	Untersuchung der AID-Expression und Analyse der Proliferation in den verschiedenen SHPRH- <i>Knockouts</i>	42
2.2.3	Einfluss der SHPRH-Expression auf die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturwege	44
2.2.4	Untersuchung der Funktion von SHPRH bei der Mono- und Polyubiquitinierung von PCNA	47
2.2.5	Beeinflussung der somatischen Hypermuation durch SHPRH	49
2.2.6	Untersuchung der somatischen Hypermuation auf genomischer Ebene	51
2.3	Inaktivierung von SHPRH in der DT40-Cre1-Zelllinie.....	53
2.3.1	Einfluss von SHPRH auf die Proliferation und AID-Expression in der Cre1-Zelllinie	55
2.3.2	Untersuchung der PCNA-Ubiquitinierung in SHPRH-defizienten Cre1-Zellen.....	56
2.3.3	Einfluss der SHPRH-Expression auf die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturwege in der Cre1-Zelllinie	57
2.3.4	Einfluss von SHPRH auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über die Nicht-homologe Endverknüpfung oder die homologe Rekombination	58
2.3.5	Untersuchung der <i>Targeting</i> -Effizienz in der Cre1-SHPRH ^{-/-} -Zelllinie	61
2.3.6	Die Rolle von SHPRH bei der Ig-Genkonversion.	62
2.3.7	Einfluss von SHPRH auf die Ig-Genkonversion auf DNA-Ebene.....	64
3	DISKUSSION	69
3.1	Deletion von SHPRH in der DT40-Zelllinie	69
3.1.1	SHPRH- <i>Knockout</i> -Strategien.....	70
3.1.2	<i>Targeting</i> -Effizienz der verschiedenen <i>Knockout</i> -Konstrukte.....	70
3.1.3	Einfluss der verschiedenen SHPRH- <i>Knockout</i> -Strategien auf die mRNA- und Proteinexpression .	72
3.2	Einfluss von SHPRH auf die PCNA-Ubiquitinierung	72
3.2.1	Die PCNA-Monoubiquitinierung.....	72

3.2.2	Einfluss von SHPRH auf die PCNA-Polyubiquitinierung	73
3.3	Funktion von SHPRH bei der Reparatur exogen und endogen induzierter DNA-Schäden	76
3.3.1	Einfluss von SHPRH bei der Schadensantwort nukleotidverändernder Agenzien	76
3.3.2	Einfluss von SHPRH auf die somatische Hypermutation	78
3.4	Einfluss von SHPRH auf die Doppelstrangbruchreparatur.....	80
3.4.1	Funktion von SHPRH nach der exogenen Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen	80
3.4.2	Funktion von SHPRH nach der Bestrahlung von Zellen	82
3.4.3	Die gerichtete Integration von Gen- <i>Targeting</i> -Vektoren in das Genom von DT40-Zellen.....	83
3.4.4	SHPRH und die Ig-Genkonversion, ein Prozess dem die HR zu Grunde liegt	84
3.5	Fazit	90
3.6	Ausblick.....	91
4	ANHANG:	93
5	MATERIAL UND METHODEN	94
5.1	Material	94
5.1.1	Chemikalien.....	94
5.1.2	Geräte.....	94
5.1.3	Protein-Größenstandard	95
5.1.4	DNA-Größenmarker	96
5.1.5	Antikörper	96
5.1.6	Bakterien	97
5.1.7	Primer.....	98
5.1.8	Plasmide	99
5.1.8.1	SHPRH- <i>Targeting</i> -Vektoren	99
5.1.8.2	SHPRH-Überexpressionsvektor	101
5.1.9	Die DT40-Zelllinie	102
5.2	Methoden	102
5.2.1	Zellkultur	102

5.2.1.1	Bestimmung der Zelldichte.....	103
5.2.1.2	Einfrieren und auftauen von Zellen.....	103
5.2.2	Transfektion von DT40-Zellen.....	103
5.2.3	Durchflusszytometrische-Analyse von Zellen.....	104
5.2.4	Untersuchung der Proliferationsrate.....	104
5.2.5	Untersuchung der Ig-Diversifizierung in der DT40-Zelllinie.....	105
5.2.6	Methylzellulose-Überlebensexperimente.....	106
5.2.6.1	Herstellung der 1,8%-igen Methylzellulose.....	107
5.2.7	Doppelter Thymidinblock.....	107
5.2.8	PCNA-Ubiquitinierungs-Assay.....	108
5.2.9	Aktivierung der <i>Cre</i> -Rekombinase in den DT40-Zellen.....	108
5.2.10	Techniken der DNA-Analyse.....	109
5.2.10.1	Isolierung der DNA aus DT40-Zellen.....	109
5.2.10.2	Southernblot-Analyse.....	109
5.2.10.3	Herstellung der radioaktiv markierten Sonde.....	110
5.2.10.4	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	111
5.2.10.5	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	111
5.2.10.6	DNA-Modifikationen.....	111
5.2.10.7	DNA-Quantifizierung.....	111
5.2.10.8	DNA-Gelelektrophorese.....	111
5.2.10.9	Reinigung der DNA.....	112
5.2.10.10	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	112
5.2.11	Methoden der RNA-Analyse.....	114
5.2.11.1	RNA-Isolation und Erststrang-cDNA-Synthese.....	114
5.2.11.2	Quantitative <i>realtime</i> -PCR.....	114
5.2.12	Proteinbiochemische Methoden.....	115
5.2.12.1	Präparation von Proteinen aus Zellen.....	115
5.2.12.2	Proteinquantifizierung.....	116
5.2.12.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	117
5.2.12.4	Western Blot.....	117
5.2.12.5	Immundetektion von Proteinen.....	118

6	LITERATURVERZEICHNIS	119
7	ABKÜRZUNGEN	135
8	DANKSAGUNG.....	141
9	LEBENS LAUF	143
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	144
	ERKLÄRUNG.....	144

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Überblick über die primären und sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen.	12
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Keimzentrumsreaktion (verkürzt nach Küppers [21]).....	14
Abb. 1.3: Modell der Reparatur AID-induzierter Schäden (nach Di Noia und Neuberger [2]).....	21
Abb. 1.4: Darstellung der sequenziellen Ubiquitinierung von PCNA und der daraus resultierenden Änderung der Replikation (nach Hoege et al. [124]).....	25
Abb. 2.1: Übersicht über die SHPRH- <i>Knockout</i> -Strategien.....	32
Abb. 2.2: Entfernen des ersten Allels von SHPRH in der DT40- Ψ V-Zelllinie.....	34
Abb. 2.3: Untersuchung der SHM in der DT40- Ψ V-SHPRH ^{+/-} -Zelllinie.....	37
Abb. 2.4: Inaktivierung von SHPRH in der DT40- Ψ V-Zelllinie mit den <i>Knockout</i> -Strategien B/C	39
Abb. 2.5: Nachweis der SHPRH-Proteinexpression in den verschiedenen Ψ V-SHPRH ^{+/-} -Zelllinien	42
Abb. 2.6: Untersuchung der AID-Expression und Proliferation in den verschiedenen.....	43
Abb. 2.7: Einfluss von SHPRH auf das Überleben unter dem Einfluss DNA-schädigender Agenzien	46
Abb. 2.8: Einfluss der verschiedenen SHPRH- <i>Knockouts</i> auf die PCNA-Ubiquitinierung.....	48
Abb. 2.9: Einfluss der verschiedenen SHPRH- <i>Knockouts</i> auf die SHM.....	50
Abb. 2.10: Untersuchung der Mutationsfrequenz in der leichten λ -Kette der Ψ V-DT40-Zellen	52
Abb. 2.11: Inaktivierung von SHPRH in der DT40-Cre1-Zelllinie mit Hilfe der Strategie A	54
Abb. 2.12: Untersuchung der AID-Expressionen und Proliferation in der Cre1-SHPRH ^{+/-} -Zelllinie	56
Abb. 2.13: Ubiquitinierungsexperiment mit DT40-Cre1-SHPRH ^{+/-} -Zellen, <i>Knockoutset</i> A	57
Abb. 2.14: Einfluss der SHPRH-Expression auf die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturwege in der DT40-Cre1-Zelllinie.....	58
Abb. 2.15: Doppelstrangbruch-Reparatur: Unterscheidung zwischen NHEJ und HR in Cre1-SHPRH- defizienten Zellen	60
Abb. 2.16: <i>Targeting</i> -Effizienz des RDM1-Transgens in der Cre1-Wildtyp- und SHPRH ^{+/-} -Zelllinie	62
Abb. 2.17: Untersuchung der Ig-Genkonversion in DT40-Cre1-SHPRH ^{+/-} -Zellen.....	63
Abb. 2.18: SHPRH hat einen Einfluss auf die Genkonversionsmutationen	65
Abb. 2.19: Darstellung der Genkonversionsereignisse auf der VJ-Region des λ -Lokus der leichten Kette ...	66
Abb. 2.20: Darstellung der Traktlängen der Genkonversionsereignisse	67
Abb. 4.1: Effekt von SHPRH auf das Überleben von Ψ V-Zellen unter dem Einfluss von Etoposid.....	93
Abb. 5.1: Proteingrößenstandard.....	95
Abb. 5.2: Repräsentativer SHPRH- <i>Knockout</i> -Vektor	100
Abb. 5.3: HA-SHPRH-Überexpressions-Vektor	101

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Targeting-Effizienz in der Ψ V-Zelllinie für <i>Knockout</i> -Strategie A	35
Tab.2.2 Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen, generiert mit den <i>Knockout</i> -Strategien B und C.....	44
Tab.2.3 <i>Targeting</i> -Effizienz mit Strategie A in der Cre1-Zelllinie	55
Tab. 3.1 Übersicht der SHPRH- <i>Knockout</i> -Strategien und die daraus resultierenden Effekte	89
Tab. 5.1 Westernblot-Analyse	96
Tab. 5.2 FACS-Analyse	96
Tab. 5.3 Enzyme	96
Tab. 5.4 Kits	97
Tab. 5.5 Datenverarbeitung	97
Tab. 5.6 Übersicht der verwendeten Primer.....	98
Tab. 5.7 PCR-Programm unter Verwendung der <i>Long-Template</i> -Polymerase	112
Tab. 5.8 PCR-Programm unter Verwendung der <i>Phusion</i> -Polymerase	113
Tab. 5.9 PCR-Programm zur Amplifikation des λ -Lokus	113
Tab. 5.10 PCR-Programm unter Verwendung der <i>Taq</i> -Polymerase.....	114
Tab. 5.11 q-PCR-Programm	115

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID) ist ein hoch mutagenes Protein, welches die somatische Hypermutation, den Immunglobulin (Ig)-Klassenwechsel und die Ig-Genkonversion initiiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AID auch außerhalb der *Ig*-Gene Läsionen einfügen kann. Es mehren sich Hinweise, dass durch die Aktivierung vorwiegend fehlerfreier Reparaturwege „Nicht-*Ig*-Gene“ weitgehend vor Mutationen bewahrt werden, wohingegen die fehlerbehafteten Reparaturmechanismen zu einer erhöhten Mutationsfrequenz in den *Ig*-Genen führen und somit zur Diversifizierung des B-Zellrezeptors beitragen.

Der Rad6-Weg, ein wichtiger Signalweg der postreplikativen Reparatur (PRR), kann durch die Modifikation von PCNA über Ubiquitin sowohl einen fehlerbehafteten als auch einen fehlerfreien Reparaturmechanismus initiieren. Während der fehlerhafte Reparaturweg durch die PCNA-Monoubiquitinierung eingeleitet wird, wird in der Hefe für den fehlerfreien Reparaturweg die PCNA-Polyubiquitinierung über die E3-Ligase Rad5 vermittelt. Nachdem SHPRH als Ortholog von Rad5 identifiziert wurde, sollte die Funktion von SHPRH (*SNF2 histone linker PHD RING helicase*) in der Hühner-B-Zelllinie DT40, in der das zweite Rad5-Ortholog HLTF nicht gefunden werden konnte, genauer untersucht werden. Hierfür wurde in DT40-Zellen mit Hilfe von *Gen-Targeting* SHPRH entweder komplett inaktiviert oder es wurden funktionelle Domänen entfernt.

Zunächst wurde ein Versuchsansatz etabliert, der den Nachweis der PCNA-Ubiquitinierung erheblich erleichtert. Die Untersuchung der verschiedenen *Knockoutzellen* zeigte keinen Einfluss von SHPRH auf die schadensinduzierte PCNA-Polyubiquitinierung, aber möglicherweise einen Einfluss auf die basale PCNA-Monoubiquitinierung.

Auch an der Reparatur von Cisplatin oder MMS-induzierten DNA-Schäden sowie der somatischen Hypermutation scheint SHPRH nicht beteiligt zu sein.

In Überlebensexperimenten mit Etoposid kristallisierte sich schließlich eine Funktion von SHPRH bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen heraus. Trotz verschiedener weiterer experimenteller Ansätze konnte der diesem Effekt zugrundeliegende Mechanismus nicht eindeutig geklärt werden.

Es werden daher weitere Studien benötigt, um das richtige Substrat der E3-Ligase SHPRH und/oder die redundante E3-Ligase für die PCNA-Polyubiquitinierung zu identifizieren sowie den Einfluss von SHPRH auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur zu analysieren.

1 EINLEITUNG

Der menschliche Organismus ist jederzeit einer Vielzahl von Pathogenen verschiedenster Art ausgesetzt. Die erste Verteidigungslinie ist die angeborene Immunität [1]. Trotz physischer Barrieren, Komplementsystem und Fresszellen wie Makrophagen gelingt es einigen Pathogenen die angeborene Immunität zu überwinden [1]. Dadurch wird schon während der Infektion die adaptive Immunantwort aktiviert. Ein wichtiger Teil der adaptiven Immunität sind B-Zellen, die mit Hilfe von keimbahnkodierten Immunglobulinen sehr spezifisch fremde Antigene von Krankheitserregern erkennen und binden können [1]. Nach der Aktivierung differenzieren die B-Zellen im Zuge der Immunantwort zu langlebigen Gedächtniszellen sowie zu Plasmazellen [1]. Die Plasmazellen sezernieren bei einer primären Immunantwort affine Antikörper um das spezifische Pathogen zu beseitigen [1]. Noch während der Infektion kommt es zu einer Affinitätsreifung der Antikörper, um das Pathogen effektiver binden und dadurch noch effizienter eliminieren zu können [2].

1.1 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunantwort wird von den B- und T-Lymphozyten, kurz B- und T-Zellen genannt, vermittelt [1]. Diese zeichnen sich durch einen antigenspezifischen Rezeptor (B- oder T-Zell Rezeptor; BZR oder TZR) aus, über den die Zellen selektiv aktiviert werden können [1].

Beide Zelltypen lassen sich neben dem TZR und dem BZR durch zusätzlich exprimierte CD-Oberflächenproteine (*Cluster of Differentiation*) unterscheiden. Die T-Zellen sind an der sogenannten zellulären Antwort beteiligt [1]. Dabei gibt es CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, die maligne oder durch Viren infizierte Zellen direkt abtöten können. CD4⁺ T-Helferzellen nehmen andererseits vor allem eine Aufgabe bei der Aktivierung von B-Zellen und von Zellen des angeborenen Immunsystems wahr [3]. Bei der humoralen Immunantwort hingegen werden B-Zellen aktiv, die außer dem membranständigen Immunglobulin noch CD19, CD20 und CD21 auf der Oberfläche exprimieren und darüber identifiziert werden können. Unter anderem durch die Bindung des spezifischen Antigens an den BZR wird die B-Zelle aktiviert und kann im Zuge der Immunantwort zu einer langlebigen Gedächtniszelle oder zu einer Plasmazelle differenzieren, die große Mengen Antikörper sekretieren kann

[1]. Bei der Opsonisierung werden die Pathogene durch die Bindung von Antikörper markiert und somit auf die Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Zellen vorbereitet [1, 4]. Auch das Komplementsystem, das durch die Antikörperbindung aktiviert wird, kann das Pathogen entweder direkt abtöten oder die Phagozytose erleichtern [5]. Es gibt aber auch neutralisierende Antikörper, die das Pathogen oder ein Toxin direkt unschädlich machen können [1].

Die B-Lymphozyten stehen vor dem Problem, dass sie mit einer begrenzten Anzahl an Informationen, die das Genom zur Verfügung stellen kann, eine theoretisch unbegrenzte Anzahl an Pathogenen erkennen müssen. Jedem einzelnen Antigen ein eigenes Gen zuzuordnen ist nicht möglich. Aus diesem Grund bedient sich die B-Zelle einiger genetischer Mechanismen, um die Vielfalt ihrer Antikörperbindestellen zu erhöhen und somit möglichst alle Pathogene mit einer hohen Affinität binden zu können [6].

1.2 Die B-Zellentwicklung und der B-Zell-Rezeptor

Die gesamte Entwicklung der B-Zelle ist darauf ausgelegt, aus dem begrenzten Repertoire von genomisch kodierten Antigenbindestellen denjenigen Antikörper zu generieren, der ein bestimmtes Pathogen binden und vernichten kann. Ziel ist es also, einen möglichst effektiven Antikörper zu generieren. Dieser besteht aus zwei identischen leichten (IgL, *immunoglobulin light chain*) und zwei identischen schweren Ketten (IgH, *immunoglobulin heavy chain*), die miteinander über Disulfidbrücken verbunden sind. Auf diese Weise erhalten sie in etwa die Form eines Y [1, 7]. Der N-terminale Teil ist für die Antigenbindung zuständig und wird auch als variable Region bezeichnet. Hier liegen die drei CDRs (*complementary determining regions*) [8], die die höchste Variabilität aufweisen [9] und später direkt mit dem komplementären Antigen in Verbindung treten [9].

Die konstante Region ist hingegen verantwortlich für die spätere Interaktion des Antikörpers mit Effektorzellen oder Komponenten der angeborenen Immunität, wie z.B. dem Komplementsystem [9]. Die Immunglobulin-Gensegmente liegen in drei genetischen *Loci* vor, in dem κ - und λ -Lokus und dem Lokus für die schwere Kette.

Während der B-Zell-Entwicklung durchläuft der BZR zwei Schritte der Diversifizierung, um den Antikörper für ein spezifisches Pathogen zu optimieren. Dabei wird eine Antikörpervielfalt erreicht, die beim Menschen auf 10^{11} geschätzt wird [10].

1.2.1 Die primäre Immunglobulin-Diversifizierung von B-Zellen

Der erste Schritt, um die Variabilität der Antikörperbindestelle zu erhöhen, ist die zufällige Zusammensetzung von verschiedenen V- (*variable*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Gensegmenten (Abb. 1.1 A). Für die variable Region der leichten Kette stehen dabei nur V- und J-Segmente zur Verfügung, während bei der schweren Kette ein zusätzliches D-Segment rekombiniert werden kann. Diese zufällige und nicht reversible V(D)J-Umlagerung führt dann zu einem funktionellen V-Exon [11, 12].

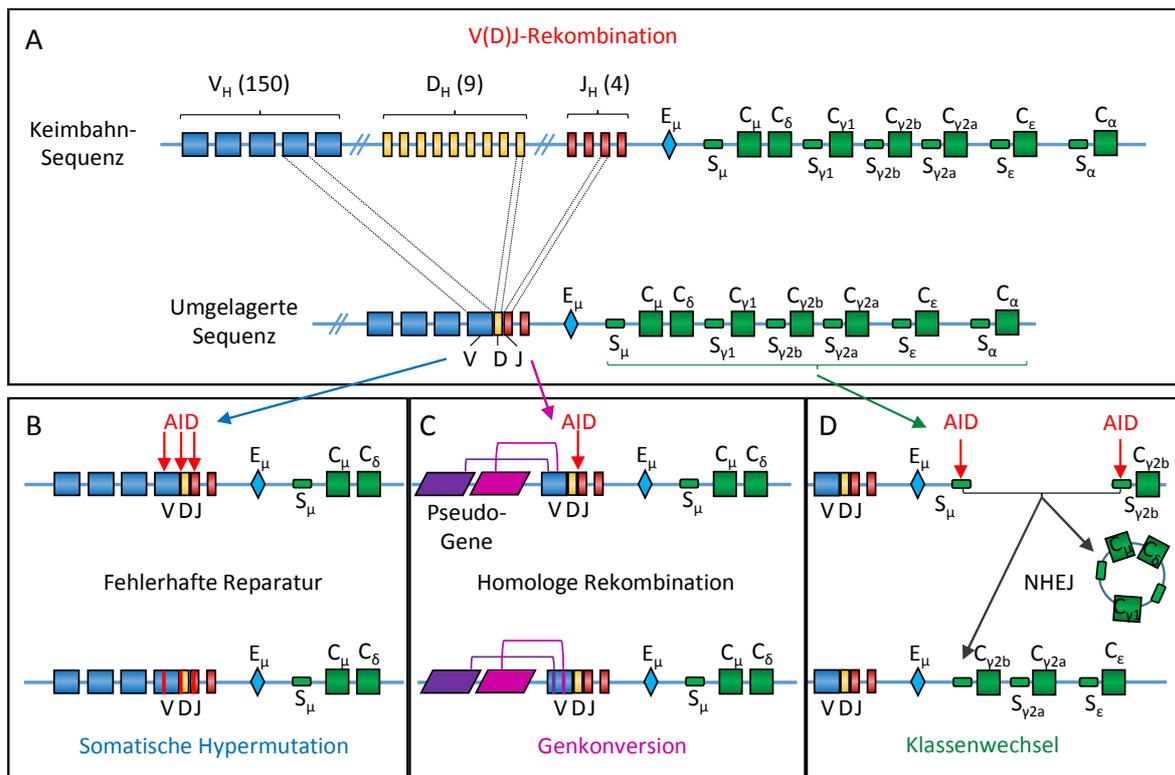


Abb. 1.1: Überblick über die primären und sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen.

A) Vereinfachte Darstellung des IgH-Lokus von *Mus musculus* in seiner Keimbahn- und seiner rekombinierten Konfiguration (nach Schatz et al. [13]). Dargestellt sind die V- (*variable*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Gensegmente. In Klammern ist die ungefähre Anzahl an Gensegmenten angegeben. Mit S sind die *switch* und mit C die konstanten (*constant*) Regionen angegeben. In B-D sind die sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen aufgeführt (verändert nach Jungnickel [14]). **B)** AID-induzierte Läsionen führen durch eine fehlerhafte Reparatur zu Mutationen, welche die Grundlage der somatischen Hypermutation darstellen. **C)** In einigen Farmtieren haben AID-induzierte Schäden zur Folge, dass sich durch die homologe Rekombination Fragmente aus den stromaufwärts liegenden Pseudogenen in den umgelagerten V(D)J-Bereich integrieren. Durch die Ig-Genkonversion wird die Variabilität erhöht. **D)** AID-induzierte Läsionen in den S-Regionen können zu Brüchen prozessiert werden. Diese können über die Nicht-homologe Endverknüpfung neu verbunden werden. Dadurch kommt es zur Expression eines neuen Isotyps (hier IgG2b) und somit zum Klassenwechsel. Die dazwischenliegende Sequenz wird als *switch circle* entfernt. Abkürzungen: AID: Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase, E: *Enhancer*, NHEJ: Nicht-homologe Endverknüpfung.

Damit ein V-Segment mit einem D- oder J-Segment und nicht mit einem anderen V-Segment rekombiniert wird, sind die einzelnen Segmente von Rekombinationssignalsequenzen (RSS) flankiert. Erkannt werden diese Sequenzen von RAG-1 und RAG-2 (*recombination activating gene 1/2*), den Schlüsselenzymen dieser Reaktion. RAG-1 und RAG-2 initiieren die Rekombination der V(D)J-Segmente indem sie Doppelstrangbrüche zwischen der RSS und der kodierenden Sequenz einführen und an den kodierenden Enden Haarnadelstrukturen (*Hairpin*) generieren [10, 15]. Hierauf werden die Enden von Ku70/80-Proteinen der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ; *non-homologous end joining*) gebunden. Anschließend kann die Haarnadelstruktur von einem Komplex, bestehend aus der DNA-PK (DNA-Proteinkinase) sowie der Endo- und Exonuklease Artemis, geöffnet werden. Durch das Öffnen der Haarnadelstruktur entstehen palindromische Nukleotide (P-Nukleotide) [1]. Um die Variabilität weiter zu erhöhen fügt die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) matrizenunabhängig N-Nukleotide (*Non-template*) an die offenen DNA-Enden an, wobei Exonukleasen auch wieder zufällig Nukleotide entfernen können [16]. Schließlich werden die offenen Enden durch die DNA-Ligase IV, die einen Komplex mit XRCC4 bildet, neu verknüpft [17, 18]. Anschließend wird die Variabilität zusätzlich durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten einer schweren mit einer leichten Kette erhöht [9].

Zusammengefasst entsteht die Variabilität bei der primären Ig-Diversifizierung durch die Rekombination verschiedener V(D)J-Segmente (Abb. 1.1 A), sowie dem zufälligen Hinzufügen und Entfernen einzelner Nukleotide. Sobald die V(D)J-Segmente erfolgreich umgelagert wurden, kann die naive B-Zelle das Knochenmark verlassen und zirkuliert durch die Peripherie im Blut oder in der Lymphe. Trifft sie hier auf ihr spezifisches Antigen, kommt es während der anschließenden Keimzentrumsreaktion zur sekundären Ig-Diversifizierung [19].

1.2.2 Die sekundäre Diversifizierung während der Keimzentrumsreaktion

Das Keimzentrum wurde 1884 erstmals von Walter Flemming als mikroanatomische Region von sekundären Lymphorganen beschrieben, welche sich schnell teilende Zellen beinhaltet [20]. Als sekundäre Lymphorgane werden die Milz, die Lymphknoten, sowie mucosal-assoziierte lymphoide Gewebe bezeichnet [1].

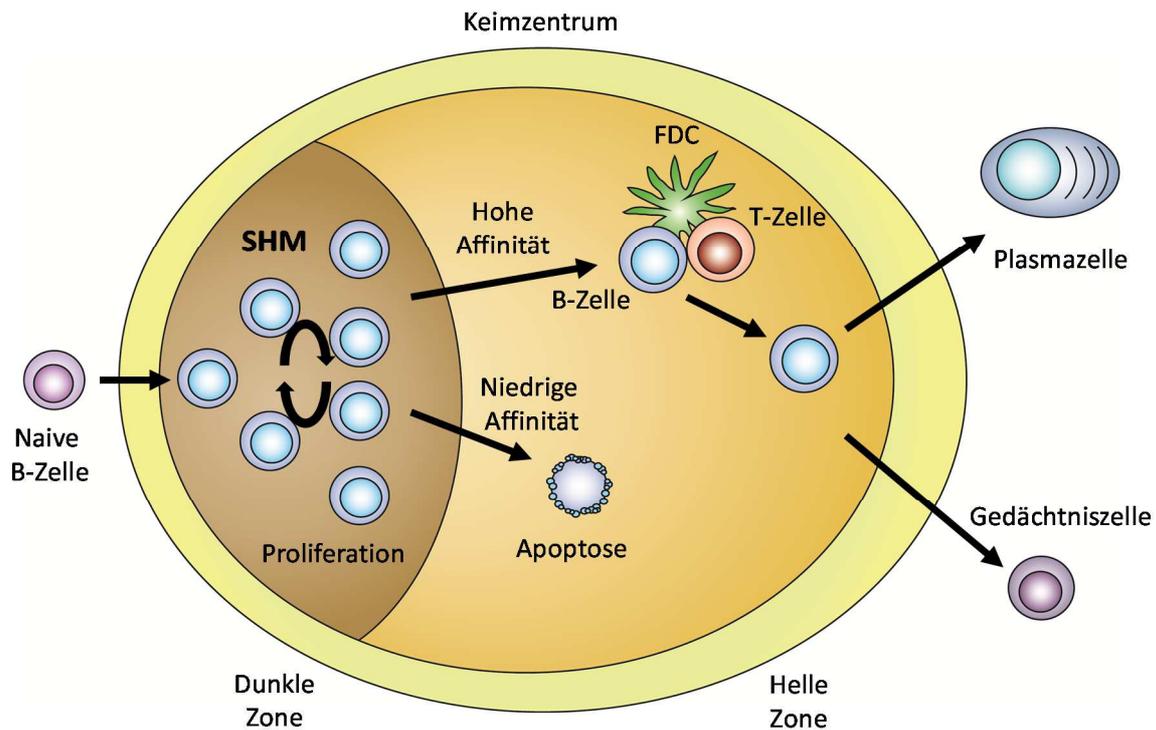


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Keimzentrumsreaktion (verkürzt nach Küppers [21])

Trifft die naive B-Zelle auf ihr Antigen und wird zusätzlich von einer T-Helferzelle aktiviert, beginnt sie in der dunklen Zone des Keimzentrums zu proliferieren. Währenddessen kommt es zur somatischen Hypermutation. Hierbei sollen zufällig eingefügte Mutationen die Antikörperaffinität erhöhen. Follikulär dendritische Zellen präsentieren das Antigen auf der Oberfläche. B-Zellen mit einer niedrigeren oder gleichbleibenden Affinität gehen in Apoptose, wohingegen Zellen, die Antigene mit einer höheren Affinität binden, ein Überlebenssignal von T-Helferzellen bekommen und dann zu Plasma- oder Gedächtnis-B-Zellen differenzieren können. Abkürzung: FDC: *follicular dendritic cell*, SHM: somatische Hypermutation

Durch die Bindung des spezifischen Antigens werden die B-Zellen aktiviert, worauf sie in die sekundären Lymphorganen wandern und dort die Keimzentren innerhalb der B-Zell-Follikel bilden. Diese *Foci* werden schnell größer und nach einigen Tagen kann man die typische Struktur der reifen Keimzentren erkennen [22] (Abb. 1.2). Die Keimzentren sind in eine helle und eine dunkle Zone eingeteilt [20]. Nach dem zweiten Aktivierungssignal durch eine ebenfalls antigenspezifische T-Zelle beginnen die B-Zellen stark zu proliferieren und bilden die dunkle Zone des Keimzentrums. In der hellen Zone kommen neben den B-Zellen auch Antigen-präsentierende follikulär-dendritische-Zellen (FDC, *follicular dendritic cell*) und T-Helfer-Zellen vor. Die Aktivierung der B-Zellen durch T-Helferzellen führt neben der Proliferation auch zur Expression von AID [23]. AID deaminiert Cytidin in der variablen- und *switch*-Region der Immunglobulin-Gene (*Ig*-Gene) und induziert damit die somatische

Hypermutation (SHM, *somatic hypermutation*) sowie den Ig-Klassenwechsel (CSR, *class switch recombination*) [24-26] (Abb. 1.1 B+D).

Nach der somatischen Hypermutation wandern die B-Zellen in die helle Zone des Keimzentrums. B-Zellen, in denen Mutationen dazu führen, dass keine BZR-Expression mehr möglich ist, werden über die Einleitung der Apoptose beseitigt. B-Zellen mit einem funktionellen BZR interagieren mit den FDCs, welche das Antigen auf der Oberfläche präsentieren. Wenn der BZR das Antigen mit einer erhöhten Affinität binden kann, bekommen die B-Zellen ein erstes Überlebenssignal [27].

Danach tritt die B-Zelle mit den T-Helferzellen in Kontakt, welche einen weiteren Schritt der Selektion hochaffiner B-Zellen übernehmen, wie experimentelle Daten [28], aber auch mathematische Modelle nahelegen [29, 30]. Dabei präsentiert die B-Zelle das internalisierte und prozessierte Antigen der antigen-spezifischen T-Zelle. Wenn die T-Zelle das Antigen binden kann exprimiert sie den CD40-Ligand, der den CD40-Rezeptor auf der B-Zelle binden kann [31]. Diese Interaktion vermittelt der B-Zelle ein kostimulatorisches Signal [31], worauf diese zu einer Plasmazelle oder einer langlebigen Gedächtniszelle differenziert [1]. Alle Zellen, die während der Keimzentrumsreaktion in Apoptose gegangen sind, werden durch spezielle keimzentrumstypische *tingible-body*-Makrophagen beseitigt [32].

Der zweite wichtige Schritt bei der Reifung der B-Zelle im Keimzentrum ist der Klassenwechsel. Dieser findet in der konstanten Region der *Ig*-Gene statt. Aufgebaut ist diese in *Mus musculus* aus fünf C-Segmenten (C μ -, C δ -, C γ -, C ϵ - und C α -Segment), wobei sich das C γ -Segmente in drei Untergruppen aufgliedert (C γ ₁-, C γ _{2b}- und C γ _{2a}-Segment). Diese bestimmen den späteren Isotyp des Antikörpers (IgM, IgD, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgE oder IgA) [33] (Abb. 1.1 D). Der Isotyp beeinflusst die Effektorfunktion des Antikörpers und bestimmt dessen Klasse [33].

Als Endergebnis der Keimzentrumsreaktion werden terminal differenzierte Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen mit hochaffinen Antikörpern sowie einer speziellen Effektorfunktion (Isotyp) in den Körper entlassen, um das eingedrungene Pathogen möglichst effizient zu beseitigen [34].

1.2.3 Die somatische Hypermutation

AID und die von diesem Enzym induzierten Läsionen sind die Grundlage der SHM [23]. Im Modell nach Di Noia und Neuberger wurde beschrieben, wie diese DNA-Läsionen prozessiert werden können, um Mutationen zu generieren [2]. Durch die SHM werden Punktmutationen in die variable Region eingefügt (Abb. 1.1 B). Diese beginnen ~150 bp vor dem Promotor der Ig-V-Gene und enden nach 1-2 kb, wobei mit zunehmendem Abstand auch die Mutationsfrequenz sinkt [35]. Während der SHM erhöht sich dadurch die Mutationsrate der variablen Region auf 10^{-3} Mutationen pro Basenpaar pro Zellteilung, eine 10^6 -fache Erhöhung der Mutationsrate verglichen mit der spontanen somatischen Mutationsrate [36, 37].

Für die somatische Hypermutation gibt es sogenannte *Hot-Spot-Motive* WRCY (W = A/T, R = A/G, und Y = C/T), bzw. das komplementäre Motiv RGYW [38]. Mutiert werden alle 4 Basen, wobei mehr Transitionen als Transversionen vorkommen [39]. Die G:C-Mutationen entstehen gleich häufig am Vorwärts- oder Rückwärts-Strang. Bei den A:T-Mutationen hingegen werden Mutationen an A-Basen im Vorwärts-Strang bevorzugt [40]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass AID nur an einzelsträngiger DNA katalytisch aktiv werden kann, was die Transkription des entsprechenden genomischen Bereichs erfordert [41-44]. Obwohl die Transkription eine wichtige Voraussetzung der SHM ist, reicht diese alleine nicht aus, da viele stark transkribierte Gene nicht mutiert werden [45, 46]. Trotzdem konnten Mutationen in den Genen wie *bcl-6*, *c-myc* und *fas* nachgewiesen werden [47, 48].

Ziel der somatischen Hypermutation ist es die Mutationsrate in der variablen Region zu erhöhen, um durch zufällige Veränderungen von Nukleotiden einen Antikörper soweit zu verbessern, dass er das spezifische Antigen mit einer erhöhten Affinität binden kann.

1.2.4 Die Ig-Genkonversion, ein alternativer Weg der Ig-Diversifizierung

Während bei Primaten und Nagetieren das primäre Antikörperrepertoire ausschließlich durch die V(D)J-Umlagerung generiert wird, besitzen einige Farmtiere wie Rinder, Pferde, Kaninchen oder Hühner nur eingeschränkte Umlagerungsmöglichkeiten [49]. Stellvertretend für die Ig-Genkonversion bei Farmtieren werden in diesem Kapitel Hühner-B-Zellen beschrieben. Diese besitzen für die leichte Kette jeweils nur ein funktionelles V- (V_L) sowie ein J-Gensegment (J_L). Diese beiden Segmente werden in allen B-Zellen

verwendet. Einzig durch die ungenaue Zusammenlagerung kommt es zu kleinen Variationen [50-52]. Ähnlich sieht es bei der schweren Kette aus, auch hier sind die V_H - und J_H -Gensegmente einzigartig [53], wobei es 15 funktionelle D_H -Segmente gibt, die jedoch zu keiner vergleichbaren Diversität wie beim Menschen oder beim Nagetier führen [54].

Vor den VJ_L - und VDJ_H -Segmenten befinden sich sogenannte Pseudo V-Gene (ΨV). Diesen ΨV -Genen fehlen die Rekombinationssignalsequenzen, da sie häufig am 5'- und/oder 3'-Ende verkürzt sind. Außerdem besitzen sie keine Promotor-Sequenzen [50]. Auf Grund dieser Eigenschaften sind diese Sequenzen von der $V(D)J$ -Rekombination ausgeschlossen. Auch die Ig-Genkonversion (Ig-GC, *gene conversion*) wird von AID-induzierten Läsionen initiiert und findet bei der Deletion von AID nicht mehr statt [55]. Mechanistisch betrachtet wird für diesen Prozess ein Einzelstrang- oder Doppelstrangbruch benötigt. Im Gegensatz zum Klassenwechsel wird dieser jedoch über die homologe Rekombinations (HR)-Reparatur prozessiert. Dabei spielen XRCC2, XRCC3 und RAD51B, Paraloge von Rad51 sowie Rad54 aus der Hefe [56] und UNG eine wichtige Rolle [57]. Ein Einfluss der Proteine RAD52, Ku70, DNA-PKcs [56] und RAG-2 [58] konnte hingegen nicht nachgewiesen werden [50]. Während der Ig-GC werden aus den ΨV -Genen teilweise homologe Abschnitte in die vorher umgelagerten $V(D)J$ -Segmenten eingefügt und die ursprüngliche Sequenz wird ersetzt [52, 53] (Abb. 1.1 C). Bei diesem unidirektional Gentransfer bleibt die Information aus den ΨV -Genen unverändert und wird in mehrfachen Zyklen in die $V(D)J$ -Segmente eingefügt, um die Diversität zu erhöhen [51, 59].

1.3 Molekulare Mechanismen der sekundären Ig-Diversifizierung

Durch die sekundäre Ig-Diversifizierung können die nun hoch affinen Antikörper das Pathogen sehr effizient binden und beseitigen und somit eine chronische Infektion verhindern. Der Motor der sekundären Ig-Diversifizierung ist AID [9], welches die somatische Hypermutation, den Ig-Klassenwechsel und die Ig-Genkonversion initiiert [23, 60]. Das Enzym gehört zu der Familie der APOBEC-Proteine und besitzt ein Deaminase-Motiv mit einem Schlüssel-Histidin und einem Cysteinrest, um ein Zink-Molekül koordinieren zu können [61].

Mechanistisch läuft die sekundäre Ig-Diversifizierung auf verschiedenen Ebenen ab. Zunächst generiert AID durch die Deaminierung von Cytidin zu Uracil Läsionen in einzelsträngiger DNA [44]. Anschließend müssen bei der Ig-Diversifizierung die AID-induzierten Läsionen so prozessiert werden, dass aus dieser DNA-Läsion das gesamte Spektrum an Mutationen generiert werden kann [2]. Da AID ein hoch mutagenes Protein ist, muss dieses Enzym strikt reguliert werden, um ungewollte Mutationen außerhalb des *Ig*-Lokus zu verhindern [62].

1.3.1 Die AID-Expression wird auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene reguliert

AID wird auf transkriptioneller Ebene durch mehrere Transkriptionsfaktoren (TF) reguliert. Hier spielen unter anderem NFκB und HoxC4 eine entscheidende Rolle [62]. Dabei wird NFκB durch die Stimulation von CD40, TLR (*toll-like receptor*) und dem BZR induziert [63, 64], HoxC4 hingegen durch CD154 oder LPS und IL-4 (Interleukin 4) [65]. Beide TF binden an den *AID*-Kern-Promotor und induzieren synergistisch die *AID*-Transkription [62, 65]. Aber auch andere TF, wie das durch IL-4 aktivierte Stat6 oder das TGF-β/Stat6-induzierte Smad3/4 können an den *AID*-Promotor binden und diesen aktivieren [62, 66]. Weitere *AID*-induzierende Faktoren sind Pax5, E47 und Irf8 [67]. Dem gegenüber stehen unter anderem Blimp1 und Id2 welche die *AID*-Expression supprimieren können [67].

Posttranskriptionell kann AID auch durch miRNAs (*mikro-RNA*) unterdrückt werden. MiRNAs sind kurze (~22 Nukleotide) Nicht-kodierende RNAs, welche komplementär zu der 3'UTR (*untranslated region*) der Ziel-mRNA sind und diese degradieren oder deren Translation inhibieren können [68]. Auf diese Weise können über miR-155, miR-181b und miR-93 AID mRNA- und damit Protein-Level von AID herabgesetzt werden [62, 69-73].

1.3.2 Regulation von AID durch die Lokalisation in der Zelle und durch Phosphorylierung

Bei AID ist der N-terminale Teil positiv geladen und besitzt eine Kernlokalisationssequenz [74, 75]. Der C-terminale Teil hingegen besitzt eine leuzinreiche Kernexportsequenz, die eine vorwiegende Lokalisation von AID im Zytoplasma zur Folge hat [62, 74-77]. Neben der Diffusion bewirken diese Sequenzen, dass AID ständig zwischen dem Zellkern und dem

Zytoplasma transportiert wird. Zusätzlich wird der Wirkungsgrad von AID durch den schnellen proteasomalen Abbau im Kern eingeschränkt, wohingegen dieses Enzym im Zytoplasma Hsp90-abhängig stabilisiert wird [78, 79].

Eine weitere Möglichkeit der AID-Regulation ist unter anderem die Phosphorylierung an T27, S38, T140, Y184 und an weiteren Aminosäuren [80-83], wobei die Phosphorylierungen von T27 und S38 am besten untersucht sind. Nach aktuellen Forschungsergebnissen werden sie über die Proteinkinase A (PKA) reguliert [75, 81, 84]. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesen Aminosäuren sowohl die SHM und Ig-Genkonversion, als auch den Klassenwechsel beeinträchtigen [80, 81, 85]. Da an S38 nicht-phosphoryliertes AID enzymatisch noch aktiv ist [86], ist diese Modifikation wahrscheinlich regulatorischer Natur. Tatsächlich wird sie für die Interaktion von AID mit dem Replikations-Protein A (RPA, replication protein A) benötigt, welches einzelsträngige DNA bindet [80, 84], an der AID seine enzymatische Aktivität ausführen kann.

1.3.3 Zielführung von AID an die *Ig*-Loci

Es ist bekannt dass die SHM unter anderem von dem IgH-Promotor und der Transkription abhängt. Diese These wird durch Experimenten gestützt, bei denen die SHM-Rate merklich abnahm, wenn in einem IgH-Transgen der Promotor fehlte [87]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Mutations- mit der Transkriptionsrate korreliert [88].

Zusätzlich konnte mit Hilfe von shRNA (short hairpin RNA)-Versuchen belegt werden, dass AID über Spt5 an blockierten RNA-Polymerase II-Komplexen kolokalisiert und seine enzymatische Aktivität dabei an einzelsträngiger DNA ausführen kann [89]. Auch für PTBP2 (Polypyrimidine tract-binding protein 2) und dem 14-3-3 Protein konnte gezeigt werden, dass beide für die Interaktion von AID mit transkribierter DNA benötigt werden [90, 91].

Mutationsanalysen weisen darauf hin, dass einige Aminosäuren im N-terminale Bereich von AID spezifisch für die SHM gebraucht werden, wohingegen einige Aminosäuren des C-terminalen Bereiches für spezielle Aufgaben bei dem Klassenwechsel notwendig sind [92, 93]. Über diese Aufteilung können Kofaktoren, die an den unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind, möglicherweise besser koordiniert werden.

1.3.4 Fehlleitung von AID

AID kann fälschlicherweise auch an andere Loci binden. In der Abwesenheit von UNG (*uracil DNA glycosylase*) und dem MSH2 (*MutS protein homolog*) Protein, das eine Rolle bei der *Mismatch*-Reparatur spielt, führen die AID-induzierten Läsionen in einer Reihe anderer transkribierter Gene zu Mutationen. In diesen Genen beträgt die Mutationsrate jedoch nur ein Zehntel der der Ig-V-Gene [47]. Eine andere Studie belegt, dass AID mit annähernd 6000 Nicht-Ig-Genen assoziiert ist [94]. Sollten die von AID induzierten Läsionen sowie die dabei entstehenden Einzel- und Doppelstrangbrüche nicht richtig prozessiert werden, kann das Genom der B-Zelle destabilisiert werden. Dies führt im ungünstigsten Fall zu Lymphomen, die oft aus Keimzentrumszellen entstehen [24].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass viel über die Regulierungsmechanismen von AID aufgeklärt werden konnte. Wie jedoch die Zielführung von AID an die Ig-V-Gene gesteuert wird, ist nach wie vor nur teilweise verstanden.

1.3.5 Die Prozessierung AID-induzierter Läsionen

Die sekundäre Ig-Diversifizierung ist in vielerlei Hinsicht außergewöhnlich. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sehr unterschiedliche Prozesse wie die SHM, der Klassenwechsel und die Ig-Genkonversion durch ein einziges Protein initiiert werden. *Knockout*-Studien mit Mäusen und Zelllinien, sowie Erbkrankheiten im Menschen belegen, dass ohne AID diese Prozesse nicht mehr stattfinden [23, 55, 60, 95].

Dabei katalysiert AID nur eine einzige Modifikation in einzelsträngiger DNA (ssDNA, *single stranded DNA*). Die Deaminierung von Cytidin zu Uracil [41]. Aus dieser Läsion ergeben sich trotzdem an beiden DNA-Strängen und in etwa gleichem Verhältnis C:G- und A:T-Mutationen [2], sowie Einzelstrangbrüche, die zu Doppelstrangbrüchen prozessiert werden können, um den Klassenwechsel und die Ig-Genkonversion zu induzieren [96]. Diese Tatsache ist besonders überraschend, da Uracil normalerweise durch die Basenexzisionsreparatur sowie die *Mismatch*-Reparatur mit einer sehr hohen Effizienz fehlerfrei entfernt und durch Cytidin ersetzt werden kann [97-99]. Durch die Kombination verschiedener *Knockout*-Studien in Mäusen haben Di Noia und Neuberger ein Modell entwickelt, welches darlegt, wie aus einer U:G-Fehlpaarung das gesamte Spektrum an Mutationen entstehen kann [2].

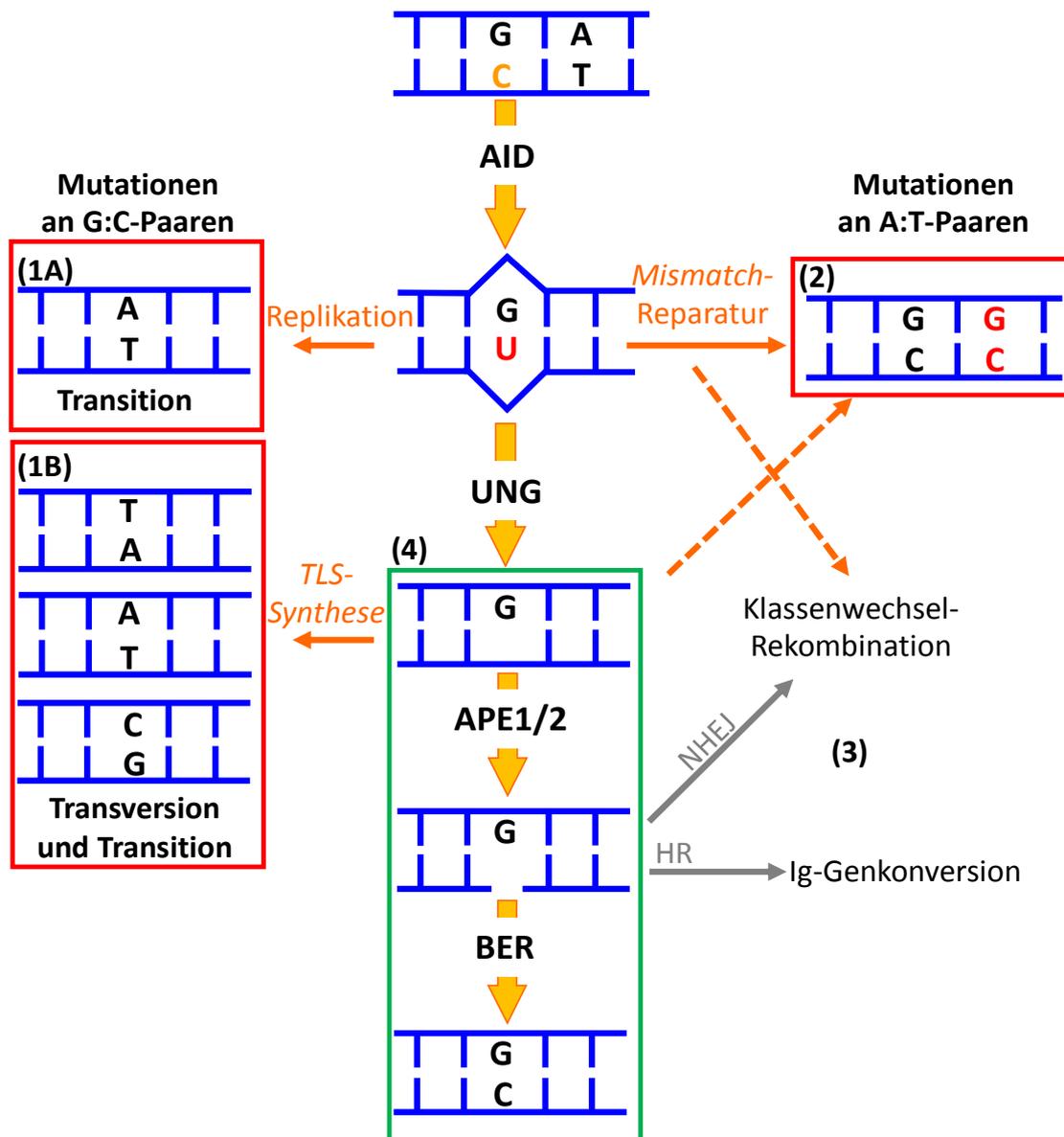


Abb. 1.3: Modell der Reparatur AID-induzierter Schäden (nach Di Noia und Neuberger [2]).

Während der Ig-Diversifizierung deaminiert AID Cytidin zu Uracil. Normalerweise kann diese Läsion fehlerfrei über die Basenexzisionsreparatur (4) und die *Mismatch*-Reparatur behoben werden. In diesem Modell kommt es durch die Replikation über Uracil (1A) zu Transitionsmutationen an G:C-Basen. Durch die Aktivierung der *Mismatch*-Reparatur werden auch A:T-Basen mutiert (2). Nachdem UNG eine abasische Stelle generiert hat, kann es durch die Rekrutierung von TLS-Polymerasen (1B) zu Transitions- und Transversionsmutationen an G:C-Basen kommen. Alternativ kann an einer abasischen Stelle die Endonuklease APE1/2 ein Einzelstrangbruch generieren, der zu einem Doppelstrangbruch prozessiert werden kann. Doppelstrangbrüche in der *switch*-Region können über das NHEJ repariert werden, um den Klassenwechsel zu initiieren. Bei der Ig-Genkonversion werden Einzel- oder Doppelstrangbrüche über die HR repariert. Die unterbrochenen Pfeile zeigen eine *Backup*-Funktion der jeweiligen Reparaturwege.

Abkürzungen: AID: Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase, APE: Apurinische/apyrimidinische Endonuklease, UNG: Uracil-N-Glykosylase, NHEJ: Nicht-homologe Endverknüpfung, HR: homologe Rekombination, Ig: Immunglobulin, BER: Basenexzisionsreparatur, TLS: Transläsionssynthese, grün umrandet sind fehlerfreie und rot umrandet fehlerhafte Reparaturmechanismen.

Um die verschiedenen Mutationen zu erklären, unterteilt dieses Modell die Prozessierung der Läsionen in drei Phasen. In Phase 1 entstehen vor allem Mutationen an G:C-Paaren, wobei diese Phase nochmal in Phase 1A, die sich durch Transitionen auszeichnet, und Phase 1B, die durch Transitionen und Transversionen gekennzeichnet ist, unterteilt wird.

In der Phase 2 kommt es zu Transitions- und Transversionsmutationen bevorzugt an A:T-Basenpaaren.

Phase 1A:

In dieser Phase wird über die fehlgepaarte U:G-Läsion repliziert. Dabei generiert die Nukleotidsubstitution eine C zu T oder eine G zu A Transition, da während der Replikation bevorzugt Adenin gegenüber dem Uracil eingefügt wird [100].

Phase 1B:

Während dieser Phase wird Uracil vor dem Start der Replikation durch die Uracil-DNA Glykosylase2 (UNG2) entfernt. UNG2 ist eine Komponente der Basenexzisionsreparatur (BER) und schneidet Uracil vom Dextrose-Phosphat-Rückgrat der DNA, wobei eine abasische Stelle entsteht. Während der klassischen BER wird hierauf APE1 (apurinische/apyrimidinische Endonuklease) rekrutiert, ein Enzym, welches das Deoxyribose-Phosphat-Band auf der 5'-Seite, gleich neben der AP-Stelle (apurinische/apyrimidinische Stelle) schneidet, worauf die Polymerase β (Pol β) den DNA-Strang fehlerfrei resynthetisiert [101-103] (Abb. 1.3 (4)). Während der SHM ist dieser kanonische Mechanismus der BER beeinträchtigt und es kommt zum fehlerhaften Einbau von Nukleotiden durch die Rekrutierung von fehlerbehafteten Polymerasen, die über die abasischen Stellen synthetisieren [2, 104]. Hauptsächlich sind dabei die Transläsionspolymerasen (TLS-Polymerasen, translesion synthesis) Rev1 und Pol ζ beteiligt. Es zeichnet sich ab, dass diese gegenüber abasischen Stellen ein einzelnes Nukleotid synthetisieren [2], was zu Transitionen oder Transversionen an G:C-Basen führen kann [105-109].

Phase 2:

Neben der BER kann Uracil auch durch Komponenten der Mismatch-Reparatur (MMR) erkannt werden. Normalerweise entfernt die MMR DNA-Fehlverknüpfungen und behebt diese fehlerfrei. Dabei bindet das Heterodimere Mut S Homolog 2/6 (MSH2/6) die Fehlpaarung und rekrutiert weitere Proteine, unter anderem die Exonuklease 1 (Exo1), die Uracil und umliegende Nukleotide entfernt [110, 111]. Danach wird die fehlerfreie Pol δ

rekrutiert, welche die entstandene Lücke wieder auffüllt [112]. Während der somatischen Hypermutation wird durch das Heterodimer MSH2/6 jedoch statt der fehlerfreien Pol δ die Pol η rekrutiert [113]. Diese fehlerbehaftete Polymerase baut gegenüber Thymidin bevorzugt Guanin ein und führt damit zu den A:T-Mutationen [114]. Dies wird auch durch MSH2/6-*Knockout*-Experimente bestätigt, in welchen ein starker Abfall der A:T-Mutationen beobachtet werden konnte [115].

Beim Klassenwechsel erzeugt UNG2 ausgehend von Uracil eine abasische Stelle in den *switch*-Regionen vor den konstanten Segmenten [116], worauf das APE1-Enzym einen Einzelstrangbruch generiert (Abb. 1.1 D und Abb. 1.3) [117, 118]. Kommt es in der Nähe auf dem anderen DNA-Strang zu dem gleichen Ereignis, kann dies einen Doppelstrangbruch erzeugen (*double-strand break*, DSB) [119], welcher benötigt wird, um die zwischen zwei *switch*-Sequenzen liegende DNA zu entfernen [33]. Die Brüche werden danach meist über das klassische NHEJ oder aber auch die alternative Endverknüpfung verbunden [33].

Mit Hilfe von MSH2/UNG doppeldefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zu einer gewissen Kompetition zwischen dem UNG- und MSH2/6-Reparaturweg kommt. Denn die Exzision des Uracils durch UNG2 kann einen untergeordneten *Backup*-Reparaturweg für die zweite Phase der SHM bereitstellen und durch die *Mismatch*-Reparatur kann auch der Isotypenwechsel eingeleitet werden [2, 120, 121] (Abb. 1.3, unterbrochene Pfeile).

Zusammengefasst erklärt das Modell nach Di Noia und Neuberger, wie in den *Ig*-Genen aus den AID-induzierten Läsionen das gesamte Spektrum an Mutationen entstehen kann. Für den Fall, dass AID-induzierte Läsionen jedoch in Nicht-*Ig*-Gene eingeführt wurden, muss der fehlerfreie Reparaturmechanismus wieder aktiviert werden, um gefährliche Mutationen zu verhindern.

1.4 Der Rad6-Signalweg

Wie es dazu kommt, dass durch AID-induzierte Läsionen hauptsächlich die *Ig*-Gene mutiert werden, blieb lange Zeit ein Rätsel. Verschiedene Studien zeigen, dass AID nicht nur mit *Ig*-Genen assoziiert, wobei die in Nicht-*Ig*-Genen eingefügten DNA-Schäden aber hauptsächlich fehlerfrei repariert werden [47, 94]. Eine Möglichkeit zwischen der

fehlerhaften und der fehlerfreien Reparatur zu entscheiden bietet der sogenannte Rad6-Weg.

Der Rad6-Weg steuert die post-replikative-Reparatur (PRR) und wurde zunächst in der Hefe ausführlich untersucht [122]. Im Mittelpunkt dieses Mechanismus steht PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), ein homotrimeres ringähnliches Molekül, welches für die Prozessivität der DNA-Polymerasen während der normalen Replikation zuständig ist [123]. Es kann aber auch bei einer blockierten Replikationsgabel durch post-translationale Modifikationen verändert werden, so dass sich die Affinität zu Proteinen aus der DNA-Reparatur erhöht [123]. Bei der Entscheidung zwischen der fehlerhaften und fehlerfreien Reparatur spielt vor allem die Modifikation durch Ubiquitin am Lysin164 eine wichtige Rolle [124], welche hier nun im Detail beschrieben wird.

1.4.1 Die PCNA-Monoubiquitinierung

Kommt es auf Grund eines DNA-Schadens zu einer blockierten Replikationsgabel, wird PCNA an dem stark konservierten Lysin164 (Lys) mit Hilfe des Ubiquitin-konjugierendem Enzyms (E2) Rad6 und der Ubiquitinligase (E3) Rad18 monoubiquitiniert (Abb. 1.4) [124]. Die Monoubiquitinierung konnte in einer Reihe von Organismen nachgewiesen werden, einschließlich der Hefe [124], dem *Xenopus* [125], dem Huhn [126] und den Säugern [124]. Beim Pausieren der Replikationsgabel kommt es zu einzelsträngiger DNA, welche durch RPA gebunden wird. RPA kann wiederum mit Rad18 interagieren und wahrscheinlich auf diese Weise den Rad6/Rad18-Komplex zur Schadensstelle rekrutieren [127, 128].

Wenn PCNA einmal am Lys164 monoubiquitiniert ist, können TLS-Polymerasen der Y-Familie (Pol η , Pol κ , Pol ι und Rev1), sowie die aus der B-Familie stammende Pol ζ zur DNA-Schadensstelle rekrutiert werden [129]. Die Interaktion zwischen monoubiquitiniertem PCNA und den TLS-Polymerasen kommt über die PIP-Motive (*PCNA interacting peptide*), sowie die UBM (*ubiquitin-binding motif*) oder die UBZ (*ubiquitin-binding zinc finger*) zustande. Dabei verdrängen die TLS-Polymerasen die replikativen Polymerasen δ oder ϵ [130-135]. TLS-Polymerasen besitzen, anders als die prozessiven Polymerasen, ein flexibles katalytisches Zentrum, mit dessen Hilfe sie über blockierende Läsionen hinweg replizieren können [136-138]. Dabei arbeitet die Pol η relativ fehlerfrei, wenn sie über Thymidindimere repliziert [139-141]. An unbeschädigter DNA führen die Pol η oder die Pol ζ jedoch zu einer erhöhten Mutagenese [142]. Die Bedeutung der TLS-Polymerasen wird

durch Mutationen in den entsprechenden Genen offensichtlich. So kann eine Mutation im Gen der Pol η das Krankheitsbild Xeroderma pigmentosum hervorrufen. Diese Krankheit erhöht das Hautkrebsrisiko stark und verringert somit die Lebenserwartung der Betroffenen deutlich [129, 139, 140].

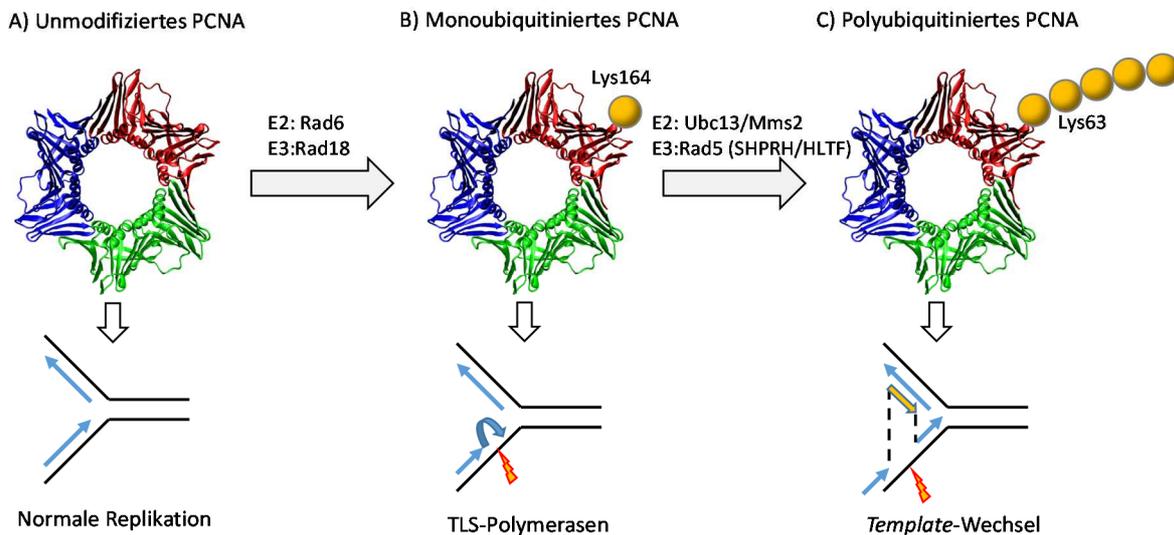


Abb. 1.4: Darstellung der sequenziellen Ubiquitinierung von PCNA und der daraus resultierenden Änderung der Replikation (nach Hooge et al. [124])

A) Während der normalen Replikation liegt PCNA unmodifiziert vor. **B)** Kommt es auf Grund einer Läsion zu einer blockierten Replikationsgabel, kann PCNA über Rad6 und Rad18 am Lys164 monoubiquitiniert werden, wodurch Transläsionspolymerasen rekrutiert werden können, die über den Schaden hinweg replizieren können. **C)** Rad5 kann den Ubc13/Mms2-Komplex an das monoubiquitinierte PCNA rekrutieren und somit an das Lys63 des Ubiquitin weitere Ubiquitine anhängen. Dadurch kann PCNA polyubiquitiniert werden. Dies führt zu einem homologievermittelten Wechsel, wobei das Schwesterchromatid als Matrize dient, um die Läsion fehlerfrei zu reparieren.

Abkürzungen: E2: Ubiquitin verknüpfendes Enzym, E3: Ubiquitinligase, PCNA: *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*, Lys: Lysin, TLS: Transläsionssynthese, SHPRH: *SNF2 histone linker PHD RING helicase*, HLTF: *helicase-like transcription factor*, Mms: *Methyl methanesulfonate sensitive*, Ubc: *Ubiquitin-conjugating enzyme*. 3D-Struktur von PCNA nach Wikipedia und [143]

1.4.2 Die PCNA-Polyubiquitinierung

Neben der PCNA-Monoubiquitinierung kann es in vielen Organismen, eingeschlossen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, zur Polyubiquitinierung von PCNA kommen [124]. Dabei werden weitere Proteine der Rad6-Epistasegruppe benötigt. Der E2/E2-Komplex, bestehend aus Mms2 (*Methyl methanesulfonate sensitive 2*) und Ubc13 (*Ubiquitin-conjugating enzyme*), wird in der Hefe über die RING-Finger-Domäne der E3-Ligase Rad5

aus dem Zytoplasma in den Zellkern rekrutiert. Rad5 kann dabei mit Rad18 interagieren, wodurch der gesamte Komplex in die Nähe der blockierten Replikationsgabel kommt [124, 144]. In dieser Konstellation können Mms2/Ubc13 und Rad5 an das bereits am PCNA konjugierte erste Ubiquitin weitere Ubiquitin-Moleküle über das Lys63 knüpfen, um PCNA auf diese Weise zu polyubiquitinieren [145, 146]. Als Folge der Polyubiquitinierung von PCNA kommt es zu einem homologievermittelten Wechsel zum Schwesterchromatid, wobei der unbeschädigte DNA-Strang als Matrize verwendet wird (Abb. 1.4) [124, 147, 148]. Obwohl dieser Prozess nicht genau verstanden ist, zeigen Epistasis-Analysen in der Hefe, dass das Wegfallen der Polyubiquitinierung zu einer erhöhten Mutagenese führt, möglicherweise da der Zelle nur die Alternative bleibt, auf die fehlerbehafteten TLS-Polymerasen zurückzugreifen [149-152].

Die PCNA-Polyubiquitinierung konnte in der Hefe gut untersucht werden, wobei sich der Nachweis der Polyubiquitinierung im Säuger jedoch als viel schwieriger erweist [132, 153]. Es wurden zwei zu Rad5 orthologe Proteine gefunden, SHPRH (*SNF2 histone linker PHD RING helicase*) und HLTF (*helicase-like transcription factor*). Beide Proteine können gemeinsam mit dem Ubc13/Mms2-Komplex PCNA polyubiquitinieren, wobei ihre Funktionen allerdings kontrovers diskutiert werden [153-157].

Das kürzlich identifizierte Protein ZRANB3 erkennt polyubiquitiniertes PCNA über eine PIP-box und über Ubiquitin-bindende NZF (*NPI4 zinc-finger*)-Motive [158-160]. Es werden jedoch noch weitere Studien benötigt, um zu bestätigen, ob das Protein wirklich essentiell an dem fehlerfreien Reparaturweg beteiligt ist, oder ob es nur eines von vielen nukleären Faktoren ist, die zu polyubiquitiniertem PCNA rekrutiert werden [161].

1.4.3 Die E3-Ligase SHPRH

E3-Ligasen können zusammen mit dem entsprechenden Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) eine Vielzahl von Proteinen ubiquitinieren und dadurch zelluläre Prozesse wie die Proteindegradation [162], DNA-Reparatur, den Zellzyklus und den Proteintransport steuern [163, 164]. Die E3-Ligasen werden dabei funktionell in die RING (*Really Interesting New Gene*)- bzw. HECT (*homologous to E6-AP carboxyl terminus*)-Familie eingeteilt [165-167]. Bei der HECT-Familie wird das Ubiquitin ausgehend von dem E2-konjugierendem Enzym an die E3-Ligase kovalent gebunden und kann dann auf das Substrat übertragen werden [168, 169]. Bei der RING-Familie hingegen wird das E2-konjugierende Enzym mit

Hilfe der Ringdomäne der E3-Ligase gebunden und der E2/E3-Komplex wird in die Nähe des Substrates gebracht, wodurch dieses vom E2/E3-Komplex ubiquitiniert werden kann [170, 171].

SHPRH wurde zunächst als unbekanntes Gen identifiziert, welches eine Vielzahl von unterschiedlichen Domänen besitzt, wie die SNF2 (*S*ucrose *N*on *F*ermentable)-, PHD (*p*lant *h*omeodomain)-Finger, RING-Finger, Helikase- und Histon-linker-Domäne [172]. Sood und Kollegen konnten zwar Proteine mit bis zu 50% Ähnlichkeit in anderen Spezies finden, woraus sie schlossen, dass es sich um ein gut konserviertes Protein handeln müsse, aber sie konnten kein Ortholog für dieses Protein ableiten [172]. Auf Grund von Mutationen im *SHPRH*-Gen in verschiedenen Melanomen, sowie in Brust- und Ovar-Tumor-Zelllinien, ordneten Sood und Kollegen *SHPRH* als Tumorsuppressorgen ein [172].

Drei Jahre später identifizierten zwei Gruppen *SHPRH* als Ortholog zu der RING-E3-Ligase Rad5 aus der Hefe [156, 157], welche für die Polyubiquitinierung von PCNA verantwortlich ist [124, 144]. Als Nachweis dienten *in vitro* Assays [157], oder Experimente in Zelllinien, in denen die einzelnen Komponenten des Rad6-Signalweges überexprimiert wurden [156]. Hier zeigten die verschiedenen Gruppen, dass eine *SHPRH*-Überexpression die PCNA-Polyubiquitinierung induzieren kann [156, 157]. Im Jahr 2008 identifizierten Moetegi und Kollegen HLTF (*h*elicase-*l*ike *t*ranscription *f*actor) als ein weiteres Ortholog zu Rad5 und zeigten in Überexpressionsversuchen, dass *SHPRH* und HLTF kooperativ an der Polyubiquitinierung von PCNA beteiligt sind [155].

Mit Hilfe von shRNA (*s*hort *h*airpin RNA) konnte außerdem gezeigt werden, dass eine verminderte *SHPRH*- oder *HLTF*-Expression zu einer erhöhten MMS-Sensitivität (*M*ethyl*m*ethansulfonat) und zu einer stärkeren MMS-induzierten Mutationsfrequenz führt [155, 156].

Zwei Jahre später konnten Krijeger und Kollegen *HLTF*- und *SHPRH*-doppeldefiziente Mäuse generieren. In diesem *Knockout* konnte jedoch kein Einfluss der zwei Proteine auf die PCNA-Polyubiquitinierung, die Sensitivität der Zellen gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien, sowie die somatische Hypermuation beobachtet werden [154].

Im Jahr 2011 zeigten Lin und Kollegen, dass *SHPRH* und HLTF schadensabhängig die postreplikative Reparatur koordinieren, um eine Mutagenese zu verhindern [153]. Dabei legen die Autoren dar, dass MMS einen Rad18-*SHPRH*-Polk-Komplex induziert, der die MMS-induzierten Läsionen relativ fehlerfrei repariert. Auf der anderen Seite kann HLTF

nach UV-induzierten Schäden Pol η rekrutieren, welche diese Läsionen mit hoher Zuverlässigkeit fehlerfrei reparieren kann [153, 173].

Eine Funktion der E3-Ligase SHPRH (und von HLTF) im Rad6-Weg wurde mehrfach beobachtet. Je nach Versuchsansatz (Proteinüberexpression, shRNA oder *Knockout*) und in Abhängigkeit der experimentellen Vorgehensweise wurde der Phänotyp jedoch sehr unterschiedlich beschrieben und dieser konnte nicht eindeutig geklärt werden. Dabei ist es besonders interessant, den Einfluss von SHPRH auf die Ig-Diversifizierung zu untersuchen, da entweder kein Einfluss auf die Mutationsrate [154] oder eine erhöhte Mutationsrate [155] beobachtet werden konnte.

1.4.4 Der Rad6-Weg und die Ig-Diversifizierung

Da der Rad6-Weg durch die Mono- und Polyubiquitinierung von PCNA die Weichen für die fehlerfreie bzw. die fehlerhafte DNA-Reparatur stellen kann, könnte dieser Weg auch während der Ig-Diversifizierung eine wichtige Rolle spielen. Dies wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen.

Wird etwa in der DT40- Ψ V-Zelllinie das Rad18-Gen deletiert, kann PCNA nur noch sehr schwach monoubiquitiniert werden, wodurch sich die Rate der SHM stark verringert [126, 174]. Noch eindeutiger wird dieser Effekt in der PCNA^{K164R}-Mutante, welche nicht mehr ubiquitiniert werden kann. Dies führt zu einer nochmals weiter verminderten Rate an Nukleotidsubstitutionen während der SHM in DT40-Zellen [126]. In Mäusen mit der PCNA^{K164R}-Mutation verringert sich die Mutationsrate der SHM an A:T-Basen um 90 Prozent, was aber durch den G:C-Mutator teilweise kompensiert wird, wodurch die Gesamtmutationsrate sich nur um 25 Prozent verringert [175, 176].

Die Ursache für beide Beobachtungen ist die Interaktion von einigen TLS-Polymerasen mit monoubiquitinierten PCNA. So ist die TLS-Polymerase Rev1 für die G:C-Transversionen in den Hühner-DT40-Zellen und in der Maus verantwortlich [106, 177]. Die Rekrutierung bestimmter TLS-Polymerasen während der SHM ist zumindest in DT40-Zellen aus dem Huhn von monoubiquitiniertem PCNA abhängig [126, 174]. In Mäusen hingegen konnte auch eine PCNA-Ubiquitinierungs-unabhängige Rekrutierung der Pol η bei der SHM nachgewiesen werden [178].

Für die A:T-Mutagenese werden die MSH2/MSH6-Proteine benötigt, die die U:G-Fehlpaarung erkennen. Exo1 generiert dann eine Lücke und diese wird über die Pol η

aufgefüllt [179]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei oxidativem Stress MSH2 und MSH6 unverzichtbar sind, um PCNA zu monoubiquitinieren und die Interaktion von monoubiquitiniertem PCNA mit der Pol η zu initiieren [115]. Somit konnte eine regulierende Funktion des Rad6-Weges in der Phase 2 der SHM belegt werden (Abb. 1.3). Der Einfluss der PCNA-Polyubiquitinierung auf den Prozess der SHM wurde bisher nicht genauer beschrieben. Es gibt zwar Hinweise darauf, dass eine fehlende SHPRH-Expression zu einer erhöhten Mutagenese führt [155], doch diese Aussage konnte in einer anderen Publikation nicht bestätigt werden [154]. Auch das E2-konjugierende Enzym Ubc13 zeigt keinen Einfluss auf die SHM, sondern, wegen einer zusätzlichen Funktion bei der HR [180], nur auf die Ig-Genkonversion [181, 182]. Somit bleibt der Einfluss der PCNA-Polyubiquitinierung bei der Ig-Diversifizierung weiterhin offen und dient als Grundlage für verschiedene Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit.

1.5 Die DT40-Zelllinie, ein Modellorganismus für die somatische Hypermutation und die Ig-Genkonversion

Um den Einfluss von SHPRH auf verschiedene Reparaturwege und die Ig-Diversifizierung zu untersuchen wurde die DT40-Zelllinie ausgewählt. Die DT40-Zelllinie ist eine Hühner-B-Zelllinie, die der *bursa fabricii* entstammt und durch die Infektion mit dem *aviären Leukosevirus* (ALV) immortalisiert wurde [183, 184]. Diese B-Zellen befinden sich in einem bursalen Stadium, weswegen es zu einer kontinuierlichen Diversifizierung der Ig-Kette durch Ig-Genkonversion und zu einem sehr geringen Anteil auch durch somatische Hypermutation kommt [185, 186].

Um die DT40-Zelllinie für die Untersuchung der Ig-Genkonversion zu optimieren, wurde ein IgM-negativer Subklon generiert. Diese neue DT40-CL18-Zelllinie hat eine Leserastermutation auf der leichten Kette des *Ig*-Lokus. Durch ein überlappendes Genkonversionsereignis kann diese Mutation revertiert werden und die Zellen können wieder den IgM-Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Dieser Wechsel von IgM-negativen Zellen zu IgM-positiven Zellen kann mit Hilfe einer FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse gemessen werden und korreliert mit der Ig-Genkonversionsrate [185]. Diese Zelllinie wurde von Arakawa und Kollegen zusätzlich mit einer induzierbaren *Cre*-Rekombinase versehen, um bei der Generierung von *Knockouts* loxP-flankierte

Resistenzkassetten ausschneiden und damit wiederverwenden zu können [187]. Nachdem ein *v-Myb*-Transgen in das Genom integriert wurde, konnte ein Subklon generiert werden, der sich durch eine fünffach erhöhte Ig-Genkonversionsrate auszeichnet, woraus die DT40-Cre1-Zelllinie entstanden ist. Somit kann in der DT40-Cre1-Zelllinie die Ig-Genkonversion besonders gut untersucht werden [55].

In einer Weiterentwicklung wurde der *AID*-Lokus deletiert und durch ein überexprimierendes *AID-IRES-GFP* Transgen ersetzt. Zusätzlich wurden in der DT40-Cre1-Linie die Pseudogene deletiert. Als Folge dessen können die Zellen keine Ig-Genkonversion mehr durchführen und wechseln zur somatischen Hypermutation [188]. In einem IgM-positiven Subklon kann die kontinuierliche somatische Hypermutation zu einem STOPP-Codon oder zu einer *nonsense*-Mutation führen, was einen Verlust des Oberflächen-IgM zur Folge hat. In dieser Ψ V-Zelllinie kann daher über den Verlust des Oberflächen-IgM die somatische Hypermutationsrate bestimmt werden [188].

Ein weiterer Vorteil der DT40-Zelllinie ist eine relativ hohe Rate, mit der transfizierte Gen-*Targeting*-Konstrukte homolog in das Genom integriert werden [189]. Somit können Gene relativ leicht komplett deletiert werden, anstatt die Translation nur partiell zu inhibieren, wie es bei siRNA- oder shRNA-Versuchen oft der Fall ist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

DNA-Läsionen können zum Pausieren der Replikationsgabel führen. Dies ist eine kritische Situation für die Zelle. Der Rad6-Signalweg kann durch die Mono- und Polyubiquitinierung von PCNA einen fehlerhaften oder fehlerfreien Weg für die Reparatur dieser Läsionen induzieren und erhöht damit die genetische Stabilität. Dieser Signalweg ist in der Hefe gut untersucht. In eukaryotischen Zellen hingegen ist zwar die Monoubiquitinierung gut verstanden, der Nachweis der Polyubiquitinierung erweist sich jedoch als anspruchsvoll und schwer reproduzierbar.

Es wurden erst kürzlich SHPRH und HLTF als Orthologe von Rad5 identifiziert. Seit ihrer Entdeckung wurden die Funktionen der beiden E3-Ligasen unterschiedlich beschrieben. Während die Proteine anfangs kooperieren sollten, wurde ihnen später jegliche Funktion in der PCNA-Ubiquitinierung, der DNA-Reparatur und der somatischen Hypermutation

abgesprochen. Wenige Zeit später konnte wiederum gezeigt werden, dass die Proteine schadensabhängig funktionieren.

Ziel der Arbeit war es, einen experimentellen Versuchsansatz zu finden, der die Polyubiquitinierung von PCNA zuverlässig induziert und diese auch nachweist. Es sollte dann die Funktion von SHPRH in dem DT40-Zellsystem untersucht werden, in welchem das zweite Rad5-Ortholog HLTF fehlt, wodurch die Aufgabe von SHPRH in einem isolierten Umfeld untersucht werden konnte. Im Detail sollte dann der Einfluss von SHPRH auf verschiedene DNA-schädigende Agenzien untersucht werden, um den durch SHPRH beeinflussten DNA-Reparaturweg weiter einzugrenzen. Da in vorhergehenden Arbeiten die Beteiligung des fehlerhaften Armes des Rad6-Signalweges an der Immunglobulin-Diversifizierung mehrfach bestätigt werden konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von SHPRH und damit des fehlerfreien Arms des Rad6-Weges auf den Prozess der Ig-Diversifizierung genauer untersucht werden.

2 ERGEBNISSE

Das *SHPRH*-Gen des Huhns umfasst mit seinen 29 Exons eine Größe von insgesamt 47 kb (kilo-Basenpaaren). Die Exons 1-5 kodieren einen Abschnitt im Protein, für den über die Homologie-Suche CDD (*conserved domain database*) [190] keine funktionellen Domänen gefunden wurden. Die Exons 6-13 kodieren für die SNF2- (*Sucrose Non Fermentable*), H15- (*histon 1 und 5*) und PHD-Domäne (*plant homeodomain*), wohingegen die Exons 24 und 25 für die RING-Domäne (*Really Interesting New Gene*) kodieren. Da die Größe von *Targeting*-Vektoren im DT40-System auf maximal 10 kb begrenzt ist [191], wurden für den *SHPRH*-*Knockout* drei verschiedene Strategien entwickelt. In Strategie A wurde der genomische Bereich 1 kb vor der Transkriptionsinitiation bis zum Ende von Exon 4 entfernt. Hierdurch sollte die Transkription komplett inhibiert werden. In Strategie B wurde ein frühzeitiges STOPP-Codon in Exon 6 eingefügt und die Exons 7, 8 und 9 wurden entfernt, um die N-terminalen funktionellen Domänen zu inaktivieren. In Strategie C wurde ein vorzeitiges STOPP-Codon in Exon 22 eingefügt und zusätzlich wurden die Exons 23-26 entfernt, mit dem Ziel nur die RING-Domäne dieser RING-Typ E3-Ligase zu entfernen (Abb. 2.1).

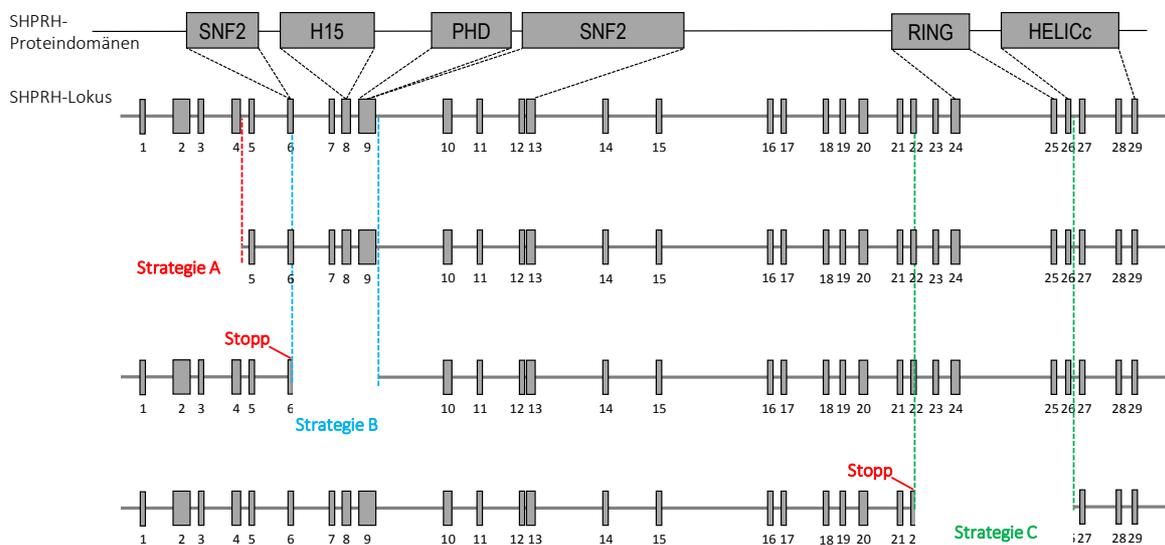


Abb. 2.1: Übersicht über die *SHPRH*-*Knockout*-Strategien

Dargestellt sind oben die *SHPRH*-Proteindomänen und die dafür kodierenden Exons. Die Größe und Lage der Exons ist maßstabsgetreu. Die farbigen Linien zeigen die durch unterschiedliche *Targeting*-Vektoren (Strategie A-C) entfernten genomischen Regionen von *SHPRH* und die dadurch fehlenden Exons an. „Stopp“ bedeutet, dass *in frame* ein Stoppcodon eingefügt wurde.

2.1 Inaktivierung der *SHPRH*-Allele mit Strategie A

Mit Strategie A sollte die Transkription des gesamten *SHPRH*-Gens in der DT40- Ψ V-Zelllinie inaktiviert werden. Hierfür wurde ein *Knockout*-Vektor generiert, der aus einem 1,5 kb großen 5'-Arm und aus einem 1,3 kb großen 3'-Arm besteht. Der 5'-Arm ist homolog zu der genomischen Sequenz, die sich 1 kb vor der Transkriptionsinitiation befindet und der 3'-Arm ist homolog zu der genomischen Sequenz hinter Exon 4. Zwischen den homologen Armen befindet sich eine Resistenzkassette, die durch gerichtete Integration die dazwischen liegende genomische Information ersetzt (Abb. 2.2 A). In den verwendeten Vektoren sind die DNA-Sequenzen, die für die verschiedenen Resistenzen kodieren zusätzlich von einer Rekombinationssequenz (loxP) flankiert, um bei möglichen weiteren *Knockouts* oder bei einer Rekonstitution die Resistenz herausschneiden und wiederverwenden zu können. Für die Selektion stehen in unserem Labor Resistenzen für Puromycin, Blasticidin und Mycophenolsäure zur Verfügung. Da in der DT40- Ψ V-Zelllinie das *AID-IRES-GFP*-Transgen über Puromycin rekonstituiert wurde, wird bei der Generierung eines *Knockouts* üblicherweise für das erste Allel die Blasticidin- und für das zweite Allel die Mycophenolsäureresistenz verwendet.

Mit dem Blasticidin-*Targeting*-Vektor konnte in 2 Klonen das erste Allel inaktiviert werden. Die gerichtete Integration wurde über eine PCR bestätigt, in der ein Primer vor dem homologen 5'-Arm bindet und ein zweiter Primer in der DNA-Sequenz, die für die Resistenz kodiert (Abb. 2.2 B). Obwohl der DT40-Zelllinie eine hohe *Targeting*-Effizienz zugeschrieben wird [191], konnte das erste *SHPRH*-Allel mit Strategie A nur mit einer sehr geringen Effizienz entfernt werden, wobei es unmöglich war auch das zweite Allel zu entfernen (Tab. 2.1). Anschließend wurden die PCR-positiven Klone mit Hilfe der Southernblot-Analyse untersucht. Hierbei schneidet das Enzym BclI im Genom so, dass mit Hilfe der radioaktiv markierten Sonde das Wildtyp-Allel eine Bande von 5,6 kb erzeugt, wohingegen das mutierte Allel eine Bande von 3,9 kb aufweist. Die Southernblot-Analyse zeigt für die Ψ V-*SHPRH*^{+/+}-Zelllinie nur eine Bande auf der Höhe von 5,6 kb und für die zwei *SHPRH*^{+/-}-Klone ebenfalls diese Bande, sowie eine weitere auf der Höhe von 3,9 kb, und bestätigt damit die gerichtete Integration des *Knockout*-Vektors (Abb. 2.2 C).

Um in den Klonen die Funktionalität des *Knockouts* zu untersuchen, sollten die mRNA-Level von *SHPRH* bestimmt werden. Hierfür wurde die RNA der Zellen aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels q-PCR (quantitativer *realtime*-PCR) gemessen.

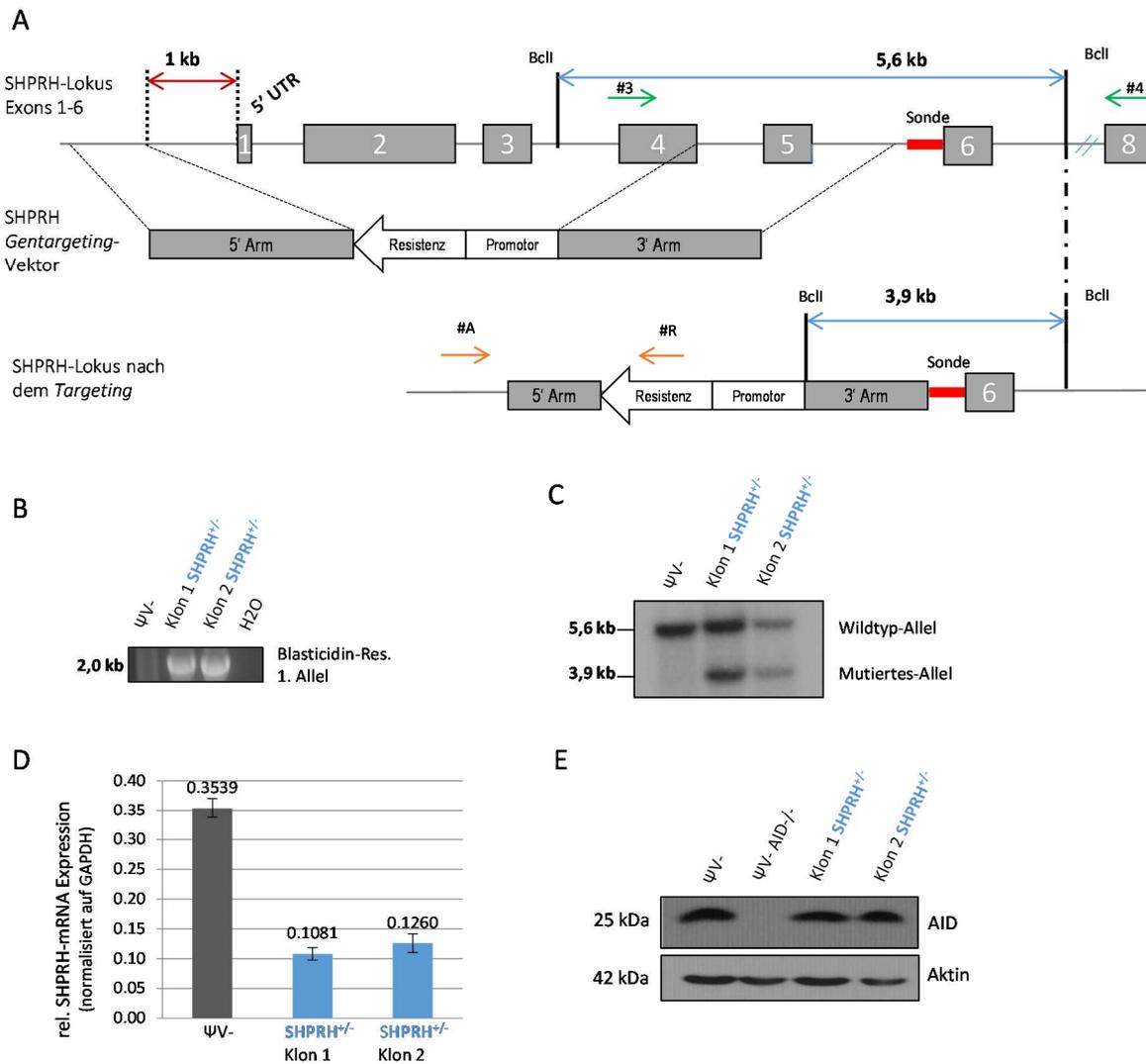


Abb. 2.2: Entfernen des ersten Allels von *SHPRH* in der DT40-ψV-Zelllinie

A) Schematische Darstellung des *SHPRH*-Lokus, Exons 1-6. Der *Targeting*-Vektor entfernt 1 kb stromaufwärts der Transkriptionsinitiation bis zum Ende von Exon 4. Die orangen Pfeile zeigen die ungefähre Bindestelle der in Abb. B verwendeten Primer. Mit dem Enzym *BclI* und der Sonde wurde der in Abb. C dargestellte Southernblot durchgeführt. **B)** PCR zum Nachweis der gerichteten Integration des *Knockout*-Vektors. Der erste Primer bindet noch außerhalb des 5'-Armes, der zweite Primer bindet in der Blasticidin-Resistenzkassette. **C)** Southernblot zum Nachweis der gerichteten Integration des 3'-Armes. Mit Hilfe der radioaktiven Sonde kann nach der Spaltung mit *BclI* zwischen dem Wildtyp-Allel (5,6 kb) und dem mutierten Allel (3,9 kb) unterschieden werden. **D)** q-PCR zum Nachweis der verminderten *SHPRH*-Expression in den ψV-*SHPRH*^{+/-}-Zellen. Die Expressionswerte wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. **E)** Nachweis der unveränderten AID-Expression nach Entfernen des ersten Allels von *SHPRH*. Als Westernblot-Ladekontrolle dient β-Aktin.

Abkürzungen: rel: relativ, Res: Resistenz, UTR: untranslated region

Tab. 2.1 Targeting-Effizienz in der ΨV -Zelllinie für *Knockout*-Strategie A

Zelllinie	<i>SHPRH</i> - <i>Knockout</i>	Anzahl der Selektions-positiven Klone	Anzahl der PCR- positiven Klone	Targeting Effizienz %
ΨV -	1. Allel	80	1	1,3
ΨV -	1. Allel	95	1	1,1
ΨV - #1 <i>SHPRH</i> ^{-/-}	2. Allel	72	0	0,0
ΨV - #2 <i>SHPRH</i> ^{-/-}	2. Allel	106	0	0,0

Die hierfür verwendeten Primer binden am Ende von *SHPRH* in Exon 25 und 28. Um Abweichungen entgegen zu wirken, die durch die Aufreinigung bedingt sind, wurde die Expression des Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ebenfalls bestimmt und die *SHPRH*-Expression relativ zu der von GAPDH gesetzt. Die Auswertung zeigt, dass auch das Entfernen nur eines Allels mit dieser Strategie die mRNA-Expression von *SHPRH* auf ein Drittel verringert (Abb. 2.2 D).

Da auch schon die Inaktivierung nur eines Allels einen deutlichen Effekt auf die *SHPRH*-Expression zu haben schien, wurde bereits mit den heterozygoten Klonen die somatische Hypermutation analysiert. Hierfür muss jedoch ein weiterer Faktor untersucht werden. Da AID das ausschlaggebende Protein der somatischen Hypermutation ist, sollten wenn möglich alle Subklone eines *Knockouts* eine ähnliche AID-Expression wie der Wildtyp aufweisen. Hierfür wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt, welche zeigt, dass die beiden heterozygoten Klone AID genauso stark exprimieren wie der Wildtyp (Abb. 2.2 E). Ein Effekt auf die somatische Hypermutation, ausgehend von einer unterschiedlich starken AID-Expression, kann folglich ausgeschlossen werden.

Mit der Strategie A konnte in der DT40- ΨV -Zelllinie ein heterozygoter *Knockoutset* generiert werden, welches eine verringerte *SHPRH*-Expression bei gleichbleibender AID-Expression aufwies. Somit konnten die generierten Klone für die folgenden Versuche verwendet werden.

2.1.1 Untersuchung der somatischen Hypermutation in der DT40- Ψ V-Zelllinie nach dem Entfernen des ersten Allels mit Strategie A

In der DT40- Ψ V-Zelllinie können AID-induzierte Läsionen in den *Ig*-Genen zum Teil fehlerhaft über Transläsionspolymerasen repariert werden [2]. Dies führt dazu, dass sich Mutationen anhäufen oder es zu *nonsense*-Mutationen kommt, wodurch der IgM-Rezeptor nicht mehr exprimiert werden kann. Über einen anti-IgM-PE-Antikörper und eine nachfolgende FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse kann der Verlust des Oberflächen-IgM nachgewiesen werden (Abb. 2.3 A). Mit diesem System war es möglich den Einfluss von SHPRH auf die somatische Hypermutation zu untersuchen.

Hierzu wurden zunächst 30-60 Einzelzellklone je Genotyp generiert und diese nach 14 und 21 Tagen Kultur auf den IgM-Status untersucht. Eine erste Durchführung des Versuches zeigte, verglichen mit dem Wildtyp, eine signifikant erhöhte Hypermutation in den zwei SHPRH heterozygoten Klonen (Abb. 2.3 A). In der Reproduktion des Versuches zeigte jedoch nur noch ein Klon eine signifikante Erhöhung der Hypermutationsrate (Abb. 2.3 B). Auch eine mehrfache Wiederholung des Ansatzes deutet zwar auf eine erhöhte somatische Hypermutation hin, diese war jedoch nur bei einem Klon eindeutig signifikant. Um den Einfluss von SHPRH auf die somatische Hypermutation besser bestimmen zu können, sollte SHPRH daher mit Hilfe der *Knockout*-Strategien B und C inaktiviert werden.

2.2 Deletion der funktionellen PHD- bzw. RING-Domäne von SHPRH in der Ψ V-Zelllinie

Mit der *Knockout*-Strategie A konnten erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von SHPRH bei der somatischen Hypermutation erlangt werden. Um einen detaillierteren Einblick in die Aufgaben von SHPRH zu bekommen, wurden zwei weitere *Knockout*-Strategien eingesetzt. Mit Strategie B wurden gezielt die PHD-Zinkfinger-Domäne sowie die davorliegende H15-Domäne und ein Teil der stromaufwärts liegenden SNF2-Domäne entfernt (Abb. 2.1 A). Hierfür wurde ein *Targeting*-Vektor erzeugt, der einen 1,1 kb großen 5'-Arm und einen 2 kb großen 3'-Arm besitzt. Der 5'-Arm integriert homolog vor Exon 6 und reicht bis in das Exon 6 hinein. Dabei integriert er ein künstliches STOPP-Codon „*in frame*“ in das Exon 6, um somit einen Translationsstopp zu erzwingen. Der 3'-homologe Arm integriert hinter Exon 9. Damit wird die Hälfte von Exon 6 bis einschließlich Exon 8 durch die Resistenzkassette ersetzt (Abb. 2.4 A).

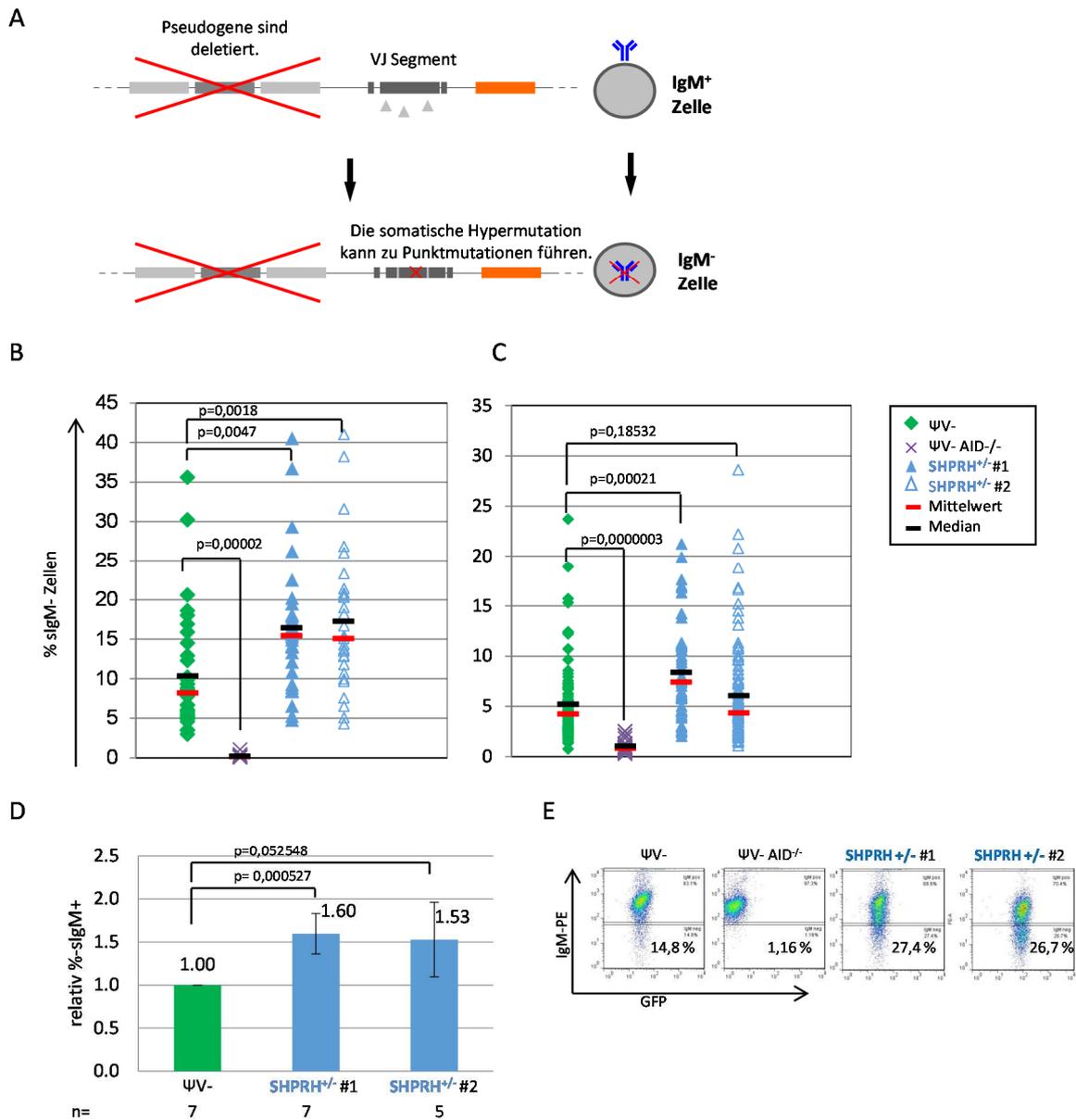


Abb. 2.3: Untersuchung der SHM in der DT40-ψV-SHPRH^{-/-}-Zelllinie

A) Modell der DT40-ψV-Zelllinie zur Untersuchung der somatischen Hypermutation. **B+C)** Darstellung aller Subklone der verschiedenen Zelllinien aus zwei unabhängigen SHM-Experimenten. Außerdem sind der Mittelwert und der Median sowie die statistische Auswertung eingefügt. Die ψV-AID^{-/-}-Zelllinie dient als Negativkontrolle. **D)** Zusammenfassung der durchgeführten Experimente zur somatischen Hypermutation. **E)** Exemplarische FACS-Bilder für den Versuchsansatz B+C.

Abkürzungen: sIgM: surface-IgM, n: Anzahl der durchgeführten Versuche; statistische Auswertung: Student's-t-Test

Die Exons kodieren für verschiedene Domänen. Die H15-Domäne hat eine hohe Homologie zu histonverbindenden Proteinen [192]. Die PHD-Domäne ist ein Zn^{2+} -bindende Domäne, die eine starke strukturelle Ähnlichkeit zur RING-Domäne besitzt [193]. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass Proteine mit einer PHD-Domäne eine Rolle bei der Regulation von Chromatin spielen [194]. Proteine mit einer SNF-Typ-2-Domäne nutzen die Energie aus ATP zur Modifikation von Chromatin, und es verdichten sich die Hinweise auf eine Funktion solcher Proteine in der DNA-Reparatur [195, 196].

Mit Hilfe der *Knockout*-Strategie C wurde die RING-Domäne entfernt. Hierfür wurde ein *Targeting*-Vektor kloniert, der einen 1,5 kb großen 5'-Arm besitzt, der in Exon 21 beginnt und bis zu Hälfte von Exon 22 geht. Dabei integriert dieser homologe Arm ein STOPP-Codon „*in frame*“ in Exon 22, um die Translation der RING-Domäne zu inhibieren. Der 2 kb große 3'-Arm beginnt nach Exon 26, geht über die Exons 27 bis 28 und endet dort im Intron. Dabei ersetzt die dazwischen enthaltene Resistenzkassette die Hälfte von Exon 22 bis einschließlich Exon 26 und entfernt damit die komplette RING-Domäne, sowie einen Teil der HELICc-Domäne (Abb. 2.4 B). Die RING-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der orthologen E3-Ligase Rad5. Dabei ist sie für Interaktion des Heterodimer-Komplexes Ubc13/Mms2 mit PCNA verantwortlich, welche dann zur Polyubiquitinierung von PCNA führt [197, 198]. Vor allem diese stark konservierte Domäne führt zu der Annahme, dass SHPRH ein Rad5-Ortholog ist [156, 157, 172]. Die HELICc-Domäne ist eine konservierte Domäne, die in vielen Helikasen und Helikase-ähnlichen Proteinen gefunden wurde. Sie haben alle die Fähigkeit, einen Nukleinsäure-Duplex zu entwinden [199].

Um das erste Allel zu entfernen, wurde für beide Strategien die Blasticidinresistenz verwendet, wohingegen für das zweite Allel die Mycophenolsäureresistenz eingesetzt wurde. Die gerichtete Integration wurde über eine PCR bestätigt, wobei ein Primer jeweils vor dem 5'-homologen Arm und der zweite Primer in der jeweiligen Resistenz bindet (Abb. 2.4 A+B). Für beide Strategien konnten auf diese Weise mindestens zwei unabhängige heterozygote Klone generiert werden. Für Strategie B sind aus diesen zwei heterozygoten Klonen drei bzw. vier *SHPRH*^{-/-}-Klone entstanden (Abb. 2.4 C), die in dieser Arbeit als *Knockoutset* B bezeichnet werden. Mit Strategie C konnte in drei Klonen das zweite Allel erfolgreich entfernt und über PCR bestätigt werden (Abb. 2.4 D). Diese Klone werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als *Knockoutset* C bezeichnet.

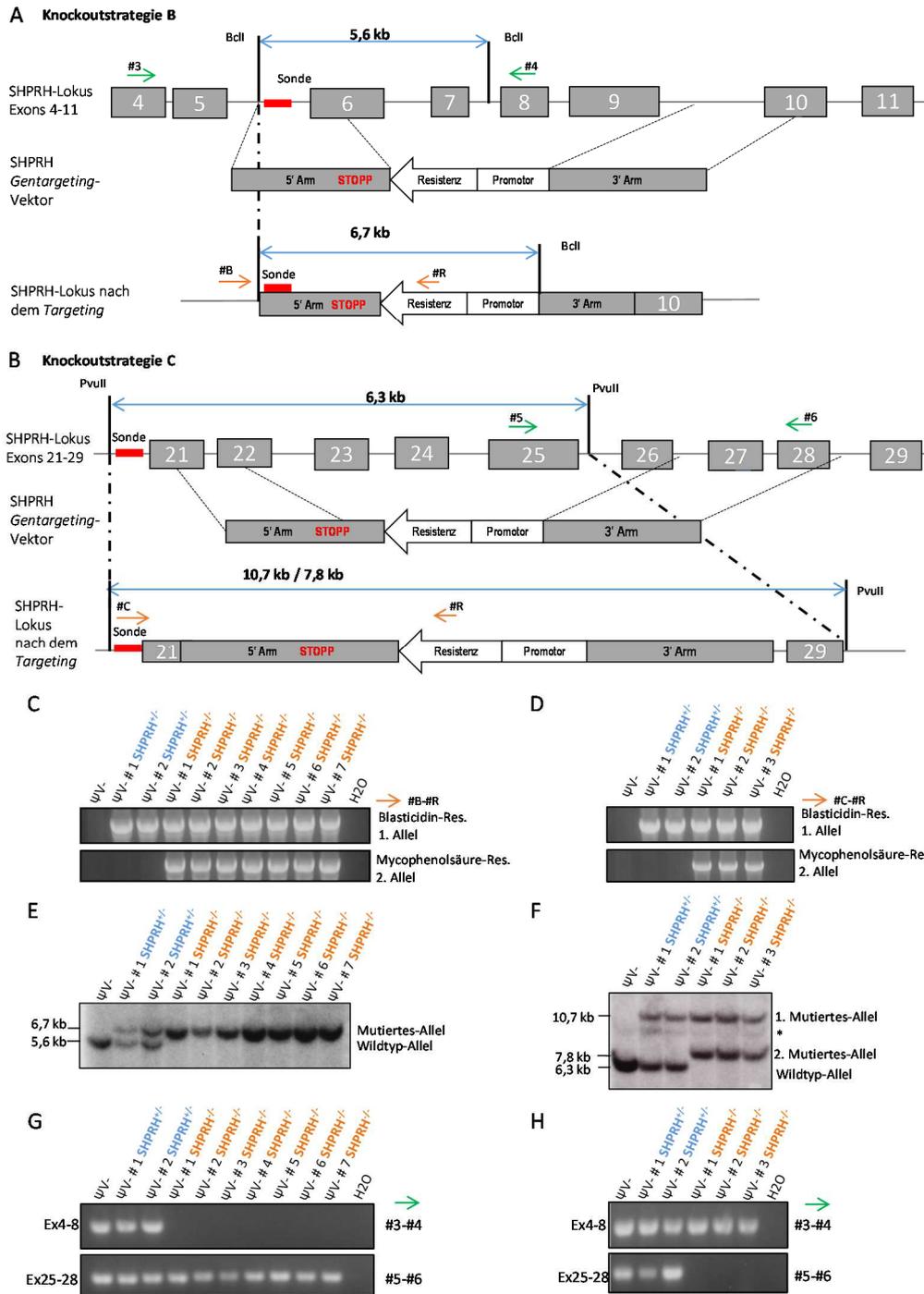


Abb. 2.4: Inaktivierung von SHPRH in der DT40-ψV-Zelllinie mit den Knockout-Strategien B/C

A+B) Schematische Darstellung der *Knockout*-Strategien B und C. Orange Pfeile zeigen die ungefähre Bindung der Primer für die *Targeting*-PCR in C+D. Grüne Pfeile sind Primer-Bindestellen der RT-PCR in G+H. **C+D)** PCR zum Nachweis der gerichteten Integration des homologen 5'-Armes. Der erste Primer bindet noch außerhalb des 5'-Armes, der zweite Primer bindet in der Blasticidin-Resistenzkassette für das erste Allel und in der Mycophenolsäure-Resistenzkassette für das zweite Allel. **E+F)** Southernblot zum Nachweis der gerichteten Integration des 5'-Armes. Mit Hilfe der radioaktiven Sonde kann nach der Spaltung mit BclI bzw. PvuII zwischen dem Wildtyp-Allel (5,6 kb bzw. 6,3 kb) und dem mutierten Allel (6,7 kb bzw. 7,8 kb und 10,7 kb) unterschieden werden. **G+H)** RT-PCR zum Nachweis der fehlenden *SHPRH* mRNA-Expression der jeweiligen *Targeting*-Region in den DT40-ψV-*SHPRH*^{-/-}-Zellen. Abkürzung: Ex: Exon, Res: Resistenz, * unspezifische Bande.

Um die gerichtete Integration mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde eine Southernblot-Analyse durchgeführt. Hierfür konnte für das *Knockoutset* B dieselbe Sonde sowie dasselbe Enzym BclI verwendet werden wie in Strategie A. Dabei entsteht für das Wildtyp-Allel eine 5,6 kb große Bande, für das mutierte Allel eine 6,7 kb große Bande, wobei sich hier die Schnittstelle in der *multiple cloning site 2* des pLox-Vektors befindet [187] (Abb. 2.4 E). Für Strategie C wurde das Restriktionsenzym PvuII verwendet. Dabei ergeben sich drei verschieden große Banden im Southernblot. Die Wildtypbande beträgt 6,4 kb, die Bande für das erste Allel mit der Blastocidinresistenz läuft auf einer Höhe von 10,6 kb und das zweite mutierte Allel weist eine Bandengröße von 7,4 kb auf (Abb. 2.4 F). Auffällig ist die Größe des mutierten ersten Allels, diese ist um 2,8 kb größer als es die *in silico* Berechnung vorhergesagt hatte. Eine genauere Untersuchung des *Targeting*-Vektors durch verschiedene Restriktionsspaltungen zeigte, dass sich der Promotor und die Blastocidinresistenz zweimal in den Vektor integriert hatten (Daten nicht gezeigt). Dies sollte keinen Einfluss auf den *Knockout* an sich haben, muss aber bei der Auswertung des Southernblots beachtet werden.

Um den *Knockout* auch auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurde die RNA aus den Klonen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und für RT-PCRs (*reverse Transkriptase* PCR) eingesetzt. Dabei wurden zwei Primerpaare generiert. Das erste Primerpaar #3 und #4 bindet in den Exons 4 bzw. 8. Somit dürfte bei einem erfolgreichen *Knockout* mit Strategie B keine Bande für das Wildtyp-Allel entstehen. Das zweite Primerpaar #5 und #6 bindet in Exon 25 bzw. 28. Mit dieser Primerkombination kann ein erfolgreicher *Knockout* mit Strategie C nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 2.4 G und H zu sehen ist, weisen die Klone, die beide *Targeting*-Vektoren integriert haben, keine Wildtypbande mehr auf. Zu beachten ist jedoch, dass es bei Strategie B zu einem Transkript am Ende der RING-Domäne kommt (Abb. 2.4 G Primer #5-#6), und dass es umgekehrt bei Strategie C zu einem Transkript kommt, welches in der Nähe der PHD-Domäne liegt (Abb. 2.4 H Primer #3-#4).

Mit den *Knockout*-Strategien B und C konnte das *SHPRH*-Gen erfolgreich auf beiden Allelen mutiert werden. Es ist jedoch zu beachten, dass je nach Strategie unterschiedliche Resttranskripte vorhanden sind und daher unterschiedliche Restfunktionen möglich wären. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, beide *Knockout*-Strategien gleichermaßen zu untersuchen.

2.2.1 Untersuchung der SHPRH-Proteinexpression nach dem Entfernen verschiedener Domänen

Für den Nachweis von SHPRH auf Proteinebene musste ein reaktiver Antikörper gefunden werden. Hierfür wurde zunächst die Proteinsequenz zwischen dem humanen, dem Maus- und dem *SHPRH* aus dem Huhn verglichen. Danach wurde ein Antikörper gesucht, dessen Epitop in einer Region bindet, in der das SHPRH des Huhns nicht zu stark von den anderen Sequenzen abweicht. Auf diese Weise erhöht sich die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität des Antikörpers.

Ein weiteres Problem sind die widersprüchlichen Molekulargewichtsangaben zu SHPRH in verschiedenen Publikationen und Herstellerangaben. So wird SHPRH auf der Höhe von 150 kDa detektiert [157] oder knapp unter der 250 kDa Markerbande [155] bzw. knapp über 170 kDa (abcam, ab117928). *In silico* Berechnungen ergeben eine Größe von ca. 192 kDa. Um die exakte Laufhöhe von SHPRH im Westernblot zu ermitteln, wurde ein Hühner-*SHPRH*-Überexpressionsvektor mit einem N-terminalen Hämagglutinin-(HA)-tag kloniert (Abb. 2.5 A). Dieser wurde in die Cre1-Zelllinie transfiziert. Mit Hilfe eines HA-Antikörpers konnte in einem Westernblot die genaue Laufhöhe von SHPRH bestimmt werden und dadurch ein Antikörper ermittelt werden, der mit dem SHPRH des Huhns kreuzreagiert (Abb. 2.5 B rechts). Die Westernblot-Analyse zeigte jedoch auch, dass SHPRH mit diesem Antikörper schlechter detektiert werden kann, als mit dem HA-Antikörper. Die daraus folgenden langen Belichtungszeiten haben den Nebeneffekt, dass sehr viele Hintergrundbanden erscheinen (Abb. 2.5 B linke Seite). Weitere Untersuchungen der SHPRH-Expression in Wildtyp-Zellen zeigten außerdem eine sehr schwache Expression von SHPRH. Damit die entsprechende Bande überhaupt detektiert werden konnte, musste sehr viel Protein geladen werden (120 µg), was den Effekt der Hintergrundbanden noch weiter verstärkte (Abb. 2.5 B-D).

Mit dem reaktiven Antikörper konnten nun Expressionsanalysen von SHPRH nach dem Entfernen der PHD- bzw. RING-Domäne durchgeführt werden. Dabei zeigte sich eine feine Bande für die *SHPRH*^{+/+}-Zelllinie, eine schwächere Bande in den heterozygoten Klonen und ein Verschwinden dieser Bande in beiden *Knockout*-Strategien bei den homozygoten Klonen (Abb. 2.5 C und D, Pfeile). Zu beachten ist, dass mit *Knockout*-Strategie C in den *SHPRH*^{+/-}- und *SHPRH*^{-/-}-Zelllinien bei ca. 160 kDa eine weitere Bande erscheint. Diese zusätzliche Bande könnte ein verkürztes SHPRH-Protein ohne RING-Domäne darstellen,

was auch durch die *in silico* Berechnung des Molekulargewichts gestützt wird, die einen Wert von 159 kDa ergibt.

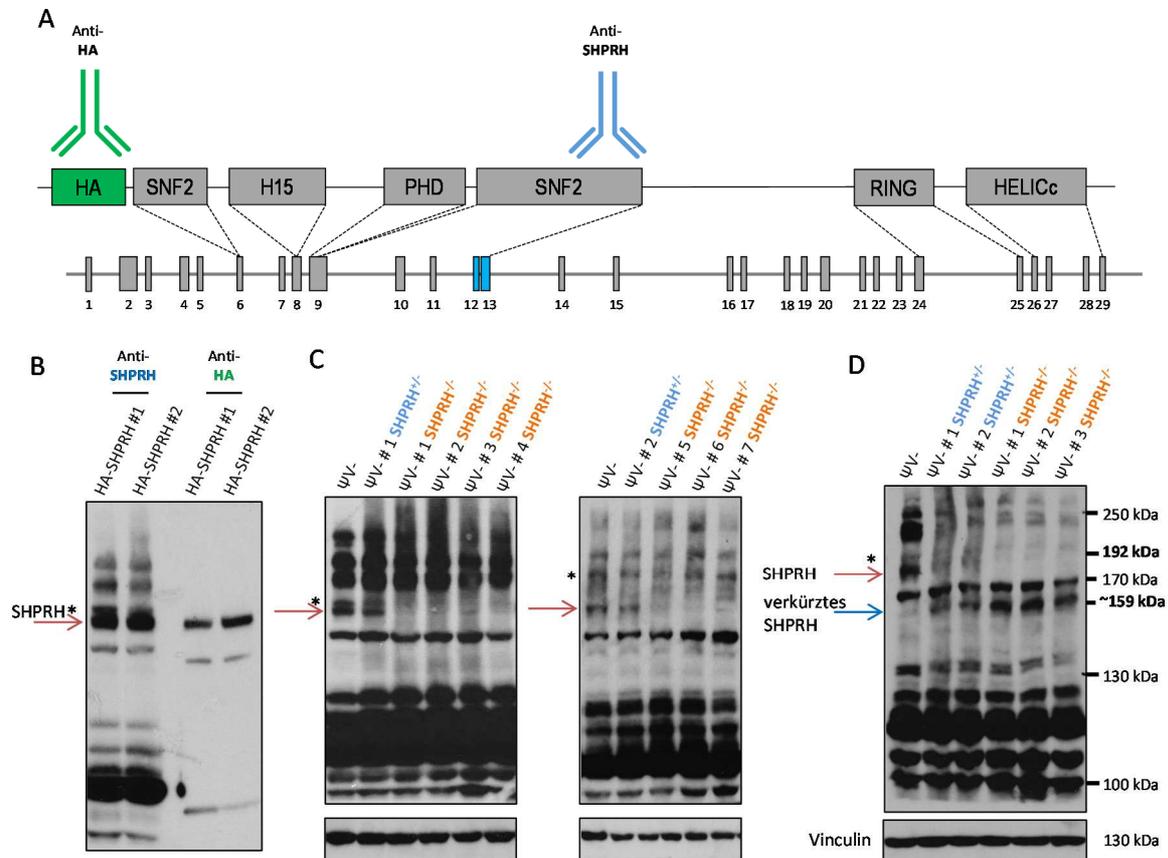


Abb. 2.5: Nachweis der SHPRH-Proteinexpression in den verschiedenen ψV -SHPRH^{-/-}-Zelllinien
A) Schematische Darstellung der Antikörperbinderegionen. Grün: anti-HA-Antikörper, blau: anti-SHPRH-Antikörper. **B)** Mit Hilfe des HA-Antikörpers kann das exogene HA-SHPRH nachgewiesen werden (rechte Seite). Damit kann die Reaktivität des SHPRH-Antikörpers bestätigt werden (linke Seite). **C)** Nachweis der SHPRH-Expression in Zellen der *Knockout*-Strategie B. Links: SHPRH^{+/-}-Klon #1 und daraus entstandene SHPRH^{-/-}-Klone. Rechts: SHPRH^{+/-}-Klon #2 und daraus entstandene SHPRH^{-/-}-Klone. **D)** Nachweis der SHPRH-Expression in *Knockout*set C. Keine SHPRH-Expression in SHPRH^{-/-}-Zellen. Bei ca. 160 kDa erscheint ein wahrscheinlich verkürztes SHPRH-Protein.
 * Unspezifische Bande, → SHPRH-Protein, → verkürztes SHPRH-Protein,

2.2.2 Untersuchung der AID-Expression und Analyse der Proliferation in den verschiedenen SHPRH-Knockoutsets

Da eine veränderte AID-Expression auch die Rate der somatischen Hypermutation beeinflussen kann, wurde eine Westernblot-Analyse mit den Zellen der *Knockout*-Strategie B und C durchgeführt. Es konnte jedoch kein Einfluss der SHPRH-Deletion auf die

Expression von AID beobachtet werden (Abb. 2.6 A+B). Da die Ig-Diversifizierung auch von der Proliferation der Zellen abhängt, wurden die Zellen der beiden *Knockoutsets* B und C mit CFSE (*C*arboxyfluorescein *s*uccinimidyl *e*ster) gefärbt, um damit die Proliferationsgeschwindigkeit zu bestimmen. Dieser Farbstoff ist membranpermeabel und wird an intrazelluläre Moleküle kovalent gebunden [200]. Bei jeder Teilung verteilt sich das CFSE gleichermaßen auf die zwei Tochterzellen, wodurch sich die CFSE-Konzentration in jeder Zelle halbiert (Abb. 2.6 C+D). Somit lässt sich über den Verlust der Fluoreszenzintensität die benötigte Zeit pro Zellteilung berechnen, die für alle Klone zwischen 10-11 Stunden betrug, unabhängig von der SHPRH-Expression (Tab. 2.2).

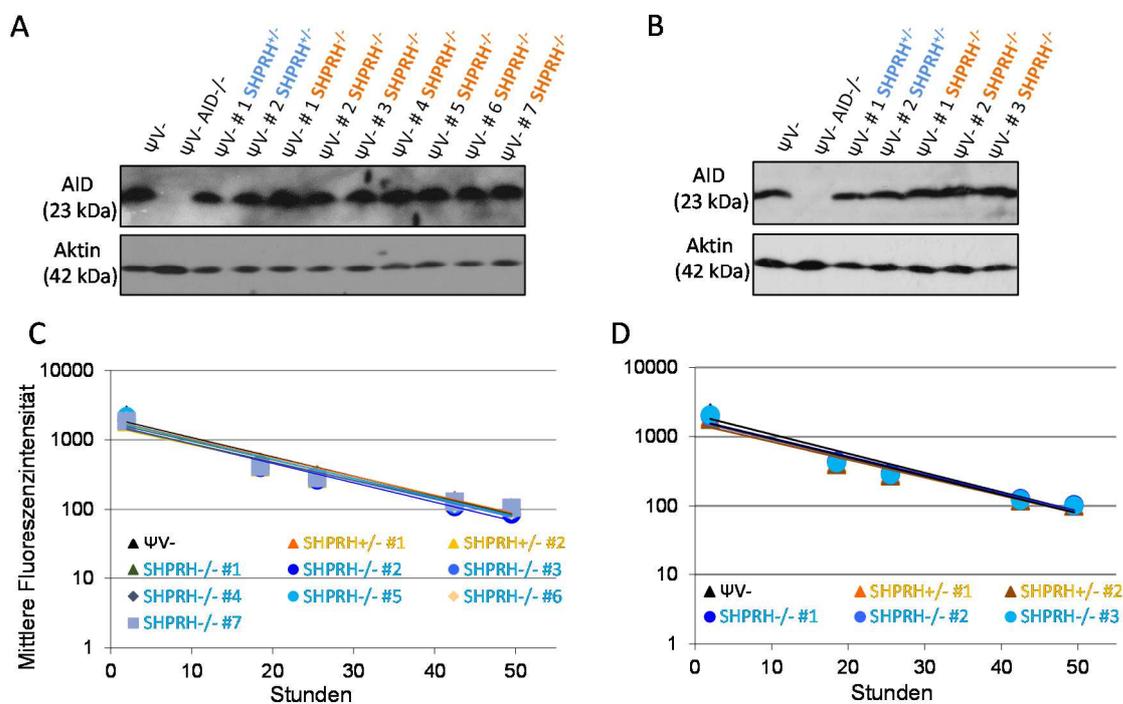


Abb. 2.6: Untersuchung der AID-Expression und Proliferation in den verschiedenen DT40- ψV^- -SHPRH $^{-/-}$ -Zelllinien

A+B) Die AID-Expression wird durch die *Knockout*-Strategien B (links) und C (rechts) nicht beeinflusst. β -Aktin dient als Ladekontrolle **C+D)** Die Abnahme der CFSE-Fluoreszenz ist als Exponentialfunktion in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Hieraus lässt sich die Proliferationsgeschwindigkeit ermitteln. Der ähnliche Verlauf der Geraden weist auf eine ähnliche Proliferationsgeschwindigkeit für *Knockout*-Strategie B (C) und C (D) hin.

Tab.2.2 Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen, generiert mit den *Knockout*-Strategien B und C

Zelllinie Strategie B	Std. / Zelltlg.	Zelllinie Strategie B	Std. / Zelltlg.	Zelllinie Strategie C	Std. / Zelltlg.	Zelllinie Strategie C	Std. / Zelltlg.
ΨV^-	10,8	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #3	11,3	ΨV^-	10,8	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #1	11,3
<i>SHPRH</i> ^{+/-} #1	11,2	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #4	11,6	<i>SHPRH</i> ^{+/-} #1	11,3	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #2	11,4
<i>SHPRH</i> ^{+/-} #2	11,8	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #5	10,9	<i>SHPRH</i> ^{+/-} #2	11,7	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #3	11,2
<i>SHPRH</i> ^{-/-} #1	11,3	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #6	11,3				
<i>SHPRH</i> ^{-/-} #2	10,8	<i>SHPRH</i> ^{-/-} #7	11,8				

2.2.3 Einfluss der SHPRH-Expression auf die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturwege

Der Einfluss von SHPRH auf die DNA-Reparatur wird kontrovers diskutiert. Da SHPRH ein Ortholog zu Rad5 sein soll [153, 156], wird eine Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen postuliert. Nach dem Herunterregulieren von SHPRH konnte in mehreren Publikationen eine erhöhte Methylmethansulfonat (MMS)-Sensitivität/Mutagenese nachgewiesen werden [153, 155]. Andere Ergebnisse zeigen jedoch keinen Einfluss von SHPRH auf das Überleben nach der Behandlung mit MMS oder Cis-Diamin(dichloro)platin (Cisplatin) [154].

Die sich voneinander unterscheidenden *Knockout*-Strategien B und C erlaubten es, den Einfluss der einzelnen Domänen auf die DNA-Reparatur zu untersuchen. Dafür wurden Methylzellulose-Überlebensexperimente (*colony survival assay*, CSA) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen in Duplikaten in Methylzellulose ausplattiert, die verschiedene Konzentrationen der DNA-schädigenden Substanz enthalten. Um ein breiteres Spektrum an Konzentrationen abdecken zu können, wurden jeweils drei verschiedene Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100) der Zellen ausgesät. Nach 11-14 Tagen konnten die Kolonien gezählt werden. Als DNA-schädigende Substanzen wurden MMS, Cisplatin und Etoposid verwendet.

MMS erzeugt als methylierendes Agens hauptsächlich N⁷-Methylguanin [201]. Diese Läsionen werden vor allem durch die Basenexzisionsreparatur behoben [202], können aber auch durch den Rad6-Weg beseitigt werden [203].

Cisplatin führt zu DNA-Intrastrang- und DNA-Interstrang-Quervernetzungen [204]. Diese werden hauptsächlich durch die Nukleotidexzisionsreparatur, aber auch über Transläsionspolymerasen oder die homologe Rekombination repariert [205].

Etoposid ist ein nicht-interkalierender Topoisomerase II (Top II)-Inhibitor, der spezifisch für Top2cc (*Top2 cleavage complexes*) ist [206]. Top II-Inhibitoren generieren in sich teilenden Zellen DNA-Doppelstrangbrüche. Dies passiert vor allem während der S-Phase. In dieser Phase ist das Schwesterchromatid in der Zelle vorhanden, daher kann der Bruch sowohl durch die Homologe Rekombination (HR), als auch die Nicht-homologe End-Verknüpfung (Non-homologous end joining, NHEJ) repariert werden [207].

Als Kontrolle wurde eine PCNA^{K164R}-Mutante verwendet. Diese hat einen ähnlichen Phänotyp wie eine Rad18-defiziente Zelllinie und sollte daher besonders sensitiv gegenüber Cisplatin und MMS sein [203].

Entgegen der erwähnten Publikation [156] zeigte keine der *Knockout*-Zelllinien, die mit den beiden *SHPRH-Knockout*-Strategien B und C generiert wurden, eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS (Abb. 2.7 A+B).

Das Chemotherapeutikum Cisplatin, welches den stärksten Einfluss auf Störungen im Rad6-Signalweg hat [203], zeigte ebenfalls keine veränderte Sensitivität der verschiedenen *SHPRH-Knockouts* gegenüber dem Agens (Abb. 2.7 C+D). Die Funktionalität des Versuchsaufbaus wurde mit der PCNA^{K164R}-Mutante bestätigt, welche wie erwartet in allen Experimenten sehr sensitiv auf MMS und Cisplatin reagierte (Abb. 2.7 A-D)

Um eine Funktion von SHPRH auf die Doppelstrangbruchreparatur zu untersuchen, sollte der Einfluss von Etoposid auf die verschiedenen *Knockouts* analysiert werden. Das Entfernen der RING-Domäne alleine führte zu keiner veränderten Sensitivität gegenüber Etoposid (Abb. 2.7 F). Die mit Strategie B mutierten Zellen wiesen jedoch gegenüber Etoposid eine erhöhte Sensitivität auf, die durch einen möglichen Defekt in der Doppelstrangbruchreparatur erklärt werden könnte. Dieser Effekt war zwar nicht sehr stark, jedoch eindeutig, da alle Klone, auch die heterozygoten, einen geringeren Anteil an lebenden Kolonien aufweisen als die Wildtyp-Zelllinie (Abb. 2.7 E).

Die Agenzien Cisplatin und MMS sind zwei gute Indikatoren, um Abweichungen im Rad6-Weg aufzuzeigen. In den Überlebensversuchen weisen die SHPRH-defizienten Zellen eine ähnliche Überlebensrate auf wie der Wildtyp. Es konnte jedoch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Etoposid festgestellt werden, ein Agens, welches eine funktionierende DSB-

Reparatur benötigt. Somit scheint SHPRH keinen Einfluss auf die Reparatur von Nukleotidveränderungen zu haben. Bei der Induktion von Doppelstrangbrüchen führt die fehlende SHPRH-Expression jedoch zu einer verminderten Überlebensrate der Zellen. Diese Funktion bei der DSB-Reparatur konnte auch für Rad5 beobachtet werden [197]. Falls Rad5 und SHPRH Orthologe sind, sollte SHPRH analog zu Rad5 auch PCNA polyubiquitinieren können.

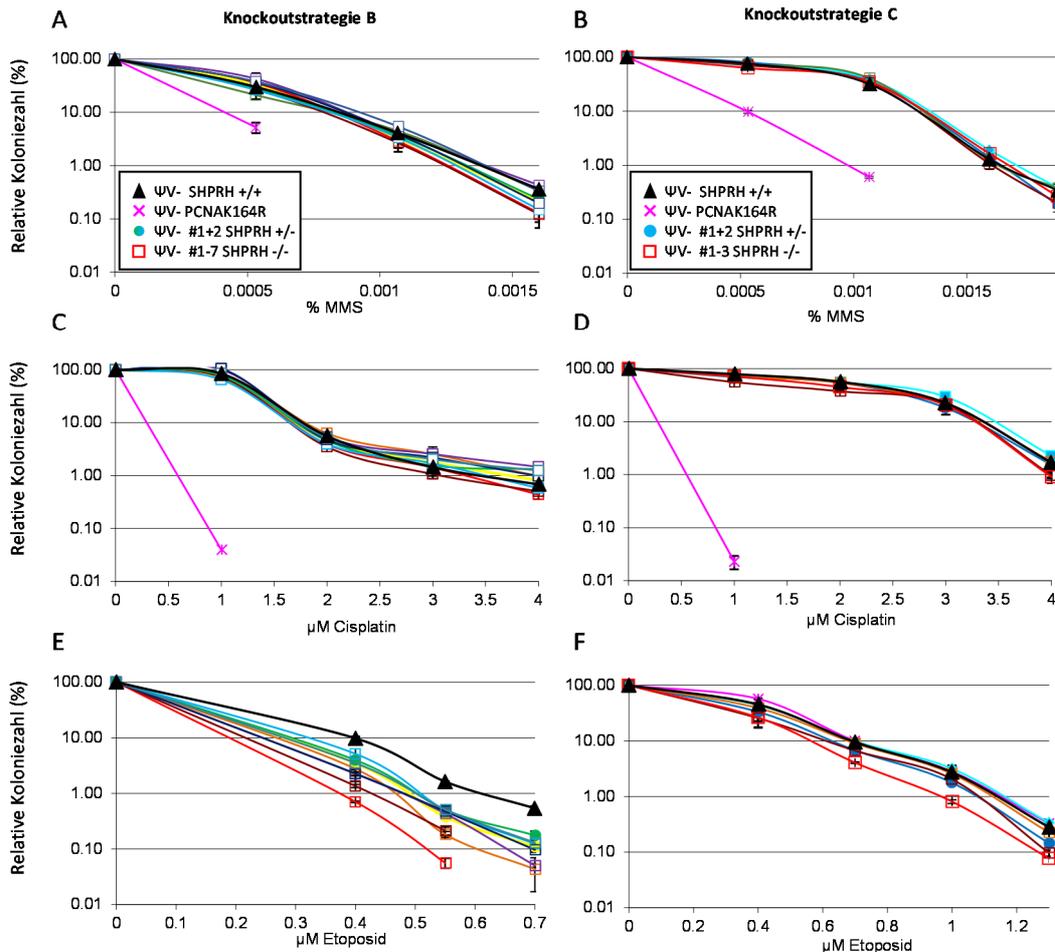


Abb. 2.7: Einfluss von SHPRH auf das Überleben unter dem Einfluss DNA-schädigender Agenzien
 Untersuchung mit Hilfe von Methylzellulose-Überlebensexperimenten. Linke Seite: *Knockout*-Strategie B, rechte Seite *Knockout*-Strategie C. In den Graphen ist die relative Koloniezahl (logarithmisch) in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Agens angegeben.
A+B) Einfluss von MMS auf das Überleben der verschiedenen SHPRH-exprimierenden Zellen. **C+D)** Effekt der verschiedenen SHPRH-exprimierenden Zellen auf das Überleben unter Cisplatin-einfluss **D+E)** Einfluss von Etoposid auf das Überleben der unterschiedlich SHPRH-exprimierenden Zellen.

2.2.4 Untersuchung der Funktion von SHPRH bei der Mono- und Polyubiquitinierung von PCNA

Als Rad5-Ortholog sollte die E3-Ligase SHPRH für die Polyubiquitinierung von PCNA verantwortlich sein [156, 157]. Dabei führt während der Replikation eine blockierte Replikationsgabel zur Monoubiquitinierung von PCNA an Lys164 durch den Rad6/Rad18-Komplex. Über die E3-Ligase Rad5 können die E2-konjugierenden Enzyme Ubc13 und Mms2 als Komplex rekrutiert werden und führen zur Polyubiquitinierung von PCNA über das Lys63 am Ubiquitin (Abb. 2.8 A). Der Nachweis der Polyubiquitinierung ist jedoch nicht trivial. Die Induktion der PCNA-Ubiquitinierung erfolgt üblicherweise über MMS-Behandlung oder nach UV-Bestrahlung [182]. Hierbei kann die Monoubiquitinierung zwar detektiert werden, die Induktion ist jedoch nicht besonders stark.

Aus diesem Grund sollte ein neuer Nachweis etabliert werden, welcher die Monoubiquitinierung induziert, zugleich aber auch eine Polyubiquitinierung detektierbar macht. Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem auch H_2O_2 eine PCNA-Ubiquitinierung bewirkt [208]. Interessanterweise erscheint dabei in einer Westernblot-Analyse eine weitere Bande, welche diubiquitiniertes PCNA darstellen könnte. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, wurde dieser Versuch mit DT40-Zellen reproduziert. Dabei wurde die Induktion der PCNA-Ubiquitinierung durch H_2O_2 zeitabhängig analysiert. Eine PCNA^{K164R}-mutierte DT40-Zelllinie wurde mitgeführt, um die Spezifität der Bande sicherzustellen. In dieser Kontroll-Zelllinie kann PCNA nicht mehr ubiquitiniert werden, da die Bindestelle von Ubiquitin, das Lys164, durch Arginin ersetzt wurde [126].

Zusätzlich wurde auch die Rad18-defiziente DT40-Zelllinie als Kontrolle verwendet. In dieser Zelllinie fehlt die für die PCNA-Monoubiquitinierung zuständige E3-Ligase Rad18. Trotz fehlendem Rad18 ist bei einer DNA-Schädigung eine schwache PCNA-Monoubiquitinierung detektierbar [174, 209], wahrscheinlich durch eine alternative E3-Ligase [210, 211].

Die Zellen wurden für 10 Minuten, 40 Minuten und 2 Stunden mit 1 mM H_2O_2 inkubiert und anschließend per Westernblot auf ihre PCNA-Modifikation untersucht. Die Knüpfung eines jeden Ubiquitin an PCNA führt zu einem veränderten molekularen Gewicht, welches mit Hilfe eines PCNA-Antikörpers als *shift* erkennbar wird. Der Westernblot zeigt, dass mit Hilfe von H_2O_2 eine Monoubiquitinierung bereits nach 10 Minuten induziert werden kann (Abb. 2.8 B).

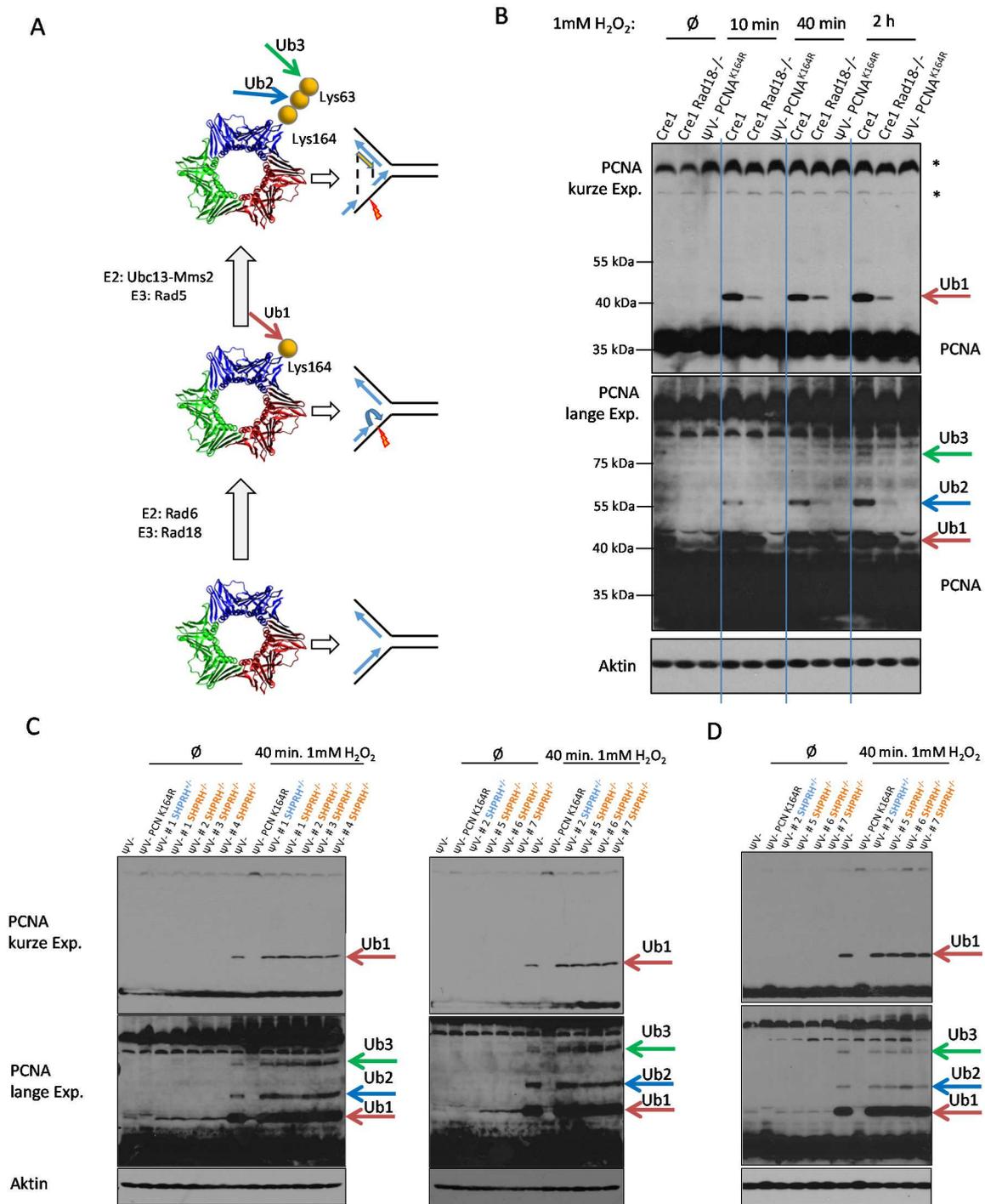


Abb. 2.8: Einfluss der verschiedenen SHPRH-Knockouts auf die PCNA-Ubiquitinierung

A) Modell der PCNA-Ubiquitinierung. **B)** Zeitabhängige Induktion der PCNA-Ubiquitinierung nach 10 Minuten, 40 Minuten und 2 Stunden, Cre1 dient als Wildtyp-Zelllinie, die Rad18-defiziente Zelllinie weist nur eine sehr schwache PCNA-Ubiquitinierung auf, die PCNA^{K164R}-Mutante kann nicht ubiquitiniert werden. **C)** Untersuchung der PCNA-Ubiquitinierung in Ψ V-Zellen der *Knockout*-Strategie B. Links: *SHPRH*^{+/-}-Klon #1 und daraus entstandene *SHPRH*^{-/-}-Klone. Rechts: *SHPRH*^{+/-}-Klon #2 und daraus entstandene *SHPRH*^{-/-}-Klone. **D)** *Knockout*-Strategie C, Beschreibung siehe C).
 Abkürzungen: E2: E2-konjugierendes Enzym; E3: E3-Ligase, Ub: Ubiquitinierung; Exp: Exposition;
 * unspezifische Bande;

(PCNA nach *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 269-282 (May 2013))

Auch die schwächere Modifikation von PCNA in der Rad18-defizienten Zelllinie ist gut erkennbar, ebenso die komplette fehlende Modifikation der PCNA^{K164R}-Mutante. Eine stärkere Belichtung zeigt auch eine Bande für die eventuelle PCNA-Diubiquitinierung (Abb. 2.8 B, Pfeil Ub2). Nach 40 Minuten und auch nach zwei Stunden ist diese sehr schwach auch in der Rad18-defizienten Mutante zu erkennen. Nach zwei Stunden erscheint dann eine weitere Bande, die potentiell eine Triubiquitinierung darstellen könnte (Abb. 2.8, Pfeil Ub3). Aufgrund der starken Hintergrundbanden konnte dies jedoch nicht eindeutig bestätigt werden (Abb. 2.8 B, Pfeil Ub3). Da keine dieser Banden in der PCNA^{K164R}-Mutante auftaucht, handelt es sich bei den Banden mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Modifikation von PCNA über Ubiquitin.

Mit diesem experimentellen Ansatz wurden die zwei verschiedenen *SHPRH-Knockouts* auf ihren Einfluss bei der PCNA-Ubiquitinierung untersucht. Keine der beiden *Knockout*-Strategien führte zu einer veränderten, schadensinduzierten PCNA Di- oder Triubiquitinierung (Abb. 2.8 C+D), obwohl die dafür verantwortliche E3-Ligase, oder zumindest wichtige Domänen fehlen. Auffällig war jedoch eine leicht erhöhte basale Monoubiquitinierung von PCNA in den unbehandelten *SHPRH*^{-/-}-Zellen aus *Knockout*-Strategie B (Abb. 2.8 C, Pfeil Ub1).

Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine fehlende Polyubiquitinierung in den unbehandelten Zellen sein. Dies wiederum könnte zu einer erhöhten Menge an monoubiquitinierten PCNA führen. Da die basale Ubiquitinierung von PCNA wahrscheinlich sehr gering ist, konnte sie mit dieser Methode möglicherweise auch in den Wildtyp-Zellen nicht detektiert werden.

Diese Ergebnisse können einen Einfluss von SHPRH auf die schadensinduzierte Polyubiquitinierung von PCNA zwar nicht bestätigen, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass SHPRH eine Rolle bei der basalen Monoubiquitinierung von PCNA spielt.

2.2.5 Beeinflussung der somatischen Hypermutation durch SHPRH

Auch wenn SHPRH die H₂O₂-induzierte PCNA-Polyubiquitinierung nicht beeinflusst, könnte eine veränderte basale Monoubiquitinierung, wie sie z.B. in *Knockoutset* B zu beobachten ist, einen Einfluss auf die Rekrutierung von TLS-Polymerasen haben und somit auch die somatische Hypermutation beeinflussen. Da auch bereits die RING-Domäne alleine einen Einfluss auf die DNA-Reparatur und somit auf die somatische Hypermutation haben kann,

sollte auch das *Knockoutset C* auf die Hypermutationsrate hin untersucht werden. Hierfür wurde mit beiden *Knockoutsets* ein Hypermutations-Experiment analog zu 2.1.1 durchgeführt. Keine der beiden *Knockout-Strategien* führte zu einem signifikanten Unterschied an IgM-negativen Zellen zwischen *SHPRH*-inaktivierten und Wildtyp-Zellen (Abb. 2.9 B+C). In beiden *Knockoutsets* gab es je einen Klon, der eine signifikant veränderte Hypermutation aufweist. Dies ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit kein *SHPRH*-abhängiger Effekt, sondern auf die in der DT40-Zelllinie beobachtete klonale Variabilität zurückzuführen [212].

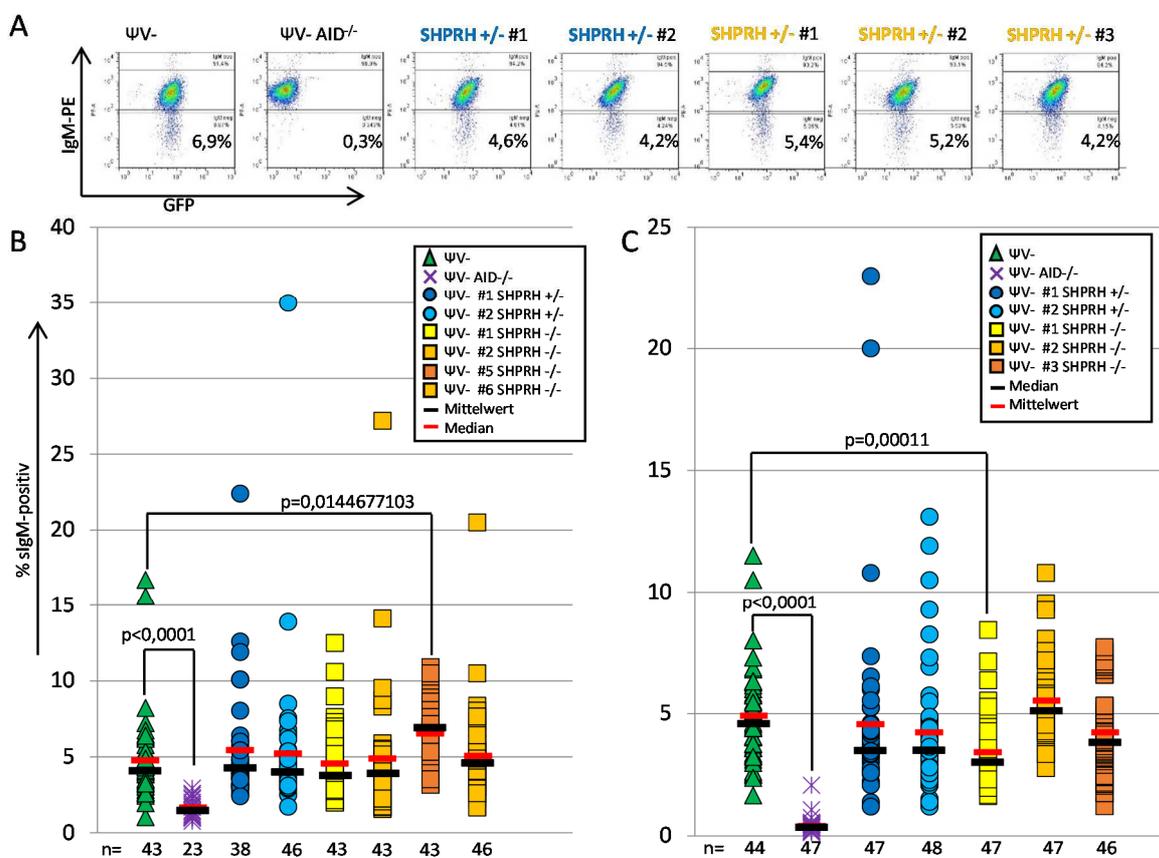


Abb. 2.9: Einfluss der verschiedenen *SHPRH*-Knockouts auf die SHM

A) Exemplarische FACS-Daten, mit deren Hilfe der Anteil an IgM-negativen Zellen bestimmt werden konnte. **B)** Darstellung aller Klone des SHM-Assays mit dem *Knockoutset B*. **C)** Darstellung des *Knockoutsets C*, Beschreibung wie B.

Abkürzungen: sIgM: surface-IgM

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-t-Tests ermittelt.

2.2.6 Untersuchung der somatischen Hypermutation auf genomischer Ebene

Um die Hypermutation mit einer weiteren Methode detaillierter zu untersuchen, wurden Sequenzanalysen der verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Da eine veränderte basale Monoubiquitinierung die Regulation der TLS-Polymerasen beeinflussen könnte, was wiederum eine Veränderung des Hypermutationsmusters zur Folge haben könnte, wurde der mit dem *Knockoutset* B durchgeführte Hypermutationsversuch sequenziert.

Hierfür wurden jeweils vier Klone je Genotyp weiter kultiviert. Es wurden Klone ausgewählt, deren IgM-Expression dem Median aus Abbildung 2.9 B sehr nahe war, um bei der Sequenzierung für jeden Genotyp möglichst repräsentative Klone untersuchen zu können. Die Klone wurden für insgesamt sieben Wochen in Kultur gehalten und es wurde einmal pro Woche der IgM-Status geprüft, um Artefakte auszuschließen, die beim Verdünnen der Zellen entstehen können. Die verlängerte Kultivierung erhöht die Anzahl der Mutationen in den variablen Genen, wodurch eine statistische Auswertung besser möglich wird. Für die Sequenzierung wurde die DNA anschließend aus jeweils zwei Klonen pro Genotyp extrahiert. Mit Hilfe der Phusion Polymerase, die eine sehr geringe Fehlerrate aufweist ($4,4 \times 10^{-7}$ Mutationen pro Basenpaar) wurde das VJ-Segment des λ -Lokus der leichten Kette amplifiziert.

Das amplifizierte VJ-Segment wurde in den pGEMT-Vektor (Promega) kloniert und in *E. coli* transformiert. Das durch diesen Schritt vereinzelt PCR-Produkt wurde aufgereinigt und sequenziert (MWG Eurofins). Es wurde ein 700 bp langes Fragment analysiert, welches vor dem Intron der VJ-Region beginnt, die CDR (Complementarity Determining Region)-Regionen 1-3 beinhaltet und im Intron vor der konstanten Region endet (Abb. 2.10 A). Mit Hilfe des Programms *Geneious* wurden die Sequenzen jedes Subklons untereinander verglichen. Auf diese Weise konnten im Vergleich mit der Konsensussequenz die einzelnen Mutationen ausgemacht werden. Dabei kam es zu keinem signifikantem Unterschied, was die Anzahl der Mutationen pro Basenpaar betrifft (Abb. 2.10 B). Mit Hilfe des SHM-Tools [213] konnte das Mutationsmuster genauer analysiert werden. Hierbei wurden die einzelnen Basenveränderungen untersucht, wodurch sich möglicherweise ein beeinträchtigter Reparaturweg identifizieren lässt. Jedoch zeigte auch diese Auswertung keinen Unterschied bezüglich des Mutationsmusters (Abb. 2.10 C).

Hieraus ergibt sich, dass für die *Knockout*-Strategie B und mit dem zur Verfügung stehenden Versuchsansatz kein Einfluss von SHPRH auf die SHM nachgewiesen werden konnte.

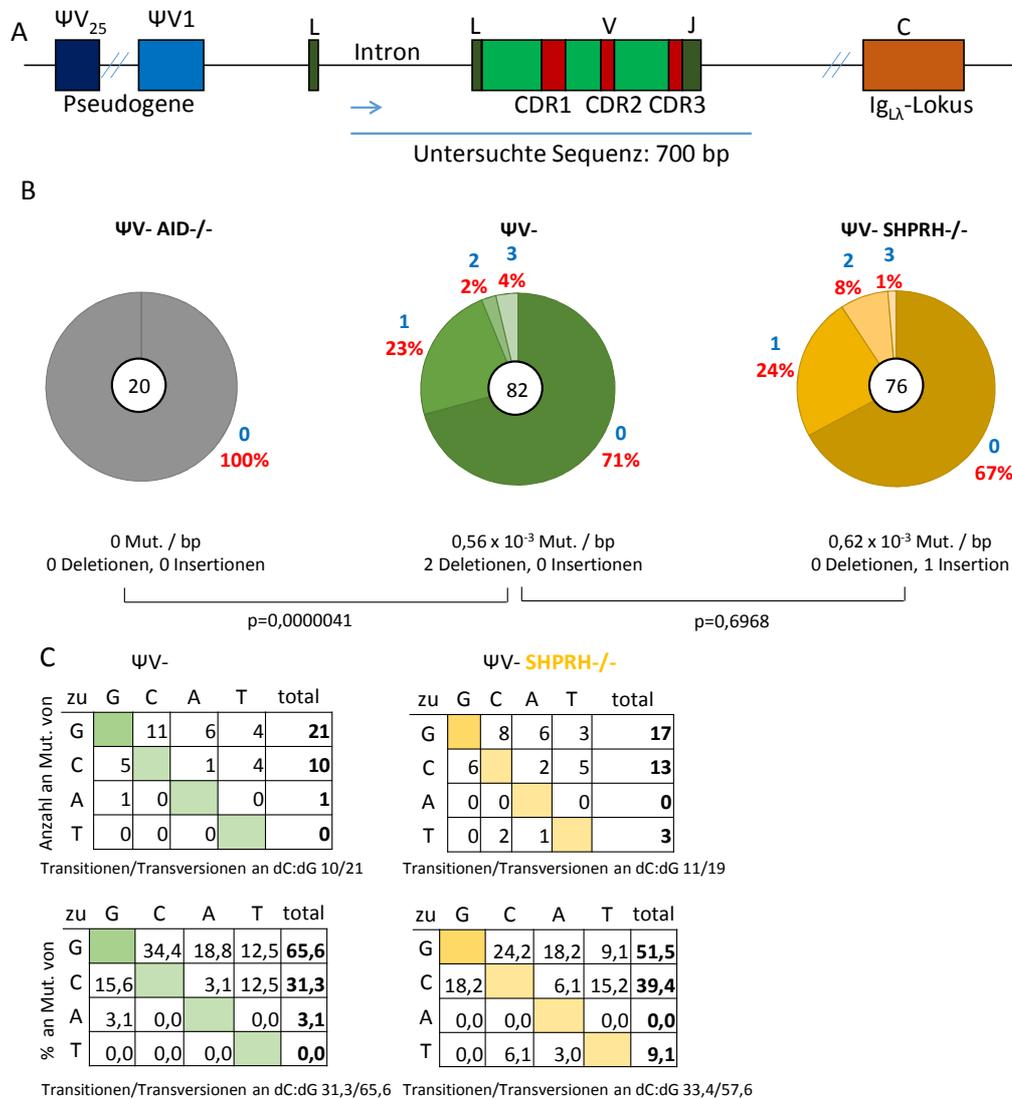


Abb. 2.10: Untersuchung der Mutationsfrequenz in der leichten λ-Kette der ΨV-DT40-Zellen

A) Schema der Genregion der leichten λ-Kette. Die Sequenzierung erfolgte ausgehend vom Primer (blauer Pfeil) und umfasst 700 bp. Dabei werden sowohl die VJ-Region als auch ein Teil der Introns untersucht. **B)** Darstellung des prozentualen Anteils an Mutationen für jeden Genotyp. Angegeben sind die Menge an Mutationen pro Sequenz (blau) und der sich daraus ergebende prozentuale Anteil (rot) an den insgesamt analysierten Sequenzen. Die Anzahl der analysierten Sequenzen ist in der Mitte eines jeden Kreises dargestellt. Als Negativ-Kontrolle wurde die ΨV-AID^{-/-}-Zelllinie verwendet. Die Signifikanz (p) wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's-t-Test ermittelt. **C)** Die Zahlen geben die absoluten (oben) und relativen Werte (unten) der Mutationen an. Mit Hilfe des χ²-Testes konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Abkürzungen L: *Leader*-Region, V: *variable*, J: *joining*, C: konstante (*constant*) Region, Mut: Mutationen, bp: Basenpaare

2.3 Inaktivierung von *SHPRH* in der DT40-Cre1-Zelllinie

Den deutlichsten Reparaturdefekt zeigte der *Knockout* von *SHPRH* in der DT40- Ψ V-Zelllinie mit Strategie B bei der Doppelstrangbruchreparatur unter Einfluss von Etoposid (Abb. 2.7 E). Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich die DT40-Cre1-Zelllinie verwendet. Diese zeichnet sich durch eine hohe Genkonversionsrate aus, ein Prozess, der eine funktionierende Doppelstrangbruchreparatur über die homologe Rekombination voraussetzt.

Um sich für eine *Knockout*-Strategie mit dem größtmöglichen Effekt zu entscheiden, wurde mit dem *Knockoutset* A in der DT40- Ψ V-Zelllinie auch ein Überlebensexperiment mit Etoposid durchgeführt. Obwohl hier nur heterozygote Klone getestet werden konnten, bildeten die *SHPRH*^{+/}-Klone wesentlich weniger Kolonien aus (siehe Anhang Abb. 4.1 im Vergleich mit Abb. 2.7 E).

Da die DT40-Cre1-Zelllinie, verglichen mit der DT40- Ψ V-Zelllinie, eine erhöhte Frequenz der gerichteten Integration von *Targeting*-Vektoren aufweist [182, 214], wurde die Inaktivierung von *SHPRH* zunächst mit Strategie A versucht, welche in der Ψ V-Zelllinie lediglich zu heterozygoten Klonen führte.

Der *Knockout* mit Strategie A wurde analog zu den Ψ V-Zellen durchgeführt (Abb. 2.11 A). Da die DT40-Cre1-Zelllinie Wildtyp-AID exprimiert und nicht mit einer Puromycinresistenz enthaltenden *AID-IRES-GFP*-Kassette rekonstituiert wurde, besitzt der *Targeting*-Vektor für das erste Allel eine Puromycinresistenz und für das zweite Allel eine Blasticidinresistenz. Eine PCR auf die gerichtete Integration der zwei *Targeting*-Vektoren zeigte, dass mit dieser Strategie erfolgreich 13 heterozygote Klone generiert werden konnten (Tab. 2.3). Von diesen 13 Klonen konnten nach Analyse der AID-Proteinmenge und Untersuchung des λ -Lokus (Daten nicht gezeigt) jedoch nur zwei Klone für weitere Versuche verwendet werden. Aus diesen zwei Klonen konnten wiederum sieben *SHPRH*⁻-Subklone generiert werden (Tab. 2.3), von denen sich nach Analyse des AID-Levels und des λ -Lokus (Daten nicht gezeigt) nur noch drei Klone für weitere Versuche eigneten. Daraus ergibt sich ein *Knockoutset* mit zwei *SHPRH*^{+/}-Klonen, sowie drei *SHPRH*⁻-Klonen (Abb. 2.11 B). Dass es in dem DT40-Cre1-Hintergrund möglich war, auch das zweite Allel mit *Knockout*-Strategie A zu entfernen bestätigt die erhöhte *Targeting*-Effizienz in dieser Zelllinie (vergl. Tab. 2.1 und 2.3).

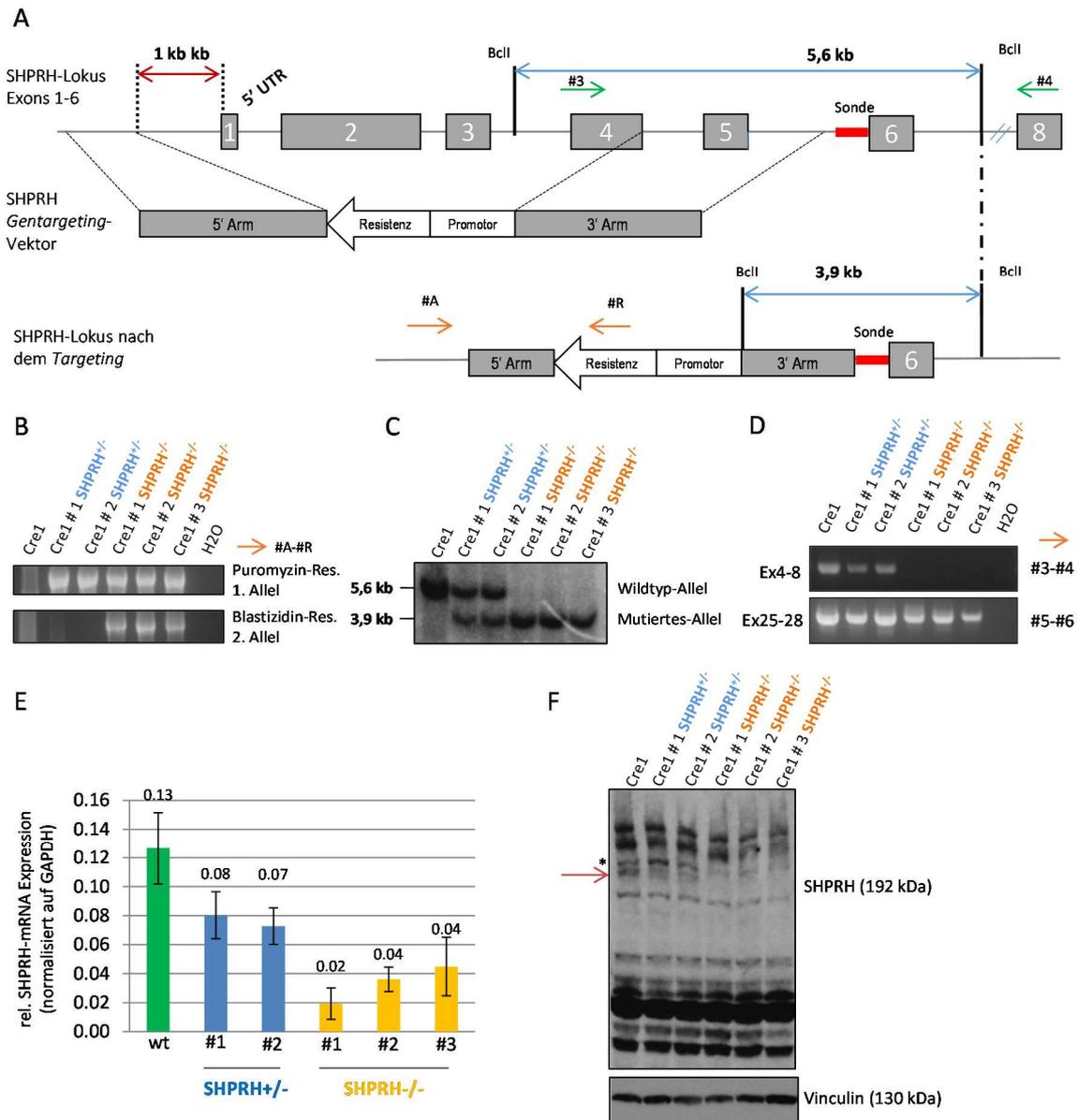


Abb. 2.11: Inaktivierung von SHPRH in der DT40-Cre1-Zelllinie mit Hilfe der Strategie A

A) Schematische Darstellung der Exons 1-6 des SHPRH-Lokus. Der Targeting-Vektor entfernt 1 kb stromaufwärts der Transkriptionsinitiation bis zum Ende von Exon 4. Die orangenen Pfeile zeigen die ungefähre Bindestelle der in Abb. B verwendeten Primer. Mit dem Enzym BclI und der eingezeichneten Sonde wurde die in Abb. C dargestellte Southernblot-Analyse durchgeführt. **B)** PCR zum Nachweis der gerichteten Integration des homologen 5'-Armes. Der erste Primer bindet noch außerhalb des 5'-Armes, der zweite Primer bindet in der Puromycin- bzw. Blastizidin-Resistenzkassette. **C)** Southernblot zum Nachweis der gerichteten Integration des 3'-Armes. Mit Hilfe der radioaktiven Sonde kann nach der Spaltung mit BclI zwischen dem Wildtyp-Allel (5,6 kb) und dem mutierten Allel (3,9 kb) unterschieden werden. **D)** RT-PCR zum Nachweis der fehlenden SHPRH-mRNA-Expression der Knockout-Region in den Cre1-SHPRH^{-/-}-Zellen. **E)** q-PCR Primer binden in Exon 25 und 28, zum Nachweis der verminderten SHPRH-Expression in den ΨV-SHPRH^{+/-}-Zellen. Die Expressionswerte wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. **F)** Westernblot-Analyse zeigt die fehlende SHPRH Proteinexpression in den SHPRH^{-/-}-Zellen. Das SHPRH-Protein (roter Pfeil) ist im Knockout nicht mehr nachweisbar. Vinculin dient als Ladekontrolle.

Abkürzungen: Res: Resistenz, rel: relativ, Ex: Exon

Tab.2.3 Targeting-Effizienz mit Strategie A in der Cre1-Zelllinie

Zelllinie	Knockout-Strategie A	Selektions-positive Klone	PCR-positive Klone	Targeting Effizienz %
Cre1	1. Allel	132	13	9,8
Cre1 #1 <i>SHPRH</i> ^{+/-}	2. Allel	35	5	14,2
Cre1 #2 <i>SHPRH</i> ^{+/-}	2. Allel	75	2	2,7

Um den *Knockout* zu bestätigen, wurde die gerichtete Integration der Vektoren in das Genom über eine Southernblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 2.11 C). Zudem wurde eine RT-PCR durchgeführt, welche belegt, dass es zu keinem Transkript der entfernten Exons kommt. Es ist jedoch möglich, von Exon 25-28 *SHPRH*-mRNA nachzuweisen (Abb. 2.11 D). Eine q-PCR mit Primern, die in Exon 25 und Exon 28 binden, zeigte eine moderat abgesenkte *SHPRH*-Expression in den heterozygoten Zellen und eine stark verminderte *SHPRH*-Expression in den homozygoten Klonen (Abb. 2.11 E). Um den *Knockout* auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Diese zeigt auf der Höhe von ca. 192 kDa die Wildtyp-*SHPRH*-Bande, welche in den heterozygoten Klonen kaum schwächer wird. Die homozygoten Klone weisen jedoch keine Expression des *SHPRH*-Proteins mehr auf (Abb. 2.11 F). Die Funktionalität dieser *Knockout*-Strategie konnte auf diese Weise mehrfach bestätigt werden.

2.3.1 Einfluss von *SHPRH* auf die Proliferation und AID-Expression in der Cre1-Zelllinie

Da auch die Ig-Genkonversion von der Teilungsrate der Zellen abhängig ist, sollte untersucht werden, ob die *Knockout*-Strategie A einen Einfluss auf die Proliferation der Cre1-Zelllinie hat. Hierfür wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und die Teilungsgeschwindigkeit über die Abnahme der Fluoreszenzintensität bestimmt. Eine Teilung benötigte im Durchschnitt 12-13 Stunden, einzig ein heterozygoter Klon teilt sich mit 11,5 Stunden etwas schneller (Abb. 2.12 A).

In den Cre1-Zellen wird AID endogen exprimiert. Um einen Einfluss von *SHPRH* auf die endogene AID-Expression zu untersuchen, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass der *Knockout* keinen Einfluss auf die AID-Level hat (Abb. 2.12 B). Somit kann das Cre1-*Knockoutset* für funktionelle Untersuchungen verwendet werden.

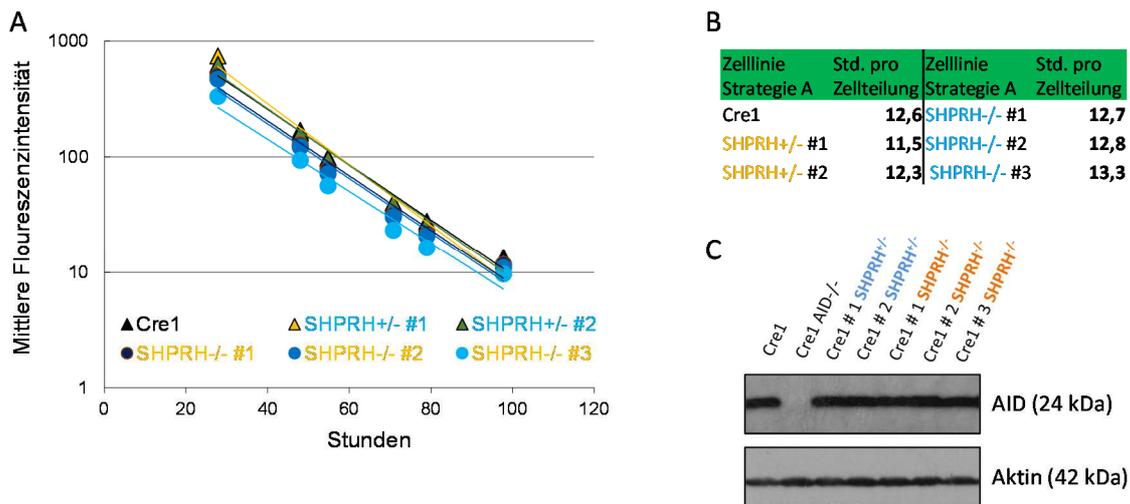


Abb. 2.12: Untersuchung der AID-Expressionen und Proliferation in der Cre1-SHPRH^{-/-}-Zelllinie

A) Die Abnahme der CSFE-Fluoreszenz ist als Exponentialfunktion in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Hieraus lässt sich die Proliferationsgeschwindigkeit ermitteln. Der ähnliche Verlauf der Geraden weist auf eine ähnliche Proliferationsgeschwindigkeit hin. **B)** Berechnung der benötigten Zeit pro Teilung. **C)** Die AID-Expression wird durch die *Knockout*-Strategie A nicht beeinflusst. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

2.3.2 Untersuchung der PCNA-Ubiquitinierung in SHPRH-defizienten Cre1-Zellen

Da in den Ψ V-Zellen mit *Knockout*-Strategie A nur das erste Allel entfernt werden konnte, sollte untersucht werden, ob das Entfernen beider Allele mit dieser Strategie in den Cre1-Zellen einen Einfluss auf die PCNA-Polyubiquitinierung zur Folge hat. Ein Effekt auf die schadensinduzierte Monoubiquitinierung war nicht zu beobachten (Abb. 2.13 A oben). In diesem ersten Versuch wiesen die SHPRH-defizienten Zellen jedoch eine verminderte Diubiquitinierung von PCNA auf (Abb. 2.13 A). Jedoch war diese Beobachtung nicht eindeutig reproduzierbar. Wie in Abbildung B zu sehen ist, scheint bei einer Wiederholung die Diubiquitinierung im Wildtyp ähnlich stark zu sein wie in den *Knockout*-Zellen. Weitere Wiederholungen des Versuchsansatzes (Daten nicht gezeigt) ergaben ein ähnlich variables Ergebnis. Auch die leicht veränderte basale Monoubiquitinierung wie in Abbildung 2.8 konnte in DT40-Cre1-*Knockout*set A festgestellt werden (vergl. Abb. 2.13 A und B).

Mit *Knockout*strategie A konnte also ebenfalls kein klarer Effekt von SHPRH auf die schadensinduzierte PCNA-Polyubiquitinierung nachgewiesen werden. Einen leichter Einfluss auf die basale PCNA-Monoubiquitinierung, ähnlich zur *Knockout*-Strategie B, schien sich aber zu bestätigen.

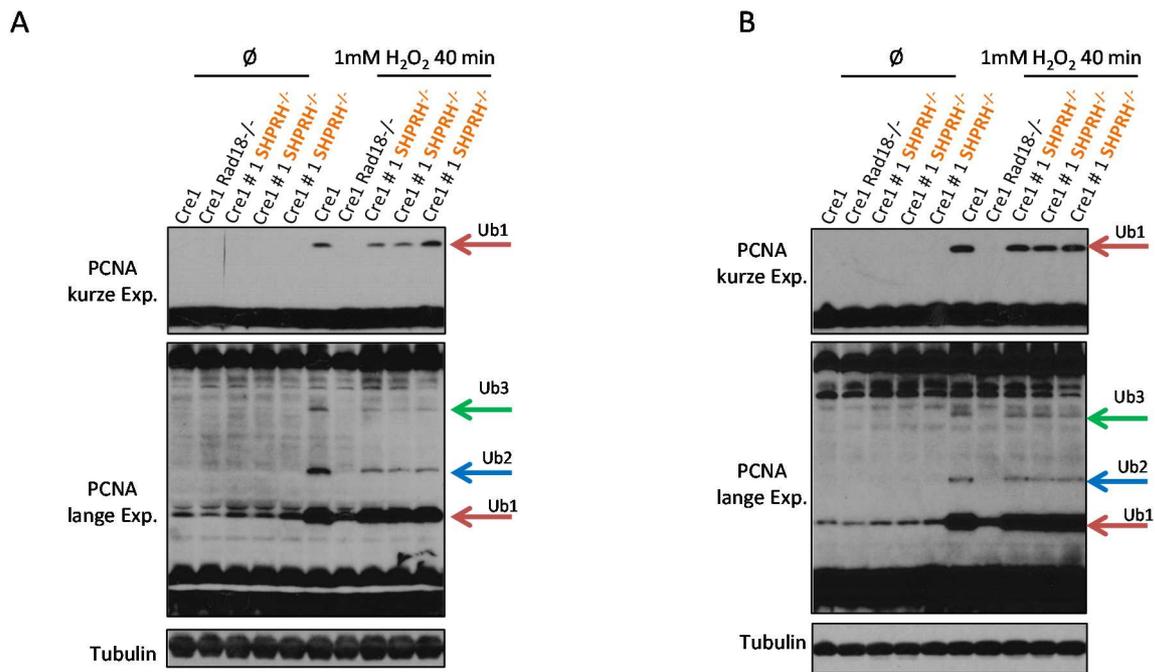


Abb. 2.13: Ubiquitinierungsexperiment mit DT40-Cre1-SHPRH^{-/-}-Zellen, Knockoutset A

A/B) Die Zellen wurden für 40 Minuten mit 1 mM H₂O₂ behandelt, um eine Ubiquitinierung von PCNA zu induzieren. Es sind zwei unabhängige Experimente dargestellt.

2.3.3 Einfluss der SHPRH-Expression auf die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturwege in der Cre1-Zelllinie

Nachdem in der DT40-Cre1-Zelllinie ein komplettes *Knockoutset* mit Strategie A generiert werden konnte, sollte die Sensitivität der Zellen auf verschiedene DNA-schädigende Substanzen untersucht werden. Jedoch konnte erneut keine erhöhte Sensitivität des *SHPRH-Knockouts* bei der Behandlung mit MMS beobachtet werden (Abb. 2.14 A). Auch gegenüber Cisplatin zeigten die *Knockout*-Zellen keine verringerte Überlebensrate (Abb. 2.14 B).

Allerdings hat die Behandlung mit Etoposid einen noch eindeutigeren Effekt auf das Überleben der *SHPRH^{-/-}*-Zellen als mit *Knockoutset* B. Bereits die heterozygoten Zellen zeigten analog zu den Versuchen in der DT40- Ψ V-Zelllinie eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesem Agens.

In den *SHPRH*-defizienten Zellen war dieser Effekt noch deutlicher zu beobachten (Abb. 2.14 C). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde ein weiterer Top II-Inhibitor verwendet. Doxorubicin fängt nicht nur Top2cc ab, sondern ist zusätzlich zytotoxisch durch die

Interkalation in die DNA und durch die Bildung von Sauerstoffradikalen [215]. Auch gegen dieses Agens zeigen die *SHPRH*-defizienten Zellen eine erhöhte Sensitivität. Die *SHPRH*^{+/-}-Zellen sind jedoch kaum sensitiver als der Wildtyp, der Effekt ist also nicht so stark wie im Fall von Etoposid (Abb. 2.14 D).

Der Einfluss von SHPRH auf die DSB-Reparatur konnte daher in der DT40-Cre1-Zelllinie mit zwei verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien bestätigt werden und soll aus diesem Grund im Folgenden detaillierter untersucht werden.

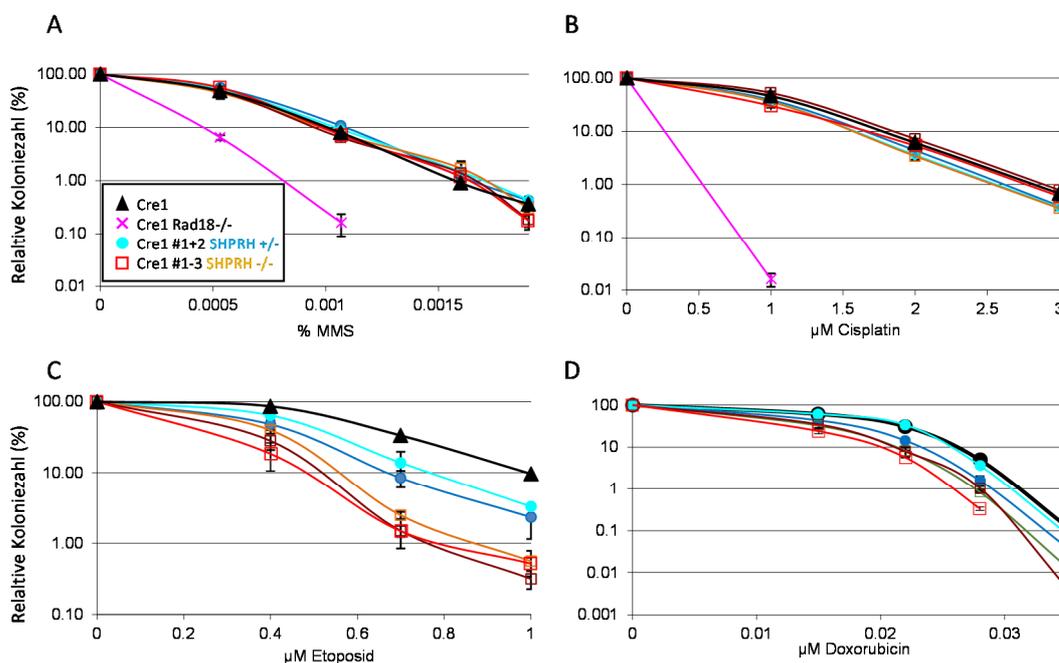


Abb. 2.14: Einfluss der SHPRH-Expression auf die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturwege in der DT40-Cre1-Zelllinie

Untersuchung mit Hilfe von Methylzellulose-Überlebensversuchen. In den Graphen ist die relative Koloniezahl (logarithmisch) in Abhängigkeit von der Agens-Konzentration abgebildet.

A) Einfluss von MMS auf das Überleben von *SHPRH*^{-/-}-Zellen. **B)** Sensitivität der *SHPRH*^{-/-}-Zellen gegenüber Cisplatin. **C)** Einfluss von Etoposid auf das Überleben von *SHPRH*^{-/-}-Zellen. **D)** Überlebensexperiment mit Doxorubicin als weiteres Doppelstrangbruch-induzierendes Agens.

2.3.4 Einfluss von SHPRH auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über die Nicht-homologe Endverknüpfung oder die homologe Rekombination

Top II-Inhibitoren führen zu Doppelstrangbrüchen, die in der S-Phase repariert werden. Dabei stehen die homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe Endverknüpfung

(NHEJ) zur Verfügung [207]. Eine Möglichkeit, um zwischen diesen zwei kompetitiven DSB-Reparaturwegen zu unterscheiden, ist die Verwendung von Topoisomerase I (Top I)-Inhibitoren. Top I-Inhibitor-induzierte DSB werden über die HR während der S-Phase repariert [216, 217]. Gegen den Top I-Inhibitor Camptothecin zeigen Zellen, die einen Defekt in dem NHEJ haben, eine besonders eindeutige Resistenz [217, 218]. Zellen mit einer beeinträchtigten HR hingegen sind sensitiver gegenüber dieser Droge [217]. Die Behandlung der Zellen mit Camptothecin zeigte jedoch weder eine erhöhte Sensitivität noch eine stärkere Resistenz der *Cre1-SHPRH^{-/-}*-Zellen gegen die eingesetzte Droge (Abb. 2.15 A).

Eine weitere Möglichkeit, mit Hilfe von Überlebens-Versuchen zwischen HR und NHEJ zu unterscheiden, ist das Arretieren der Zellen in einer Zellzyklusphase, in der die HR nicht funktionieren kann. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks in der G1-Zellzyklus-Phase arretiert. Während dieser Phase fehlt das Schwesterchromatid und somit kann keine Reparatur über die HR erfolgen. Unmittelbar nachdem das Thymidin durch mehrfaches Waschen entfernt worden war, wurden die Zellen steigenden Dosen radioaktiver Strahlung ausgesetzt.

Auch das Arretieren der Zellen mit Thymidin und eine nachfolgende γ -Bestrahlung führte zu keiner veränderten Sensitivität der *SHPRH*-defizienten Zellen (Abb. 2.15 B). Um das Arretieren in der G1-Phase zu bestätigen, wurden die Zellen nach dem Waschen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. In einer nachfolgenden FACS-Analyse konnten die verschiedenen Zellzyklus-Phasen, in denen sich die Zellen befanden, sichtbar gemacht werden (Abb. 2.15 D). Unbehandelt waren alle Zellzyklus-Phasen zu beobachten (Abb. 2.15 C obere Reihe), nach dem Thymidinblock befanden sich die Zellen ausschließlich in der G1-Phase (Abb. 2.15 C untere Reihe).

Eine darauf folgende Bestrahlung der Zellen, ohne diese zuvor zu arretieren, zeigte jedoch auch keinen Einfluss von *SHPRH* auf das Überleben der Zellen (Abb. 2.15 E). Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine einmalige Bestrahlung, und damit einmalige Schädigung der DNA, eventuell nicht ausreicht, um einen Effekt ähnlich zur kontinuierlichen Etoposid-Behandlung zu erzielen.

Mit Hilfe von Überlebensversuchen konnte der Einfluss von *SHPRH* auf die DSB-Reparatur weder der HR noch dem NHEJ zugewiesen werden. Daher wurde mit einer weiteren Methode versucht diesen Phänotyp zu erklären.

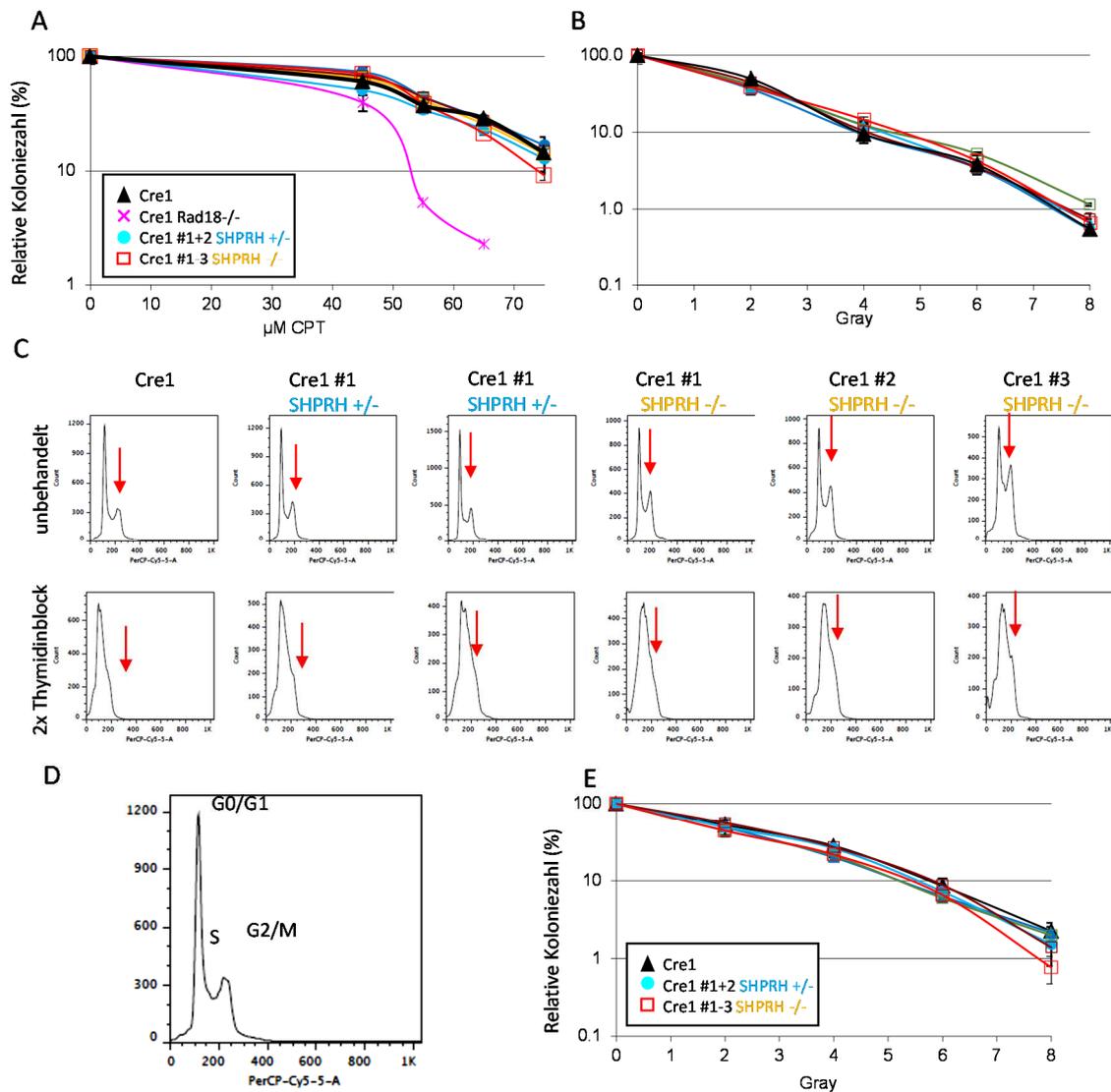


Abb. 2.15: Doppelstrangbruch-Reparatur: Unterscheidung zwischen NHEJ und HR in Cre1-SHPRH-defizienten Zellen

A/B/E) Untersuchung der Cre1-SHPRH^{-/-}-Zellen mit Hilfe von Methylzellulose-Überlebensversuchen. In den Graphen ist die relative Koloniezahl (logarithmisch) in Abhängigkeit von der Agens-Konzentration (**A+B**) /Strahlen-Dosis (**E**) abgebildet. **A)** Einfluss von Camptothecin auf die SHPRH^{-/-}-Zelllinien. **B)** Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit steigenden Dosen an γ -Strahlung nach einem doppelten Thymidinblock **C)** FACS-Analyse der Zellen nach Fixierung und Propidiumiodid-Färbung. Oben: unbehandelt, unten: nach zweifachem Thymidinblock. Zellen arretieren in der G1-Phase. **D)** Exemplarische Darstellung der Zellzyklusphasenverteilung un behandelter DT40-Cre1-Zellen. **E)** γ -Bestrahlung nicht arretierter DT40-Cre1-SHPRH^{-/-}-Zellen. Abkürzung: CPT: Camptothecin, \downarrow : G2/M-Zellzyklusphase

2.3.5 Untersuchung der *Targeting*-Effizienz in der Cre1-*SHPRH*^{-/-}-Zelllinie

Eine weitere Möglichkeit, um zwischen der HR und dem NHEJ zu unterscheiden, ist die Bestimmung der sogenannten *Targeting*-Effizienz. Hierbei wird die Integration eines *Targeting*-Vektors in das Genom der Cre1-Zelllinie untersucht. Dabei kann man feststellen, ob der Vektor gerichtet durch die HR oder zufällig durch das NHEJ in das Genom integriert wurde. Die beiden Reparaturmechanismen verhalten sich bei diesem Versuchsansatz indirekt proportional zueinander. Ein Defekt im NHEJ führt zu einer höheren Anzahl an gerichteten Integrationen [219, 220], wohingegen eine beeinträchtigte HR zu einer verringerten Rate an gerichteter Integration führt [221, 222]. Für diesen Versuch wurde ein RDM1-*Targeting*-Vektor verwendet. Werden in DT40-Zellen beide RDM1-Allele entfernt, so weisen diese eine 3-fach erhöhte Cisplatinsensitivität auf. Das Entfernen nur eines Allels hingegen hat keinen Effekt [223].

Da der RDM1-*Targeting*-Vektor eine Blasticidinresistenz besitzt, wurden aus den Cre1 *SHPRH*^{-/-}-Klonen die Blasticidin-Resistenzkassetten, mit denen das erste Allel mutiert wurde, durch die Aktivierung der Cre-Rekombinase entfernt. Nach der Transfektion konnten für den Cre1-Wildtyp und die Cre1-*SHPRH*^{-/-}-Zelllinie jeweils 100 Puromycin-resistente Klone untersucht werden. Über eine PCR konnte die Anzahl der Klone bestimmt werden, welche das Konstrukt gerichtet integriert hatten. Dabei lag der erste Primer vor dem 5'-homologen Arm und der zweite Primer in der Resistenzkassette. Um die PCR-Fehlerquote möglichst gering zu halten, wurde jede PCR zweimal durchgeführt. Die PCR-positiven Klone hatten das Konstrukt über die HR gerichtet integriert, die PCR-negativen Klone hatten den *Targeting*-Vektor über das NHEJ zufällig ins Genom eingefügt. Das Diagramm (Abb. 2.16) zeigt eine leichte, wenn auch nicht signifikant erhöhte *Targeting*-Effizienz der *SHPRH*-defizienten Klone. Dies könnte ein Hinweis auf eine Störung bei der DSB-Reparatur über das NHEJ sein, die zu einer erhöhten HR führen würde.

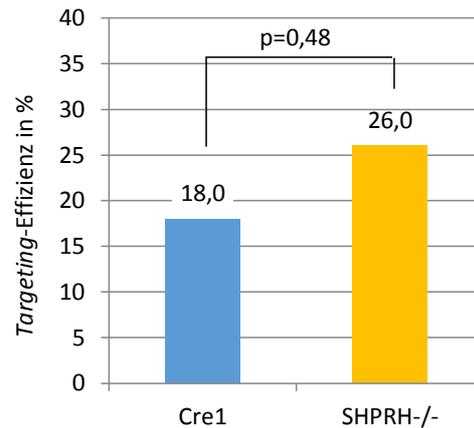


Abb. 2.16: Targeting-Effizienz des RDM1-Transgens in der Cre1-Wildtyp- und SHPRH^{-/-}-Zelllinie

Untersucht wurde die Targeting-Effizienz in je 100 Klonen. Die statistische Auswertung wurde mit dem Fisher's-Exact-Test durchgeführt.

2.3.6 Die Rolle von SHPRH bei der Ig-Genkonversion.

Die Ig-Genkonversion ist ein Prozess, der die HR benötigt. Ein Untersuchung der Ig-Genkonversionsrate lässt also Rückschlüsse auf Störungen der HR zu. Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen der Ig-Genkonversions- und der somatischen Hypermutationsrate [224]. Dabei wurde folgendes Modell aufgestellt. Solange eine Pseudogen-Donor-Sequenz vorhanden ist und diese Zelllinie, so wie die Cre1-Zelllinie, eine hohe Rate an homologer Rekombination hat, kommt es zur Ig-Genkonversion. Bei einer Störung in der HR sinkt auch die Ig-Genkonversionsrate. Je nachdem in welchem Stadium die homologe Rekombination gestört ist, folgen daraus zwei Szenarien. Entweder erfolgt die Störung vor dem Rad51 vermitteltem Strangaustausch, dann sinkt die Ig-Genkonversion und gleichzeitig kann eine erhöhte somatische Hypermutationsrate beobachtet werden [56, 225, 226]. Findet die Störung alternativ nach dem Strangaustausch statt, dann sinkt die Ig-Genkonversionsaktivität, die somatische Hypermutationsrate bleibt jedoch gleich [221, 227, 228]. Somit könnte SHPRH trotz unveränderter somatischer Hypermutation einen Einfluss auf die Ig-Genkonversion haben. Die Ig-Genkonversion ist außerdem ein gutes Werkzeug, um einen Defekt in der HR oder dem NHEJ zu erkennen. So konnte gezeigt werden, dass Fehler in dem NHEJ zu einer erhöhten Ig-Genkonversion führen [229]. Auf der anderen Seite haben Defekte in der HR eine niedrigere Ig-Genkonversionsrate zur Folge [230], oder können diese komplett inhibieren, wie der *Knockout* von XRCC2/3 zeigt [56].

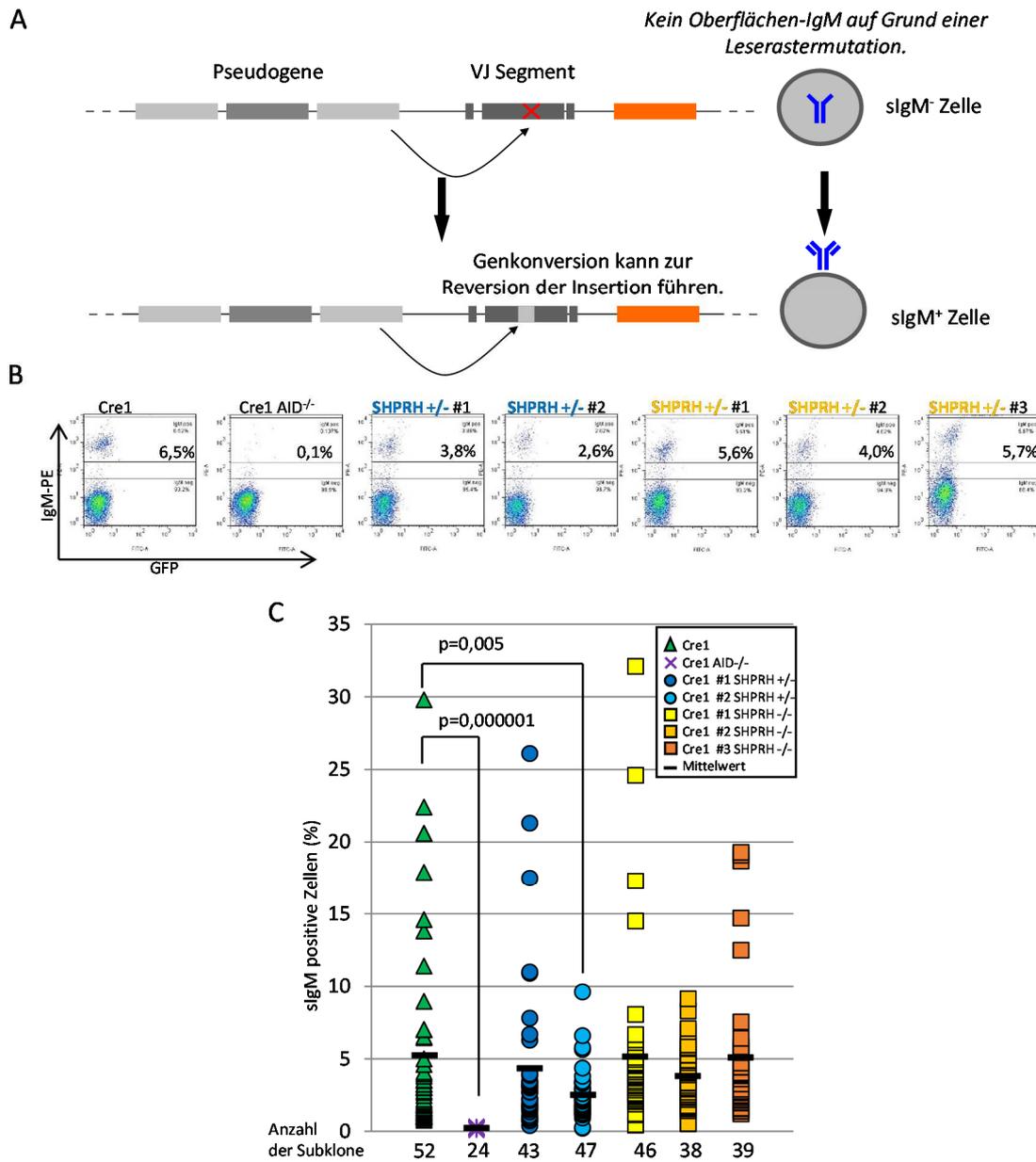


Abb. 2.17: Untersuchung der Ig-Genkonversion in DT40-Cre1-SHPRH^{-/-}-Zellen

A) Modell zur Untersuchung der Ig-Genkonversion in DT40-Cre1-Zellen. Wegen einer Leserastermutation im VJ-Segment der leichten Kette exprimieren die Zellen kein Oberflächen-IgM. Durch Genkonversionsereignisse kann diese Mutation repariert und IgM wieder exprimiert werden. **B)** Repräsentative FACS-Blots aller Zelllinien aus dem *Knockoutset* A. **C)** Darstellung aller Klone aus dem GC-Experiment, sowie des Mittelwerts aller Subklone. Die Cre1-AID^{-/-}-Zelllinie dient als Negativkontrolle. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-t-Tests ermittelt. Abkürzungen: sigM: *surface*-IgM.

Die DT40-Cre1-Zelllinie besitzt ein zusätzliches Nukleotid in der leichten Kette der VJ- λ -Gensegmente. Dies führt zu einer Leserasterverschiebung und als Folge dessen kann die Cre1-Zelllinie kein Oberflächen-IgM exprimieren [185]. Die Ig-Genkonversion kann Teile der VJ- λ -Region mit homologen Abschnitten aus den stromaufwärts liegenden 25 Pseudogenen ersetzen, um diese zu diversifizieren (Abb. 2.17 A). Auf diese Weise kann auch die Leserastermutation durch einen Abschnitt aus den Pseudogenen ersetzt und dadurch repariert werden. Die Funktion der leichten Kette kann somit wiederhergestellt werden und die Zellen exprimieren wieder Oberflächen-IgM (Abb. 2.17 A). Dieser Wechsel der IgM-Oberflächen-Expression korreliert mit der Ig-Genkonversionsrate [185].

Mit Hilfe eines PE-gekoppelten IgM-Antikörpers und einer danach folgenden FACS-Analyse an Tag 13 nach der Vereinzelung konnte die Ig-Genkonversionsrate bestimmt werden (Abb. 2.17 B). Der Vergleich zwischen dem Wildtyp und den *SHPRH*-defizienten Zellen zeigte jedoch, dass mit diesem Versuchsansatz kein Unterschied in der Ig-Genkonversionsrate ermittelt werden konnte. Die *Cre1-AID^{-/-}*-Zelllinie diente als Negativkontrolle (Abb. 2.17 C). Einzig ein heterozygoter Klon zeigte auch in weiteren unabhängigen Versuchen (Daten nicht gezeigt) eine signifikant niedrigere Genkonversionsrate. Da bei daraus entstandenen homozygoten Klonen keine veränderte Genkonversionsrate beobachtet werden konnte, lässt sich dieser Effekt wahrscheinlich auf die klonale Variabilität der DT40-Zellen zurückführen.

2.3.7 Einfluss von SHPRH auf die Ig-Genkonversion auf DNA-Ebene

Um die Ergebnisse des Genkonversions-Versuches mit einer weiteren Methode detaillierter zu untersuchen, wurden je vier Klone um den Median aus dem in Abb. 2.17 gezeigtem Experiment bis an Tag 31 nach der Vereinzelung weiterkultiviert. Anschließend wurden je zwei repräsentative Wildtyp-Klone und je zwei *SHPRH^{-/-}*-Klone sequenziert. Die Vorgehensweise war analog zur Sequenzierung der DT40- Ψ V-Zelllinie, abgesehen von der Auswertung. Diese erfolgte ausschließlich mit dem Programm *Geneious*. Die Mutationen wurden analog zu anderen Arbeiten in Punktmutationen oder Genkonversionsereignisse eingeteilt [52, 229].

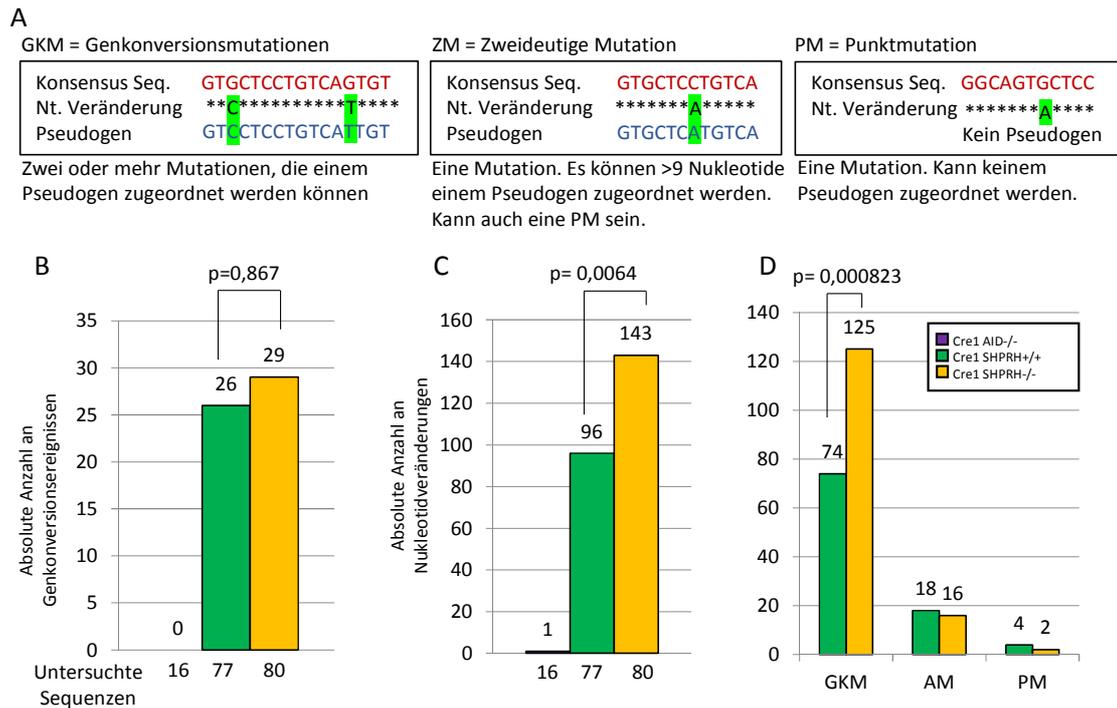


Abb. 2.18: SHPRH hat einen Einfluss auf die Genkonversionsmutationen

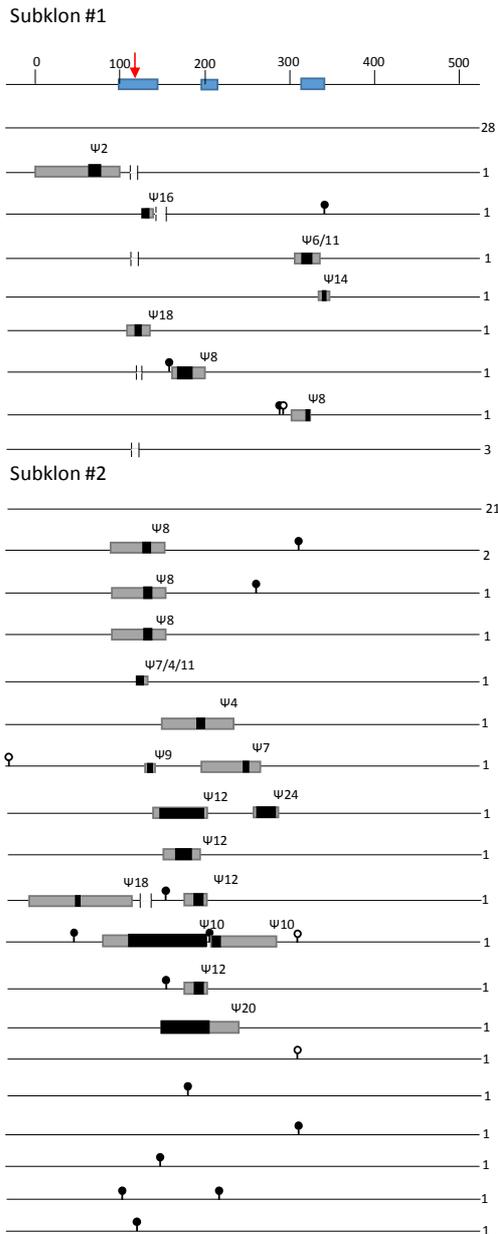
A) Übersicht zur Einteilung der verschiedenen Nukleotidveränderungen. **B)** Absolute Anzahl an Genkonversionsereignissen in den untersuchten Sequenzen. **C)** Absolute Anzahl der Nukleotidveränderungen in der Cre1 und Cre1-*SHPRH*^{-/-}-Zelllinie. Pro Sequenz wurden 698 bp analysiert. **D)** Einteilung der verschiedenen Genkonversionsereignisse. Statistische Auswertung nach Fisher's-Exact-Test bezogen auf die Nukleotid-Gesamtanzahl pro Genotyp.

Abkürzung: Seq: Sequenz, Nt: Nukleotid

Genkonversionsereignisse können mit Hilfe der Datenbank von *Reynaud* [52] bestimmten Pseudogenen zugeordnet werden. Wenn mehr als eine Base verändert ist und der veränderte Sequenzabschnitt einem Pseudogen zugeordnet werden kann, spricht man von einem Genkonversionsereignis mit Genkonversionsmutationen (GKM). Wenn nur ein Nukleotid verändert ist, gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder kann diese Mutation einem Pseudogen zugeordnet werden, dann spricht man von einer zweideutigen Mutation (ZM) oder kein Pseudogen kann für diese Nukleotidveränderung gefunden werden, dann handelt es sich um eine echte Punktmutationen (PM) (Abb. 2.18 A).

Nach der Auswertung aller Mutationsereignisse zeigt sich, dass sich die Anzahl an Genkonversionsereignissen zwischen Cre1-*SHPRH*^{+/+}-Zellen und Cre1-*SHPRH*^{-/-}-Zellen nicht unterscheidet (Abb. 2.18 B). Betrachtet man jedoch die Anzahl der Mutationen, die sich durch die Genkonversionsereignisse ergibt, so ist diese in den *SHPRH*-defizienten Zellen gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht (Abb. 2.18 C).

DT40 Cre1 WT



DT40 Cre1 SHPRH-/-

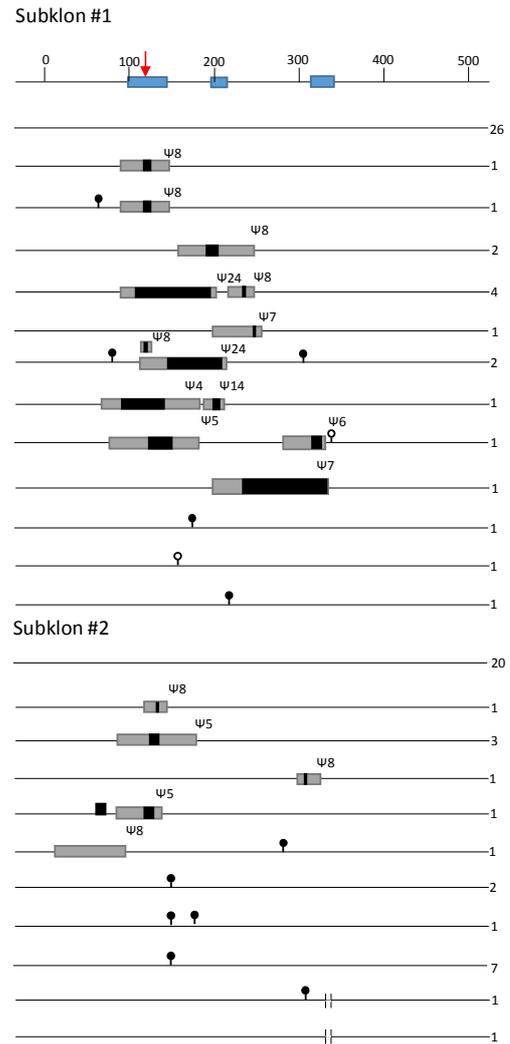


Abb. 2.19: Darstellung der Genkonversionsereignisse auf der VJ-Region des λ -Lokus der leichten Kette

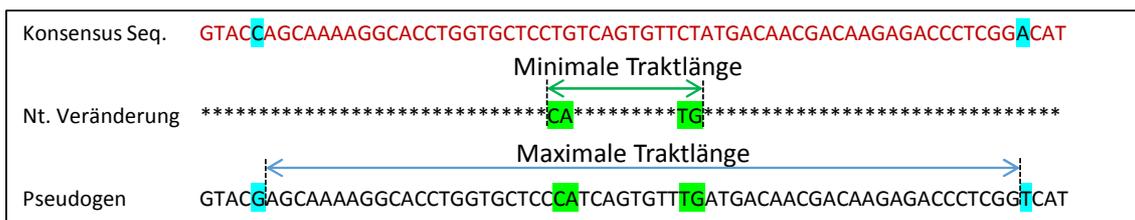
In blau dargestellt sind die CDR-Regionen auf dem VJ-Segment. Der rote Pfeil markiert das zusätzliche Nukleotid in der Cre1-Zelllinie. Die Zählung beginnt mit dem ersten Nukleotid der *Leader*-Sequenz. Jede Linie repräsentiert eine Sequenz. Die Zahl daneben gibt die Häufigkeit identischer Sequenzen an. Schwarze Blocks stehen für die minimale Traktlänge eines Genkonversionsereignisses, graue Blocks für die maximale Länge. Mit Ψ wird das Pseudogen, aus dem die Veränderung stammt, angegeben. Schwarze Kreise stehen für zweideutige Mutationen, weiße Kreise für Punktmutationen. Unterbrechungen in den Linien stehen für Deletionen. Die Abbildung ist maßstabsgetreu.

Unterteilt man die Mutationen in die verschiedenen Mutationsarten, zeigt sich, dass vor allem die Anzahl an GKM in den *SHPRH*-defizienten Zellen erhöht ist (Abb. 2.18 D).

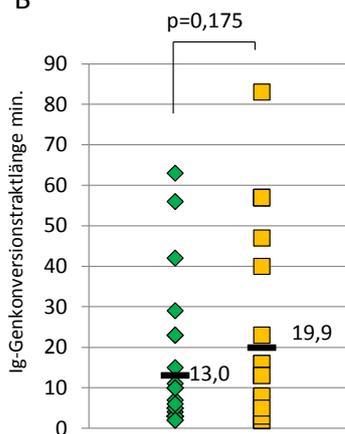
Die statistische Auswertung bezieht sich hierbei auf die absolute Zahl an jeweils untersuchten Basen. Pro Sequenzierung wurden 698 bp verglichen. Für den Wildtyp wurden 77, für die *SHPRH*^{-/-}-Zellen 80 Sequenzen ausgewertet. Daraus ergibt sich mit Hilfe des Fisher's-Exact-Test ein signifikant erhöhter Anteil an GKM in den *SHPRH*-defizienten Zellen (Abb. 2.18 D). Die Analyse der Nukleotidveränderungen im Allgemeinen deutet auf keine Besonderheiten hin. Wie zu erwarten war, finden die meisten Veränderungen im Bereich der CDR-Regionen statt (Abb. 2.19).

Eine Ursache für die erhöhten GKM könnten die Traktlängen der Ereignisse darstellen. Dabei wird zwischen minimaler und maximaler Traktlänge eines Genkonversionsereignisses unterschieden. Die minimale Länge ergibt sich von der ersten Mutation bis zur letzten des entsprechenden Ereignisses.

A



B



C

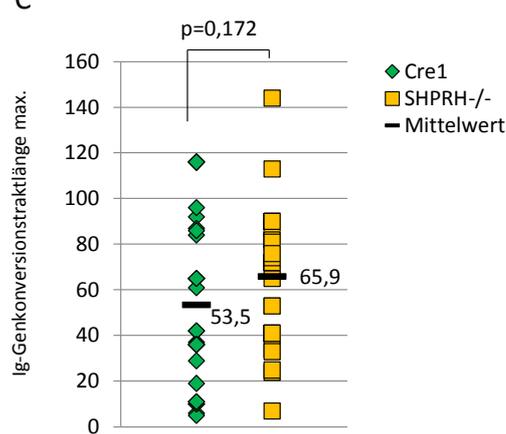


Abb. 2.20: Darstellung der Traktlängen der Genkonversionsereignisse

A) Modell zur Einteilung der der Traktlängen in minimale und maximale Länge. **B)** Darstellung der minimalen (min.) Traktlänge aller Genkonversionsereignisse. **C)** Darstellung der maximalen (max.) Traktlänge aller Genkonversionsereignisse. Statistische Auswertung über den Student's-t-Test. Abkürzungen: Seq: Sequenz, Nt: Nukleotid, Ig: Immunglobulin.

Bei der maximalen Länge werden alle angrenzenden Nukleotide mit einberechnet, die potentiell noch von dem Pseudogen abstammen könnten (Abb. 2.20 A). Die Analyse der Traktlängen zeigt zwar eine leichte Tendenz des *Knockouts* zu längeren Genkonversions-Trakten, jedoch ist der Unterschied bei der Menge an analysierten Sequenzen nicht signifikant (Abb. 2.20 B+C).

Zusammengefasst zeigt SHPRH auch einen Einfluss auf die Ig-Genkonversion, ein Prozess dem die HR zugrunde liegt [221]. Die Untersuchung der einzelnen Genkonversionsereignisse deutet darauf hin, dass SHPRH eine Funktion bei der Toleranz von Fehlpaarungen während der HR besitzen könnte. Um den dahinter stehenden Mechanismus zu finden sind jedoch weitere Experimente nötig.

3 DISKUSSION

Der Rad6-Weg erlaubt die Replikation über DNA-Schäden auf eine potentiell mutagene oder eine fehlerfreie Weise, gelenkt durch die Modifikation von PCNA mit Hilfe von Ubiquitin [122, 124]. Während die fehlerhafte Reparatur von DNA-Läsionen in der Zelle normalerweise vermieden wird, ist dieser Prozess bei der somatischen Hypermutation die Grundlage dafür, eine erhöhte Mutationsrate innerhalb der *Ig*-Gene zu gewährleisten, wodurch die Affinitätsreifung der Antikörper ermöglicht wird [2]. Während der Einfluss der PCNA-Monoubiquitinierung auf die somatische Hypermutation bereits gezeigt werden konnte [126, 174], ist die Bedeutung der Polyubiquitinierung im Prozess der SHM weitgehend unbekannt. Nachdem SHPRH und HLTF als Orthologe der E3-Ligase Rad5 in Hefe identifiziert wurden [155-157, 172], war die Grundlage geschaffen, den Einfluss der fehlerfreien Reparatur im Rad6-Weg in Vertebraten genauer zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von SHPRH auf die PCNA-Ubiquitinierung, das Überleben von DNA-Schäden, sowie die Immunglobulin-Diversifizierung untersucht werden. Da es widersprüchliche Ergebnisse zur Kooperation von SHPRH und HLTF gibt [153-155], sollte die Funktion in der DT40-Zelllinie des Huhns untersucht werden, der das zweite Rad5-Ortholog HLTF fehlt.

3.1 Deletion von *SHPRH* in der DT40-Zelllinie

Auf Grund der hohen *Targeting*-Effizienz ist die DT40-Zelllinie gut geeignet, Gene über die gerichtete Integration von Vektoren zu entfernen [189]. Diese Eigenschaft, sowie eine kurze Verdopplungszeit und eine lange S-Phase machen die Zelllinie zusätzlich zu einem idealen Modellorganismus, um die DNA-Reparatur und Genotoxizität zu untersuchen [231].

Vor Beginn dieser Arbeit konnten Effekte von SHPRH nur mit exogen überexprimierten Proteinmengen [156, 157] oder mit Hilfe von shRNA [155, 156] gezeigt werden. Die Effekte auf die PCNA-Ubiquitinierung nach UV-Bestrahlung in *SHPRH*-defizienten MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) waren wenig überzeugend, da der Nachweis der PCNA-Polyubiquitinierung mit aktuellen Methoden nur schwer möglich ist [153] und daher ein Einfluss von SHPRH auf die PCNA-Polyubiquitinierung nicht eindeutig gezeigt werden konnte [155].

3.1.1 *SHPRH-Knockout-Strategien*

SHPRH ist wie Rad5 ein Multidomänen-Protein aus der Familie der SWI/SNF2-Helicasen. Beide kodieren unter anderem für eine E3-RING-Domäne [232], wobei SHPRH zusätzlich eine PHD-Domäne besitzt [172]. Um die Funktionen von SHPRH zu untersuchen, sollte das Protein zunächst möglichst komplett deletiert werden. Hierfür wurden ein Teil der Promotorregion sowie die ersten 4 Exons entfernt, um die Transkription zu verhindern. Dennoch wurde in früheren Studien bereits angemerkt, dass das partielle Entfernen eines Genabschnittes zu einem Resttranskript führen kann, welches durchaus noch translatiert werden kann [126, 191]. Arakawa und Kollegen generierten einen *Rad18-Knockout*, welcher jedoch nicht die Sequenz der RING-Domäne deletierte. Als weiterhin eine PCNA-Monoubiquitinierung nachweisbar war, entschieden sie sich zu einem weiteren *Knockout*, der spezifisch die RING-Domäne von Rad18 entfernte [126]. Auch beim Entfernen der Promotorregion muss beachtet werden, dass sich *Enhancer* bis zu 2-3 Mbp vor dem Transkriptionsstart befinden können [233] und die ersten 4 Exons von *SHPRH* für keine funktionellen Domänen kodieren. Dies ist der Grund warum in den zwei folgenden *Knockout-Strategien* gezielt funktionelle Domänen deletiert wurden.

Die RING-Domäne besitzt eine Reihe von spezifisch angeordneten Histidinen und Cysteinen und ermöglicht die E2-abhängige Ubiquitinierung des Substrates [234]. Da für Rad5 in der Hefe gezeigt werden konnte, dass Mutationen in der RING-Domäne zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV- und γ -Strahlung führen [197, 198, 235], sollte diese Domäne auch in SHPRH untersucht werden.

Die PHD-Domäne besitzt ein ähnliches Histidin- und Cysteinmuster wie die RING-Domäne, spielt jedoch keine Rolle bei der Ubiquitinierung von Proteinen [236]. Da diese Domäne aber normalerweise eine Bedeutung bei der Umgestaltung von Chromatin und bei der Transkriptionsregulation hat [193, 237], sollte auch diese Domäne gezielt deletiert werden.

3.1.2 *Targeting-Effizienz der verschiedenen Knockout-Konstrukte*

Normalerweise integriert die DT40-Zelllinie transfizierte Gen-*Targeting*-Konstrukte mit einer relativ hohen Rate homolog in das Genom [189]. Für die 3 verschiedenen *SHPRH Knockout*-Vektoren ergaben sich erhebliche Unterschiede, was die Effizienz der Integration anbelangt. Mit Strategie A konnte in der DT40- Ψ V-Zelllinie nur das erste Allel

erfolgreich entfernt werden. Dies führte zunächst zu der Annahme, dass das Gen überlebenswichtig für die Zelle sei und ein kompletter *Knockout* letal wäre. Dies schien nicht ungewöhnlich, da es durchaus denkbar ist, dass das Entfernen eines Reparaturweges tödlich ist. So war es nur über einen Umweg möglich, das zweite Allel des E2-konjugierenden Enzymes Ubc13 zu entfernen [180]. Noch deutlicher zeigte sich dieser Effekt bei der Endonuklease APE1 aus der BER, deren Deletion letal ist [238].

Warum die *Targeting*-Effizienz der *Knockout*-Strategie A so gering ist, kann nicht eindeutig belegt werden. Sie besitzt aber die kürzesten homologen Arme und ersetzt einen langen dazwischen liegenden genomischen Bereich von 5,8 kb. Somit besteht nur eine geringe kontinuierliche Homologie zwischen dem *Targeting*-Vektor und der genomischen DNA, was eine verminderte Rate an gerichteter Integration des Konstrukts zur Folge haben könnte [191].

In der DT40-Cre1-Zelllinie konnten dann aber beide Allele mit Strategie A erfolgreich entfernt werden. Ein Unterschied zwischen den zwei Zelllinien ist das AID-Expressionslevel, welches in den DT40-Cre1-Zellen endogen reguliert wird, während DT40- Ψ V-Zellen dieses exogen stark überexprimieren [188]. Ob die unterschiedlich starke AID-Expression hierbei eine Rolle spielt, konnte bisher jedoch experimentell nicht bestätigt werden.

Eine andere Möglichkeit sind die unterschiedlichen Prozesse der Ig-Diversifizierung. Im Gegensatz zur Ψ V-Zelllinie ist in der Cre1-Zelllinie die Ig-Genkonversion und damit die homologe Rekombination ständig aktiv. Als Folge dessen könnten auch andere Prozesse, wie die gerichtete Integration, die von der HR abhängt, positiv beeinflusst werden [189]. Jedoch fehlen auch hierfür experimentelle Indizien.

Mit den *Knockout*-Strategien B und C konnten erfolgreich beide Allele in der DT40- Ψ V-Zelllinie entfernt werden. Die erhöhte Frequenz an gerichteter Integration lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass mindestens ein homologer Arm des jeweiligen *Knockout*-Konstruktes eine Größe von 2 kb aufwies.

Es muss daher bei zukünftigen *Knockout*-Strategien beachtet werden, dass die Beschaffenheit des *Targeting*-Vektors einen großen Einfluss auf die Frequenz der gerichteten Integration nimmt. Dabei wird die *Targeting*-Effizienz durch das Verhältnis der Länge der homologen Arme zu der zu entfernenden Größe der genomischen DNA direkt beeinflusst [191].

3.1.3 Einfluss der verschiedenen *SHPRH*-*Knockout*-Strategien auf die mRNA- und Proteinexpression

Auf transkriptioneller Ebene konnte in den deletierten Regionen keine mRNA mehr nachgewiesen werden. Zu beachten ist jedoch, dass für *Knockout*-Strategie A und B noch mRNA am Ende der RING-Domäne nachgewiesen werden konnte. Das gleiche gilt bei Strategie C für die Exons 4-8. Auf Proteinebene konnte SHPRH mit allen drei Strategien erfolgreich entfernt werden. Zumindest für die Strategie C konnte ein verkürztes Protein gefunden werden, welches von der Größe her den *in silico* Berechnungen entsprechen könnte. Eine Restfunktion dieses Proteins bzw. ein dominant negativer Effekt, der bei verkürzten Proteinen beobachtet werden kann [239], konnte hier deshalb nicht ausgeschlossen werden. Ob bei Strategie A und B kein verkürztes Protein exprimiert wurde, oder dieses nur auf Grund der starken Hintergrundbanden des Antikörpers nicht nachweisbar war, konnte nicht geklärt werden. Dieser Umstand muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

3.2 Einfluss von SHPRH auf die PCNA-Ubiquitinierung

Nachdem *SHPRH* in der DT40-Zelllinie durch verschiedene *Knockout*-Strategien entfernt wurde, sollten die Funktionen des Proteins genauer untersucht werden. SHPRH wurde als Ortholog der E3-Ligase Rad5 aus der Hefe identifiziert [157], deren Funktion kontrovers diskutiert wurde [153-157]. Da es bislang schwierig war konsistente Ergebnisse zum Nachweis der PCNA-Polyubiquitinierung zu generieren [153], können die publizierten Ergebnisse nicht eindeutig interpretiert werden.

3.2.1 Die PCNA-Monoubiquitinierung

Vorarbeiten im eigenen Labor zeigten eine gute und reproduzierbare Induktion der PCNA-Monoubiquitinierung durch MMS [174], es konnte jedoch keine Polyubiquitinierung detektiert werden. Bei der Untersuchung der PCNA-Monoubiquitinierung verwendeten Zlatanou et al. H₂O₂, wobei eine zusätzliche potentielle Diubiquitinierungsbande auf dem Westernblot sichtbar wurde [208]. Bei der Reproduktion dieses Versuchsansatzes mit der DT40-Zelllinie wurden als Negativ-Kontrolle eine Rad18-defiziente Zelllinie, sowie eine PCNA^{K164R}-Mutante verwendet. Durch die fehlende Induktion der PCNA-Di- und

Triubiquitinierung in den Negativ-Kontrollen konnte die Funktionalität des Versuchsansatzes bestätigt werden.

3.2.2 Einfluss von SHPRH auf die PCNA-Polyubiquitinierung

Trotz der starken Induktion der Ubiquitinierung zeigte keine der *Knockout*-Strategien von *SHPRH* einen Effekt auf die schadensinduzierte PCNA-Polyubiquitinierung. Einzig in Strategie A konnte eine möglicherweise schwächere Polyubiquitinierung beobachtet werden, die jedoch quantitativ schwer reproduzierbar war.

Interessanterweise konnte in Strategie A und B eine erhöhte basale PCNA-Monoubiquitinierung in *SHPRH*-defizienten Zellen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Monoubiquitinierung wäre ein negativer Einfluss von SHPRH auf die Monoubiquitinierung von PCNA. Wahrscheinlicher wäre jedoch, dass das Wegfallen der basalen Polyubiquitinierung zu einer erhöhten Monoubiquitinierung führt. Während des normalen Zellzyklus wird eventuell immer ein Teil des monoubiquitinierten PCNA polyubiquitiniert. Fällt dieser Schritt weg könnte sich eventuell der Anteil an monoubiquitinierten PCNA erhöhen. Dieses Modell wird durch Ergebnisse gestützt, die zeigen, dass die E3-Ligase CRL4^{Cdt2} synergistisch mit Rad18 für die basale Monoubiquitinierung von PCNA verantwortlich ist [210]. Es konnte auch gezeigt werden, dass CRL4^{Cdt2} in einem antagonistischen Gleichgewicht mit USP1 vorkommt, damit die basale Monoubiquitinierung nicht überhandnimmt [240]. Diese hätte eine zu hohe Rekrutierung von TLS-Polymerasen zur Folge und könnte damit zu einer erhöhten Mutagenese führen [210, 241, 242]. Daher könnte im Umkehrschluss eine basale Polyubiquitinierung von PCNA die Menge an monoubiquitiniertem PCNA ebenfalls verringern. Durch die verminderte PCNA-Monoubiquitinierung, sowie die Induktion der fehlerfreien DNA-Reparaturwege könnte eine Mutagenese ebenfalls verhindert werden.

Da bereits basal monoubiquitiniertes PCNA nur in geringer Menge in der Zelle vorkommt [210], ist es verständlich, dass die Di- und Triubiquitinierung von PCNA unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze im Westernblot liegt und deshalb auch in den Wildtyp-Zellen nicht klar detektierbar ist.

Des Weiteren muss bei der Auswertung der Daten darauf geachtet werden, dass mit der vorliegenden Westernblot-Methode nicht die PCNA-Polyubiquitinierung im eigentlichen Sinne, sondern nur die Di- und Triubiquitinierung nachgewiesen wird. Wie viele Ubiquitine

benötigt werden, damit es zur Aktivierung des fehlerfreien Wegs kommt, ist noch nicht bekannt. Somit kann es sein, dass der *en bloc* Transfer einer ganzen Ubiquitinkette [243] dazu führt, dass PCNA ein sehr hochmolekulares Gewicht erhält, welches jenseits der Nachweisbarkeit dieser Methode ist.

Eine veränderte basale Monoubiquitinierung und damit möglicherweise auch veränderte Polyubiquitinierung scheint unabhängig von der Ringdomäne zu sein, da die *Knockout*-Strategie C diesen Phänotyp nicht zeigte. Denkbar wäre ein dominant negativer Effekt des verkürzten Proteins gewesen. H. Ullrich und S. Jentsch stellten ein Modell auf, in dem Rad18 dimerisiert und Rad6 rekrutiert, um PCNA zu monoubiquitinieren. In einem nächsten Schritt verdrängt Rad5 eines der beiden Rad18-Proteine und rekrutiert über die RING-Domäne das Mms2/Ubc13-Heterodimer, wodurch PCNA polyubiquitiniert werden kann [144]. In diesem Modell würde die Δ RING-Mutante von SHPRH zwar ein Rad18-Molekül verdrängen, es käme aber dennoch zu keiner PCNA-Polyubiquitinierung, da die hierfür nötige RING-Domäne in SHPRH fehlt. Dadurch würde PCNA zwar monoubiquitiniert, aber nicht weiter polyubiquitiniert werden. Hierdurch würde sich die Menge an monoubiquitiniertem PCNA möglicherweise erhöhen, was jedoch in dem vorliegenden Versuch mit *Knockoutset C* nicht beobachtet wurde.

Zusammengenommen ist es interessant, dass eine erhöhte spontane PCNA-Monoubiquitinierung in den *SHPRH*-defizienten Zellen nachgewiesen werden kann, auch wenn die Polyubiquitinierung, eventuell wegen einem zu hohen molekularen Gesamtgewicht, nicht detektierbar ist. Die Ergebnisse deuten auf eine Funktion von SHPRH bei der Generierung von hochmolekularem PCNA während des normalen Zellzyklus hin. Dass hier SHPRH eine Rolle bei der Reparatur von oxidativem Stress spielt ist unwahrscheinlich, da ansonsten auch H₂O₂ hier einen Effekt zeigen müsste. Man muss jedoch bedenken, dass auch Replikationsintermediate zu einer spontanen Ubiquitinierung von PCNA führen können [148]. Auch andere endogene Schäden, wie zum Beispiel die spontane Hydrolyse der DNA, die immerhin zu 9 000 - 10 000 AP-Stellen pro Zelle/Tag führen kann [244-246], benötigen durchaus eine fehlerfreie Reparatur, um die genomische Stabilität der Zelle zu gewährleisten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass PCNA polyubiquitiniert wird, obwohl das zweite Rad5-Ortholog HLTF in den DT40-Zellen fehlt. Diese Beobachtung bestätigt ein früheres Ergebnis, wonach Krijger und Kollegen auch eine weitere E3-Ligase postulieren

[154]. Zusätzlich scheinen auch die anderen Funktionen von HLTF, die keine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen [247-249], während der Evolution des Huhns redundant geworden zu sein, so dass Hühner ohne HLTF überleben können.

Die Beteiligung einer weiteren E3-Ligase bei der PCNA-Polyubiquitinierung ist durchaus möglich, da man zurzeit davon ausgeht, dass das Säuger-Genom für mehr als 600 E3-Ligasen kodiert [250]. Trotzdem stellt sich die Frage, warum in einem solchen Prozess 3 redundante E3-Ligasen beteiligt sein sollten, wobei jedes Protein einzeln reguliert werden müsste. Eventuell reicht es aber aus, die Polyubiquitinierung durch eine Ubiquitin-spezifische Protease zu kontrollieren. Eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung von polyubiquitiniertem PCNA konnte hier bereits für USP1 gezeigt werden [251].

Wenn man jedoch den Einfluss von SHPRH auf die PCNA-Ubiquitinierung genauer betrachtet, so ist dieser sowohl schadensinduziert mit Strategie A (Abb. 2.13), als auch basal mit Strategie A und B eher marginal (Abb. 2.13 und 2.8).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob SHPRH tatsächlich ein Ortholog der E3-Ligase Rad5 in der Hefe ist. Bekräftigt werden diese Zweifel durch die geringe Nukleotid-Übereinstimmung von 26% mit Rad5 [157]. Nichtsdestotrotz bleibt SHPRH eine E3-Ring-Ligase, welche in einer Vielzahl von Tumoren dereguliert ist [172]. Eine detaillierte Untersuchung der Funktion von SHPRH ist daher sinnvoll.

Wenn man diese Ergebnisse zusammenfasst und davon ausgeht, dass SHPRH ein Rad5-Ortholog ist, könnte man vermuten, dass neben SHPRH und HLTF eine weitere E3-Ligase vorhanden ist, welche sich redundant zu den beiden Ligasen verhält. Es muss jedoch auch der Umstand in Betracht gezogen werden, dass SHPRH im physiologischen Kontext möglicherweise gar keine E3-Ligase von PCNA ist.

Da weder die Polyubiquitinierung von PCNA noch die daraus folgenden Phänotypen in eukaryotischen Zellen gut untersucht sind und die Anzahl an beteiligten E3-Ligasen offen ist, werden weitere Studien benötigt, um diesen Prozess besser zu verstehen. Hierbei ist besonders zu beachten, dass gerade die komplexe Funktionsvielfalt der E3-Ligasen und das vielfältige Zusammenspiel der verschiedenen E3-Ligasen für kommende Experimente einen wohl überlegten Modellorganismus voraussetzt, um die spezifische Funktion einer einzelnen Ligase analysieren zu können.

3.3 Funktion von SHPRH bei der Reparatur exogen und endogen induzierter DNA-Schäden

Vor der Zuordnung von SHPRH als E3-Ligase wurde das Protein als ein potentielles Tumorsuppressorgen identifiziert [172]. Daher lässt sich eine Funktion bei der Antwort auf DNA-Schäden vermuten. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, können exogen, über DNA-schädigende Agenzien wie MMS oder Cisplatin, Läsionen in die DNA eingeführt und anschließend das Überleben der Zellen untersucht werden.

Da MMS- und Cisplatin-induzierte Schäden unter anderem über die Basenexzisionsreparatur (BER) und den Rad6-Weg behoben werden [203, 252] und diese beiden Reparaturwege auch an der SHM beteiligt sind [2, 126, 174, 203], kann auch durch die Untersuchung der SHM die Beteiligung eines Proteins an einem Reparaturweg analysiert werden.

3.3.1 Einfluss von SHPRH bei der Schadensantwort nukleotidverändernder Agenzien

Motegi und Kollegen konnten zeigen, dass die Inaktivierung von *SHPRH* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber MMS führt [156], einem alkylierenden Agens, dessen Schäden vor allem durch die BER behoben werden [252], aber auch zur Aktivierung des Rad6-Weges führen [203]. Eine Funktion der E3-Ligase SHPRH bei der Schadensantwort auf MMS scheint folgerichtig zu sein, da auch die Rad5-defiziente Mutante in Hefe eine erhöhte MMS-Sensitivität aufweist [253, 254]. Trotzdem ist selbst dieser Phänotyp in Mauszellen widerlegt worden. Dabei zeigte der *SHPRH/HLTF-Doppelknockout* keine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS [154].

Auch in den vorliegenden Experimenten hatte die Expression von SHPRH trotz der drei verschiedenen *Knockout*-Strategien keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellkolonien in Anwesenheit von MMS. Hierbei muss angemerkt werden, dass in Polyubiquitinierungsversuchen mit MMS keine Di- und Triubiquitinierung von PCNA nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). In anderen Systemen hingegen war es möglich, eine Polyubiquitinierung von PCNA mit Hilfe von MMS zu induzieren [154]. Dabei wurden jedoch andere Zelllinien und/oder andere Methoden verwendet. Krijger und Kollegen gelang es, in *HLTF/SHPRH*-doppeltdefizienten MEFs die PCNA-Polyubiquitinierung zu induzieren, sie konnten aber nur eine sehr schwache Diubiquitinbande detektieren und

mussten hierfür die chromatingebundene Fraktion aus den Zellen isolieren [154]. Motegi und Kollegen konnten die Polyubiquitinierung zwar mit MMS induzieren, konnten diese jedoch nur mit Hilfe einer Immunpräzipitation (IP) nachweisen [155]. Hierbei ergibt sich jedoch das Problem, dass die PCNA-Polyubiquitinierung nur als diffuse breite Bande (Schmier) zu erkennen ist. Zudem ist es oft schwierig, IP-Versuche quantitativ zu reproduzieren [255, 256]. Somit scheint die Induktion der PCNA-Polyubiquitinierung durch MMS nur sehr schwach zu sein. Zusätzlich könnten zelltypspezifische Eigenschaften, sowie Unterschiede zwischen den Spezies eine Ursache für die unterschiedlichen Effekte von MMS darstellen [252, 257].

Um nicht nur den Einfluss von MMS auf das Überleben *SHPRH*-defizienter Zellen zu testen, wurde als weiteres Agens Cisplatin verwendet. Cisplatin führt zu DNA-Intrastrang- und DNA-Interstrang-Quervernetzungen und induziert damit räumliche Veränderungen in der DNA-Helix [258, 259]. Diese Abweichungen werden bevorzugt durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben, was durch eine erhöhte Cisplatin-Sensitivität von Krebszellen mit Defekten in diesem Reparaturweg bestätigt wird [260, 261]. Ein weiterer Grund für die Verwendung von Cisplatin ist ein besonders starker Effekt auf Mutationen in Komponenten des Rad6-Signalweges [203], welcher auch das Rad5-Ortholog *SHPRH* beinhaltet. Wider Erwarten zeigten auch mit diesem Chemotherapeutikum die Zellen, in denen *SHPRH* mit verschiedenen *Knockout*-Strategien inaktiviert wurde, keine verminderte Koloniebildung in den Überlebensexperimenten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Experimenten in der Hefe *S. pombe*. Hier konnte gezeigt werden, dass Rad5-defizienten Zellen eine erhöhte Cisplatin-Sensitivität aufwiesen [262]. Andererseits werden die Ergebnisse in den DT40-Zellen durch Überlebensexperimente mit *SHPRH/HLTF*-doppeltdefizienten MEFs gestützt, die ebenfalls keine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin zeigten [154]. Der *Knockout* von Ubc13 wiederum führt zu einer stark erhöhten Sensitivität gegenüber einer Vielzahl von DNA-schädigenden Substanzen, unter anderem auch Cisplatin [180]. Da Ubc13 für die Polyubiquitinierung von PCNA im Rad6-Weg benötigt wird [124, 144], stellt sich die Frage, welche Funktion *SHPRH* im Rad6-Weg hat. Entweder ist *SHPRH* keine E3-Ligase, die für die PCNA-Ubiquitinierung verantwortlich ist, oder deren Funktion ist durch eine weitere E3-Ligase redundant. Um diese Frage zu beantworten sind weitere Versuche nötig, um entweder das richtige Substrat von *SHPRH* oder die zusätzliche E3-Ligase zu identifizieren.

3.3.2 Einfluss von SHPRH auf die somatische Hypermutation

DNA-Schäden entstehen nicht nur durch toxische Agenzien und ionisierende Strahlung. Auch endogene Prozesse wie die SHM induzieren Läsionen die durch verschiedene Reparaturwege behoben werden. Daher kann die genaue Untersuchung der SHM weitere Einblicke in die Funktion von SHPRH geben.

Frühere Studien in der Hefe [124], in DT40-Zellen [126, 174, 209], in humanen Zellen [132], sowie *in vivo* Studien in der Maus [175] zeigten eine Interaktion von monoubiquitiniertem PCNA mit verschiedenen TLS-Polymerasen, die bei der somatischen Hypermutation eine wichtige Rolle spielen. Fällt dieser Reparaturweg ganz oder teilweise weg, sei es durch das Entfernen der E3-Ligase Rad18, die Mutation der Ubiquitinbindestelle am Lys164 in PCNA oder dem Entfernen von TLS-Polymerasen, kommt es zu einer veränderten somatischen Hypermutation [126, 174, 175, 263].

In diesen vorhergegangenen Studien wurde jedoch nur der Einfluss einer verminderten Monoubiquitinierung durch das Entfernen von Rad18 oder einer ganz wegfallenden Ubiquitinierung durch die PCNA^{K164R}-Mutante untersucht. Dabei wurden die Effekte nur der PCNA-Monoubiquitinierung zugeschrieben, ohne zu beachten, dass auch die PCNA-Polyubiquitinierung stark vermindert oder komplett inhibiert ist. Zwar konnte später gezeigt werden, dass in Zellen mit verminderter SHPRH-Expression die Mutagenese steigt [155], aber andererseits zeigen Ubc13-heterozygote Zellen keinen Einfluss auf die somatische Hypermutation [181]. In Mauszellen führte der *Doppelknockout* von *SHPRH* und *HLTF* ebenfalls zu keiner veränderten somatischen Hypermutation [154].

In der vorliegenden Arbeit wurde die SHM über einen IgM-Verlust-Experiment bestimmt, in dem die Zellen im Anfangszustand ein funktionelles Oberflächen-IgM exprimieren. Durch die stetige SHM können Mutationen in die VJ-Gene eingefügt werden, die zu Stopp-Kodons oder *nonsense*-Mutationen führen. Als Folge kann das Oberflächen-IgM nicht mehr exprimiert werden. Der Wechsel von IgM-positiv zu -negativ korreliert also in einem gewissen Maß mit der Frequenz der SHM-Ereignisse. Dieser Versuchsansatz zeigte keinen oder nur einen schwachen Unterschied zwischen den Wildtyp und den *SHPRH*-defizienten Zellen, unabhängig davon, ob *SHPRH* mit Strategie A in nur einem Allel, mit Strategie B komplett oder mit Strategie C die RING-Domäne inaktiviert wurde. Mit diesem experimentellen Ansatz kann zwar die Rate der SHM gemessen werden, er gibt jedoch

keinen Rückschluss auf die Art der Mutationen. Somit können beispielsweise auch Deletionen zu einer fehlenden Oberflächenexpression von IgM führen [174].

Um den komplexen Vorgang der Hypermutation näher zu untersuchen, wurde das VJ-Segment des λ -Lokus der leichten Kette sequenziert. Es wurde der Versuchsansatz mit der *Knockout*-Strategie B gewählt, da hier bereits ein Effekt auf die basale PCNA-Monoubiquitinierung beobachtet werden konnte und diese Zellen eine erhöhte Etoposid-Sensitivität aufwiesen. Eine erhöhte Kultivierungszeit war notwendig, um eine ausreichende Anzahl von Mutationsereignissen für die Auswertung zu erhalten. Mit Hilfe der Sequenzierung kann die Veränderung einzelner Basen und deren Frequenz genauer untersucht werden. Konsistent mit den Daten aus den Überlebensversuchen, die zeigen, dass SHPRH keine Funktion bei der Reparatur von Nukleotidveränderungen hat, konnte auch kein Einfluss bei der Reparatur der AID-induzierten Läsionen während der somatischen Hypermutation beobachtet werden. Dieses Ergebnis widerspricht zumindest einer Veröffentlichung [155], wobei die SHM nur in einem IgM-Expressions-Versuch in Ramos-Zellen untersucht wurde und SHPRH sowie HLTF nur einzeln durch siRNA herunterreguliert wurden. Jedoch sind die vorliegenden Ergebnisse konsistent mit einer Publikation, die in *SHPRH*- und *HLTF*-doppeltdefizienten Mauszellen keinen Effekt auf die SHM nachweisen konnte [154].

Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze; zum einen die bereits erwähnte Redundanz mit einer möglicherweise noch nicht beschriebenen E3-Ligase [154], zum anderen der fehlende Effekt von SHPRH in mehreren Polyubiquitinierungs-Experimenten. Zu bedenken ist zudem, dass wohl nur ein Bruchteil, wahrscheinlich unter zehn Prozent, des monoubiquitinierten PCNA polyubiquitiniert vorliegt (Abb. 2.8). Wenn man davon ausgeht, dass der Effekt von polyubiquitiniertem PCNA auch nur weniger als ein Zehntel ausmacht, sind daraus folgende Effekte auf Prozesse wie die SHM so gering, dass sie mit den angewandten Methoden eventuell nicht detektierbar sind.

Ein möglicher Ansatz wäre eine Ubiquitin-Lys63-Mutante zu verwenden. Diese Bindestelle ist für die Etablierung der Polyubiquitinkette nötig, während eine Monoubiquitinierung weiterhin möglich wäre. Experimente in der Hefe zeigen, dass diese Mutation zu einer erhöhten MMS- und UV-Sensitivität führt, aber keinen Einfluss auf das Überleben nach γ -Bestrahlung hat [264]. Dieser Ansatz ist jedoch nicht sehr spezifisch, da auch andere Proteine wie z.B. NEMO (*NFkB essential modulator*) mit Lys63-verknüpften

Ubiquitinketten interagieren [265]. Somit wäre ein möglicher Effekt nicht unbedingt der fehlenden PCNA-Polyubiquitinierung zuzuordnen, sondern er könnte auch ein unerwünschter Nebeneffekt sein. Daher sind weitere Studien nötig, um die richtige E3-Ligase für die schadensinduzierte Polyubiquitinierung von PCNA zu finden, wofür ein geeignetes Zellsystem gefunden werden müsste, um deren Funktion zuverlässig untersuchen zu können.

3.4 Einfluss von SHPRH auf die Doppelstrangbruchreparatur

In früheren Studien wurde der Einfluss von SHPRH auf die Doppelstrangbruchreparatur nicht untersucht [153-157]. Für das Rad5-Ortholog aus der Hefe hingegen konnte eine solche Studie eine erhöhte Sensitivität von Rad5-defizienten Zellen gegenüber γ -Strahlung aufzeigen [197], wobei ursprünglich nur bekannt war, dass Rad5 die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch das NHEJ verhindert [266]. Es ist zu bedenken, dass der Mechanismus des Matrizenwechsels zum Schwesterchromatid, der durch die Polyubiquitinierung von PCNA eingeleitet wird, homologievermittelt ist. Die initialen Schritte bei diesem Prozess ähneln der HR stark [267].

Für HLTF konnte bereits gezeigt werden, dass es eine Funktion bei dem homologievermittelten Matrizenwechsel besitzt, welcher jedoch unabhängig von Rad51 ist [268]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von SHPRH auf die Doppelstrangbruchreparatur mit Hilfe verschiedener Versuchsansätze genauer untersucht.

3.4.1 Funktion von SHPRH nach der exogenen Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Den stärksten Phänotyp auf das Überleben zeigte der *SHPRH-Knockout* gegenüber Etoposid, ein Chemotherapeutikum, welches die Topoisomerase II (Top II) inhibiert. Dieses Agens stabilisiert den Komplex, der fähig ist die DNA zu schneiden, und kann dadurch Doppelstrangbrüche verursachen [269]. Top II-Inhibitoren führen vor allem in der mitotischen Phase zu Doppelstrangbrüchen, in einer Phase in der sowohl die HR als auch das NHEJ zur Verfügung stehen [217].

Eine erhöhte Sensitivität gegenüber Etoposid zeigte sich jedoch nur bei der *SHPRH-Knockout*-Strategie B und besonders eindeutig bei der Strategie A, wohingegen Strategie C denselben Phänotyp wie der Wildtyp aufwies. Daraus lässt sich schließen, dass die RING-Domäne von SHPRH bei diesem Prozess wahrscheinlich keine Rolle spielt. Dies ist ein interessanter Aspekt, da bei dem Rad5-Protein Mutationen in der Ringdomäne zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Strahlung [198], sowie γ -Strahlung führen [197], auch wenn diese nicht so stark ist, wie bei der Inaktivierung des gesamten Proteins. Dass es sich bei dem Phänotyp nicht nur um einen Nebeneffekt von Etoposid handelt, zeigt die Behandlung mit Doxorubicin. Im Gegensatz zu Etoposid ist Doxorubicin nicht nur ein Top II-Inhibitor, sondern die Zelle wird zusätzlich durch die Bildung von Sauerstoffradikalen getötet [217]. Die erhöhte Sensitivität gegenüber diesem Agens ist zwar nicht ganz so stark wie bei Etoposid, trotzdem bestätigt sie die vorhergegangenen Ergebnisse.

Um Doppelstrangbrüche (*double-strand break*, DSB) zu beheben gibt es zwei verschiedene und kompetitive Reparaturwege, das NHEJ und die HR [270]. Das NHEJ ist in allen Zellzyklusphasen vorhanden und behebt etwa 80% der DSB in humanen Zellen [270]. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass das NHEJ den Doppelstrangbruch sehr schnell repariert und ohne ein homologes Schwesterchromatid auskommt [18]. Als Nachteil des NHEJ wird oftmals eine erhöhte Fehlerrate genannt [271]. Dabei zeigen neue Ergebnisse, dass das NHEJ in das klassische NHEJ und das alternative NHEJ unterteilt werden muss. In diesem Modell wird der DSB über den klassische Weg weitgehend fehlerfrei repariert und nur der alternative Weg, der die Verknüpfung des DSBs über Mikrohomologien vermittelt, ist potentiell fehlerbehaftet [271-273]. Die HR benötigt für die Reparatur die Information des homologen Schwesterchromatids als Matrize. Dadurch ist dieser Reparaturweg zwar fehlerfrei, kann aber nur in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus stattfinden [274]. Außerdem besitzt er eine langsamere Kinetik und ist energieaufwändiger [270].

Um zwischen NHEJ und HR zu unterscheiden, kann in manchen Fällen Camptothecin verwendet werden. Zellen mit Mutationen in Komponenten des NHEJ sind besonders resistent gegenüber dieser Droge, wohingegen Deregulationen in der HR zu einer erhöhten Sensitivität führen [217, 218]. Ein mögliches Modell für diese Beobachtung stellten Adachi und Kollegen auf. Top I-Komplexe können zusammen mit einem Einzelstrangbruch während der Replikation oder durch einen weiteren Einzelstrangbruch in der Nähe zu einem Doppelstrangbruch prozessiert werden. Dabei entstehende freie

DNA-Enden können über die HR fehlerfrei repariert werden, wohingegen das NHEJ zu nachteiligen fehlerhaften Verknüpfungen führen kann, die Deletionen und somit eventuell den Zelltod verursachen können [275].

Für die *SHPRH-Knockout*-Zellen konnte jedoch keiner der beiden Effekte beobachtet werden. Dies ist durchaus möglich, da nicht jeder *Knockout* gleichstark auf eine Droge reagiert. So zeigen zum Beispiel der *Knockout* der Ligase IV eine sehr starke Resistenz gegenüber Camptothecin, wohingegen der von RAP80 einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp aufweist, obwohl beide Komponenten im NHEJ-Reparaturweg wirken [217]. Zwar wurde in der Hefe gezeigt, dass Camptothecin keine Aktivierung der PCNA-Ubiquitinierung initiiert [276], jedoch kann auf Grund der vorhergehenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, dass SHPRH mit seinen vielen Domänen zusätzliche Funktionen bei der DSB-Reparatur besitzt.

Durch den Einsatz von Camptothecin konnte SHPRH weder eine Funktion in der HR noch im NHEJ zugewiesen werden, weswegen weitere experimentelle Ansätze nötig sind.

3.4.2 Funktion von SHPRH nach der Bestrahlung von Zellen

Neben dem Einsatz von Top I-Inhibitoren ist die radioaktive Bestrahlung von Zellen eine häufig genutzte Methode, um Doppelstrangbrüche in die DNA-Helix einzufügen. Dabei kommt es durch die ionisierenden Strahlen unter anderem zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA [277]. Für Rad5 konnte eine zusätzliche Funktion bei der Reparatur von strahlungsinduzierten Schäden nachgewiesen werden. Mutationen in der RING-Domäne zeigten nur einen intermediären Phänotyp auf das Überleben der Zellen, wohingegen der *Rad5-Knockout* eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber Bestrahlung aufwies [197]. In den *SHPRH*-defizienten DT40-Zellen konnte keine erhöhte Sensitivität gegenüber γ -Bestrahlung festgestellt werden. Hierfür kann es verschiedene Erklärungen geben.

Erstens unterscheiden sich die letalen Strahlendosen zwischen den zwei Organismen stark voneinander, mit bis 500 Gy in der Hefe und bis 8 Gy in den DT40-Zellen. Zweitens muss im direkten Vergleich dieser zwei Versuche beachtet werden, dass Etoposid der Methylzellulose beigemischt wird, wodurch die Zellen unter ständigem Selektionsdruck stehen, die Bestrahlung jedoch nur einmalig stattfindet. Und schließlich können sich Effekte des NHEJ und der HR gegenseitig aufheben. So konnte gezeigt werden, dass beide

Reparaturwege sich unter bestimmten Bedingungen kompensieren können, wobei ein Weg für den anderen einspringen kann [278]. Dadurch kann ein Effekt schwer nur der HR oder nur dem NHEJ zugeordnet werden [278].

Allerdings bietet gerade die Bestrahlung eine Möglichkeit, zwischen der HR und dem NHEJ zu unterscheiden. Durch das Arretieren der Zellen in der G1-Phase durch einen doppelten Thymidin-Block steht der Zelle kein Schwesterchromatid für die Reparatur zur Verfügung [279]. Wird die Zelle zu diesem Zeitpunkt bestrahlt, kann der Schaden nur durch das NHEJ behoben werden [279]. Obwohl die Bestrahlung von nicht synchronisierten Zellen keinen Effekt zeigte, könnte das Arretieren der Zellen einen Phänotyp verstärken, da die Zelle bei Defekten im NHEJ in einer sensitiveren Phase geschädigt werden würde. Aus diesem Grund wurde dieser Versuchsaufbau auch mit den DT40-Cre1-Zellen durchgeführt. Die Zellen konnten erfolgreich in der G1-Phase arretiert werden, jedoch zeigten die *SHPRH*-defizienten Zellen bei diesem Ansatz ein ähnliches Überleben wie die Wildtyp-Zellen. Auch hier muss berücksichtigt werden, dass eventuell eine einmalige Schädigung der DNA nicht ausreicht, um den Phänotyp, der mit Etoposid erreicht wurde, auszulösen.

Zusammengefasst konnte auch durch das Arretieren der Zellen und eine darauf folgende Bestrahlung nicht geklärt werden, ob *SHPRH* eine Funktion bei der HR oder dem NHEJ besitzt. Es gibt jedoch weitere experimentelle Ansätze, um zwischen diesen beiden Reparaturwegen zu unterscheiden.

3.4.3 Die gerichtete Integration von Gen-Targeting-Vektoren in das Genom von DT40-Zellen

Die DSB-Reparatur kann nicht nur mit Hilfe von Überlebensversuchen untersucht werden, sondern spielt auch bei anderen Prozessen in der Zelle eine wichtige Rolle. Die gerichtete Integration von Gen-Targeting-Konstrukten in das Genom ist eine wichtige Methode, um Gene in Mausstammzellen zu entfernen und daraus *Knockout*-Tiere zu generieren. Dies geschieht homologievermittelt durch die HR, wobei die Effizienz dieser Methode mit 0,2% sehr gering ist [280]. Die DT40-Zelllinie hingegen integriert Gen-Targeting-Konstrukte mit einer Effizienz von bis zu 80% gerichtet ins Genom [189]. Dieser Vorteil wird genutzt, um in den Zellen gezielt Gene zu inaktivieren.

Aber die Effizienz der gerichteten Integration kann auch verwendet werden, um ein Ungleichgewicht zwischen NHEJ und HR zu untersuchen [191]. Hierfür wird ein

Genkonstrukt mit einer Resistenz in die Zellen transfiziert. Wenn resistente Zellen das Genkonstrukt integriert haben, kann über eine PCR die gerichtete Integration nachgewiesen werden. Alle anderen Klone haben das Konstrukt über das NHEJ ungerichtet im Genom integriert. Mutationen die das NHEJ beeinflussen, wie *Ku70-Knockouts*, weisen auf Grund der verringerten ungerichteten, eine erhöhte gerichtete Integration auf [220]. Defekte in der HR zeigen den gegenteiligen Effekt und führen zu einer verminderten gerichteten Integration [181, 191, 214, 281].

Der *SHPRH-Knockout* zeigte eine leicht erhöhte gerichtete Integration der *Knockout*-Konstrukte, was ein weiterer Hinweis auf einen Einfluss von SHPRH bei der DSB-Reparatur ist. Das Fehlen des Proteins führte also eventuell zu einer leicht erhöhten Aktivität der HR oder verminderten Aktivität des NHEJ. Dieser Effekt war jedoch gering, da selbst die Untersuchung von 100 resistenten Klonen kein signifikantes Ergebnis lieferte.

Die erhöhte Rate der gerichteten Integration, sowie die erhöhte Etoposid-Sensitivität deuten beide auf einen Einfluss von SHPRH bei der Doppelstrangbruchreparatur hin. Während die erhöhte gerichtete Integration von *Gen-Targeting*-Konstrukten jedoch auf eine verbesserte HR hinweist, könnte die höhere Sensitivität gegenüber Etoposid sowohl einem Defekt in der HR, als auch in dem NHEJ zugeschrieben werden [217].

Durch die Ergebnisse verschiedener experimenteller Ansätze mehren sich die Hinweise, dass SHPRH eine Funktion bei der DSB-Reparatur hat und die Balance zwischen HR und NHEJ verschiebt. Eine eindeutige Zuweisung zu einem der beiden Reparaturprozesse ist an dieser Stelle jedoch nicht möglich. Dementsprechend konnte weder Camptothecin, noch die Bestrahlung von synchronisierten Zellen oder die Untersuchung der Frequenz der gerichteten Integration von Vektoren eine Tendenz zu einem der beiden Reparaturwege zeigen. Um dieses Phänomen genauer zu prüfen, sollte in DT40-Cre1-Zellen die Ig-Genkonversion untersucht werden, da dieser Prozess weitere Einblicke in die Funktionalität der HR geben kann.

3.4.4 SHPRH und die Ig-Genkonversion, ein Prozess dem die HR zu Grunde liegt

Sowohl die Überlebensversuche, als auch die Untersuchung der gerichteten Integration konnten SHPRH weder eine Funktion im NHEJ noch in der HR eindeutig zuweisen. Daher sollte ein weiterer Prozess untersucht werden, der hierüber Aufschluss geben könnte.

Bei der Ig-Genkonversion werden aus den stromaufwärts liegenden Pseudo-V-Genen (Ψ V-Gene) Fragmente in das umgelagerte VJ-Segment eingefügt [282]. Genau wie bei der SHM und dem Klassenwechsel wird AID für diesen Prozess benötigt [55], wobei es hier zu Doppelstrangbrüchen kommt, die aber im Gegensatz zum Klassenwechsel nicht über das NHEJ, sondern über die HR prozessiert werden [50].

Mit Hilfe des IgM-Reversions-Assays konnte die Genkonversionsrate der *SHPRH*-defizienten Klone untersucht werden. Es konnte jedoch kein Einfluss von *SHPRH* auf die Reexpression von Oberflächen-IgM beobachtet werden (Abb. 2.16). Mit diesem Versuchsansatz können aber keine Details zu dem Mechanismus der HR, welcher die Grundlage der Ig-Genkonversion darstellt, nachgeprüft werden. Dafür wurde die VJ-Region der leichten Kette sequenziert und Veränderungen genau analysiert. Mit Hilfe der Datenbank von *Reynaud* [52] und der *Geneious* Software konnte die veränderte Sequenz einem bestimmten Ψ V-Gen zugewiesen werden, es konnten aber auch die Länge der Genkonversionsereignisse sowie Punktmutationen zwischen dem *Knockout* und dem Wildtyp verglichen werden.

Die absolute Anzahl an Genkonversionsereignissen unterschied sich nicht zwischen *SHPRH*-defizienten und -profizienten Zellen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, denn hierbei handelte es sich um jene Ereignisse, die im IgM-Revertierungs-Assay mittels FACS-Analyse gemessen wurden. Bei genauer Betrachtung der Gesamtzahl an Nukleotidsubstitutionen (Abb. 2.17) fällt jedoch auf, dass diese in den *SHPRH*-defizienten Zellen signifikant erhöht ist. Teilt man die Nukleotidveränderungen dem Mechanismus zu, bei dem sie entstanden sind, erkennt man, dass die Erhöhung fast ausschließlich durch die Genkonversionsmutationen entstanden ist. Untersucht man nun die Traktlänge der Genkonversionsereignisse, zeigt sich sowohl bei der minimalen, als auch bei der maximalen Traktlänge eine leicht erhöhte Länge der Trakte in den *SHPRH-Knockout* Zellen. Der Unterschied zu den Wildtypzellen ist jedoch nicht signifikant. Bei einem solch kleinen Unterschied müsste die Probenanzahl stark erhöht werden, um ein deutlicheres und möglicherweise signifikantes Ergebnis zu erhalten.

Eine erhöhte Traktlänge ist interessant, da z.B. ein Fehlen der Pol η zu durchschnittlich längeren Trakten in der Ig-Genkonversion führt [283], wohingegen der *Rad18-Knockout* in DT40-Zellen bedingt, dass sich die Genkonversions-Traktlängen verkürzen [284]. Zunächst scheint diese Beobachtung widersprüchlich, da die Pol η durch die Monoubiquitinierung

von PCNA an die Schadenstelle rekrutiert wird, um dort über die Läsion zu replizieren [285]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Pol η auch Rad18-unabhängig zur blockierten Replikationsgabel rekrutiert werden kann [286].

Für die Ig-Genkonversion ist es jedoch wahrscheinlich ausschlaggebend, dass beide Proteine neben der PRR eine Funktion bei der HR haben. So interagiert die Pol η mit der Rad51-Rekombinase, wobei Rad51 die Pol η -vermittelte Verlängerung des *D-Loop* stimuliert [287]. Durch die zusätzliche Funktion in der HR führt ein *Knockout* der Pol η zu einer verminderten Genkonversionsrate [283]. Für Rad18 konnte gezeigt werden, dass es für eine ordnungsgemäße Durchführung der Ig-Genkonversion nötig ist [284]. Diese Ergebnisse hin, dass Proteine, die einen Einfluss auf die DSB-Reparatur haben auch eine Rolle bei der Ig-Genkonversion haben können.

Ebenso konnte für Chk1 (*checkpoint kinase 1*) gezeigt werden, dass diese eine Funktion bei der HR hat und dabei mit Rad51 interagiert [288]. Auch hier führt die Funktion von Chk1 bei der HR wahrscheinlich dazu, dass eine verminderte Chk1-Expression zu einer niedrigeren Genkonversionsrate und auch zu kürzeren Traktlängen führt [214, 289].

Neben den oben genannten Faktoren muss vor allem der Einfluss der zwei Haupt-Reparaturwege bei DSB auf die Ig-Genkonversion betrachtet werden. Werden Faktoren der HR entfernt, reduziert sich die Rate der Ig-Genkonversion [230] und kommt sogar ganz zum Erliegen, wenn etwa das Rad51-Paralog XRCC2 entfernt wird [221].

Fehlen hingegen Faktoren des NHEJ, wie die DNA-PK α oder Ku70, erhöht sich die Ig-Genkonversionsrate. Möglicherweise werden als Folge des fehlenden NHEJ viele AID-induzierte DSB durch die HR repariert und dadurch wird ein Großteil der Läsionen zu einem Genkonversionsereignis prozessiert [229].

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so haben Proteine, die direkt an der DSB-Reparatur beteiligt sind, einen starken Einfluss auf die Ig-Genkonversion. Für andere Proteine, die nur eine untergeordnete oder auch regulatorische Rolle bei einem der Prozesse spielen, fallen die Effekte bei Weitem geringer aus, ähnlich wie bei SHPRH.

Sollte SHPRH ein Ortholog von Rad5 sein, würde zumindest die Funktion bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen für die beiden Proteine übereinstimmen [197]. Die Funktion von SHPRH bei der DSB-Reparatur wird von einer sehr aktuellen Studie gestützt, die mit einem weiteren *SHPRH-Knockout* in DT40-Zellen einen negativen Einfluss von HDAC-Inhibitoren (Histon Deacylase) auf das Überleben von *SHPRH*-defizienten Zellen

nachgewiesen hat [290]. Dabei konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren das NHEJ zwar hochregulieren, aber nur Zellen mit Mutationen in Proteinen die an der HR beteiligt sind eine erhöhte Sensitivität aufweisen. Kritisch zu beurteilen ist, dass der Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf den *Knockout* von SHPRH in MEFs nicht reproduziert werden konnte. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass nicht zwangsläufig eine andere Spezies für das Ausbleiben des Effektes verantwortlich sein muss, sondern dass bereits verschiedene humane Tumore sehr unterschiedlich auf HDAC-Inhibitoren reagieren können [291].

Die Ergebnisse zur Ig-Genkonversion könnten ein zusätzlicher Hinweis auf eine Funktion von SHPRH bei der DSB-Reparatur sein. Zwar ist die Ig-Genkonversionsrate nicht beeinflusst, es kann aber spekuliert werden, ob die Erkennung oder das Vermeiden von Fehlpaarungen im *SHPRH-Knockout* beeinträchtigt ist. Dadurch könnten auch längere Trakte entstehen, da eine Fehlpaarung während der Ig-Genkonversion eher toleriert wird. Dies könnte eventuell auch das verminderte Überleben unter dem Einfluss von Etoposid erklären, wobei viele DSB in den *SHPRH*-defizienten Zellen durch die HR ungenauer repariert worden wären. Auch bei der gerichteten Integration von Vektoren könnte eine gewisse Fehlertoleranz möglicherweise zu einer erhöhten Integration führen, wobei eine zu große Toleranz möglicherweise auch zu einer ungerichteten Integration führen könnte. Ob mit einer erhöhten Toleranz von Fehlpaarungen allein der recht eindeutige Effekt auf die Behandlung mit Etoposid erklärt werden kann, oder ob SHPRH zusätzlich auch einen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen HR und NHEJ ausübt, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Die Tabelle 3.1 zeigt eine Zusammenfassung der Effekte von SHPRH auf die in dieser Arbeit untersuchten Prozesse. Aus den Experimenten geht hervor, dass vor allem die Funktion bei der PCNA-Ubiquitinierung nur marginal ist und auch der Einfluss auf die PRR gering ausfällt.

Der Einfluss auf die DSB-Reparatur fällt deutlicher aus, was vor allem dem starken Effekt von Etoposid auf das Überleben der Zellen zuzuschreiben ist. Die gerichtete Integration von *Gen-Targeting*-Vektoren, sowie die detaillierte Untersuchung der Ig-Genkonversion bestätigen diese These. Weitere Versuchsansätze, wie die Bestrahlung nach der Synchronisation der Zellen oder der Einfluss von Camptothecin, konnten SHPRH aber weder eine Funktion in der HR noch im NHEJ eindeutig zuweisen.

Insgesamt betrachtet ist es sehr wahrscheinlich, dass SHPRH eine Funktion bei der DSB-Reparatur hat, es sind aber weitere Experimente nötig, um diese Beobachtung zu bestätigen, den dahinter stehenden Mechanismus zu erklären und möglicherweise weitere Funktionen von SHPRH zu finden.

Tab. 3.1 Übersicht der *SHPRH-Knockout*-Strategien und die daraus resultierenden Effekte

	DT40- Ψ V ⁻ Strategie A	DT40-Cre1 Strategie A	DT40- Ψ V ⁻ Strategie B	DT40- Ψ V ⁻ Strategie C
Allele entfernt	1	2	2	2
SHPRH-Protein	-	Keine Expression	Keine Expression	Verkürztes Protein
PCNA-Mono-Ubiquitinierung Nach DNA-Schädigung	-	Leicht erhöhte basale Mono-ubiquitinierung	Leicht erhöhte basale Mono-ubiquitinierung	Kein Effekt
PCNA-Di-/Tri-Ubiquitinierung Nach DNA-Schädigung	-	Möglicherweise leicht vermindert	Kein Effekt	Kein Effekt
MMS- / Cisplatin-Überleben	-	Kein Effekt	Kein Effekt	Kein Effekt
Etoposid-Überleben	Leicht erhöhte Sensitivität	Erhöhte Sensitivität	Leicht erhöhte Sensitivität	Kein Effekt
Doxorubicin-Überleben	-	Moderat erhöhte Sensitivität	-	-
Somatische Hypermutation	Kein klarer Effekt	-	Kein Effekt	Kein Effekt
Ig-Genkonversion	-	Erhöhte Nukleotid-Substitution; leicht erhöhte Traktlänge	-	-
Gerichtete Integration von Gen-Targeting-Vektoren	-	Leicht erhöht	-	-

3.5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktionen von SHPRH, einem potentiellen Rad5-Ortholog aus der Hefe untersucht. Hierfür wurde gezielt die DT40-Zelllinie verwendet, da in dieser das weitere Rad5-Ortholog HLTF nicht gefunden und somit SHPRH fokussiert analysiert werden konnte. Da die Funktion von SHPRH in verschiedenen Studien gegensätzlich beschrieben wurde, sollte SHPRH, ausgehend von Ergebnissen aus Rad5-*Knockout*-Experimenten, mit Hilfe von drei verschiedenen *Knockout*-Strategien entfernt werden. Ziel war es, die Folge der kompletten *SHPRH*-Inaktivierung (Strategie A), die Inaktivierung mehrerer funktioneller Domänen (Strategie B) sowie die Wegnahme der RING-Domäne (Strategie C) zu untersuchen.

In der Hefe ist die E3-Ligase Rad5 für die Polyubiquitinierung von PCNA und den damit einhergehenden Matrizenwechsel verantwortlich [124]. Als Ortholog sollte SHPRH eine ähnliche Funktion wie Rad5 ausüben. Trotz einer deutlich stärkeren Induktion der PCNA-Ubiquitinierung durch H₂O₂ konnte mit diesem neuen Versuchsansatz kein eindeutiger Effekt von SHPRH auf die PCNA-Polyubiquitinierung nachgewiesen werden. Beobachtet wurde ein möglicher Einfluss auf die basale PCNA-Ubiquitinierung, dieser ist jedoch marginal und könnte auch die Nachweisgrenze des experimentellen Aufbaus darstellen. Ein Wegfallen der PCNA-Polyubiquitinierung ist mit diesem Versuchsansatz aber nachweisbar und durch die PCNA^{K164R}-Mutante bestätigt. Ein quantitatives Ergebnis hingegen ist wahrscheinlich nur schwer reproduzierbar. Eine Funktion von SHPRH bei der Polyubiquitinierung wird damit weniger wahrscheinlich, es sei denn diese Aufgabe könnte auch durch eine redundante E3-Ligase übernommen werden.

In Rad5-Experimenten konnte für den *Knockout* des Proteins eine erhöhte Mutationsfrequenz bzw. erhöhte Apoptose nachgewiesen werden, wobei aber auch Mutationen in der RING-Domäne alleine wenigstens einen intermediären Effekt bewirkten [197, 198]. Angelehnt an diese Experimente wurde in *SHPRH*-defizienten Zellen das Überleben nach DNA-Schädigung, sowie die SHM untersucht. Für die nukleotidverändernden-Agenzien wie MMS und Cisplatin konnte kein Effekt von SHPRH gezeigt werden, was im Fall von MMS im Gegensatz zu einer veröffentlichten Studie steht [156].

In keinen der vorangegangenen Experimente wurde der Einfluss von SHPRH auf die Reparatur von DSB untersucht, obwohl dieser für den Rad5-*Knockout* und in verminderter

Form für die RING-Mutante gezeigt werden konnte [197]. Eine Funktion bei der DSB-Reparatur ließ sich für SHPRH mit drei verschiedenen Versuchsansätzen nachweisen. I) Das Überleben unter dem Einfluss von Etoposid, II) die gerichtete Integration von Gen-*Targeting*-Konstrukten und III) die Ig-Genkonversion, wobei in der DT40-Zelllinie die RING-Domäne unter dem Einfluss von Etoposid keine Funktion mehr zu haben scheint. Bekräftigt wird diese Beobachtung durch eine sehr aktuelle Studie mit HDAC-Inhibitoren, welche auch eine Funktion von SHPRH bei der DSB-Reparatur zeigt [290].

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass SHPRH unter anderem einen Einfluss auf die DSB-Reparatur hat, was konsistent mit Untersuchungen aus der Hefe für Rad5 ist. Welcher Mechanismus hierfür verantwortlich ist, konnte trotz verschiedener Ansätze nicht ausgemacht werden, obwohl sich die Hinweise mehren, dass es zu einer erhöhten Toleranz von Basen-Fehlpaarungen bei der HR kommt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass ein Protein mit so vielen funktionellen Domänen mehr als nur eine Aufgabe übernehmen kann. Dass diese Domänen dabei auch nicht immer die für sie typische Funktion innehaben, zeigen Machado und Kollegen, welche die PHD-Domäne von SHPRH genau analysiert haben. Dabei konnten sie keine Interaktion der PHD-Domäne mit verschiedenen Peptiden des Histon-H3-Schwanzes mit unterschiedlichen Methylierungszuständen des K4 (Lysin4) finden [292], obwohl dies typisch für diese Domäne gewesen wäre [237].

Zusammengefasst konnten einige Funktionen von SHPRH in der DT40-Zelllinie nicht bestätigt werden, wobei zu bedenken ist, dass bei einer Anzahl von 600 E3-Ligasen im Menschen [293] auch im Huhn eventuell eine Redundanz mit einer anderen E3-Ligase vorliegt. Trotzdem konnte eine neue und mit Rad5 konsistente Funktion von SHPRH bei der DSB-Reparatur gefunden werden.

3.6 Ausblick

SHPRH wurde als Ortholog der E3-Ligase Rad5 entdeckt, welche für die schadensinduzierte Polyubiquitinierung von PCNA verantwortlich sein soll. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass SHPRH eine Rolle bei der basalen Ubiquitinierung von PCNA spielt. Damit ist das Rätsel um eine für die Polyubiquitinierung von PCNA zuständige E3-Ligase trotz langer Suche nicht gelöst. Es

konnte in dieser Arbeit jedoch ein PCNA-Ubiquitinierungsassay etabliert werden, welcher die Di- und Triubiquitinierung erfolgreich detektieren kann. Obwohl quantitative Änderungen der PCNA-Di- und Triubiquitinierung schwer reproduzierbar sind, wäre eine komplette Inhibierung der Polyubiquitinierung definitiv nachweisbar, wie die Kontrolle mit der PCNA^{K164R}-Mutante beweist. Dies ist insofern ein Fortschritt, da vorhergehende Studien die PCNA-Polyubiquitinierung kaum als eindeutige Banden darstellen konnten. Somit ist ein nützliches Werkzeug gegeben, welches den Einfluss von anderen Proteinen auf die PCNA-Ubiquitinierung gut nachweisen kann und damit vielleicht endgültig eine Antwort auf die Frage nach einem oder mehreren Rad5-Orthologen liefert.

Des Weiteren konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Etoposid und damit eine Aufgabe bei der DSB-Reparatur festgestellt werden. Diese Funktion konnte auch bei Rad5 in der Hefe beobachtet werden [197]. Interessant wird die erhöhte Etoposid-Sensitivität vor allem bei der Krebsbehandlung. *SHPRH* wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen beschrieben, da es in verschiedenen Melanomen, Brust- und Ovar-Krebszelllinien mutiert war [172, 294]. In diesem Zusammenhang wäre eine erhöhte Sensitivität gegenüber Etoposid von großer Bedeutung, da Etoposid ein zugelassenes Chemotherapeutikum ist und die Behandlung von Tumoren mit einer Mutationen in *SHPRH* möglicherweise maßgeblich verbessern könnte. Es wäre daher sehr interessant herauszufinden, ob und bei welchen humanen Zelllinien *SHPRH* denselben Effekt hat. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig den Mechanismus zu erkunden, der *SHPRH*-defiziente Zellen sensibler gegenüber Etoposid macht, um bei einer möglichen Therapie hier gezielt anzusetzen.

Außerdem ist die Frage nach weiteren Funktionen von *SHPRH* noch nicht geklärt. Hier wäre es aufschlussreich das Substrat von *SHPRH* zu finden, was mit Hilfe von Co-IPs und anschließender massenspektrometrischer Analysen erreicht werden könnte. Aber auch die gründliche Analyse eines Mausmodells könnte Aufschlüsse darüber geben, welche Funktionen *SHPRH* *in vivo* ausüben kann. Es bleibt also noch in verschiedenen Bereichen viel zu erforschen, bis *SHPRH* vollständig verstanden ist.

4 ANHANG:

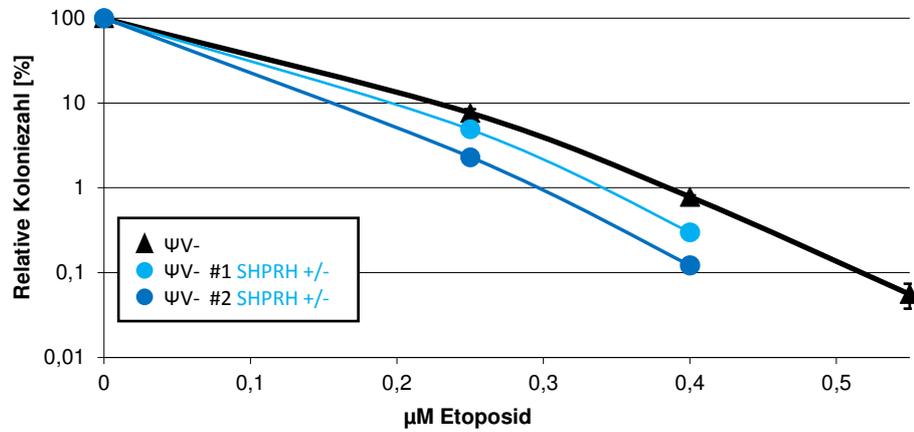


Abb. 4.1: Effekt von SHPRH auf das Überleben von ΨV-Zellen unter dem Einfluss von Etoposid
Kolonie-Überlebensversuche von DT40-ΨV-Zellen, generiert mit *Knockout*-Strategie A, nach der Behandlung mit steigenden Konzentrationen an Etoposid. In dem Graph ist die relative Koloniezahl (logarithmisch) in Abhängigkeit von der Agens-Konzentration angegeben.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle	Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamid	Roth	Glutamin	Gibco BRL
Agarose	Invitrogen	Glycerin	Merck
Ampicillin	Roche	Hygromycin B	Invitrogen
APS	Merck	Isopropanol	Merck
2- β -Mercaptoethanol	Sigma	Methanol	Merck
Blasticidin S	Mobitec	Methylzellulose	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck	MMS	Sigma
Camptothecin	Sigma-Aldrich	Mycophenolsäure	Sigma-Aldrich
Cisplatin	Ribosepharm	Natriumpyruvat	Gibco BRL
Complete Protease Inhibitor	Roche	Natriumhydrogen-Carbonat	Merck
D-MEM/F12	Invitrogen	Penicillin	Gibco BRL
DMSO	Merck	Puromycin	Sigma
Doxorubicin	Santa Cruz	PhosStop	Roche Diagnostics
Doxycyclin	Sigma	RPMI-1640	Gibco BRL
DTT	Diagnostic Chemicals	SDS	Merck
ECL	GE Healthcare	Streptomycin	Gibco BRL
Ethanol	Merck	TEMED	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Tris	Sigma
Etoposid	Sigma	Trypanblau	Sigma
FCS	PAA Laboratories GmbH		

5.1.2 Geräte

Blot-Tank / Mighty Small

Hoefer, USA

Elektrophoresekammer

BioRad, München

Elektroporator

BioRad, Hercules, USA

Entwicklermaschine CAVOMAT

Christiansen GmbH, München

FACS Canto II

Becton Dickinson, USA

Inkubator

Binder, Tuttlingen-Möhringen

iQ5-RealTimePCR Systems	BioRad Laboratories GmbH, München
Mikroskop	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Schubert & Weiss
PA-Gel-Kammer / Mighty Small II	Hoefer, USA
Thermocycler	Bioanalytik, Jena
Photometer SmartSec™ Plus	Eppendorf, Köln
PowerPac 3000/Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sonifikator	Bandelin Sonopuls, Papenburg
Tischzentrifuge (gekühlt)	Eppendorf, Köln
Umluft-Sterilbank	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf

5.1.3 Protein-Größenstandard

Um das Molekulargewicht von Proteinen zu bestimmen, wurden diese zusammen mit einem Proteingrößenstandard aufgetragen. Der Proteingrößenstandard enthält Proteine mit einer Größe von 10 kDa bis 170 kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo SCIENTIFIC, ehemals Fermentas), welche in einem SDS-PA-Gel aufgetrennt wurden. Um große Proteine zu identifizieren, wurde zusätzlich der Proteingrößenstandard PageRuler™ Plus verwendet, dieser weist statt der 170 kDa Bande eine 250 kDa Bande auf.

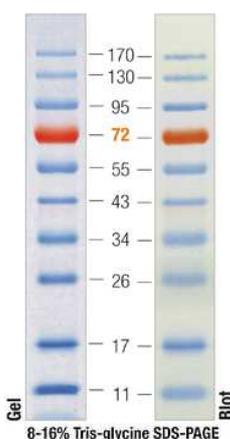


Abb. 5.1: Proteingrößenstandard
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

5.1.4 DNA-Größenmarker

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurde gleichzeitig ein DNA-Größenstandard mit aufgetragen. Der verwendete Größenstandard ist der O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo SCIENTIFIC, ehemals Fermentas)

5.1.5 Antikörper

Tab. 5.1 Westernblot-Analyse

Bezeichnung	Bezugsquelle	Herkunft	Verdünnung	Verdünnungsreagenz
α -AID	E. Kremmer, HMGU München (5G9)	Ratte	1:5	5% Milchpulver/ TBS-Tween
α -Aktin	Sigma-Aldrich (A-2066)	Kaninchen	1:5000	5 % Milchpulver/ TBS-Tween
α -PCNA	abcam (ab29)	Maus	1:3000	5% Milchpulver/ TBS-Tween
α -SHPRH	Sigma-Aldrich HPA034854-100UL	Kaninchen	1:500	5% BSA/TBS-Tween
α -Tubulin	abcam (ab4074)	Kaninchen	1:1000	5% Milchpulver/PBS
α -Vinculin	Biozol BZL03106	Maus	1:3000	5% Milchpulver/ PBS-Tween

Tab. 5.2 FACS-Analyse

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verdünnung	Verdünnungsreagenz
α -Huhn-IgM-FITC	Bethyl (A130-102F)	1:40	PBS/FKS(0,5 %)
α -Huhn-IgM-PE	Southern Biotech (8310-09)	1:40	PBS/FKS(0,5 %)

Tab. 5.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
AMV-Reverse-Transkriptase	Roche Diagnostics
Expand Long Template-Polymerase	Roche Diagnostics
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo SCIENTIFIC
Phusion-Polymerase	Thermo SCIENTIFIC

Proteinase K	Thermo SCIENTIFIC, ehemals Fermentas
Restriktionsenzyme	Thermo SCIENTIFIC, ehemals Fermentas
T4-DNA-Ligase	Thermo SCIENTIFIC

Tab. 5.4 Kits

Produkt	Bezugsquelle	Anwendung
<i>DC Protein Assay</i>	BioRad Laboratories	Proteinquantifizierung
<i>ECL Western Blotting System RPN2106</i>	GE Healthcare	Western-Blot Detektion
<i>Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit</i>	Genomed	Plasmid-Isolierung
<i>pGEMT Cloning Kit</i>	Invitrogen	pGEMT-Klonierung
<i>Qiagen Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN	Gelextraktion
<i>Qiagen PCR Purification Kit</i>	QIAGEN	Reinigung von PCR-Fragmenten
<i>RNeasy Kit</i>	QIAGEN	RNA-Isolation
<i>1st strand cDNA synthesis Kit</i>	Roche Diagnostics	cDNA-Synthese
<i>ABsolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix</i>	Thermo SCIENTIFIC	q-PCR-Analyse

Tab. 5.5 Datenverarbeitung

Software	Anwendung
Adobe Photoshop CS5	Bildverarbeitung
BioRad iQ5	Quantitative RT-PCR Datenakquisition und Auswertung
FlowJo 7.6.1	FACS Daten Auswertung
Geneious Pro 5.5.6	Analyse von DNA- und Proteinsequenzen, Primerdesign
MS-Excel 2010	Tabellenkalkulation
MS-Word 2010	Textverarbeitung

5.1.6 Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α benutzt.

Genotyp: F-, Φ dlaCZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (rk-, mk-), supE44, Thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF) U169, λ -.

5.1.7 Primer

Tab. 5.6 Übersicht der verwendeten Primer

Zweck der Primer:		Primersequenz:
Knockout von <i>SHPRH</i> in DT40- Zellen:		
Strategie A, linker Arm:	5'-GGG CTC GAG GAC TAC CAT GTT GTT CTC TCT TCT C-3' (XhoI)	
	5'-GGG GGA TCC TGT CAG GGC TGC CTG TGG TTC CAT C-3' (BamHI)	
rechter Arm:	5'-GGG GGA TCC GCA AGT ATA TGG GTC TGG AAA ACT TG-3' (BamHI)	
	5'-GCG GCC GCT CCA CCC CAC TAG ACA CAG AAC TGG-3' (NotI)	
Strategie B, linker Arm:	5'-GGG CTC GAG TGC ATG CAG GTT CTT TTT CAT GGC-3' (XhoI)	
	5'- GGG TGA TCA CTG TTC ATC CAA GAC CCA TCT CAT CTG CCA-3' (BclI, Stopp)	
rechter Arm:	5'- GGG TGA TCA TGA CTA GAG AAG TGT TGC AGC AGT CA-3' (BclI)	
	5'- GGG ACT AGT ACG ACG CCC ATC TTC GCT GT-3' (SpeI)	
Strategie C, linker Arm:	5'-GGG CTC GAG GCA ACA AGT GAA ACT GAG CGT GCC-3' (XhoI)	
	5'-GGG GGA TCC GCT CTC AAG GAT GAC GCA CCC TCA GCC G-3' (BamHI, Stopp)	
rechter Arm:	5'-GGG GGA TCC AGC TTG TCA ACA AAC ACT TGA ATG GGA-3' (BamHI)	
	5'-GGG ACT AGT TGC AAA ACT CCC ACA GAA GTG TGA A-3' (SpeI)	
Nachweis der gerichteten Integration		
Strategie A (#1A):	5'-CTG CTG CCA CAG CCA ATT TGG AGA AAA GTA C-3'	
Strategie B (#1B):	5'- TTG GCC CAT TAT GTG GCT GT-3'	
Strategie C (#1C):	5'-TGT TAA GGA GGG GGC AGA GA-3'	
Resistenzkassetten:		
Puromycin (#R):	5'-CAG CGC CCG ACC GAA AGG AGC GCA-3'	

Blasticidin (#R):	5'-CGA TTG AAG AAC TCA TTC CAC TCA AAT-3'
Mycophenolsäure (#R):	5'-TCG TAT TCG TCC CGC CAA TCT CCG GTC GCT-3'
Southernblot Sonde	
Strategie A and B :	5'- GAT TAG GAA GAT GAG GTC TGT TTG GAG-3' 5'-TGA GGT CCA GCA AAT GGA TAT TCAC-3'
Strategie C :	5'- GAA CGG TTG CAC CGG CCC AT-3' 5'-ACA CAG TAA ACC TGG CAC CAG CA-3'
<i>SHPRH</i> Überexpressions- Vektor	5'-GGG GAT ATC GCC GCC ACC ATG TAT CCC TAT GAC GTC CCG GAC TAT GCA AGT AGT CGT CGA AAG CGT GC-3' (EcoRV, Kozak, start, HA-tag) 5'-GGG GAT ATC TCA CTC AAG TTC TTC AGT TTC CTC TGT AA-3' (EcoRV)
λ-PCR	5'-TGG GAA ATA CTG GTG ATA GGT GGA T-3' 5'-CCT CCAT TTT TTG ACA GCA CTT ACC TGG ACA GCT G-3'
RT-PCR, q-PCR	
Exon 4-Exon 8 (#3-#4)	5'-CCA TCA GCA GGA TGT CCA ACT AC-3' 5'-GCT GCT AAC ACC ATC ACT CTT AAG-3'
Exon 25-Exon 28 (#5-#6)	5'-GCA GTA CAG TGT TGG CAC GC-3' 5'-GTC TGG CCA ATA CGA TGA ACT C-3'
GAPDH	5'-ACG GTG GAT GGC CCC TCT GG-3' 5'-GGG TTG GCA CAC GGA AAG CCA-3'

5.1.8 Plasmide

5.1.8.1 *SHPRH-Targeting-Vektoren*

Um *SHPRH* in seiner ganzen Größe zu untersuchen, wurden drei verschiedene Gen-*Targeting*-Strategien entwickelt. Mit der ersten wird die Promotorregion von *SHPRH* entfernt, diese Vektoren wurden von Friedemann Loos hergestellt und sind bei David Grotzky beschrieben [295]. Die zweite entfernt die PHD-Domäne von *SHPRH* und enthält ein vorzeitiges *Stopp-Codon*. Die dritte entfernt die RING-Domäne und beinhaltet ebenfalls ein vorzeitiges *Stopp-Codon*. Die homologen Arme der Gen-*Targeting*-Vektoren der verschiedenen *Knockout*-Strategien von *SHPRH* wurden aus genomischer DT40-DNA

amplifiziert (Primer, Tab. 5.6). Die PCR-Produkte wurden mit den in Tabelle 5.6 annotierten Enzymen gespalten und in einen pBluescript II KS (+/-) Vektor (Fermentas) kloniert. Es wurden drei verschiedene loxP-flankierte Resistenzkassetten (ploxpurp, ploxbsr und ploxtgpt) aus dem pLox-System von Arakawa et. al [187] zwischen die homologen Arme eingefügt, wobei die BamHI-Schnittstellen (Strategie A und B) oder die BclI-Schnittstellen (Strategie C) verwendet wurden.

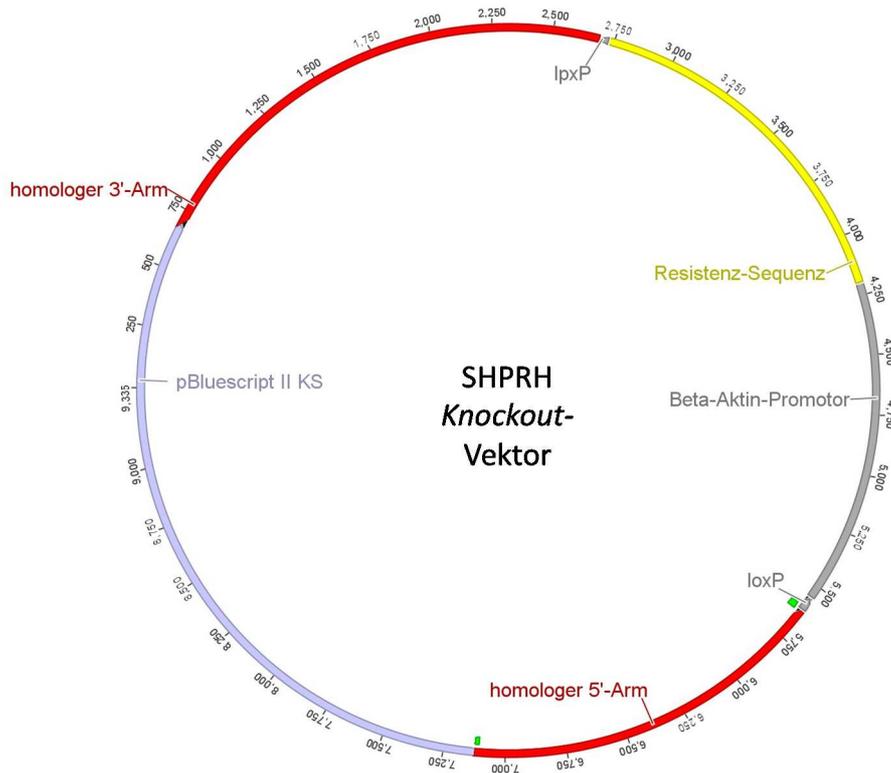


Abb. 5.2: Repräsentativer *SHPRH*-Knockout-Vektor

Folgende Vektoren wurden auf diese Weise generiert (Abb. 5.2):

1. Targeting-Vektor für die *SHPRH*-Promotorregion:
 - a. FL1: mit einer Puromycinresistenz
 - b. FL2: mit einer Blastocidinresistenz
 - c. FL3: mit einer Mycophenolsäureresistenz
2. Targeting-Vektor für die PHD-Domäne:
 - a. R1 Puro2: mit einer Puromycinresistenz
 - b. R1 BSR3: mit einer Blastocidinresistenz
 - c. R1 GPT1: mit einer Mycophenolsäureresistenz

3. Targeting-Vektor für die RING-Domäne:
 - a. R2 Puro6: mit einer Puromycinresistenz
 - b. R2 BSR18: mit einer Blastidinresistenz
 - c. R2 GPT5: mit einer Mycophenolsäureresistenz

5.1.8.2 SHPRH-Überexpressionsvektor

Um den *SHPRH*-Überexpressionsvektor zu generieren, wurde das pExpress/ploxSystem von Arakawa et al. [187] verwendet. Die für *SHPRH* kodierende Sequenz wurde aus DT40 cDNA mit Hilfe der Primer aus Tab. 5.6 mit der *Phusion*-Polymerase synthetisiert. N-Terminal wurde eine Kozak-Sequenz, sowie ein HA-Tag hinzugefügt. Außerdem wurden N- und C-terminal eine EcoRV-Schnittstelle eingefügt, über die das Konstrukt in die „multiple cloning site“ des pExpress kloniert werden kann. Im pExpress-Vektor sind ein β -Aktin-Promotor, sowie ein SV40-Poly-Signal enthalten. Diese Sequenz wurde über *SpeI* herausgespalten und in die *NheI*-Schnittstelle des pLox-Puro-Vektors [187] integriert. Anschließend konnte das *SHPRH*-Konstrukt in die „multiple cloning site“ des bereits integrierten pExpress eingefügt werden. Die *SHPRH*-Expressionskassette sowie der Selektionsmarker sind von loxP-Seiten flankiert.

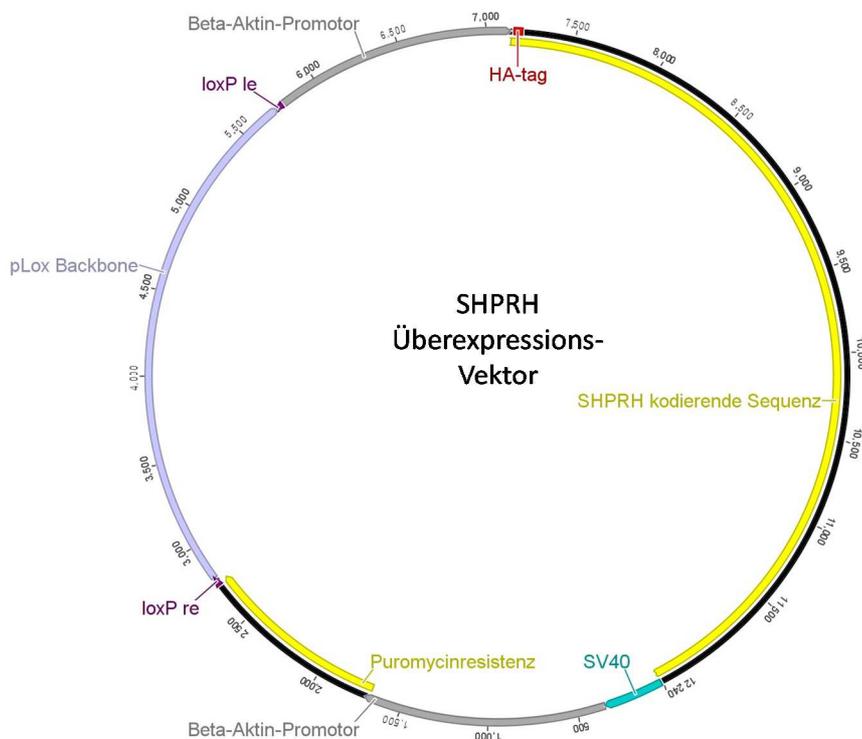


Abb. 5.3: HA-SHPRH-Überexpressions-Vektor

5.1.9 Die DT40-Zelllinie

Die DT40-Hühner-B-Zelllinie entstammt einem ALV-induziertem Lymphom der *bursa fabricii* [296, 297]. Diese Zelllinie hat die 3'-LTR stromaufwärts des *c-myc* Gens integriert [298]. Die 3'-LTR befindet sich in der selben Orientierung wie *c-myc* und erhöht die Transkriptionslevel um das 100-fache [296].

Die DT40-Zelllinie zeichnet sich durch ein hohes Verhältnis von gerichteter gegenüber ungerichteter DNA-Integration aus [189, 299].

Die DT40-Zelllinie zeigt einen stabilen Karyotyp [300] mit einer Trisomie von Chromosom 2, sowie einer Trisomie des Mikrochromosoms 24 [300]. Es gibt einige Anhaltspunkte für eine erhöhte genomische Instabilität der Zelllinie [301-303]. Auch der p53-Status dieser Zelllinie konnte noch nicht eindeutig geklärt werden [304-306].

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (Thermo Scientific, Herasafe/Maxisafe) durchgeführt. Dabei wurden sterile Glas- oder Plastikpipetten verwendet. Die DT40-Zellen wurden bei 41°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Binder) kultiviert. Die Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, stets bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage grob auf eine Dichte von 1x10⁵ eingestellt.

Zellkulturmedium

500 ml	RPMI 1640 Medium (Gibco BRL)
10%	Fötale Kälberserum (Gibco BRL)
1%	Hühnerserum (SIGMA CHEMIE)
100 µg/µl	Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco BRL)
2 mM	Glutamin (200 mM) (Gibco BRL)
1 mM	Natriumpyruvat (100 mM) (Gibco BRL)
0,1 µM	2-Mercaptoethanol (1 M) (Sigma-Aldrich)

5.2.1.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei sind 4x16 Kästen auf der Kammer eingraviert. Zwischen Deckgläschen und der Neubauerkammer befinden sich oberhalb der 16 Kästchen 0,1 µl Flüssigkeit. Daher musste die gezählte Zellzahl mit 1×10^4 multipliziert werden, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

5.2.1.2 Einfrieren und auftauen von Zellen

Es wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden bei -80°C oder im Stickstoff eingefroren.

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen, zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 ml Zellkulturmedium überführt.

5.2.2 Transfektion von DT40-Zellen

Für eine Transfektion wurden 1×10^7 Zellen benötigt. Diese wurden am Vortag auf eine Dichte von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Damit die DNA in das Genom der DT40-Zellen integrieren kann, musste diese erst linearisiert werden. Hierfür wurden am Vortag 50 ng DNA mit dem entsprechenden Enzym für mind. 4 Stunden bei 37°C gespalten. Danach wurde die DNA mit 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Am nächsten Tag wurde die DNA für 20 Minuten bei 15 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 250 µl 70%igem Alkohol gewaschen und für 10 min bei 15 000 rpm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand unter der Sterilbank komplett abgenommen und das Pellet wurde für 30 Minuten unter der Sterilbank getrocknet. Danach wurde die DNA in 300 µl PBS resuspendiert.

Es wurden 1×10^7 Zellen benötigt, diese wurden einmal in PBS gewaschen und dann in 500 µl PBS aufgenommen. Das Gemisch wurde dann zur DNA pipettiert und auf Eis 10-15 min inkubiert, damit sich die DNA an die Membran anlagern kann. Danach wurde die Zell-DNA-Suspension in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm BioRad) überführt. Die DNA wurde mit einem elektrischen Puls von 800V und 50µF (BioRad, GenePulser Xcell) in die Zellen gebracht. Danach wurden die Zellen in 10 ml Zellkulturmedium überführt, je 100 µl in die

Vertiefung einer 96-Well-Platte gegeben und diese für 24 Std. in den Inkubator gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 0,8 µg/ml Puromycin oder 5 µg/ml Blastocidin bzw. 30 µg/ml Mycophenolsäure (gpt) selektioniert.

Nach 7-14 Tagen, je nach Selektion, konnten eindeutig einzelne Kolonien identifiziert werden und diese in 2 ml Zellkulturmedium in eine 24-Well-Platte überführt werden.

5.2.3 Durchflusszytometrische-Analyse von Zellen

Um die Expression von Oberflächenproteinen oder GFP-gekoppelte Proteine zu analysieren, wurden die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie am FACS-Canto untersucht. Hierfür wurden 1×10^5 - 1×10^6 Zellen sedimentiert und einmal mit PBS/FCS (0,5%) gewaschen. Um Oberflächenmoleküle nachzuweisen wurden die Zellen entsprechend den Konzentrationen in Tab. 5.2 für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit 300 µl PBS/FCS (0,5%) gewaschen, in 500 µl PBS/FCS (0,5%) resuspendiert und bis zur Analyse am FACS-Gerät auf Eis gelagert. Der Nachweis von GFP-gekoppelten Proteinen verläuft analog, nur fällt der Färbeschritt weg. Über das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) konnte die Zellgröße bestimmt werden und über das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) konnte die Granularität der Zelle ermittelt werden. Mittels dieser Parameter konnten in der FACS-Analyse die lebenden von den toten Zellen unterschieden werden, wobei tote Zellen eine erhöhtes FSC- und vermindertes SSC-Signal aufweisen (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der FACS-Software konnte die Untersuchung somit auf die lebende Population eingegrenzt werden.

5.2.4 Untersuchung der Proliferationsrate

Für die Untersuchung der Proliferationsrate werden die DT40-Zellen mit CFSE (*Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester*) gefärbt. Dieser Farbstoff integriert in die Zelle und wird dann kovalent an intrazelluläre Proteine gebunden [200]. Bei jeder Zellteilung verteilt sich der Farbstoff gleichermaßen auf die zwei Tochterzellen. Über die Abnahme der Fluoreszenz kann somit die Proliferationsgeschwindigkeit ermittelt werden. Für die Färbung und die Kontrolle wurden jeweils 4×10^6 Zellen benötigt. Diese wurden bei Raumtemperatur zentrifugiert und einmal durch die Zugabe von 10 ml warmem PBS (41°C) durch einen weiteren Zentrifugationsschritt gewaschen. Der Überstand musste

komplett entfernt werden. Das Zellpellet wurde in 2 ml CFSE-PBS-Lösung resuspendiert und für 5 Minuten im Inkubator bei 41°C inkubiert. Für die Lösung wurde die 10 mM CFSE-Stammlösung (Vybrant™ CFDA-SE Cell Tracer, V-12883, Invitrogen) 1:10 000 in warmem PBS (41°C) verdünnt. Die Kontrolle (unbehandelte Zellen) wurde in warmem PBS aufgenommen. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml kaltem PBS (4°C) gestoppt. Danach wurden die Zellen einmal zentrifugiert und in 10 ml warmem Medium (41°C) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal für 30 Minuten bei 41°C in den Inkubator gestellt. Hierauf wurden die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert, wodurch sich eine Dichte von 4×10^5 Zellen/ml ergab. Nach mindestens 5 Stunden konnte die Fluoreszenz der Zellen mit Hilfe einer FACS-Messung bestimmt werden. Diese erfolgte für die folgenden 3 Tage im Abstand von 10-12 Stunden. Danach war eine Messung alle 24 Stunden ausreichend. Der Versuch endete, wenn die Zellen die gleiche Fluoreszenzintensität wie die Eigenfluoreszenz der Kontrolle erreicht hatten. Die Proliferationsgeschwindigkeit konnte über folgende Gleichung berechnet werden:

$$V_p = -\frac{1}{k} * \ln\left(\frac{1}{2}\right)$$

V_p : Proliferationsgeschwindigkeit; k : Exponent der Funktion $f(y)$ (aus Abb. 2.6 C+D, Abb. 2.12 A)

5.2.5 Untersuchung der Ig-Diversifizierung in der DT40-Zelllinie

Die Untersuchung der Ig-Genkonversion erfolgte in der DT40-Cre1-Zelllinie mittels FACS-Analyse, wobei der Anteil an IgM-negativen Zellen ermittelt wurde [55]. Die somatische Hypermutation wurde in DT40- Ψ V-Zellen analysiert, wobei in diesem Fall der Anteil an IgM-positiven Zellen bestimmt wurde [188].

Zuerst wurden die Zellen auf 1×10^4 Zellen pro ml Medium eingestellt. Diese wurden dann 3 mal 1:10 verdünnt, so dass man am Ende 1×10 Zellen pro ml erhalten hat. Von diesen wurden je 100 μ l in eine 96-Loch-Platte verteilt, so dass statistisch gesehen 1 Zelle pro Vertiefung ausplattiert wurde. Diese wurden für 7-10 Tage bei 41°C und 5% CO₂ kultiviert und nach Möglichkeit nicht bewegt. Sobald deutliche Kolonien sichtbar waren, wurden nur Kolonien gepickt, die sich einzeln in einer Vertiefung befanden. Es wurden 30-60 Klone in

24-Loch-Platten überführt, wobei in jeder Vertiefung 2 ml Medium vorgelegt waren. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage annähernd auf ihre optimale Dichte eingestellt.

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen mit einem anti-IgM-PE (8310-09, Southern Biotech) Antikörper gefärbt, wobei drauf geachtet wurde, trotz der hohen Probenzahl möglichst gleiche Färbebedingungen für alle Zellen zu gewährleisten. Es wurden 1×10^4 lebende Zellen für die Bestimmung am FACS-*Canto* aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo und MS-Excel. Die FACS-Messungen erfolgten nach 2 und 3 Wochen.

Für die Analyse der SHM und der Ig-Genkonversion wurden repräsentative Klone um den Median (aus der FACS-Auswertung) für weitere 7 bzw. 4 Wochen kultiviert. Danach konnte die DNA extrahiert werden. Um die umgelagerte leichte Kette des λ -Lokus zu amplifizieren, wurde die PCR mit der *Phusion*-Polymerase (Finnzymes) und den λ -Primern (Tab. 5.6) mit dem unten stehenden PCR-Programm durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T[®] Vektor kloniert und mit dem Primer 5'-GAG CGC AGG GAG TTA TTT GCA TAG-3' sequenziert (MWG Eurofins). Der Sequenzvergleich wurde mit der *Geneious*-Software durchgeführt. Durch den Vergleich aller Klone eines Genotyps untereinander wurde eine parentale Konsensussequenz generiert, in der Änderungen nachvollzogen werden konnten. Die Analyse der SHM-Frequenz, sowie die Erstellung des Musters wurden mit Hilfe des SHMTools durchgeführt (<http://scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1>) [213]. Die Ig-Genkonversion wurde nur mit Hilfe der *Geneious*-Software ausgewertet. Dabei wurden Genkonversionsereignisse mit Hilfe der Datenbank von *Reynaud* [52] den entsprechenden Pseudogenen zugeordnet. Die Mutationen wurden in Genkonversionsereignisse, zweideutige Mutationen und Punktmutationen eingeteilt (Abb. 2.18). Die Auswertung der dabei erhaltenen Daten erfolgte mit MS-Excel.

5.2.6 Methylzellulose-Überlebensexperimente

Methylzellulose-Überlebensversuche wurden verwendet, um die Sensitivität von Zellen zu untersuchen, die DNA-schädigenden Agenzien oder energiereicher Strahlung ausgesetzt sind. Hierfür wurden Etoposid (Sigma, USA), Doxorubicin (Santa Cruz, Germany), Cisplatin (Ribosepharm, Gräfelfing), Methylmethanesulfonat (MMS) (Sigma, USA), Camptothecin (Sigma-Aldrich) oder γ -Strahlung verwendet.

Die Zellen wurden am Vortag auf eine Dichte von 3×10^5 Zellen/ml verdünnt. Am nächsten Tag wurden sie auf eine Dichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Dann wurden in je

zweifacher Ausführung 100 µl der Zellen, sowie eine 1:10 und 1:100 Verdünnung zu 5 ml Methylzellulose gegeben, die in 6-Loch-Platten vorgelegt war. In der Methylzellulose befand sich bereits das DNA-schädigende Agens, oder die Zellen wurden sofort nach dem Ausplattieren bestrahlt. Danach wurden die Ansätze für 11-16 Tage bei 41°C im Inkubator kultiviert und die Kolonien ausgezählt. Es wurden die Verdünnungen ausgezählt in denen sich mindestens 20 Kolonien befanden, damit durch den Ansatz bedingte Varianzen möglichst gering gehalten wurden. Die Auswertung erfolgte mit MS-Excel.

5.2.6.1 Herstellung der 1,8%-igen Methylzellulose

Es wurden 18 g Methylzellulosepulver (Sigma) autoklaviert und in 220 ml 60° C warmem, sterilen Wasser gelöst. Dann wurden in 500 ml H₂O 11,9 g D-MEM (Invitrogen) und 2,44 g Natriumhydrogen-Carbonat (Merck) gelöst und steril filtriert (0,2 µm). Wenn die Methylzelluloselösung etwa 35°C erreicht hatte, konnte die D-MEM/NaHCO₃-Lösung hinzugegeben werden. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C gerührt. Am nächsten Tag wurden 2 mM L-Glutamin, 100 µg/µl Penicillin/Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 10% Fötale Kälberserum, 1% Hühnerserum, 0,1 µM 2-Mercaptoethanol und 140 ml steriles H₂O hinzugegeben und abermals über Nacht bei 4° C gerührt. Dann konnte die Methylzellulose mit den DNA-schädigenden Agentien versetzt werden, wobei dieses Gemisch nochmal über Nacht bei 4°C gerührt werden musste.

5.2.7 Doppelter Thymidinblock

Dieser Ansatz wird durchgeführt, um die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Hierfür wurden die DT40-Zellen auf 5x10⁵ Zellen/ml eingestellt und Thymidin hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 2,5 mM erreicht wurde. Danach wurden die Zellen für 18 Stunden bei 41°C im Inkubator kultiviert. Hierauf wurden die Zellen dreimal mit 5 ml warmem Medium gewaschen und anschließend in warmem Medium resuspendiert. Die Färbung, Inkubation und das Waschen der Zellen wurde nochmals durchgeführt (doppelter Block). Nach dem letzten Waschschrift wurden 5x10⁴ Zellen für die FACS-Analyse entnommen, die restlichen Zellen wurden in warmem Medium resuspendiert und wie oben beschrieben sofort in Methylzellulose ausplattiert sowie bestrahlt.

5.2.8 PCNA-Ubiquitinierungs-Assay

In diesem Versuchsansatz wurden die Zellen mit einer DNA-schädigenden Substanz behandelt, wodurch die Ubiquitinierung von PCNA induziert wurde, um den Schaden zu reparieren. In einer anschließenden Westernblot-Analyse konnte die Modifikation von PCNA durch Ubiquitin untersucht werden.

Die Zellen wurden am Vortag auf eine Dichte von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte erneut bestimmt, um möglichst ähnliche Bedingungen zwischen den verschiedenen Genotypen zu gewährleisten. Zu den Zellen wurde so viel H_2O_2 hinzugefügt, dass eine Endkonzentration von 1mM erreicht wurde. Daraufhin wurden die Zellen für 40 Minuten bei $41^\circ C$ in den Inkubator gestellt. Danach wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und in Lysepuffer resuspendiert. Die PCNA-Ubiquitinierung wurde mit Hilfe einer Westernblot-Analyse bestimmt (siehe Abschnitt 5.2.12).

5.2.9 Aktivierung der Cre-Rekombinase in den DT40-Zellen

Die DT40-Zellen besitzen eine induzierbare Cre-Rekombinase Diese kann durch die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aktiviert werden [187, 307]. Die Cre-Rekombinase erkennt dabei loxP-DNA-Signalsequenzen und kann zwei gleich orientierte Sequenzen miteinander rekombinieren und dabei die dazwischenliegende DNA-Sequenz entfernen. In DT40-Zellen können damit bereits verwendete Resistenzen entfernt werden und in einem neuen Vektor wiederverwendet werden [187].

Hierfür wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen in 1 ml Medium mit $1 \mu M$ 4-OHT versetzt und über Nacht bei $41^\circ C$ in den Inkubator gestellt. Nach 12-18 Stunden wurden die Zellen gezählt und auf 330 Zellen/ml, 33 Zellen/ml und 3,3 Zellen/ml eingestellt. Von den Verdünnungen wurden je 100 μl in eine 96-Loch-Platte gegeben und die Platten im Inkubator bei $41^\circ C$ kultiviert. Wenn eine Resistenz erhalten bleiben sollte, wurde am 2. Tag die entsprechende Selektion hinzugefügt. Nach 7-14 Tagen wurden nur Kolonien in eine 24-Loch-Platte mit Medium überführt, die sich zuvor einzeln in einer Vertiefung befanden. Das erfolgreiche Entfernen der Resistenz wurde über die daraus entstehende Sensitivität gegenüber der Selektion bestätigt. Zusätzlich wurde eine *Targeting*-PCR auf die fehlende Resistenz durchgeführt (Abschnitt 5.2.10.10).

5.2.10 Techniken der DNA-Analyse

5.2.10.1 Isolierung der DNA aus DT40-Zellen

Für die Isolierung der DNA aus DT40-Zellen standen 3 Methoden zur Verfügung. I) Um qualitativ möglichst reine DNA zu erhalten wurde das *QIA amp DNA Mini-Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet. II) Um die DNA aus einer großen Anzahl von Proben zu isolieren, wurden jeweils etwas 5×10^5 Zellen mit 20 μ l Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, und 0,5 μ g/ μ l Proteinase K (MBI Fermentas)) für 2,5 Std. bei 50°C inkubiert. Danach musste die Proteinase K durch eine 10 Minuten Inkubation bei 95° C inaktiviert werden. III) Für eine möglichst hohe DNA-Ausbeute wurden etwa 2×10^7 Zellen in 500 μ l Lysepuffer und 10mg/ml Proteinase K (MBI Fermentas) über Nacht bei 56°C und 1000 rpm lysiert. Am nächsten Tag wurden 170 μ l NaCl (5 M) hinzugefügt und bei 15 000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 μ l Isopropanol (100%) vermischt und anschließend unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 500 μ l Ethanol (70%) zum Pellet hinzugefügt und die Mischung wiederum zentrifugiert. Hierauf wurde der Überstand komplett entfernt und das Pellet für 1 Std. getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50-100 μ l TE aufgenommen und bei 37°C für 4 Std. mit 1000 rpm geschüttelt.

Lysepuffer

100 mM Tris HCl pH 8,5
5 mM EDTA
0,2% SDS
200 mM NaCl
Ad 250 ml H₂O

1X TE

10 mM Tris
1 mM EDTA
add 200 ml H₂O
autoklavieren

5.2.10.2 Southernblot-Analyse

Mit Hilfe der Southernblot-Analyse [308] sollte die gerichtete Integration der verschiedenen *Knockout*-Konstrukte in das Genom bestätigt werden. Hierfür wurde die DNA aus 2×10^7 Zellen isoliert und über Nacht mit BclI für Strategie A und B oder mit PvuII für Strategie C gespalten. Am nächsten Tag wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe eines 0,8%-igen Agarosegels bei 80V für etwa 5 Stunden aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 20 Minuten in 0,25 M HCl geschwenkt, um die DNA zu denaturieren. Anschließend wurde

das Gel einmal mit Transferpuffer gewaschen und hierauf für 60 Minuten in Transferpuffer geschwenkt, um das Agarosegel zu neutralisieren. Dann wurde die DNA mit einem Southern-Kapillar-Blot aus dem Gel auf einen Nitrozellulose-Membran (INYC00010, Millipore) übertragen. Der Transfer benötigte 1-2 Tage. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in 2x SSC gewaschen und anschließend wurde die DNA durch eine 2-stündige Inkubation bei 78° C in einer luftdichten Röhre an die Membran fixiert. Daraufhin wurde Prähybridisierungspuffer auf 65°C vorgewärmt und mit einzelsträngiger DNA (D9156, Sigma-Aldrich) versetzt. In diesem Gemisch wurde die Membran über Nacht bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine radioaktive Sonde in den Puffer hinzugegeben und für weitere 1-2 Tage inkubiert. Hierauf wurde die Membran 3x 10 Minuten mit vorgewärmtem Waschpuffer (2x SSC/0,5% SDS) bei 65°C gewaschen. Zuletzt konnte das radioaktive Signal mit Hilfe eines Kodak-BioMax-Filmes bei -80°C für mehrere Stunden bis zu einigen Tagen detektiert werden.

Prähybridisierungspuffer	20x SSC	Transferpuffer
NaCl 1 M	NaCl 3 M	NaOH 0,4 M
Tris pH 7,5 50 mM	Natriumcitrat 0,3 M	NaCl 0,6 M
Dextransulfat 10 %		
SDS 1 %		
ssDNA 250 µg/ml		

5.2.10.3 Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Für die drei verschiedenen Strategien wurden zwei Sonden benötigt. Die Sequenzen der Primer für Strategie A und B bzw. Strategie C sind in Tab. 5.6 aufgelistet. Es wurden 25 ng der Sonden DNA in 45 µl H₂O benötigt. Diese wurden für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und in *rediPrime*TM (Amersham) aufgelöst. Anschließend wurden 5 µl ³²P dCTP (50 µCi) hinzugegeben und die Sonde bei 37°C für 30 Minuten radioaktiv markiert. Mit Hilfe einer Sephadex-Säule (Microspin S-200 HR, Amersham) wurde die Sonde gereinigt. Für die Markierung der DNA auf der Membran wurden etwa 7 µl der Sonde zunächst für 3 Minuten auf 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und anschließend zu dem Prähybridisierungspuffer hinzugefügt.

5.2.10.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um eine möglichst reine Plasmid-DNA aus einer geringen Anzahl an Zellen zu erhalten, wurde das Qiagen-Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden).

5.2.10.5 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Größere Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien wurden mit Hilfe des JetStar-Kits isoliert, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde (Jetstar-Kit, Genomed, Löhne).

5.2.10.6 DNA-Modifikationen

Die DNA wurde für Klonierung, die Linearisierung oder Spaltung mit Enzymen von Thermo Fischer (ehemals Fermentas) dephosphoryliert, gespalten oder ligiert. Dabei wurde stets nach Herstellerangaben verfahren.

5.2.10.7 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt. Hierbei wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm das transmittierte Licht gemessen und die Konzentration von dem BioRad SmartSpec Plus berechnet.

5.2.10.8 DNA-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, wurden die Proben auf ein 0,8-1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Hierfür mussten die Proben 1:10 mit Ladebuffer versetzt werden. Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe eines elektrischen Feldes bei 80-120 V.

1xTAE

0,04 M Tris-Acetat
1 mM EDTA

Ladebuffer (10x)

0,25% Bromphenolblau
30% Glycerin
50 mM Tris

Agarosegel

0,8-1,5 mg Agarose
je 100 ml 1xTAE
0,5 µg EtBr je ml

5.2.10.9 Reinigung der DNA

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) aus dem Agarosegel oder mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aus PCR- oder Spaltungsansätzen aufgereinigt.

5.2.10.10 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die *Expand-Long-Template* Polymerase (Roche, Mannheim) ist speziell dafür konzipiert, besonders lange DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Diese Polymerase wurde für den Nachweis der gerichteten Integration der *Knockout*-Vektoren in das DT40-Genom verwendet.

Der PCR-Ansatz (25 µl) ist aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

13,75 µl H₂O, 2,5 µl 10x *Long-Template*-Puffer, 17,5 mM MgCl₂, 2,5 µl dNTP (2 mM, Fermentas), 2,5 µl MgCl₂ (5 mM), 1,25 µl vorwärts-Primer* (12,5 µM), 1,25 µl rückwärts-Primer* (12,5 µM), 0,25 µl *Long-Template*-Polymerase, 1 µl DNA (Isolierung der DNA nach 5.2.10.1 Unterpunkt II)

* Als vorwärts-Primer wurden die Primer entsprechend der *Knockout*-Strategie A-C verwendet (Tab. 5.6); die rückwärts-Primer wurden gemäß der verwendeten Resistenz ausgewählt (Tab. 5.6)

Tab. 5.7 PCR-Programm unter Verwendung der *Long-Template*-Polymerase

	Dauer	Temperatur	
Denaturieren der DNA	5 min.	95° C	
Zyklische Denaturierung	50 sek.	95° C	
Zyklische Anlagerung	50 sek.	65° C (SHPRH) 60° C (RDM1)	50 Wdh.
Zyklische Verlängerung	7 min.	72° C	
Finale Verlängerung	10 min.	72° C	

Die *Phusion*-Polymerase (NEB) wurde verwendet, um DNA-Fragmente mit einer möglichst niedrigen Fehlerquote zu vervielfältigen. Der PCR-Ansatz (20 µl) für die *Knockout*-Arme bzw. den Rekonstitutionsvektor ist aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

12,7 µl H₂O, 4 µl 5x *Phusion-HF*-Puffer, 0,4 µl dNTP (10 mM), 0,9 µl DMSO, 0,4 µl vorwärts-Primer* (25 µM), 0,4 µl rückwärts Primer* (25 µM), 0,2 µl *Phusion*-Polymerase, 1 µl DNA (Isolierung der DNA nach 5.2.10.1 Unterpunkt II)

* Als vorwärts- und rückwärts-Primer wurden die Primer entsprechend der *Knockout*-Strategie A-C oder für den Rekonstitutionsvektor verwendet (Tab. 5.6).

Tab. 5.8 PCR-Programm unter Verwendung der *Phusion*-Polymerase

	Dauer	Temperatur	
Denaturieren der DNA	3 min.	94° C	
Zyklische Denaturierung	30 sek.	94° C	
Zyklische Anlagerung	30 sek.	63° C	50 Wdh.
Zyklische Verlängerung	5 min.	72° C	
Finale Verlängerung	10 min.	72° C	

Für die Sequenzierung der Ig-Diversifizierungsversuche wurde die λ -Kette amplifiziert und anschließend sequenziert. Auch hier ist eine möglichst niedrige Fehlerquote nötig, weshalb die *Phusion*-Polymerase verwendet wurde. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 5.6 aufgelistet. Der PCR-Ansatz (20 μ l) für die Amplifikation des λ -Lokus ist aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

12,4 μ l H₂O, 4 μ l 5x *Phusion-HF*-Puffer, 0,4 μ l dNTP (10 mM), 1 μ l λ 1-Primer (12,5 μ M), 1 μ l C2-Primer (12,5 μ M), 0,2 μ l *Phusion*-Polymerase, 1 μ l DNA (*QIA-Amp-Kit*)

Tab. 5.9 PCR-Programm zur Amplifikation des λ -Lokus

	Dauer	Temperatur	
Denaturieren der DNA	2 min.	94° C	
Zyklische Denaturierung	30 sek.	94° C	
Zyklische Anlagerung	30 sek.	65° C	35 Wdh.
Zyklische Verlängerung	3 min.	72° C	
Finale Verlängerung	10 min.	72° C	

Für kürzere Fragmente, wie die Southernblot-Sonde oder RT-PCRs wurde der *Taq*-Polymerase-Mix (Roche, Mannheim) verwendet, der aus folgenden Komponenten besteht:

15,4 μ l H₂O, 2,5 μ l 10x *Taq*-Puffer (-MgCl₂), 2,5 μ l dNTP (2 mM, Fermentas), 1 μ l MgCl₂ (50 mM), 1 μ l vorwärts-Primer* (12,5 μ M), 1 μ l rückwärts-Primer* (12,5 μ M), 0,1 μ l *Taq*-Polymerase, 1 μ l DNA (Isolierung der DNA nach 5.2.10.1 Unterpunkt II oder cDNA 1:5)

* Als vorwärts- und rückwärts-Primer wurden die Primer für die Sonde der Strategie A und B bzw. Strategie C verwendet. Mit Hilfe der RT-PCR wurden die Exons 4-8 oder Exons 25-28 nachgewiesen (Tab. 5.6).

Tab. 5.10 PCR-Programm unter Verwendung der *Taq*-Polymerase

	Dauer	Temperatur	
Denaturieren der DNA	3 min.	94° C	
Zyklische Denaturierung	30 sek.	94° C	
Zyklische Anlagerung	30 sek.	59° C	35 Wdh.
Zyklische Verlängerung	2 min.	72° C	
Finale Verlängerung	10 min.	72° C	

5.2.11 Methoden der RNA-Analyse

5.2.11.1 RNA-Isolation und Erststrang-cDNA-Synthese

Die Isolation der RNA aus den DT40-Zellen wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des *RNeasy*-Kits (QIAGEN) durchgeführt. Die Synthese der cDNA erfolgte unter Anwendung des *1st strand cDNA synthesis*-Kit (Roche Diagnostics), wobei nach Möglichkeit 1 µg RNA eingesetzt wurden.

5.2.11.2 Quantitative *realtime*-PCR

Die quantitative *realtime* (q)-PCR wurde am *iQ5-RealTimePCR-Cycler* (BioRad) mit einem *Absolute qPCR SYBR Green Fluorescein Mix*-Kit, (Thermo Scientific, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde aus 10 µl SYBR GreenFluorescein 2x Mix, 0,5 µl Exon 25 Primer (5 µM), 0,5 µl Exon 28 Primer (5 µM), 18 µl H₂O und 2 µl cDNA (1:10) gemischt. Die Primer (Tab 5.6) binden an verschiedenen Exons, um die Amplifikation einer möglichen Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden. Die Standardabweichung wurde durch technische Triplikate in jedem Ansatz sowie durch Verrechnen von 3 unabhängigen Versuchsansätzen ermittelt.

Tab. 5.11 q-PCR-Programm

	Dauer	Temperatur	
Denaturieren der DNA	15 min.	95° C	
Zyklische Denaturierung	15 Sek.	95° C	
Zyklische Anlagerung	20 Sek.	63° C	50 Wdh.
Zyklische Verlängerung	10 Sek.	72° C	
Aufschmelzen	10 Sek.	70°-97° C (Transitionsrate 0,1° C)	
Abkühlen	15 min.	40° C	

Für die Ermittlung der Effizienz wurde eine Eichgerade erstellt. Hierbei wurde der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Crossing-point (Cp)-Wert aufgetragen (Der Cp-Wert wird durch die Anzahl der Zyklen ermittelt, bei der die Fluoreszenz das erste Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt [309]).

Aus der Steigung der Eichgeraden (m) konnte die Effizienz der Reaktion mit folgender Formel ermittelt werden:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}} \quad [310]$$

Um die relative Ausgangskonzentration der Probe zu ermitteln, wurde folgende Formel verwendet:

$$T_0 = 100 \times \frac{E_{\text{Referenzgen}} \cdot C_{p_{\text{Referenzgen}}}}{E_{\text{Zielgen}} \cdot C_{p_{\text{Zielgen}}}} \quad [311]$$

Für die Normalisierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet.

5.2.12 Proteinbiochemische Methoden

5.2.12.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung von Proteinen wurden 1×10^7 DT40-Zellen bei 1200 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in ein Reaktionsgefäß übertragen und zwei Mal mit PBS gewaschen (5000 rpm, 3 Minuten, 4°C). Zur Lyse wurde das Zellpellet in dem entsprechenden Volumen Lysepuffer gut resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Proben während der Inkubationszeit mehrere Male mit einem

Vortexer gemischt wurden. Anschließend wurden DNA- und Zelltrümmer bei einem weiteren Zentrifugationsschritt (14 000 rpm, 20 Minuten, 4°C) sedimentiert und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die Proteinkonzentration konnte mit dem DC-Protein Assay ermittelt werden (Bio Rad Laboratories).

Lysepuffer

Hepes (pH 7,9) 20 mM

NaCl 350 mM

Glycerin 20%

MgCl₂ 1mM

EDTA 0,5 mM

EGTA 0,1 mM

NP-40 1%

Zusatz von:

Protease-Inhibitor (Complete E, Roche Diagnostics)

Phosphatase-Inhibitor (PhosStop, Roche Diagnostics)

5.2.12.2 Proteinquantifizierung

Eine abgewandelte Form des *Lowry*-Assay [312] wurde verwendet, um die Proteinmenge zu quantifizieren. Hierfür wurden die Proben 1:10 in einem 20 µl Ansatz mit H₂O_{bidest} vorverdünnt. Zur Ermittlung der Eichgeraden wurden vier Proteinstandards mit bekannter Konzentration (0,1; 0,2; 0,4 und 0,8 mg/ml BSA, *bovine serum albumin*) mitgeführt. Das Reagenz A wurde zunächst mit 2% Reagenz S gemischt (Reagenz A'). Anschließend wurde zu jedem 20 µl Ansatz der Proben und Proteinstandards 50 µl des vorgemischten Reagenz A' pipettiert und die Ansätze wurde mit einem *Vortexer* gut gemischt. Nach der Zugabe von 400 µl Reagenz B wurden die Ansätze erneut gut gemischt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Schließlich konnte die Absorption der Proteine bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen werden.

5.2.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Zunächst wurde der gewünschten Proteinmenge mindestens die Hälfte des Volumens an 2xLaemmli-Probenpuffer hinzugefügt und die Proteine wurden durch 5-minütiges Aufkochen bei 95°C denaturiert. Daraufhin wurden die Proben noch mit 1/10 des Volumens an DTT versetzt. Je nach Antikörper wurden zwischen 80-120 µg an Proteinen verwendet. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [313]. Veränderungen in der Acrylamidkonzentrationen ermöglichen eine optimale Auftrennung der Proteine durch Variation der Porengröße im Polyacrylamid-Gel. Es wurden Acrylamidkonzentrationen von 6, 10 oder 12% verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einfachem *Laemmli*-Laufpuffer bei Raumtemperatur bei einer konstanten Spannung von 90-120 Volt.

2x Laemmli-Probenpuffer

SDS 4%
Glycerin 20%
Tris pH 6,8 0,12 M
Bromphenolblau 0,01%
ad 10 ml H₂O

10x Laemmli Laufpuffer

Tris 250 mM
Glycin 1,92 M
SDS 1%
ad 1 l H₂O

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	ad 15 ml	ad 5 ml
Acrylamid	10-15%	5%
Tris pH 8,8	350 mM	125 mM
SDS	0,1%	0,1%
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	0,1%	0,1%
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	0,004%	0,006%

5.2.12.4 Western Blot

Bei der Western-Blot-Analyse werden die Proteine durch ein elektrisches Feld aus dem Acrylamidgel auf eine proteinbindende Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Hybond-P, Amersham Pharmacia, Braunschweig) transferiert. Hierfür wurde die PVDF-Membran mit Methanol benetzt, eine Minute in Wasser gewaschen und anschließend für fünf Minuten in *Blotting*-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde auf zwei mit *Blotting*-Puffer getränkte

Filterpapiere gelegt, auf diese kam das Acrylamidgel und danach wurden noch zwei weitere Filterpapiere auf das Gel gelegt. Dabei wurde dieser Aufbau so zwischen Anode und Kathode angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine auf die Membran übertragen wurden. Der Transfer erfolgte bei diesem Nass-Blot in einem *Blotting*-Tank der Firma Hoefer. Für das SHPRH-Protein wurde eine Spannung von 120 mA für 16 Std. angelegt, der Transfer aller anderen Proteine benötigte 1 Std. bei 450 mA. Um den Transfer der Proteine auf die Membran zu kontrollieren, wurde diese für 1 Minute reversibel mit Ponceau S (Sigma-Aldrich) gefärbt.

10x Blotpuffer (ohne Methanol) 1x Blotpuffer

250 mM Tris
1,92 M Glycin

10x Blotpuffer 100 ml
Methanol 200 ml
ad 1l H₂O

5.2.12.5 Immundetektion von Proteinen

Spezifische Proteine können mit den entsprechenden Antikörpern auf der PVDF-Membran detektiert werden. Die Antikörper und deren Verdünnung sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Vor der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran für 1 Std. in einer Blockierlösung (1x PBS, 5% Trockenmilchpulver (Roth) oder 5% BSA (Roth)) geschüttelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern. Danach erfolgte die Inkubation der Membran im Erstantikörper (Tab. 5.1) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 3 Std. mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Chemolumineszenz-Reaktion mit dem ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia, Braunschweig) aktiviert, ein Film auf die Membran gelegt und diese für mindestens 15 Sekunden bis zu einer Stunde belichtet. Anschließend wurde der Film in einer Entwicklermaschine entwickelt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 8th ed. 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
2. Di Noia, J.M. and M.S. Neuberger, *Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 1-22.
3. Ellmeier, W., L. Faust, and R. Tschismarov, *Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **70**(23): p. 4537-53.
4. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 181-218.
5. Daha, N.A., et al., *Complement activation by (auto-) antibodies*. *Mol Immunol*, 2011. **48**(14): p. 1656-65.
6. Neuberger, M.S., *Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards*. *Immunol Cell Biol*, 2008. **86**(2): p. 124-32.
7. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
8. Wu, T.T. and E.A. Kabat, *An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity*. *J Exp Med*, 1970. **132**(2): p. 211-50.
9. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. *Nature*, 1983. **302**(5909): p. 575-81.
10. Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and M.S. Schlissel, *V(D)J recombination: molecular biology and regulation*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 359-83.
11. Brack, C., et al., *A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination*. *Cell*, 1978. **15**(1): p. 1-14.
12. Jung, D. and F.W. Alt, *Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 299-311.
13. Schatz, D.G. and Y. Ji, *Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(4): p. 251-63.
14. Jungnickel, B., *False moves for survival: error-prone DNA repair in adaptive immunity*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(24): p. 2856-61.
15. Oettinger, M.A., et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination*. *Science*, 1990. **248**(4962): p. 1517-23.
16. Weigert, M., et al., *The joining of V and J gene segments creates antibody diversity*. *Nature*, 1980. **283**(5746): p. 497-9.
17. Lieber, M.R., et al., *The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination*. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 817-26.
18. Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller, *Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining*. *Biochem J*, 2009. **417**(3): p. 639-50.
19. Allman, D.M., S.E. Ferguson, and M.P. Cancro, *Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics*. *J Immunol*, 1992. **149**(8): p. 2533-40.
20. Nieuwenhuis, P. and D. Opstelten, *Functional anatomy of germinal centers*. *Am J Anat*, 1984. **170**(3): p. 421-35.
21. Kuppens, R., *B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 801-12.

22. Jacob, J., R. Kassir, and G. Kelsoe, *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations.* J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1165-75.
23. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme.* Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.
24. Nussenzweig, A. and M.C. Nussenzweig, *Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer.* Cell, 2010. **141**(1): p. 27-38.
25. Pavri, R. and M.C. Nussenzweig, *AID targeting in antibody diversity.* Adv Immunol, 2011. **110**: p. 1-26.
26. Neuberger, M.S., et al., *Antibody diversification and selection in the mature B-cell compartment.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 211-6.
27. Vinuesa, C.G., et al., *T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection.* Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 72-89.
28. Janeway, C.A., Jr., *The discovery of T cell help for B cell antibody formation: a perspective from the 30th anniversary of this discovery.* Immunol Cell Biol, 1999. **77**(2): p. 177-9.
29. Figge, M.T., et al., *Deriving a germinal center lymphocyte migration model from two-photon data.* J Exp Med, 2008. **205**(13): p. 3019-29.
30. Meyer-Hermann, M.E., P.K. Maini, and D. Iber, *An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centers.* Math Med Biol, 2006. **23**(3): p. 255-77.
31. Han, S., et al., *Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers.* J Immunol, 1995. **155**(2): p. 556-67.
32. Swartzendruber, D.C. and C.C. Congdon, *Electron Microscope Observations on Tingible Body Macrophages in Mouse Spleen.* J Cell Biol, 1963. **19**: p. 641-6.
33. Xu, Z., et al., *Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 517-31.
34. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal centers.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 429-57.
35. Rada, C. and C. Milstein, *The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially.* EMBO J, 2001. **20**(16): p. 4570-6.
36. Berek, C. and C. Milstein, *Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response.* Immunol Rev, 1987. **96**: p. 23-41.
37. McKean, D., et al., *Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(10): p. 3180-4.
38. Rogozin, I.B. and N.A. Kolchanov, *Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis.* Biochim Biophys Acta, 1992. **1171**(1): p. 11-8.
39. Golding, G.B., P.J. Gearhart, and B.W. Glickman, *Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes.* Genetics, 1987. **115**(1): p. 169-76.
40. Milstein, C., M.S. Neuberger, and R. Staden, *Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8791-4.
41. Bransteitter, R., et al., *Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4102-7.
42. Pham, P., et al., *Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation.* Nature, 2003. **424**(6944): p. 103-7.

43. Ramiro, A.R., et al., *Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 452-6.
44. Sohail, A., et al., *Human activation-induced cytidine deaminase causes transcription-dependent, strand-biased C to U deaminations*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(12): p. 2990-4.
45. Pasqualucci, L., et al., *Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 341-6.
46. Odegard, V.H. and D.G. Schatz, *Targeting of somatic hypermutation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 573-83.
47. Liu, M., et al., *Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation*. Nature, 2008. **451**(7180): p. 841-5.
48. Muschen, M., et al., *Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1833-40.
49. Butler, J.E., *Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals*. Rev Sci Tech, 1998. **17**(1): p. 43-70.
50. Ratcliffe, M.J., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 101-18.
51. Thompson, C.B. and P.E. Neiman, *Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment*. Cell, 1987. **48**(3): p. 369-78.
52. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
53. Reynaud, C.A., et al., *Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region*. Cell, 1989. **59**(1): p. 171-83.
54. Reynaud, C.A., V. Anquez, and J.C. Weill, *The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire*. Eur J Immunol, 1991. **21**(11): p. 2661-70.
55. Arakawa, H., J. Hauschild, and J.M. Buerstedde, *Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion*. Science, 2002. **295**(5558): p. 1301-6.
56. Sale, J.E., et al., *Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation*. Nature, 2001. **412**(6850): p. 921-6.
57. Di Noia, J.M. and M.S. Neuberger, *Immunoglobulin gene conversion in chicken DT40 cells largely proceeds through an abasic site intermediate generated by excision of the uracil produced by AID-mediated deoxycytidine deamination*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 504-8.
58. Takeda, S., et al., *RAG-2 expression is not essential for chicken immunoglobulin gene conversion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 4023-7.
59. Carlson, L.M., et al., *Templated insertions in the rearranged chicken IgL V gene segment arise by intrachromosomal gene conversion*. Genes Dev, 1990. **4**(4): p. 536-47.
60. Muramatsu, M., et al., *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, 1999. **274**(26): p. 18470-6.
61. Teng, G. and F.N. Papavasiliou, *Immunoglobulin somatic hypermutation*. Annu Rev Genet, 2007. **41**: p. 107-20.
62. Zan, H. and P. Casali, *Regulation of Aicda expression and AID activity*. Autoimmunity, 2013. **46**(2): p. 83-101.

63. Rawlings, D.J., et al., *Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 282-94.
64. Pone, E.J., et al., *BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 767.
65. Park, S.R., et al., *HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation*. Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 540-50.
66. Tran, T.H., et al., *B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 148-54.
67. Xu, Z., et al., *Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination*. Crit Rev Immunol, 2007. **27**(4): p. 367-97.
68. Pritchard, C.C., H.H. Cheng, and M. Tewari, *MicroRNA profiling: approaches and considerations*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(5): p. 358-69.
69. Teng, G., et al., *MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 621-9.
70. Dorsett, Y., et al., *MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 630-8.
71. de Yébenes, V.G., et al., *miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2199-206.
72. Borchert, G.M., N.W. Holton, and E.D. Larson, *Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 347.
73. Basso, K., et al., *BCL6 positively regulates AID and germinal center gene expression via repression of miR-155*. J Exp Med, 2012. **209**(13): p. 2455-65.
74. Ito, S., et al., *Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1975-80.
75. McBride, K.M., et al., *Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase*. J Exp Med, 2004. **199**(9): p. 1235-44.
76. Brar, S.S., M. Watson, and M. Diaz, *Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26395-401.
77. Cattoretti, G., et al., *Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3967-75.
78. Aoufouchi, S., et al., *Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1357-68.
79. Orthwein, A., et al., *Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90*. J Exp Med, 2010. **207**(12): p. 2751-65.
80. Basu, U., et al., *The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation*. Nature, 2005. **438**(7067): p. 508-11.
81. McBride, K.M., et al., *Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8798-803.
82. McBride, K.M., et al., *Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2585-94.
83. Vuong, B.Q., et al., *Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 420-6.

84. Chaudhuri, J., C. Khuong, and F.W. Alt, *Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets*. Nature, 2004. **430**(7003): p. 992-8.
85. Pasqualucci, L., et al., *PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(2): p. 395-400.
86. Besmer, E., E. Market, and F.N. Papavasiliou, *The transcription elongation complex directs activation-induced cytidine deaminase-mediated DNA deamination*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(11): p. 4378-85.
87. Fukita, Y., H. Jacobs, and K. Rajewsky, *Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 105-14.
88. Bachl, J., et al., *Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line*. J Immunol, 2001. **166**(8): p. 5051-7.
89. Pavri, R., et al., *Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5*. Cell, 2010. **143**(1): p. 122-33.
90. Nowak, U., et al., *The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA*. Nat Immunol, 2011. **12**(2): p. 160-6.
91. Xu, Z., et al., *14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(9): p. 1124-35.
92. Barreto, V., et al., *C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 501-8.
93. Shinkura, R., et al., *Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 707-12.
94. Yamane, A., et al., *Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 62-9.
95. Revy, P., et al., *Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)*. Cell, 2000. **102**(5): p. 565-75.
96. Rush, J.S., S.D. Fugmann, and D.G. Schatz, *Staggered AID-dependent DNA double strand breaks are the predominant DNA lesions targeted to S mu in Ig class switch recombination*. Int Immunol, 2004. **16**(4): p. 549-57.
97. Barnes, D.E. and T. Lindahl, *Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 445-76.
98. Kavli, B., et al., *Uracil in DNA--general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(4): p. 505-16.
99. Li, G.M., *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 85-98.
100. Petersen-Mahrt, S.K., R.S. Harris, and M.S. Neuberger, *AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 99-103.
101. Maul, R.W. and P.J. Gearhart, *AID and somatic hypermutation*. Adv Immunol, 2010. **105**: p. 159-91.
102. Fortini, P. and E. Dogliotti, *Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(4): p. 398-409.

103. Knippers, R., *Molekulare Genetik*. 2001.
104. Ling, H., et al., *Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication*. *Cell*, 2001. **107**(1): p. 91-102.
105. Daly, J., et al., *Altered Ig hypermutation pattern and frequency in complementary mouse models of DNA polymerase zeta activity*. *J Immunol*, 2012. **188**(11): p. 5528-37.
106. Jansen, J.G., et al., *Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice*. *J Exp Med*, 2006. **203**(2): p. 319-23.
107. Ross, A.L. and J.E. Sale, *The catalytic activity of REV1 is employed during immunoglobulin gene diversification in DT40*. *Mol Immunol*, 2006. **43**(10): p. 1587-94.
108. Zan, H., et al., *The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation*. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 643-53.
109. Diaz, M., et al., *Decreased frequency of somatic hypermutation and impaired affinity maturation but intact germinal center formation in mice expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta*. *J Immunol*, 2001. **167**(1): p. 327-35.
110. Edelbrock, M.A., S. Kaliyaperumal, and K.J. Williams, *Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities*. *Mutat Res*, 2013. **743-744**: p. 53-66.
111. Pena-Diaz, J. and J. Jiricny, *Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone?* *Trends Biochem Sci*, 2012. **37**(5): p. 206-14.
112. Constantin, N., et al., *Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(48): p. 39752-61.
113. Wilson, T.M., et al., *MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase eta, suggesting a role for A:T mutations in antibody genes*. *J Exp Med*, 2005. **201**(4): p. 637-45.
114. Matsuda, T., et al., *Error rate and specificity of human and murine DNA polymerase eta*. *J Mol Biol*, 2001. **312**(2): p. 335-46.
115. Roa, S., et al., *MSH2/MSH6 complex promotes error-free repair of AID-induced dU:G mispairs as well as error-prone hypermutation of A:T sites*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11182.
116. Rada, C., et al., *Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice*. *Curr Biol*, 2002. **12**(20): p. 1748-55.
117. Guikema, J.E., et al., *APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination*. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 3017-26.
118. Masani, S., L. Han, and K. Yu, *Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is the essential nuclease during immunoglobulin class switch recombination*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(7): p. 1468-73.
119. Stavnezer, J., J.E. Guikema, and C.E. Schrader, *Mechanism and regulation of class switch recombination*. *Annu Rev Immunol*, 2008. **26**: p. 261-92.
120. Rada, C., J.M. Di Noia, and M.S. Neuberger, *Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation*. *Mol Cell*, 2004. **16**(2): p. 163-71.
121. Di Noia, J.M., C. Rada, and M.S. Neuberger, *SMUG1 is able to excise uracil from immunoglobulin genes: insight into mutation versus repair*. *EMBO J*, 2006. **25**(3): p. 585-95.
122. Jentsch, S., J.P. McGrath, and A. Varshavsky, *The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme*. *Nature*, 1987. **329**(6135): p. 131-4.

123. Moldovan, G.L., B. Pfander, and S. Jentsch, *PCNA, the maestro of the replication fork*. Cell, 2007. **129**(4): p. 665-79.
124. Hoege, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
125. Leach, C.A. and W.M. Michael, *Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in Xenopus laevis egg extracts*. J Cell Biol, 2005. **171**(6): p. 947-54.
126. Arakawa, H., et al., *A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation*. PLoS Biol, 2006. **4**(11): p. e366.
127. Brown, S., A. Niimi, and A.R. Lehmann, *Ubiquitination and deubiquitination of PCNA in response to stalling of the replication fork*. Cell Cycle, 2009. **8**(5): p. 689-92.
128. Davies, A.A., et al., *Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a*. Mol Cell, 2008. **29**(5): p. 625-36.
129. Fox, J.T., K.Y. Lee, and K. Myung, *Dynamic regulation of PCNA ubiquitylation/deubiquitylation*. FEBS Lett, 2011. **585**(18): p. 2780-5.
130. Bienko, M., et al., *Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis*. Science, 2005. **310**(5755): p. 1821-4.
131. Friedberg, E.C., A.R. Lehmann, and R.P. Fuchs, *Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis?* Mol Cell, 2005. **18**(5): p. 499-505.
132. Kannouche, P.L., J. Wing, and A.R. Lehmann, *Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage*. Mol Cell, 2004. **14**(4): p. 491-500.
133. Kannouche, P.L. and A.R. Lehmann, *Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells*. Cell Cycle, 2004. **3**(8): p. 1011-3.
134. Plosky, B.S., et al., *Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin*. EMBO J, 2006. **25**(12): p. 2847-55.
135. Watanabe, K., et al., *RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(7): p. 2176-93.
136. Yang, W. and R. Woodgate, *What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15591-8.
137. Prakash, S., R.E. Johnson, and L. Prakash, *Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 317-53.
138. Waters, L.S., et al., *Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(1): p. 134-54.
139. Johnson, R.E., S. Prakash, and L. Prakash, *Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta*. Science, 1999. **283**(5404): p. 1001-4.
140. Masutani, C., et al., *Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity*. EMBO J, 1999. **18**(12): p. 3491-501.
141. Masutani, C., et al., *The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta*. Nature, 1999. **399**(6737): p. 700-4.
142. Lin, W., X. Wu, and Z. Wang, *A full-length cDNA of hREV3 is predicted to encode DNA polymerase zeta for damage-induced mutagenesis in humans*. Mutat Res, 1999. **433**(2): p. 89-98.

143. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
144. Ulrich, H.D. and S. Jentsch, *Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair*. EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3388-97.
145. Brusky, J., Y. Zhu, and W. Xiao, *UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 2000. **37**(3): p. 168-74.
146. Hofmann, R.M. and C.M. Pickart, *Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair*. Cell, 1999. **96**(5): p. 645-53.
147. Zhang, H. and C.W. Lawrence, *The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15954-9.
148. Stelter, P. and H.D. Ulrich, *Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 188-91.
149. Broomfield, S., B.L. Chow, and W. Xiao, *MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5678-83.
150. Broomfield, S., T. Hryciw, and W. Xiao, *DNA postreplication repair and mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Mutat Res, 2001. **486**(3): p. 167-84.
151. Chiu, R.K., et al., *Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations*. PLoS Genet, 2006. **2**(7): p. e116.
152. Xiao, W., et al., *The Saccharomyces cerevisiae RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways*. Genetics, 2000. **155**(4): p. 1633-41.
153. Lin, J.R., et al., *SHPRH and HLTF act in a damage-specific manner to coordinate different forms of postreplication repair and prevent mutagenesis*. Mol Cell, 2011. **42**(2): p. 237-49.
154. Krijger, P.H., et al., *HLTF and SHPRH are not essential for PCNA polyubiquitination, survival and somatic hypermutation: existence of an alternative E3 ligase*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(4): p. 438-44.
155. Motegi, A., et al., *Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12411-6.
156. Motegi, A., et al., *Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination*. J Cell Biol, 2006. **175**(5): p. 703-8.
157. Unk, I., et al., *Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18107-12.
158. Ciccica, A., et al., *Polyubiquitinated PCNA recruits the ZRANB3 translocase to maintain genomic integrity after replication stress*. Mol Cell, 2012. **47**(3): p. 396-409.
159. Weston, R., H. Peeters, and D. Ahel, *ZRANB3 is a structure-specific ATP-dependent endonuclease involved in replication stress response*. Genes Dev, 2012. **26**(14): p. 1558-72.

160. Yuan, J., G. Ghosal, and J. Chen, *The HARP-like domain-containing protein AH2/ZRANB3 binds to PCNA and participates in cellular response to replication stress*. Mol Cell, 2012. **47**(3): p. 410-21.
161. Mailand, N., I. Gibbs-Seymour, and S. Bekker-Jensen, *Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(5): p. 269-82.
162. Amm, I., T. Sommer, and D.H. Wolf, *Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 182-96.
163. Mukhopadhyay, D. and H. Riezman, *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. Science, 2007. **315**(5809): p. 201-5.
164. Teixeira, L.K. and S.I. Reed, *Ubiquitin ligases and cell cycle control*. Annu Rev Biochem, 2013. **82**: p. 387-414.
165. Metzger, M.B., V.A. Hristova, and A.M. Weissman, *HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 3): p. 531-7.
166. Scheffner, M. and S. Kumar, *Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 61-74.
167. Metzger, M.B., et al., *RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 47-60.
168. Ardley, H.C. and P.A. Robinson, *E3 ubiquitin ligases*. Essays Biochem, 2005. **41**: p. 15-30.
169. Maspero, E., et al., *Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(6): p. 696-701.
170. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.
171. Plechanovova, A., et al., *Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 115-20.
172. Sood, R., et al., *Cloning and characterization of a novel gene, SHPRH, encoding a conserved putative protein with SNF2/helicase and PHD-finger domains from the 6q24 region*. Genomics, 2003. **82**(2): p. 153-61.
173. Moldovan, G.L. and A.D. D'Andrea, *DNA damage discrimination at stalled replication forks by the Rad5 homologs HLF and SHPRH*. Mol Cell, 2011. **42**(2): p. 141-3.
174. Bachl, J., I. Ertongur, and B. Jungnickel, *Involvement of Rad18 in somatic hypermutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12081-6.
175. Roa, S., et al., *Ubiquitylated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class-switch recombination and is required for meiotic progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16248-53.
176. Langerak, P., et al., *Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: lessons from proliferating cell nuclear antigenK164R mutant mice*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1517): p. 621-9.
177. Simpson, L.J. and J.E. Sale, *Rev1 is essential for DNA damage tolerance and non-templated immunoglobulin gene mutation in a vertebrate cell line*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1654-64.
178. Krijger, P.H., et al., *PCNA ubiquitination-independent activation of polymerase eta during somatic hypermutation and DNA damage tolerance*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(10): p. 1051-9.

179. Saribasak, H. and P.J. Gearhart, *Does DNA repair occur during somatic hypermutation?* Semin Immunol, 2012. **24**(4): p. 287-92.
180. Zhao, G.Y., et al., *A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination.* Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 663-75.
181. Ertongur, I., et al., *Ubc13 dosage is critical for immunoglobulin gene conversion and gene targeting in vertebrate cells.* Nucleic Acids Res, 2010. **38**(14): p. 4701-7.
182. Ertongur, S.I., *Funktionen und Regulation der PCNA-Ubiquitinierung in Vertebraten.* Doktorarbeit, 2009.
183. Baba, T.W. and E.H. Humphries, *Formation of a transformed follicle is necessary but not sufficient for development of an avian leukosis virus-induced lymphoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(1): p. 213-6.
184. Cooper, M.D., et al., *Pathogenesis of avian lymphoid leukosis. I. Histogenesis.* J Natl Cancer Inst, 1968. **41**(2): p. 373-8.
185. Buerstedde, J.M., et al., *Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line.* EMBO J, 1990. **9**(3): p. 921-7.
186. Kim, S., et al., *Ongoing diversification of the rearranged immunoglobulin light-chain gene in a bursal lymphoma cell line.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(6): p. 3224-31.
187. Arakawa, H., D. Lodygin, and J.M. Buerstedde, *Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs.* BMC Biotechnol, 2001. **1**: p. 7.
188. Arakawa, H., H. Saribasak, and J.M. Buerstedde, *Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate.* PLoS Biol, 2004. **2**(7): p. E179.
189. Buerstedde, J.M. and S. Takeda, *Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines.* Cell, 1991. **67**(1): p. 179-88.
190. Marchler-Bauer, A., et al., *CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.* Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D225-9.
191. Buerstedde, J.-M. and S. Takeda, *Reviews and protocols in DT40 research.* Subcellular biochemistry, 2006, New York: Springer. xii, 477 p.
192. Ramakrishnan, V., et al., *Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding.* Nature, 1993. **362**(6417): p. 219-23.
193. Bienz, M., *The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain.* Trends Biochem Sci, 2006. **31**(1): p. 35-40.
194. Aasland, R., T.J. Gibson, and A.F. Stewart, *The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation.* Trends Biochem Sci, 1995. **20**(2): p. 56-9.
195. Ryan, D.P. and T. Owen-Hughes, *Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion.* Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(5): p. 649-56.
196. Morrison, A.J. and X. Shen, *Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(6): p. 373-84.
197. Moertl, S., et al., *Regulation of double-stranded DNA gap repair by the RAD6 pathway.* DNA Repair (Amst), 2008. **7**(11): p. 1893-906.
198. Gangavarapu, V., et al., *Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): p. 7783-90.
199. Kim, J.L., et al., *Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding.* Structure, 1998. **6**(1): p. 89-100.
200. Parish, C.R., *Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies.* Immunol Cell Biol, 1999. **77**(6): p. 499-508.

201. Beranek, D.T., C.C. Weis, and D.H. Swenson, *A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography*. *Carcinogenesis*, 1980. **1**(7): p. 595-606.
202. Krokan, H.E., et al., *Base excision repair of DNA in mammalian cells*. *FEBS Lett*, 2000. **476**(1-2): p. 73-7.
203. Nojima, K., et al., *Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(24): p. 11704-11.
204. Fichtinger-Schepman, A.M., et al., *Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation*. *Biochemistry*, 1985. **24**(3): p. 707-13.
205. Deans, A.J. and S.C. West, *DNA interstrand crosslink repair and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(7): p. 467-80.
206. Long, B.H. and D.A. Stringfellow, *Inhibitors of topoisomerase II: structure-activity relationships and mechanism of action of podophyllin congeners*. *Adv Enzyme Regul*, 1988. **27**: p. 223-56.
207. Wohlbold, L. and R.P. Fisher, *Behind the wheel and under the hood: functions of cyclin-dependent kinases in response to DNA damage*. *DNA Repair (Amst)*, 2009. **8**(9): p. 1018-24.
208. Zlatanou, A., et al., *The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol eta in response to oxidative DNA damage in human cells*. *Mol Cell*, 2011. **43**(4): p. 649-62.
209. Simpson, L.J., et al., *RAD18-independent ubiquitination of proliferating-cell nuclear antigen in the avian cell line DT40*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(9): p. 927-32.
210. Terai, K., et al., *CRL4(Cdt2) E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates PCNA to promote translesion DNA synthesis*. *Mol Cell*, 2010. **37**(1): p. 143-9.
211. Zhang, S., et al., *PCNA is ubiquitinated by RNF8*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(21): p. 3399-404.
212. Campo, V.A., et al., *MSH6- or PMS2-deficiency causes re-replication in DT40 B cells, but it has little effect on immunoglobulin gene conversion or on repair of AID-generated uracils*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(5): p. 3032-46.
213. Maccarthy, T., et al., *SHMTool: a webserver for comparative analysis of somatic hypermutation datasets*. *DNA Repair (Amst)*, 2009. **8**(1): p. 137-41.
214. Frankenberger, S., *Die Rolle der Checkpoint-Kinase 1 in der Immunglobulin-Diversifizierung*, in *Helmholtz Zentrum für Gesundheit und Umwelt München*. 2013, Ludwig-Maximilians-Universität München.
215. Doroshow, J., *Anthracyclines and anthracenediones*. *Cancer chemotherapy and biotherapy principles and practice*, ed. In B. A. Chabner & D. L. Longo (Eds). Vol. 2. 1996, Philadelphia, PA: Lippincott-Raven.
216. Nitiss, J. and J.C. Wang, *DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(20): p. 7501-5.
217. Maede, Y., et al., *Differential and Common DNA Repair Pathways for Topoisomerase I- and II-Targeted Drugs in a Genetic DT40 Repair Cell Screen Panel*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(1): p. 214-20.
218. Otsuki, M., et al., *WRN counteracts the NHEJ pathway upon camptothecin exposure*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **355**(2): p. 477-82.
219. Bertolini, L.R., et al., *Increased gene targeting in Ku70 and Xrcc4 transiently deficient human somatic cells*. *Mol Biotechnol*, 2009. **41**(2): p. 106-14.

220. Iizumi, S., et al., *Impact of non-homologous end-joining deficiency on random and targeted DNA integration: implications for gene targeting*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(19): p. 6333-42.
221. Bezzubova, O., et al., *Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54^{-/-} mutant of the chicken DT40 cell line*. Cell, 1997. **89**(2): p. 185-93.
222. Takata, M., et al., *Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2858-66.
223. Hamimes, S., et al., *RDMI, a novel RNA recognition motif (RRM)-containing protein involved in the cell response to cisplatin in vertebrates*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9225-35.
224. Buerstedde, J.M. and H. Arakawa, *Immunoglobulin gene conversion or hypermutation: that's the question*. Subcell Biochem, 2006. **40**: p. 11-24.
225. Hatanaka, A., et al., *Similar effects of Brca2 truncation and Rad51 paralog deficiency on immunoglobulin V gene diversification in DT40 cells support an early role for Rad51 paralogs in homologous recombination*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1124-34.
226. Longerich, S., et al., *Brcal in immunoglobulin gene conversion and somatic hypermutation*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(2): p. 253-66.
227. Niedzwiedz, W., et al., *The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 607-20.
228. Yamamoto, K., et al., *Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(15): p. 5421-30.
229. Tang, E.S. and A. Martin, *NHEJ-deficient DT40 cells have increased levels of immunoglobulin gene conversion: evidence for a double strand break intermediate*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(21): p. 6345-51.
230. Tang, E.S. and A. Martin, *Immunoglobulin gene conversion: synthesizing antibody diversification and DNA repair*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(11): p. 1557-71.
231. Evans, T.J., et al., *Mutant cells defective in DNA repair pathways provide a sensitive high-throughput assay for genotoxicity*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(12): p. 1292-8.
232. Johnson, R.E., et al., *Saccharomyces cerevisiae RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(9): p. 3807-18.
233. Krivega, I. and A. Dean, *Enhancer and promoter interactions-long distance calls*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(2): p. 79-85.
234. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11364-9.
235. Ulrich, H.D., *Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7051-8.
236. Scheel, H. and K. Hofmann, *No evidence for PHD fingers as ubiquitin ligases*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(6): p. 285-7; author reply 287-8.
237. Sanchez, R. and M.M. Zhou, *The PHD finger: a versatile epigenome reader*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(7): p. 364-72.
238. Scharer, O.D. and J. Jiricny, *Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases*. Bioessays, 2001. **23**(3): p. 270-81.

239. Chelli, M. and M. Alizon, *Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46975-82.
240. Huang, T.T., et al., *Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(4): p. 339-47.
241. Pan, H.W., et al., *Role of L2DTL, cell cycle-regulated nuclear and centrosome protein, in aggressive hepatocellular carcinoma*. Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2676-87.
242. Schindl, M., et al., *Overexpression of the human homologue for Caenorhabditis elegans cul-4 gene is associated with poor outcome in node-negative breast cancer*. Anticancer Res, 2007. **27**(2): p. 949-52.
243. Masuda, Y., et al., *En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(20): p. 10394-407.
244. Nakamura, J., et al., *Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions*. Cancer Res, 1998. **58**(2): p. 222-5.
245. Lindahl, T. and B. Nyberg, *Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid*. Biochemistry, 1972. **11**(19): p. 3610-8.
246. Lindahl, T. and D.E. Barnes, *Repair of endogenous DNA damage*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2000. **65**: p. 127-33.
247. Debauve, G., et al., *The helicase-like transcription factor and its implication in cancer progression*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(4): p. 591-604.
248. Helmer, R.A., et al., *Role of helicase-like transcription factor (hltf) in the G2/m transition and apoptosis in brain*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66799.
249. Helmer, R.A., et al., *Helicase-like transcription factor (hltf) regulates g2/m transition, wt1/gata4/hif-1a cardiac transcription networks, and collagen biogenesis*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80461.
250. Li, W., et al., *Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1487.
251. Brun, J., et al., *Regulation of PCNA polyubiquitination in human cells*. BMC Res Notes, 2010. **3**: p. 85.
252. Wyatt, M.D. and D.L. Pittman, *Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks*. Chem Res Toxicol, 2006. **19**(12): p. 1580-94.
253. Ball, L.G., et al., *The Rad5 helicase activity is dispensable for error-free DNA post-replication repair*. DNA Repair (Amst), 2014. **16C**: p. 74-83.
254. Minca, E.C. and D. Kowalski, *Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks*. Mol Cell, 2010. **38**(5): p. 649-61.
255. Wang, X., et al., *Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly*. EMBO J, 1999. **18**(16): p. 4549-59.
256. Brymora, A., et al., *Enhanced protein recovery and reproducibility from pull-down assays and immunoprecipitations using spin columns*. Anal Biochem, 2001. **295**(1): p. 119-22.

257. Toutain, P.L., A. Ferran, and A. Bousquet-Melou, *Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Handb Exp Pharmacol, 2010(199): p. 19-48.
258. Martin, L.P., T.C. Hamilton, and R.J. Schilder, *Platinum resistance: the role of DNA repair pathways*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1291-5.
259. Rabik, C.A. and M.E. Dolan, *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*. Cancer Treat Rev, 2007. **33**(1): p. 9-23.
260. Koberle, B., et al., *Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours*. Curr Biol, 1999. **9**(5): p. 273-6.
261. Welsh, C., et al., *Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines*. Int J Cancer, 2004. **110**(3): p. 352-61.
262. Perego, P., et al., *Sensitivity to cisplatin and platinum-containing compounds of Schizosaccharomyces pombe rad mutants*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(1): p. 213-9.
263. Casali, P., et al., *DNA repair in antibody somatic hypermutation*. Trends Immunol, 2006. **27**(7): p. 313-21.
264. Spence, J., et al., *A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(3): p. 1265-73.
265. Hadian, K., et al., *NF-kappaB essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 26107-17.
266. Ahne, F., B. Jha, and F. Eckardt-Schupp, *The RAD5 gene product is involved in the avoidance of non-homologous end-joining of DNA double strand breaks in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(4): p. 743-9.
267. Lambert, S., et al., *Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange*. Mol Cell, 2010. **39**(3): p. 346-59.
268. Burkovics, P., et al., *Strand invasion by HLTF as a mechanism for template switch in fork rescue*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(3): p. 1711-20.
269. Adachi, N., et al., *Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 35897-902.
270. Kakarougkas, A. and P.A. Jeggo, *DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism*. Br J Radiol, 2014. **87**(1035): p. 20130685.
271. Betermier, M., P. Bertrand, and B.S. Lopez, *Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process?* PLoS Genet, 2014. **10**(1): p. e1004086.
272. Deriano, L. and D.B. Roth, *Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage*. Annu Rev Genet, 2013. **47**: p. 433-55.
273. Chiruvella, K.K., Z. Liang, and T.E. Wilson, *Repair of double-strand breaks by end joining*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a012757.
274. Mao, Z., et al., *DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells*. Cell Cycle, 2008. **7**(18): p. 2902-6.
275. Adachi, N., S. So, and H. Koyama, *Loss of nonhomologous end joining confers camptothecin resistance in DT40 cells. Implications for the repair of topoisomerase I-mediated DNA damage*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37343-8.
276. Frampton, J., et al., *Postreplication repair and PCNA modification in Schizosaccharomyces pombe*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(7): p. 2976-85.

277. Thompson, L.H., *Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography*. *Mutat Res*, 2012. **751**(2): p. 158-246.
278. Jeggo, P.A., V. Geuting, and M. Lobrich, *The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 7-12.
279. Saleh-Gohari, N. and T. Helleday, *Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(12): p. 3683-8.
280. Cui, X., et al., *Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(1): p. 64-7.
281. Yamamoto, K., et al., *Fanconi anemia protein FANCD2 promotes immunoglobulin gene conversion and DNA repair through a mechanism related to homologous recombination*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(1): p. 34-43.
282. Arakawa, H. and J.M. Buerstedde, *Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line*. *Dev Dyn*, 2004. **229**(3): p. 458-64.
283. Kawamoto, T., et al., *Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis*. *Mol Cell*, 2005. **20**(5): p. 793-9.
284. Szuts, D., et al., *Role for RAD18 in homologous recombination in DT40 cells*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(21): p. 8032-41.
285. Watanabe, K., et al., *Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination*. *EMBO J*, 2004. **23**(19): p. 3886-96.
286. Schmutz, V., et al., *Role of the ubiquitin-binding domain of Poleta in Rad18-independent translesion DNA synthesis in human cell extracts*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(19): p. 6456-65.
287. McIlwraith, M.J., et al., *Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination*. *Mol Cell*, 2005. **20**(5): p. 783-92.
288. Sorensen, C.S., et al., *The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(2): p. 195-201.
289. Frankenberger, S., et al., *Checkpoint kinase 1 negatively regulates somatic hypermutation*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(6): p. 3666-74.
290. Smith, S., et al., *Histone deacetylase inhibitors selectively target homology dependent DNA repair defective cells and elevate non-homologous endjoining activity*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e87203.
291. Nalabothula, N. and F. Carrier, *Cancer cells' epigenetic composition and predisposition to histone deacetylase inhibitor sensitization*. *Epigenomics*, 2011. **3**(2): p. 145-55.
292. Machado, L.E., et al., *PHD domain from human SHPRH*. *J Biomol NMR*, 2013. **56**(4): p. 393-9.
293. Marblestone, J.G., et al., *Comprehensive ubiquitin E2 profiling of ten ubiquitin E3 ligases*. *Cell Biochem Biophys*, 2013. **67**(1): p. 161-7.
294. Unk, I., et al., *Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance*. *DNA Repair (Amst)*, 2010. **9**(3): p. 257-67.
295. Grotzky, D., *Investigations towards the functions and interactions of the Rad5 ortholog SHPRH*. Diplomarbeit, 2009.

296. Baba, T.W., B.P. Giroir, and E.H. Humphries, *Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes*. *Virology*, 1985. **144**(1): p. 139-51.
297. Baba, T.W. and E.H. Humphries, *Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines*. *Virology*, 1984. **135**(1): p. 181-8.
298. Hayward, W.S., B.G. Neel, and S.M. Astrin, *Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis*. *Nature*, 1981. **290**(5806): p. 475-80.
299. Yamazoe, M., et al., *Reverse genetic studies of the DNA damage response in the chicken B lymphocyte line DT40*. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 1175-85.
300. Sonoda, E., et al., *Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death*. *EMBO J*, 1998. **17**(2): p. 598-608.
301. Chang, H. and M.E. Delany, *Karyotype stability of the DT40 chicken B cell line: macrochromosome variation and cytogenetic mosaicism*. *Chromosome Res*, 2004. **12**(3): p. 299-307.
302. Neiman, P.E., et al., *Analysis of gene expression, copy number and palindrome formation with a Dt40 enriched cDNA microarray*. *Subcell Biochem*, 2006. **40**: p. 245-56.
303. Nawaz, H.M., et al., *Expression profiling of chicken DT40 lymphoma cells indicates clonal selection of knockout and gene reconstituted cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **377**(2): p. 584-8.
304. Takao, N., et al., *Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation*. *Oncogene*, 1999. **18**(50): p. 7002-9.
305. Sui, G., et al., *Yin Yang 1 is a negative regulator of p53*. *Cell*, 2004. **117**(7): p. 859-72.
306. Tanikawa, J., et al., *p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(20): p. 15578-85.
307. Arakawa, H., *Excision of floxed-DNA sequences by transient induction of Mer-Cre-Mer*. *Subcell Biochem*, 2006. **40**: p. 347-9.
308. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. 1975. *Biotechnology*, 1992. **24**: p. 122-39.
309. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. *Biotechnology (N Y)*, 1992. **10**(4): p. 413-7.
310. Meuer, S.C., C. Wittwer, and K. Nakagawara, *Rapid cycle real-time PCR : methods and applications*. 2001, Berlin ; New York: Springer. xi, 408 p.
311. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
312. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
313. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

7 ABKÜRZUNGEN

α	Alpha/anti-
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
ϵ	Epsilon
μ	micro
μF	Microfarad
μg	Mikrogramm
μ -Kette	schwere Kette des IgM
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
η	Eta
θ	Theta
ΨV	Psi (Pseudogene der variable Region)

A

Abb.	Abbildung
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APE	apurinische/apyrimidinische Endonuklease
APS	Ammoniumpersulfat
AP-Stelle	apyrimidinische Stelle
AT	Mutation an A:T-Basenpaar

B

Bcl6	B-cell CLL/lymphoma 6
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserum Albumin
BZR	<i>B cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor

C

C	Cytidin
c-Myc	avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
C-Region	<i>constant region</i> , konstante Region
ca.	circa
CAG	<i>chicken β-actin</i>
CD	<i>cluster of differentiation antigen</i>
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CDR	complementary determining region
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester

CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
Chk1/2	Checkpoint kinase ½
Cisplatin	Cis-Diamindichloroplatin
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	cyclization recombination
CSR	<i>class switch recombination</i> , Klassenwechselrekombination

D

DSB	Doppelstrangbrüche
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA Proteinkinase
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat
D-Segment	<i>diversity</i> -Segment des V-Gens
DTT	Dithiothreitol

E

E2	Ubiquitin verbindendes Enzym
E3	Ubiquitin Ligase
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alterae</i> , und andere
Exo	Exonuklease
Exon	expressed region

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FANCD2/E/M	Fanconi anemia, complementation group D2/E/M

G

g	Gramm
G	Guanin
GC	<i>gene conversion</i> , Ig-Genkonversion
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grün-fluoreszierendes Protein
GKM	Genkonversionsmutationen
GPT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase aus E.coli

H

H15	<i>histon 1 and 5</i>
-----	-----------------------

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA-	Hämagglutinin
HDAC	Histon-Deacetylasen
HR	homologe Rekombination
HLTF	<i>helicase-like transcription factor</i>
I	
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
IL	Interleukin
IR	<i>ionising radiation</i>
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> , interne Ribosomeneintrittsstelle
J	
J-Segment	<i>joining</i> -Segment des V-Gens
K	
K	Lysin
K164	Lysin an Position 164
K164R	Lysin an Position 164 wurde gegen ein Arginin ausgetauscht
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	
l	Liter
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
loxP	<i>locus of X-over of P1-sites</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	
M	molar
Mbp	Megabasenpaar (eine Million Basenpaare)
MCSA	<i>methylcellulose colony survival assay</i> , Methylzellulose Überlebens-Assay
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMR	<i>mismatch</i> -Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure

MSH2/6 mutS homolog 2
Mut./bp Mutationen pro Basenpaar

N

N-Nukleotide nicht-matrizenkodierte Nukleotide
NaOH Natriumhydroxid
NER Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NES *nuclear export signal*, Kernexportsignal
ng Nanogramm
NHEJ *non homologous end joining*, nicht homologe Endverknüpfung
NK-Zellen *natural killer cells*
nm Nanometer
NZF *NPI4 zinc-finger*

O

O₂ Sauerstoff
OHT 4-Hydroxy-Tamoxifen

P

P Phosphorylierung
P-Nukleotide Palindromische Nukleotide
PA Polyacrylamid
PBS *phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA *proliferating cell nuclear antigen*
PCR *polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion
PE Phycoerythrin (rot fluoreszierend im FACS)
pH *pondus Hydrogenii*, Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen
Wirkung einer wässrigen Lösung
PHD *plant homeodomain*
PIP *PCNA interacting peptide*
PKA Proteinkinase A
PM Punktmutation
Pol Polymerase
PRR post-replikative Reparatur
Puro Puromycin
PTBP *Polypyrimidine tract-binding protein*

Q

q-PCR *quantitative real-time polymerase chain reaction*

R

R Purin (Adenin oder Guanin)
Rag Rekombinationsaktivierende Gene
RDM1 *Rad52 motif 1*
Rek. rekonstituiert
RING *Really Interesting New Gene*

RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR

S

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S-Phase	<i>synthesis-Phase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
SHM	somatische Hypermutation
SHPRH	<i>SNF2 histone linker PHD RING helicase</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
slg	<i>surface immunoglobulin</i> , Oberflächen-Immunglobulin
SNF	<i>sucrose non fermentable</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV40	Simian Virus 40
SWI	<i>switch</i>

T

T	Thymin
<i>Tag</i>	Markierung
Tab.	Tabelle
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TLS	Transläsionssynthese
Top I und II	Topoisomerase I und II
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TS	Transitionsmutationen
TV	Transversionsmutationen
TZR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor

U

U	<i>Unit</i>
UBM	<i>ubiquitin-binding motif</i>
UBZ	<i>ubiquitin-binding zinc finger</i>
UNG	Uracil-Glykosylase
UV	ultraviolettes Licht

V

V	Volt
V-Gen	Gen der variablen Region
V-Region	variable Region
V-Segment	variables Segment des V-Gens

VH V-Segment der schweren Ig-Kette
VL V-Segment der leichten Ig-Kette

W

WT Wildtyp

X

XRCC1 x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells1
XRCC2/3 x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster
cells2/3

Z

z.B. zum Beispiel
z.T. zum Teil
ZM zweideutige Mutation

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte mich bei Allen bedanken die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben und mir geholfen haben alle Hochs und Tiefs durchzustehen.

Vor allem danke ich Prof. Dr. Berit Jungnickel für dieses spannende Thema mit all seinen Herausforderungen. Ich möchte ihr für die Unterstützung, gute Betreuung und Geduld während der Dissertation bedanken und dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Angelika Böttger, PD Dr. Josef Mautner, Prof. Dr. Heinrich Jung, und Prof. Dr. Michael Schleicher für die Übernahme der Begutachtung herzlich bedanken.

Ich möchte der Münchner Arbeitsgruppe und guten Bekannten aus dem Helmholtz Zentrum sowie der DINI für den guten Start ins Forscherleben danken.

Mein besonderer Dank geht auch an Julia Jeschke, die den Umzug nach Jena mitgemacht hat. Zusammen haben wir viel Zeit im Auto nach München und durch Kanada verbracht. Du hast mit deiner guten Art den Einstieg in die neue Umgebung erheblich erleichtert.

Ich möchte mich auch herzlich bei Samantha Frankenberger bedanken, die mir sowohl persönlich als auch beruflich immer mit Rat und Tat und aufmunternden Worten zur Seite stand.

Auch möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Heinzl bedanken, die mir und der ganzen AG kurz nach dem Umzug und bis heute in vielen Situationen geholfen hat. Besonders möchte ich hier Tobias Wagner erwähnen, der für fast jedes Problem eine Lösung hat und sich immer Zeit für die Unterstützung nimmt.

Vielen Dank an Christian Kosan für die hilfreichen Diskussionen und konstruktiven Beiträge zu meiner Arbeit und die fröhlichen Treffen nach der Arbeit.

An dieser Stelle ein großes Dankeschön an Daniel Kritsch. Du hast mir mit viel Engagement das soziale Umfeld in Jena gezeigt und wir hatten viel Spaß zusammen.

Danke auch an Benjamin Födich für die Aufnahme in eure nette Runde und die vielen lustigen und von der Arbeit ablenkenden Stunden.

Ich danke auch der neuen Generation der AG Jungnickel. Es ist schön dass wir weiter zusammenwachsen und auch hier eine familiäre Stimmung entsteht. Hierbei möchte ich

besonders Angelika Schmidt danken. Sie ist die gute Seele im Labor und stand mir mehrmals in fast aussichtslosen Situationen zur Seite.

Danke auch an Felix Strasser und Karl-Gunter Glowalla für die spontane und gründliche Korrektur der Arbeit.

Ein großer Dank geht an meine Mutter, Fritz und Laura. Ohne Euch und die Abwechslung zu Hause hätte ich es nie geschafft. Danke Mama, dass Du immer an mich geglaubt hast und mich immer wieder ermutigt hast weiter zu machen.

Und zuletzt noch ein riesiges Dankeschön an meine Freundin Kathrin Davari. Du hast viel dazu beigetragen, dass ich durchgehalten habe. Du hast mir mit unglaublich viel Ausdauer zur Seite gestanden und mir den Weg gezeigt, wenn ich nicht mehr weiter wusste. Danke für deine Unterstützung!

9 LEBENSLAUF

Nils-Sebastian Tomi

Diese Dissertation wurde von April 2009 bis Juli 2014 am Helmholtz Zentrum München im Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik sowie an der der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Bereich Zellbiologie, Institut für Biochemie und Biophysik angefertigt.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

München, den.....

.....

Nils-Sebastian Tomi

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den.....

.....

Nils-Sebastian Tomi