

Untersuchung der Regulation und Interaktionen der
Aktivierungsinduzierten Cytidineaminase (AID)
in humanen B-Lymphozyten

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

28. Juni 2007

Stephanie Tobollik

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
2. Gutachter: PD Dr. Anna Friedl
Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.07

Gewidmet meinen Eltern
und meiner Tochter

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Axel Greiner, Stephanie Tobollik, Maïke Buettner, Berit Jungnickel, Kathrin Herrmann, Elisabeth Kremmer and Gerald Niedobitek (2005). Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J.Pathol.* 205, 541-547

Stephanie Tobollik, Linda Meyer, Maïke Buettner, Sandra Klemmer, Bettina Kempkes, Elisabeth Kremmer, Gerald Niedobitek and Berit Jungnickel (2006). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 inhibits AID expression during EBV-driven B-cell growth. *BLOOD* 108, 3859-3864

Die Arbeit wurde auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

36th Annual Meeting of the DGfI German Society of Immunology, Kiel 2005 (Poster)
4th B cell Forum, Kloster Banz 2006 (Vortrag)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Die Keimzentrumsreaktion	3
2.2	Die Somatische Hypermutation	4
2.3	Mechanismen der B-Zell Lymphomentstehung.....	7
2.4	Das Epstein-Barr Virus	8
2.5	Die Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase	11
2.5.1	AID-Regulation.....	14
2.5.2	AID-Interaktionen	15
2.6	Tandem Affinitätsreinigung (TAP-Reinigung).....	16
2.7	Nano-LC und MALDI-Massenspektrometrie	16
2.8	Zielsetzung	19
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Etablierung eines Antikörpers gegen AID und Untersuchungen zur AID-Expression in B-Zell Lymphomen.....	21
3.2	Untersuchungen zur AID-Regulation durch das Epstein-Barr-Virus	26
3.3	Identifikation von AID-Interaktionspartnern	33
3.3.1	Tandem Affinitätsreinigung	34
3.3.1.1	Konstruktion verschiedener TAP-AID-Expressionsvektoren.....	34
3.3.1.2	Funktioneller Test der TAP-AID-Fusionsproteine	36
3.3.1.3	Expression der TAP-AID-Fusionsproteine in Raji-Einzelzellklonen	38
3.3.1.4	AID-Komplexe in der Zelle	40
3.3.1.5	Etablierung der TAP-Reinigung.....	43
3.3.2	Nano-Flüssigchromatographie und MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometrie.....	50
3.3.3	Potentielle AID-Interaktionspartner	54
4	Diskussion.....	59
4.1	AID-Expression in humanen B-Zellen und in primärem Lymphomgewebe	59
4.2	Einfluss von EBV auf die AID-Expression während des Latenz III-Programm	62
4.3	AIDosom- neue Einblicke in die AID-Regulation.....	64
4.3.1	Aufreinigung von AID-Komplexen	64
4.3.2	Prozessierung der gereinigten AID-Komplexe	68
4.3.3	Interessante AID-Interaktionspartner	70
4.4	Ausblick	75
5	Material.....	77
5.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	77
5.2	Verwendete Kits.....	77
5.3	Bakterien	77
5.4	Enzyme.....	78
5.5	Proteingrößenstandard.....	78
5.6	Antikörper	78
5.7	Oligonukleotide.....	79
5.8	Zelllinien	80
5.9	Datenverarbeitung	80

5.10	Peptide für AID-Antikörpergenerierung	81
6	Methoden	82
6.1	Standardmethoden	82
6.2	Klonierung	82
6.2.1	TAP-AID Expressionsvektoren	82
6.3	Zellkultur	84
6.3.1	Inaktivierung und Reaktivierung von EBNA2 in der Zelllinie EREB2-5	85
6.4	Transfektion	85
6.5	Generierung von Einzelzellklonen	86
6.6	Western-Blot-Analyse	86
6.7	Reverse Transkription-PCR	86
6.8	Quantitative RT-PCR	87
6.9	FACS (Fluorescence activated cell scanner)	88
6.10	Generierung monoklonaler anti-AID-Antikörper	89
6.11	Gelfiltration	89
6.12	Tandem Affinitätsreinigung	89
6.13	Immunpräzipitation	90
6.14	Trichloressigsäure-Fällung	91
6.15	Silberfärbung	91
6.16	Trypsinverdau im Gel	91
6.17	Nano-Hochleistungsflüssigchromatographie	92
6.18	MALDI-TOF/TOF-MS	93
7	Literaturverzeichnis	95
	Abkürzungsverzeichnis	106
	Abbildungsverzeichnis	109
	Tabellenverzeichnis	110
	Danksagung	111
	Ehrenwörtliche Erklärung	113
	Erklärung	114
	Lebenslauf	115
	Anhang	116

1 Zusammenfassung

In Vertebraten hat sich ein adaptives Immunsystem entwickelt, das mit einer Vielzahl an Antigenrezeptoren eine unlimitierte Anzahl von Pathogenen erkennen kann. In B-Zellen können diese Rezeptoren (Immunglobuline oder Antikörper), die früh während der B-Zellentwicklung gebildet werden, später während der T-Zell-abhängigen Immunantwort im Keimzentrum verändert werden. Durch den Prozess der Somatischen Hypermutation (SHM) können hochaffine Antikörper entstehen und deren gezielte Effektorfunktion kann durch die Klassenwechselrekombination (CSR) verändert werden. Diese beiden wichtigen Prozesse werden durch das Schlüsselprotein Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase (AID) reguliert, das durch Deaminierung von Cytosinen die initialen DNA-Läsionen einführt. Die Fehlleitung dieser Prozesse, die während der Keimzentrumsreaktion stattfinden, spielt eine Rolle bei der Lymphomentstehung.

In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen ein AID-Peptid generiert, um die AID-Expression und -Regulation zu untersuchen. Die Antikörper sind für immunhistochemische Färbungen verwendbar, so dass die AID-Expression in Keimzentrums-B-Zellen und Lymphomen *in vivo* analysiert werden konnte. AID wurde so als differentieller und diagnostischer Marker für zwei Hodgkin Lymphom-Entitäten identifiziert.

Außerdem wurden Untersuchungen zur AID-Regulation durch Latenzgene des Epstein-Barr Virus (EBV) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der EBV-Haupttranskriptionsfaktor EBNA2, der das Latenzprogramm III in humanen B-Zellen initiiert, einen negativen Einfluss auf die AID-Expression hat. Auch *in vivo* ist dieser inhibitorische Effekt über die anderen Latenz III Proteine dominant und hat durch die Modulation der AID-Expression einen Einfluss auf die Aktivität der Ig-diversifizierenden Prozesse.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Tandem Affinitätsreinigung (TAP) in B-Zellen etabliert. Mit dieser Methode gelang es native AID-Proteinkomplexe aus einer hypermutierenden B-Zelllinie aufzureinigen. Die gereinigten Komplexe wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Unter den potentiellen AID-Interaktionspartnern, die hier identifiziert wurden, finden sich unter anderem Transkriptionsfaktoren, Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems und Faktoren der DNA-Reparaturmaschinerie. Diese AID-interagierenden Proteine geben Hinweise für die AID-Regulation bzw. -Funktion und dienen als Ausgangspunkt für spätere funktionelle Analysen.

2 Einleitung

Der Mensch ist täglich einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt, deshalb benötigt er effiziente Abwehrmechanismen, um diese unschädlich zu machen. Der erste Schutz gegen Erreger wird durch die angeborene Immunität bereitgestellt, die jedoch Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen kann. Die spezifische Abwehr leistet das adaptive Immunsystem, dessen Komponenten mit denen des angeborenen Systems interagieren (Janeway et al., 2004). Die antigenspezifischen Lymphozyten vermehren sich und differenzieren zu Effektorzellen, die die pathogenen Mikroorganismen gezielt abwehren. Die Hauptkomponenten der adaptiven Immunität sind zwei Zelltypen, die B- und T-Lymphozyten, die durch eine enorme Vielfalt an spezifischen Antigenrezeptoren jedes beliebige Antigen erkennen können. Jeder Lymphozyt und seine Nachkommen prägen einen einzigartigen Rezeptor aus. Der Antigenrezeptor der B-Zelle, der B-Zell-Rezeptor (BCR) und in der sezernierten Form auch Antikörper bzw. Immunglobulin genannt, gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus zwei schweren (IgH) und zwei leichten (IgL) Polypeptidketten, die jeweils über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Funktionell ist jede Kette in zwei Domänen aufgeteilt, wobei der variable Teil der Antigenerkennung dient und der konstante Teil im Falle der schweren Kette die Effektorfunktion des Antikörpers bestimmt (Janeway et al., 2004).

Die enorme Vielfalt der Antigenrezeptoren der B-Zellen entsteht im Wesentlichen durch drei Mechanismen, die die Immunglobuline auf genetischer Ebene verändern. Zum einen durch die somatische Rekombination, die während der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark stattfindet. Hier wird je eines der verschiedenen, in mehreren Kopien vorliegenden V-, (D-) und J-Gensegmente zusammengefügt, die für die variablen Regionen der schweren bzw. leichten Ketten kodieren (V(D)J-Rekombination, Abb.1) (Janeway et al., 2004). Zum anderen durch die SHM, die während einer akuten Infektion in reifen B-Zellen erfolgt. Bei diesem Prozess werden in die variablen Bereiche der Immunglobulingene zufällige Punktmutationen eingeführt, die zur Erhöhung der Affinität des Antikörpers führen können (Abb.1) (Rajewsky, 1996). Der dritte Mechanismus ist die CSR, die die Effektorfunktion des BCR verändert. Hier wird der DNA-Bereich zwischen zwei S-Regionen als zirkuläres Produkt deletiert und eine vorher stromabwärts gelegene konstante Region kann nun exprimiert werden (Abb.1) (Iwasato et al., 1990; von Schwedler et al., 1990). Die beiden letzten Prozesse finden im Keimzentrum statt (Abb.1).

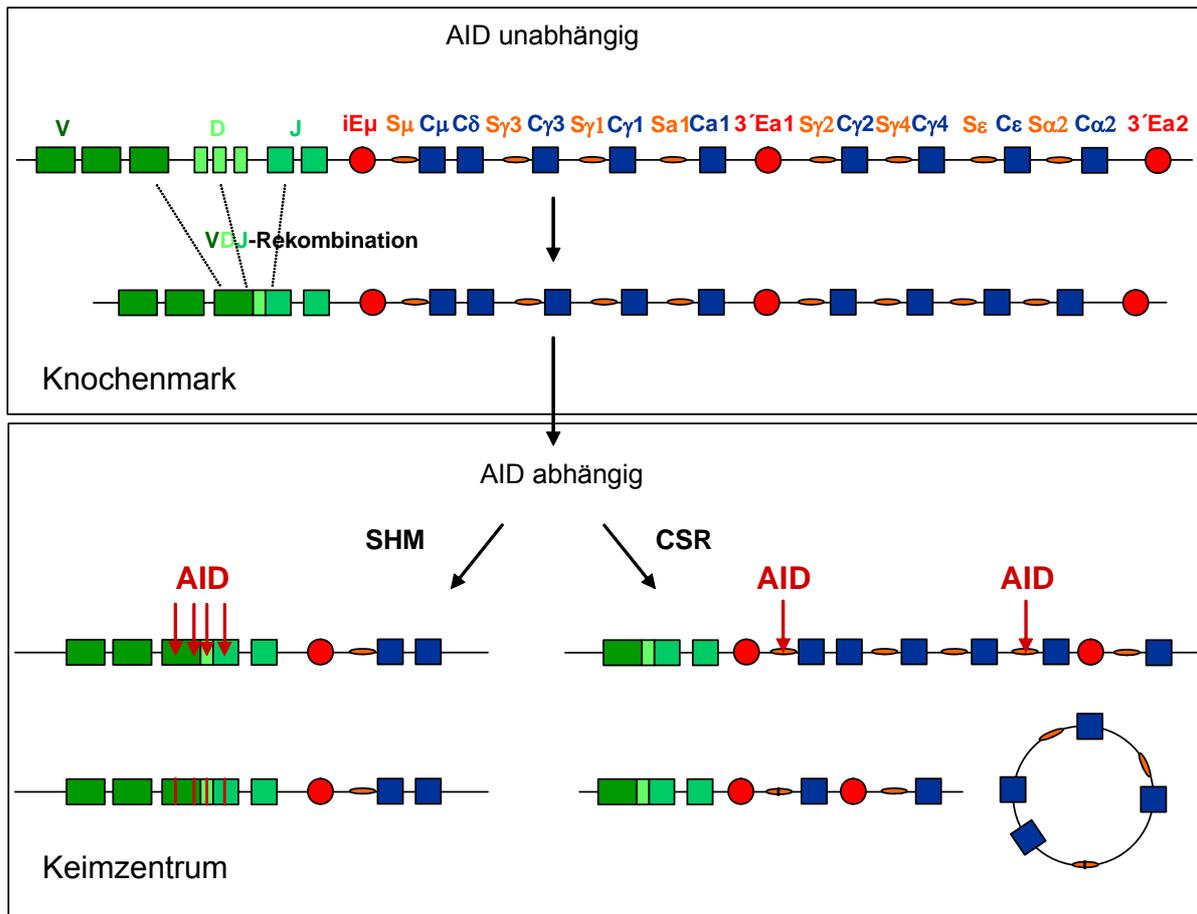


Abbildung 1: Genetische Veränderungen auf dem humanen Immunglobulinlocus der schweren Kette (nach Jungnickel, 2006)

Im Knochenmark findet die VDJ-Rekombination unabhängig von AID statt. In der späteren B-Zellentwicklung kommt es im Keimzentrum zu den AID abhängigen genetischen Veränderungen des Ig-Locus, der Somatischen Hypermutation (SHM) und der Klassenwechselrekombination (CSR). V: Exons der variablen Segmente; D: Diversitäts-Segmente; J: Verbindungs-Segmente; iE μ : Intron-Enhancer; S: Switch-Regionen; C: Exons der konstanten Segmente; 3'E: 3'Enhancer; rote Pfeile: AID-induzierte DNA-Läsionen; rote Striche: Mutationen, die während der SHM eingeführt wurden.

2.1 Die Keimzentrumsreaktion

Um potentielle Pathogene im Körper aufzuspüren, zirkulieren die naiven B-Zellen, die nach erfolgreicher V(D)J-Rekombination einen funktionellen B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, durch das lymphatische System und die Blutbahn. Treffen sie auf das Antigen, das ihr BCR erkennt, kommt es im Rahmen einer T-Zell abhängigen Immunantwort in den sekundären lymphatischen Organen zur Bildung von Keimzentren. In diesem speziellen Mikromilieu findet die Affinitätsreifung statt, wobei durch die Einführung von Punktmutationen in die V-Gen-Regionen die Affinität der B-Zell-Rezeptoren erhöht wird. Im Keimzentrum kann es auch zum Klassenwechsel kommen, bei dem der konstante Teil des Antikörpers ausgetauscht wird. So ändert sich die Effektorfunktion dem jeweiligen

Mechanismus der Pathogenbekämpfung entsprechend, aber die Antigenpezifität bleibt erhalten (Rajewsky, 1996).

Bindet eine naive, zirkulierende B-Zelle ihr Antigen, wird dieses zusammen mit dem Rezeptor internalisiert, prozessiert und mittels eines MHC-II-Moleküls auf der Zelloberfläche präsentiert. In den T-Zellbereichen der sekundären lymphatischen Gewebe, wie den PALS („periarteriolar lymphoid sheath“) der Milz oder dem paracortikalen Bereich der Lymphknoten, treffen die B-Zellen auf T-Helferzellen und werden bei assoziierter Erkennung des Antigens von diesen mittels CD40/CD40L-Interaktion und über Zytokine aktiviert (Jacob et al., 1991). Die meisten aktivierten B-Zellen migrieren in die rote Pulpa der Milz oder in die Markstränge der Lymphknoten, wo sie zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren und niederaffine Antikörper sezernieren. Wenige sogenannte Keimzentrums-Gründerzellen siedeln sich in einem Follikel im Netzwerk der Follikulären Dendritischen Zellen (FDC) an (Jacob and Kelsoe, 1992; Kuppers et al., 1993). Diese B-Zellblasten expandieren massiv und exprimieren den Transkriptionsrepressor Bcl-6, der die Entwicklung zu Plasmazellen hemmt (Shaffer et al., 2001). Sie bilden das Keimzentrum, das in eine dunkle und eine helle Zone unterteilt werden kann (MacLennan, 1994). Die dunkle Zone enthält die Zentroblasten, die sich häufig teilen und in denen die somatische Mutation der V-Gene stattfindet (Pascual et al., 1994). In der hellen Zone des Keimzentrums befinden sich T-Helferzellen, FDC und Zentrozyten, die aus den Zentroblasten mit mutierten Rezeptoren hervorgegangen sind. Die FDC präsentieren unprozessierte Antigene, um deren Bindung die Zentrozyten konkurrieren. Die Zentrozyten mit affineren B-Zellrezeptoren können das Antigen von den FDC besser aufnehmen und den Helferzellen präsentieren (Gray, 1991; Kosco et al., 1988), so dass sie mittels CD40/CD40L-Interaktion ein Überlebenssignal erhalten (Kelsoe, 1995). Im Zentrozytenstadium kann es auch zum Austausch des BCR-Isotyps durch Klassenwechselrekombination kommen (Liu et al., 1996). Zentrozyten, die das Antigen nicht binden können, autoreaktiv sind oder keinen funktionellen BCR exprimieren, werden durch Apoptose vernichtet (Kelsoe, 1995). Die positiv selektierten B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen (Hollowood and Goodlad, 1998; Kelsoe, 1995).

2.2 Die Somatische Hypermutation

Der Prozess der SHM findet hauptsächlich im Keimzentrum statt. Durch die SHM werden in der rekombinierten V-Region der Ig-Gene stromabwärts vom V_H-Promotor Mutationen eingeführt (Lebecque and Gearhart, 1990) (Abb.1). Im 5'-Bereich beginnt die SHM-Domäne

ungefähr 150bp unterhalb des Transkriptionsstarts und erstreckt sich über einen Bereich von 1,5-2 kb (Lebecque and Gearhart, 1990). Die genaue Mutationsrate *in vivo* ist auf Grund von starken Selektionseffekten nicht bekannt. Sie wird auf ungefähr 1×10^{-3} bis 1×10^{-4} Mutationen pro Basenpaar pro Generation geschätzt, was 10^6 mal höher ist als die durchschnittliche spontane Mutationsrate im menschlichen Genom (McKean et al., 1984; Rajewsky et al., 1987). Meist handelt es sich um Punktmutationen, es wurden aber auch Deletionen und Duplikationen gefunden (Goossens et al., 1998). Transitionsmutationen (z.B. Basenaustausch von C nach T, oder G nach A) kommen häufiger vor als Transversionen (Golding et al., 1987). Außerdem wurden Mutationen an GC-Basen vermehrt im DGYW-Motiv und der komplementären Sequenz WRCH gefunden und an AT-Basen vermehrt im WA/TW-Motiv (Rogozin and Diaz, 2004). Diese Motive werden als Hotspots bezeichnet (Betz et al., 1993; Rogozin and Kolchanov, 1992), die nicht alle gleich stark mutiert werden, d.h. die umgebenden Sequenzen und die Sekundärstruktur scheinen auch einen Einfluß zu haben (Bachl et al., 1997).

Wie die SHM-Aktivität an den Ig-Locus geleitet wird, ist noch nicht vollständig verstanden. Die Sequenz des V-Gens ist nicht involviert in die Zielführung („Targeting“), da auch andere Gensequenzen mutiert werden, wenn das V-Gen durch sie ersetzt wurde (Yelamos et al., 1995). Ebenso ist zu erwähnen, dass die Ig-Gene nicht die einzigen Gene sind, die in Keimzentrums-B-Zellen mutiert werden. Z.B. akkumulieren das *bcl-6*- oder das *CD95*-Gen ebenfalls Mutationen, wenn auch mit deutlich geringerer Frequenz als das V-Gen (Muschen et al., 2000; Shen et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription der Zielgene für die SHM erforderlich ist, denn nach Entfernen des V_H -Promotors war die Mutationsfrequenz drastisch reduziert (Fukita et al., 1998). Die Sequenz des V_H -Promotors selbst scheint aber nicht wichtig zu sein, sondern nur seine Position. Deletiert man den V_H -Promotor und ersetzt ihn durch einen heterologen Promotor, kann im stromabwärts liegenden Bereich wieder SHM beobachtet werden (Betz et al., 1994). Dennoch scheint Transkriptionsaktivität alleine nicht ausreichend zu sein, um SHM zu induzieren, da bei weitem nicht alle stark transkribierten Gene in Zentroblasten mutiert werden (Shen et al., 2000).

Außerdem konnten Ig-Enhancer als wichtige Elemente für die SHM identifiziert werden, denn die Stärke der Transkription korreliert mit der Stärke der SHM (Bachl et al., 2001; Peters and Storb, 1996). Für eine Beteiligung der Enhancer an der SHM über die Transkriptionsaktivität hinaus liegen konträre Ergebnisse vor. Auf Transgenen basierende Studien sprechen meist für eine positive Rolle der Enhancer bei der SHM, wohingegen die

Studien an den endogenen Ig-Loci keine eindeutige Evidenz für die Beteiligung der Enhancer an der SHM zeigen (Odegard and Schatz, 2006). Erfolgt die Deletion der Enhancer auf dem endogenen Locus in der Keimbahn, könnten epigenetische Veränderungen oder Selektionsereignisse stattfinden, die für das Fehlen der Enhancer in frühen Phasen der B-Zellentwicklung kompensieren (Yang et al., 2006). Auch könnten die *cis*-Elemente redundante Funktion haben und so das Fehlen eines Elements kompensieren (Yang et al., 2006).

Auch wenn die Studien zur Rolle der Ig-Enhancer konträr sind und die Enhancer untereinander nur geringe Sequenzhomologien aufweisen, sind sie „heiße Kandidaten“, die den Hypermutationsbereich durch gezielte Rekrutierung der SHM-Maschinerie an den Ig-Locus eingrenzen könnten. Es gibt weitere Hinweise, dass diese *cis*-Elemente nicht nur den Zielort der Hypermutation festlegen, sondern auch durch spezifisches Rekrutieren von Reparaturfaktoren das Muster der SHM bestimmen. Komori et al. konnten zeigen, dass sich auf einem Transgen mit E μ -Enhancer und einem Teil des 3' μ -Enhancers das Mutationsspektrum verschiebt (Komori et al., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von E-Box-Motiven (DNA-Bindungsmotive für Helix-Loop-Helix-Proteine) auf einem Reporterkonstrukt die Hypermutationsfrequenz um ein vielfaches erhöht, ohne die mRNA-Level zu beeinflussen (Michael et al., 2003). Bisher ist nur ein konkreter Kandidat bekannt, der an E-Box-Motive bindet und eine Rolle bei der SHM spielt: E2A (Schoetz et al., 2006).

In Anlehnung an ein klassisches Konzept (Brenner and Milstein, 1966) wurde angenommen, dass DNA-Schäden und anschließende fehlerhafte Reparatur eine Rolle in der SHM spielen. Es gibt sowohl Hinweise, dass DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), als auch Einzelstrangbrüche (SSB) mit dem SHM-Prozess assoziiert sind (Bross et al., 2000; Kong and Maizels, 2001; Papavasiliou and Schatz, 2000; Sale and Neuberger, 1998). Bislang ist jedoch nicht geklärt, ob die SSB oder DSB den Mutationsvorgang einleiten, oder ob sie sekundär bei der Reparatur entstehen. Die Einführung von fehlgepaarten Basen findet wahrscheinlich während der DNA-Synthese statt, und die anschließende Fixierung der Mutationen hängt von den jeweiligen DNA-Reparatursystemen ab.

Es wird angenommen, dass bei der Reparatur fehlerhaft replizierende DNA-Polymerasen rekrutiert werden, die Bestandteile des Reparaturmechanismus der Translänionssynthese (TLS) sind, und dass diese Polymerasen die SHM-Reaktion zu Ende führen. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die TLS-Polymerasen ι und ζ eine Rolle bei der Mutationseinführung in den Ig-Locus spielen (Diaz et al., 2003; Faili et al., 2002). Auch für

die Beteiligung der TLS-Polymerase η bei der Einführung von Mutationen an Adeninen und Thyminen wurden unter anderem in XPV-Patienten (Xeroderma pigmentosum Variante) Hinweise gefunden (Zeng et al., 2001). Für die Generierung von Mutationen an Cytosinen und Guaninen konnte ein Mitwirken der TLS-Polymerase θ gezeigt werden (Masuda et al., 2005).

2.3 Mechanismen der B-Zell Lymphomentstehung

Die Mutationen in der V-Region sind ein Merkmal von Keimzentrums-B-Zellen und ihren Nachkommen. Deshalb können Sequenzanalysen der V-Gene von B-Zell Lymphomen Aufschluß über den Ursprung eines Tumors geben (Kuppers et al., 1999). Umfangreiche Analysen zeigten, dass die meisten V-Gene von B-Zell Lymphomen mutiert sind. Bei den Non-Hodgkin Lymphomen wurden somatisch mutierte V-Gene zum Beispiel in Follikulären Lymphomen (Faili et al., 2002), in Burkitt Lymphomen (BL) und in diffusen großzelligen Lymphomen (DLCL) gefunden (Cleary et al., 1986; Klein et al., 1995; Kuppers et al., 1997). Auch bei den klassischen Hodgkin Lymphomen (cHL) haben V-Gen-Sequenzierungen gezeigt, dass die Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) Zellen eine klonale Population von B-Zellen repräsentieren, die von Keimzentrums-B-Zellen abstammen und keine fortlaufende SHM durchführen (Kanzler et al., 1996). Bei einer HL-Subentität, dem nodulären Lymphozyten-prädominanten HL (nlpHL), konnte gezeigt werden, dass die lymphozytischen und histiozytischen (L und H) Zellen transformierte Keimzentrums-B-Zellen darstellen, die fortlaufende SHM zeigen (Kuppers et al., 2002).

Da sehr viele B-Zell-Neoplasien von Keimzentrums- oder post-Keimzentrumsentwicklungsstadien abstammen, liegt es nahe zu vermuten, dass die malignen Transformationen im Keimzentrum stattfinden oder dort beginnen. In diesem Milieu finden genetische Modifikationen wie die SHM und die CSR statt. Die Fehlregulation der Kontrolle dieser Prozesse könnte durch Entstehung von Translokationen oder Mutationen bei der Tumorgenese eine Rolle spielen (Kuppers und Dalla-Favera, 2001).

Reziproke Translokationen von Onkogenen in die S-Region der Immunglobulingene, wie bei sporadischen BL das *c-myc*-Gen oder bei DLCL das *bcl-6*-Gen, können durch inkorrekten Klassenwechsel zustande kommen (Kuppers, 2005). Die Deregulation der SHM scheint auch an der Generierung von Translokationen beteiligt zu sein, da bei einigen BL und DLCL die Translokationsbruchstellen oft in den Regionen liegen, die von der SHM-Maschinerie angesteuert werden (Cario et al., 2000; Goossens et al., 1998). Der *c-myc*-Genlocus auf

Chromosom 8 kann in einen der drei Ig-Loci, IgH auf Chromosom 14 (bei 80 % der BL), IgL κ auf Chromosom 2 oder IgL λ auf Chromosom 22 transloziert vorliegen. Durch die Translokation gelangt das *c-myc*-Gen unter die Kontrolle der Ig-Regulatorsequenzen und es kommt zu einer deregulierten *c-myc*-Expression (Boxer und Dang, 2001).

Außerdem wurden im translozierten *c-myc*-Allel Mutationen gefunden, die auf SHM-Aktivität zurückzuführen sind (Albert et al., 1994; Bemark und Neuberger, 2000). Die SHM kann aber auch für die Einführung von Punktmutationen in nicht translozierten Genen verantwortlich sein. In dem Onkogen *bcl-6* und dem Tumorsuppressorgen *CD95* wurden in normalen Keimzentrums-B-Zellen somatische Mutationen nachgewiesen, welche auch zur Lymphomentstehung beitragen können (Muschen et al., 2000; Shen et al., 1998). In Fällen des DLCL, des cHL und des nlpHL wurden noch weitere Gene identifiziert, die durch aberrante SHM verändert werden. Diese Mutationen in den Onkogenen *PIM1*, *RhoH/TTF* und *PAX5* lassen eine Fehlregulation der SHM in diesen Entitäten vermuten (Liso et al., 2006; Pasqualucci et al., 2001).

Die häufigste Neoplasie des hämatopoetischen Systems sind B-Zell Leukämien oder Lymphome, die meist von B-Zellen abstammen, deren Ig-Gene sekundär diversifiziert wurden (Kuppers et al., 1999). Nicht nur die Fehlsteuerung der Keimzentrumsreaktionen, sondern auch Viren stehen im Verdacht an der Transformation von B-Zellen beteiligt zu sein. Ein sehr bekanntes Beispiel ist das Epstein-Barr Virus (EBV) (Kuppers, 2005).

2.4 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, das zur Familie der γ -Herpesviren gehört. EBV infiziert überwiegend humane B-Zellen und sehr selten andere Zelltypen, wie z.B. T-Zellen oder Epithelzellen. Findet eine EBV-Infektion in der frühen Kindheit statt, so verläuft diese meist asymptomatisch. Bei einer Erstinfektion im Erwachsenenalter kann es in der Hälfte der Fälle zu einer Lymphoproliferativen Erkrankung kommen, die als Infektiöse Mononukleose (IM) oder Pfeiffersches Drüsenfieber bekannt ist. Hierbei kommt es zu einer massiven Vermehrung der EBV-infizierten B-Zellen und der zytotoxischen T-Zellen. Nach ein paar Wochen kommt die Infektion zum Abklingen, da durch die massive T-Zell-Antwort fast alle EBV-infizierten B-Zellen eliminiert werden (Rickinson und Moss, 1997). Dennoch persistiert das Virus bei über 90 % der Weltbevölkerung ein Leben lang latent in B-Gedächtniszellen. Bei gesunden EBV-Trägern

findet man im peripheren Blut nur 1-50 latent EBV-infizierte B-Zellen pro 10^6 B-Zellen (Khan et al., 1996).

Das EBV-Genom enthält mehr als 85 Gene, von denen einige transformierendes Potential besitzen. *In vitro* können B-Lymphozyten durch EBV transformiert werden (Chan et al., 1986) und es entstehen Lymphoblastoide Zelllinien (LCL, „lymphoblastoid cell line“), in denen neun EBV-Gene exprimiert werden. Diese Gene kodieren für virale Proteine, wie das Protein EBNA1 („EBV nuclear antigen 1“), das für den Erhalt des Virus-Episoms während der Zellteilung sorgt. Der Transkriptionsfaktor EBNA2 ist der wichtigste Transkriptionsregulator des Virus. Er ist essentiell für die Transformation von B-Zellen *in vitro* und wirkt über einen Mechanismus, der dem zellulären Notch-Signalweg ähnelt. Ein wichtiges zelluläres Zielgen von EBNA2 ist das *c-myc*-Gen. Virale Zielgene von EBNA2 sind die Gene, die für die Proteine LMP („latent membrane protein“) 1 und 2A kodieren (Bishop und Busch, 2002; Rickinson, 2002). LMP1 und 2A agieren als konstitutiv aktive Liganden-unabhängige Rezeptoren. LMP1 ist ein funktionales Homologes von CD40, einem Mitglied der TNF-R („tumor necrosis factor-receptor“) Superfamilie. LMP2A kann das Signal ersetzen, das normalerweise von einem intakten BCR bereitgestellt wird (Thorley-Lawson, 2001).

Ein gängiges Modell von Thorley-Lawson für die latente EBV-Infektion besagt, dass verschiedene virale Expressionsmuster latenter Gene mit unterschiedlichen Differenzierungsstadien von B-Zellen korreliert werden können (Tab.1) (Babcock et al., 2000). Die Arbeitsgruppe nimmt an, dass die EBV-Proteine hierbei physiologische Signale der normalen B-Zelldifferenzierung nachahmen. Das Modell geht davon aus, dass ausschließlich naive B-Zellen mit EBV infiziert werden. Diese Aussage beruht auf der Beobachtung, dass nur in naiven B-Zellen die Expression der EBV-Gene nachgewiesen werden kann, die im so genannten Latenzprogramm III (Tab.1), auch Wachstumsprogramm genannt, exprimiert werden und charakteristisch für B-Zellen sind, die *in vitro* mit EBV transduziert wurden (LCL). Die EBV-infizierten Zellen proliferieren und einige von ihnen sollen die Keimzentrumsreaktion durchlaufen, um in das Zellstadium zu gelangen, in dem das Virus latent persistieren kann, das Gedächtnis-B-Zell-Kompartiment. In den Keimzentrums-B-Zellen kann ein eingeschränktes EBV-Expressionsmuster beobachtet werden und in diesen Zellen kann nur noch EBNA1, LMP1 und LMP2A mRNA nachgewiesen werden (Latenz II, Tab.1). In den lang lebenden, ruhenden Gedächtnis-B-Zellen kann das Virus, ohne ein virales Gen zu exprimieren, für lange Zeit überdauern (Latenz 0, Tab.1). Durch die fehlende Expression von EBV-Genen entgeht das Virus der Detektion durch zytotoxische T-Zellen.

Tabelle 1: EBV-Genexpressionsmuster in verschiedenen B-Zelldifferenzierungsstadien und B-Zell Lymphomen (nach Babcock et al., 2000; Kuppers, 2003)

Naive B-Zellen	Keimzentrums-B-Zellen		Gedächtnis-B-Zellen
Latenz III	Latenz II	Latenz I	Latenz 0
EBER EBNA1 EBNA2 LMP1 LMP2A	EBER EBNA1 LMP1 LMP2A	EBER EBNA1	EBER
PTLD	HL	BL	

BL: Burkitt Lymphom, EBER: „EBV-encoded RNAs“, EBNA: „EBV-encoded nuclear antigen“, HL: Hodgkin Lymphom, LMP: „latente membrane protein“, PTLD: „post-transplant lymphoproliferative disease“

Meist bleibt die EBV-Infektion asymptomatisch, aber dennoch wird das Virus mit der B-Zell Lymphomentstehung in Zusammenhang gebracht. In EBV-positiven Lymphomen wurden unterschiedliche Expressionsmuster der EBV-Gene gefunden, was vermuten lässt, dass das Virus verschiedene Rollen im Transformationsprozess oder bei der Aufrechterhaltung des malignen Wachstums spielt. Bei der endemischen Form des BL, das in Zentralafrika auftritt, sind 95 – 100 % der Fälle mit EBV assoziiert. Bei der sporadischen Form des BL in der westlichen Welt sind bis zu 30 % der Fälle EBV positiv. In diesen beiden Tumorentitäten wurde die Expression des EBV-Gens EBNA1 nachgewiesen (Latenz I, Tab.1). Beim cHL sind rund 40 % der in der westlichen Welt auftretenden Fälle EBV positiv und weisen eine EBV-Genexpression des Latenzprogramms II auf (Tab.1) (Kuppers, 2003).

Bei Transplantationspatienten kann es durch die immunsuppressive Therapie zu Lymphoproliferativen Erkrankungen kommen. Im Rahmen dieser Post-Transplantations-Lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD, „post-transplant lymphoproliferative disease“) kommt es meist zur Vermehrung von EBV positiven B-Zellen. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf deren unkontrollierte Proliferation durch die fehlende T-Zell-Kontrolle zurückzuführen. Meist handelt es sich um polyklonale Expansion, es können aber auch Fälle mit Oligo- oder Monoklonalität beobachtet werden. Diese Zellen haben vermutlich weitere transformierende Ereignisse durchlaufen und sind als maligner Klon zu einem Post-Transplantations-Lymphom ausgewachsen. In diesen Tumorentitäten wurden EBV-Gene des Latenzprogramms III detektiert (Tab.1) (Kuppers, 2003).

Inwieweit EBV und die Keimzentrumsreaktion zusammenwirken und durch die Fehlsteuerung von physiologischen Signalwegen zur Lymphomentstehung beitragen oder ob sie über Schlüsselmoleküle kooperieren, die die genetische Instabilität beeinflussen, ist Bestandteil heutiger Forschung. Ein Hauptkandidat für die Beeinflussung genetischer Integrität ist das Enzym Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase (AID) (Jungnickel, 2006).

2.5 Die Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase

Tatsuku Honjo und Kollegen identifizierten das Gen der Aktivierungsinduzierten Cytidineaminase in einer B-Lymphom-Zelllinie, die zur Klassenwechselrekombination stimuliert wurde (Muramatsu et al., 1999). Das *AID*-Gen¹ kodiert für ein kleines Protein von 198 Aminosäuren Länge mit einer molekularen Masse von ca. 24kDa. Es gehört zur Familie der Apobec Cytidineaminasen, deren Mitglieder Cytosin zu Uracil in DNA oder RNA konvertieren können (Pham et al., 2005). Das AID-Protein zeigt eine signifikante Homologie (34 % Aminosäure-Identität) mit der Cytidineaminase APOBEC1, der katalytischen Untereinheit des Apolipoprotein B (apoB) mRNA-editierenden Komplexes. Das Cytidineaminase-Motiv ist in AID konserviert, und *in vitro* zeigt AID eine Cytidineaminase-Aktivität, die durch den Cytidineaminase-Inhibitor Tetrahydrouridin gehemmt werden kann (Muramatsu et al., 1999).

AID ist das erste Protein, für das eine essentielle Funktion in der CSR und auch in der SHM gezeigt werden konnte. In Mäusen führt eine *AID*-Defizienz zum Verlust der CSR und der SHM (Muramatsu et al., 2000). Durch genetische Studien von Patienten, die an der autosomal rezessiven Form des Hyper-IgM-Syndrom-2 (HIGM2) leiden, konnten Mutationen in der kodierenden Sequenz des *AID*-Gens als Ursache für dieses Syndrom identifiziert werden (Revy et al., 2000). Sowohl in den Patienten als auch in *AID*^{-/-}-Mäusen wurden außer maternalem IgG1 nur IgM Antikörperisotypen im Serum nachgewiesen und die V-Regionen der Immunglobulinloci wiesen keine Mutationen auf. Außerdem wurden in beiden Fällen Keimzentrumshyperplasien mit stark proliferierenden B-Zellen festgestellt (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000).

Versuche mit Keimzentrums-B-Zellen-ähnlichen BL-Zelllinien, die als *in vitro* Hypermutationsmodelle dienen, haben ebenfalls gezeigt, dass AID ein Schlüsselenzym in diesem Prozess ist. In der BL-Zelllinie Ramos korrelieren die *AID*-mRNA-Level mit der Mutationsrate verschiedener Subklone. Ferner stellt die *AID*-Überexpression die SHM-

¹ Der Name des Gens der Aktivierungsinduzierten Cytidineaminase ist *aicda*, in dieser Arbeit und in den meisten Veröffentlichungen werden das Gen mit *AID* und das Protein mit AID bezeichnet.

Aktivität in den Klonen wieder her, die geringe endogene *AID*-Level haben und nicht mehr mutieren (Zhang et al., 2001). *AID* scheint das einzige Keimzentrums-spezifische Protein zu sein, das essentiell für die Induktion der SHM ist, da die *AID*-Überexpression in nicht-Keimzentrums-Zellen, wie z.B. in Plasmazell-ähnlichen Hybridomen, die SHM in der V-Region induzieren kann (Martin et al., 2002). Selbst in nicht-B-Zellen (Fibroblasten) führt die Expression von *AID* zu SHM und zu CSR von artifiziellen DNA-Substraten (Okazaki et al., 2002; Yoshikawa et al., 2002). Folglich scheint *AID* der einzige B-Zell-spezifische Faktor zu sein, der für beide Prozesse benötigt wird, zumindest wenn diese von B-Zell-spezifischer Transkriptionsregulation entkoppelt sind.

Aufgrund der Homologie zu dem RNA-editierenden Enzym APOBEC1 wurde ursprünglich angenommen, dass *AID* ebenfalls eine unbekannte Vorläufer-mRNA editiert und dadurch eine aktive Endonuklease entsteht (Honjo, 2002). Experimentell spricht für diese Hypothese, dass nach der *AID*-Expression *de novo* Proteinsynthese für die CSR benötigt wird (Doi et al., 2003). Eine zweite weit gängigere Hypothese postuliert jedoch, dass das Substrat von *AID* die DNA selbst ist (Rada et al., 2004). *In vitro* deaminiert *AID* einzelsträngige DNA, aber keine RNA und keine doppelsträngige DNA (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003; Ramiro et al., 2003).

Die zweite Hypothese wurde von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen Systemen getestet. In *E. coli* (Petersen-Mahrt et al., 2002), in der Hühner-B-Zelllinie DT40 (Di Noia und Neuberger, 2002), in Mäusen (Rada et al., 2002a) und in Menschen (Imai et al., 2003) konnte gezeigt werden, dass durch das Fehlen der Uracil-N-Glykosylase (UNG) die CSR-Reaktion substantiell gestört wurde und das Hypermutationsmuster sich veränderte. UNG ist ein Enzym der Basenexzisionsreparatur (BER), das Uracil aus der DNA entfernt. Die Änderung des SHM-Musters an dC/dG-Basenpaaren ist wohl das stärkste Argument für die direkte Prozessierung von DNA durch *AID*, denn der beobachtete Anstieg von C nach T Transitionen kann sehr gut durch das fehlende Entfernen des Uracils und die anschließende Replikation über diese Base erklärt werden (Abb.2). Die Entstehung von Apyrimidin-Stellen (AP-Stellen), welche bei der Replikation auch zur Einführung von Transversionen führen können, wird durch das Fehlen des Enzyms UNG inhibiert. Ebenso stützt ein Chromatin Immunpräzipitations (CHIP)-Experiment diese These, mit dem die physische Interaktion von *AID* mit der S-Region in Zellen, die zur CSR stimuliert wurden, gezeigt werden konnte (Nambu et al., 2003).

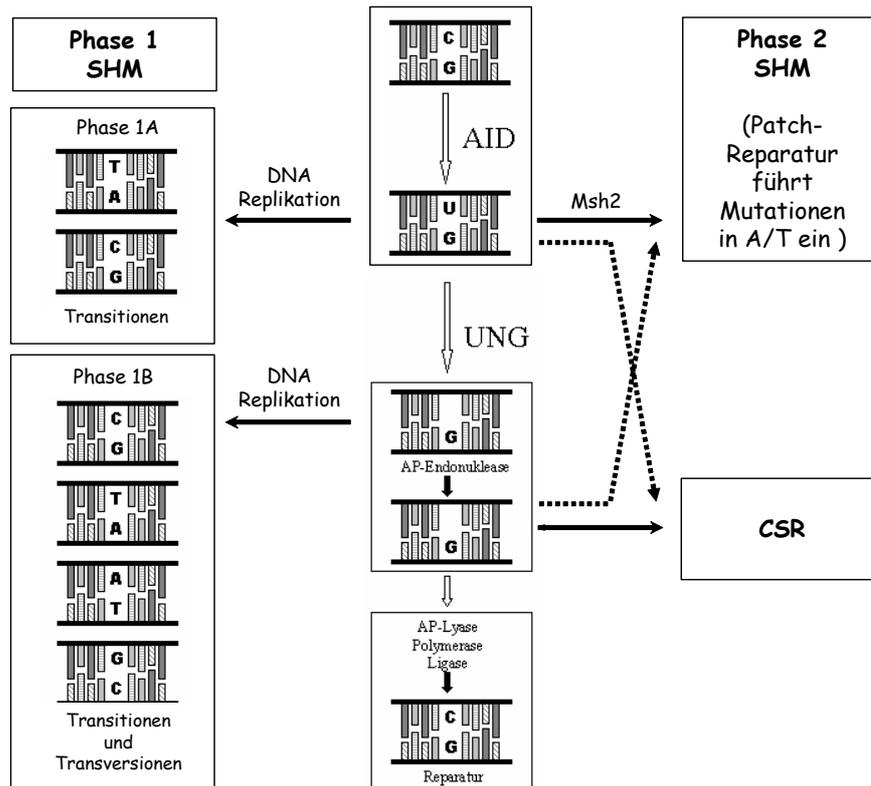


Abbildung 2: Modell der Reparatur AID-induzierter Läsionen bei SHM und CSR (nach Rada et al., 2004)
 AID führt die initialen Läsionen in die DNA durch Deaminierung von Cytosin zu Uracil ein. Ausgehend von diesen Läsionen erfolgen parallel und/oder unabhängig voneinander verschiedene, fehleranfällige bzw. fehlerfreie Reparaturprozesse, die zu unterschiedlichen Endprodukten führen.

Die DNA-Deaminierungs-Hypothese geht davon aus, dass die initiale Läsion, die durch AID eingeführt wird, durch parallel und/oder unabhängig ablaufende Prozesse weiter modifiziert werden kann (Abb.2). Insgesamt werden zwei Phasen unterschieden, die sich auf die Einführung von Mutationen an dC:dG- bzw. an dA:dT-Basenpaaren beziehen. Wenn die Uracil-Base nicht entfernt wird und von DNA-Polymerasen während der Replikation als Thymin erkannt und mit Adenin gepaart wird, sind ausschließlich Transitionsmutationen nachzuweisen (Phase 1A; Abb.2). Phase 1B setzt das Entfernen der Uracil-Base durch die UNG voraus und die resultierende Lücke wird von TLS-DNA-Polymerasen in der darauf folgenden DNA-Synthese aufgefüllt, so dass es zu Transitionen oder Transversionen kommen kann (Abb.2). Da die Mutationen an dA/dT-Basenpaaren durch die *ung*-Defizienz nicht beeinträchtigt werden, nimmt man an, dass während der Phase 2 die Fehlpaarungen direkt durch Mismatchreparatur (MMR)-Enzyme (MSH2/MSH6) erkannt und durch Rekrutierung der TLS-DNA-Polymerasen repariert werden (Abb.2). Die DNA-Läsion könnte allerdings auch durch die BER (UNG, AP-Endonuklease, etc.) effizient repariert werden (Abb.2). Warum die Reparatur während der SHM fehlerhaft verläuft und in anderem Kontext meist fehlerfrei, ist noch nicht verstanden.

2.5.1 AID-Regulation

Eine hohe *AID*-Expression ist *in vivo* beschränkt auf reife B-Zellen, die bereits Antigenkontakt hatten (Muramatsu et al., 1999). Diese gezielte Expression wird durch transkriptionsregulatorische Elemente ermöglicht, die Bindungsstellen für B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren enthalten. Sowohl das *E2A*-Genprodukt, E47 (Sayegh et al., 2003), als auch der Transkriptionsfaktor Pax5 (Gonda et al., 2003) induzieren die *AID*-Expression. Ebenso sind bestimmte Stimuli, die zur Aktivierung von B-Zellen führen, bei der Induktion der *AID*-Expression beteiligt, wie z.B. das polyklonale Mitogen Lipopolysaccharid (LPS) (Muramatsu et al., 1999) oder Interleukin-4 (IL-4) und CD40-Ligation, die durch den STAT6- bzw. NF κ B-Signalweg bei der *AID*-Expression zusammenwirken (Dedeoglu et al., 2004; Zhou et al., 2003). Eine Hemmung der *AID*-Transkription erfolgt durch den Transkriptionsrepressor Blimp-1. Dieser unterstützt die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, indem er die Transkription vieler Gene hemmt, die wichtig für das Keimzentrumsstadium sind (Shaffer et al., 2002).

Bezüglich der Lokalisation des AID-Proteins wurden Studien mit chimären AID-Fluoreszenzfusionsproteinen durchgeführt (Brar et al., 2004; Ito et al., 2004; McBride et al., 2004; Rada et al., 2002a) (F. Rückerl, Doktorarbeit). Diese überexprimierten, chimären Proteine sind überwiegend im Zytoplasma zu finden, ebenso wie endogenes AID, das in aktivierten B-Zellen nur zu einem geringen Anteil im Zellkern nachzuweisen ist (Cattoretti et al., 2006). Mehrere Gruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass AID C-terminal ein funktionelles nukleäres Exportsignal (NES) besitzt, das für einen aktiven Transport des Enzyms aus dem Zellkern hinaus sorgt (Brar et al., 2004; McBride et al., 2004; Rada et al., 2002b). Der Mechanismus wie der AID-Transport in den Zellkern erfolgt, oder ob es aktiv im Zytoplasma zurückgehalten wird, ist noch nicht geklärt.

Bisher ist eine posttranslationale Modifikation für AID beschrieben worden. Basu und Kollegen konnten zeigen, dass AID in aktivierten B-Zellen phosphoryliert vorliegt (Basu et al., 2005). Die Phosphorylierung am S38 hat eine wichtige Rolle bei der effizienten SHM und CSR, da eine S38A-AID-Mutante in aktivierten *AID*^{-/-}-B-Zellen weder SHM noch CSR wieder herstellen konnte (Basu et al., 2005; McBride et al., 2006; Pasqualucci et al., 2006). Da die regulatorische und katalytische Untereinheit der Protein Kinase A (PKA) mit AID im Zytoplasma interagieren und die Phosphorylierung von AID mit einem PKA-spezifischen Inhibitor gehemmt werden kann, geht man davon aus, dass die Modifikation durch die katalytische Untereinheit der PKA auf AID übertragen wird (Basu et al., 2005; Pasqualucci et al., 2006).

2.5.2 AID-Interaktionen

Bei den komplexen Prozessen der SHM und der CSR sind eine Vielzahl an Proteinen beteiligt (de Yebenes und Ramiro, 2006). Es ist anzunehmen, dass die AID-Funktion durch die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert wird. Beispielsweise könnte AID durch einen Retentionsfaktor im Zytoplasma zurückgehalten werden oder der AID-Import in den Zellkern durch Importfaktoren geregelt werden. Auch ist es möglich, dass AID durch einen oder mehrere Faktor/en an den Ig-Locus geleitet wird und mit Faktoren der Transkriptionsmaschinerie oder der DNA-Reparatur interagiert. Dennoch konnten bis jetzt nur wenige AID-Interaktionspartner nachgewiesen werden.

Ein bekannter Interaktionspartner ist die RNA-Polymerase II, deren physische Interaktion mit AID mit Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden konnte (Nambu et al., 2003). Chaudhuri et al. konnten zeigen, dass das Replikationsprotein A (RPA), ein Protein, das einzelsträngige DNA bindet und bei der DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur beteiligt ist, mit AID interagiert (Chaudhuri et al., 2004). RPA komplementiert die AID-Deaminaseaktivität auf einem *in vitro*-transkribierten Substrat. Da RPA die einzelsträngige DNA während der Transkription stabilisiert, kann angenommen werden, dass es so die AID-Funktion unterstützt. Auch ist bekannt, dass RPA mit UNG und eventuell mit MMR-Komponenten interagiert. So könnte AID über die Interaktion mit RPA die nachfolgenden Reparaturproteine an den Ig-Locus rekrutieren (Guo et al., 2006; Krokan et al., 2001). Als weiterer Interaktionspartner von AID ist die oben schon erwähnte PKA zu nennen, die das AID-Protein phosphoryliert. Diese Modifikation ist für die Interaktion von AID und RPA essentiell (Chaudhuri et al., 2004). Ein weiterer AID-interagierender Faktor ist das Enzym DNA-abhängige Protein Kinase (DNA-PK). Die Interaktion der katalytischen Untereinheit dieses Proteins mit AID konnte mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden (Wu et al., 2005). DNA-PK wird benötigt, um DNA-DSB, wie sie z.B. bei der CSR entstehen, im Rahmen der nichthomologen Endverknüpfung effizient zu reparieren (Manis et al., 2002). Ebenso wurde die physische Interaktion von AID mit β -Tubulin mit Koimmunpräzipitation gezeigt und mit konfokaler Mikroskopie war teilweise eine Kollokalisierung mit AID zu beobachten (Wu et al., 2005). Die Autoren nehmen an, dass AID mit Hilfe dieser Zytoskelettstrukturen im Zytoplasma zurückgehalten wird (Wu et al., 2005).

Studien mit einer C-terminal-deletierten AID-Mutante zeigen, dass der C-Terminus essentiell für die CSR ist, aber nicht für die SHM (Barreto et al., 2003; Ta et al., 2003). Andererseits scheint der N-Terminus für die SHM unerlässlich, denn N-terminale AID-Mutanten induzieren CSR, aber keine SHM (Shinkura et al., 2004). Diese differentiellen Effekte bei den

AID-Mutanten sind Hinweise darauf, dass die zwei AID-Regionen mit bestimmten Faktoren interagieren, die die AID-Funktion bei SHM bzw. CSR regulieren.

2.6 Tandem Affinitätsreinigung (TAP-Reinigung)

Zur Identifikation von AID-Interaktionspartnern wurde in dieser Arbeit die Tandem Affinitätsreinigung nach B. Seraphin (Rigaut et al., 1999), die ursprünglich für die Aufreinigung von nativen Proteinkomplexen aus Hefezellen konzipiert wurde, für die Verwendung in humanen B-Zellen etabliert. Hierbei werden native Proteinkomplexe aus Proteingemischen, z.B. aus Zellextrakten mit Hilfe zweier spezifischer Affinitätsreinigungen aufgereinigt.

Die TAP-Struktur besteht aus zwei konsekutiven Epitopen: den zwei IgG-Bindungsdomänen des Protein A aus *Staphylococcus aureus* und dem Calmodulinbindungspeptid, das in Anwesenheit von Kalzium-Ionen an Calmodulin bindet (Abb.3A). Diese beiden Epitope sind durch eine Tobacco Etch Virus (TEV)- Proteasespaltungssequenz getrennt (Abb.3A). Die TAP-Struktur wird N- oder C-terminal an das zu untersuchende Protein fusioniert. Dabei ist zu beachten, dass die N-terminale Version invertiert vorliegt, da sich das Protein A immer am extremen Ende des markierten Proteins befindet (Abb.3A). Die Fusionsproteine werden in Zellen exprimiert und die anschließende TAP-Reinigung erfolgt in zwei aufeinander folgenden Reinigungsschritten und einer dazwischen geschalteten Proteasespaltung (Abb.3B).

2.7 Nano-LC und MALDI-Massenspektrometrie

Um die Komplexität des Probengemischs nach der Affinitätsreinigung zu reduzieren, gibt es die Möglichkeit der chromatographischen Trennung. Die mit der TAP-Reinigung erhaltenen Proteine werden mit dem Enzym Trypsin gespalten und die entstandenen Peptide werden mit einer Umkehrphase-Chromatographie separiert. Bei dieser Methodik können die Auftrennungssäulen mit einer Flussrate im Nanoliter-Bereich betrieben werden, d.h. über Nano-Flüssigchromatographie („Nano-Liquid Chromatography“, Nano-LC). Diese Flüssigchromatographie eignet sich, um sehr kleine Probenvolumina und geringe Probenkonzentrationen sehr genau aufzutrennen. Nach der Auftrennung werden die Peptide zu einem Pipettier-Roboter (Probot, LC-Packings) geleitet, der die Peptidlösung mit einer Matrixlösung mischt und diese als einzelne Fraktionen auf eine Stahlplatte aufträgt. Die so vorbereiteten Proben sind für die Analyse im Massenspektrometer bereit.

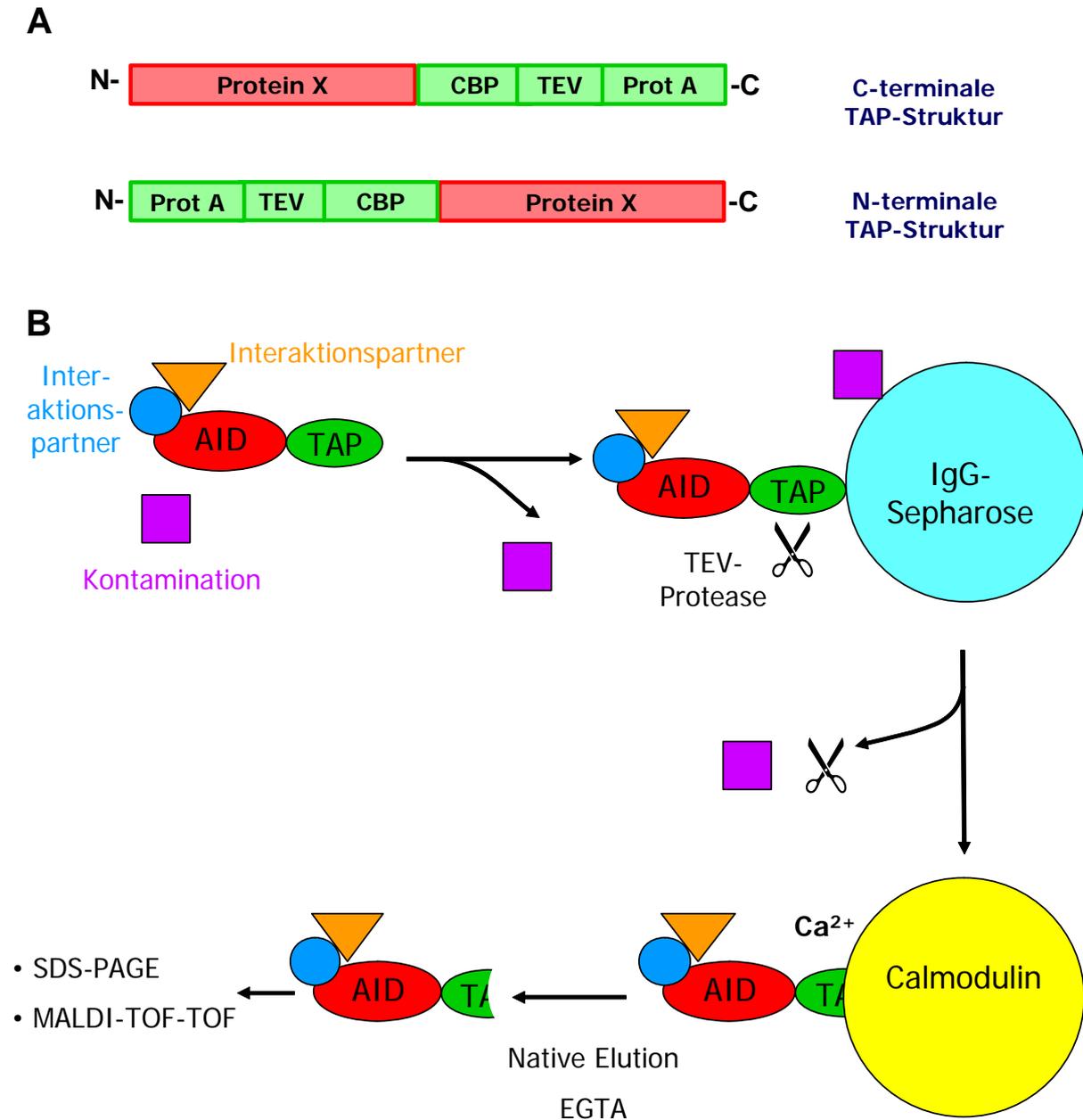


Abbildung 3: Schema der TAP-Struktur und Prinzip der Tandem Affinitätsreinigung (nach Rigaut et al., 1999)

A) Schema der TAP-Struktur: CBP: Calmodulinbindungspeptid, C-: C-Terminus des Fusionsproteins, N-: N-Terminus des Fusionsproteins, Prot A: IgG-Bindungsdomänen des Protein A aus *S. aureus*, Protein X: zu untersuchendes Protein, TEV: Tobacco Etch Virus-Proteasespaltungssequenz.

B) Prinzip der TAP-Reinigung: **1. IgG-Bindung:** Das Protein A der TAP-Struktur bindet an IgG, das an eine Sepharose-Matrix gekoppelt wurde. Anschließende Waschschritte werden durchgeführt, um Kontaminationen zu eliminieren. **2. TEV-Proteasespaltung:** Da die IgG/Protein A Interaktion sehr stark ist und die Elution nur unter denaturierenden Konditionen mit niedrigem pH möglich wäre, wird bei diesem Schritt die native Elution der spezifisch gebundenen Komplexe durch eine TEV-Proteasespaltung ermöglicht. **3. Calmodulin-Bindung:** Das Eluat nach der TEV-Spaltung wird nun für den zweiten Affinitätsschritt eingesetzt. Die Bindung an Calmodulin, das auf einer Matrix immobilisiert wurde, erfolgt über das Calmodulinbindungspeptid in Anwesenheit von Kalzium-Ionen. Auch hier werden in anschließenden Waschschritten unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine und die TEV-Protease entfernt. Die Elution erfolgt nativ mittels EGTA-Zugabe, welches präferentiell Ca^{2+} bindet. Die aufgereinigten Komplexe werden mit Gelelektrophorese aufgetrennt und der Erfolg der Reinigung mit Western-Blot-Analyse kontrolliert. Die im Komplex enthaltenen Proteine werden mit Massenspektrometrie identifiziert. SDS-PAGE: „Sodium dodecyl sulphate“-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; MALDI-TOF-TOF: „Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight-time of flight“ (siehe 2.7).

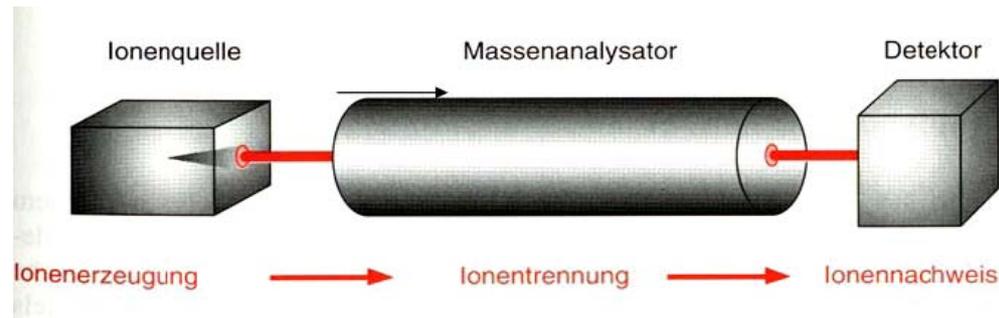


Abbildung 4: Komponenten eines Massenspektrometers (aus Lottspeich und Zorbas, 1998)

Durch die Entwicklung sehr sanfter Ionisierungstechniken wie der Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Fenn et al., 1989) und der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisierung („Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation“; MALDI) (Hillenkamp et al., 1991) ist man in der Lage, auch Biomoleküle massenspektrometrisch zu analysieren. Die Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum kann mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) bestimmt werden. Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus 3 Komponenten: Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor (Abb.4). Die Ionenquelle dient der Erzeugung von Ionen (z.B. ESI, MALDI). Im Massenanalysator werden die Ionen beschleunigt und anschließend nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. In der Detektionseinheit werden die Ionen detektiert. Die MALDI-MS hat sich aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Geschwindigkeit in den vergangenen Jahren zu einer der wichtigsten Techniken der Molekülmassenbestimmung von Biomolekülen in der Proteomik entwickelt (Aebersold und Mann, 2003). Das Prinzip von MALDI ist in Abbildung 5 dargestellt.

Für eine MALDI-MS Messung wird zunächst die Probe mit einem gelösten niedermolekularen Feststoff, der Matrix, vermischt. Bei den meisten verwendeten Matrices handelt es sich um organische Säuren. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels kommt es zu einer Kokristallisation von Analyt und Matrix, wobei die Moleküle des Analyten in das Kristallgitter der Matrix eingebaut werden. Bei der anschließenden MALDI-MS Messung wird nun die Probe mehreren intensiven Impulsen kurzwelliger Laserstrahlung (je 3-4 ns) ausgesetzt, woraufhin die Probe aus der kristallinen Matrix sublimiert und ionisiert. Dabei ist die Wellenlänge des Lasers so gewählt, dass die Laserenergie von der Matrix absorbiert und durch Relaxation in das Festkörpergitter übertragen wird. Durch die resultierende explosionsartige Sublimation eines Teilbereichs der Festkörperoberfläche werden sowohl Proben- als auch Matrixmoleküle in die Gasphase überführt. Der Ionisationsvorgang ist dabei sehr schonend, so dass auch große und thermisch labile Biomoleküle, wie Proteine, intakt

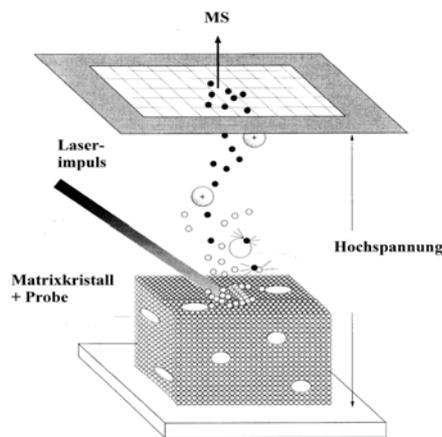


Abbildung 5: Prinzip des MALDI-Prozesses (aus Lottspeich und Zorbas, 1998)

Die Probe wird mit einem Überschuss an Matrix vermischt. Die Matrix-Moleküle sublimieren beim Beschuss mit einem fokussierten Laserimpuls und befördern so die Probe in die Gasphase. Die dabei entstehenden einfach geladenen Ionen werden in einer angelegten Hochspannung in Richtung Massenanalysator beschleunigt.

bleiben. Schließlich werden die gebildeten Ionen noch durch ein erzeugtes elektrostatisches Feld Richtung Massenanalysator/Detektor beschleunigt.

Durch die Kombination von Affinitätsreinigung und MALDI-MS ist es möglich z.B. zelluläre Proteinkomplexe aus Proteingemischen aufzureinigen und die Komponenten dieser zu identifizieren.

2.8 Zielsetzung

Die Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase (AID) ist das Schlüsselenzym zweier Prozesse, die in aktivierten Keimzentrums-B-Zellen stattfinden, die SHM und die CSR. Da davon auszugehen ist, dass die Deregulation von AID eine Störung dieser Prozesse zur Folge hat und das daraus resultierende transformierende Potential zur Lymphomentstehung beitragen kann, sollten in dieser Arbeit Untersuchungen im Vordergrund stehen, die Hinweise zu Regulationsmechanismen von AID geben.

Für die Untersuchung des AID-Proteins standen zu Beginn der Arbeit kommerziell keine funktionellen Antikörper zur Verfügung, so sollten monoklonale Antikörper gegen AID generiert werden, die es ermöglichen, die Expression des AID-Proteins *in vitro* sowie auch *in vivo* zu untersuchen. Diese Antikörper sollten möglichst vielfältig einsetzbar sein z.B. für Western-Blot-Analysen, immunhistochemische Färbungen und Immunpräzipitationen.

Um Anhaltspunkte für den Einfluss von EBV auf die Keimzentrumsreaktion zu erhalten, sollte in dieser Arbeit der Effekt von EBV auf das im Keimzentrum exprimierte Protein AID untersucht werden. Da AID die SHM und die CSR reguliert kann durch die Modulation der AID-Expression die Aktivität der Ig-diversifizierenden Prozesse beeinflusst werden. So sollte

die AID-Expression in humanen B-Zellen analysiert werden, in denen die EBV-Latenzgene regulierbar exprimiert werden können.

Um weitere Hinweise für die Regulation und/oder Funktion von AID zu erhalten, sollte mit der Etablierung der Tandem Affinitätsreinigung eine Methode erschlossen werden, die die Aufreinigung von AID-Komplexen aus humanen B-Zelllinien ermöglicht. Durch die anschließende Identifikation potentieller Interaktionspartner mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen sollten Faktoren detektiert werden, die als Ausgangspunkt für spätere funktionelle Analysen dienen können und Aufschluss über die Rolle von AID in der SHM und in der CSR geben können.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Antikörpers gegen AID und Untersuchungen zur AID-Expression in B-Zell Lymphomen

Das Enzym AID ist ein für die Zelle potentiell gefährliches Protein, es deaminiert DNA und ist mutagen (Petersen-Mahrt et al., 2002). So unterliegt es in B-Zellen sehr wahrscheinlich einer strengen Regulation. Über mögliche Regulationswege ist bisher noch wenig bekannt, deshalb ist die Untersuchung des AID-Proteins mittels Western-Blot-Analysen, Immunpräzipitation, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz wichtig, um einen Einblick in diese Mechanismen zu bekommen. Für die genannten Untersuchungen wird ein Antikörper gegen AID benötigt. Ein kommerziell erhältlicher, polyklonaler AID-Antikörper (Santa Cruz) zeigte in Western-Blot-Analysen keine spezifische Reaktivität gegen endogen oder exogen exprimiertes AID-Protein (S. Tobollik, Diplomarbeit). Da es zu dieser Zeit keine weiteren Antikörper kommerziell zu erwerben gab, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit monoklonale AID-Antikörper in Ratten generiert. Hierfür waren mehrere AID-Fusionsproteine in Ratten injiziert worden. Weder die AID-GST- noch die AID-His-Fusionsprotein-Injektion führten zur Generierung von antikörperproduzierenden Hybridomzellen. Deshalb wurden synthetisch generierte AID-Peptide zur Herstellung der Antikörper verwendet, wobei nur der Einsatz der C-terminalen Peptidsequenz zum Erfolg führte. Letzten Endes konnten drei Hybridomzellklone identifiziert werden, die monoklonale AID-Antikörper in den Zellkulturüberstand sezernieren (Tab.2) (Greiner et al., 2005).

Um die Überstände der Hybridomzellen zu identifizieren, die die AID-bindenden Antikörper enthalten, wurden sie mit Hilfe von Western-Blot-Analysen auf Gesamtproteinextrakten von HEK 293 Zellen getestet, die mit einem Expressionsvektor für HA-AID transient transfiziert wurden (Ergebnisse nicht gezeigt). Mit Extrakten der BL-Zelllinie Raji, bei der mittels quantitativer RT-PCR AID-mRNA nachgewiesen wurde, und Extrakten von HEK 293 Zellen mit bzw. ohne HA-AID-Expressionsplasmid, die als Positiv- bzw. Negativkontrolle eingesetzt wurden, wurde die Spezifität der im ersten Testschritt positiven Antikörperüberstände verifiziert (Abb.6A). Bei Verwendung des Überstandes von Klon EK2-5C7 wurden neben der spezifischen AID-Bande noch zwei zusätzliche Banden sichtbar. Da diese Banden auch in der Negativkontrolle erscheinen, handelt es sich hierbei um unspezifische Signale. Ebenso ergaben sich beim Einsatz des Überstandes von Klon EK2-2H5 neben der spezifischen AID-Bande noch ein bzw. zwei unspezifische Banden mit höherem Molekulargewicht, abhängig

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten AID-Fusionsproteine und –Peptide für die Herstellung monoklonaler AID-Antikörper

Antigen	Ratten	Getestete Überstände	Antikörper
AID-GST	2	3	0
AID-His	2	38	0
N-terminales Peptid EK1	2	2	0
C-terminales Peptid EK2	4	16	3
Zentrales Peptid EK3	4	15	0

von der eingesetzten Testzelllinie. Bei dem Überstand des Zellklones EK2-5G9 war nur eine wesentlich geringere Hintergrundbande mit niedrigerem Molekulargewicht zu beobachten. Hierbei handelt es sich evtl. um ein AID-Degradationsprodukt, da diese Bande in der Negativkontrolle nicht zu beobachten ist.

In BL-Zelllinien, die als Modell für AID-exprimierende Keimzentrums-B-Zellen dienen, konnte die AID-Expression bisher nur auf mRNA-Ebene z. B. mit quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden (S.Tobollik, Diplomarbeit) (Greeve et al., 2003). Mit den jetzt zur Verfügung stehenden monoklonalen AID-Antikörpern ist es möglich geworden, die Expression des AID-Proteins in diesen Zelllinien nachzuweisen (Abb.6B). Ebenso wurde das AID-Protein in lymphoblastoiden Zelllinien, d.h. in durch das Epstein-Barr-Virus immortalisierten B-Zellen, detektiert (Abb.6B).

Die in dieser Arbeit generierten AID-Antikörper wurden von F. Ruckerl (GSF, München) im Zuge seiner Doktorarbeit auf ihre Fähigkeit getestet das AID-Protein zu präzipitieren. Prinzipiell funktionieren alle drei Antikörperüberstände, die in Western-Blot-Analysen spezifisch AID erkennen, auch in der Immunpräzipitation. Ebenso konnte F. Ruckerl zeigen, dass diese monoklonalen Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen von exogen exprimiertem AID-Protein verwendet werden können.

Des Weiteren wurden die monoklonalen AID-Antikörper im Labor von G. Niedobitek (Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen) in immunhistochemischen Färbungen auf Formalin-fixierten in Paraffinwachs eingebetteten bzw. Aceton-fixierten Frischgewebeschnitten getestet. Der Antikörperüberstand des Klones EK2-5G9 ist für diese

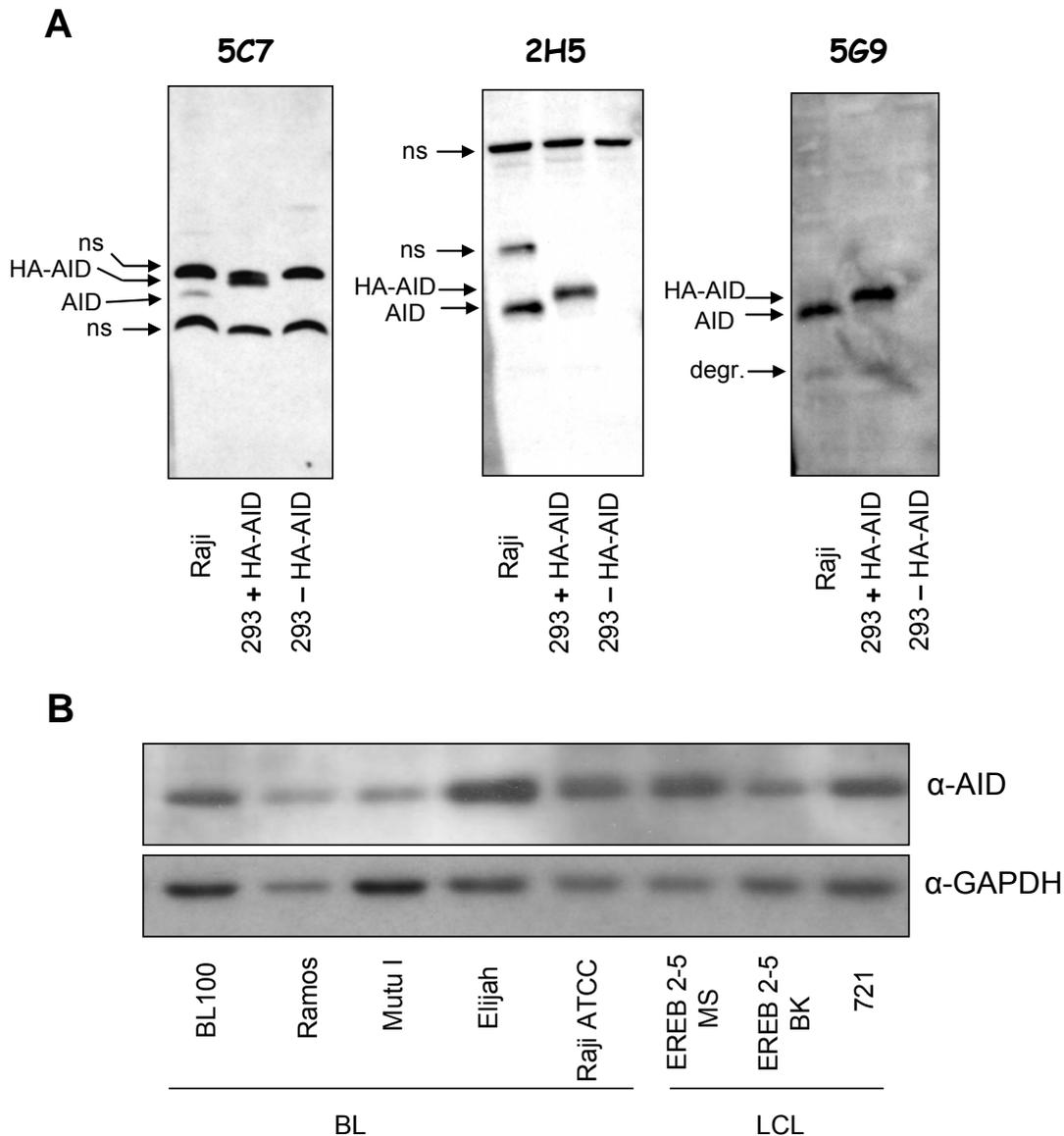


Abbildung 6: Western-Blot-Analysen mit drei monoklonalen AID-Antikörpern

A) Die Spezifität der drei AID-Antikörper wurde mit Western-Blot-Analysen getestet. Alle drei Antikörper detektieren endogenes AID in Raji-Zellen und rekombinantes HA-AID in HEK 293+ Zellen. In der Negativkontrolle HEK 293- ist wie zu erwarten kein Signal sichtbar. Bei den Antikörpern 5C7 und 2H5 sind noch zusätzliche unspezifische Banden unterschiedlichen Molekulargewichts auch in der Negativkontrolle zu sehen. Bei der niedermolekularen zusätzlichen Bande mit dem 5G9 Antikörper handelt es sich wahrscheinlich um ein AID-Degradationsprodukt, da diese Bande in der Negativkontrolle nicht zu sehen ist. Es wurde je 60µg Gesamtproteinextrakt pro Bahn geladen. **B)** Die Expression des AID-Proteins konnte in BL-Zelllinien und LCLs mit Western-Blot-Analyse mit dem 5G9 Antikörper nachgewiesen werden. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

BL: Burkitt Lymphom-Zelllinien; degr.: Degradationsprodukt von AID; HA-AID: rekombinantes, mit einem Hämagglutinin-Epitop markiertes AID-Protein; ns: nicht spezifisch; LCL: lymphoblastoide Zelllinien; 293+ HA-AID: HEK 293-Zelllinie, transfiziert mit einem HA-AID kodierenden Expressionsplasmid; 293- HA-AID: parentale HEK 293-Zelllinie.

Anwendung besonders geeignet und somit der erste Antikörper, mit dessen Hilfe das AID-Protein *in vivo* nachzuweisen ist (Greiner et al., 2005). Für die Pathologie ist dieser Antikörper von großer Bedeutung, weil es möglich ist, die Expression des AID-Proteins in Tumorgewebe zu untersuchen und AID als diagnostischen Marker zu verwenden (siehe unten).

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Labor von G. Niedobitek konnte durch Färbungen von Gewebeschnitten von hyperplastischen Tonsillen mit dem Antikörper EK2-5G9 gezeigt werden, dass Keimzentrums-B-Zellen das AID-Protein exprimieren (Abb.7A). Dieses Ergebnis bestätigt vorherige Arbeiten bei denen *in situ*-Hybridisierung, RT-PCR und Western-Blot-Analysen angewandt wurden (Greeve et al., 2003; Muramatsu et al., 2000; Pasqualucci et al., 2004). Die AID-Expression konnte vor allem in der dunklen Zentroblastenreichen Zone des Keimzentrums beobachtet werden (Abb.7B).

Außerdem wurde die AID-Expression *in vivo* auch in Non-Hodgkin Lymphomen bestätigt, die von Keimzentrums-B-Zellen abstammen und bei denen AID-Expression mittels RT-PCR nachgewiesen wurde (Greeve et al., 2003). In elf von zwölf FL-Fällen und in vier von sechs BL-Fällen konnte das AID-Protein detektiert werden (Abb.7C+D).

Im Rahmen dieser Studie konnte AID als differentieller Marker für das nlpHL und das cHL identifiziert werden (Greiner et al., 2005). Die malignen L und H Zellen des nlpHL sind in acht von acht untersuchten Fällen AID positiv (Abb.7E+F), wohingegen die neoplastischen HRS Zellen des cHL nur in drei von 38 Fällen geringe AID-Expression zeigen (Abb. 7G+H). Die Gewinnung von RNA oder Protein aus HRS oder L und H Zellen ist technisch eine große Herausforderung, denn diese neoplastischen Zellen stellen nur eine geringe Zahl der Zellen im Gewebe dar. So ist der hier entwickelte Antikörper von großem Nutzen, da die AID-Expression auf Gewebeschnitten untersucht werden kann. Die beobachtete AID-Expression in L und H Zellen steht im Einklang mit einer Studie von Bräuninger et al., die zeigte, dass diese Zellen klonale, transformierte Keimzentrums-B-Zellen repräsentieren, die fortlaufende SHM durchführen (Braeuninger et al., 1997). Das Fehlen der AID-Expression in HRS Zellen passt zu der Beobachtung, dass diese Zellen das gesamte B-Zell-spezifische Genexpressionsprogramm abgeschaltet haben (Schwering et al., 2003).

Bei diesen Färbungen ist auffällig, dass das AID-Protein überwiegend im Zytoplasma detektiert werden konnte. Auch unter Verwendung der konfokalen Lasermikroskopie ist ein AID-Signal nur im zytoplasmatischen Teil der Zelle sichtbar (Abb.7A+E, kleine Bilder). Die postulierte Funktion des Enzyms setzt aber eine Lokalisation des Proteins im Zellkern voraus.

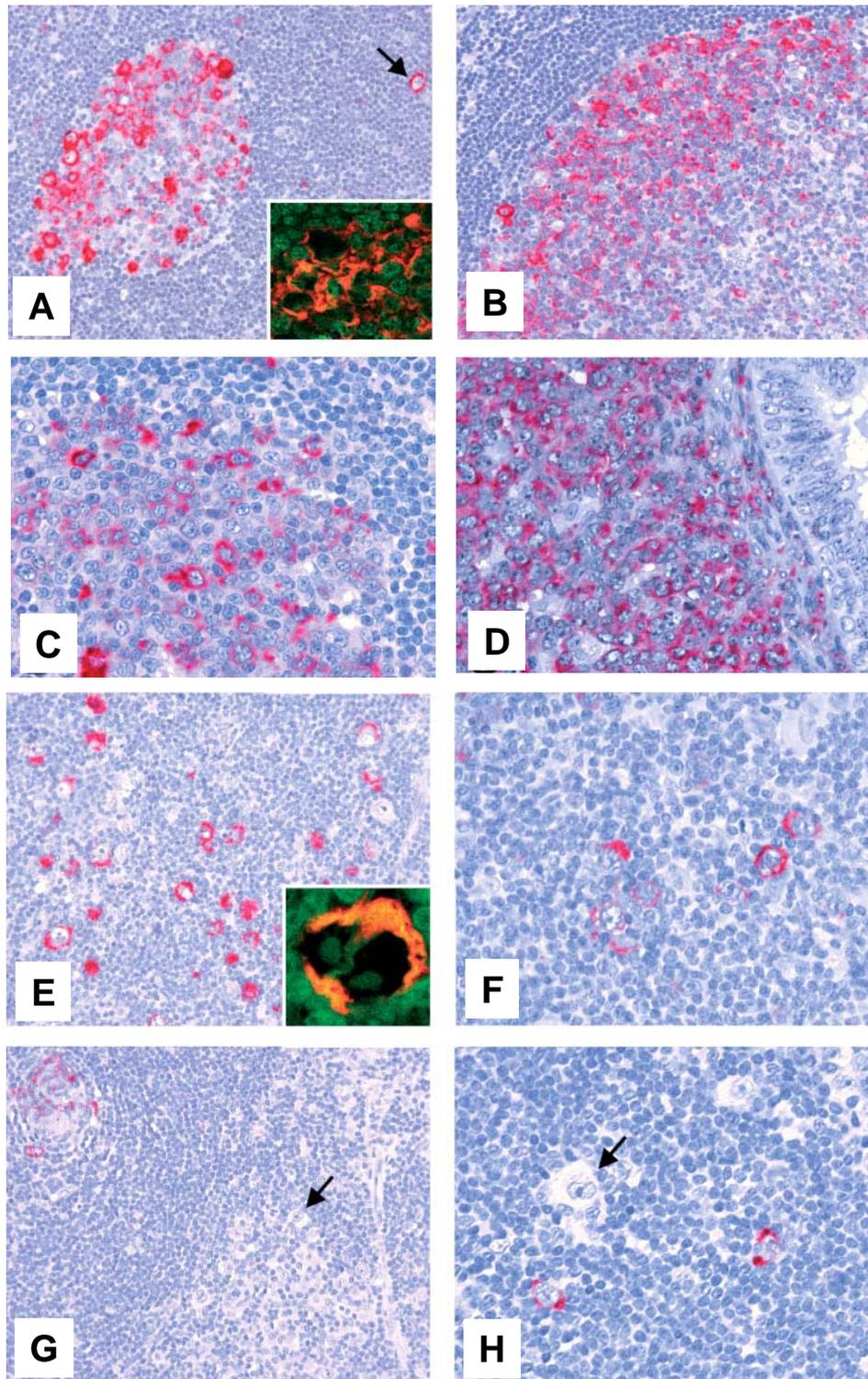


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbungen mit dem AID-Antikörper EK2-5G9 (durchgeführt im Labor von G. Niedobitek)

A) Die Färbung von hyperplastischen Tonsillen zeigt, dass AID (rotes Signal) überwiegend in Keimzentrums-B-Zellen und in einigen extrafollikulären B-Zell-Blasten (Pfeil) exprimiert wird. AID ist mit dieser Färbung exklusiv im Zytoplasma sichtbar (konfokale Lasermikroskopie, kleines Bild). **B)** Im Keimzentrum wird AID besonders in der Zentroblasten-reichen dunklen Zone detektiert, die im Bild als Rand des Keimzentrums zu sehen ist. **C)** AID wird in neoplastischen Zellen wie in Fällen von FL und **D)** von BL exprimiert. **E)+F)** Starke AID-Expression kann auch in den L und H Zellen zwei verschiedener nlpHL-Fälle beobachtet werden. Auch in diesen Zellen ist AID exklusiv im Zytoplasma sichtbar (konfokale Lasermikroskopie, kleines Bild). **G)+H)** Die HRS Zellen des cHL sind in den meisten Fällen AID negativ (Pfeile). In der linken Ecke ist der Rest eines Keimzentrums angefärbt worden (**G**). Neben den HRS Zellen können AID positive B-Zell-Blasten detektiert werden (**H**).

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass AID im Kern nur in geringer Menge vorliegt und so unter der Detektionsgrenze der verwendeten Färbemethode liegt.

3.2 Untersuchungen zur AID-Regulation durch das Epstein-Barr-Virus

EBV persistiert latent im Gedächtnis-B-Zell-Kompartiment. Wie das Virus die Latenz etabliert, ist nicht bekannt und Gegenstand derzeitiger Forschung. Ob die EBV-positiven B-Zellen eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen müssen, um anschließend in Gedächtnis-B-Zellen zu differenzieren, wird gegensätzlich diskutiert (Kuppers, 2003; Thorley-Lawson, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das Virus *in vitro* BCR-defiziente Keimzentrums-B-Zellen retten kann, die ohne Rezeptor Apoptose durchlaufen würden (Bechtel et al., 2005; Chaganti et al., 2005; Mancao et al., 2005). In transgenen Mäusen, die LMP1 unter der Kontrolle des Ig-Promotors exprimieren, ist die Bildung von Keimzentren jedoch inhibiert (Uchida et al., 1999). Die bisherigen Ergebnisse zum Einfluss von EBV auf die Keimzentrumsreaktion lassen sich noch nicht zu einem kongruenten Bild zusammenfassen (Kuppers, 2003; Thorley-Lawson, 2001).

Um den Einfluss von EBV auf die Keimzentrumsreaktion und die damit einhergehenden genetischen Prozesse besser zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Effekt viraler Latenzgene auf die Expression von AID untersucht. Hierfür wurde die lymphoblastoide Zelllinie EREB2-5 verwendet, in der die EBNA2-Funktion durch die Östrogen-abhängige nukleäre Lokalisation eines Östrogenrezeptor-EBNA2-Fusionsproteins (ER-EBNA2) reguliert wird (Abb.8) (Kempkes et al., 1995). Durch Östrogenzugabe wird in dieser Zelllinie EBNA2 in den Kern transloziert und somit aktiviert. Zur Etablierung dieser Zelllinie waren Nabelschnurblut-B-Zellen mit dem *EBNA2*-defizienten EBV-Stamm P3HR1 infiziert und mit einem Viruspartikel kotransduziert worden, der ein Plasmid enthielt, das für ein ER-EBNA2-Fusionsprotein kodiert. Bei der resultierenden lymphoblastoiden Zelllinie wird mittels Östrogenzugabe das Latenzprogramm III von EBV angeschaltet, welches die Zellen immortalisiert (Kempkes et al., 1995). Durch Auswaschen von Östrogen wird EBNA2 wieder inaktiv und das Wachstumsprogramm wird abgeschaltet, was einen Zellzyklusarrest und letztendlich das Sterben der Zellen innerhalb von fünf bis sechs Tagen zur Folge hat.

Die EREB2-5-Zellen wurden für drei Tage mit bzw. ohne Östrogen kultiviert, und anschließend wurden die AID-mRNA- und Proteinlevel mit Hilfe von quantitativer RT-PCR bzw. Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Normalisierung der AID-mRNA-Level erfolgte

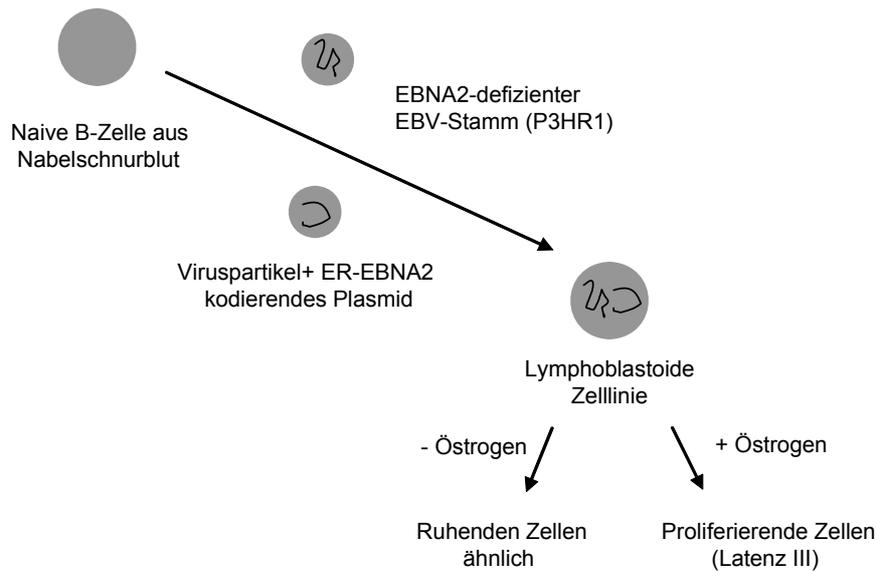


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie EREB2-5 (nach Schlee et al., 2007)

Naive Nabelschnurblut B-Zellen wurden kotransduziert mit dem EBNA2-defizienten Virus-Stamm P3HR1 und einem Viruspartikel, der ein ER-EBNA2 kodierendes Plasmid enthält. Bei Zugabe von Östrogen proliferieren diese Zellen aufgrund des durch EBNA2 induzierten Wachstumsprogramms (Latenz III). Unter Zellkulturbedingungen ohne Östrogen wird EBNA2 inaktiviert und die Zellen sind ruhenden B-Zellen ähnlich.

auf die mRNA-Level von CD19, da die Expression dieses Gens durch EBNA2 nicht reguliert wird (Schlee et al., 2007). Die Aktivierung des Wachstumsprogramms durch Östrogenzugabe hatte erstaunlicherweise einen klaren negativen Effekt auf die AID-Expression sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene (Abb.9A+B) (Tobollik et al., 2006). Die EBNA2-Aktivität wurde über die Bestimmung der mRNA-Menge zweier bekannter EBNA2-Zielgene mit quantitativer RT-PCR überprüft. *CD21* wird positiv von EBNA2 beeinflusst (Jochner et al., 1996) und die Expression steigt bei Östrogenzugabe an (Abb.9D). Der mRNA-Level der Immunglobulin μ schweren Kette sinkt wie erwartet (Abb.9C), da es sich um ein negativ-reguliertes Zielgen von EBNA2 handelt (Jochner et al., 1996). Der Haupttranskriptionsfaktor von EBV, EBNA2, schaltet das gesamte Latenz III Programm an. Da die AID-Menge abhängig von der EBNA2-Expression abnimmt, muss also mindestens eines der Latenz III-Gene einen negativen Effekt auf die AID-Expression haben.

Ein Zeitkinetik-Experiment mit der EREB2-5-Zelllinie sollte Aufschluss über die Eigenschaften dieses Inhibitors geben. Nach drei Tagen Östrogenentzug wurde dem Kulturmedium wieder Östrogen zugefügt und das AID-mRNA-Expressionsniveau wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Der AID-Level ist in den ersten vier Stunden nach der EBNA2 Induktion sehr stark abgefallen (Abb.10A) und erreichte dann wieder einen

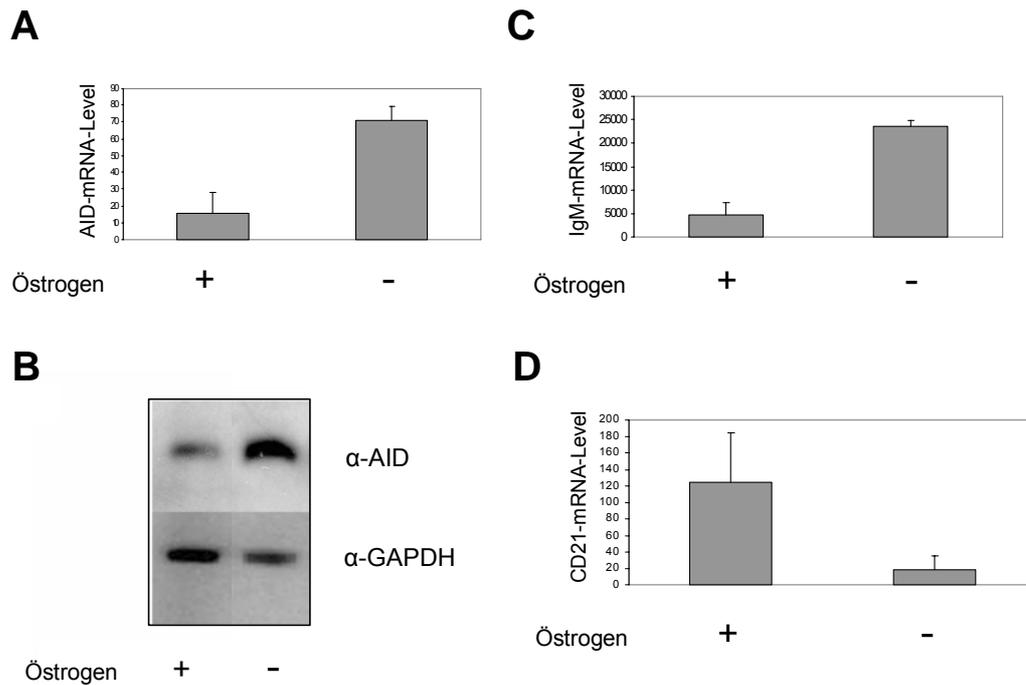


Abbildung 9: Einfluss des EBV-Latenzprogramms III auf die AID-Expression

Die EREB2-5 Zellen wurden für drei Tage mit bzw. ohne Östrogen kultiviert. **A)** Die relative AID-mRNA-Kopienzahl wurde durch quantitative RT-PCR ermittelt und auf CD19 [%] normalisiert. **B)** Das AID-Protein wurden mit dem Antikörper EK2-5G9 im Western-Blot nachgewiesen und GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Das EBV-Latenzprogramm III hat einen negativen Effekt auf die AID-Expression sowohl auf Protein- wie auch auf mRNA-Ebene. **C)+D)** Die EBNA2-Aktivität wurde über die Bestimmung der mRNA-Level zweier EBNA2-Zielgene geprüft. Die relative IgM- bzw. CD21-mRNA-Kopienzahl wurde durch quantitative RT-PCR ermittelt und auf CD19 [%] normalisiert. *IgM* ist ein negativ und *cd21* ein positiv reguliertes EBNA2-Zielgen. Alle quantitativen RT-PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Höchstwert nach 8h (Abb.10A). Dieser Höchstwert erscheint mit einer leichten Verzögerung nach den EBNA2-Zielgenen *c-myc* und *LMP1* (Abb.10B+C). *LMP1* induziert nach Überexpression die AID-Expression in EREB2-5 (Daten nicht gezeigt) und in anderen B-Zellen (He et al., 2003). Der finale Gleichgewichtslevel von AID nach 50 Stunden liegt klar unter dem Expressionsniveau, das nach Ausschalten von EBNA2 gemessen wurde, was den negativen Effekt des Latenz III Programms auf AID bestätigt. Der starke Abfall der AID-mRNA-Level direkt nach EBNA2-Aktivierung, d.h. vor der Induktion von EBNA2-Zielgenen, lässt vermuten, dass EBNA2 einen direkten negativen Effekt auf die AID-Expression hat.

Um diese Annahme zu testen, nutzten wir zwei EBV-negative Zelllinien, die nur ein für das ER-EBNA2-Fusionsprotein kodierendes Plasmid enthalten und ansonsten keine anderen EBV-Gene besitzen. Es handelt sich um Derivate der BL-Zelllinie BL41 (BL41/K3) bzw. der BL-ähnlichen Zelllinie BJAB, die keine *c-myc*-Translokation besitzt (BJAB/K3) (Jochner et al., 1996). Nach Aktivierung von EBNA2 mittels Östrogenzugabe zum Zellkulturmedium wurden auch hier zu verschiedenen Zeitpunkten die AID-mRNA-Mengen mit quantitativer

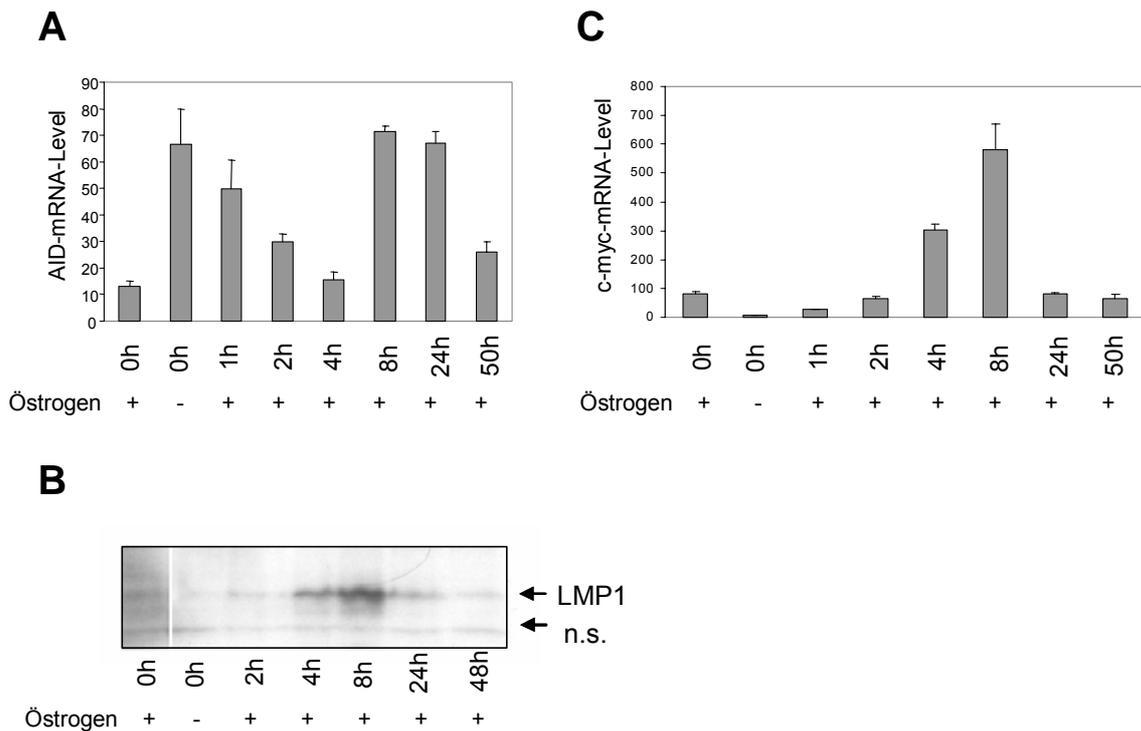


Abbildung 10: AID-Expressionsänderungen in einem Kinetikexperiment mit der Zelllinie EREB2-5

Die Zelllinie EREB2-5 wurde drei Tage ohne Östrogen kultiviert (- 0h). Nach Östrogenzugabe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (+ 1h, + 2h usw.) Proben entnommen. Einer Kontrollkultur mit Östrogen im Kulturmedium wurde nach drei Tagen zum Zeitpunkt 0h eine Probe entnommen (+ 0h). **A**) Die relative AID-mRNA-Kopienzahl wurde durch quantitative RT-PCR ermittelt und auf CD19 [%] normalisiert. **B**) Die EBNA2-Aktivität wurde über die Bestimmung der Proteinmenge des viralen EBNA2-Zielgens *LMP1* überprüft. Es wurden je 20µg Gesamtproteinextrakt pro Bahn geladen. n.s.: nicht spezifisch **C**) Die EBNA2-Aktivität wurde über die Bestimmung der mRNA-Level des EBNA2-Zielgens *c-myc* überprüft. Die relative *c-myc*-mRNA-Kopienzahl wurde durch quantitative RT-PCR ermittelt und auf CD19 [%] normalisiert.

RT-PCR bestimmt. Es konnte ein kontinuierlicher Abfall der AID-Level in beiden Zelllinien beobachtet werden (Abb.11A+E). Um auszuschließen, dass Östrogen selbst die AID-Expression beeinflusst, wurde Östrogen ins Kulturmedium von BL-Zelllinien oder lymphoblastoiden Zelllinien ohne ER-EBNA2-Fusionsprotein zugegeben und die AID-mRNA-Level bestimmt. Es konnte so gezeigt werden, dass Östrogen keinerlei negativen Effekt auf die AID-Expression hat (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität von EBNA2 in BL41/K3 und BJAB/K3 wurde auch hier über das Expressionsniveau der EBNA2-Zielgene *IgM* und *cd21* kontrolliert (Abb.11B+C und 11F+G). Die IgM-Mengen sanken und die von CD21 stiegen in beiden Zelllinien an, so dass die Aktivität von EBNA2 bestätigt werden kann. Bei der Zelllinie BL41/K3 konnte der negative Effekt von EBNA2 auf die AID-Expression ebenfalls auf Proteinebene gezeigt werden (Abb.11D). Für die Zelllinie BJAB/K3 war dies nicht möglich, da hier die AID-Proteinlevel unter der Detektionsgrenze des Antikörpers lagen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass EBNA2 alleine, ohne andere EBV-Gene, die AID-Expression inhibiert.

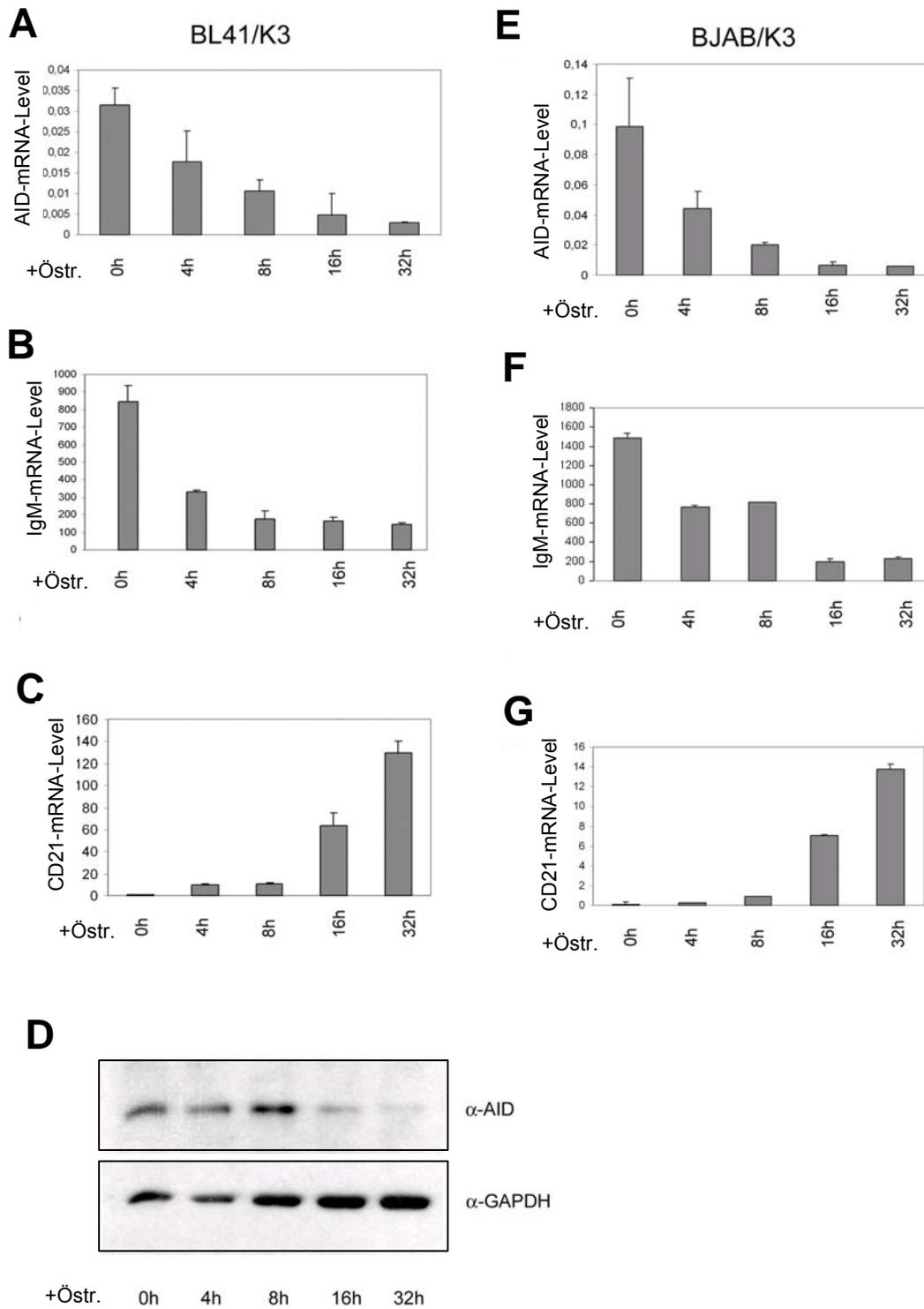


Abbildung 11: EBNA2 inhibiert die AID-Expression

Die EBV-negativen Zelllinien BL41/K3 und BJAB/K3 enthalten ein ER-EBNA2 kodierendes Plasmid und durch die Zugabe von Östrogen wird EBNA2 aktiviert. **A)+E)** Die relative AID-mRNA-Kopienzahl wurde in beiden Zelllinien durch quantitative RT-PCR ermittelt und auf CD19 [%] normalisiert. EBNA2 inhibiert die AID-Expression auch in Abwesenheit anderer EBV-Proteine **B)+F)** und **C)+G)** Die EBNA2-Aktivität wurde in beiden Zelllinien über die Bestimmung der mRNA-Level zweier EBNA2-Zielgene geprüft. Die relative IgM- bzw. CD21-mRNA-Kopienzahl wurde durch quantitative RT-PCR ermittelt und auf CD19 [%] normalisiert. *IgM* ist ein negativ und *cd21* ein positiv reguliertes EBNA2-Zielgen. **D)** In der Zelllinie BL41/K3 konnte der negative Effekt von EBNA2 auch auf Proteinebene gezeigt werden. Das AID-Protein wurde mit dem Antikörper EK2-5G9 im Western-Blot nachgewiesen und GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. +Östr.: Östrogenzugabe für angegebene Zeitspanne.

Mit dem monoklonalen AID-Antikörper EK2-5G9 ist es möglich, den Effekt von EBV auf die AID-Expression auch *in vivo* zu untersuchen. Hierfür wurden EBV-infizierte Zellen in Fällen von Infektiöser Mononukleose (IM) analysiert. Bei dieser akuten EBV-Infektion findet man typischerweise B-Zellen, die angeregt durch das Virus stark proliferieren. Um einen Überblick über die Anzahl der EBV-infizierten AID-positiven Zellen während einer akuten IM zu erhalten, wurde im Labor von G. Niedobitek eine *in situ* Hybridisierung für EBV-spezifische EBER-Transkripte, die in allen EBV-positiven Zellen exprimiert werden, und eine darauf folgende immunhistochemische Färbung mit dem AID-Antikörper EK2-5G9 durchgeführt. Diese Doppelfärbung zeigte, dass die Mehrzahl der EBER-exprimierenden und damit EBV-positiven Zellen AID-negativ ist (Abb.12A). Dieses Ergebnis ist kongruent mit den *in vitro* Daten dieser Arbeit, in denen gezeigt wurde, dass das EBV-Wachstumsprogramm einen negativen Einfluss auf die AID-Expression hat.

Es findet sich vor allem in den interfollikulären Bereichen eine geringe Anzahl von AID und EBER-doppelpositiven Zellen (Abb.12A, Pfeil), was vermuten lässt, dass entweder AID-exprimierende Zellen präferentiell infiziert werden können, oder dass EBV die Expression von AID in einigen Zellen *in vivo* durch ein bestimmtes virales Genexpressionsmuster induziert (z.B. durch die Latenz II), oder dass AID noch nicht negativ reguliert wurde oder degradiert wurde. Bei den weder EBV- noch AID-positiven Zellen in diesem Gewebeschnitt handelt es sich höchstwahrscheinlich um zytotoxische T-Zellen. Da diese durch die EBV-Infektion zu vermehrter Proliferation angeregt werden, ist die normale histologische Kompartimentierung in B-Zell-Follikel und T-Zell-Bereiche in IM-Tonsillen überwiegend zerstört. Die Färbung von hyperplastischen Tonsillen von Patienten mit latenter EBV-Infektion zeigt, dass EBV-infizierte Zellen während der Viruspersistenz fast nie AID exprimieren und außerhalb des Keimzentrums liegen (Abb.12B, Pfeile).

Die Expression der EBER-Transkripte sagt nichts über das aktuelle EBV-Genexpressionsprogramm in der jeweiligen B-Zelle aus. Deshalb wurden Doppelfärbungen für AID und Latenz III-Proteine durchgeführt, um den Einfluss von Latenz III-Proteinen auf die AID-Expression *in vivo* zu untersuchen. Die Doppelfärbungen wurden für AID und EBNA2 bzw. LMP1 durchgeführt.

Die meisten der EBNA2-positiven Zellen sind AID negativ (Abb.12C, rotes Signal: EBNA2, grünes Signal: AID). Dieses Ergebnis korreliert mit den *in vitro* Daten dieser Arbeit und bestätigt den inhibitorischen Effekt von EBNA2 auf die AID-Expression auch *in vivo*. Bei den Doppelfärbungen für AID und LMP1 zeigen die meisten LMP1-positiven Zellen kein AID-Signal, so dass davon ausgegangen werden kann, dass *in vivo* der inhibitorische Effekt des

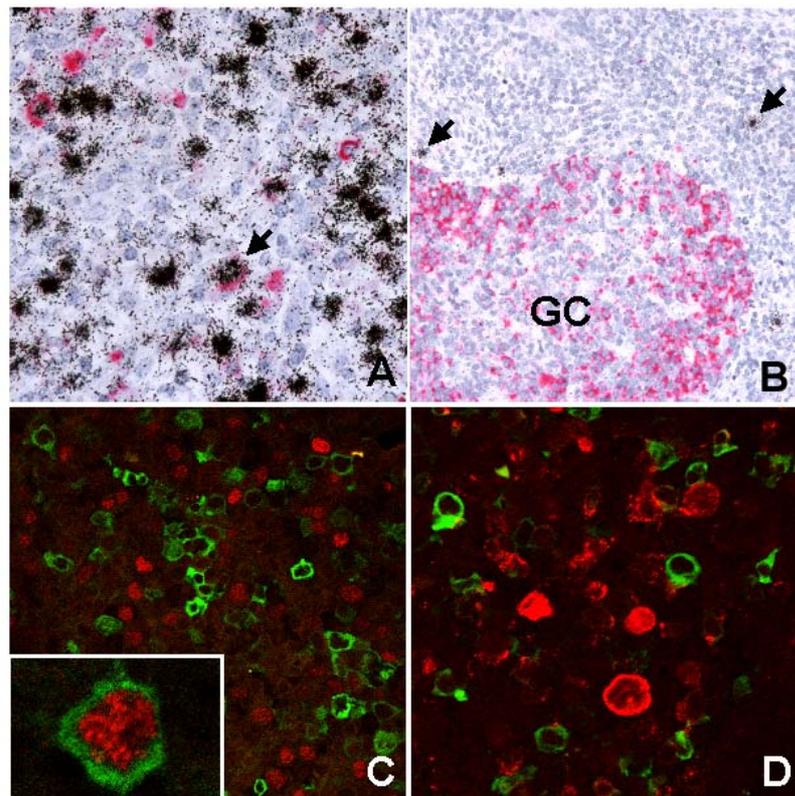


Abbildung 12: Einfluss der EBV Latenz III Proteine auf die AID-Expression *in vivo* (durchgeführt im Labor von G. Niedobitek)

A) Kombination von *in situ* Hybridisierung für EBER-Transkripte (Schwarzes Signal) und immunhistochemische Färbung für AID mit dem EK2-5G9-Antikörper (rotes Signal) auf Tonsillengewebeschnitten von IM-Patienten. Die Mehrzahl der EBER-positiven Zellen ist AID-negativ. Nur eine geringe Anzahl an Zellen ist doppelpositiv (Pfeil). **B)** Die gleiche Färbekombination auf hyperplastischen Tonsillen von Patienten mit latenter EBV-Infektion zeigt, dass EBV-infizierte Zellen kein AID exprimieren und außerhalb des Keimzentrums liegen. GC: Keimzentrum („Germinal Center“). **C)** Doppelfärbungen für AID (grünes Signal) und EBNA2 (rotes Signal) auf Tonsillengewebeschnitten von IM-Patienten zeigen, dass auch hier die meisten EBNA2-positiven Zellen AID nicht exprimieren. Nur selten werden doppelpositive Zellen detektiert (kleines Bild). **D)** Doppelfärbungen für AID (grünes Signal) und LMP1 (rotes Signal) auf Tonsillengewebeschnitten von IM-Patienten zeigen, dass der inhibitorische Effekt von EBNA2 auch *in vivo* über den positiven Effekt von LMP1 dominiert.

Wachstumprogramms bzw. EBNA2 auf die AID-Expression dominant über den kürzlich beschriebenen positiven Effekt von LMP1 ist (He et al., 2003; Abb.12D, rotes Signal: LMP1, grünes Signal: AID). Die geringe Anzahl an AID und EBNA2 doppelpositiven Zellen kann z.B. durch den Verzug zwischen Aktivierung des Wachstumprogramms und vollständiger Degradation des AID-Proteins erklärt werden (Abb.12C, kleines Bild).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die meisten B-Zellen, die durch die Latenz III-Gene von EBV zum Wachstum angeregt werden, kein AID exprimieren. Auch die durch Aktivierung induzierte AID-Expression, die wahrscheinlich durch LMP1-vermittelte NF κ B-Aktivierung erfolgt, wird in den EBNA2 positiven Zellen inhibiert. Der negative Effekt dieses viralen Transkriptionsfaktors dominiert auch *in vivo* über die Wirkung der anderen Latenz III-Proteine.

3.3 Identifikation von AID-Interaktionspartnern

Um die Regulation von AID im zellulären Kontext zu untersuchen, wurden native AID-Komplexe aufgereinigt und potentielle AID-Interaktionspartner identifiziert. Mit der Identifizierung potentieller AID-interagierender Proteine wird es möglich, gezielt weitere AID-regulierende Mechanismen zu untersuchen und damit zum Gesamtbild der AID-Regulation beizutragen.

In Abbildung 13 ist die Herangehensweise zusammengefasst, wie AID-Interaktionspartner in dieser Arbeit identifiziert wurden. Als erste Schritte standen die Aufreinigung nativer AID-Komplexe sowie die Reduzierung der Komplexität der Proben im Vordergrund, die dringend für die weitere massenspektrometrische Analyse erforderlich sind.

Die in dieser Arbeit generierten Antikörper sind prinzipiell für die Immunpräzipitation des AID-Proteins geeignet, jedoch sind sie für den Einsatz der Aufreinigung und späteren Identifikation mit dem Massenspektrometer nur bedingt einsetzbar, da keine genügend hohe Reinheit der AID-Komplexe erzielt werden konnte (F. Ruckerl, GSF, Doktorarbeit).

Deshalb wurde in dieser Doktorarbeit die Tandem Affinitätsreinigung in einem humanen B-Zellsystem etabliert. Für die Aufreinigung von nativen AID-Komplexen wurde die BL-Zelllinie Raji gewählt, die einen Keimzentrumsursprung hat (Kanda et al., 2000), und die auch unter Kulturbedingungen SHM-Aktivität auf einem Transgen und am endogenen Ig-Locus zeigt (Ruckerl et al., 2006). Die finalen Eluate nach dieser Aufreinigung wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend eine Trypsinspaltung der Proteine im Gel durchgeführt. Das resultierende Peptidgemisch wurde mit Hilfe von Nano-Flüssigkeitschromatographie in seiner Komplexität reduziert und die Peptide nach ihrer Hydrophobizität auf einer C-18 Säule aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch einen Roboter mit einer Zimtsäure-Matrix gemischt und auf eine MALDI-Platte aufgetropft. Anschließend wurden diese Proben in einem MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometer analysiert. Die daraus resultierenden Daten wurden mit der GPS Explorer-Software, der MASCOT-Suchmaschine und der Swiss Prot-Datenbank verarbeitet. Für besonders interessant erscheinende Interaktionspartner wurde die Koreinigung über Western-Blot-Analysen bestätigt.

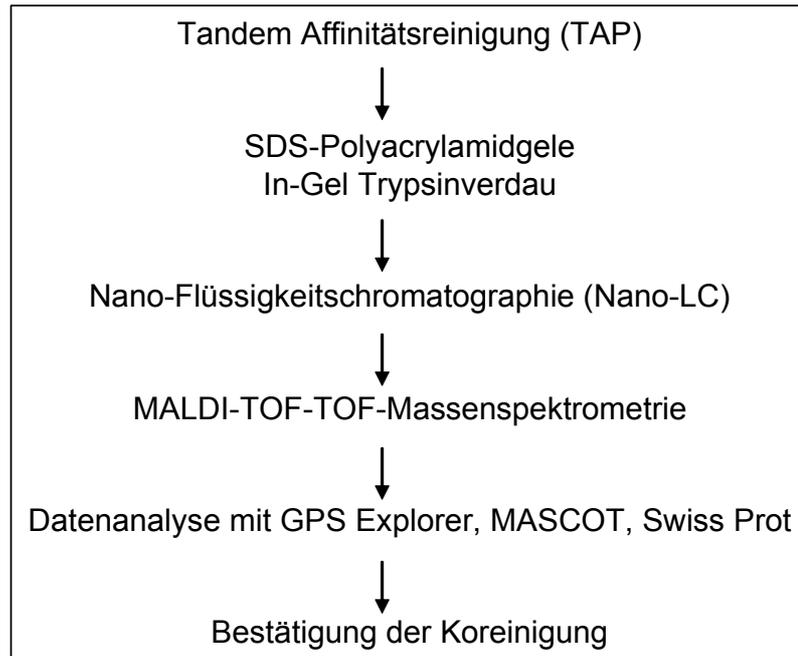


Abbildung 13: Überblick über Herangehensweise zur Identifikation AID-interagierender Proteine

3.3.1 Tandem Affinitätsreinigung

3.3.1.1 Konstruktion verschiedener TAP-AID-Expressionsvektoren

Die TAP-Struktur besteht zum einen aus dem Calmodulinbindungspeptid (CBP), das immer direkt an das zu untersuchende Protein fusioniert wird, da durch CBP der zweite Reinigungsschritt vermittelt wird (Abb.14). So muss die Struktur, je nach Terminus an den sie fusioniert wird, gedreht werden. Zum anderen besteht sie aus den zwei IgG-bindenden Domänen des Protein A (Prot A) aus *S. aureus*. Diese beiden Epitope sind durch eine TEV-Protease-Spaltungssequenz getrennt (Abb.14). Bevor die TAP-Struktur an das AID-Protein fusioniert wurde, wurde abgeklärt, dass diese Spaltungssequenz nicht in der AID-Aminosäuresequenz enthalten ist.

Die TAP-Sequenz wurde sowohl N-terminal als auch C-terminal an das AID-Gen fusioniert und die Fusionen werden im Weiteren als N-TAP-AID bzw. C-TAP-AID bezeichnet (Abb.14). Als Negativkontrolle diente ein Vektor, der nur für die TAP-Struktur kodiert (später als TAP bezeichnet). Die detaillierten Klonierungsschritte sind im Methodenteil beschrieben (siehe 6.2.1).

Außerdem wurden zwei AID-Mutanten, deren Phänotyp bereits beschrieben wurde, C-terminal an die TAP-Markerstruktur fusioniert: AID Δ NES-Mutante und AIDbix-Mutante

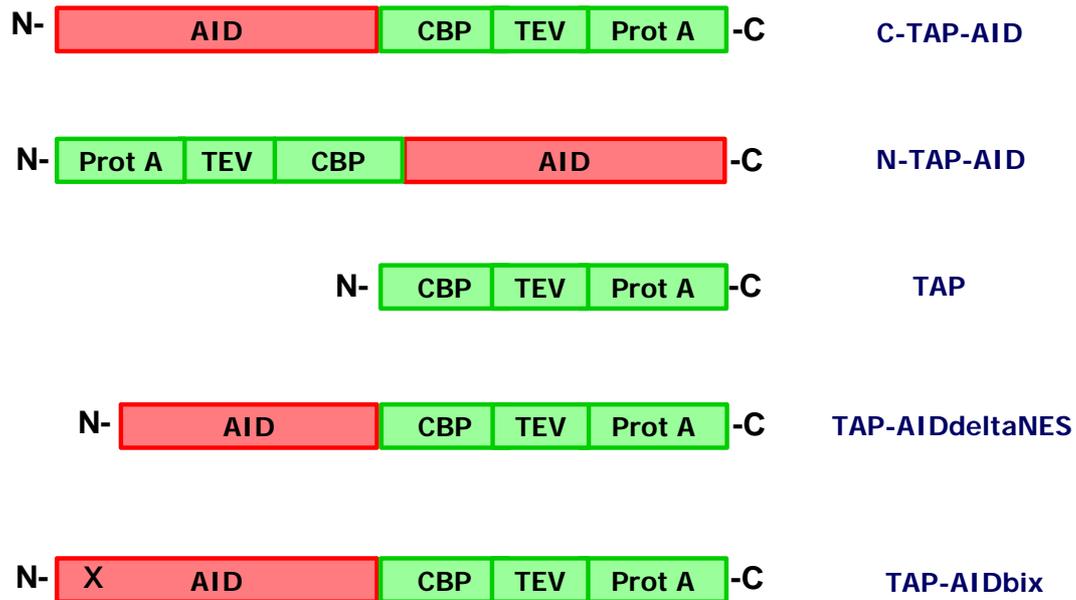


Abbildung 14: Schematische Darstellung der TAP-AID-Fusionsproteine

Die TAP-Struktur wurde C- und N-terminal an Wildtyp-AID fusioniert. Die TAP-Struktur alleine dient als Negativkontrolle. Die beiden Mutanten AID Δ NES und AIDbix wurden C-terminal an die TAP-Struktur fusioniert. Für die Beschreibung der Mutanten siehe Text. CBP: Calmodulinbindungspeptid, TEV: Tabacco Etch Virus Protease-Spaltungssequenz, Prot A: IgG-bindende Domänen des Protein A.

(Abb.14). Bei der AID Δ NES-Mutante wurden die letzten 14 Aminosäuren und damit die nukleäre Exportsequenz (NES) von AID deletiert. Durch Studien mit dieser Mutante konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von AID essentiell für die CSR ist, jedoch für die SHM vernachlässigbar (Barreto et al., 2003; Ta et al., 2003). So könnte diese AID-Mutante später für vergleichende Analysen verwendet werden, um reaktionsspezifische AID-Interaktionspartner zu identifizieren.

Die AIDbix-Mutante hat eine Punktmutation im *AID*-Gen, wobei an Nukleotid-Position 70 statt einem C ein T zu finden ist, was einen AS-Austausch zur Folge hat (R24W). Diese Mutation wurde im Rahmen von Studien mit Hyper-IgM-Patienten beschrieben (Revy et al., 2000), deren B-Zellen weder SHM noch CSR durchführen können. Da die Mutation im putativen nukleären Lokalisationssignal (NLS) von AID liegt, könnte die Translokation von AID in den Kern unterbunden sein und AID wäre nicht in der Lage, sein Substrat zu erreichen. Die AIDbix-Mutante könnte in späteren Studien für die Identifikation eines Transportfaktors eingesetzt werden.

3.3.1.2 Funktioneller Test der TAP-AID-Fusionsproteine

Da die TAP-Struktur mit 25 kDa ungefähr so groß wie das AID-Protein ist (24 kDa), könnte es sein, dass die Funktionalität des AID-Proteins durch die Fusion beeinträchtigt wird. Durch inkorrekte Faltung des Enzyms oder sterische Behinderung durch die große angehängte Struktur könnte das aktive Zentrum inaktiviert werden oder Bindungsstellen zu anderen Proteinen und/oder DNA gestört werden. Deshalb wurde die Funktionalität der Fusionsproteine getestet.

Für die Überprüfung der SHM-Aktivität wurde ein von J. Bachl und C. Olsson entwickeltes Versuchssystem verwendet (Bachl und Olsson, 1999). Der Assay basiert auf einem GFP-Reporterkonstrukt, bei dem in ein GFP-Transgen (Reporter) ein vorzeitiges TAG-Stopp-Codon eingeführt wurde (pI-GFP-stop). Dieses transkribierte GFP ist verkürzt und zeigt somit keine fluoreszierende Eigenschaft. Finden in der Zelle, die das verkürzte Transgen exprimiert, Hypermutationsereignisse statt, kann es zur Reversion des Stopp-Codons kommen und ein funktionelles GFP-Protein wird exprimiert. Dieses kann in den Revertanten mit Hilfe von FACS-Analysen nachgewiesen werden. Die TAP-AID-Expressionvektoren wurden in einen Subklon (8-11-10) der Mauszelllinie 18-81 transfiziert, der das pI-GFP-stop-Konstrukt stabil enthält. Humanes AID ist in Mauszellen funktionell (J. Bachl, GSF, München, persönl. Mitteilung). Die Transkription des pI-GFP-stop-Vektors wird mittels Doxyzyklin-induzierbarem tet-Promotor reguliert. Nach Doxyzyklinzugabe wurden je Konstrukt 24 Einzelzellklone mit Durchflusszytometrie analysiert und die GFP-Expression ermittelt. Die Reversionsfrequenz (Anzahl GFP-Revertanten pro 10^5 lebender Zellen) wurde für die Klone bestimmt (Abb.15A).

Die C-terminale AID-TAP-Fusion besitzt funktionelle Aktivität, denn in 35 % (7 aus 20) der Zellklone konnte revertiertes GFP nachgewiesen werden (die durchschnittliche Reversionsfrequenz betrug 27,8 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen). Bei der Positivkontrolle mit Wildtyp-AID konnten 21 % (5 aus 24) der Klone mit revertiertem GFP nachgewiesen werden mit einer durchschnittlichen Frequenz von 8 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen. Durch die N-terminale Fusion scheint die Funktionalität sehr stark eingeschränkt, denn nur 8 % (2 aus 24) der Klone hatten Zellen mit revertiertem GFP (durchschnittliche Frequenz 3,5 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen). Die leichte Hintergrundaktivität in der Leerkontrolle (19 % (4 aus 21) der Klone mit revertiertem GFP, durchschnittliche Frequenz 1,75 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen) kann durch das in geringem Maße endogen exprimierte AID in den 18-81 Zellen erklärt werden.

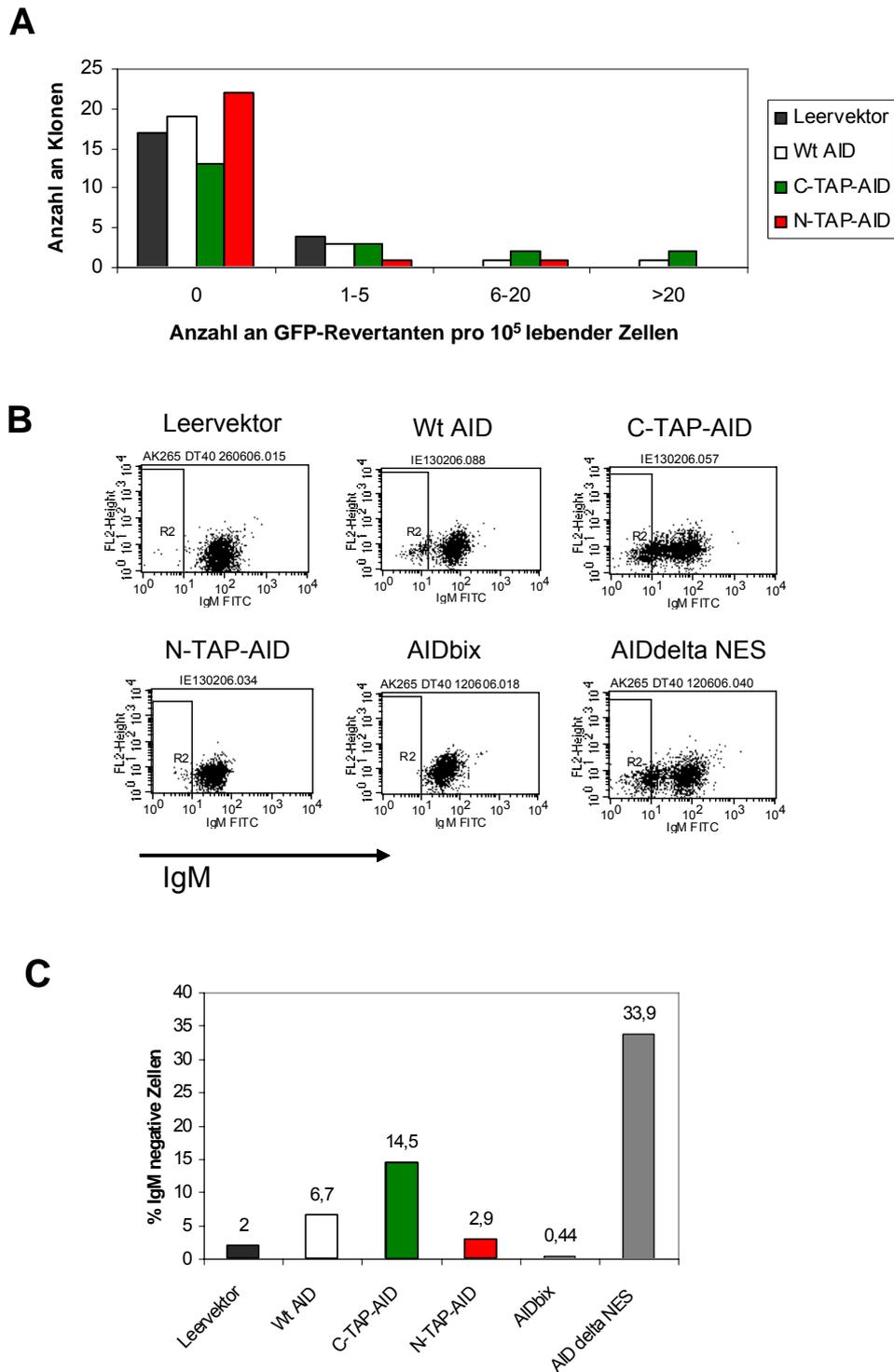


Abbildung 15: Funktioneller Test der TAP-AID-Fusionsproteine

A) GFP-Reversionsfrequenzen für C-TAP-AID und N-TAP-AID, die stabil in den Subklon 8-11-10 der Mauszelllinie 18-81 transfiziert wurden. Der Subklon 8-11-10 enthält den SHM-Reporter pI-GFP-stop. Die Reversionsfrequenz pro 10⁵ lebende Zellen wurde durch FACS-Analysen von je 24 unabhängigen Klonen bestimmt. B) Analyse der Oberflächen IgM-Expression der DT40 Subklone AID^{-/-} Ψ, die mit den verschiedenen TAP-AID-Fusionen stabil transfiziert wurden. FACS-Analysen der anti-IgM-Färbung von repräsentativen ursprünglich sIgM⁺ Klonen sind gezeigt. C) Durchschnittliche Prozentzahlen der sIgM⁻-Zellen, die in die sIgM⁻-Region (R2) fallen, basierend auf der Messung von je 24 unabhängigen Klonen.

Die Funktionalität der AID-Fusionsproteine wurde zusätzlich in einem zweiten Zellsystem getestet, wobei auch die AID-Mutanten mitgeführt wurden. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass es sich um eine AID „knock out“-Zelllinie handelt und so kein endogenes AID in den Zellen vorliegt. Bei der Zelllinie DT40, die für diesen Funktionstest verwendet wurde, handelt es sich um Keimzentrums-B-Zellen aus dem Huhn, die sich durch eine hohe Homologe Rekombinationseffizienz auszeichnen. In dem verwendeten DT40 Klon waren die Pseudogene auf dem rearrangierten Ig-Locus deletiert worden, so dass anstelle von Genkonversion (charakteristisch für Hühner B-Zellen) nur noch SHM durchgeführt werden kann. Dies geschah auf einem genetischen Hintergrund, bei dem die beiden AID-Allele deletiert und durch ein loxP-flankiertes Transgen rekonstituiert worden waren ($AID^{-/-}$, Ψ^{-}) (Arakawa et al., 2002; Arakawa et al., 2004). Anschließend war das AID-Transgen durch Cre-Rekombinase deletiert worden (C. Glon und B. Jungnickel, GSF, München, persönl. Mitteilung), so dass es sich nun um einen AID-negativen, IgM-positiven und nicht hypermutierenden DT40 Zellklon handelt ($AID^{-/-}$, Ψ^{-}). Wird in diesen Zellen AID re-exprimiert, kommt es zur Hypermutation des endogenen Ig-Locus, wobei durch Nonsense-Mutationen Zellen mit nicht funktionellen IgM-Molekülen entstehen können. Die IgM-negativen Zellen lassen sich mit Durchflusszytometrie nachweisen.

Es wurden pro transfiziertem Konstrukt 24 Einzelzellklone generiert, die auf ihre IgM-Expression überprüft wurden. In Abbildung 15B ist für jedes Konstrukt exemplarisch die FACS-Analyse eines Klones dargestellt. Der Ausgangsklon ist IgM-positiv und die Zellklone, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, sind zu 2 % IgM-negativ (Hintergrundlevel des Assays, Abb.15C). Die Zellklone, die mit einem Wildtyp-AID transfiziert wurden, weisen durchschnittlich 6,7 % IgM-negative Zellen auf (Abb.15C). Wie schon im ersten Funktionalitätstest gezeigt, beeinträchtigt die C-terminale Fusion die SHM-Aktivität von AID nicht (14,5 % IgM⁻ Zellen, Abb.15C). Auch das Ergebnis für die N-terminale Variante konnte mit diesem Test bestätigt werden, mit nur 2,9 % IgM⁻ Zellen liegt dieses Fusionsprotein im Bereich der Negativkontrolle (Abb.15C). Die AIDbix-Mutante ist wie zu erwarten funktionslos (0,44 % IgM⁻ Zellen, Abb.15C) und die AID Δ NES-Mutante zeigte eine erhöhte SHM-Aktivität (33,9 % IgM⁻ Zellen, Abb.15C).

3.3.1.3 Expression der TAP-AID-Fusionsproteine in Raji-Einzelzellklonen

In dieser Arbeit wurde die native Reinigung von AID-Komplexen in der humanen, hypermutierenden B-Zelllinie Raji durchgeführt, um möglichst physiologische Interaktionspartner zu identifizieren. Für die Expression der AID-TAP-Fusionsproteine wurde

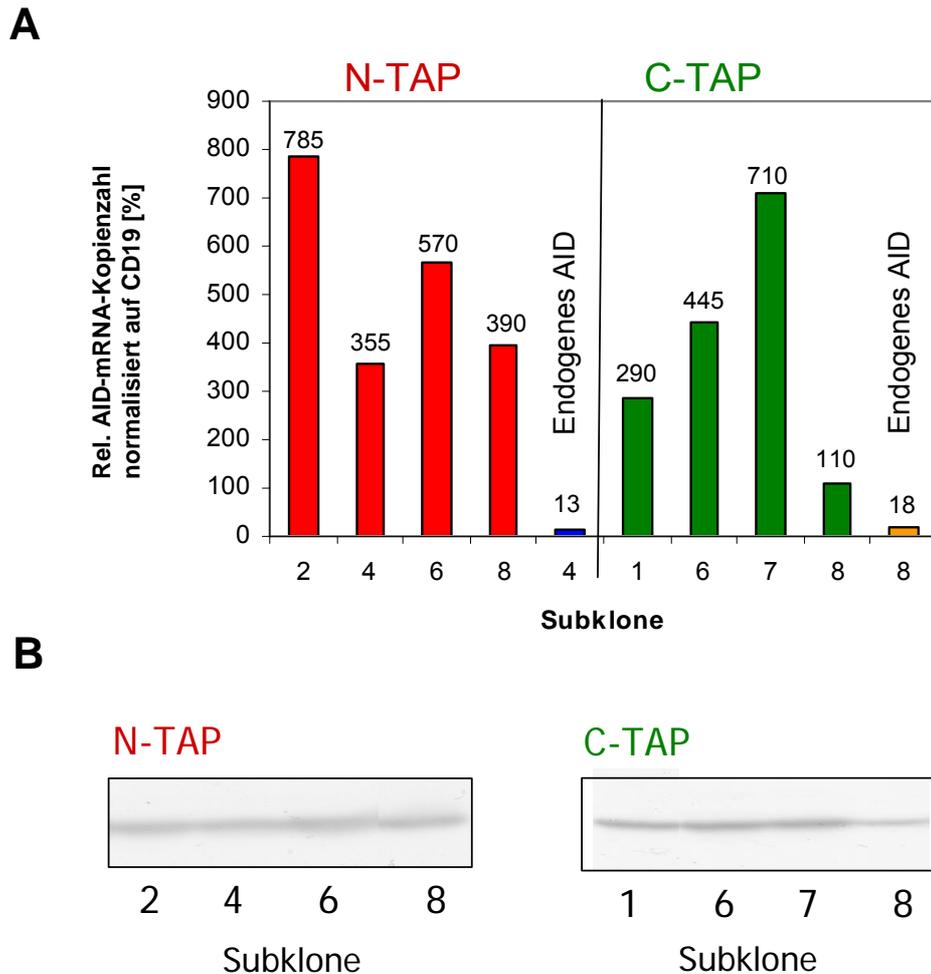


Abbildung 16: Expression der TAP-AID-Fusionen in Raji-Einzelzellklonen

A) Die relative AID-mRNA-Kopienzahl der TAP-AID-Fusionen und des endogenen AIDs wurde in den Raji-Einzelzellklonen durch quantitative RT-PCR ermittelt und auf CD19 [%] normalisiert. **B)** Die Expression des TAP-AID-Proteins wurde durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des anti-Peroxidase-Antikörpers überprüft. Es wurden pro Klon äquivalente Mengen aufgetragen (1/1600 bezogen auf die Ausgangsmenge).

ein pCAGGS-Expressionsvektor verwendet, in den die verschiedenen AID-Fusionen kloniert wurden. Die Transkription der Transgene erfolgt über den β -Aktin-Promotor des Huhns. Dieses Expressionssystem wurde gewählt, da die Expression der Transgene ungefähr auf physiologischem Level erfolgt (Abb.16A). In diesem Vektorsystem ist eine Puromycinresistenzkassette über eine IRES (Interne Ribosomen Eintrittsstelle) an das jeweilige rekombinante AID angeschlossen; so kann auf die Zellklone positiv selektioniert werden, die das Expressionsplasmid enthalten.

Nach der Transfektion von Raji-Zellen mit den verschiedenen TAP-AID-Expressionsvektoren wurden durch serielle Verdünnung und Verwendung des Selektionsmarkers Puromycin stabile Einzelzellklone generiert, die auf die TAP-AID-Expression hin getestet wurden. Die mRNA-Expressionslevel des endogenen und des rekombinanten AID können durch Verwendung von quantitativer RT-PCR verglichen werden. Für die weiteren Experimente

wurde für das N-TAP-AID der Klon 208-4 ausgewählt, der das exogene TAP-AID 30fach stärker exprimiert als das endogene AID (Abb.16A). Für das C-TAP-AID wurde zunächst der Klon 209-8 verwendet, der eine nur 6fach höhere Expression des exogenen AIDs gegenüber dem endogenen zeigte. Doch nach anfänglichen Versuchen stellte sich heraus, dass diese AID-Mengen für die weiteren Versuche aus Detektionsgründen nicht ausreichten. So wurde für die in dieser Arbeit gezeigten Experimente der Klon 209-1 verwendet, der um den Faktor 16 mehr exogenes als endogenes AID exprimiert (Abb.16A). Obgleich die Expressionsstärke des TAP-AID in den ausgewählten Klonen etwas höher liegt als das endogene AID, sollten die AID-Level im physiologischen Bereich liegen, da uns bekannt ist, dass Keimzentrums-B-Zellen *in vivo* eine höhere AID-Expression zeigen als Raji-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die AID-TAP-Proteinexpression wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analysen überprüft (Abb.16B). Der Vergleich zu endogenen Proteinexpressionsleveln ist hier nicht möglich, da beim Nachweis der TAP-Fusionsproteine der AID-Antikörper durch das in der TAP-Struktur enthaltene Protein A gebunden wird und so das Signal bei der Detektion mit ECL um ein vielfaches verstärkt wird. Das Fusionsprotein wird von allen getesteten Klonen exprimiert. Man sieht deutlich, dass Klon 209-8 (C-TAP-AID) viel weniger Protein exprimiert als die anderen Klone und dieses Ergebnis korreliert mit den mRNA-Daten (Abb.16A+B). Bei der Leerkontrolle TAP wurde nur auf der Proteinebene überprüft, ob die TAP-Struktur exprimiert wird, auch hier lässt sich das TAP-Protein in fast allen analysierten Klonen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Für den Nachweis der TAP-Fusionsproteine und der TAP-Struktur alleine wurde ein Antikörper gegen das Enzym Peroxidase verwendet, der vom Protein A-Epitop in der TAP-Struktur gebunden wird.

3.3.1.4 AID-Komplexe in der Zelle

Die Gelfiltration macht es möglich native Proteinkomplexe ihrer Größe nach aufzutrennen. Mit Hilfe dieser Methode sollte geklärt werden, ob AID und vor allem die AID-Fusionsproteine in der Zelle in komplexierter Form vorliegen.

Um die Größe der Komplexe einschätzen zu können, lässt man über die Säule einen Größenstandard laufen. In Abbildung 17A ist das UV-Elutionsprofil des verwendeten Größenstandards dargestellt. Bei dieser Methode eluieren die Proteine mit hohem Molekulargewicht als erste. Die Proteine definierter Größe finden sich nach einer gewissen Laufzeit der Säule in bestimmten Elutionsfraktionen wieder. So eluiert z.B. das Protein mit der Größe von 158 kDa nach ungefähr 16 ml.

In den Abbildungen 17B-D sind die UV-Elutionsprofile dreier Gelfiltrationsexperimente mit Zellextrakten gezeigt. Das Ausschlussvolumen der verwendeten Säule liegt bei ca. 5MDa. D.h., dass Proteinkomplexe, die größer als 5 MDa sind nicht weiter aufgetrennt werden können und so in den ersten Elutionsfraktionen zu finden sind. Der Ausschlusspeak ist nach ungefähr 8 ml im Elutionsprofil zu sehen. Ab Erscheinen des Ausschlusspeaks werden verschiedene, aufeinander folgende Fraktionen über einen definierten Zeitraum gesammelt, die anschließend mit Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein bestimmter Proteine überprüft werden.

Die Western-Blot-Analysen sind in den Abbildungen 17E-G dargestellt. Die Proteine des Größenstandards befinden sich in folgenden Fraktionen: in Fraktion 5 ist der Standard der molekularen Größe von 680 kDa zu erwarten, in Fraktion 8 von 158 kDa, in Fraktion 9 von 44 kDa, in Fraktion 10 von 17 kDa und in Fraktion 13 von 1 kDa. Die Auftrennung eines Zellextraktes der Zelllinie Raji zeigte, dass das endogene AID-Protein überwiegend in sehr großen Komplexen vorliegt, die größer als 680 kDa sind (Abb.17E). Ebenso lassen sich unkomplexierte AID-Monomere in Fraktion 10 nachweisen. Der bekannte Interaktionspartner Replikationsprotein A (RPA) (Chaudhuri et al., 2004) scheint weniger stark in Komplexe eingebunden zu sein. Es liegt größtenteils als Monomer vor, da der Hauptpeak in den Fraktionen 9 und 10 zu finden ist und RPA ein Molekulargewicht von 32 kDa besitzt. Die Größenauftrennung eines Zellextrakts mit Raji-Zellen, die das C-terminale TAP-AID exprimieren, zeigte, dass das Fusionsprotein ebenfalls in großen Komplexen vorliegt (Abb.17F). Auch können C-TAP-AID-Dimere (ca. 100 kDa) in Fraktion 8 detektiert werden. Das Protein RPA ist hier etwas vermehrt in Komplexe eingebunden. In Abbildung 17G ist das Gelfiltrationsexperiment für Zellen dargestellt, die das N-TAP-AID exprimieren. Dieses ist im Vergleich zu endogenem AID verstärkt in großen Komplexen gebunden. Dimere bzw. Monomere sind hier nicht zu detektieren. RPA ist ebenso wie beim C-TAP-AID vermehrt in komplexierter Form vorhanden.

Diese Experimente zeigen, dass die AID-Fusionsproteine in Komplexe eingebunden sind und keine Aggregatbildung bzw. Komplexzerstörung aufgrund der Fusion mit der TAP-Struktur erfolgt. Ebenso bestätigt das Vorhandensein von großen AID-Komplexen die Existenz von AID-Interaktionspartnern. In einer Studie konnten Chaudhuri et al. durch eine andere Methode gleichfalls große AID-Komplexe in der Zelle nachweisen (Chaudhuri et al., 2003). Auch konnte F. Rückerl (GSF, München, persönl. Mitteilung und Doktorarbeit) mit Gelfiltrationsexperimenten und Sucrose-Gradienten zeigen, dass AID in großen Komplexen gebunden in der Zelle vorliegt.

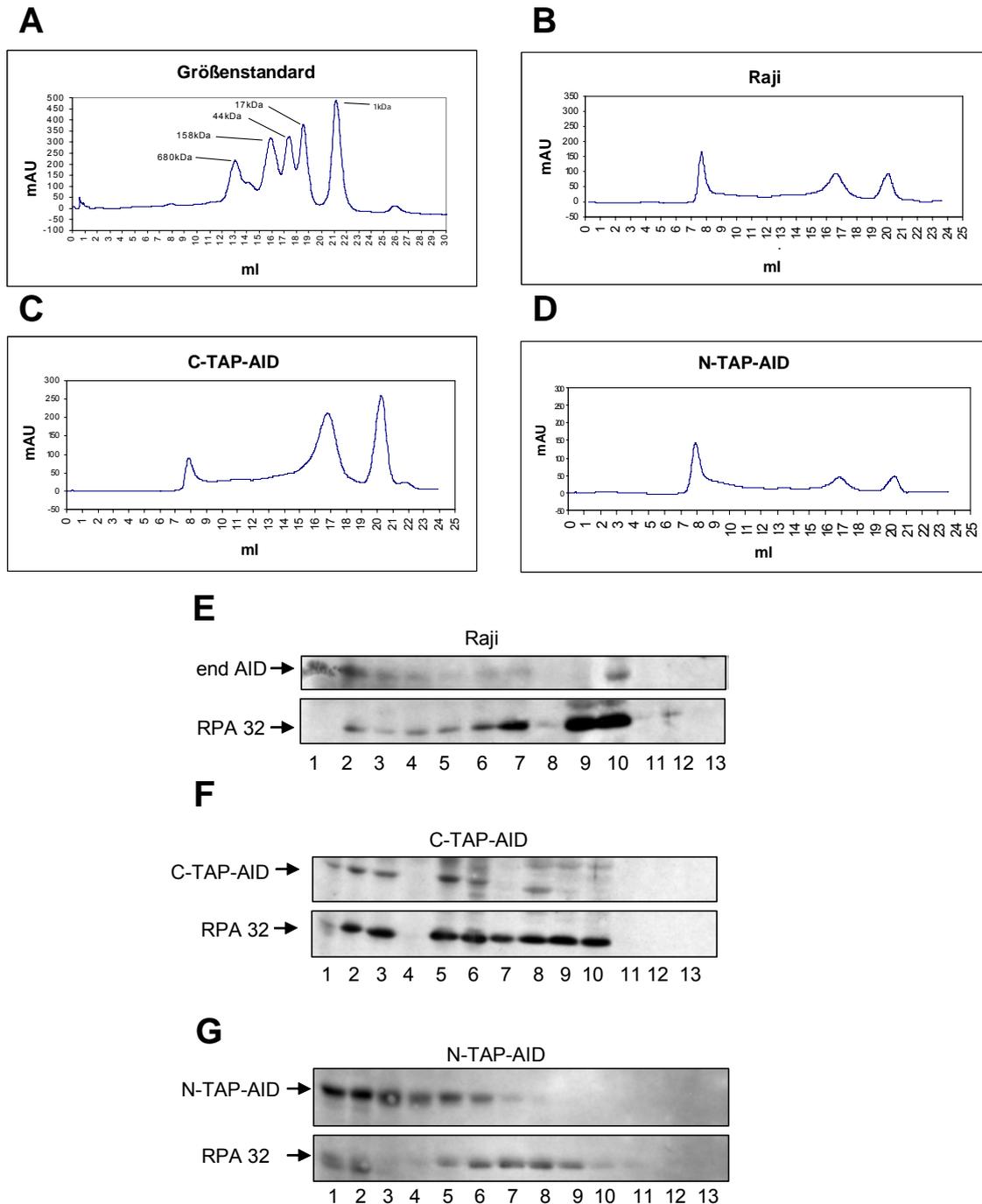


Abbildung 17: AID-Komplexe in der Zelle

Große AID-Komplexe wurden mit Gelfiltrationsexperimenten und anschließender Western-Blot-Analyse nachgewiesen. **A)** UV-Elutionsprofil des Größenstandards mit folgenden Komponenten: Thyroglobulin (680 kDa), Rinder Gamma-Globulin (158 kDa), Hühner-Ovalbumin (44 kDa), Pferde-Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B₁₂ (1.35 kDa). **B)** UV-Elutionsprofil eines Gelfiltrationsexperiments mit untransfizierten Raji-Zellen. **C)** UV-Elutionsprofil eines Gelfiltrationsexperiments mit dem Raji-Zellklon, der das C-TAP-AID-Fusionsprotein exprimiert. **D)** UV-Elutionsprofil eines Gelfiltrationsexperiments mit dem Raji-Zellklon, der das N-TAP-AID-Fusionsprotein exprimiert. **E)-F)** Für die Western-Blot-Analysen wurden von den gesammelten Proben je drei aufeinander folgende zu je einer Fraktion (1 bis 13) vereinigt (folglich entspricht eine Fraktion 900 µl Elutionsprobe), mit Trichloressigsäure präzipitiert und anschließend auf den Gehalt an endogenem AID, C-TAP-AID, N-TAP-AID und RPA-Protein überprüft. Der Nachweis der AID-Proteine erfolgte mit dem Antikörper EK2-5G9 und die AID-interagierende 32 kDa-Untereinheit von RPA wurde mit dem Antikörper RBF-4E4 nachgewiesen. Die Zuordnung des Standards zu den einzelnen Fraktionen erfolgte über das entsprechende Elutionsvolumen. Fraktion 5: 680 kDa, Fraktion 8: 158 kDa, Fraktion 9: 44 kDa, Fraktion 11: 17 kDa und Fraktion 13: 1 kDa.

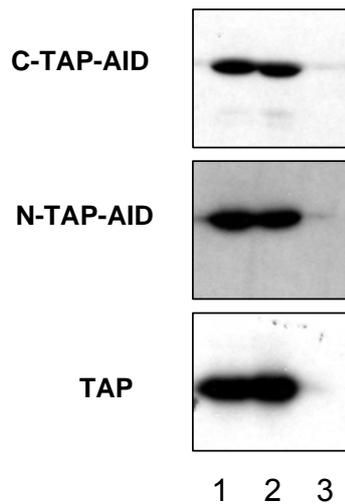


Abbildung 18: Lyse der Zellen für die anschließende TAP-Reinigung

Für den C-TAP-AID Klon und TAP Klon wurden 6×10^8 Zellen und für den N-TAP-AID Klon 3×10^8 Zellen in einem Dounce Homogenisator lysiert und für eine Stunde zentrifugiert. Die TAP-AID-Fusionsproteine bzw. das TAP-Protein wurden mit dem Peroxidase-Antikörper in der Western-Blot-Analyse in den einzelnen Extraktionsfraktionen detektiert. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen.

Spur 1: Gesamtzellextrakt, Spur 2: Lysat (Überstand), Spur 3: Pellet

3.3.1.5 Etablierung der TAP-Reinigung

Die Zellen müssen als erstes aufgeschlossen werden, um die Proteine zugänglich für die Aufreinigung zu machen. 3×10^8 Zellen des N-TAP-AID Klons 208-4, 6×10^8 Zellen des C-TAP-AID Klons 209-1 und 6×10^8 Zellen des TAP Klons 252-10 wurden in Lysepuffer in einem Dounce Homogenisator lysiert. Für den C-TAP-AID Klon wurden doppelt so viele Zellen benötigt wie für den N-TAP-AID Klon, da die Level des exogen exprimierten Proteins für einen Nachweis im Western-Blot sonst nicht ausreichend waren. Für den TAP-AID Klon wurde die gleiche Anzahl an Zellen wie für den C-TAP-AID Klon verwendet, um ausschließen zu können, dass durch Verwendung einer größeren Menge an Ausgangsprotein mehr Protein unspezifisch gebunden wird. Die Lyse der Zellen wurde während der Prozedur im Mikroskop überprüft. Nach abgeschlossener Lyse wurde der Zellextrakt für eine Stunde abzentrifugiert, um Aggregate und Membranpartikel zu separieren. In Abbildung 18 ist je eine repräsentative Western-Blot-Analyse für die verschiedenen Extraktionen gezeigt. Die einzelnen Extraktionsfraktionen (Gesamtzelllysate, Überstand (Lysat) und Pellet) wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und die TAP-Fusionsproteine bzw. das TAP-Peptid mit dem Peroxidase-Antikörper nachgewiesen. Wie nach einer erfolgreichen Lyse erwartet, wurde der Hauptanteil der Fusionsproteine bzw. des TAP-Peptids im Lysat detektiert. Das Lysat mit den löslichen Proteinen und Proteinkomplexen wurde für die weiteren Analysen verwendet.

Alle folgenden Etablierungsschritte der TAP-Reinigung wurden aus praktischen Gründen mit dem N-TAP-AID durchgeführt, da dieses höher exprimiert wird. In Abbildung 19 ist die IgG-Bindung für zwei Zeitpunkte dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass nach zwei

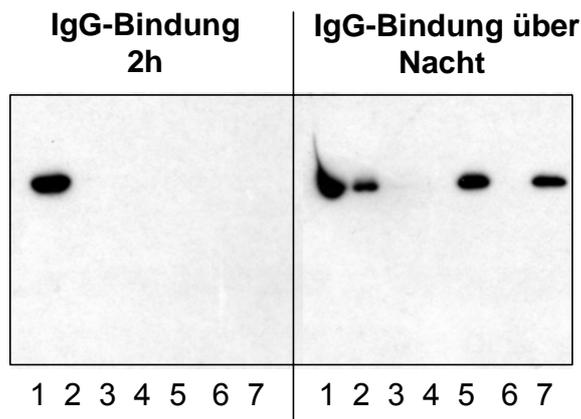


Abbildung 19: Vergleich der IgG-Bindung für 2h und über Nacht

Spur 1: Überstand nach IgG-Bindung
 Spur 2: IgG-Sepharose vor Waschschritten
 Spur 3: Erster Waschschriff
 Spur 4: Zweiter Waschschriff
 Spur 5: IgG-Sepharose vor TEV-Spaltung
 Spur 6: TEV-Eluat
 Spur 7: IgG-Sepharose nach TEV-Spaltung
 Nach 2 h ist noch keine Bindung des TAP-AID-Proteins an die IgG-Sepharose zu beobachten (2h Spur 2). Erfolgt die Bindung über Nacht ist das an die IgG-Sepharose gebundene TAP-AID nachweisbar (über Nacht Spur 2). Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen.

Stunden noch keine Bindung des Fusionsproteins an die IgG-Sepharose erfolgt ist (Abb.19, 2h Spur 2). Erst als die Bindung über Nacht durchgeführt wurde, konnte man das an die IgG-Sepharose gebundene Fusionsprotein nachweisen (Abb.19, über Nacht Spur 2). Um das Fusionsprotein von der IgG-Matrix zu eluieren, muss eine TEV-Proteasespaltung durchgeführt werden. Diese erwies sich hier zunächst als erfolglos, da sich das TAP-AID-Protein noch ungespalten an die Matrix gebunden nachweisen ließ (Abb.19, über Nacht Spur 7). Außerdem wäre eine Bande im TEV-Eluat (Abb.19, über Nacht Spur 6) zu erwarten gewesen, die um 15 kDa leichter ist als das gesamte Fusionsprotein, da das Protein A abgespalten werden sollte.

Um die TEV-Proteasespaltung zu optimieren, wurde sie mit verschiedenen Puffervarianten durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die TEV-Protease den Zusatz von EDTA zum Spaltungspuffer benötigt, um das TAP-AID-Fusionsprotein zu spalten (Abb.20A+B). Die erfolgreiche Spaltung ist in Abbildung 20B dargestellt, wo das abgespaltene CBP-AID mit dem AID-Antikörper EK2-2H5 nachgewiesen werden kann. Dieses Experiment zeigt auch, dass sich die Spaltungseffizienz nach drei Stunden nicht erhöht, vergleicht man die Stärke des Signals des ungespaltenen N-TAP-AID mit der Stärke des Signals des gespaltenen CBP-AID (Abb.20B). So wurde die Inkubationszeit für diesen Schritt auf drei Stunden festgelegt. Nach Abspaltung des Protein A wäre eine Ablösung des gespaltenen Proteins von der IgG-Matrix zu erwarten gewesen. Doch das AID-CBP-Protein ließ sich nicht in der Überstandsfraction nachweisen, sondern wurde in der IgG-Sepharose-Fraction detektiert (Abb.20B).

Um zu testen, ob das AID-Protein selbst an die IgG-Matrix bindet, wurde ein Zellklon der Raji-Zelllinie lysiert, der mit einem Expressionsplasmid für HA-markiertes AID transfiziert

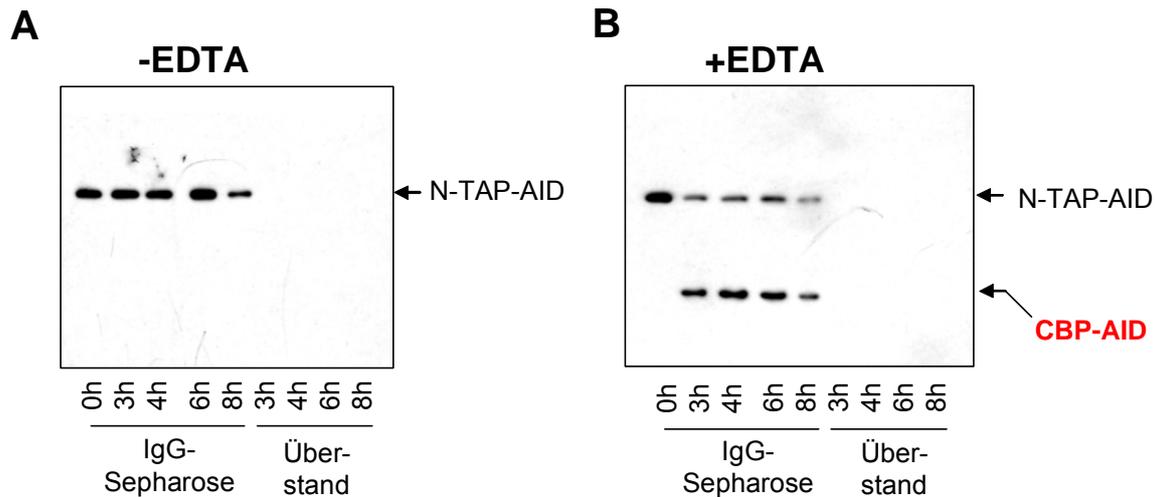


Abbildung 20: TEV-Proteasespaltung mit und ohne EDTA

A) Ohne Zugabe von EDTA spaltet die TEV-Protease das TAP-AID-Protein nicht. Die Probenentnahme erfolgte nach 3h, 4h, 6h und 8h. Die Detektion der Proteine in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem EK2-2H5-Antikörper. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen. **B)** Die TEV-Proteasespaltung des TAP-AID-Proteins ist bei Zugabe von 0,5 mM EDTA erfolgreich. Das um 15 kDa kleinere CBP-AID ist bereits nach drei Stunden Inkubationszeit nachweisbar. Die Probenentnahme erfolgte wie bei A). Das CBP-AID-Protein ließ sich in diesem Experiment nicht von der IgG-Sepharose ablösen. Die Detektion der Proteine in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem EK2-2H5-Antikörper. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen.

wurde. Das Lysat wurde in zwei Teile geteilt und entweder mit Lysepuffer oder mit TEV-Spaltungspuffer zur IgG-Sepharose zugegeben. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand mit der abzentrifugierten Matrix verglichen (Abb.21A). Nur ein sehr geringer Teil des AID-Proteins bindet an die Matrix, etwas mehr in Anwesenheit des TEV-Spaltungspuffers. AID selbst bindet also nicht nennenswert an die IgG-Sepharose.

Um das Ablösen des CBP-AID-Proteins von der IgG-Matrix zu verbessern, wurde der TEV-Spaltungsschritt in verschiedenen Reaktionsgefäßen getestet. In Abbildung 21B ist die Reaktion dargestellt, die in LUERLOCK-Reaktionsgefäßen durchgeführt wurde. Da hier der Elutionsschritt nach der TEV-Proteasespaltung über Zentrifugation erfolgen kann, konnte die Effizienz der Elution um ein Vielfaches verbessert werden. Ein zusätzlicher Elutionsschritt mit Hilfe von Zentrifugation konnte aber die Effizienz nicht weiter steigern (Abb.21C).

Der nächste Schritt in der TAP-Reinigung ist die Bindung des CBP-AID an eine Calmodulin-Matrix. Da die Bindung über zweiwertige Ca^{2+} -Ionen vermittelt wird, wurde die Bindung unter verschiedenen Ca^{2+} -Ionenkonzentration getestet (Abb.22A). Bei Ca^{2+} -Konzentration zwischen 1 mM und 3 mM war die Bindungseffizienz der Reaktion sehr gering (Abb.22A). Auch eine weitere schrittweise Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration bis hin zu 8 mM ergab keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt).

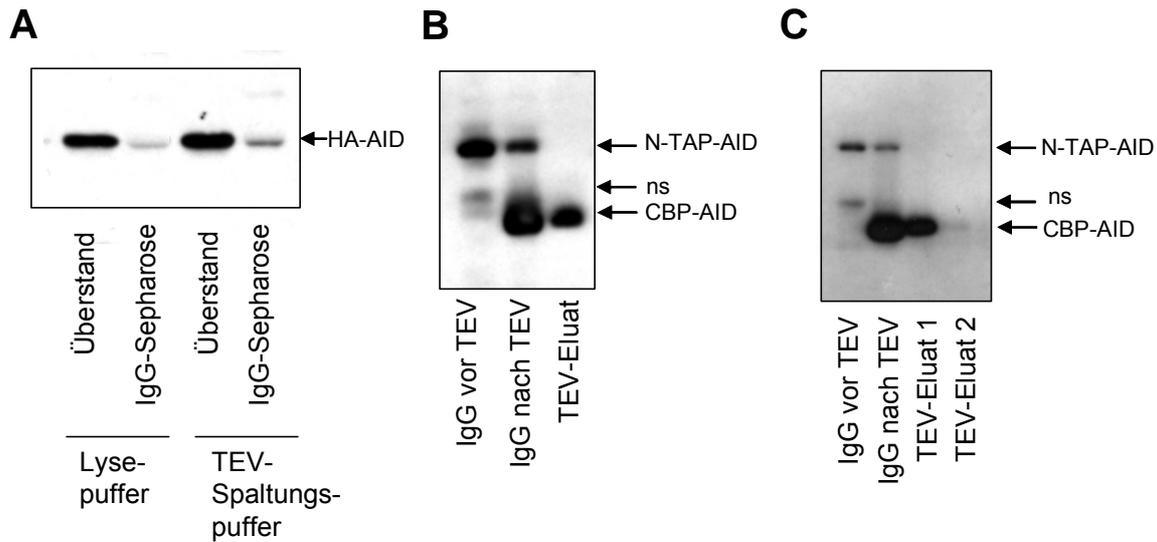


Abbildung 21: Versuche zur Etablierung der TEV-Elution

A) Das HA-AID-Protein bindet nur zu einem geringen Anteil an die IgG-Sepharose. Die Detektion des HA-AID-Proteins in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem HA-Antikörper 3F10. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen. B) Der TEV-Elutionsschritt konnte durch die Verwendung von LUERLOCK-Reaktionsgefäßen entscheidend verbessert werden. IgG vor TEV: Probenentnahme von IgG-Sepharose vor der TEV-Spaltung; IgG nach TEV: Probenentnahme von IgG-Sepharose nach der TEV-Spaltung; ns: nicht spezifisch. Die Detektion der AID-Fusionsproteine in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem EK2-2H5-Antikörper. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen. C) Ein zusätzlicher Elutionsschritt (TEV-Eluat 2) erhöht die Ausbeute nicht. IgG vor TEV: Probenentnahme von IgG-Sepharose vor der TEV-Spaltung; IgG nach TEV: Probenentnahme von IgG-Sepharose nach der TEV-Spaltung; ns: nicht spezifisch. Die Detektion der AID-Fusionsproteine in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem EK2-2H5-Antikörper. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen.

Ein Versuch den zweiten Reinigungsschritt durch eine Immunpräzipitation gegen AID zu ersetzen, ergab ebenfalls kein effizienteres Ergebnis. Die Bindung der AID-Komplexe ist zu schwach, um im Western-Blot nachgewiesen zu werden (Abb.22B). Das Signal, das in der Western-Blot-Analyse zu sehen ist, entspricht der leichten Immunglobulin-Kette des AID-Antikörpers, der an die Matrix gekoppelt wurde. Dieses Signal ist ebenfalls in der Negativkontrolle zu beobachten (Abb.22B).

Letztendlich gelang es durch den parallelen Ansatz von zwei IgG-Bindungen und die anschließende Vereinigung der TEV-Eluate, die Ausbeute bei der Calmodulin-Bindung zu erhöhen. Für das N-TAP-AID ist eine exemplarische TAP-Reinigung in Abbildung 23A dargestellt. Mit dem C-TAP-AID wurden alle etablierten Reinigungsschritte wie beschrieben durchgeführt. In Abbildung 23B ist für dieses AID-Fusionsprotein eine exemplarische TAP-Reinigung gezeigt.

Um die Abreicherung während der gesamten Affinitätsreinigung zu überprüfen, wurden Proben der einzelnen Schritte der TAP-Reinigung in einem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Proteine mit Silberfärbereagenzien sichtbar gemacht (Abb.24A-C).

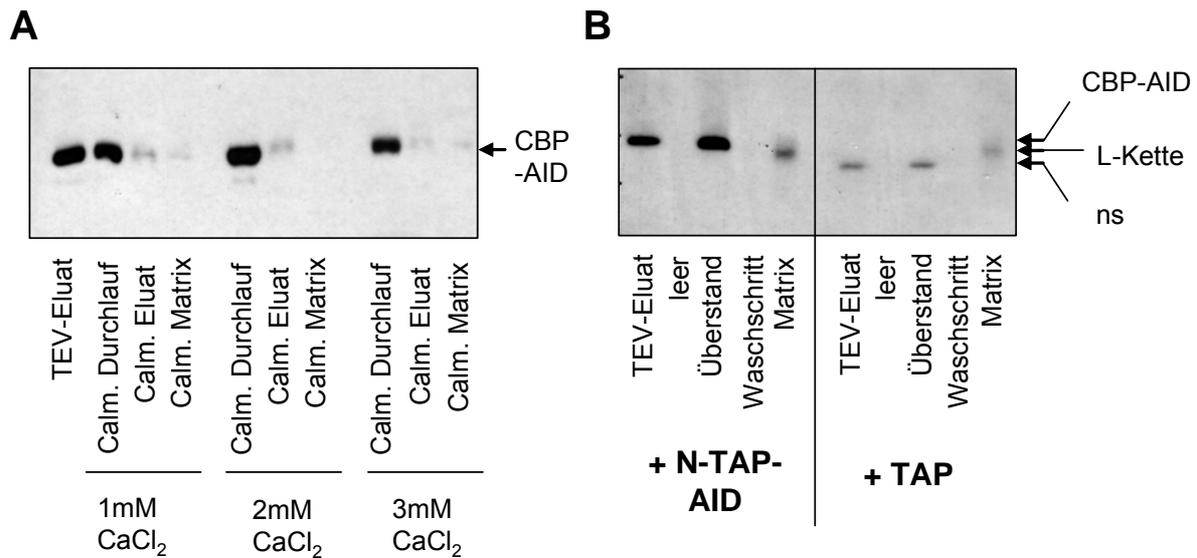


Abbildung 22: Versuche zur Calmodulinbindung

A) Durch Erhöhung der Kalziumionenkonzentration konnte keine Verbesserung der Calmodulinbindung erreicht werden. Die Detektion der AID-Fusionsproteine in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem EK2-5G9-Antikörper. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen. Calm.: Calmodulin. **B)** Das Ersetzen des Calmodulinbindungsschritts durch eine Immunpräzipitation führt nicht zur Anreicherung des CBP-AID-Proteins. Die Detektion der AID-Fusionsproteine in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem EK2-5G9-Antikörper. Es wurden pro Fraktion äquivalente Mengen aufgetragen. L-Kette: Leichte Kette des in der Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers; ns: nicht spezifisch.

Schon der erste Reinigungsschritt führte zur Depletion vieler Proteine, die nicht spezifisch an die IgG-Sepharose binden. Das TEV-Eluat erscheint bei äquivalenter Probenauftragsmenge fast leer. Bei der zweiten Affinitätsreinigung kommt es zu einer weiteren Depletion von Proteinen. Im finalen Calmodulin-Eluat ist bei äquivalenter Auftragsmenge nicht genug Protein vorhanden, um mit dieser Proteinnachweismethode detektiert zu werden (für Silberfärbungen werden Proteinmengen im μg -Bereich benötigt).

Trägt man die 20fache Proteinmenge auf, so kann man im hochmolekularen Bereich einige Proteine detektieren (Abb.24D). Im niedermolekularen Bereich sind nur sehr wenige Proteine detektierbar, was aber darauf zurückzuführen sein könnte, dass diese zu geringe Mengen an Silberpartikeln binden, um ein Signal zu ergeben (Abb.24D). Da für die anschließende massenspektrometrische Analyse der AID-Komplexe nur Proteinmengen im fmol-Bereich benötigt werden (siehe 3.3.2), sind die hier gereinigten Mengen ausreichend für dieses Analyseverfahren. Die finalen Calmodulin-Eluate wurden für die Analyse im Massenspektrometer verwendet und die Identifikation von AID-Interaktionspartnern ist möglich (siehe 3.3.3 und Tab.4).

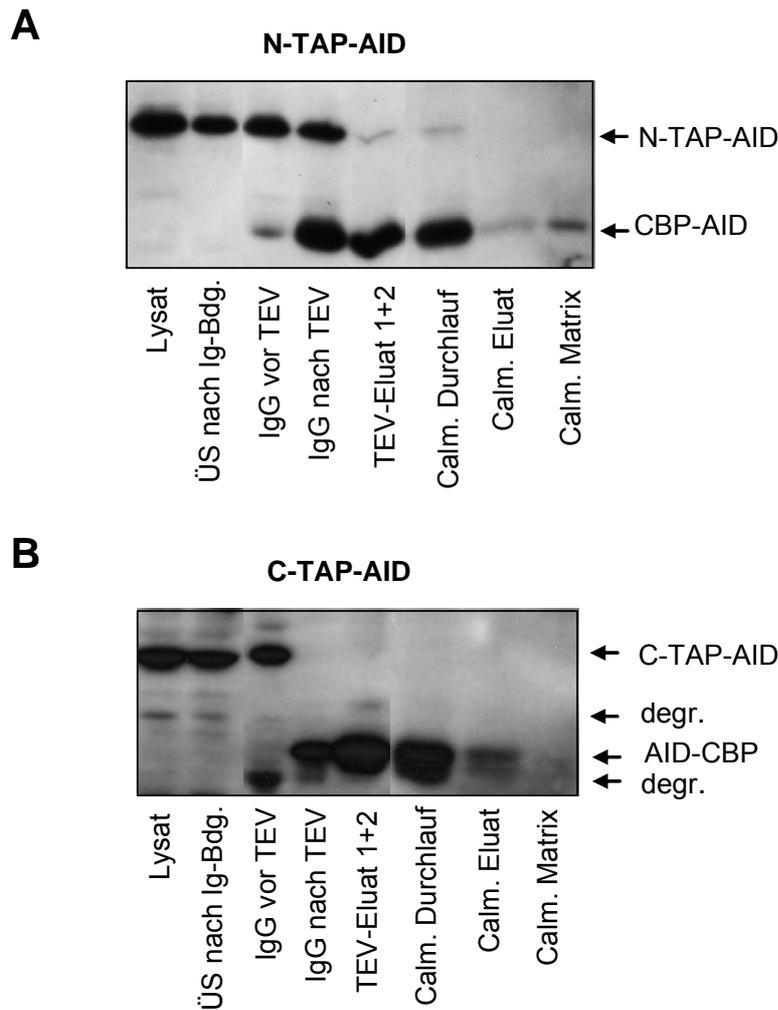


Abbildung 23: TAP-Reinigung von N-TAP-AID und C-TAP-AID

Durch Vereinigung von zwei TAP-Eluaten konnte die Anreicherung der TAP-AID-Fusionsproteine gesteigert werden. Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse einer TAP-Reinigung für **A)** das N-TAP-AID-Fusionsprotein und **B)** das C-TAP-AID-Fusionsprotein. Die Detektion der AID-Fusionsproteine in der Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem EK2-5G9-Antikörper. Auftragsmengen bezogen auf Ausgangsmenge wie folgt: Lysat: 1/1000; ÜS nach Ig-Bdg.: 1/1000; Ig vor TEV: 1/80; Ig nach TEV: 1/80; TEV-Eluat 1+2: 1/40; Calm. Durchlauf: 1/40; Calm. Eluat: 1/40; Calm. Matrix: 1/40. Calm.: Calmodulin, degr.: Degradationsprodukt des AID-Fusionsproteins; IgG vor TEV: Probenentnahme von IgG-Sepharose vor der TEV-Spaltung; IgG nach TEV: Probenentnahme von IgG-Sepharose nach der TEV-Spaltung; ÜS nach Ig-Bdg.: Überstand nach Ig-Bindung.

Für das finale N-TAP-AID Calmodulin-Eluat sind insgesamt mehr Proteine sichtbar, was an der höheren Expression und somit Ausgangsmenge an Komplexen liegen könnte. Bei dem C-TAP-AID ist eine wesentlich geringere Menge an Proteinen aufgereinigt worden, auch hier könnte die Expressionsstärke ursächlich sein. Bei der Negativkontrolle wurden unspezifisch an die Calmodulin-Matrix gebundene Proteine eluiert, die dann nach der massenspektrometrischen Bestimmung als spezifische AID-Interaktionspartner ausgeschlossen wurden.

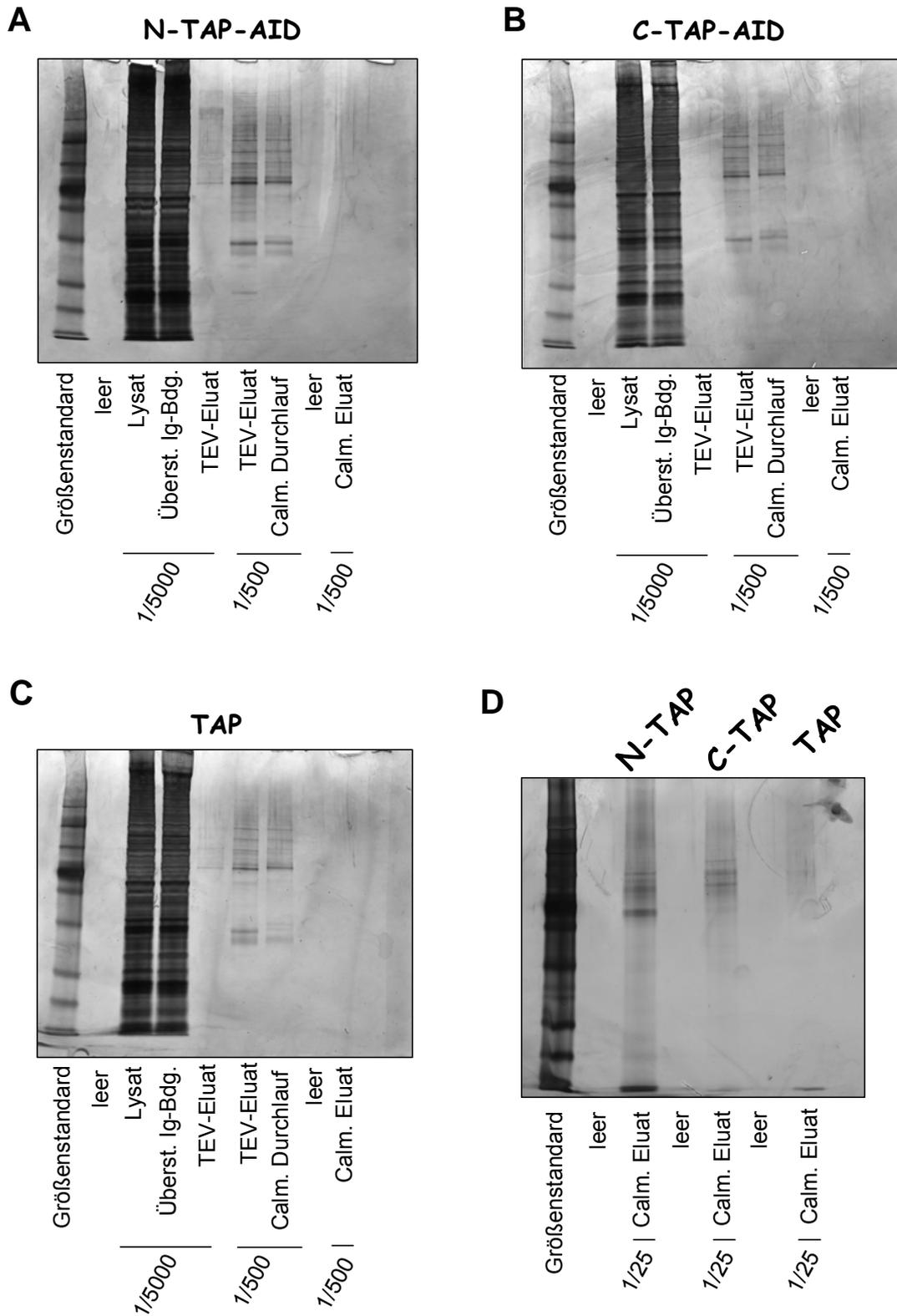


Abbildung 24: Abreicherung von Gesamtprotein und Anreicherung spezifischer Proteine während der TAP-Reinigung von N-TAP-AID und C-TAP-AID

A-C) Silbergefärbungen von Fraktionen der TAP-Reinigung. Calm.: Calmodulin; Überst. Ig-Bdg.: Überstand der Ig-Bindung. D) Silberfärbung der finalen Calmodulin-Eluate. 1/5000, 1/500 und 1/25: Auftragsmenge bezogen auf Ausgangsmenge der entsprechenden Fraktionen.

3.3.2 Nano-Flüssigchromatographie und MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometrie

Es gibt mehrere Möglichkeiten mit denen man ein Proteingemisch für die massenspektrometrische Detektion vorbereiten kann. Es können einzelne Proteinbanden aus einem 1D-Gel ausgeschnitten werden, anschließend mit dem Enzym Trypsin in Peptide gespalten und das Protein durch die Bestimmung der Massen seiner Peptide identifiziert werden („Peptide Mass Fingerprint“ (PMF)) (Cottrell, 1994; Pappin, 1997). Konnte das Protein mittels PMF nicht identifiziert werden oder soll das Ergebnis nochmals bestätigt werden, kann anschließend noch eine MS/MS-Messung (MS-Sequenzierung) durchgeführt werden (Steen und Mann, 2004). Hierbei wird ein einzelnes Peptid im Massenspektrometer in charakteristische Peptidfragmente zerschlagen und deren Aminosäuresequenz bestimmt. Die zu analysierende Probe kann aber auch ohne eine vorherige Trennung der Proteine über ein 1D-Gel mit einem Enzym in Lösung gespalten werden, wobei nun ein komplexes Peptidgemisch entsteht. Die Reduktion der Komplexität erfolgt durch eine Auftrennung der Peptide mit Hilfe einer Nano-Flüssigkeitschromatographie. Da die einzelnen Peptide nun nicht mehr direkt einem einzelnen Protein zugeordnet werden können, ist eine MS-Sequenzierung zur Identifikation der Proteine obligatorisch.

Um die beiden Möglichkeiten der Proteinvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse zu vergleichen, wurden Titrationsexperimente mit dem Standardprotein Rinder-serumalbumin (BSA) durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente wurde auch die Sensitivität des Applied Biosystem 4700 Massenspektrometers bestimmt.

Es wurden definierte Mengen BSA auf ein SDS-PAGE aufgetragen, die Proteinbanden ausgeschnitten und eine enzymatische Spaltung mit Trypsin im Gel durchgeführt. Von den trypsinierten Proben wurde ein Teil direkt auf eine MALDI-Platte aufgetropft und dann im MALDI-TOF-TOF-MS analysiert. Da es durch die hohen Salzkonzentrationen im Spaltungspuffer oft zur Reduzierung der Sensitivität kommen kann, wurde ein weiterer Teil der gleichen Probe vor der massenspektrometrischen Analyse mit so genannten Zip-Tips (Millipore, Bedford, USA) behandelt. Hierbei handelt es sich um kleine C_{18} Säulen, an die Peptide unter hydrophilen Bedingungen binden, die Salze werden hingegen entfernt. Außerdem wurde ein dritter Teil der Probe zuerst mit Hilfe einer Nano-Flüssigkeitschromatographie (Nano-LC) aufgetrennt, und daraufhin im Massenspektrometer analysiert.

Tabelle 3: Versuche zur Sensitivität der MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometrie

	BSA [ng]	BSA [fmol]	Identifikation mit MALDI-TOF-TOF-MS
Zip-Tip	750	11300	+
	252	7900	+
	175	2600	+
	70	1050	-
	50	750	-
	35	500	-
	17,5	260	-
	7	100	-
	0,7	10	-
direktes Auftragen auf MALDI-Platte	500	7500	+
	375	5600	+
	250	3700	+
	125	1900	+
	50	750	+
	37,5	600	+
	25	400	+
	12,5	200	-
	5	75	-
2,5	40	-	
Nano-LC	26	400	+
	20	300	+
	13	200	+

In Tabelle 3 sind die Nachweisgrenzen von BSA mit der jeweiligen Herangehensweise aufgeführt. Hierbei kann die Variante über die Nano-LC als die sensitivste von den Dreien angesehen werden. Mit diesem Ansatz war es möglich, BSA ab 200 fmol nachzuweisen (Tab.2). Die scheinbar geringere Sensitivität nach der Zip Tip Behandlung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass man bei diesem Verfahren sehr viele Peptide verliert. Die Tatsache, dass viel Probenmaterial verloren geht, ist bei einer Anwendung bei der man mit sehr geringen Ausgangsmengen arbeitet nicht wünschenswert.

Somit wurden die weiteren Analysen mit Nano-LC-Auftrennung durchgeführt. Da eine Trypsinspaltung in Lösung wegen Problemen bei der vorausgehenden Fällung der Proteine nicht möglich war, wurde das Eluat nach der TAP-Reinigung auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Die geringe Menge an Probenmaterial bedingte, dass keine einzelnen Banden ausgeschnitten

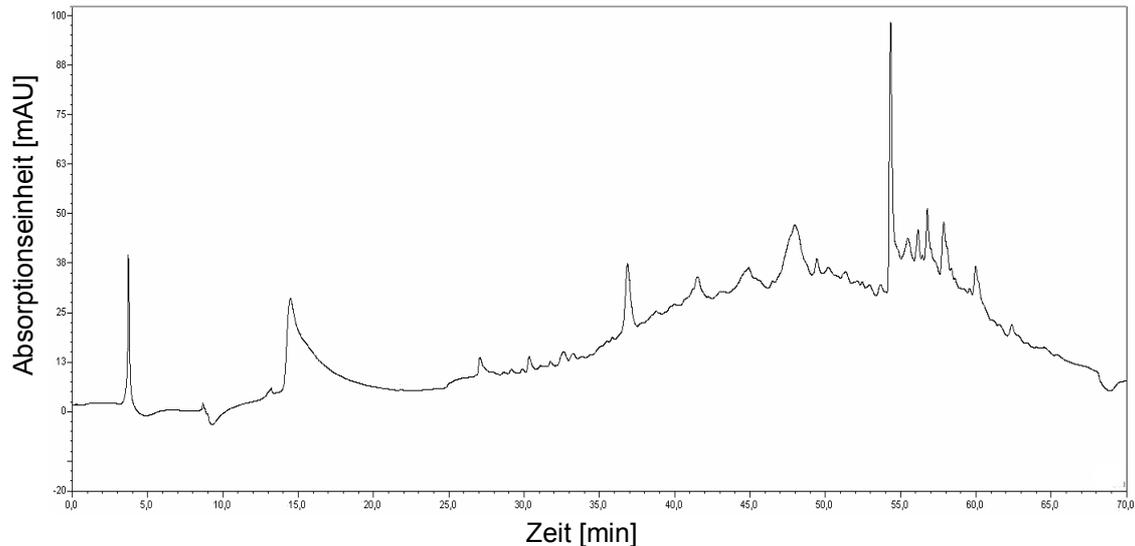


Abbildung 25: UV-Spektrum eines Nano-LC-Experiments mit einem finalen Calmodulin-Eluat des C-TAP-AID

Die verschiedenen Peptide wurden nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt und in einem UV-Detektor bei 214nm detektiert.

werden konnten. Das Proteingemisch wurde nur 1cm weit elektrophoretisch getrennt und anschließend wurden zwei Gelstücke ausgeschnitten. Die Proteine im Gel wurden enzymatisch mit Trypsin gespalten und dann mittels Nano-LC chromatographisch aufgetrennt, wobei die hydrophilen Peptide zuerst eluieren. In Abbildung 25 ist exemplarisch ein Chromatographiespektrum einer finalen TAP-Eluat-Probe (C-TAP-AID) gezeigt. Die Peptidauftrennung wurde mit einem UV-Detektor bei $A_{214\text{nm}}$ gemessen und aufgezeichnet. Die aufgetrennten Peptide wurden mit Hilfe eines Roboters (Probot) mit der Matrix im Verhältnis 1:4 vermischt und auf eine MALDI-Platte millimetergenau und auf einander folgenden Punkten für eine definierte Zeitspanne aufgetropft. Auf dieselbe MALDI-Platte wurde noch ein Peptidstandardgemisch definierter Größe aufgetragen, mit dessen Hilfe die Peptidgrößen im Massenspektrometer ermittelt werden.

Jeder Probenpunkt enthielt mehrere Peptide, die im Massenspektrometer in der MS-Messung analysiert wurden. In Abbildung 26A ist ein MS-Spektrum dargestellt, das sich aus der Analyse eines Probentropfens ergab. Auf der x-Achse sind die Größen der Peptide aufgetragen (von 900Da bis 4000Da), und auf der y-Achse die Intensität des Signals. Das Massenspektrometer wählte nach benutzerdefinierten Kriterien aus diesem Peptidgemisch die Vorläufer („precursor“) für den MS-Sequenzierungsschritt aus. Der Peptidvorläufer wurde in der Kollisionszelle des Massenspektrometers in definierte Fragmente zerschlagen und deren Massen ermittelt. In Abbildung 26B ist für einen Peptidvorläufer das MS/MS-Spektrum

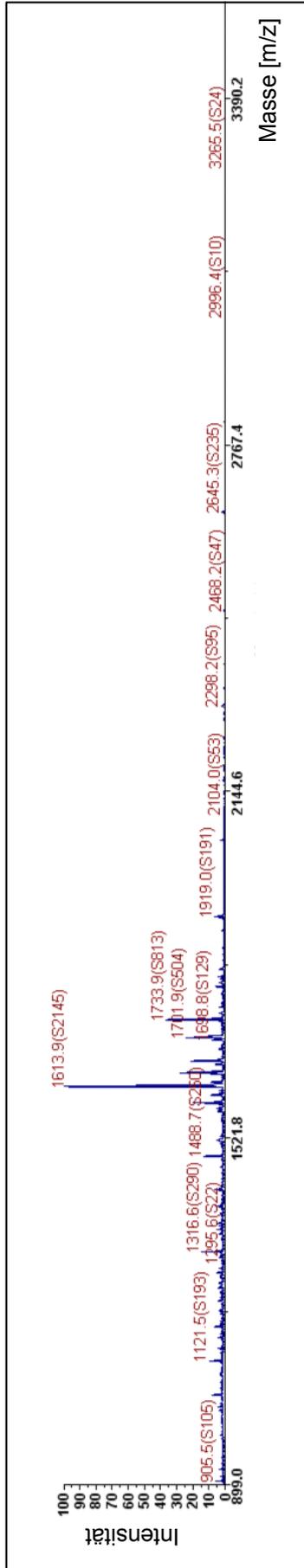
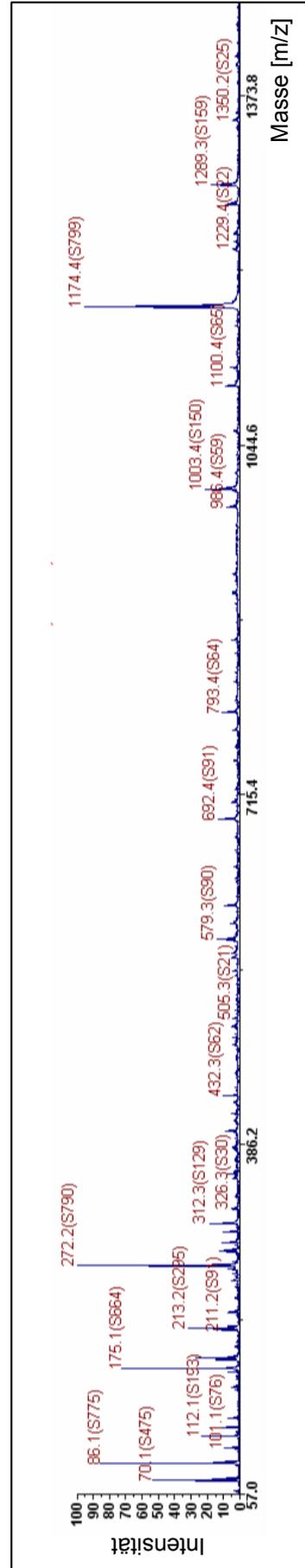
A**B**

Abbildung 26: Massenspektrometrische Analyse eines Probenprotropfens einer TAP-Reinigung

A) Dargestellt ist das MS-Spektrum eines Probenprotropfens nach der Nano-LC-Auftrennung (N-TAP-AID). B) Dargestellt ist das MS-MS-Spektrum eines Peptidvorläufers mit dem Molekulargewicht 1613,9 Da (siehe A). S: Signal zu Hintergrund-Verhältnis; die Masse ist in Da angegeben.

dieser Fragmente dargestellt. Hier bewegen sich die molekularen Größen zwischen 57Da und 1400Da, welche je nach Größe und Sequenz des Vorläuferpeptids variieren. Je Probentropfen auf der Platte können mehrere Vorläufer gefunden werden, d.h. das Massenspektrometer analysiert viele tausend Vorläuferpeptide und sequenziert diese. Die Proteinidentifizierung erfolgt anschließend durch einen Abgleich mit der Proteindatenbank Swiss Prot mit entsprechenden Computeralgorithmen (MASCOT).

Die Analysen für die Identifikation der AID-interagierenden Proteine wurden aus technischen Gründen teilweise am ABI 4800-Analyzer in Darmstadt bei der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das hatte den Vorteil, dass ein Gerät verwendet werden konnte, das um den Faktor 10 sensitiver ist als der hauseigene ABI 4700-Analyzer.

3.3.3 Potentielle AID-Interaktionspartner

Die im Rahmen zweier TAP-Reinigungen identifizierte potentiellen Interaktionspartner des Enzyms AID sind in Tabelle 4 zusammengestellt. In dieser Tabelle wurden die Proteine für das N- und C-TAP-AID vereinigt. Die Liste der Interaktionspartner wurde nach im Methodenteil 6.18 beschriebenen Kriterien analysiert und nur Proteine mit mindestens einem signifikanten Peptid wurden in sie aufgenommen. Die Proteine wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt. In der Negativkontrolle (TAP) identifizierte Proteine wurden als falsch-positive Interaktionen gewertet und aus der Kandidatenliste gestrichen. Im Anhang sind die jeweiligen Listen getrennt und mit Signifikanzscores dargestellt.

Das AID-Protein konnte in beiden Reinigungen und reproduzierbar in weiteren TAP-Eluaten detektiert werden. Es konnten des Weiteren potentielle AID-interagierende Proteine identifiziert werden, die drei sehr interessanten Gruppen angehören: Transkriptionsfaktoren, Mitglieder des Ubiquitin-Proteasom-Systems und DNA-Reparatur-Faktoren.

In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren sind drei der Faktoren besonders zu erwähnen: TFE3, TFEB und MITF. Sie gehören der TFE/MITF-Familie an, von deren Mitgliedern einige an das E-Box-Motiv im IgH-Intron-Enhancer binden. Diese Eigenschaft lässt sie als Targetingfaktoren für AID an den Ig-Locus in Frage kommen. Da diese Transkriptionsfaktoren Homologiebereiche aufweisen, wie z.B. das Helix-Loop-Helix (Albert et al.)-Motiv, sind einige der Peptide für die Mitglieder der TFE/MITF-Familie identisch (Abb.28). So konnten nur zwei der Transkriptionsfaktoren spezifisch nachgewiesen werden. Für TFE3 und TFEB wurden in der MALDI-MS/MS-Analyse je zwei signifikante Peptide identifiziert und von diesen war je eines spezifisch, d.h. diese Peptide liegen nicht im Homologiebereich.

Tabelle 4: Liste mit Proteinen, die potentiell mit AID interagieren

Markiertes Ausgangsprotein	Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase
Transkriptionsfaktoren	Hämatopoetische Zelllinien-spezifisches Protein (HS1) Microphthalmia-assoziiertes Transkriptionsfaktor (MITF) Nukleäres Protein SkiP Transkriptionsfaktor EB (TFEB) Transkriptionsfaktor E3 (TFE3)
Ubiquitin-Proteasom-System	Proteasom-Aktivator-Komplex Untereinheit 3 Ubiquitin Ubiquitin-Carboxyl-Terminale Hydrolase 36 Ubiquitin-konjugierendes Enzym 7 interagierendes Protein 3 Ubiquitin-Protein-Ligase EDD
DNA-Reparatur	CAF ("Chromatin assembly factor 1") Untereinheit C PCNA ("Proliferating cell nuclear antigen")
Transkription	RuvB-like 2 (ATPase und DNA-Helikase Aktivität) TATA-Element modulierender Faktor (TMF)
Zytoskelett	Aktin Emerin Serin/Threonin-Protein Kinase PLK3 Spektrin beta Kette Tubulin alpha-1 Kette Tubulin alpha-4 Kette Tubulin alpha-6 Kette Tubulin beta-1 Kette Tubulin beta-2 Kette Tubulin beta-5 Kette Vimentin
Hitzeschockproteine	Hitzeschockprotein 1 70 kDa (HSP70.1) Hitzeschockprotein 1-HOM 70 kDa (HSP70-HOM) Hitzeschockprotein 6 70 kDa Hitzeschockprotein "cognate" 71 kDa Hitzeschockprotein HSP 90-beta (HSP 84) Hitzeschockprotein HSP 90-alpha (HSP 86) Hitzeschockprotein 75 kDa
Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNP)	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein F (hnRNP F) Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H (hnRNP H) Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H' (hnRNP H')

Fortsetzung Tabelle 4:

Andere	ADP,ATP „carrier“ Protein Amyotrophe Lateral Sklerose 2 chromosomal C-1-Tetrahydrofolat Synthase CDC45-„related“ Protein Copine VII Deoxycytidin Kinase Desmocollin 1A/1B Vorläufer Ectonukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2 Elongationsfaktor 1-alpha 1 Exocyst-Komplex-Komponente Sec6 78 kDa Glucose-regulierter Proteinvorläufer Glutamat Rezeptor-interagierendes Protein 1 GPI Transamidase Komponente PIG-T HLA Klasse I Histokompatibilitätsantigen, Cw-3 Hypothetisches Protein C14orf39 Hypothetisches Protein KIAA0196 Interleukin-17E Vorläufer (IL-17E) Mevalonat Kinase Mitochondriales 28S ribosomales Protein S22 Neurofilament Triplet H Protein Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase „like“ 1 Phosphat „carrier“ Protein Polyadenylat-bindendes Protein 3 Polycystin 1 Vorläufer Protein KIAA0539 40S ribosomales Protein S10 SCO2 Protein Homolog Serin/Threonin Protein Phosphatase 2B (Untereinheit A und C) Serumalbumin Vorläufer
Kontamination	Calmodulin Ig gamma-1 Kette C-Region Ig gamma-2 Kette C-Region Ig gamma-4 Kette C-Region Keratin, type II Trypsin III Vorläufer

Der Faktor MITF konnte nach den in dieser Arbeit angewandten Kriterien nicht eindeutig identifiziert werden, da nur ein signifikantes Peptid identifiziert wurde, welches im bHLH-Motiv liegt.

Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems konnten ebenfalls im AID-Komplex nachgewiesen werden. Es konnten Ubiquitin, eine E3 Ubiquitin-Ligase EDD, eine Ubiquitin-Hydrolase und eine Proteasom-Untereinheit identifiziert werden. Dieses System spielt eine Rolle bei der Proteinregulation z.B. über proteasomale Degradation.

Des Weiteren wurden Komponenten der DNA-Reparatur-Maschinerie gefunden, wie PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“), das eine wichtige Rolle z.B. bei der Rekrutierung von fehlerhaft replizierenden DNA-Polymerasen spielt.

Außerdem konnten Faktoren, die eine Rolle bei der Transkription spielen nachgewiesen werden. Die DNA-Helikase RuvBL2 ist eine Komponente des RNA-PolIII Holoenzymkomplexes. Transkription ist für den Prozess der SHM unabdinglich, denn ohne Transkription wird auch keine Einführung von Mutationen beobachtet.

Des Weiteren wurden Faktoren nachgewiesen, die zum Zytoskelett, den Hitzeschock Proteinen und den heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen zählen. Bei diesen Gruppen ist der Bezug zu AID weniger klar. Es handelt sich hierbei um Proteine mit sehr heterogenen Funktionen, so dass eine Beteiligung an Ig-diversifizierenden Prozessen durchaus im Möglichen liegt.

Die Gruppe der Proteine, deren Zusammenhang mit AID und SHM nicht erkennbar oder deren Funktion noch nicht bekannt ist, wurde unter „Andere“ zusammengefasst. Eindeutige Kontaminationen wie z.B. Calmodulin oder IgG, die von den Matrizes der TAP-Reinigungsschritte stammen, wurden unter dem Punkt Kontamination eingeordnet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Koreinigung von je einem Mitglied der drei wichtigsten Gruppen mit Hilfe einer unabhängigen Methode, der Western-Blot-Analyse, gezeigt werden (Abb.27A). In den finalen Eluatn der zwei TAP-Reinigungen (N-TAP-AID und C-TAP-AID) konnte die Koreinigung des Transkriptionsfaktors TFEB, des Replikations- und Reparaturfaktors PCNA und von monomerem Ubiquitin bestätigt werden. Bei der Negativkontrolle (TAP) werden die Faktoren im Durchlauf der Calmodulinbindung nachgewiesen, binden also nicht an die Calmodulin-Matrix. Das zeigt, dass unspezifisch-bindende Proteine aus dem ersten Affinitätsschritt im zweiten Reinigungsschritt eliminiert werden. Aus volumentechnischen Gründen konnte von der TEV-Eluat-Probe nur 1/60 aufgetragen werden, so dass die Proteinmenge der AID-interagierenden Proteine wohl unter

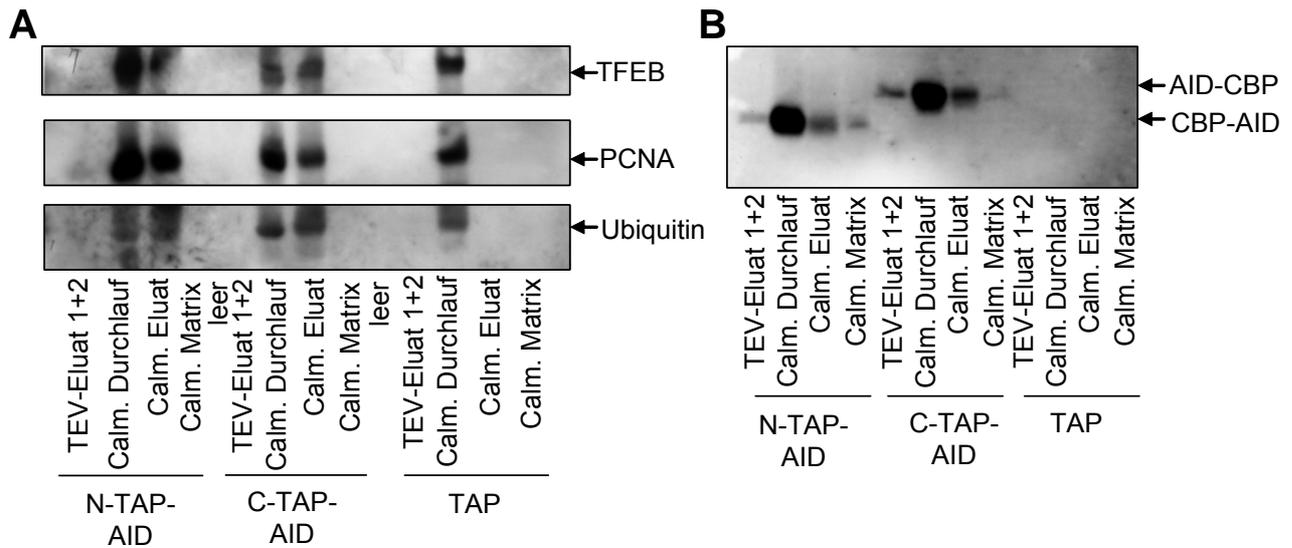


Abbildung 27: Koreinigung von AID-interagierenden Proteinen

A) Detektion kogereinigter Proteine mit Antikörpern gegen TFEB, PCNA bzw. Ubiquitin. Die Membranen wurden nacheinander mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Auftragsmengen bezogen auf Ausgangsmenge wie folgt: TEV-Eluat 1+2: 1/60; Calm. Durchlauf: 1/20; Calm Eluat: 1/20; Calm. Matrix: 1/40. Calm.: Calmodulin. **B)** Detektion der AID-Fusionsproteine mit dem EK2-5G9-Antikörper. Auftragsmengen bezogen auf Ausgangsmenge wie folgt: TEV-Eluat 1+2: 1/60; Calm. Durchlauf: 1/40; Calm Eluat: 1/40; Calm. Matrix: 1/40. Calm.: Calmodulin.

der Detektionsgrenze der Western-Blot-Analyse lag (Abb.27A). Bei den Calmodulinproben konnte 1/20 der Probe aufgetragen werden, also um den Faktor drei mehr als im TEV-Eluat. In Abbildung 27B ist die Detektion des CBP-AID in den zwei TAP-Eluaten gezeigt. Wie zu erwarten ist es in der Negativkontrolle nicht detektierbar. Die Fusion des CBP-Peptids an den C-Terminus des AID-Proteins ändert das Laufverhalten des Proteins in der Gelelektrophorese. So wird das AID-CBP-Fusionsprotein mit einem scheinbar höheren Molekulargewicht detektiert als erwartet (Abb.27B).

Im Rahmen der Tandem Affinitätsreinigung konnte insgesamt eine Abreicherung von Proteinen ca. um den Faktor 1/200.000 erreicht werden. Aus dem Proteingehalt der Fraktionen der TAP-Reinigung und den Intensitäten der AID-Signale im Western-Blot lässt sich abschätzen, dass das AID-Protein ca. um den Faktor 4000 angereichert wurde. Für den potentiellen Interaktionspartner TFEB konnte eine Anreicherung ca. um den Faktor 3000 erreicht werden. Der Unterschied zwischen Proteinabreicherung und Anreicherung von AID und Interaktionspartner (200.000 vs. 3-4000) spiegelt den Verlust an eingesetztem Protein während der Reinigung wieder (insbesondere beim Calmodulin-Bindungsschritt). Trotz einer Wiederfindung von nur ca. 2 % des Ausgangsproteins ist es mit der entwickelten Methodik möglich, bei physiologischer Expression von AID in B-Zellen biologisch relevante Interaktionspartner zu identifizieren.

4 Diskussion

Es ist seit mehr als 30 Jahren bekannt, dass *in vivo* die Affinität eines Antikörpers zu einem bestimmten Antigen bei wiederholter Exposition erhöht wird und dass dieses durch den Mechanismus der SHM im Rahmen der T-Zell abhängigen Immunantwort geschieht. Man weiß auch, dass während der Immunantwort, abhängig von der Natur des Erregers, die Effektorfunktion des Antikörpers durch CSR gewechselt werden kann. Doch die detaillierten biochemischen und molekularen Mechanismen dieser Prozesse sind bis heute nicht vollständig entschlüsselt. Die Entdeckung eines einzigen Enzyms, das für beide Prozesse notwendig ist, hat den Stand der Forschung rasant vorangebracht. Dieses Enzym, AID, wurde 1999 von der Gruppe von T. Honjo entdeckt (Muramatsu et al., 1999) und die beiden als bisher völlig unterschiedlich angesehenen Prozesse, SHM und CSR, konnten durch AID auf einen gemeinsamen Teilmechanismus zurückgeführt werden. Bis dato sind die verschiedenen Regulationsstufen von AID Bestandteil intensiver Forschung. Es ist noch nicht bekannt, was AID zum transkribierten Ig-Locus leitet, noch welche Signalkaskaden in die AID-Regulation involviert sind, noch wie es zur Umgehung der fehlerfreien Reparaturmechanismen kommen kann und ebenso wenig wie diese Prozesse wieder abgestellt werden. So ist die Untersuchung der Regulation oder der Deregulation von AID von großer Bedeutung, da die Deregulation von AID auch in Zusammenhang mit Lymphomentstehung gebracht wird.

4.1 AID-Expression in humanen B-Zellen und in primärem Lymphomgewebe

In der westlichen Welt werden über 20 neue Lymphomfälle pro 100.000 Menschen pro Jahr diagnostiziert. 95% der Lymphome sind B-Zell-Ursprungs (Kuppers, 2005). Hiervon entstehen wiederum viele aus Keimzentrums-B-Zellen, so ist es nahe liegend die genetischen Ereignisse, die in diesen Zellen stattfinden, für das transformierende Potential verantwortlich zu machen. Man nimmt an, dass es durch die Fehlsteuerung der Keimzentrums-Prozesse zu Translokationsereignissen kommen kann, die Protoonkogene unter die Kontrolle des Ig-Promoters bringen. Die daraus resultierende konstitutive und deregulierte Expression dieser Gene kann zur klonalen Entartung der Zellen führen. Als Beispiel wurde schon das *c-myc*-Gen erwähnt, das in BL in den Ig-Locus transloziert vorliegt (Taub et al., 1982).

Das AID-Protein ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da es die Prozesse im Keimzentrum reguliert, die den Immunglobulinlocus genetisch verändern. Außerdem kann

AID auch direkt als Mutator an der Pathogenese von Lymphomen beteiligt sein, da eine deregulierte AID-Expression zum Verlust der Zielspezifität von SHM führen kann. Die Mechanismen, die die genomische Integrität der Zelle gewährleisten, könnten durch die deregulierte AID-Expression überlastet werden und dieses kann eine inkorrekte DNA-Reparatur zur Folge haben.

Basierend auf mRNA-Daten ist bekannt, dass AID in Keimzentrums-B-Zellen und in Lymphomen, die von diesen abstammen, exprimiert wird. Das Proteinexpressionsmuster konnte mangels eines spezifischen Antikörpers bis jetzt nicht untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden AID-spezifische monoklonale Antikörper generiert und etabliert.

In Lymphomzelllinien konnte AID mit diesen Antikörpern in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden und die mRNA-Daten in verschiedenen BL-Zelllinien bestätigt werden. Die Analysen zeigen, dass das AID-Protein in allen untersuchten BL-Zelllinien mit unterschiedlichen Leveln exprimiert wird.

Mit den hier generierten AID-Antikörpern ist es erstmals möglich, die Expression und Lokalisation des AID-Proteins auch *in vivo* zu untersuchen. So konnten verlässliche Daten für die AID-Proteinexpression in primären Geweben gewonnen werden. Der Antikörper EK2-5G9 färbt AID immunhistochemisch auf Gewebeschnitten an. Färbungen von Lymphommaterial zeigten, dass die AID-mRNA-Expressionsdaten im Falle von BL und FL unterstützt werden können. Die AID-Proteinexpression in HL war bisher unbekannt, da Techniken, die das Protein aus dem Gesamttumorgewebe isolieren, für die Analyse von HL bis jetzt nicht anwendbar waren, denn die neoplastischen Zellen stellen nur eine Minderheit im Gewebe dar und sind von zahlreichen reaktiven, lymphoiden Zellen umgeben. Mit dem AID-Antikörper EK2-5G9 war es zum ersten Mal möglich, die AID-Proteinexpression in HL-Fällen zu untersuchen. AID wird in den L und H Zellen des nlpHL in allen untersuchten Fällen und in den HRS Zellen des cHL in nur 8% der Fälle, und dann auch nur sehr schwach, exprimiert. AID konnte somit immunhistochemisch als differentieller Marker für die zwei HL-Entitäten identifiziert werden. Da sich die beiden Tumorentitäten bezüglich der Prognose unterscheiden (Nogova et al., 2006), ist es von immenser Wichtigkeit für die Patienten, dass sie mit möglichst vielen Markern leicht und definitiv unterschieden werden können.

Die physiologische AID-Expression konnte *in vivo* auf Schnitten von hyperplastischen Tonsillen untersucht werden. AID wird in Keimzentrums-B-Zellen vor allem in der dunklen Zone exprimiert, wo die Zentroblasten zu finden sind. Außerdem konnte die AID-Expression auch außerhalb des Keimzentrums beobachtet werden, in extrafollikulären großen aktivierten B-Zell-Blasten, die wahrscheinlich Ig-Diversifizierung außerhalb des Keimzentrumskontextes

durchführen. Für die CSR ist schon beschrieben worden, dass diese auch außerhalb des Keimzentrums in B-Zell-Foci stattfinden kann (Jacob und Kelsoe, 1992).

Die AID-Lokalisation in der Zelle im physiologischen wie auch im pathologischen Kontext bei den hier durchgeführten Färbungen ist überwiegend zytoplasmatisch. Sowohl in den Keimzentrums-B-Zellen, in den extrafollikulären Blasten, in den BL- und FL-Zellen, als auch in den L und H Zellen des nIpHL konnte AID nur im Zytoplasma nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis erscheint widersprüchlich zur angenommenen enzymatischen Aktivität von AID, die den Transport von AID in den Kern voraussetzt. Die Menge des nukleären AIDs hängt von vielen Faktoren ab, die bis jetzt noch nicht bekannt sind. Man weiß weder welche AID-Menge ausreicht um SHM zu induzieren, noch wie lange AID im Kern verweilt, noch wie schnell es wieder aus dem Kern transportiert wird, noch wie oft es zwischen Kern und Zytoplasma in einem Mutationszyklus hin und her pendelt. So kann es sein, dass die AID-Menge zu einem gegebenen Zeitpunkt unter der Detektionsgrenze der angewandten Methode liegt. Diese Annahme wird durch eine Studie von Cattoretti et al. gestützt, die unter Verwendung desselben Antikörpers, aber mit Modifikationen des Färbeprotokolls, nukleäres AID in einer geringen Anzahl von Zentroblasten und extrafollikulären Blasten nachweisen konnte (Cattoretti et al., 2006). Der Nachweis von nukleärem AID mit dem EK2-5G9-Antikörper wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass das nukleäre AID in Komplexen eingebunden vorliegt und so die Antikörperbindungsstelle am C-Terminus eventuell durch AID-Interaktionspartner blockiert wird (F. Ruckerl, Doktorarbeit). Es könnte auch sein, dass nur geringe AID-Mengen nukleär vorliegen und diese ausreichend sind für die SHM. Es wäre hilfreich, einen Antikörper der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist oder einen polyklonalen Antikörper zur Verfügung zu haben, um diese Fragestellung zu klären. Zudem wäre es interessant, die physiologische AID-Lokalisation mit der in Lymphomzellen zu vergleichen, um Hinweise darauf zu bekommen, ob z.B. eine vermehrte Lokalisation von AID im Kern zur Fehlsteuerung von SHM oder CSR führt und somit zur Lymphomentstehung beiträgt.

Für die Pathogenese von B-Zellen wird nicht nur die Fehlsteuerung der Keimzentrumsreaktion in Betracht gezogen, auch Viren stehen im Verdacht hier mitzuwirken. Deshalb ist es sehr interessant den Einfluss von EBV auf ein Protein wie AID zu untersuchen, das die genetische Stabilität der Zelle beeinflusst.

4.2 Der Einfluss von EBV auf die AID-Expression während des Latenz III-Programm

Ob EBV-positive B-Zellen die Keimzentrumsreaktion durchlaufen müssen, um die virale Persistenz zu etablieren, ist zur Zeit Thema intensiver, wissenschaftlicher Diskussion. Die Gruppe von Thorley-Lawson geht davon aus, dass EBV-positive B-Zellen das Keimzentrum durchlaufen, um dann in latent infizierte B-Gedächtniszellen zu differenzieren (Babcock et al., 2000) (siehe Einleitung S.9). Die Beobachtungen, dass EBV-positive B-Zellen sehr selten in Keimzentren von normalen Tonsillen nachzuweisen sind und dass die seltenen EBV-positiven B-Zellen in Keimzentren von IM-Patienten nicht die charakteristische Keimzentrumsreaktion, SHM, durchführen (Kurth et al., 2003; Niedobitek et al., 1992), werfen kritische Fragen zum Modell der Etablierung der viralen Latenz nach Thorley-Lawson auf. Weitere Forschungsergebnisse sprechen eher gegen das Durchlaufen der Keimzentrumsreaktion von EBV-positiven Zellen, denn die Expression von LMP1 interferiert negativ mit der Bildung von Keimzentren in transgenen Mäusen (Uchida et al., 1999) (C. Hoemig, GSF, München, Doktorarbeit) und lymphoblastoide Zelllinien exprimieren LMP1, führen aber keine CSR durch und sind meist IgM-positiv (Ounanian et al., 1992).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Effekt der EBV-Latenz III-Gene auf die AID-Expression analysiert, um den Einfluss von EBV auf die Keimzentrumsreaktion zu untersuchen. Hierfür wurde ein lymphoblastoides Zellsystem verwendet, in dem die AID-Expression während des Latenz III-Programms oder während des Ruhezustands detektiert werden kann. Des Weiteren wurden in Kooperation mit G. Niedobitek (Universität, Erlangen) Studien zur *in vivo* Expression des AID-Proteins und der EBV-Proteine in B-Zellen von IM-Patienten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Latenz III-Gene auf die AID-Expression durch einen dominanten negativen Effekt von EBNA2 beherrscht wird. Die durch LMP1 induzierte AID-Expression (He et al., 2003) wird *in vitro* sowie auch *in vivo* durch den negativen Einfluss von EBNA2 inhibiert. Die SHM-Aktivität ist abhängig vom AID-Level in der Zelle (Zhang et al., 2001). Zellklone, die eine AID-Menge unter einer bestimmten Schwelle haben, zeigen keine SHM. Bedenkt man diesen Dosiseffekt, dann sollte die Modulation der AID-Expression durch EBNA2 einen drastischen Effekt auf die Aktivität der Ig-diversifizierenden Prozesse haben.

In der Tat liefert dieses Ergebnis eine molekulare Erklärung für die Diskrepanz in der SHM-Aktivität verschiedener EBV-assoziiierter B-Zell-Lymphoproliferationen. Vergleicht man die *in vivo* Daten der EBNA2-Expression und der SHM bei diesen Erkrankungen, dann findet man eine Situation der inversen Korrelation vor. So exprimieren die proliferierenden EBV-

positiven B-Zellen während der IM meist EBNA2 und zeigen keine fortlaufende SHM, auch wenn diese Zellen im Keimzentrum lokalisiert sind (Kurth et al., 2003; Kurth et al., 2000). Andererseits ist es für die EBV-positiven EBNA2-negativen B-Zellen in BL charakteristisch, dass sie fortlaufende SHM durchführen (Chapman et al., 1995; Kuppers, 2003). In EBV-positiven Post-Transplantations-Lymphomen (PTL) wurden Fälle identifiziert, die sich bezüglich der EBNA2-Expression unterschieden. In den EBNA2-negativen B-Zellen konnte fortlaufende SHM-Aktivität nachgewiesen werden, wohingegen in den EBNA2-positiven Fällen keine solche Aktivität zu beobachten war (Brauninger et al., 2003; Capello et al., 2003). Klonale Expansion von EBV-infizierten B-Zellen kommt nicht nur während der IM oder in EBV-assoziierten B-Zell Lymphomen vor, sondern auch bei anderen Krankheiten wie z.B. bei der Angioimmunoblastischen Lymphadenopathie mit Dysproteinämie (AILD). Hierbei handelt es sich um ein T-Zell Lymphom, in dessen Verlauf EBV-positive B-Zell-Klone expandieren können. Diese EBV-positiven EBNA2-negativen B-Zellpopulationen zeigen fortlaufende SHM während der klonalen Expansion (Brauninger et al., 2001).

Im BL scheint es zu einer Gegenselektion des *EBNA2*-Gens zu kommen, da in einigen Tumorfällen das Gen des viralen Transkriptionsfaktors sogar deletiert wird (Kelly et al., 2002). In diesen Zellen ist das *c-myc*-Gen in den Ig-Locus transloziert und die Expression dieses Onkogens wird durch EBNA2 ebenso wie die des *IgM*-Gens negativ reguliert (Jochner et al., 1996). Die somit verminderte Expression des *c-myc*-Gens könnte eine Erklärung für das Phänomen der Gegenselektion sein. Die von uns beobachtete negative AID-Regulation durch EBNA2 könnte ein weiterer Grund hierfür sein, da durch die Hemmung der AID-induzierten Prozesse sowohl die Translokation als auch die Hypermutation des Onkogens *c-myc* verhindert werden würde. Experimentell macht es der inhibitorische Einfluss von EBNA2 auf die *c-myc*-Expression unmöglich, in den verfügbaren menschlichen Hypermutationsmodellen (BL-Zelllinien) den Einfluss der EBV-Latenzgene auf die SHM zu untersuchen.

Der Mechanismus der Inhibition von AID durch EBNA2 scheint unabhängig vom Transformations- oder Differenzierungsstatus der Zellen zu sein, da die Inhibition in allen untersuchten B-Zelllinien (LCL, BL und BJAB) zu beobachten war. Die Transformationsereignisse bei diesen Zelllinien sind unterschiedlich, zudem repräsentieren LCLs aktivierte B-Zellen, wohingegen BLs und BJAB Keimzentrums-B-Zellen ähneln.

Für die Etablierung der EBV-Persistenz in nicht-malignen B-Zellen erscheint die Inhibition eines mutagenen Proteins wie AID sinnvoll. Jede Mutation, die zu einem nicht-funktionellen BCR führt, würde mit der viralen Persistenz interferieren. Da es *in vivo* zu einer intrinsischen Oszillation des Gebrauchs der verschiedenen EBV-Promotoren kommt (Thorley-Lawson,

2001), um der Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen zu entkommen, würde der Verlust des BCR zu Anfang noch von LMP2A kompensiert werden (Thorley-Lawson, 2001). Wird die Expression von LMP2A jedoch schließlich im B-Zell-Gedächtnisstadium eingestellt, würde das den Tod der B-Zelle und damit das Ende der EBV-Persistenz bedeuten. Ebenso sollte die allgemeine genetische Stabilität in der Zelle gegeben sein, um ein Persistieren des Virus zu ermöglichen.

Ein weiterer möglicher Punkt, warum es für EBV vorteilhaft wäre, die AID-Expression negativ zu regulieren ist, die Beteiligung von Deaminasen an der angeborenen Immunantwort gegen Viren. Für ein Mitglied der Deaminase-Familie, APOBEC3G konnte gezeigt werden, dass es durch die Deaminierung der retroviralen cDNA zur Zerstörung des Retrovirus beiträgt (Harris et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Mariani et al., 2003; Zhang et al., 2003). Auch für AID konnte eine antivirale Aktivität gegen einen Retrovirus nachgewiesen werden (Gourzi et al., 2006).

Die AID-Funktion und –(De)Regulation sind Inhalt intensiver Forschung. Neue Einblicke in diese Mechanismen kann man über die Identifizierung von AID-Interaktionspartnern erlangen.

4.3 AIDosom- neue Einblicke in die AID-Regulation

4.3.1 Aufreinigung von AID-Komplexen

In den letzten Jahrzehnten wurde es immer deutlicher, dass man Proteine nicht isoliert, sondern in ihrer Organisation in Multi-Protein-Komplexen betrachten muss. Proteine treffen auf ihr Substrat nicht diffusionsabhängig, sondern sie interagieren miteinander und formen große, molekulare Maschinen. Innerhalb des Proteinkomplexes hat jedes individuelle Protein eine spezifische Funktion, die zur Gesamtfunktion des Komplexes beiträgt. Diese spezielle Proteinfunktion ist häufig von der Interaktion mit benachbarten Proteinoberflächen abhängig, die zur Modulation der Proteinaktivität durch z.B. Konformationsänderung oder post-translationale Modifikationen führen kann. Prominente Beispiele für Proteinkomplexe sind die Ribosomen, das Spleißosom oder der Kernporenkomplex. Oft gehören Proteine mehr als einem Proteinkomplex an, die sich auch in unterschiedlichen, subzellulären Kompartimenten befinden können. Weiteres Wissen über diese Zusammenhänge kann helfen, bisher als unabhängig geltende zelluläre Aktivitäten miteinander zu verknüpfen.

Im Feld der funktionellen Proteomik sind durch die Kombination von biochemischen Methoden und Massenspektrometrie sehr große Fortschritte gemacht worden. So ist es zum

Beispiel möglich, durch Affinitätsreinigungen die Komplexität der zu analysierenden Probe zu reduzieren und so eine weitere Untersuchung mit dem Massenspektrometer durchzuführen. Der klassische Ansatz für die Aufreinigung von interagierenden Proteinen wird mit Hilfe eines Antikörpers gegen das spezifische Protein durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie sehr nah an der physiologischen Situation ist, da der endogene Komplex direkt gereinigt wird, ohne dass die ektopische Expression des Proteins nötig ist. Nachteilig ist, dass der Antikörper, sofern er Kreuzreaktivität zeigt, auch viele falsch-positive Proteine aufreinholt. Das größte Problem bei dieser Methodik ist aber, dass ein guter Antikörper gegen das zu reinigende Protein zur Verfügung stehen muss. Für AID war zu Beginn des Projektes kein AID-Antikörper vorhanden, mit dem AID spezifisch hätte aufgereinigt werden können; so kam diese Art der Affinitätsreinigung zunächst nicht in Frage.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von interagierenden Proteinen ist der so genannte „GST-Pulldown“. Hierbei wird das zu analysierende Protein als rekombinantes GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und an einer festen Matrix immobilisiert. Interagierende Proteine werden hier durch das Auftragen eines Zellysats an die Säule gebunden. Für diese Methode ist es essentiell, dass das zu analysierende Protein löslich in *E.coli* überexprimiert werden kann. Für AID war bekannt, dass es bei Überexpression in *E.coli* nicht löslich vorliegt, da im Rahmen der Antikörpergenerierung rekombinantes AID aus *E.coli* nur unter Verwendung von Guanidinhydrochlorid isoliert werden konnte.

Eine 1999 von B. Seraphin und seiner Arbeitsgruppe entwickelte Methode zur Aufreinigung von nativen Proteinkomplexen aus dem Modellorganismus Hefe, die TAP-Reinigung, erschien die geeignete Methode, um AID-Komplexe in hoher Reinheit für die Massenspektrometrie zu gewinnen. Die Gruppe verglich mehrere Markerstrukturen, die an das zu analysierende Protein fusioniert wurden und konnte zeigen, dass die Aufreinigung mit Hilfe der TAP-Markerstruktur sowohl bei der Ausbeute eines in geringen Mengen vorhandenen Proteinkomplexes, als auch bei der Kontaminationsbilanz am Besten abschnitt (Rigaut et al., 1999). Der Vorteil der Methodik liegt darin, dass zwei Affinitätsreinigungen hintereinander geschaltet werden, und vor der Elution die an den Komplex oder die Matrix unspezifisch gebundenen Proteine durch Waschschriffe vermindert werden können. Die Elutionsschritte der Komplexe sind dann jeweils unter nativen Bedingungen möglich. Durch die hohe Spezifität der Reinigung kann stringentes Waschen (z.B. unter Verwendung eines Waschpuffers mit hoher Salz- bzw. Detergenzkonzentration) vermieden werden. So ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass auch weniger stabile Multiproteinkomplexe aufgereinigt

werden. Da es sich aber durch das duale Reinigungsschema um eine relativ lange Prozedur handelt, könnten wiederum sehr schwach assoziierte Interaktionspartner verloren gehen.

Die hohe Effizienz von Homologer Rekombination (HR) in Hefezellen erlaubt es in diesem System, die TAP-Markerkassette C- wie auch N-terminal in den genomischen Locus zu integrieren. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt somit auf physiologischem Level, da sich das TAP-Gen unter der Kontrolle des endogenen Promotors befindet (Puig et al., 2001). Der Vorteil dieses Systems liegt ganz klar in der Kombinationsmöglichkeit von Biochemie und Genetik.

In humanen Zellen wurde die TAP-Methode bisher nur in einer embryonalen Nierenkarzinomzelllinie HEK 293 verwendet (Bouwmeester et al., 2004). Der Nachteil dieses Systems ist, dass durch die Überexpression des zu untersuchenden Proteins die Stöchiometrie des Proteins zu seinen Bindungspartnern drastisch geändert wird und es dadurch sehr schwierig wird, auch wenig abundante Interaktionspartner zu identifizieren. Ebenso wird durch die große Menge an überexprimiertem Protein die Wahrscheinlichkeit erhöht, falsch-positive Interaktionen mit aufzureinigen.

In humanen B-Zelllinien ist die TAP-Reinigung bis dato noch nicht durchgeführt worden. In diesem Zellsystem ist es uns gelungen, durch die Wahl eines adäquaten Promotors und die Verwendung von stabil transfizierten Zellklonen die Expressionshöhe des rekombinanten Proteins an den physiologischen Level anzugleichen. Die Expressionstärke der verwendeten Klone liegt etwas höher als das endogen exprimierte AID. Da uns aber bekannt ist, dass Keimzentrums-B-Zellen *in vivo* im Vergleich zu den verwendeten Raji-Zellen mehr AID exprimieren, sollten die verwendeten Klone im physiologischen Expressionsbereich liegen. Allerdings ist bei diesem Zellsystem noch zu beachten, dass neben dem exogenen TAP-AID Protein noch das endogene AID-Protein in der Zelle vorhanden ist und mit dem TAP-AID um bindende Proteine kompetitiert, was die mögliche Ausbeute an Interaktionspartnern reduzieren könnte.

In unserem Labor ist in der Zwischenzeit ein Zellsystem etabliert worden, in dem wir die TAP-Technik mit „knock-out“- Zelllinien kombinieren können. Hierbei handelt es sich um die Hühnerzelllinie DT40, in der es verhältnismäßig einfach ist durch die hohe HR-Effizienz das zu untersuchende Gen zu deletieren (Buerstedde und Takeda, 1991).

Da es sich bei der TAP-Markerstruktur (25 kDa) im Vergleich zu dem markierten AID-Protein (24 kDa) um eine verhältnismäßig große Struktur handelt, war es denkbar, dass durch die Fusion die Funktionalität des AID-Proteins beeinträchtigt wird. Deshalb wurden Versuche durchgeführt, um die Funktionalität der N- und C-terminalen Fusionsproteine zu überprüfen.

Am Anfang der Studien stand uns ein System zur Verfügung, bei dem neben der TAP-AID-Fusion zusätzlich das endogene AID-Protein in der Zelle vorlag. Später erst konnte der Funktionalitätstest im DT40-System in AID-defizienten Zellen durchgeführt werden. Beide Tests bestätigen die Funktionalität der C-terminalen Fusion, wohingegen die an den N-Terminus fusionierte Variante keine SHM-Aktivität zeigt. Die Ursache für den Verlust der SHM-Aktivität ist mit dem verwendeten Versuch nicht unmittelbar zu klären. Durch die N-terminale Fusion könnte die Faltung des AID-Proteins so gestört worden sein, dass die enzymatische Aktivität des Enzyms verloren gegangen ist oder Interaktionspartner, die für die AID-Aktivität oder die Zielrichtung der Aktivität benötigt werden, nicht mehr binden können. In dieser Arbeit konnten viele identische potentielle Interaktionspartner für das N- und C-terminale Fusionsprotein identifiziert werden. So könnte es sich bei der N-TAP-AID-Fusion um einen enzymatischen Aktivitätsverlust handeln. Doch diese Annahme müsste mit einem Experiment überprüft werden, das die Deaminase-Aktivität ermittelt.

Das ursprüngliche TAP-Protokoll von Bertrand Seraphin ist auf die Verwendung in Hefezellen oder das Zielprotein-überexprimierenden 293-Zellen ausgelegt. So war ein Hauptziel der Doktorarbeit, diese Reinigungsmethode für B-Zellen zu etablieren, die das Zielprotein in physiologischen Mengen exprimieren. Jeder einzelne Schritt der TAP-Reinigung musste an die Verhältnisse in B-Zellen angepasst und optimiert werden. Auch die verwendeten Puffer mussten modifiziert und die Dauer der einzelnen Reinigungsschritte entsprechend angeglichen werden.

Bei der Bindung an die Ig-Matrix konnte meist bis zu ca. 70% Bindungseffizienz erreicht werden, ebenso konnte eine hohe Effizienz bei der TEV-Protease-Spaltung erzielt werden (ca. 80-100%). Die Calmodulinbindung war zumindest für die CBP-AID Fusion sehr schwach (ungefähr 2-10% Bindungseffizienz). Die Vereinigung von zwei TEV-Eluaten in der gleichen Calmodulin-Bindungsreaktion konnte die Ausbeute dieses Reinigungsschrittes erhöhen, so dass genug Probenmaterial für die weitere Analyse im Massenspektrometer zur Verfügung stand. Die nicht sehr effektive Bindung an die Calmodulinsäule scheint ein proteinspezifisches Problem darzustellen, da in unserem Labor mittlerweile die TAP-Reinigung für ein anderes TAP-Protein (TAP-Rad18) durchgeführt wird und bei diesem Fusionsprotein der Calmodulin-Bindungsschritt deutlich effektiver ist (S.Gowri Sreekumar, GSF, München, persönl. Mitteilung).

Die in B-Zellen optimierte TAP-Reinigung steht nun als allgemeine Labormethode für die Aufreinigung weiterer, beliebiger Proteinkomplexe zur Verfügung. Durch die Markierung einzelner, bekannter Komponenten eines biologischen Prozesses (wie z.B. der

Hypermutation) und die anschließende Kombination mit Massenspektrometrie macht es diese Methode möglich, große physische Interaktionsnetzwerke zu identifizieren. Mit anschließenden funktionellen Versuchen kann aus diesem physischen ein funktionelles Netzwerk erstellt werden. Bouwmeester et al. haben zum Beispiel mit Hilfe einer groß angelegten TAP-Analyse und anschließenden funktionellen Methoden in humanen HEK 293-Zellen zur weiteren Aufklärung des TNF α /NF- κ B-Signaltransduktionsweges beigetragen (Bouwmeester et al., 2004).

4.3.2 Prozessierung der gereinigten AID-Komplexe

Nachdem die Komplexität der zu analysierenden Probe mit Hilfe der TAP-Reinigung stark reduziert wurde, musste das Probenmaterial für die weitere massenspektrometrische Analyse vorbereitet werden. Es gibt zwei Möglichkeiten weiter mit den Proben zu verfahren: einmal können die gereinigten Komplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt werden und nach Anfärben der Proteine einzelne Banden ausgeschnitten werden. Die Proteine werden anschließend mit Trypsin im Gel gespalten und die entstandenen Peptide werden direkt auf eine MALDI-Metallplatte aufgetropft und analysiert. Als zweite Möglichkeit kann das Eluat aus der TAP-Reinigung direkt in Lösung mit Trypsin gespalten werden und die entstandenen Peptide nach ihrer Hydrophobizität mittels Nano-LC aufgetrennt und in definierten Fraktionen auf eine MALDI-Metallplatte aufgetropft und anschließend analysiert werden.

Da jede Bande in einem SDS-PAGE nicht nur ein Protein, sondern mehrere Proteine enthalten kann, ist die Gefahr groß, dass bei der anschließenden MALDI-Analyse weniger abundante Proteine nicht identifiziert werden können. Der limitierende Schritt ist die Peptid-Detektion der massenspektrometrischen Methode. Übersteigt die Anzahl der Peptide, die in einem Tropfen enthalten sind, die Anzahl der Sequenzierungszyklen während einer MS/MS-Analyse, dann werden einige Peptide nicht erfasst. Wiederholt man die Analyse einer komplexen Probe, so wird die Überlappung der identifizierten Peptide/Proteine nie 100% erreichen (Gingras et al., 2005). Auch können beim Ausschneiden von Coomassie-gefärbten Proteinbanden Proteine verloren gehen, die unter der Detektionsgrenze des Coomassie-Färbereagens liegen, aber wohl noch im Rahmen der MALDI-Detektionsgrenze wären. Die Möglichkeit der Trypsinspaltung von gereinigten Komplexen in Lösung hat den Vorteil, dass hier kaum Proteine verloren gehen. Außerdem erhält man durch den folgenden Nano-LC-Schritt eine bessere Trennung der einzelnen Peptide, da sie sich über eine größere Anzahl an Tropfen aufteilen als bei der Isolation einzelner Banden. So ist die Peptid-Detektions-

Limitation der MS/MS-Analyse geringer und es können auch weniger abundante Peptide detektiert werden. Ebenso wird durch die Nano-LC-Anwendung das Salz aus der Trypsinspaltung aus der Probe entfernt und kann so nicht mehr bei der Ionisierung der Peptide stören.

Die Sensitivität des ABI Proteomics Analyzers-4700 wurde durch Titrationsexperimente mit bekannten Mengen des kommerziell gereinigten Proteins, BSA, bestimmt. Im Rahmen dieser Experimente wurden auch die beiden Möglichkeiten der Probenaufbereitung miteinander verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die vorherige Auftrennung der Peptide mit Hilfe der Nano-LC zu einer höheren Sensitivität führt (Tab.3). Das kann unter anderem daran liegen, dass durch die Chromatographie das in der Probe enthaltene Salz, das bei der MALDI-Analyse stört, entfernt wird. Die hohe Sensitivität der Nano-LC-MALDI-MS/MS-Methodik hat zur Folge, dass in der gereinigten-BSA Probe nicht nur BSA, sondern weitere Proteine detektiert werden, auch wenn der Hersteller eine Reinheit von 99% verspricht.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte für die weitere Verarbeitung der TAP-Eluate in dieser Arbeit die Trypsin-Spaltung in Lösung und die anschließende Nano-LC-Auftrennung verwendet werden. Da die Trypsin-Spaltung in Lösung aus experimentellen Gründen nicht möglich war, wurde das gereinigte Eluat alternativ mit SDS-PAGE 1 cm aufgetrennt, Coomassie gefärbt, zwei 0,5 cm große Gelstücke ausgeschnitten und die Trypsin-Spaltung im Gel durchgeführt. Da somit keine einzelnen Banden ausgeschnitten wurden, sondern das Eluat in zwei Teile geteilt wurde, wurden nach der Trypsin-Spaltung die Peptidlösungen mit Nano-LC aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Es gibt Peptide, die mit Hilfe der MALDI-Technik nicht gut ionisiert werden und so auch nicht mit dieser Methode identifiziert werden können. Die alternative Ionisierungstechnik erfolgt über eine so genannte Elektrospray Ionifizierung (ESI) und die zugehörigen Massenspektrometer werden als ESI-MS bezeichnet. Da mit diesen zwei Massenspektrometern oft unterschiedliche Proteine identifiziert werden, können die beiden Methoden als komplementär betrachtet werden (Domon und Aebersold, 2006). So könnte dieses Phänomen einer der Gründe sein, warum einige schon bekannte Interaktionspartner von AID wie z.B. RPA (Chaudhuri et al., 2004) nicht mit der hier verwendeten Methodik nachgewiesen werden können.

Während der Arbeiten am hauseigenen MALDI-Massenspektrometer ergaben sich nach einiger Zeit Probleme mit der Sensitivität. Da auch von Seiten der Firma ABI kein schneller Lösungsvorschlag gegeben werden konnte, wurden die Proben im Rahmen dieser Doktorarbeit auch bei ABI in Darmstadt am Proteomics Analyzer-4800 analysiert. Diese neue

Generation von Massenspektrometern weist eine 10fach höhere Sensitivität auf als die alte 4700-Generation. Die identifizierten potentiellen Interaktionspartner werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.3.3 Interessante AID-Interaktionspartner

Die Liste der identifizierten möglichen AID-Interaktionspartner wurde nach bestimmten Signifikanz-Kriterien durchgesehen (siehe Methoden 6.18). Es wurden nur Proteine ausgewählt, die mindestens ein signifikantes Peptid enthielten. Für viele der hier näher besprochenen Proteine wurden auch zwei signifikante Peptide gefunden. Die Proteine, die diesen Kriterien entsprachen, wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Proteine des Ubiquitin-Proteasom-System oder Komponenten der Transkriptions- und/oder DNA-Reparatur-Maschinerie. Bei diesen funktionellen Gruppen ist die Relevanz für die von AID induzierten Prozesse oder für die AID-Regulation sehr deutlich. Bei den Faktoren, die zum Zytoskelett, den Hitzeschockproteinen und den heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen zählen, ist es schwieriger einen direkten Zusammenhang zu erkennen. Die Gruppe der Proteine, deren Zusammenhang mit AID und SHM nicht erkennbar oder deren Funktion noch nicht bekannt ist, wurde unter „Andere“ zusammengefasst. Eindeutige Verunreinigungen wurden unter dem Punkt „Kontamination“ zusammengefasst.

Die Transkription ist für den Prozess der SHM unabdinglich, denn ohne Transkription kann auch keine Einführung von Mutationen beobachtet werden (Fukita et al., 1998). Für das „Targeting“ der SHM-Maschinerie scheint der Transkriptionsvorgang aber nicht ausreichend zu sein, denn die meisten der in B-Zellen stark transkribierten Gene akkumulieren keine Mutationen (Shen et al., 2000). Wahrscheinlich regulieren *cis*-Elemente, die im Ig-Locus liegen und/oder kombinatorische Effekte dieser Elemente die Zielführung der SHM-Maschinerie. Diese *cis*-Elemente im Ig-Locus, an die Transkriptionsfaktoren binden, könnten eine Rolle beim „Targeting“ eines Mutators wie AID spielen. Es wurde gezeigt, dass die Einführung mehrerer E-Box-Sequenzen in ein Transgen eine starke Erhöhung der SHM bewirkt ohne den Transkriptionslevel des Transgens zu verändern (Michael et al., 2003). Für die von E2A-kodierten, E-Box-bindenden Proteine konnte im DT40-System eine Stimulation der Genkonversions- bzw. SHM-Aktivität gezeigt werden (Conlon und Meyer, 2006; Schoetz et al., 2006). Bisher konnte aber noch keine physische Interaktion dieser E-Box-bindenden Proteine mit AID gezeigt werden.

Unter den in dieser Arbeit identifizierten AID-Interaktionspartnern befinden sich drei Transkriptionsfaktoren, die der TFE/MITF Familie angehören: TFE3, TFEB und MITF. Die

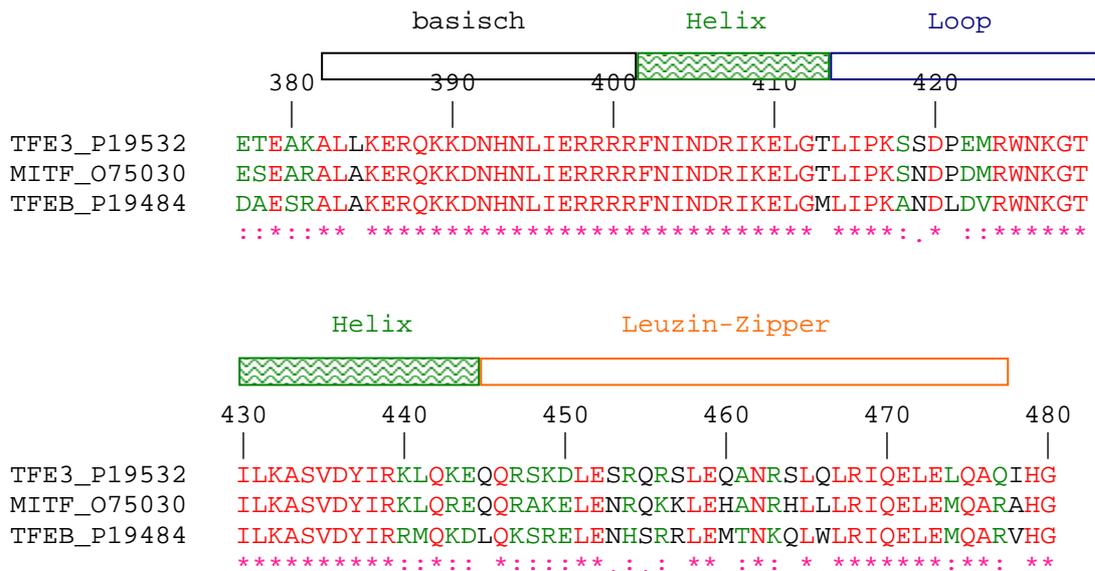


Abbildung 28: Darstellung des Homologiebereichs der bHLH-LZ Transkriptionsfaktorfamilie MITF

Die Mitglieder der MITF-Transkriptionsfaktorfamilie haben eine fast identische basische Region und sehr ähnliche HLH- und LZ-Regionen. Die Sequenzen sind aus der SwissProt-Datenbank mit den angegebenen „Accession“-Nummern entnommen. Für den Sequenzvergleich wurde CLUSTALW Multiple Alignment verwendet. (*): Identische AS in rot; (:): sehr ähnliche AS in grün, (.) : geringfügig ähnliche AS in schwarz.

Mitglieder dieser Familie sind basische Helix-Loop-Helix Leucine-Zipper (bHLH-LZ) Transkriptionsfaktoren (Abb.28), die als Homo- wie auch als Heterodimere an E-Box-Motiv in der DNA binden können (Hemesath et al., 1994). Potentielle Heterodimerpartner sind die Mitglieder derselben Familie (Hemesath et al., 1994). TFE3 ist ubiquitär exprimiert und bindet unter anderem an die microE3 E-Box (μ E3) des IgH-Intron-Enhancers (Beckmann et al., 1990); es ist das primäre zelluläre bHLH-LZ Protein, das den IgH-Enhancer aktiviert (Carter et al., 1997). Mäuse, deren B- und T-Zellen kein TFE3 exprimieren, zeigen eine geringe B-Zellaktivierung, die IgM-Serumlevel sind ebenso wie die IgG- und IgA-Level reduziert (Merrell et al., 1997). Für den Transkriptionsfaktor MITF sind mehrere Isoformen bekannt, die überwiegend gewebsspezifisch exprimiert werden. Die in B-Zellen exprimierte Isoform MITF-L inhibiert die Plasmazellentwicklung von ruhenden B-Zellen (Lin et al., 2004). Ebenso sind für TFEB mehrere Spleißvarianten beschrieben worden, von denen TFEB-F spezifisch in Milzgewebe exprimiert wird (Kuiper et al., 2004). In B-Zellen wurden zu TFEB noch keine Studien durchgeführt. Für TFEB konnte gezeigt werden, dass es ebenso wie TFE3 und MITF *in vitro* an μ E3-Stellen bindet (Aksan und Goding, 1998). TFEB defiziente Mausembryos sterben früh in der Entwicklung, da sie Defekte in der plazentalen Gefäßbildung haben (Steingrimsson et al., 1998).

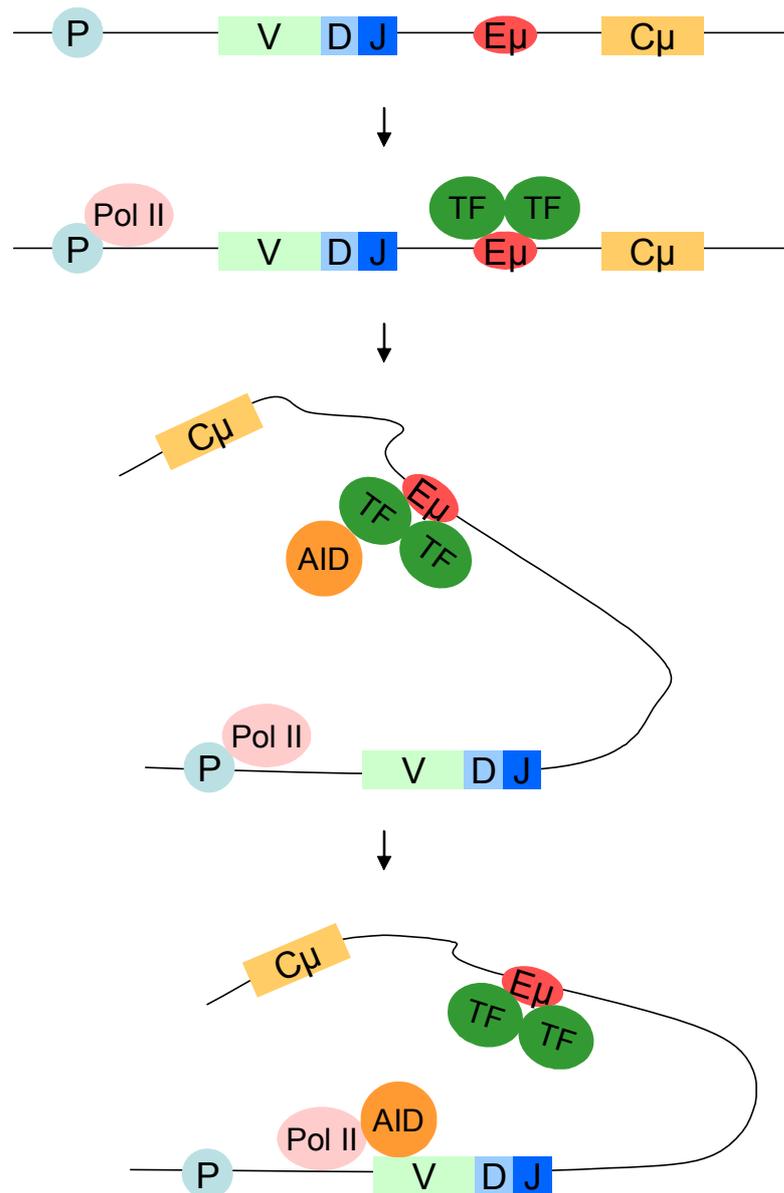


Abbildung 29: Modell der Zielführung von AID an den IgH-Locus

Die Transkriptionsfaktoren der MITF-Familie sind Kandidaten für die Zielführung von AID an den IgH-Locus. Die TFs binden als Homo- bzw. Heterodimere an den E μ -Enhancer. AID bindet an die TFs, die es somit an das transkribierte V-Gen des IgH-Locus führen könnten. (Anmerkung: vereinfachtes Modell, in dem die E μ 3'-Enhancer, die für die SHM wichtig sind, nicht miteinbezogen sind).

Diese Transkriptionsfaktoren stellen exzellente Kandidaten für die gerichtete Hypermutationsaktivität von AID an den Ig-Locus dar (Abb.29). Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit eine physische Interaktion von AID mit einem möglichen Zielfaktor gezeigt werden. Mit Western-Blot-Analyse konnte für den Transkriptionsfaktor TFEB eine Koreinigung mit AID bestätigt werden (Abb.27A). Für den Faktor MITF ist kein funktioneller Antikörper verfügbar und für TFE3 ist keine Koreinigung mit AID sichtbar. Da über die

Stöchiometrie dieses Komplexes keinerlei Daten bekannt sind, könnte es auch sein, dass TFE3 unterhalb der Detektionsgrenze der Western-Blot-Analyse vorliegt.

Das HS1-Protein („Hematopoietic lineage cell-specific protein 1“) wird spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Kitamura et al., 1989). Seine Funktion ist noch nicht bekannt. Da es Motive enthält, die charakteristisch für Transkriptionsfaktoren sind, nimmt man an, dass es die Genexpression wie ein Transkriptionsfaktor reguliert (Kitamura et al., 1989). HS1 wird in B-Zellen nach BCR-Quervernetzung von den Nicht-Rezeptor Phosphotyrosinkinasen (NR-PTK) wie Lyn und Syc phosphoryliert (Yamanashi et al., 1997). Das HS1-Protein enthält eine putative NLS und transloziert, nachdem es phosphoryliert wurde, in den Kern (Yamanashi et al., 1997). B- und T-Zellen von Mäusen, denen ein funktionelles HS1-Gen fehlt, zeigen klare Defekte in der Antigenrezeptor-Antwort (Taniuchi et al., 1995). HS1 wäre somit ein viel versprechender Kandidat für die nukleäre Translokation von AID abhängig von einem BCR-Signal bzw. für die Retention im Zytoplasma ohne ein adäquates BCR-Signal. Durch eine Deletion der NLS-Sequenz im HS1-Gen in DT40-Zellen könnte diese Hypothese überprüft werden.

Für den transkriptionellen Regulator SKIP („Ski Interacting Protein“) sind einige Funktionen bekannt, jedoch wurde keine davon bisher mit der Regulation der Transkription des Ig-Locus in Zusammenhang gebracht (Folk et al., 2004). SKIP kann sowohl als Transkriptionsinitiator als auch als Repressor fungieren, je nach Interaktionspartner.

Eine weitere interessante Gruppe sind Proteine, die mit dem Ubiquitinsystem in Verbindung stehen. Dieses System markiert Proteine mit Ubiquitin und reguliert so die Proteinaktivität bzw. die Degradation durch das Proteasom. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation der DNA-Reparatur (siehe unten). Die Polyubiquitinierung eines Proteins führt zu seinem Abbau über das Proteasom. In dem gereinigten AID-Komplex konnte Ubiquitin selbst identifiziert werden, was darauf hinweist, dass mindestens eines der im Komplex befindlichen Proteine modifiziert ist. Es wurden weitere Proteine gefunden, die zum Ubiquitin-Proteasom-System gehören, so z.B. die Ubiquitin-Protein-Ligase EDD, eine E3 Ubiquitin-Ligase, die Ubiquitin auf Zielproteine direkt überträgt. Für EDD1 ist eine Rolle bei der DNA-Schadensantwort in Zusammenhang mit TopBP1 (Topoisomerase bindendes Protein 1) beschrieben worden (Honda et al., 2002). Die Ubiquitin-Hydrolase ist ein Gegenspieler der Ubiquitin-Ligasen und die Proteasom-Aktivator-Komplex-Untereinheit ist eine Untereinheit des Proteasoms. Die potentielle Regulation von AID durch das Ubiquitin-Proteasom-System wird in unserem Labor untersucht (M. Eder und I. Pfeil, GSF, München).

Es wird angenommen, dass die durch AID eingeführten Mutationen während der DNA Replikation fixiert werden (Rada et al., 2004). So ist es möglich, dass sich unter den Komponenten eines postulierten „AIDosoms“ auch Proteine befinden, die für die DNA-Reparatur und -Replikation wichtig sind. Als wichtiger Faktor ist hier PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“) zu erwähnen, das in unserer Studie als Komponente des AID-Komplexes identifiziert wurde. Dieses Protein erhöht die Prozessivität der DNA-Pol δ , die in Eukaryoten überwiegend für die Replikation zuständig ist. Wird der Replikationsprozess durch DNA-Schäden gestört oder kommt die Replikationsgabel zum Stillstand, dann wird PCNA an einem konservierten Lysin (K164) monoubiquitiniert (Hoege et al., 2002). Dieses monoubiquitinierte PCNA rekrutiert fehlerhaft-replizierende DNA-Polymerasen (z.B. DNA-Pol η , ι oder ζ), die dann DNA-Pol δ ersetzen und bei der DNA-Synthese Mutationen einführen (Stelter und Ulrich, 2003; Ulrich und Jentsch, 2000). Die Beteiligung der durch Rad18 induzierten Monoubiquitinierung von PCNA am Prozess der SHM ist erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe und anderen gezeigt worden (Arakawa et al., 2006; Bachl et al., 2006). Für PCNA konnte in dieser Doktorarbeit eine Koreinigung mit AID über Western-Blot-Analyse gezeigt werden und auch in einer unabhängigen Immunpräzipitation konnte die Interaktion von AID und PCNA bestätigt werden (I. Pfeil, GSF, persönliche Kommunikation). Für den hier identifizierten möglichen AID-Interaktionspartner CAF1 („Chromatin Assembly Factor“) und PCNA ist bereits eine Kolokalisation an DNA-Schadensstellen gezeigt worden (Gerard et al., 2006).

Ein Bestandteil des Zytoskeletts, die Mikrotubuli, wurde bereits als Interaktionspartner von AID veröffentlicht und von den Autoren als Retentionsfaktor postuliert (Wu et al., 2005). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten TAP-Reinigung konnte Tubulin als Interaktionspartner von AID bestätigt werden.

Mit der Identifizierung von AID-Interaktionspartnern im Rahmen dieser Arbeit konnte das physische Netzwerk bezüglich der AID-Regulation erweitert werden. Es konnten entscheidende Einblicke in potentielle Mechanismen der Zielführung von AID oder des Kerntransportes von AID gewonnen werden. Als wesentlicher nächster Schritt muß aus dem physischen ein funktionelles Netzwerk der AID-Regulation erstellt werden.

4.4 Ausblick

AID wird in vielen B-Zell Lymphomen exprimiert. Es wird angenommen, dass es durch eine konstitutive AID-Aktivität zu aberranter SHM in Protoonkogenen (Pasqualucci et al., 2001) und/oder zur Translokation derselben in den Ig-Locus kommen kann (Magrath, 1990). In Fällen von Non-Hodgkin Lymphomen konnten unterschiedliche AID-mRNA-Expressionslevel und damit oft korrelierende aktive SHM beobachtet werden (Smit et al., 2003). Auch konnte bei einigen FL-Fällen ein selektives Auswachsen von AID-exprimierenden Klonen detektiert werden, die wahrscheinlich eine aktive SHM-Maschinerie exprimieren (Smit et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch fortlaufende SHM bedingte genomische Instabilität nicht nur für die Initiation von Tumorzellen essentiell sein könnte, sondern auch eine Rolle beim Prozess der Tumoraufrechterhaltung und/oder -progression spielt. Deshalb untersuchen wir in Kooperation mit M.-L. Hansmann (Universität, Frankfurt) mit dem von uns generierten Antikörpern Fälle von FL auf ihre AID-Expression *in vivo* und versuchen diese mit der Prognose der Patienten zu korrelieren. Je nach Ergebnis dieser Studie soll die Untersuchung auf weitere Tumorentitäten ausgeweitet werden. Korreliert ein hoher AID-Level mit einer schlechteren Prognose, könnte das Einfluss auf die Therapie der Lymphom-Patienten haben.

Weitere Untersuchungen zur physiologischen AID-Regulation sind wichtig für das Verständnis des SHM-Prozesses. So kann man in einer BL-Zelllinie (BL2), die durch CD40L und BCR-Stimulation zur SHM induziert werden kann, das TAP-AID-Fusionsprotein exprimieren, anschließend die Komplexe aus den induzierten mit denen aus den nicht induzierten Zellen vergleichen und bei eventuell unterschiedlichen Interaktionspartnern einen Hinweis auf die AID-Regulation erhalten. Die Untersuchung von nukleären und zytoplasmatischen AID-Komplexen in diesem Zellsystem könnte Aufschluss darüber geben, ob die AID-Mengen oder die AID-Komplexzusammensetzung im Kern von Signalen des BCR oder CD40 abhängig sind.

Mit den in dieser Arbeit identifizierten AID-Interaktionspartnern stehen unserer Arbeitsgruppe gute Ausgangspunkte zur Verfügung, um weitere Einblicke in das funktionelle AID-Netzwerk zu erlangen. Es wird z.B. untersucht, ob die Transkriptionsfaktoren der MITF-Familie mechanistisch für die SHM eine Rolle spielen. Im Hinblick auf die Beteiligung von AID bei der DNA-Reparatur wird untersucht, ob AID mit der PCNA-Ubiquitinierung interferiert. Des Weiteren werden Versuche durchgeführt, die klären sollen, ob AID über proteasomalen Abbau reguliert wird.

Mit der DT40-Zelllinie steht uns ein Zellsystem zur Verfügung mit dem es möglich ist, die wichtigen funktionellen Analysen bezüglich der AID-Regulation durchzuführen. Man kann durch HR bekannte AID-Interaktionspartner deletieren und den Effekt dieses Genverlusts auf die SHM bzw. Genkonversion untersuchen. In DT40-Zellen ist es auch möglich genetische Manipulation mit biochemischen Methoden zu verbinden. Man kann in DT40-AID^{-/-}-Klonen TAP-AID-Mutanten bzw. TAP-Wildtyp-AID exprimieren und vergleichende Studien der Zusammensetzung der AID-Komplexe durchführen.

5 Material

5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

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

5.2 Verwendete Kits

DC Protein Assay (BioRad, München); ECL Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science, Mannheim); 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim); GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit (Genomed, Löhne); QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden); QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden); RNeasy Kit (Qiagen, Hilden).

5.3 Bakterien

Es wurde für Klonierungen der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α benutzt. Genotyp: F⁻, ϕ dlacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169, λ ⁻

5.4 Enzyme

Restriktionsenzyme sowie dazugehörigen Reaktionspuffer (10x) wurden von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), NEB (Schwalbach) und Roche Applied Science (Mannheim) bezogen.

T4-DNA-Ligase sowie dazugehöriger Puffer kamen von Roche Applied Science (Mannheim). *Taq*-Polymerase und Puffer wurde von Roche Applied Science (Mannheim) und Qiagen (Hilden) bezogen. TurboPfu-Polymerase wurde von Stratagen (Amsterdam, Niederlande) erstanden. TEV Protease wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Trypsin Gold kam von Promega (Mannheim).

5.5 Proteingrößenstandard

Um das molekulare Gewicht von Proteinen zu bestimmen, die in einem SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurde neben den Proben ein Marker geladen. Der Proteinstandard enthält 10 Proteine, die eine Größe zwischen ca. 10 und 190kD haben. Um die Standardproteine sichtbar zu machen, ist ein blauer Farbstoff kovalent an diese gebunden. Für eine leichtere Orientierung und Identifikation der Proteine wurde an das ca. 60kD große Protein ein roter Farbstoff gekoppelt. Der verwendete Standard ist der Proteinstandard Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder von Invitrogen (Karlsruhe).

5.6 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper, die für den Proteinnachweis verwendet wurden

Erstantikörper	Verdünnung	aus	gegen	Bezugsquelle
AID 5G9	1:5	Ratte	AID	E.Kremmer
AID 5C7	1:5	Ratte	AID	E.Kremmer
AID 2H5	1:5	Ratte	AID	E.Kremmer
Aktin	1:1000	Maus	Aktin	Santa Cruz
3F10	1:100	Ratte	HA	E. Kremmer, GSF
RBF 4E4	1:10	Ratte	RPA	E. Kremmer, GSF
GAPDH	1:2000	Kaninchen	GAPDH	Abcam/Biozol
Tubulin	1:20000	Maus	Tubulin	Promega
9E10	1:1000	Maus	c-Myc	Santa Cruz
TFEB	1:1000	Kaninchen	TFEB	Biochrom
PCNA	1:10000	Maus	PCNA	Promega
Ubiquitin	1:1000	Maus	Ubiquitin	Promega
IgM-FITC	1:40		Chicken IgM	Natutec

Zweitantikörper	Verdünnung	aus	gegen	Bezugsquelle
anti-goat-HRP	1:10000	Kaninchen	Ziege	Sigma
anti-mouse-HRP	1:2000	Schaf	Maus	Amersham
anti-rat-HRP	1:10000	Ziege	Ratte	Jackson Immuno Research
anti-rabbit-HRP	1:10000	Esel	Kaninchen	Promega

5.7 Oligonukleotide

Tabelle 6: DNA-Oligonukleotide für (quantitative) RT-PCR-Reaktionen

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
hAIDRT1	GAGGCAAGAAGACACTCTGG
hAIDRT2	GTGACATTCTGGAAGTTGC
hAIDRT3	CCAACCTCAGTCTGAGGATCTTC
hAIDRT12	AACCAGGTGACGCGGTAG
hAIDRT13	GACGTTCTGACTATGCCG
hCD21RT1	AGATCCTAAGAGGCCGAATGG
hCD21RT2	CACATAGCCAGGGTTACAGC
CD19fw	CTCCTTCTCCAACGCTGAGT
CD19rv	TGGAAGTGTCACTGGCATGT
hmycRT1	CAGCAGCCTCCCGCGACGATG
hmycRT4	GGACATTTCTGTTAGAAGGAATCG
hmuHCRT1	CTGACCTTCCAGCAGAATGCG
hmuHCRT2	AAGTAGACATCGGGCCTGTGC
C-TAP1	GTATCGGCAGAGTCGTGGTTG
N-TAP3	TAGCCGTCTCAGCAGCC

Tabelle 7: Primer zur Amplifikation der AID- bzw. TAP-Fragmente

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Enzym
N-TAP1	<u>CGTTCGAATTC</u> GCCACCATGGCAGGCCTTG	BstBI, EcoRI
N-TAP2	CGGGATCCAAGTGCCCCGGAGGATGAG	BamHI
N-TAP4	<u>GGAATTCT</u> CAAAGTGCCCCGGAGGATG	EcoRI
AID16	<u>GACTAGTGAATTC</u> GCCACCATGGACAGCCTCTTG	SpeI, EcoRI
AID17	CGGGATCCAAGTCCCAAAGTACGAAATG	BamHI
AID18	CGGGATCCATACAGGGGCAAAGGATGCG	BamHI

Unterstrichen: Restriktionssequenz.

Durch die verwendeten Primer wurden an den Enden der PCR-Produkte Restriktionsstellen eingeführt, die für die Klonierung in den Expressionsvektor genutzt wurden.

5.8 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Bemerkungen
Burkitt Lymphom-Zelllinien EBV-negativ		
BL41	H. Tesch, Köln	
BL41-K3	B. Kempkes, München	mit Östrogen regulierbarem EBNA2
BL100	B. Jungnickel, München	
Ramos	M. Neuberger, Cambridge	
Burkitt Lymphom-Zelllinie EBV-positiv		
Elijah	B. Jungnickel, München	
Mutu I	J. Bachl, München	
Raji ATCC	J. Bachl, München	
Burkitt Lymphom-ähnliche Zelllinien		
BJAB	B. Kempkes, München	EBV negativ
BJAB-K3	B. Kempkes, München	mit Östrogen regulierbarem EBNA2
Lymphoblastoide Zelllinie		
721	B. Kempkes, München	
Konditional immortalisierte Zelllinie		
EREB2-5 (MS oder BK)	M. Schlee + B. Kempkes, München	mit Östrogen regulierbarem EBNA2 und EBNA2 defizientem EBV Stamm (P3HR1)
Maus prä-B-Zelllinie		
18-81	J. Bachl, München	mit humanem HA-AID transfiziert
Hühner B-Zelllinie		
DT40	H. Arakawa, Neuherberg	
Nicht-B-Zelllinie		
HEK 293	Dr. Engert, Köln	embryonale Nierenzelllinie

5.9 Datenverarbeitung

Folgende Programme wurden benutzt:

Sci Ed Central (Clone Manager 6)	Sequenzverarbeitung
Microsoft Word 2003	Textverarbeitung
Adobe Photoshop 6.0	Bildverarbeitung
Excel 2003	zum Erstellen der Tabellen
Power Point 2003	Grafiken
CellQuest	FACS Datenaquisition und -auswertung
GPS Data Explorer 2.0	MS/MS-Auswertung
MASCOT	Such-Maschine
SwissProt	Proteindatenbank
AIDA 2.0 Image Analyzer	Densitometrie

5.10 Peptide für AID-Antikörpergenerierung

Alle Peptide wurden von der Firma PSL (Heidelberg) synthetisiert und an KLH oder OVA gekoppelt. Die Aminosäuresequenz wurde dem humanen AID-Protein Swiss Prot Accession Nummer Q9GZX7 entnommen.

EK1: N-terminales Peptid von Aminosäure 8 bis 30 mit der Sequenz RRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC

EK2: C-terminales Peptid von Aminosäure 184 bis 198 mit der Sequenz CEVDDLRFDAFRTLGL

EK3: Peptid aus dem Mittelbereich von Aminosäure 116 bis 132 mit der Sequenz CEDRKAEP EGLRRLHRA

6 Methoden

6.1 Standardmethoden

Alle Standardmethoden molekularbiologischer Laboratorien, die hier nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei (Sambrook und Russel, 2001) beschrieben durchgeführt. Bei kommerziellen Produkten wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen.

6.2 Klonierung

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle PCR-Reaktionen mit *Pfu*-Polymerase nach Angaben des Herstellers in einem TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als Standardprogramm wurde über 30 Zyklen amplifiziert, wobei jeder Zyklus 45 s bei 94 °C, 30 s bei 45, 56, 58 bzw. 68°C und 2 min bei 72 °C umfasste. Alle PCR Produkte wurden nach Subklonierung in einen pGEM-T Vektor (Promega, Mannheim) sequenziert. Diese Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

6.2.1 TAP-AID Expressionsvektoren

pST8 N-TAP-AID

Um den Vektor pST8 N-TAP-AID zu generieren, wurde der N-terminale TAP-tag aus dem Vektor pZome1-N (Cellzome, Heidelberg) mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden N-TAP1 und N-TAP2 benutzt. Der 5'-Primer führt eine *BstBI* und *EcoRI* Schnittstelle und der 3'-Primer eine *BamHI* Schnittstelle ein. Das PCR-Produkt wurde mittels *BstBI* und *BamHI* Restriktion in den pST1-AIDpGEX2T-Vektor (S.Tobollik, Diplomarbeit) kloniert und sequenziert (Zwischenvektor pST5). Hierbei wurde der N-TAP-tag in frame an den kodierenden Bereich von AID gebracht. Die N-TAP-AID-Kassette wurde dann als *EcoRI*-Fragment ausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pCAGGS-IRES-PURO (J. Bachl, München) ligiert, wodurch das N-TAP-AID-Fusionsgen unter die Kontrolle des β -Aktin-Promotors des Huhns gebracht wurde. Die richtige Orientierung der Kassette wurde mittels *BglII* Restriktion überprüft.

pST10 C-TAP-AID

Zur Herstellung des Plasmids pST10 C-TAP-AID wurde der kodierende Bereich für humanes AID (hnAID) mittels PCR aus dem Vektor pST1-AIDpGEX2T (S. Tobollik, Diplomarbeit) amplifiziert. Als Primer wurden AID16 und AID17 benutzt. Der 5'-Primer führt eine *SpeI* und *EcoRI* Schnittstelle und der 3'-Primer eine *BamHI* Schnittstelle ein. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Aus diesem wurde es mittels *SpeI* und *BamHI* Restriktion in den pZome1C-Vektor (Cellzome, Heidelberg) kloniert, wodurch das AID Gen in frame an den C-TAP-tag gebracht wurde (Zwischenvektor pST7). Die C-TAP-AID-Kassette wurde dann als *EcoRI*-Fragment ausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pCAGGS-IRES-PURO (J. Bachl, München) ligiert, wodurch das C-TAP-AID-Fusionsgen unter die Kontrolle des β -Aktin-Promotors des Huhns gebracht wurde. Die richtige Orientierung der Kassette wurde mittels *BsaAI* Restriktion überprüft.

pSK1 TAP

Um den Expressionsvektor für den TAP-tag alleine herzustellen, wurde aus dem Zwischenvektor pST5 (siehe pST8 N-TAP-AID) die N-TAP-Kassette mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden N-TAP1 und N-TAP4 verwendet. Nach Klonierung in den pGEM-T Vektor wurde das PCR-Produkt sequenziert und über die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pCAGGS-IRES-PURO (J. Bachl, München) ligiert. Die richtige Orientierung der Kassette wurde mittels *NcoI* Restriktion überprüft.

pSK3 C-TAP-AIDbix

Zur Herstellung dieses Vektors wurde der kodierende Bereich der AIDbix Mutante (R24W) aus dem Vektor pCAGGS HAhnAIDbix (F. Ruckerl, München) mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer waren AID16 und AID17. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T-Vektor kloniert und sequenziert. Über *SpeI* und *BamHI* Restriktionsstellen wurde das Produkt in den Zwischenvektor pST7 (siehe pST10 C-TAP-AID) ligiert, wobei die AIDbix Mutante in frame an den C-TAP-tag gebracht wurde. Die C-TAP-AIDbix-Kassette wurde dann als *EcoRI*-Fragment ausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pCAGGS-IRES-PURO (J. Bachl, München) ligiert. Die richtige Orientierung der Kassette wurde mittels *NcoI* Restriktion überprüft.

pSK5 C-TAP-AID Δ NES

Zur Generierung des Vektors pSK5 C-TAP-AID Δ NES wurde aus dem Zwischenvektor pST7 (siehe pST10 C-TAP-AID) mittels PCR AID amplifiziert. Als Primer wurden AID16 und AID18 verwendet, wobei der 3'-Primer AID18 nicht das gesamte AID abdeckt, sondern 42bp kürzer ist, somit erhält man ein verkürztes AID Produkt, AID Δ NES. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T-Vektor kloniert und sequenziert. Über *SpeI* und *BamHI* Restriktionsstellen wurde das Produkt in den Zwischenvektor pST7 (siehe pST10 C-TAP-AID) ligiert, wobei die AID Δ NES Mutante in frame an den C-TAP-tag gebracht wurde. Die C-TAP-AID Δ NES-Kassette wurde dann als *EcoRI*-Fragment ausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pST10 C-TAP-AID ligiert. Durch die *EcoRI* Restriktion wurde bei Vektor pST10 C-TAP-AID die C-TAP-AID-Kassette entfernt. Die richtige Orientierung der Kassette wurde mittels *BsaAI* Restriktion überprüft.

6.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden, um sterile Bedingungen zu gewährleisten, in einer Umluft-Sterilbank (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten vorgenommen. Die Zellen wurden in einem Inkubator (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C bzw. 41°C für Hühner DT40 Zellen kultiviert.

Kulturmedium

500 ml	RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe)	
50 ml	FKS (Biochrom KG, Berlin und PAA, Pasching, Österreich)	10 %
5 ml	Penicillin (Invitrogen, Karlsruhe)	100U/ml
5 ml	Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)	100 μ g/ml
5 ml	Glutamin (200 mM) (Gibco BRL, Schottland)	2 mM
5 ml	Natriumpyruvat (100 mM) (Gibco BRL, Schottland)	1 mM

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt.

Die Maus prä-B Zelllinie 18-81 wurde zusätzlich mit 50 mM β -Mercaptoethanol kultiviert. Stabile Transfektionsklone mit pI-GFP $_{stop}$ wurden zusätzlich in Gegenwart von 400 μ g/ml G418 kultiviert, um den Verlust des Reporter-Transgens zu verhindern. Stabile

Transfektionsklone von 18-81 mit pST-Vektoren wurden in Gegenwart von 1.25 µg/ml Puromycin kultiviert.

Die prä-B-Zelllinie Nalm-6, alle Burkitt-Lymphom Zelllinien, die Lymphoblastoiden Zelllinien und die Nicht-B-Zelllinie 293 wurden in in oben genanntem Medium kultiviert. Bei der konditional immortalisierten Zelllinie EREB2-5 wurde zusätzlich 2 µM Östrogen zum Kulturmedium gegeben. Bei den Zelllinien BL41-K3 und BJAB-K3 wurde für die Aktivierung von EBNA2 1 µM Östrogen ins Kulturmedium gegeben. Stabile Transfektionsklone der Zelllinie Raji mit pST- oder pSK-Vektoren wurden in Gegenwart von 0,8 µg/ml Puromycin kultiviert.

Bei der Hühner Zelllinie DT40 wurden zusätzlich ins Kulturmedium 10 % Hühnerserum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 100 µM β-Mercaptoethanol zugegeben. Stabile Transfektionsklone der Zelllinie DT40 mit pST- oder pSK-Vektoren wurden in Gegenwart von 0,5 µg/ml Puromycin kultiviert.

6.3.1 Inaktivierung und Reaktivierung von EBNA2 in der Zelllinie EREB2-5

Es wurden $9,6 \times 10^7$ Zellen aus einem Kulturmedium mit 2 µM Östrogen durch Zentrifugation mit 1200 rpm für 5 Minuten in einer Varifuge (Heareus Christ Instruments) sedimentiert und in 40 ml Kulturmedium gewaschen. Nach Zentrifugation wie beschrieben wurde das Zellpellet in 40 ml Kulturmedium resuspendiert und für 20 Minuten bei 37°C im Zellinkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut sedimentiert und in 160 ml Kulturmedium resuspendiert und für drei Tage inkubiert. Zu 20 ml der Zellkultur wurden 2 µM Östrogen zugegeben und die Zellen wurden in den Inkubator gestellt. Vor der Östrogenzugabe und 1, 2, 4, 8, 24 und 50 Stunden nach Östrogenzugabe wurden je drei Zellfraktionen zu je 3×10^6 Zellen sedimentiert. Eine Kontrollkultur wurde mit 2 µM Östrogen im Zellkulturmedium kultiviert.

6.4 Transfektion

Für die Etablierung stabiler Transfektionsklone wurden 1×10^7 Zellen der Zelllinie Raji mit 250 V und 850 µF elektroporiert. 1×10^7 293 Zellen wurden transient mit Polyfect (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für die stabile Transfektion von DT40 Zellklonen wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen mit 800V und 50µF elektroporiert.

6.5 Generierung von Einzelzellklonen

Die Zellen wurden wie unter 6.4 beschrieben mit pST- bzw. pSK-Vektoren transfiziert. Je 100 µl der transfizierten Zellen wurden auf die Löcher einer 96 Lochplatte verteilt und inkubiert. Nach drei Tagen wurden 0,8 µg/ml (für die Raji-Klone) bzw. 0,5 µg/ml (für die DT40-Klone) Puromycin zum Kulturmedium gegeben und die Zellen positiv selektioniert. Die Einzelzellklone wurden in 48 Lochplatten umgesetzt und weiter expandiert.

6.6 Western-Blot-Analyse

Für Western-Blot-Analysen wurden ca. 3×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und in 2x Lämmli Puffer (Laemmli, 1970) lysiert. Der Proteingehalt dieser Zellysate wurde mit Hilfe des DC Protein Assay von Bio-Rad (München) nach Angaben des Herstellers bestimmt. 60 µg Protein pro Spur wurden mittels Elektrophorese in 12 % SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Proben der TAP-Reinigung wurden direkt bzw. mittels TCA-Fällung eingeeengt in 2x Laemmli Puffer aufgenommen, wie angegeben aufgetragen und mittels Elektrophorese wie oben beschrieben aufgetrennt. Nach Blocken der Membran mit 5 % Magermilch in PBS wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Membran wurde danach mit PBS gewaschen und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Chemi-Lumineszenzreaktion mit Hilfe des ECL Kits bzw. des ECL AdvanceTM Western Blotting Detection Kits gestartet und auf ECL-Chemilumineszenzfilmen visualisiert (alle drei GE Healthcare, Freiburg).

6.7 ReverseTranskription-PCR

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) kann RNA in einzelsträngige cDNA transkribiert werden. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) aus ca. 3×10^6 Zellen nach Herstellerangaben isoliert wurde. Mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim) wurden aus der Gesamt-RNA spezifisch die mRNA-Moleküle umgeschrieben, indem die im Kit enthaltenen Oligo-p(dT)₁₅ Primer verwendet wurden. Der Reaktionsansatz wurde für die Anlagerung der Primer für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription bei 42°C für 1 Stunde. Durch Erhitzen auf 99°C für 5 Minuten wurde die RT denaturiert. Die

erhaltenen cDNA-Moleküle wurden bei -20°C gelagert und in der quantitativen RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

6.8 Quantitative RT-PCR

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

SYBR Green 1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an die kleine Furche der dsDNA bindet und dessen Fluoreszenz durch diese Bindung um das 100fache gesteigert wird. So können die bei der Amplifikation entstehenden Produkte mittels ihrer Fluoreszenz detektiert werden. Die Primer für diese Methode sollten Exon-übergreifend sein, um zu vermeiden, dass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA Amplifikationsprodukte bilden.

Die benutzten Primer-Oligonukleotide wurden bei Metabion (München) bestellt und sind in **Tab.6** aufgelistet.

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

Denaturierung der DNA

und Aktivierung der Polymerase	95°C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95°C	für 1 sec
Zyklische Anlagerung	$50-65^{\circ}\text{C}$	für 10 sec
Zyklische Verlängerung	72°C	für 1min pro 1,5 kb
Aufschmelzen	70°C bis 97°C	in 10 sec
Abkühlen	40°C	für 15 sec

Es wurde eine 1:10 Verdünnung einer cDNA-Matrize nach den oben beschriebenen Bedingungen amplifiziert. Die entstandenen PCR-Produkte wurden seriell verdünnt, um eine Eichgerade zu erstellen. Folgende Verdünnungsserie wurde erstellt: 10^{-3} ; 10^{-5} ; 10^{-7} ; 10^{-9} und Wasser als Negativkontrolle. Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes mit steigender Zykluszahl zu. Diese Fluoreszenzzunahme wird von dem LightCycler gemessen und eine Kurve erstellt. Das LightCycler-Programm ermittelt aus dieser Amplifikationskurve den crossing point (Cp). Dieser gibt die Anzahl der Zyklen an, die

nötig sind um eine definierte Menge an PCR-Produkt zu erzeugen. So ist der C_p des 10^{-3} Verdünnungsansatzes kleiner als der des 10^{-5} Ansatzes.

Trägt man nun den Logarithmus der Konzentrationen gegen die Anzahl der Zyklen auf, die nötig waren, um den C_p zu erreichen, erhält man die Eichgerade. Die Effizienz (E) der Reaktion errechnete sich mit Hilfe der Steigung (m) der Eichgeraden mit folgender Formel: $E = 10^{-1/m}$

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

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

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

$$T_{0\text{gesucht}} \times (E_{\text{gesucht}})^{C_{p\text{gesucht}}} = T_{0\text{Haushaltsgen}} \times (E_{\text{Haushaltsgen}})^{C_{p\text{Haushaltsgen}}}$$

Wird T_0 der Haushaltsgenreaktion gleich 100 % gesetzt, so ergibt sich für die Errechnung der relativen Kopienzahl des gesuchten PCR-Ansatzes :

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

Da die Ausgangsmatrize der PCR-Reaktion eine cDNA war, die aus mRNA revers transkribiert wurde, konnte das Ergebnis als die relative Kopienzahl der mRNA, die in den Zellen zum gegebenen Zeitpunkt vorhanden war, normalisiert auf ein Haushaltsgen, angegeben werden.

6.9 FACS (Fluorescence activated cell scanner)

Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen erst in PBS gewaschen und dann in PBS/0,5 % BSA resuspendiert. Für die Analyse der GFP-Revertanten wurde $1\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid zugesetzt, um tote Zellen anzufärben. Für die Analyse der IgM negativen Zellen wurden die DT40 Zellen nach dem Waschen in PBS mit einem anti-IgM-FITC Antikörper gefärbt und anschließend gewaschen und ebenso in PBS/0,5 % BSA resuspendiert und Propidiumiodid zugegeben. Die Messungen wurden auf einem FACSscan Gerät (BD

Biosciences, Heidelberg) vorgenommen. Die Analyse der aufgezeichneten Daten wurde mit Hilfe der Cell Quest-Software von BD Sciences (Heidelberg) durchgeführt.

6.10 Generierung monoklonaler anti-AID-Antikörper

Die Antikörperherstellung wurde durchgeführt wie in Greiner et al. (Greiner et al., 2005) beschrieben.

6.11 Gelfiltration

Pro Gelfiltrationsexperiment wurden 1×10^8 Zellen in ca. 500 μ l Lysepuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 μ M ZnCl₂; 0,5 % IGEPAL; 1,5 mM MgCl₂; 10 % Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol; Protease Inhibitoren [Roche Applied Science, Mannheim]) aufgenommen und mit einem Dounce Homogenisator lysiert. Die so gewonnen Gesamtextrakte wurden zentrifugiert und der Überstand (ca. 400 μ l) auf eine Superose6 HR 10/30-Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg) geladen. Mit Hilfe einer ÄKTAbasic FPLC-Anlage wurden die Extrakte bei einer Flussrate von 300 μ l/min in 300 μ l Fraktionen aufgetrennt. Der Beginn der Proteinelution konnte über die gemessene A₂₈₀ bestimmt werden. Um das Molekulargewicht der Proteine/der Proteinkomplexe in den gesammelten Fraktionen einschätzen zu können, wurde ein Gelfiltrationsstandard (Biorad, München) bei 150 mM Salz ebenfalls über die Säule gegeben. Der Standard enthielt folgende Substanzen: Thyroglobulin (670 kDa), Rinder-Gamma-Globulin (158 kDa), Hühner-Ovalbumin (44 kDa), Pferde-Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B₁₂ (1.35 kDa). Von den gesammelten Fraktionen wurden je 100 μ l von drei direkt aufeinander folgenden Fraktionen (1+2+3; 4+5+6; etc.) vereinigt, mit Trichloressigsäure (final 15 %) gefällt, in 2x Lämmli resuspendiert und mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse (siehe 6.5) auf ihren Gehalt an TAP-AID, AID, RPA oder RNA-Pol II hin untersucht.

6.12 Tandem Affinitätsreinigung

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis, mit gekühlten Puffern und alle Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt. 3×10^8 bzw. 6×10^8 Zellen der stabilen Raji TAP-AID-Klone wurden zentrifugiert und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lysepuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 μ M ZnCl₂; 0,5 % IGEPAL; 1,5 mM

MgCl₂; 10 % Glycerin, 1 mM β-Mercaptoethanol [ME]; Protease Inhibitoren [Roche Applied Science, Mannheim]) resuspendiert und mit einem Dounce Homogenisator lysiert. Um die Lysate frei von Aggregaten und Membrananteilen zu bekommen, wurden sie für 1h bei 13.000 rpm (Eppendorf Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren und für die anschließende IgG-Bindung auf Eis aufgetaut und mit 400 µl IgG-Sepharose Beads (GE Healthcare, Freiburg) über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Beads wurden mit 3 fachem Volumen IPP150 Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % IGEPAL; 10 µM ZnCl₂) und 1 fachem Volumen TEV Spaltungspuffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % IGEPAL; 10 µM ZnCl₂; 0,5 mM EDTA; 1 mM β-ME) gewaschen. Für die TEV Protease Spaltung wurden die Beads in ein LUERLOCK Reaktionsgefäß (MoBiTec, Göttingen) überführt und mit 400 µl TEV Spaltungspuffer mit 100U TEV Protease für 3h bei 19°C an einem Drehrad inkubiert. Die Elution wurde bei 1000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge durchgeführt und mit 400 µl TEV Spaltungspuffer wiederholt. Die IgG-Bindung wurde in jeweils zwei parallelen Ansätzen durchgeführt und je zwei TEV Eluate für die Calmodulin Bindung vereinigt. Die vereinigten Eluate wurden in Polyrep-Säulen (Biorad, München) überführt, die 6 ml Calmodulin Bindungspuffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 µM ZnCl₂; 1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 0,1 % IGEPAL; 10 mM β-ME) und 400 µl Calmodulin Affinitätsbeads (Stratagene, Amsterdam) enthielten. Dieser Bindungsschritt wurde für 3h bei 4°C bei leichter Rollbewegung durchgeführt. Anschließend wurden die Beads mit 30 ml Calmodulin Bindungspuffer gewaschen und die Elution erfolgte zweimal mit 500 µl Calmodulin Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM EGTA; 0,1 % IGEPAL; 10 mM β-ME). Die Eluate wurden bei -20°C eingefroren und zur späteren Analyse mit Western-Blot oder Massenspektrometer auf Eis aufgetaut und dann mittels Trichloressigsäure gefällt (siehe 6.13).

6.13 Immunpräzipitation

50 µl Dynabeads[®] Protein G (Dynal Biotech., Oslo, Norwegen) wurden dreimal in 500 µl TEV Spaltungspuffer (siehe 6.11) gewaschen. Zu den gewaschenen Beads wurden 500 µl EK2-5G9 AID-Antikörper-Überstand in 10 % Glycerol zugegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend bei 4°C für 4h an einem Drehrad inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und zu den Beads wurden die vereinigten TEV-Eluate (in 6.11 beschrieben) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls an einem Drehrad bei 4°C über Nacht. Der

Überstand wurde abgenommen und die Beads mit 100x Bead-Volumen TEV Spaltungspuffer gewaschen (zehnmal in 500 µl TEV Spaltungspuffer). Die Beads und der Überstand wurden je 1:2 mit 2x Lämmli Puffer (Laemmli, 1970) gemischt und anschließend mit Western-Blot (siehe 6.5) analysiert.

6.14 Trichloressigsäure-Fällung

Um Proteine aus einer wässrigen Lösung zu fällen, wurden sie 1:1 mit 20 % Trichloressigsäure (TCA) gemischt, zentrifugiert und die Pellets zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Das trockene Pellet wurde in 2x Laemmli Puffer bei 70°C für 20 min gelöst.

6.15 Silberfärbung

Die Silberfärbung der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurde nach Blum durchgeführt (Blum et al., 1987).

6.16 Trypsinverdau im Gel

Nach der TAP-Reinigung wurde das Probengemisch auf ein vorgegossenes NuPage-Gel (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen, 1 cm weit aufgetrennt und die Proteine mittels Colloidalem Coomassie Blau (Perbio Science, Bonn) nach Herstellerangaben gefärbt. Anschließend wurden je zwei 0,5 cm große Gelstücke unter der Umluft-Sterilbank ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in 1 mm große Würfel klein gehackt und in ABC-Puffer (50 mM Ammoniumcarbonat, 30 % Acetonitril [ACN] in Wasser) 2x 5 min bei 37°C gewaschen. Dann wurden die Gelstücke für einen Alkylierungsschritt mit 50 µl DTT-Lösung (3,5 mg Dithiotreitol in 500 µl Wasser) bei 55°C für 15 min inkubiert und bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Dann wurden 50 µl Jodacetamid-Lösung (18.6 mg in 1 ml Wasser) bei RT für 15 min im Dunkeln darauf gegeben. Anschließend wurden die Gelstücke 3x mit ABC-Puffer gewaschen. Nach vollständiger Entfärbung aller Gelstücke wurden 2x 100 µl 100 % ACN bei RT auf die Gelstücke gegeben bis sie weiß und zusammengeschrumpft waren (ca. nach 2x 15 min). Danach wurden sie offen bei RT für 15 min inkubiert, um sämtliche ACN-Reste zu entfernen. 2-3 µl Trypsin-Lösung (0,03µg Trypsin/µl Spaltpuffer) wurden direkt auf die Gelstücke gesetzt und nach etwa 5 min wurden 10 µl Spaltpuffer (10 mM Ammoniumcarbonat in Wasser) dazugegeben. Die Spaltung erfolgt bei 37°C über Nacht.

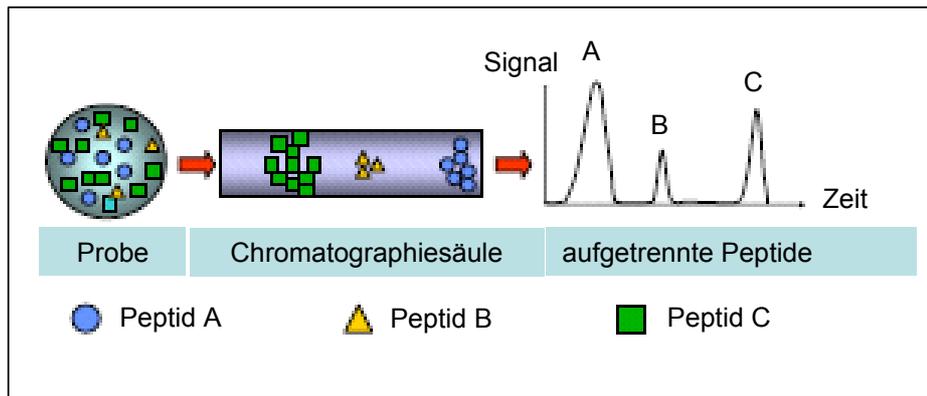


Abbildung 30: Prinzip der Flüssigchromatographie

Der eventuell vorhandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Die Gelstücke wurden mit 10 µl Elutionspuffer (80 % ACN, 1 % Trifluoressigsäure [TFA] in Wasser) bedeckt und für 5 min in ein Ultraschallbad gegeben. Die Elution wurde 2x wiederholt und die vereinigten Eluate in einer Speed Vac zur Trockene eingengt. Die Peptide wurden bei -20°C gelagert und für die Auftrennung mittels Nano-LC in 18 µl 0,1 % TFA gelöst. Für die weitere Analyse wurden 9 µl der Peptidlösung verwendet.

6.17 Nano-Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Peptide nach dem tryptischen Verdau wurden über eine Umkehrphase- oder Reverse-Phase Chromatographie aufgetrennt (Abb.30). Die stationäre Phase der Säule besteht aus porösen Silicapartikeln, die mit 18-Alkylketten beschichtet sind. Die Peptide absorbieren an die hydrophobe Oberfläche der Säule und werden mit einem steigenden Acetonitril (ACN)-Gradienten eluiert. Die Trennung wurde mit der Ultimate-HPLC von der Firma LC-Packings durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit des HPLC-Puffers (A: 5 % ACN/0,1 % TFA [Trifluoressigsäure] in Wasser, B: 80 % ACN / 0,08 % TFA in Wasser) betrug 200 nl/min. Bei jeder Trennung wurde der gleiche lineare Gradient von 50 bis 100 % B verwendet, der die Peptide über 82 min auftrennt. Anschließend folgt ein 6 min langer Waschschritt mit 100 % B. Durch die Verwendung einer Vorsäule, die das gleiche Trägermaterial enthält, können Salze, die bei der weiteren massenspektrometrischen Analyse stören, entfernt werden. Die Absorption der Peptide wurde nach der Trennung in einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 214 nm gemessen. Von der UV-Zelle aus wurden die getrennten Peptide zu einem Pipettier-Roboter (Probot, LC-Packings) geleitet. Dieser mischt die Peptidlösung mit einer Matrixlösung (5 mg/ml Zimtsäure [CHCA], 0,1 % TFA, 70 % ACN) 1:4 und trägt 275

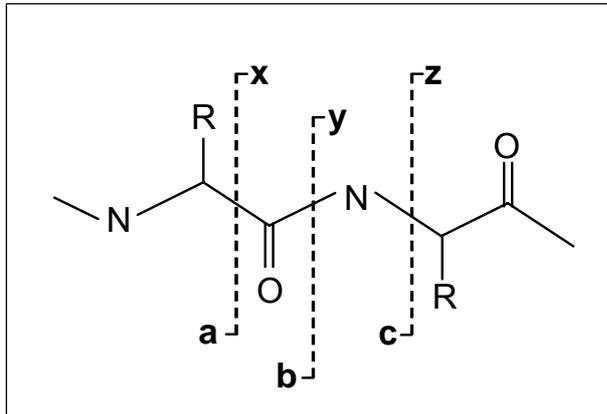


Abbildung 31: Schema der Fragmentierung von Peptiden (nach Lottspeich und Zorbas, Bioanalytik, 1998)

(Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlmann)

Die häufigste Fragmentierung erfolgt durch die Spaltung der Amidbindung. Hierbei entstehen Ionen, die als y- bzw. als b-Ionen bezeichnet werden. Außerdem können noch a-, c-, x- und z-Ionen auftreten.

Fractionen à 26 sec auf eine Stahlplatte auf. Die so vorbereiteten Proben sind für die Analyse im Massenspektrometer bereit.

6.18 MALDI-TOF/TOF-MS

Mit den benutzten MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation- Time of Flight/Time of Flight) Instrumenten, Proteomics Analyzer-4700 und -4800 (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden ausschließlich Peptide mit einer Masse von 800 bis 5500 Da massenspektrometrisch analysiert. Die Massen der einzelnen Moleküle werden über die benötigte Flugzeit für eine definierte Strecke im Hochvakuum bestimmt (Time of Flight). Dabei ist die Fluggeschwindigkeit der Ionen direkt proportional zu $1/\sqrt{m}$ (m = Ionenmasse). Schwerere Ionen benötigen eine längere Flugzeit als leichtere und aus der unterschiedlichen Flugzeit kann sehr genau die Masse der geladenen Moleküle berechnet werden.

Für die Identifizierung von Peptiden aus einem Peptidgemisch wurde die MS-Sequenzierungstechnik (auch Tandem-Massenspektrometrie, MS/MS oder MS^2 genannt) angewandt. Hierbei wird ein bestimmtes Peptid-Ion (Vorläufer, precursor) im Massenspektrometer isoliert und mit Luft zur Kollision gebracht. Dies führt zum Zerfall des Peptids in einzelne charakteristische Fragmente. In **Abbildung 31** wird erklärt, an welchen Stellen Peptide fragmentieren und wie die einzelnen Fragmente bezeichnet werden (Lottspeich and Zorbas, 1998). Die am häufigsten auftretenden und informativsten Bruchstücke werden durch die Spaltung der Amidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren erzeugt. Die entstanden Ionen werden als b-Ionen bezeichnet, wenn sie den N-Terminus des ursprünglichen Peptids enthalten und als y-Ionen, wenn das Fragment den C-Terminus einschließt (**Abb.31**). Daneben treten je nach Art der Fragmentierung noch a-, c-, x- und z-Ionen auf (**Abb.31**).

Die verwendeten Parameter für die Analyse der Proben waren wie folgt: der N₂/YAG Laser wurde auf eine Frequenz von 200Hz und eine Wellenlänge von 355 nm eingestellt. Für ein MS-Spektrum wurden 2500 Laserschüsse ausgeführt und aufaddiert. Bei den folgenden MS/MS-Spektren wurde die Laserschusszahl auf 4500 erhöht und die Laserenergie um 200 Einheiten gegenüber der MS-Messung gesteigert. Die Software erstellt die Massenlisten und wählt automatisch die Vorläufer für die MS/MS-Messung. Die Masseneichung erfolgte extern mit Hilfe von Standardpeptiden (Bruker Daltonik, Bremen).

Die gewonnenen MS/MS-Spektren wurden in den GPS-Explorer 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) geladen und dort mit Hilfe des integrierten MASCOT-Such-Programms mit einer Suche gegen die Proteindatenbank SwissProt ausgewertet. Bei MASCOT handelt es sich um eine Wahrscheinlichkeits-basierte Molekulargewichtssuche, deren Wahrscheinlichkeitsmodell nicht detailliert veröffentlicht ist. Die MASCOT Suchparameter wurden wie folgt eingestellt: Als Taxon wurde Homo sapiens gewählt und das verwendete Enzym war Trypsin. Die Carbamid-Methylierung wurde als fixe und die Methionin Oxidierung als variable Modifikation angegeben.

Die GPS Explorer Software gibt zwei Scores aus: den MASCOT „Best Ion Score“, das ist der höchste Score den ein Peptid erreicht hat, und den „Total Ion Score“, der sich aus der Summe der einzelnen „Ion Scores“ aller Peptide eines Proteins zusammensetzt. Der Signifikanzlevel für den Peptidscore ist normalerweise >20. Da verschiedene Datenbanken auf Grund der unterschiedlichen Datenbankengrößen verschiedene MASCOT Signifikanzlevel aufweisen, z.B. für Swiss Prot liegt der Signifikanzlevel für ein Peptid über 25, können die Signifikanzlevel verschiedener Datenbanken nicht miteinander verglichen werden. Deshalb kalkuliert die Software ein Konfidenzintervall aus den MASCOT „Ion Scores“, wobei der MASCOT Signifikanzlevel hier für jede Suche auf 95 % Konfidenzlevel festgelegt ist. Manuell wurden die Proteine aussortiert, deren MASCOT „Total Ion Scores“ zwar in das Konfidenzlevel 95 % fallen, da sehr viele einzelne nicht signifikante Peptide zusammen einen signifikanten „Total Ion Score“ ergeben, deren „Best Ion Score“ aber unter 25 liegt. Es wurden nur Proteine als signifikant gewertet, die mindestens 1 Peptid mit einem „Best Ion Score“ größer gleich 25 aufweisen.

7 Literaturverzeichnis

- Aebersold, R., and M. Mann. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422:198-207.
- Aksan, I., and C.R. Goding. 1998. Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol*. 18:6930-8.
- Albert, T., B. Urlbauer, F. Kohlhuber, B. Hammersen, and D. Eick. 1994. Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene*. 9:759-63.
- Arakawa, H., J. Hauschild, and J.M. Buerstedde. 2002. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science*. 295:1301-6.
- Arakawa, H., G.L. Moldovan, H. Saribasak, N.N. Saribasak, S. Jentsch, and J.M. Buerstedde. 2006. A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol*. 4:e366.
- Arakawa, H., H. Saribasak, and J.M. Buerstedde. 2004. Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol*. 2:E179.
- Babcock, G.J., D. Hochberg, and A.D. Thorley-Lawson. 2000. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity*. 13:497-506.
- Bachl, J., C. Carlson, V. Gray-Schopfer, M. Dessing, and C. Olsson. 2001. Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol*. 166:5051-7.
- Bachl, J., I. Ertongur, and B. Jungnickel. 2006. Involvement of Rad18 in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:12081-6.
- Bachl, J., and C. Olsson. 1999. Hypermutation targets a green fluorescent protein-encoding transgene in the presence of immunoglobulin enhancers. *Eur J Immunol*. 29:1383-9.
- Bachl, J., C. Steinberg, and M. Wabl. 1997. Critical test of hot spot motifs for immunoglobulin hypermutation. *Eur J Immunol*. 27:3398-403.
- Barreto, V., B. Reina-San-Martin, A.R. Ramiro, K.M. McBride, and M.C. Nussenzweig. 2003. C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol Cell*. 12:501-8.
- Basu, U., J. Chaudhuri, C. Alpert, S. Dutt, S. Ranganath, G. Li, J.P. Schrum, J.P. Manis, and F.W. Alt. 2005. The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature*. 438:508-11.
- Bechtel, D., J. Kurth, C. Unkel, and R. Kuppers. 2005. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*. 106:4345-50.
- Beckmann, H., L.K. Su, and T. Kadesch. 1990. TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev*. 4:167-79.
- Bemark, M., and M.S. Neuberger. 2000. The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line. *Oncogene*. 19:3404-10.
- Betz, A.G., C. Milstein, A. Gonzalez-Fernandez, R. Pannell, T. Larson, and M.S. Neuberger. 1994. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell*. 77:239-48.

- Betz, A.G., C. Rada, R. Pannell, C. Milstein, and M.S. Neuberger. 1993. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2385-8.
- Bishop, G.A., and L.K. Busch. 2002. Molecular mechanisms of B-lymphocyte transformation by Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* 4:853-7.
- Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8:93-99.
- Bouwmeester, T., A. Bauch, H. Ruffner, P.O. Angrand, G. Bergamini, K. Croughton, C. Cruciat, D. Eberhard, J. Gagneur, S. Ghidelli, C. Hopf, B. Huhse, R. Mangano, A.M. Michon, M. Schirle, J. Schlegl, M. Schwab, M.A. Stein, A. Bauer, G. Casari, G. Drewes, A.C. Gavin, D.B. Jackson, G. Joberty, G. Neubauer, J. Rick, B. Kuster, and G. Superti-Furga. 2004. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 6:97-105.
- Boxer, L.M., and C.V. Dang. 2001. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene.* 20:5595-610.
- Braeuninger, A., R. Kuppers, J.G. Strickler, H.H. Wacker, K. Rajewsky, and M.L. Hansmann. 1997. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9337-42.
- Bransteitter, R., P. Pham, M.D. Scharff, and M.F. Goodman. 2003. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4102-7.
- Brar, S.S., M. Watson, and M. Diaz. 2004. Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J Biol Chem.* 279:26395-401.
- Brauninger, A., T. Spieker, A. Mottok, A.S. Baur, R. Kuppers, and M.L. Hansmann. 2003. Epstein-Barr virus (EBV)-positive lymphoproliferations in post-transplant patients show immunoglobulin V gene mutation patterns suggesting interference of EBV with normal B cell differentiation processes. *Eur J Immunol.* 33:1593-602.
- Brauninger, A., T. Spieker, K. Willenbrock, P. Gaulard, H.H. Wacker, K. Rajewsky, M.L. Hansmann, and R. Kuppers. 2001. Survival and clonal expansion of mutating "forbidden" (immunoglobulin receptor-deficient) Epstein-Barr virus-infected B cells in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *J Exp Med.* 194:927-40.
- Brenner, S., and C. Milstein. 1966. Origin of antibody variation. *Nature.* 211:242-3.
- Bross, L., Y. Fukita, F. McBlane, C. Demolliere, K. Rajewsky, and H. Jacobs. 2000. DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity.* 13:589-97.
- Buerstedde, J.M., and S. Takeda. 1991. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell.* 67:179-88.
- Capello, D., M. Cerri, G. Muti, E. Berra, P. Oreste, C. Deambrogi, D. Rossi, G. Dotti, A. Conconi, M. Vigano, U. Magrini, G. Ippoliti, E. Morra, A. Gloghini, A. Rambaldi, M. Paulli, A. Carbone, and G. Gaidano. 2003. Molecular histogenesis of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood.* 102:3775-85.
- Cario, G., U.Z. Stadt, A. Reiter, K. Welte, and K.W. Sykora. 2000. Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases. *Br J Haematol.* 110:537-46.
- Carter, R.S., P. Ordentlich, and T. Kadesch. 1997. Selective utilization of basic helix-loop-helix-leucine zipper proteins at the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol.* 17:18-23.

- Cattoretti, G., M. Buttner, R. Shakhovich, E. Kremmer, B. Alobeid, and G. Niedobitek. 2006. Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood*. 107:3967-75.
- Chaganti, S., A.I. Bell, N.B. Pastor, A.E. Milner, M. Drayson, J. Gordon, and A.B. Rickinson. 2005. Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood*. 106:4249-52.
- Chan, M.A., L.D. Stein, H.M. Dosch, and N.H. Sigal. 1986. Heterogeneity of EBV-transformable human B lymphocyte populations. *J Immunol*. 136:106-12.
- Chapman, C.J., C.I. Mockridge, M. Rowe, A.B. Rickinson, and F.K. Stevenson. 1995. Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity. *Blood*. 85:2176-81.
- Chaudhuri, J., C. Khuong, and F.W. Alt. 2004. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature*. 430:992-8.
- Chaudhuri, J., M. Tian, C. Khuong, K. Chua, E. Pinaud, and F.W. Alt. 2003. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature*. 422:726-30.
- Cleary, M.L., T.C. Meeker, S. Levy, E. Lee, M. Trela, J. Sklar, and R. Levy. 1986. Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell*. 44:97-106.
- Conlon, T.M., and K.B. Meyer. 2006. The chicken Ig light chain 3'-enhancer is essential for gene expression and regulates gene conversion via the transcription factor E2A. *Eur J Immunol*. 36:139-48.
- Cottrell, J.S. 1994. Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res*. 7:115-24.
- de Yebenes, V.G., and A.R. Ramiro. 2006. Activation-induced deaminase: light and dark sides. *Trends Mol Med*. 12:432-9.
- Dedeoglu, F., B. Horwitz, J. Chaudhuri, F.W. Alt, and R.S. Geha. 2004. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol*. 16:395-404.
- Di Noia, J., and M.S. Neuberger. 2002. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 419:43-8.
- Diaz, M., N.B. Watson, G. Turkington, L.K. Verkoczy, N.R. Klinman, and W.G. McGregor. 2003. Decreased frequency and highly aberrant spectrum of ultraviolet-induced mutations in the hprt gene of mouse fibroblasts expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *Mol Cancer Res*. 1:836-47.
- Dickerson, S.K., E. Market, E. Besmer, and F.N. Papavasiliou. 2003. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med*. 197:1291-6.
- Doi, T., K. Kinoshita, M. Ikegawa, M. Muramatsu, and T. Honjo. 2003. De novo protein synthesis is required for the activation-induced cytidine deaminase function in class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2634-8.
- Domon, B., and R. Aebersold. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 312:212-7.
- Faili, A., S. Aoufouchi, E. Flatter, Q. Gueranger, C.A. Reynaud, and J.C. Weill. 2002. Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature*. 419:944-7.
- Fenn, J.B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246:64-71.
- Folk, P., F. Puta, and M. Skrzny. 2004. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci*. 61:629-40.
- Fukita, Y., H. Jacobs, and K. Rajewsky. 1998. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity*. 9:105-14.

- Gerard, A., S. Koundrioukoff, V. Ramillon, J.C. Sergere, N. Mailand, J.P. Quivy, and G. Almouzni. 2006. The replication kinase Cdc7-Dbf4 promotes the interaction of the p150 subunit of chromatin assembly factor 1 with proliferating cell nuclear antigen. *EMBO Rep.* 7:817-23.
- Gingras, A.C., R. Aebersold, and B. Raught. 2005. Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *J Physiol.* 563:11-21.
- Golding, G.B., P.J. Gearhart, and B.W. Glickman. 1987. Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics.* 115:169-76.
- Gonda, H., M. Sugai, Y. Nambu, T. Katakai, Y. Agata, K.J. Mori, Y. Yokota, and A. Shimizu. 2003. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med.* 198:1427-37.
- Goossens, T., U. Klein, and R. Kuppers. 1998. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2463-8.
- Gourzi, P., T. Leonova, and F.N. Papavasiliou. 2006. A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity.* 24:779-86.
- Gray, D. 1991. Understanding germinal centres. *Res Immunol.* 142:237-42.
- Greeve, J., A. Philipsen, K. Krause, W. Klapper, K. Heidorn, B.E. Castle, J. Janda, K.B. Marcu, and R. Parwaresch. 2003. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 101:3574-80.
- Greiner, A., S. Tobollik, M. Buettner, B. Jungnickel, K. Herrmann, E. Kremmer, and G. Niedobitek. 2005. Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol.* 205:541-7.
- Guo, S., Y. Zhang, F. Yuan, Y. Gao, L. Gu, I. Wong, and G.M. Li. 2006. Regulation of replication protein A functions in DNA mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem.* 281:21607-16.
- Harris, R.S., K.N. Bishop, A.M. Sheehy, H.M. Craig, S.K. Petersen-Mahrt, I.N. Watt, M.S. Neuberger, and M.H. Malim. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell.* 113:803-9.
- He, B., N. Raab-Traub, P. Casali, and A. Cerutti. 2003. EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol.* 171:5215-24.
- Hemesath, T.J., E. Steingrimsson, G. McGill, M.J. Hansen, J. Vaught, C.A. Hodgkinson, H. Arnheiter, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and D.E. Fisher. 1994. microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.* 8:2770-80.
- Hillenkamp, F., M. Karas, R.C. Beavis, and B.T. Chait. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem.* 63:1193A-1203A.
- Hoegge, C., B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* 419:135-41.
- Hollowood, K., and J.R. Goodlad. 1998. Germinal centre cell kinetics. *J Pathol.* 185:229-33.
- Honda, Y., M. Tojo, K. Matsuzaki, T. Anan, M. Matsumoto, M. Ando, H. Saya, and M. Nakao. 2002. Cooperation of HECT-domain ubiquitin ligase hHYD and DNA topoisomerase II-binding protein for DNA damage response. *J Biol Chem.* 277:3599-605.
- Honjo, T. 2002. Does AID need another aid? *Nat Immunol.* 3:800-1.

- Imai, K., G. Slupphaug, W.I. Lee, P. Revy, S. Nonoyama, N. Catalan, L. Yel, M. Forveille, B. Kavli, H.E. Krokan, H.D. Ochs, A. Fischer, and A. Durandy. 2003. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol.* 4:1023-8.
- Ito, S., H. Nagaoka, R. Shinkura, N. Begum, M. Muramatsu, M. Nakata, and T. Honjo. 2004. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:1975-80.
- Iwasato, T., A. Shimizu, T. Honjo, and H. Yamagishi. 1990. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell.* 62:143-9.
- Jacob, J., R. Kassir, and G. Kelsoe. 1991. 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.* 173:1165-75.
- Jacob, J., and G. Kelsoe. 1992. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med.* 176:679-87.
- Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2004. Immunobiology. Garland Science, New York and London.
- Jochner, N., D. Eick, U. Zimmer-Strobl, M. Pawlita, G.W. Bornkamm, and B. Kempkes. 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J.* 15:375-82.
- Jungnickel, B. 2006. False moves for survival: error-prone DNA repair in adaptive immunity. *Cell Cycle.* 5:2856-61.
- Kanda, K., H.M. Hu, L. Zhang, J. Grandchamps, and L.M. Boxer. 2000. NF-kappa B activity is required for the deregulation of c-myc expression by the immunoglobulin heavy chain enhancer. *J Biol Chem.* 275:32338-46.
- Kanzler, H., M.L. Hansmann, U. Kapp, J. Wolf, V. Diehl, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1996. Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood.* 87:3429-36.
- Kelly, G., A. Bell, and A. Rickinson. 2002. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med.* 8:1098-104.
- Kelsoe, G. 1995. The germinal center reaction. *Immunol Today.* 16:324-6.
- Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen-Durr, J.W. Ellwart, E. Kremmer, H.J. Delecluse, C. Rottenberger, G.W. Bornkamm, and W. Hammerschmidt. 1995. B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J.* 14:88-96.
- Khan, G., E.M. Miyashita, B. Yang, G.J. Babcock, and D.A. Thorley-Lawson. 1996. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity.* 5:173-9.
- Kitamura, D., H. Kaneko, Y. Miyagoe, T. Ariyasu, and T. Watanabe. 1989. Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Res.* 17:9367-79.
- Klein, U., G. Klein, B. Ehlin-Henriksson, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1995. Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol Med.* 1:495-505.
- Komori, A., Z. Xu, X. Wu, H. Zan, and P. Casali. 2006. Biased dA/dT somatic hypermutation as regulated by the heavy chain intronic iEmu enhancer and 3'Ealpha enhancers in human lymphoblastoid B cells. *Mol Immunol.* 43:1817-26.

- Kong, Q., and N. Maizels. 2001. DNA breaks in hypermutating immunoglobulin genes: evidence for a break-and-repair pathway of somatic hypermutation. *Genetics*. 158:369-78.
- Kosco, M.H., A.K. Szakal, and J.G. Tew. 1988. In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J Immunol*. 140:354-60.
- Krokan, H.E., M. Otterlei, H. Nilsen, B. Kavli, F. Skorpen, S. Andersen, C. Skjelbred, M. Akbari, P.A. Aas, and G. Slupphaug. 2001. Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 68:365-86.
- Kuiper, R.P., M. Schepens, J. Thijssen, E.F. Schoenmakers, and A.G. van Kessel. 2004. Regulation of the MiTF/TFE bHLH-LZ transcription factors through restricted spatial expression and alternative splicing of functional domains. *Nucleic Acids Res*. 32:2315-22.
- Kuppers, R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. 3:801-12.
- Kuppers, R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 5:251-62.
- Kuppers, R., and R. Dalla-Favera. 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 20:5580-94.
- Kuppers, R., U. Klein, M.L. Hansmann, and K. Rajewsky. 1999. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 341:1520-9.
- Kuppers, R., K. Rajewsky, and M.L. Hansmann. 1997. Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur J Immunol*. 27:1398-405.
- Kuppers, R., I. Schwering, A. Brauning, K. Rajewsky, and M.L. Hansmann. 2002. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 13 Suppl 1:11-8.
- Kuppers, R., M. Zhao, M.L. Hansmann, and K. Rajewsky. 1993. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J*. 12:4955-67.
- Kurth, J., M.L. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 2003. Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:4730-5.
- Kurth, J., T. Spieker, J. Wustrow, G.J. Strickler, L.M. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 2000. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity*. 13:485-95.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Lebecque, S.G., and P.J. Gearhart. 1990. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med*. 172:1717-27.
- Lin, L., A.J. Gerth, and S.L. Peng. 2004. Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *J Exp Med*. 200:115-22.
- Liso, A., D. Capello, T. Marafioti, E. Tiacci, M. Cerri, V. Distler, M. Paulli, A. Carbone, G. Delsol, E. Campo, S. Pileri, L. Pasqualucci, G. Gaidano, and B. Falini. 2006. Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 108:1013-20.
- Liu, Y.J., F. Malisan, O. de Bouteiller, C. Guret, S. Lebecque, J. Banchereau, F.C. Mills, E.E. Max, and H. Martinez-Valdez. 1996. Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity*. 4:241-50.

- Lottspeich, F., and H. Zorbas. 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- MacLennan, I.C. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 12:117-39.
- Magrath, I. 1990. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res.* 55:133-270.
- Mancao, C., M. Altmann, B. Jungnickel, and W. Hammerschmidt. 2005. Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood.* 106:4339-44.
- Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature.* 424:99-103.
- Manis, J.P., D. Dudley, L. Kaylor, and F.W. Alt. 2002. IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity.* 16:607-17.
- Mariani, R., D. Chen, B. Schrefelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, and N.R. Landau. 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell.* 114:21-31.
- Martin, A., P.D. Bardwell, C.J. Woo, M. Fan, M.J. Shulman, and M.D. Scharff. 2002. Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature.* 415:802-6.
- Masuda, K., R. Ouchida, A. Takeuchi, T. Saito, H. Koseki, K. Kawamura, M. Tagawa, T. Tokuhisa, T. Azuma, and O.W. J. 2005. DNA polymerase theta contributes to the generation of C/G mutations during somatic hypermutation of Ig genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13986-91.
- McBride, K.M., V. Barreto, A.R. Ramiro, P. Stavropoulos, and M.C. Nussenzweig. 2004. Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med.* 199:1235-44.
- McBride, K.M., A. Gazumyan, E.M. Woo, V.M. Barreto, D.F. Robbiani, B.T. Chait, and M.C. Nussenzweig. 2006. Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8798-803.
- McKean, D., K. Huppi, M. Bell, L. Staudt, W. Gerhard, and M. Weigert. 1984. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:3180-4.
- Merrell, K., S. Wells, A. Henderson, J. Gorman, F. Alt, A. Stall, and K. Calame. 1997. The absence of the transcription activator TFE3 impairs activation of B cells in vivo. *Mol Cell Biol.* 17:3335-44.
- Michael, N., H.M. Shen, S. Longerich, N. Kim, A. Longacre, and U. Storb. 2003. The E box motif CAGGTG enhances somatic hypermutation without enhancing transcription. *Immunity.* 19:235-42.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 102:553-63.
- Muramatsu, M., V.S. Sankaranand, S. Anant, M. Sugai, K. Kinoshita, N.O. Davidson, and T. Honjo. 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.* 274:18470-6.
- Muschen, M., D. Re, B. Jungnickel, V. Diehl, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 2000. Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med.* 192:1833-40.
- Nambu, Y., M. Sugai, H. Gonda, C.G. Lee, T. Katakai, Y. Agata, Y. Yokota, and A. Shimizu. 2003. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science.* 302:2137-40.

- Niedobitek, G., H. Herbst, L.S. Young, L. Brooks, M.G. Masucci, J. Crocker, A.B. Rickinson, and H. Stein. 1992. Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood*. 79:2520-6.
- Nogova, L., T. Rudiger, and A. Engert. 2006. Biology, clinical course and management of nodular lymphocyte-predominant hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:266-72.
- Odegard, V.H., and D.G. Schatz. 2006. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol*. 6:573-83.
- Okazaki, I.M., K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Yoshikawa, and T. Honjo. 2002. The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature*. 416:340-5.
- Ounanian, A., B. Guilbert, and J.M. Seigneurin. 1992. Characteristics of Epstein-Barr virus transformed B cell lines from patients with Alzheimer's disease and age-matched controls. *Mech Ageing Dev*. 63:105-16.
- Papavasiliou, F.N., and D.G. Schatz. 2000. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature*. 408:216-21.
- Pappin, D.J. 1997. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 64:165-73.
- Pascual, V., Y.J. Liu, A. Magalski, O. de Bouteiller, J. Banchereau, and J.D. Capra. 1994. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*. 180:329-39.
- Pasqualucci, L., R. Guglielmino, J. Houldsworth, J. Mohr, S. Aoufouchi, R. Polakiewicz, R.S. Chaganti, and R. Dalla-Favera. 2004. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood*. 104:3318-25.
- Pasqualucci, L., Y. Kitaura, H. Gu, and R. Dalla-Favera. 2006. PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:395-400.
- Pasqualucci, L., A. Migliazza, N. Fracchiolla, C. William, A. Neri, L. Baldini, R.S. Chaganti, U. Klein, R. Kuppers, K. Rajewsky, and R. Dalla-Favera. 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:11816-21.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R.S. Chaganti, R. Kuppers, and R. Dalla-Favera. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 412:341-6.
- Peters, A., and U. Storb. 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity*. 4:57-65.
- Petersen-Mahrt, S.K., R.S. Harris, and M.S. Neuberger. 2002. AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*. 418:99-103.
- Pham, P., R. Bransteitter, and M.F. Goodman. 2005. Reward versus risk: DNA cytidine deaminases triggering immunity and disease. *Biochemistry*. 44:2703-15.
- Pham, P., R. Bransteitter, J. Petruska, and M.F. Goodman. 2003. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature*. 424:103-7.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, and B. Seraphin. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*. 24:218-29.
- Rada, C., J.M. Di Noia, and M.S. Neuberger. 2004. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell*. 16:163-71.
- Rada, C., J.M. Jarvis, and C. Milstein. 2002b. AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7003-8.

- Rada, C., G.T. Williams, H. Nilsen, D.E. Barnes, T. Lindahl, and M.S. Neuberger. 2002a. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol.* 12:1748-55.
- Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature.* 381:751-8.
- Rajewsky, K., I. Forster, and A. Cumano. 1987. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science.* 238:1088-94.
- Ramiro, A.R., P. Stavropoulos, M. Jankovic, and M.C. Nussenzweig. 2003. Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol.* 4:452-6.
- Revy, P., T. Muto, Y. Levy, F. Geissmann, A. Plebani, O. Sanal, N. Catalan, M. Forveille, R. Dufourcq-Labeouze, A. Gennery, I. Tezcan, F. Ersoy, H. Kayserili, A.G. Ugazio, N. Brousse, M. Muramatsu, L.D. Notarangelo, K. Kinoshita, T. Honjo, A. Fischer, and A. Durandy. 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 102:565-75.
- Rickinson, A. 2002. Epstein-Barr virus. *Virus Res.* 82:109-13.
- Rickinson, A.B., and D.J. Moss. 1997. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol.* 15:405-31.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* 17:1030-2.
- Rogozin, I.B., and M. Diaz. 2004. Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol.* 172:3382-4.
- Rogozin, I.B., and N.A. Kolchanov. 1992. Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1171:11-8.
- Ruckerl, F., B. Busse, and J. Bachl. 2006. Episomal vectors to monitor and induce somatic hypermutation in human Burkitt-Lymphoma cell lines. *Mol Immunol.* 43:1645-52.
- Sale, J.E., and M.S. Neuberger. 1998. TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity.* 9:859-69.
- Sambrook, J., and D.W. Russel. 2001. Molecular Cloning- A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sayegh, C.E., M.W. Quong, Y. Agata, and C. Murre. 2003. E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol.* 4:586-93.
- Schlee, M., M. Holzel, S. Bernard, R. Mailhammer, M. Schuhmacher, J. Reschke, D. Eick, D. Marinkovic, T. Wirth, A. Rosenwald, L.M. Staudt, M. Eilers, F. Baran-Marszak, R. Fagard, J. Feuillard, G. Laux, and G.W. Bornkamm. 2007. C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer.* 120:1387-95.
- Schoetz, U., M. Cervelli, Y.D. Wang, P. Fiedler, and J.M. Buerstedde. 2006. E2A expression stimulates Ig hypermutation. *J Immunol.* 177:395-400.
- Schwering, I., A. Brauninger, U. Klein, B. Jungnickel, M. Tinguely, V. Diehl, M.L. Hansmann, R. Dalla-Favera, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 2003. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 101:1505-12.
- Shaffer, A.L., K.I. Lin, T.C. Kuo, X. Yu, E.M. Hurt, A. Rosenwald, J.M. Giltnane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame, and L.M. Staudt. 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* 17:51-62.

- Shaffer, A.L., A. Rosenwald, E.M. Hurt, J.M. Giltnane, L.T. Lam, O.K. Pickeral, and L.M. Staudt. 2001. Signatures of the immune response. *Immunity*. 15:375-85.
- Shen, H.M., N. Michael, N. Kim, and U. Storb. 2000. The TATA binding protein, c-Myc and survivin genes are not somatically hypermutated, while Ig and BCL6 genes are hypermutated in human memory B cells. *Int Immunol*. 12:1085-93.
- Shen, H.M., A. Peters, B. Baron, X. Zhu, and U. Storb. 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science*. 280:1750-2.
- Shinkura, R., S. Ito, N.A. Begum, H. Nagaoka, M. Muramatsu, K. Kinoshita, Y. Sakakibara, H. Hijikata, and T. Honjo. 2004. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 5:707-12.
- Smit, L.A., R.J. Bende, J. Aten, J.E. Guikema, W.M. Aarts, and C.J. van Noesel. 2003. Expression of activation-induced cytidine deaminase is confined to B-cell non-Hodgkin's lymphomas of germinal-center phenotype. *Cancer Res*. 63:3894-8.
- Steen, H., and M. Mann. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:699-711.
- Steingrimsson, E., L. Tessarollo, S.W. Reid, N.A. Jenkins, and N.G. Copeland. 1998. The bHLH-Zip transcription factor Tfeb is essential for placental vascularization. *Development*. 125:4607-16.
- Stelter, P., and H.D. Ulrich. 2003. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*. 425:188-91.
- Ta, V.T., H. Nagaoka, N. Catalan, A. Durandy, A. Fischer, K. Imai, S. Nonoyama, J. Tashiro, M. Ikegawa, S. Ito, K. Kinoshita, M. Muramatsu, and T. Honjo. 2003. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol*. 4:843-8.
- Taniuchi, I., D. Kitamura, Y. Maekawa, T. Fukuda, H. Kishi, and T. Watanabe. 1995. Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in mice lacking HS1 protein, a substrate of the antigen-receptor-coupled tyrosine kinases. *Embo J*. 14:3664-78.
- Taub, R., I. Kirsch, C. Morton, G. Lenoir, D. Swan, S. Tronick, S. Aaronson, and P. Leder. 1982. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:7837-41.
- Thorley-Lawson, D.A. 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*. 1:75-82.
- Tobollik, S., L. Meyer, M. Buettner, S. Klemmer, B. Kempkes, E. Kremmer, G. Niedobitek, and B. Jungnickel. 2006. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 inhibits AID expression during EBV-driven B-cell growth. *Blood*. 108:3859-64.
- Uchida, J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub, and H. Kikutani. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*. 286:300-3.
- Ulrich, H.D., and S. Jentsch. 2000. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J*. 19:3388-97.
- von Schwedler, U., H.M. Jack, and M. Wabl. 1990. Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature*. 345:452-6.
- Wu, X., P. Gerald, J.L. Platt, and M. Cascalho. 2005. The double-edged sword of activation-induced cytidine deaminase. *J Immunol*. 174:934-41.
- Yamanashi, Y., T. Fukuda, H. Nishizumi, T. Inazu, K. Higashi, D. Kitamura, T. Ishida, H. Yamamura, T. Watanabe, and T. Yamamoto. 1997. Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J Exp Med*. 185:1387-92.

- Yang, S.Y., S.D. Fugmann, and D.G. Schatz. 2006. Control of gene conversion and somatic hypermutation by immunoglobulin promoter and enhancer sequences. *J Exp Med.* 203:2919-28.
- Yelamos, J., N. Klix, B. Goyenechea, F. Lozano, Y.L. Chui, A. Gonzalez Fernandez, R. Pannell, M.S. Neuberger, and C. Milstein. 1995. Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature.* 376:225-9.
- Yoshikawa, K., I.M. Okazaki, T. Eto, K. Kinoshita, M. Muramatsu, H. Nagaoka, and T. Honjo. 2002. AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science.* 296:2033-6.
- Zeng, X., D.B. Winter, C. Kasmer, K.H. Kraemer, A.R. Lehmann, and P.J. Gearhart. 2001. DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol.* 2:537-41.
- Zhang, H., B. Yang, R.J. Pomerantz, C. Zhang, S.C. Arunachalam, and L. Gao. 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature.* 424:94-8.
- Zhang, W., P.D. Bardwell, C.J. Woo, V. Poltoratsky, M.D. Scharff, and A. Martin. 2001. Clonal instability of V region hypermutation in the Ramos Burkitt's lymphoma cell line. *Int Immunol.* 13:1175-84.
- Zhou, C., A. Saxon, and K. Zhang. 2003. Human activation-induced cytidine deaminase is induced by IL-4 and negatively regulated by CD45: implication of CD45 as a Janus kinase phosphatase in antibody diversification. *J Immunol.* 170:1887-93.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase
AP	Apurin/Apyrimidin
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCR	‚B cell receptor‘, B-Zell-Rezeptor
BER	‚base excision repair‘, Basenexzisionsreparatur
bHLH	‚basic helix-loop-helix‘
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	‚bovine serum albumine‘, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ca.	zirka
CBP	Calmodulinbindungspeptid
CD	‚clusters of differentiation‘
cHL	‚classical‘ Hodgkin Lymphom, klassisches Hodgkin Lymphom
C-Region	‚constant region‘, konstante Region
CSR	‚class switch recombination‘ Klassenwechselrekombination
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D	Adenin, Guanin oder Thymin
Da	Dalton
DLCL	‚diffuse large B cell lymphoma‘, Diffuses großzelliges Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	‚deoxyribonucleic acid‘, Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	‚DNA dependent Protein Kinase‘
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
D-Segment	‚diversity‘-Segment des V-Gens
DTT	Dithiothreitol
EBER	‚EBV-encoded RNAs‘ (kurze nicht polyadenylierte RNAs)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	‚Enhanced chemiluminescence‘
E μ	IgH-Enhancer
EBV	Epstein-Barr Virus
EBNA	‚EBV-encoded nuclear antigen‘
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ER	‚estrogen receptor‘, Östrogenrezeptor
et al.	‚et alterae‘, und andere
FACS	‚fluorescence activated cell sorting‘
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FKS	fötales Kälberserum
FL	Follikuläres Lymphom
Fmol	Femtomol
g	Gramm
G	Guanin
GC	‚germinal centre‘, Keimzentrum

GFP	‚green fluorescent protein‘
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HL	Hodgkin Lymphom
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser
HR	Homologe Rekombination
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen (maligne Zellen des cHL)
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
ICH	Immunhistochemie
IM	Infektiöse Mononukleose, Pfeiffersches Drüsenfieber
IP	Immunpräzipitation
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
IRES	Interne Ribosomen Eintrittsstelle
J-Segment	‚joining‘-Segment des V-Gens
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LC	‚Liquid Chromatographie‘, Flüssigkeitschromatographie
LCL	‚lymphoblastoid cell line‘, Lymphoblastoide Zelllinie
LMP1/2A	‚latent membrane proteins 1/2A‘
L und H	lymphozytische und histiozytische Zellen (maligne Zellen des nlpHL)
LZ	Leuzin Zipper
M	Molar (Mol/Liter)
MALDI	‚Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation‘
MALDI-MS	‚Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation‘-Massenspektrometrie
MAR	‚matrix attachment region‘
MD	Mega-Dalton
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	‚major histocompatibility complex‘
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
MMR	‚mismatch repair‘, Fehlpaarungsreparatur
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat
MPW	‚Millipore‘ Wasser
mRNA	‚messenger ribonucleic acid‘, Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Nano-LC	Nano-‚Liquid Chromatographie‘, Nano-Flüssigkeitschromatographie
NES	nukleäres Exportsignal

NFκB	‚Nuclear factor kappa B‘
ng	Nanogramm
NHEJ	‚non-homologous end-joining‘, nichthomologe Endverknüpfung
nm	Nanometer
nlpHL	noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
ns	Nanosekunde
PAGE	Polyacrylamidgel
PBS	‚phosphate buffered saline‘, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	‚polymerase chain reaction‘, Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
PTLD	‚post-transplant lymphoproliferative disease‘, Post-Transplantations-Lymphoproliferative Erkrankungen
PVDF	Polyvinylidenefluorid
R	Purinbasen: Adenin oder Guanin
RNA	‚ribonucleic acid‘, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNA Pol	RNA Polymerase
RPA	‚replication protein A‘, Replikationsprotein A
rpm	‚rounds per minute‘, Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunde
SDS	‚sodium dodecyl sulphate‘, Natriumdodecylsulfat
SHM	Somatische Hypermutation
S-Region	‚Switch‘-Region
SSB	‚single strand break‘, Einzelstrangbruch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAP	‚tandem affinity purification‘, Tandem Affinitätsreinigung
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylen-diamin
TEV	Tabacco Etch Virus
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TLS	Translasionssynthese
TNF	‚tumor necrosis factor‘
TOF	‚time of flight‘
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
U	Uracil
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
V-Gen	Gen der variablen Region
V _H -Gen	Gen der variablen Region der schweren Immunglobulinkette
V-Region	variable Region
W	Adenin oder Thymin
wt	Wildtyp
w/v	‚weight per volume‘; Gewicht pro Volumen
Y	Pyrimidinbasen: Thymin oder Cytosin
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetische Veränderungen auf dem humanen Immunglobulinlocus der schweren Kette (nach Jungnickel, 2006).....	3
Abbildung 2: Modell der Reparatur AID-induzierter Läsionen bei SHM und CSR (nach Rada et al., 2004).....	13
Abbildung 3: Schema der TAP-Struktur und Prinzip der Tandem Affinitätsreinigung (nach Rigaut et al., 1999)	17
Abbildung 4: Komponenten eines Massenspektrometers (aus Lottspeich und Zorbas, 1998)	18
Abbildung 5: Prinzip des MALDI-Prozesses.....	19
Abbildung 6: Western-Blot-Analysen mit drei monoklonalen AID-Antikörpern	23
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbungen mit dem AID-Antikörper EK2-5G9.....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie EREB2-5 (nach Schlee et al., 2007).....	27
Abbildung 9: Einfluss des EBV-Latenzprogramms III auf die AID-Expression.....	28
Abbildung 10: AID-Expressionsänderungen in einem Kinetikexperiment mit der Zelllinie EREB2-5	29
Abbildung 11: EBNA2 inhibiert die AID-Expression	30
Abbildung 12: Einfluss der EBV Latenz III Proteine auf die AID-Expression <i>in vivo</i>	32
Abbildung 13: Überblick über Herangehensweise zur Identifikation AID-interagierender Proteine.....	34
Abbildung 14: Schematische Darstellung der TAP-AID-Fusionsproteine	35
Abbildung 15: Funktioneller Test der TAP-AID-Fusionsproteine	37
Abbildung 16: Expression der TAP-AID-Fusionen in Raji-Einzelzellklonen.....	39
Abbildung 17: AID-Komplexe in der Zelle	42
Abbildung 18: Lyse der Zellen für die anschließende TAP-Reinigung.....	43
Abbildung 19: Vergleich der IgG-Bindung für 2h und über Nacht	44
Abbildung 20: TEV-Proteasespaltung mit und ohne EDTA.....	45
Abbildung 21: Versuche zur Etablierung der TEV-Elution.....	46
Abbildung 22: Versuche zur Calmodulinbindung	47
Abbildung 23: TAP-Reinigung von N-TAP-AID und C-TAP-AID	48
Abbildung 24: Abreicherung von Gesamtprotein und Anreicherung spezifischer Proteine während der TAP-Reinigung von N-TAP-AID und C-TAP-AID	49
Abbildung 25: UV-Spektrum eines Nano-LC-Experiments mit einem finalen Calmodulin-Eluat des C-TAP-AID	52
Abbildung 26: Massenspektrometr. Analyse eines Proben tropfens einer TAP-Reinigung	53
Abbildung 27: Koreinigung von AID-interagierenden Proteinen.....	58
Abbildung 28: Darstellung des Homologiebereichs der bHLH-LZ Transkriptionsfaktorfamilie MITF	71
Abbildung 29: Modell der Zielführung von AID an den IgH-Locus.....	72
Abbildung 30: Prinzip der Flüssigchromatographie	92
Abbildung 31: Schema der Fragmentierung von Peptiden (nach Lottspeich und Zorbas, Bioanalytik, 1998).....	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: EBV-Genexpressionsmuster in verschiedenen B-Zelldifferenzierungsstadien und B-Zell Lymphomen (nach Babcock et al., 2000; Kuppers, 2003)	10
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten AID-Fusionsproteine und –Peptide für die Herstellung monoklonaler AID-Antikörper	22
Tabelle 3: Versuche zur Sensitivität der MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometrie	51
Tabelle 4: Liste mit Proteinen, die potentiell mit AID interagieren.....	55
Tabelle 5: Antikörper, die für den Proteinnachweis verwendet wurden.....	78
Tabelle 6: DNA-Oligonukleotide für (quantitative) RT-PCR-Reaktionen	79
Tabelle 7: Primer zur Amplifikation der AID- bzw. TAP-Fragmente	79
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien	80
Tabelle 9: Liste der identifizierten Proteine für N-TAP-AID-Reinigung	116
Tabelle 10: Liste der identifizierten Proteine für C-TAP-AID-Reinigung	117
Tabelle 11: Liste der unspezifisch bindenden Proteine für TAP-Reinigung	118

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen hilfreichen Händen und Köpfen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Doktorarbeit zu erstellen:

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Betreuerin Dr. Berit Jungnickel, die wie auch schon während der Diplomarbeit immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat und Verständnis zur Verfügung stand.

An Maren Mierau geht ein riesen großer Dank für die gemeinsame Zeit, den leckeren Kuchen, das feine Essen und die zahlreichen Schokoriegel, die mir den Laboralltag versüßt haben. Außerdem tausend Dank für dein immer offenes Ohr und deine Freundschaft! Und natürlich für die legendären, wissenschaftlichen Diskussionen zu dritt...

Florian Ruckerl, dem Dritten im Bund, möchte ich danken für die Versüßung der langen Laborabende durch viel Schokolade und Kaffee. Außerdem trugen wir gemeinsam an der großen Bürde: „AID- the major problem the world shares“. Und ich kann nur sagen: Gemeinsam war alles nur halb so schlimm! Du hast mich ja alleine gelassen...

(S)Andra ☺ Klemmer und André Kutzera danke ich für die exzellente und unproblematische Zusammenarbeit im Labor. Für eure Ausdauer und nie endende Motivation auch nach dem x-ten misslungenen AID-Blot immer wieder zu lächeln.

Liebste (S)Andra danke auch für deine Freundschaft und die nicht arbeitsbedingten Momente!

Prof. Dr. Dirk Eick möchte ich danken für die Übernahme der offiziellen Betreuung und für seine unvergleichliche Ruhe.

Dr. Josef Mautner danke ich für die Bereitstellung der Expressionsplasmide für His und GST getagtes AID.

Dr. Elisabeth Kremmer danke ich für die Ausdauer, mit der sie die Generierung des AID-Antikörpers unterstützt und vorangetrieben hat.

Prof. Dr. Gerald Niedobitek und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die in vivo Färbungen und die fachliche Diskussion danken.

Dr. Ulla Zimmer-Strobl und Julia Rastelli danke ich für die fachliche Diskussion und Ratschläge.

Dr. Martin Schlee möchte ich für die EREB-Zellen und seine Array-Daten danken.

Ich bedanke mich bei Dr. Bettina Kempkes für die Bereitstellung der EREB, BL41-K3 und BJAB-K3 Zelllinien und für die Hilfe bei fachlichen Fragen.

Bei Prof. Dr. Georg Bornkamm bedanke ich mich für die Bereitstellung der TAP-Vektoren und die Hilfe bei fachlichen Fragen.

Dr. Jürgen Bachl danke ich für die Bereitstellung der SHM-Plasmide und Zellen, sowie für die fachliche Beratung.

Susanne Rother und Katja Sträßer danke ich für die fachliche Hilfe und die vielen Tipps für die TAP-Reinigung.

Ganz herzlich danke ich der „MALDI-Truppe“: Andrea, Hakan, Janine und Karsten!!! Es war einfach grauenvoll....

Besonders danke ich Andrea Hartmann für die zwei-samen Nächte an unseren Lieblingsgeräten (LC und MALDI), für die aufmunternden Worte und einfach für die ganze TAP-TEV-TOF-TOF-Zeit!!!!

Dr. Dietrich Merkel von ABI danke ich für seine Geduld und große Hilfe bei allen MALDI-Fragen. Ohne dich hätte ich **die** Liste nie bekommen!!!

Hella, Cornelia, Julia, Kristina, Florian, Maren, André, Sandra, Manu, Linda, Nevzat, Nathalie, Sushmita, Hanna, Isha, Judith und Caro danke ich für die super Zeit in der KMOLBI. Unvergessen werden mir die sauleckeren und riesigen Essen des Lunch Clubs und die nette Arbeitsatmosphäre in Erinnerung bleiben.

Ein herzliches Dankeschön an die mittlerweile unüberschaubaren Jungnickels- es war/ist wunderbar mit euch zu arbeiten!!!

Bei Hanna, Ines und Judith bedanke ich mich vielmals für das schnelle Korrekturlesen, für das Entdecken etwaiger Rechtschreibfehler und für die Erörterung der Bindestrichproblematik.

Der lieben Birgit Schrezenmeir danke ich, dass sie mich immer wieder aus dem bürokratischen Dschungel geleitet hat.

Meinen Eltern danke ich für ihre große Unterstützung -vor allem im Endspurt-Windelwechseln und so...

Meinem Mann José Miguel danke ich für seine unendliche Geduld und seine unermüdliche Hilfe in dieser doch etwas turbulenten Zeit. Muchas gracias por tu amor, pollo grande! Y muchas gracias por el regalo mas grande del mundo: el amor de mi vida- el pollo chico! Te amo!

Ehrenwörtliche Erklärung

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

München, den 28. Juni 2007

Stephanie Tobollik

Erklärung

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

München, den 28. Juni 2007

Stephanie Tobollik

Lebenslauf

Persönliche Daten

Stephanie Tobollik
geboren am 30. Januar 1973 in Freiburg

Schulischer Bildungsweg

1979-1983	Grundschule München
1983-1987	Maximilians Gymnasium München
1987-1994	Theresien Gymnasium München
1994	Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1995-2002	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2002-2003	Diplomarbeit am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GSF, München Thema: „Untersuchungen zur Expression und Regulation der Aktivierungsinduzierten Cytidineaminase in humanen B-Lymphozyten“
Seit März 2003	Doktorarbeit am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GSF, München Thema: „Untersuchung der Regulation und Interaktionen der Aktivierungsinduzierten Cytidineaminase in humanen B-Lymphozyten“ Betreuer: Prof. Dr. Dirk Eick

Auslandsaufenthalt

1999-2000	Integriertes Auslandsstudium an der Universidad de Concepción, Chile
-----------	--

Anhang

Tabelle 9: Liste der identifizierten Proteine für N-TAP-AID-Reinigung

Rank	Protein Name	Accession No.	Peptide count	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	(P35908) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E_HUMAN	24	950	100
2	(P11142) Heat shock cognate 71 kDa protein	HS7C_HUMAN	12	428	100
3	(Q9BQE3) Tubulin alpha-6 chain	TBA6_HUMAN	15	403	100
4	(P05215) Tubulin alpha-4 chain	TBA4_HUMAN	15	394	100
5	(P05218) Tubulin beta-5 chain	TBB5_HUMAN	8	234	100
6	(Q9GZX7) Activation-induced cytidine deaminase	AICD_HUMAN	8	214	100
7	(P02593) Calmodulin	CALM_HUMAN	6	209	100
8	(P05217) Tubulin beta-2 chain	TBB2_HUMAN	7	193	100
9	(P17066) Heat shock 70 kDa protein 6	HS76_HUMAN	4	188	100
10	(P31943) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H)	ROH1_HUMAN	6	171	100
11	(P04720) Elongation factor 1-alpha 1	EF11_HUMAN	7	164	100
12	(P08238) Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84)	HS9B_HUMAN	7	157	100
13	(P02571) Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	6	155	100
14	(P08107) Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1)	HS71_HUMAN	4	149	100
15	(P52597) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F)	ROF_HUMAN	4	129	100
16	(P50402) Emerin	EMD_HUMAN	6	122	100
17	(P55795) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H' (hnRNP H')	ROH2_HUMAN	5	118	100
18	(P07437) Tubulin beta-1 chain	TBB1_HUMAN	4	107	100
19	(P05141) ADP,ATP carrier protein, fibroblast isoform	ADT2_HUMAN	4	103	100
20	(P19484) Transcription factor EB	TFEB_HUMAN	5	101	100
21	(P60866) 40S ribosomal protein S20	RS20_HUMAN	3	97	100
22	(P11021) 78 kDa glucose-regulated protein precursor	GR78_HUMAN	3	91	100
23	(P12004) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	PCNA_HUMAN	3	88	100
24	(P19532) Transcription factor E3	TFE3_HUMAN	6	84	100
25	(Q09028) Chromatin assembly factor 1 subunit C	RBB4_HUMAN	4	83	100
26	(P02248) Ubiquitin	UBIQ_HUMAN	5	79	100
27	(Q9H1R3) Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac	KML2_HUMAN	2	78	100
28	(P07900) Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	HS9A_HUMAN	3	76	100
29	(Q9Y3C6) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase like 1	PPL1_HUMAN	3	63	99,999
30	(P82650) Mitochondrial 28S ribosomal protein S22	RT22_HUMAN	3	62	99,999
31	(O43819) SCO2 protein homolog, mitochondrial	SCO2_HUMAN	3	61	99,999
32	(P01857) Ig gamma-1 chain C region	GC1_HUMAN	2	59	99,998
33	(P27707) Deoxycytidine kinase	DCK_HUMAN	1	59	99,998
34	(Q9Y230) RuvB-like 2	RUV2_HUMAN	4	58	99,997
35	(Q12931) Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAL_HUMAN	1	58	99,997
36	(O75030) Microphthalmia-associated transcription factor	MITF_HUMAN	5	58	99,997
37	(Q13573) Nuclear protein SkiP	SNW1_HUMAN	3	55	99,995
38	(P01859) Ig gamma-2 chain C region	GC2_HUMAN	2	55	99,995
39	(Q08209) Serine/threonine protein phosphatase 2B	P2BA_HUMAN	3	55	99,995
40	(O60287) Protein KIAA0539	Y539_HUMAN	4	54	99,993
41	(P48454) Serine/threonine protein phosphatase 2B	P2BC_HUMAN	3	49	99,977
42	(P08670) Vimentin	VIME_HUMAN	3	48	99,977
43	(Q86YZ3) Homerin	HORN_HUMAN	2	48	99,971
44	(Q08554) Desmocollin 1A/1B precursor	DSC1_HUMAN	2	47	99,969
45	(P01861) Ig gamma-4 chain C region	GC4_HUMAN	4	46	99,962
46	(Q9H361) Polyadenylate-binding protein 3	PAB3_HUMAN	5	45	99,949
47	(Q9P275) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36	UB36_HUMAN	2	45	99,947
48	(Q9H0D6) 5'-3' exoribonuclease 2	XRN2_HUMAN	3	45	99,941
49	(O15020) Spectrin beta chain, brain 2	SPCP_HUMAN	5	44	99,934

50	(P12036) Neurofilament triplet H protein	NFH_HUMAN	3	42	99,903
51	(P11586) C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	C1TC_HUMAN	2	42	99,886
52	(P14317) Hematopoietic lineage cell specific protein	HS1_HUMAN	1	40	99,848
53	(Q9Y3R0) Glutamate receptor-interacting protein 1	GRI1_HUMAN	4	38	99,751
54	(P05209) Tubulin alpha-1 chain	TBA1_HUMAN	1	35	99,492
55	(Q9UBL6) Copine VII	CNE7_HUMAN	1	35	99,498
56	(Q969N2) GPI transamidase component PIG-T	PIGT_HUMAN	1	34	99,44
57	(O43150) Development and differentiation-enhancing	DDF2_HUMAN	2	34	99,399
58	(Q13822) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	NPP2_HUMAN	3	34	99,339
59	(O60645) Exocyst complex component Sec6	SEC6_HUMAN	4	34	99,291
60	(P04222) HLA class I histocompatibility antigen, Cw-3	1C03_HUMAN	2	33	99,213
61	(Q00325) Phosphate carrier protein, mitochondrial	MPCP_HUMAN	2	32	99,086
62	(Q9H4B4) Serine/threonine-protein kinase PLK3	PLK3_HUMAN	2	30	98,384
63	(Q9H293) Interleukin-17E precursor (IL-17E)	I17E_HUMAN	1	29	98,052
64	(P82094) TATA element modulatory factor (TMF)	TMF1_HUMAN	2	27	97,034
65	(O60296) Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal	A2S3_HUMAN	2	26	95,62
66	(Q03426) Mevalonate kinase	KIME_HUMAN	1	25	95,186

Tabelle 10: Liste der identifizierten Proteine für C-TAP-AID-Reinigung

Rank	Protein Name	Accession No.	Peptide count	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	(P04264) Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	24	1155	100
2	(P11142) Heat shock cognate 71 kDa protein	HS7C_HUMAN	16	515	100
3	(Q9GZX7) Activation-induced cytidine deaminase	AICD_HUMAN	9	215	100
4	(Q86YZ3) Hornerin	HORN_HUMAN	3	190	100
5	(P17066) Heat shock 70 kDa protein 6	HS76_HUMAN	4	186	100
6	(P08107) Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1)	HS71_HUMAN	5	174	100
7	(P34931) Heat shock 70 kDa protein 1-HOM (HSP70-HOM)	HS7H_HUMAN	5	174	100
8	(Q9BQE3) Tubulin alpha-6 chain	TBA6_HUMAN	8	171	100
9	(P05218) Tubulin beta-5 chain	TBB5_HUMAN	8	158	100
10	(P05217) Tubulin beta-2 chain	TBB2_HUMAN	7	110	100
11	(O95071) Ubiquitin--protein ligase EDD	EDD_HUMAN	6	95	100
12	(P19532) Transcription factor E3	TFE3_HUMAN	5	92	100
13	(P08238) Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84)	HS9B_HUMAN	3	84	100
14	(P19484) Transcription factor EB	TFEB_HUMAN	4	83	100
15	(P04350) Tubulin beta-5 chain	TBBX_HUMAN	5	75	100
16	(Q9H1R3) Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac	KML2_HUMAN	3	68	100
17	(P07900) Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	HS9A_HUMAN	2	54	99,993
18	(P46783) 40S ribosomal protein S10	RS10_HUMAN	2	54	99,993
19	(Q12931) Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor (HSP 75)	TRAL_HUMAN	1	53	99,991
20	(P02768) Serum albumin precursor	ALBU_HUMAN	2	45	99,947
21	(P04720) Elongation factor 1-alpha 1	EF11_HUMAN	5	45	99,939
22	(P08670) Vimentin	VIME_HUMAN	3	42	99,897
23	(P35030) Trypsin III precursor	TRY3_HUMAN	1	41	99,867
24	(Q00325) Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor (PTP)	MPCP_HUMAN	1	40	99,819
25	(P98161) Polycystin 1 precursor	PKD1_HUMAN	4	40	99,794
26	(Q9UBL6) Copine VII	CNE7_HUMAN	2	39	99,766
27	(P60866) 40S ribosomal protein S20	RS20_HUMAN	2	37	99,615
28	(P05215) Tubulin alpha-4 chain	TBA4_HUMAN	2	36	99,594
29	(Q12920) Proteasome activator complex subunit 3	PSE3_HUMAN	2	33	99,104
30	(O43150) Development and differentiation-enhancing	DDF2_HUMAN	1	28	96,881
31	(O75419) CDC45-related protein	CC45_HUMAN	1	27	96,035
32	(Q9BYM8) Ubiquitin conjugating enzyme 7 interacting protein 3	U7I3_HUMAN	1	27	96,007
33	(Q8N1H7) Hypothetical protein C14orf39	CN39_HUMAN	1	26	95,754
34	(Q12768) Hypothetical protein KIAA0196	Y196_HUMAN	1	26	95,602
35	(Q9H293) Interleukin-17E precursor (IL-17E)	I17E_HUMAN	1	26	95,52

Tabelle 11: Liste der unspezifisch bindenden Proteine für TAP-Reinigung

Rank	Protein Name	Accession No.	Peptide count	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	(P04264) Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	16	803	100
2	(P13645) Keratin, type I cytoskeletal 10	K1CJ_HUMAN	13	185	100
3	(Q9H1R3) Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac	KML2_HUMAN	3	120	100
4	(Q86YZ3) Hornerin	HORN_HUMAN	1	90	100
5	(P05218) Tubulin beta-5 chain	TBB5_HUMAN	1	44	99,949
6	(O43150) Development and differentiation-enhancing	DDF2_HUMAN	1	33	99,319
7	(Q9H0D6) 5'-3' exoribonuclease 2	XRN2_HUMAN	1	30	98,575
8	(O60343) TBC1 domain family member 4	TBC4_HUMAN	1	28	97,46
9	(P07864) L-lactate dehydrogenase C chain	LDHC_HUMAN	3	27	97,221
10	(O95563) Brain protein 44	BR44_HUMAN	1	27	96,967
11	(P60866) 40S ribosomal protein S20	RS20_HUMAN	1	25	95,182