

Funktionelle Analyse der Induktion von
somatischer Hypermutation
durch die
aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID)

Dissertation

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

Florian Rückerl

München, August 2005

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

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
PD Dr. Bettina Kempkes

Prüfung: 27. Januar 2006

Gewidmet meinen Eltern

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Ruckerl, F., Mailhammer, R., und Bachl, J. Dual reporter system to dissect cis- and trans-effects influencing the mutation rate in a hypermutating cell line. *Mol Immunol* **41** (2004), 1135-1143

Ruckerl, F., und Bachl, J. Activation-induced cytidine deaminase fails to induce a mutator phenotype in the human pre-B cell line Nalm-6. *Eur J Immunol* **35** (2005), 290-298

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Keimzentrumsreaktion	4
2.2	Somatische Hypermutation	6
2.3	AID, Hyper-IgM-Syndrom und aberrante Hypermutation	9
2.4	Hypermutation lässt sich mit einem GFP-Reporterkonstrukt messen	13
2.5	Grundlagen des Kerntransports	15
2.6	Zielsetzung der Arbeit.....	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Diskriminierung von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Einflüssen auf die Hypermutationsrate mit Hilfe eines dualen Reportersystems	19
3.1.1	In der Zelllinie 18-81 nimmt die Mutationsrate auf einem GFP-Reporter- Konstrukt mit der Zeit ab	19
3.1.2	Subklone der pI-GFP <i>stop</i> Ausgangskultur variieren in ihren Mutationsraten.....	20
3.1.3	Mit einem zweiten Reporter-Transgen lassen sich <i>cis</i> - von <i>trans</i> -Effekten unterscheiden.....	22
3.1.4	Die AID mRNS-Mengen variieren in den pI-GFP <i>stop</i> -Subklonen und korrelieren mit den jeweiligen Mutationsraten	24
3.1.5	Die Überexpression von humanem AID rekonstituiert den Mutationsphänotyp in Subklon #1-5	24
3.1.6	Die Frequenz an YFP-Revertanten bleibt konstant.....	27

3.2	Wildtyp AID kann keinen Hypermutationsphänotyp in der humanen prä-B-Zelllinie Nalm-6 induzieren.....	27
3.2.1	Das GFP-Reporter-Transgen wird in der Zelllinie Nalm-6 nicht hypermutiert und nur sehr schwach in BL70	27
3.2.2	Ektopische AID-Expression induziert Hypermutation in BL70, nicht aber in Nalm-6 Zellen	30
3.2.3	Thymidin induziert einen Mutationsphänotyp in Nalm-6 Zellen.....	31
3.2.4	Thymidin induziert nicht die endogene AID-Expression in Nalm-6 Zellen	35
3.2.5	AID-Überexpression hat keinen Einfluss auf Thymidin-induzierte Mutagenese in Nalm-6 Zellen	35
3.3	Subzelluläre Lokalisation von AID.....	36
3.3.1	Die Aminosäuresequenz von AID deutet die Existenz von Kerntransportsignalen an.....	36
3.3.2	Herstellung von AID-Lokalisationsmutanten	37
3.3.3	Kernlokalisationsmutanten wirken sich auf Hypermutationsfrequenz und – rate aus.....	39
3.3.4	Die Veränderung der Kernlokalisationssequenzen wirkt sich nicht offensichtlich auf die subzelluläre Lokalisation von HA-markiertem AID aus.....	43
3.3.5	Nukleäres AID ist maskiert.....	44
3.3.6	Biochemische Zellfraktionierung zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von AID-Mutanten	46
3.3.7	AID hat keine NLS aber eine NES.....	47
3.3.8	Kerntransportmutanten von AID können Nalm-6 zur Hypermutation anregen	49

3.4	Charakterisierung von anti-AID-Antikörpern.....	51
3.4.1	Anti-AID-Antikörper erkennen AID in der Immunfluoreszenz	51
3.4.2	AID-Antikörper erkennen vermutlich AID in der Immunpräzipitation.....	53
3.4.3	AID liegt in der Zelle in Komplexen vor	54
4	Diskussion.....	57
4.1	Der Einfluss von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Faktoren auf SHM	57
4.2	Subzelluläre Lokalisation von AID und Domänenstruktur.....	60
4.3	Die Zelllinie Nalm-6 als Musterzelllinie zur Identifizierung AID-regulierender Faktoren.....	66
4.4	Blick in die Zukunft	72
5	Material	75
5.1	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	75
5.2	Verwendete Kits.....	75
5.3	Bakterien	75
5.4	Zelllinien	76
5.5	Radioaktive Isotope.....	76
5.6	Enzyme.....	76
5.7	Datenverarbeitung	77
5.8	Antikörper	77
5.9	Oligonukleotide.....	78

6	Methoden.....	80
6.1	Standardmethoden.....	80
6.2	Klonierung von Expressionsvektoren	80
6.2.1	Reporterkonstrukte	80
6.2.2	AID-Expressionsvektoren	81
6.3	Zellkultur.....	85
6.4	Transfektionen.....	86
6.5	Western-Blot-Analyse.....	86
6.6	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	86
6.7	Northern-Blot-Analyse.....	87
6.8	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR).....	87
6.9	Quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR)	87
6.10	Durchflusszytometrie	88
6.11	Erstanalyse von stabilen Transfektionsklonen	89
6.12	Expansionsanalyse	89
6.13	Sequenzierungen von Transgenen.....	89
6.14	Zellfraktionierung.....	90
6.15	Immunpräzipitationsexperimente mit radioaktiven Zellextrakten	91
6.16	Gelfiltrationsexperimente.....	91
7	Literaturverzeichnis.....	93

8	Abkürzungsverzeichnis.....	104
9	Abbildungsverzeichnis	108
10	Tabellenverzeichnis	111

1 Zusammenfassung

Somatische Hypermutation (SHM) ist ein wichtiger Mechanismus unseres Immunsystems, um hochaffine Antikörper zur Abwehr von Krankheitserregern zu generieren. Bei diesem Prozess werden in B-Lymphozyten durch das Enzym AID (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase) in den variablen Regionen der Immunglobulin-Gene DNS-Läsionen eingeführt, die zu Punktmutationen führen. Die Mutationsrate in diesen Gen-Loci liegt dabei ca. eine Million mal über der basalen, natürlichen Mutationsrate somatischer Zellen und wird deshalb als Hypermutation bezeichnet. Die Mutationen in den Immunglobulin-Genen können zu B-Zellen führen, die effizientere Antikörper produzieren. Gleichzeitig steht der Hypermutationsprozess aber auch im Verdacht ursächlich für die Entstehung diverser Lymphome verantwortlich zu sein.

Um den Prozess gerichteter Mutation des eigenen Genoms besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit zunächst ein Assay entwickelt, der es ermöglicht mittels Durchflusszytometrie, Einflüsse auf die Mutationsrate *cis*- oder *trans*-Faktoren zuzuordnen. Dadurch können Veränderungen auf Ebene eines artifiziellen Hypermutationssubstrates von quantitativen Fluktuationen beteiligter Proteine (z. B. AID) unterschieden werden.

Zur Beurteilung des onkogenen Potenzials von AID wurden verschiedene Zelllinien auf Hypermutationsinduktion nach AID-Überexpression untersucht. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine prä-B-Zelllinie (Nalm-6) identifiziert, die trotz AID-Überexpression nicht hypermutiert. Diese Beobachtung weist auf die Existenz von regulatorischen Mechanismen hin, die AID-induzierte Hypermutation limitieren und somit das onkogene Potenzial von AID einschränken.

Einer dieser Regulationsmechanismen könnte eine kontrollierte subzelluläre Lokalisation von AID sein, die eine räumliche Trennung von Enzym (AID) und Substrat (DNS) erlaubt. Mutationsanalysen des AID-Proteins ergaben, dass AID über eine nukleäre Exportsequenz (NES) am C-Terminus verfügt und auf diese Weise aus dem Zellkern entfernt bzw. vom potenziellen Substrat DNS ferngehalten wird. Die Deletion der NES-Sequenz, ebenso wie die artifizielle Einführung von Kernimportsequenzen, führt zu einer gesteigerten Mutationsrate auf einem Reportertransgen. Interessanterweise bewirkten die Lokalisationsmutanten von AID in der „hypermutationsresistenten“ Zelllinie Nalm-6 eine Induktion von Somatischer Hypermutation. Demzufolge ist also nicht eine mangelnde Prozessierung AID-induzierter DNS-Läsionen Ursache für den Phänotyp in Nalm-6-Zellen. Die Beobachtung legt nahe, dass in der Zelllinie Nalm-6 (im Vergleich zu anderen Lymphomzelllinien) ein regulatorischer

Komplex existiert, der AID entweder in enzymatisch-inaktivem Zustand hält oder den Zugang zum Substrat (DNS) beeinträchtigt, z. B. über die Regulation der subzellulären Lokalisation von AID. In der Tat konnte die Existenz von größeren AID-Proteinkomplexen in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Des Weiteren gelang es, anti-AID-Antikörper zu identifizieren, die in Immunpräzipitationsexperimenten verwendet werden können.

Diese Ergebnisse ermöglichen es in Zukunft, AID-interagierende Proteine näher zu charakterisieren und Faktoren zu identifizieren, die direkt die Aktivität von AID regulieren und so zur Kontrolle des Hypermutationsprozesses beitragen.

2 Einleitung

Wir sind tagtäglich dem Angriff einer Vielzahl an unterschiedlichsten Pathogenen ausgesetzt. Deshalb braucht unser Körper effiziente Abwehrmechanismen, um sich dieser zu erwehren. Zum Teil haben Krankheitserreger sehr ähnliche, allgemeine Strukturen, z. B. die Lipopolysaccharide der äußeren Zellmembran von gram-negativen Bakterien. Erreger mit solchen unspezifischen Merkmalen (Antigenen) werden in erster Linie von unserem „angeborenen“ Immunsystem erkannt und eliminiert. Dieser wertvolle basale Schutz reicht jedoch nicht aus, um sich gegen jede Art von Erreger zu schützen, weil die Variationsmöglichkeiten für Pathogene prinzipiell nahezu unendlich sind. Es ist also unerlässlich, dass das Immunsystem Krankheitserreger auch an individuellen Merkmalen erkennen kann. Diese Aufgabe übernimmt das „adaptive Immunsystem“. Zentrale Elemente dieses adaptiven Immunsystems sind zwei Zelltypen, die T- und B-Lymphozyten (T- und B-Zellen). Die B-Zellen haben die Funktion, Pathogene als solche zu markieren, damit diese anschließend durch andere Komponenten des Immunsystems (z. B. Komplementkaskade, T-Zellen, etc.) unschädlich gemacht werden können. Zu diesem Zweck produzieren B-Zellen Antikörper bzw. Immunglobuline (Ig). Immunglobuline setzen sich aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten zusammen, die jeweils über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. So entsteht ein Y-ähnliches Gesamtmolekül, das zwei Antigenbindungsstellen besitzt (Bivalenz). Jede der Ketten läßt sich funktionell in zwei unterschiedliche Domänen einteilen, in eine variable Region und eine konstante Region. Die variable Region dient der Antigenbindung, die konstante Region der allgemeinen Proteinstabilität und ist im Falle der schweren Kette auch für die Effektorfunktion des Antikörpers maßgebend.

Um der großen Menge an prinzipiell möglichen Antigenen gerecht zu werden, muss die beschränkte genetische Informationsmenge der Immunglobulingene variabel genutzt werden. Dazu stehen verschiedene molekulare Mechanismen zur Verfügung: somatische Rekombination verschiedener Gensegmente (V(D)J-Rekombination), junktionale Diversifikation, die Kombination unterschiedlicher leichter (L) und schwerer (H) Ketten und Somatische Hypermutation (SHM). Die ersten drei Prozesse finden während der Entwicklung zur naiven B-Zelle (ohne Kontakt mit ihrem Antigen) statt und dienen der Ausbildung eines antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptors. SHM erfolgt erst später nach Kontakt mit dem jeweils spezifischen Antigen, meist im Rahmen der Keimzentrumsreaktion und ist immer Teil einer Immunantwort. Für einen Überblick über die einzelnen Mechanismen eignet sich das Buch „Immunobiology“ (Janeway et al., 2005).

2.1 Die Keimzentrumsreaktion

Während der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark (Janeway et al., 2005) wird das B-Zell-Repertoire unseres Körpers durch den Erwerb möglichst vieler unterschiedlicher Bindungsspezifitäten prinzipiell in die Lage versetzt, jedes denkbare Antigen mit Hilfe des B-Zell-Rezeptors erkennen und binden zu können. Der B-Zell-Rezeptor ist die membranständige Form des später sezernierten Immunglobulins. Sobald die B-Lymphozyten nach erfolgreicher V(D)J-Rekombination einen funktionellen B-Zell-Rezeptor an der Zelloberfläche exprimieren, verlassen sie das Knochenmark und patrouillieren letztlich als „naive B-Zellen“ durch die Blutbahn und die lymphatischen Organe des Körpers (z. B. Milz, Lymphknoten etc.). Treffen sie auf ihr spezifisches Antigen (Bindung an den B-Zell-Rezeptor), internalisieren und prozessieren sie dieses, um es anschließend an den MHC II Komplex („Major Histocompatibility Complex“) gebunden wieder an der Zelloberfläche zu präsentieren. Dadurch reihen sich die B-Zellen nun in die Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen ein. Erkennen in den Follikeln sekundärer lymphatischer Organe aktivierte T-Helferzellen (T_H -Zellen) ebenfalls diese präsentierten Antigene, so induzieren jene über Botenstoffe (Zytokine, z. B. Interleukin 4) die Aktivierung der B-Lymphozyten. Die meisten aktivierten B-Zellen migrieren dann für eine schnelle Immunantwort in die rote Pulpa der Milz und in die Markstränge der Lymphknoten, wo sie zu kurzlebigen Plasmazellen terminal ausdifferenzieren und niederaffine Antikörper sezernieren. Einige der aktivierten B-Zellen formieren aber im Follikel zusammen mit Antigen-präsentierenden follikulären dendritischen Zellen und T_H -Zellen ein so genanntes „Keimzentrum“ (siehe Abb. 1 und für einen Überblick Wolniak et al., 2004). Sinn der Keimzentrumsreaktion ist es, B-Lymphozyten hervorzubringen, die hochaffine Antikörper mit speziellen Effektorfunktionen produzieren können. Die verschiedenen Effektorfunktionen sind das Resultat des so genannten Klassenwechsels („Class Switch Recombination“; CSR) und beruhen auf der unterschiedlichen Nutzung von Genabschnitten der konstanten Region der schweren Kette; man spricht von Isotypen, von denen es fünf Typen gibt (IgM, IgD, IgG, IgE, IgA).

In Abbildung 1 ist schematisch der Ablauf der Keimzentrumsreaktion dargestellt. Das Keimzentrum unterteilt sich in eine charakteristische dunkle und eine helle Zone, die von einer „Mantelzone“ umgeben sind (MacLennan, 1994). Die aktivierten B-Lymphozyten beginnen zunächst in der dunklen Zone des Keimzentrums als Zentroblasten stark zu proliferieren und teilen sich ca. alle sieben Stunden (Zhang et al., 1988; Liu et al., 1991). In diesem Stadium findet in der Regel auch Somatische Hypermutation statt (Liu et al., 1996),

ein wichtiger Schritt für die Diversifizierung des Antikörperrepertoires. Danach werden aus den Zentroblasten Zentrozyten, die in die helle Zone des Keimzentrums wandern. Dort treffen sie auf folliculäre dendritische Zellen mit dem spezifischen Antigen und T_H -Zellen. B-Zellen, die durch Somatische Hypermutation keine erhöhte Affinität zum Antigen erworben haben, gehen in die Apoptose. Nur diejenigen B-Lymphozyten, die durch SHM eine höhere Affinität zu ihrem Antigen erworben haben (Affinitätsreifung), erhalten ein Überlebenssignal (positive Selektion). Während dieser Phase als Zentrozyt können die B-Zellen auch Klassenwechsel machen (Liu et al., 1996). Positiv-selektionierte B-Zellen verlassen anschließend das Keimzentrum und entwickeln sich zu langlebigen, Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, die die Grundlage jeder starken Immunantwort sind, oder zu B-Gedächtniszellen, die im Falle einer späteren, zweiten Infektion mit demselben Pathogen eine raschere, Antigen-spezifischere Immunantwort ermöglichen.

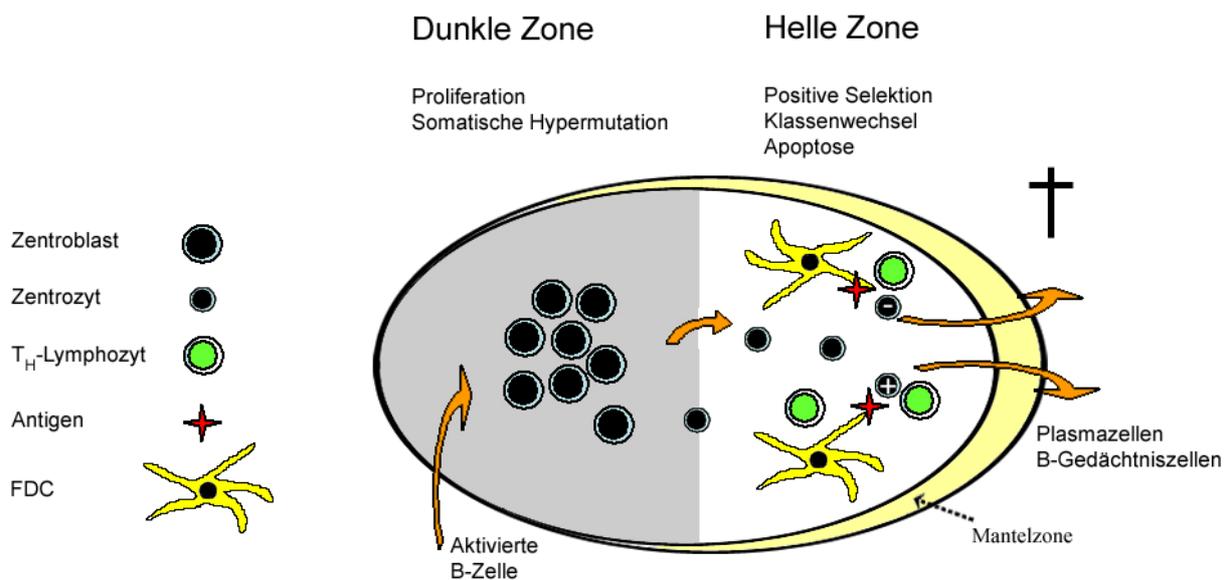


Abb. 1 Schematische Darstellung des Weges einer aktivierten B-Zelle durch das Keimzentrum. In der dunklen Zone des Keimzentrums werden die aktivierten B-Zellen zunächst zu Zentroblasten, die stark proliferieren und dabei Somatische Hypermutation vollziehen. Nach Abschluss dieses Prozesses wandern die Zentroblasten in die helle Zone und werden zu Zentrozyten. Diese treffen dort auf ihr Antigen, das von FDCs („Follicular dendritic cells“) und T_H -Zellen präsentiert wird. Sollte die Affinitätsreifung eine höhere (+) Affinität zum Antigen bewirkt haben, so erhält der Zentrozyt ein Überlebenssignal und verlässt das Keimzentrum, um zu einer Ig-sezernierenden Plasmazelle oder einer B-Gedächtniszelle auszdifferenzieren. Ohne Überlebenssignal (-) gehen die Zentrozyten in die Apoptose.

2.2 Somatische Hypermutteration

Somatische Hypermutteration findet mit Ausnahme von sporadischen extrafollikulären Ereignissen vor allem während der Keimzentrumsreaktion statt. Dabei werden die Antigenbindenden Bereiche der Immunglobulingene mit einer Rate von 10^{-3} bis 10^{-4} Mutationen pro Basenpaar und Generation mutiert. Weil diese Rate ca. eine Million mal über der basalen, natürlichen Mutationsrate somatischer Zellen liegt (McKean et al., 1984; Berek & Milstein, 1988), wird dieses Phänomen als Somatische Hypermutteration bezeichnet.

Es gibt drei Immunglobulin-Genloci in unserem Genom: den Locus für die schwere Kette („Ig heavy chain“; IgH), sowie die Loci für die lambda und kappa leichte-Ketten-Gene („Ig light chain“; IgL $_{\lambda}$ und IgL $_{\kappa}$). Um einen funktionellen B-Zell-Rezeptor ausbilden zu können, müssen B-Zellen in ihren frühen Entwicklungsstadien zuerst ihre Ig-Gensegmente in diesen Loci rearrangieren (siehe Janeway et al., 2005). Im Laufe dieses Rearrangements werden im Falle der leichten Kette ein V- und ein J-Segment bzw. für die schwere Kette ein V-, ein D- und ein J-Gensegment fusioniert die dann jeweils ein gemeinsames Exon bilden (V(D)J-Rekombination). Zwischen dem rearrangierten Exon der variablen Region und den Exons der konstanten Region liegt ein langer, nicht-codierender Bereich. In Abbildung 2 ist schematisch der humane Immunglobulin-Locus für die schwere Kette nach V(D)J-Rekombination abgebildet.

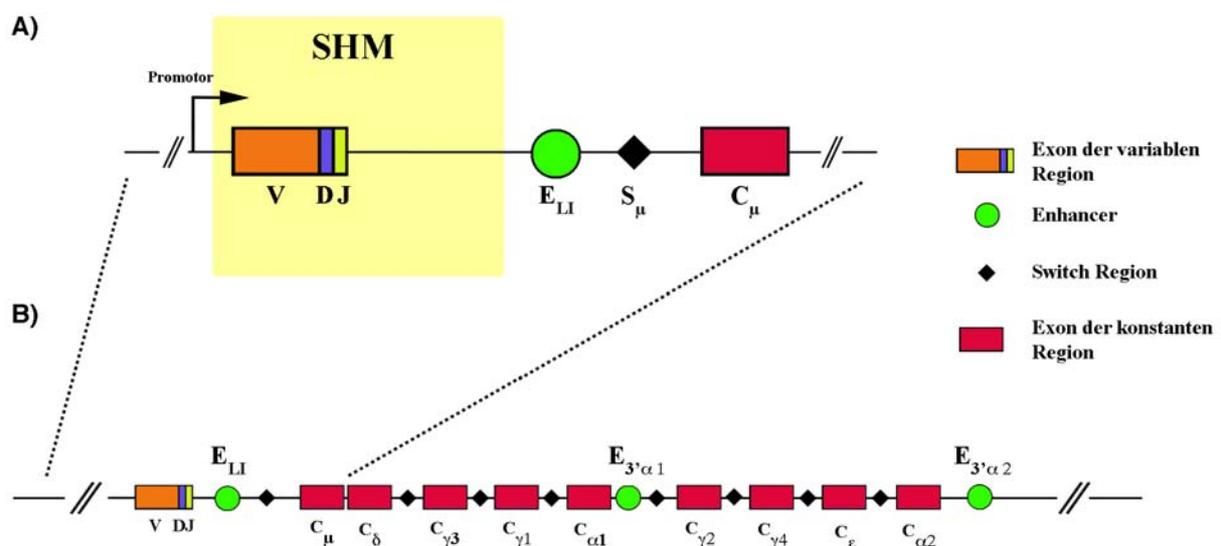


Abb. 2 Schematische Darstellung des humanen Genlocus für die schwere Kette (IgH) nach V(D)J-Rekombination. (A) Hypermutteriert wird nur ein kleiner Bereich (gelb schattiert), der innerhalb des variablen Gensegments beginnt und noch vor dem Intron-Enhancer (E_{LI}) endet. (B) Schematische Darstellung des gesamten IgH-Locus. Ig-Enhancer (grüne Kreise) gelten im Allgemeinen als essentiell für SHM, insbesondere der Intron-Enhancer (E_{LI}).

Somatische Hypermutation ereignet sich nur auf einem relativ distinkten Abschnitt der drei Immunglobulingene. Er beginnt ungefähr 150 bp unterhalb der Transkriptionsinitiationsstelle der variablen Region, erstreckt sich dann über die komplette kodierende Sequenz des rearrangierten V, (D) und J-Exons der variablen Region und darüber hinaus und endet relativ diffus ungefähr 1.5 - 2 kb unterhalb des Transkriptionsinitiationsstartes im nicht-kodierenden Bereich noch vor dem Intron-Enhancer und der konstanten Region (Lebecque & Gearhart, 1990; Rada et al., 1994; Rogerson, 1994; Rada & Milstein, 2001). Die Lage des mutierten Bereiches wird von der Position des Transkriptionsinitiationsstartes bestimmt. Wenn man den Promotor der variablen Region entfernt, dann lässt sich auch fast keine Hypermutation mehr beobachten (Fukita et al., 1998). Wird an anderer Stelle im Ig-Locus ein weiterer Ig-Promotor eingeführt, so entsteht dort ein entsprechender zweiter Hypermutationsbereich (Peters & Storb, 1996). Erstaunlicherweise kann der Ig-Promotor an sich aber gegen einen heterologen Promotor ausgetauscht werden (Betz et al., 1994). Somit ist es die Position des Promotors, die wichtig ist, und nicht dessen Sequenz. Werden artifizielle DNS-Sequenzen zwischen Transkriptionsstart und dem Exon der variablen Region integriert, so dehnt dies den Hypermutationsbereich nicht weiter in 3' Richtung aus (Yelamos et al., 1995). Daraus schlussfolgert man, dass die Sequenz des V(D)J-Exons ebenfalls nicht den Hypermutationsbereich definiert.

Die Stärke der Hypermutation (bzw. die Hypermutationsrate) hängt von der Transkriptionsrate des Locus ab (Goyenechea et al., 1997; Bachl et al., 2001). Ig-Enhancer werden deshalb als essentielle Elemente für Hypermutation angesehen. Unter anderem konnte über Deletionsexperimente gezeigt werden, dass der 3' kappa Enhancer ($3'E_{\text{kappa}}$) und der „kappa Intron-Enhancer“ (inkl. MAR; „Matrix Attachment Region“) essentiell für SHM auf der kappa leichten Kette sind (Betz et al., 1994; Goyenechea et al., 1997; Yi et al., 1999). Beim großen Intron-Enhancer der schweren Kette (E_{LI}) ist die Position und Orientierung ausschlaggebend (Bachl et al., 1998). Auf dem Lambda-Locus ist der Lambda₂₋₄-Enhancer ($3'E_{\text{Lambda}}$) an SHM beteiligt (Kong et al., 1998). Dieser konnte aber auf einem Lambda-Transgen gegen den Intron-Enhancer der schweren Kette ausgetauscht werden, ohne die SHM-Rate auf dem Transgen zu verändern (Klotz & Storb, 1996).

Trotzdem ist nicht jeder Ig-Enhancer in der Lage, SHM zu bewirken. Der $3'\alpha$ -Enhancer der schweren Kette ($E_{3'\alpha1}$ und $E_{3'\alpha2}$) kann z. B. nicht den $3'E_{\text{kappa}}$ -Enhancer funktionell ersetzen (Tumas-Brundage et al., 1997). Die Ig-Enhancer der schweren und leichten Kette weisen nur wenig Sequenzhomologie auf. Trotz zahlreicher Studien ist bis heute unklar, inwieweit und vor allem wie die Enhancer wirklich unmittelbar zur Definition des Hypermutationsbereiches

(Targeting) beitragen.

Die Mutationen selbst sind in der Regel einzelne Basenaustausche, nur gelegentlich kommen Insertionen und Deletionen vor (Wilson et al., 1998). Die Mutationen treten bevorzugt in den Sequenzen DGYW/WRCH (für GC-Mutationen; GC-Mutator; Rogozin & Diaz, 2004) und WA/TW (für AT-Mutationen, AT-Mutator) auf, so genannte Hotspot-Motive (Rogozin & Kolchanov, 1992; Milstein et al., 1998; Rogozin et al., 2001). Dabei steht **D** für ein Adenin, ein Guanin oder ein Thymin, **R** für ein Adenin oder ein Guanin, **Y** für ein Cytidin oder ein Thymin und **W** für ein Adenin oder ein Thymin an dieser Position. Transitionen sind häufiger als Transversionen (Golding et al., 1987). Allgemein wird angenommen, dass weitere Sequenzabschnitte oder Sekundärstrukturen der DNS Einfluss auf die Hypermutierbarkeit einer Sequenz haben, da nicht alle Hotspot-Motive hypermutiert werden. Außerdem erhöht z. B. die Anwesenheit von E-Box-Motiven (Bindungsmotive für Helix-Loop-Helix-Proteine wie E2A) auf einem Ig kappa Reporterkonstrukt die Hypermutationsfrequenz um 400% (Michael et al., 2003).

In vivo finden sich ungefähr gleich viele Mutationen an GC-Basenpaaren wie an AT-Basenpaaren. In Zelllinien, die von Keimzentrumszellen abgeleitet sind, findet man dagegen erstaunlicherweise vorwiegend GC-Mutationen. Dies führte zu der Hypothese, dass das Mutator-System aus zwei Teilen besteht, einem GC- und einem AT-Mutator (Bachl & Wabl, 1996b).

Brenner und Milstein versuchten schon vor einigen Jahrzehnten die Diversifizierung des Antikörperrepertoires mechanistisch zu erklären (Brenner & Milstein, 1966). Sie postulierten, dass zunächst ein unbekanntes Enzym die DNS an einem Strang schneidet, so dass ein freies 3'-Ende entsteht. Eine Exonuklease sollte dann einen Teil dieses Stranges degradieren, so dass der komplementäre Strang exponiert wird und ein kurzer Einzelstrangbereich vorliegt. Diese Lücke in der doppelsträngigen DNS müsste dann von Polymerasen, die bei der *de novo* DNS-Synthese fehleranfällig sind, geschlossen werden, wodurch Mutationen auf der DNS eingeführt werden. Die Existenz solcher fehleranfälligen Polymerasen, auch als Translasionssynthesepolymerasen bezeichnet, ist mittlerweile bewiesen. Unter anderem stehen die Polymerasen eta (Zeng et al., 2001; Martomo et al., 2005), iota (Faili et al., 2002a) und zeta (Diaz et al., 2003) im Verdacht, an Somatischer Hypermutation beteiligt zu sein.

2.3 AID, Hyper-IgM-Syndrom und aberrante Hypermutation

Nach dem Brenner und Milstein Modell (Brenner & Milstein, 1966) sind fehleranfällige Polymerasen die Ursache für Somatische Hypermutation. Diese benötigen allerdings eine initiale DNS-Läsion, um an den entsprechenden Locus rekrutiert zu werden. Lange Zeit hatte man keinerlei Vorstellung, wann und wie es zu dieser Läsion kommt und welches Protein dafür verantwortlich ist. Tatsuku Honjo und Kollegen fanden erst 30 Jahre nachdem Brenner und Milstein ihr Modell postuliert hatten den entscheidenden Hinweis. Sie konnten zeigen, dass das Protein „aktivierungsinduzierte (Cytidin-) Deaminase“ (AID) essentiell für SHM und CSR ist (Muramatsu et al., 2000). AID-Knockout-Mäuse können weder SHM noch CSR durchführen. Außerdem konnten Tatsuku Honjo und Kollegen zusammen mit der Gruppe um Anne Durandy zeigen, dass Mutationen in AID die Ursache für eine autosomal rezessive Form des Hyper-IgM-Syndroms (HIGM2) sind (Revy et al., 2000). Hyper-IgM-Syndrom bezeichnet eine Erkrankung, bei der Patienten erhöhte Serumspiegel an IgM-Antikörpern mit geringer Affinität, also ohne Mutationen, aufweisen. Die anderen Isotypen dagegen fehlen fast gänzlich, obwohl Keimzentren ausgebildet werden. Diese Patienten sind, ebenso wie die AID-Knockout-Mäuse, nicht mehr in der Lage SHM und CSR auszuführen.

AID ist ursprünglich mittels eines differentiellen RNS-Display entdeckt worden, bei dem von einer B-Zelllinie (CH12F3-2) die exprimierten mRNS vor und nach CSR-Induktion miteinander verglichen wurden (Muramatsu et al., 1999). Humanes AID besteht aus 198 Aminosäuren (AS) und hat ein Molekulargewicht von ca. 24 kDa. Es liegt vermutlich als Dimer oder Tetramer in der Zelle vor (Dickerson et al., 2003; Ta et al., 2003; Chaudhuri et al., 2004). Leider existiert bislang nur eine computerberechnete Struktur von AID (Xie et al., 2004). Ein Fusionsprotein von GFP („Green Fluorescent Protein“) und AID befindet sich ausschließlich im Zytoplasma (Rada et al., 2002a). Auf Ebene der Aminosäuresequenz ist AID zu 34% homolog mit APOBEC-1 (Apolipoprotein B mRNA editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid 1), einer Cytidin-Deaminase (Navaratnam et al., 1993). APOBEC-1 bildet die katalytische Untereinheit des apoB mRNA-Editing-Komplexes und desaminiert ein Cytidin der Apolipoprotein B mRNA zu Uridin, wodurch ein vorzeitiges Stopp-Kodon auf der mRNA eingeführt wird (Teng et al., 1993; Navaratnam et al., 1995). Da sich die Homologie vor allem auf die katalytische Domäne von APOBEC-1 bezieht (Muramatsu et al., 1999), lag die Vermutung nahe, dass es sich bei AID ebenfalls um eine Cytidin-Deaminase handelt. Die Suche nach dem Substrat für das Enzym AID spaltete in den folgenden Jahren das wissenschaftliche Feld und führte zur Postulierung von zwei gegensätzlichen Modellen.

T. Honjo, in dessen Labor AID ursprünglich entdeckt worden ist, geht davon aus, dass RNS das Substrat für AID ist (Muramatsu et al., 2000). Gemäß seinem Modell würde AID eine noch unbekannte mRNS editieren, die zu einer für CSR und SHM spezifischen Endonuklease translatiert wird. Für diese Hypothese spricht die Homologie von AID zum RNS-editierenden Enzym APOBEC-1 und die Notwendigkeit von *de novo* Proteinbiosynthese für SHM (Doi et al., 2003; Begum et al., 2004; Nagaoka et al., 2005).

Das alternative und allgemein eher akzeptierte Modell (Rada et al., 2004) geht davon aus, dass DNS das direkte Substrat von AID ist. Demzufolge wird im initialen Schritt der Somatischen Hypermutation ein Cytosin der DNS (z. B. im WRCH Hotspot-Motiv) von AID zu Uracil desaminiert. Ausgehend von diesem U:G Mismatch gibt es nun 4 mögliche Prozessierungen (siehe Abb.3):

- i) Es erfolgt keine Reparatur der DNS-Läsion, sondern DNS-Synthese für die Zellteilung; dies kann zu einer Mutation führen, da Uracil bei der Replikation auch mit Adenin paaren kann, was eine Transition von dU:dG nach dT:dA zur Konsequenz hat (Phase 1A).
- ii) Eine Prozessierung der initialen dU:dG-Läsion durch Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) produziert eine apyrimidinische Stelle, die in einer darauf folgenden Zellteilung (DNS-Synthese) zu Transitionen und Transversionen führen kann. Außerdem kann diese apyrimidinische Stelle Substrat für fehleranfällige Polymerasen sein (Phase 1B).
- iii) Durch eine Prozessierung/Erkennung der initialen dU:dG Läsion über Proteine des DNS-Mismatch-Reparatur-Weges (MSH2-MSH6, Exonuklease 1, Polymerase Eta) entstehen vor allem Mutationen an dA:dT Basenpaaren (Phase 2).
- iv) Reguläre Prozessierung von Uracil in der DNS über Basenexzisionsreparatur (UDG; AP-Endonuklease, etc.) führt zur Beseitigung der dU:dG Läsion ohne Veränderung der ursprünglichen Information.

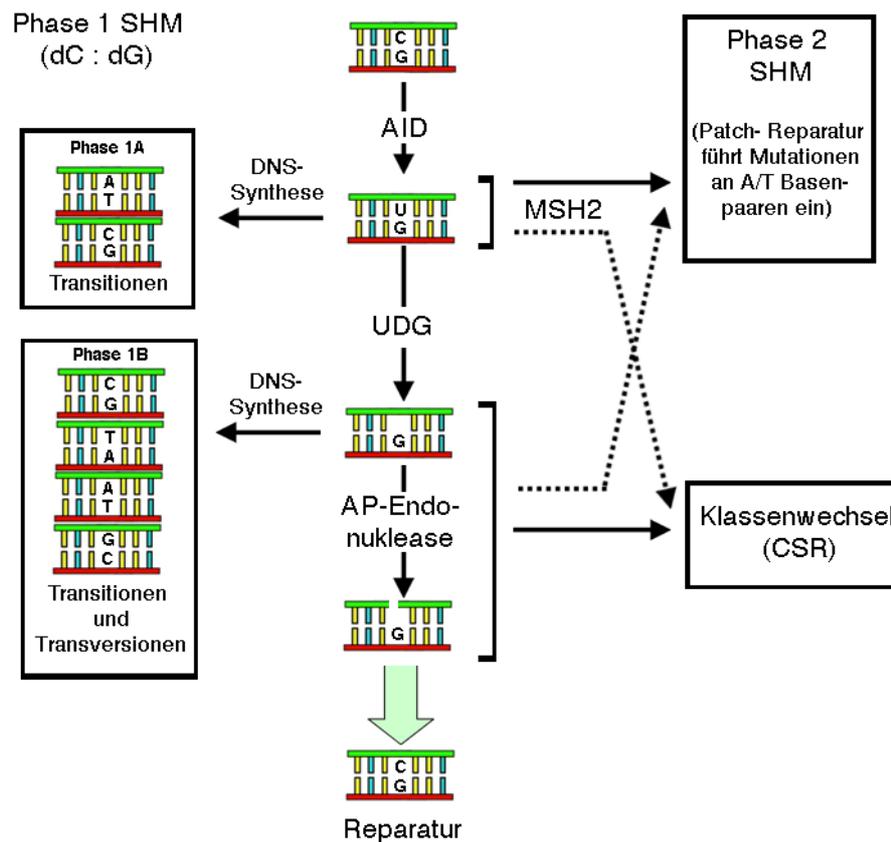


Abb. 3 Reparaturwege für AID-induzierte DNS-Desaminierung nach Rada et al. (2004). AID desaminiert Cytidine in dC:dG Basenpaaren. Das führt zu dU:dG DNS-Läsionen, die auf vier Arten prozessiert werden können: i) Es wird normal über die dU:dG Läsion hinweg repliziert, was zu Transitionen führen würde (Phase 1A); ii) Uracil-Exzision durch UDG führt zu einer apyrimidinischen Stelle, über die ebenfalls repliziert wird (Phase 1B), wodurch es zu Transitionen und Transversionen kommen kann; iii) die dU:dG DNS-Läsion wird von MSH2-MSH-6 erkannt und wird über „Patch-Reparatur“ (fehleranfällig) prozessiert, was zu A/T Mutationen führt (Phase 2); iv) reguläre Prozessierung der dU:dG DNS-Läsion über Basenexzisionsreparatur (UDG, AP-Endonuklease etc.) führt zum Erhalt der genetischen Information. Für Klassenwechsel erfolgt die Prozessierung der dU:dG Läsion hauptsächlich über UDGP. Mismatch-Reparatur und Basenexzisionsreparatur sind zum Teil redundant bzgl. ihrer Funktion für Klassenwechsel und Phase 2-Hypermuation (gestrichelte Pfeile).

Für dieses Modell spricht, dass AID *in vitro* DNS enzymatisch prozessieren kann (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003; Ramiro et al., 2003), nicht aber RNS. Dabei erwies sich der Hypermuationshotspot WRCH (Rogozin & Diaz, 2004) als das bevorzugte DNS-Substrat für AID (Pham et al., 2003). Auch das *in vitro* Mutationsspektrum von AID auf DNS entspricht dem Mutationsspektrum der hypermutierenden Zelllinie Ramos (Larijani et al., 2005). Des Weiteren führt UDG-Defizienz zu stark eingeschränkter CSR-Fähigkeit und zu einer Veränderung des Hypermuationsmusters (Rada et al., 2002b).

Die ektopische Expression von AID führte bislang in allen getesteten nicht-B-Zell-Systemen zur Induktion von Hypermutation (Martin & Scharff, 2002; Yoshikawa et al., 2002; Pham et al., 2003; Krause et al., 2005), u. a. auch in *E. coli* (Petersen-Mahrt et al., 2002). Weil die Konservierung eines potenziellen mRNS-Substrats über alle Gewebe und Spezies hinweg wenig plausibel erscheint, stärkt dieser Befund ebenfalls die DNS-Hypothese. Die bislang identifizierten Interaktionspartner (RNA Pol II, RPA, DNA-PK) weisen ebenfalls auf DNS als Substrat für AID hin (Nambu et al., 2003; Chaudhuri et al., 2004; Wu et al., 2005).

Bemerkenswert ist, dass AID *in vitro* spezifisch Einzel-, nicht aber Doppelstrang-DNS desaminiert (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003). Da Einzelstrang-DNS u. a. beim Transkriptionsvorgang entsteht, könnte dies die Erklärung für die Transkriptionsabhängigkeit von SHM sein.

Es gibt Hinweise darauf, dass AID ein Proto-Onkogen ist. Wang et al. konnten zeigen, dass AID im Prinzip Genom-weit wirken kann (Wang et al., 2004). In DLCL-Zellen („Diffuse Large-Cell Lymphoma“) werden z. B. häufig neben den Ig-Loci einige weitere Gene hypermutiert, darunter auch Proto-Onkogene wie PIM1 oder der Transkriptionsfaktor MYC (Pasqualucci et al., 2001). Ektopische, ubiquitäre Expression von AID in transgenen Mäusen führt u. a. zur Entstehung von T-Zell-Lymphomen (Okazaki et al., 2003). In diesen T-Zell-Lymphomen (mit überexprimiertem AID) wird ebenfalls der *pim1*-Locus und der *c-myc*-Locus hypermutiert (Kotani et al., 2005). Vermutlich handelt es sich dabei um deregulierte, aberrante Somatische Hypermutation (ASHM). Eine Deregulation von AID-Aktivität ist vermutlich auch für die klassische *c-myc*-Translokation in den Ig-Loci verantwortlich, die ein Charakteristikum von Burkitt-Lymphomen ist (Ramiro et al., 2004; Unniraman et al., 2004). Auch in anderen Lymphomtypen wurde AID-Expression und SHM nachgewiesen (Greeve et al., 2003; Smit et al., 2003; Babbage et al., 2004; Hardianti et al., 2004a; Hardianti et al., 2004b; Bodor et al., 2005; Greiner et al., 2005; Guikema et al., 2005; Hardianti et al., 2005). Nicht bewiesen ist jedoch bis dato, was AID in diesen Fällen zur Lymphomentstehung beiträgt. Es besteht aber trotzdem der berechtigte Verdacht, dass dereguliertes AID onkogen ist. Bislang ist noch völlig unklar, welcher physiologische Regulationsmechanismus AID-Aktivität normalerweise spezifisch auf die Ig-Loci beschränkt.

2.4 Hypermutation lässt sich mit einem GFP-Reporterkonstrukt messen

Bachl und Olsson haben vor einiger Zeit ein System entwickelt, mit dem man sowohl Mutationsfrequenzen eines einzelnen Transgens als auch indirekt dessen Expressionsrate bestimmen kann (Bachl & Olsson, 1999). Sie konnten zeigen, dass in der hypermutierenden Mauszelllinie 18-81 (und anderen) auch ein GFP-Transgen unter der Kontrolle der Immunglobulin-Enhancer Somatischer Hypermuation unterworfen ist. Dieses Phänomen ist Grundlage für den GFP-Reporter-Assay für Somatische Hypermuation (siehe Abb. 4). Dem System zugrunde liegt ein GFP-Transgen (der Reporter), in dessen kodierende Sequenz ein vorzeitiges TAG-Stopp-Kodon eingeführt worden ist. Das führt dazu, dass nach Transkription des GFP-Transgens nur eine verkürzte, funktionslose Form des GFP-Proteins entsteht. Zellen, die dieses verkürzte Protein exprimieren, haben keinerlei fluoreszierende Eigenschaft. Die Positionierung des Stopp-Kodons entspricht den Anforderungen an einen Hypermuations-hotspot: (i) das Stopp-Kodon ist Teil des Hypermuationshotspot-Motivs DGYW, (ii) das Stopp-Kodon liegt mit ca. 400 bp im optimalen Abstand zur Transkriptionsinitiationsstelle, (iii) das Transgen wird über einen ausreichend starken, konstitutiven Promotor transkribiert (Herpes Thymidinkinase Promotor, tk), und steht (iv) unter der Kontrolle des Intron-Enhancer der schweren Kette („Large Intron Enhancer“ der schweren Kette; E_{LI}). Wird nun eben dieses DGYW-Hotspotmotiv vom Hypermuationsmechanismus der Zelle erkannt, so kann es durch einen Basenaustausch im TAG-Kodon zum Verlust des Stopp-Kodons und zum Erwerb eines für eine Aminosäure kodierenden Kodons kommen (Reversion). Zellen mit einem revertierten GFP-Transgen, auch als Revertanten bezeichnet, beginnen funktionsfähiges GFP zu synthetisieren und erwerben somit die Fähigkeit zu fluoreszieren. Die fluoreszierenden Revertanten lassen sich mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie nachweisen (siehe Abb. 4).

Gleichzeitig kann näherungsweise das Expressionsniveau des GFP-Transgens bestimmt werden, weil die in der Durchflusszytometrie gemessene „relative Fluoreszenzintensität“ (RFI) des GFP-Proteins in der Regel direkt mit dem Transkriptionsniveau des GFP-Transgens korreliert (Bachl & Olsson, 1999). Damit kann schnell erkannt werden, ob eine niedrige oder hohe Mutationsrate in einer geringeren oder stärkeren Transkriptionsrate des Transgens begründet liegt.

Die Mutationsfrequenz ergibt sich nach durchflusszytometrischer Analyse aus der Anzahl an GFP-Revertanten pro Gesamtsumme an lebenden Zellen. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz für das GFP-Reporterkonstrukt liegt in der Zelllinie 18-81 bei ca. 10^{-4} bis

10^{-5} Mutationen pro Basenpaar und Generation, ähnlich also wie bei anderen artifiziellen Reporterkonstrukten für Hypermutation (z. B. μ -Ketten-Konstrukte; Green et al., 1995; Bachl & Wabl, 1996a).

Um die eigentliche Hypermutationsrate (Mutationen/Basenpaar/Generation: mut/bp/gen) zu bestimmen, muss die Mutationsfrequenz mit der Generationszeit korreliert werden. Ist diese nicht bekannt, wird sie zeitgleich mit der Reversionsanalyse in einer Expansionsanalyse ermittelt. Dazu werden die Zellen mit einem Farbstoff gefärbt, der mit jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Damit nimmt die Farbstoffintensität mit jeder Zellteilung pro Zelle um die Hälfte ab. Der Farbstoff ist wie GFP durchflusszytometrisch nachweisbar. In einer Expansionsanalyse wird ein mit dem GFP-Reporterkonstrukt transfizierter Klon für einige Tage expandiert und täglich die Reversionsfrequenz für 1×10^6 lebendige Zellen sowie die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen gemessen. Die Mutationsrate ergibt sich aus dem durchschnittlichen Zuwachs an Revertanten pro Zellteilung.

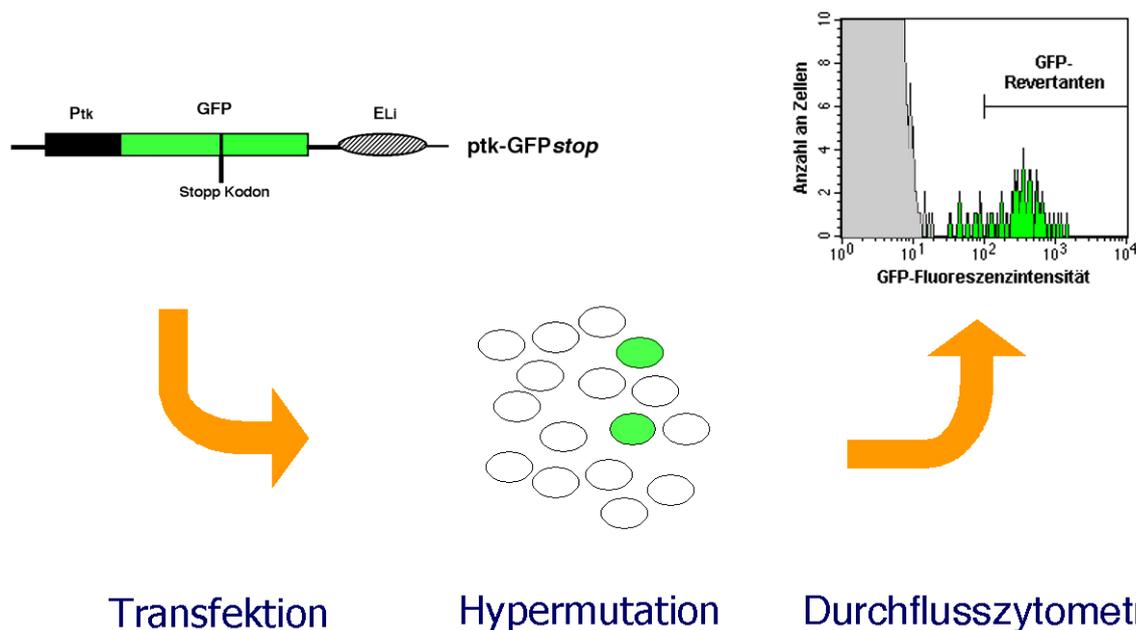


Abb. 4 Schematische Darstellung des Prinzips des GFP-Reversions-Assays nach Bachl & Olsson (1999). Zellen werden mit einem GFP-Reporterkonstrukt transfiziert, das ein GFP-Transgen mit vorzeitigem Stopp-Kodon enthält. Das Stopp-Kodon ist Teil eines Hypermutationshotspotmotivs (DGWY). Wird dieser Hotspot von der Hypermutationsmaschinerie einer hypermutierenden B-Zelle erkannt, so kann es zum Austausch des Stopp-Kodons gegen ein für eine Aminosäure kodierendes Kodon kommen (Reversion). Zellen mit einem derartigen Reversionsereignis beginnen funktionelles GFP zu synthetisieren, und lassen sich anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften in der Durchflusszytometrie nachweisen.

Dass es sich bei den Mutationen auf dem GFP-Konstrukt wirklich um die Folge von Hypermutation handelt, wird u. a. durch zwei Fakten erhärtet: (i) Sequenzierungen des GFP-Transgens von Revertanten ergab einen GC-lastigen Hypermutationsphänotyp, (ii) die Verwendung eines ähnlich starken Promotors, bei dem aber das Stopp-Kodon für das Mutator-System ungünstig weit weg von der Transkriptionsinitiationsstelle liegt (1,62 kbp), führt zum Ausbleiben von Mutationen (Bachl & Olsson, 1999). Es handelt sich also um ein sensitives und probates System, um Hypermutation nachzuweisen.

2.5 Grundlagen des Kerntransports

Eukaryoten haben im Gegensatz zu Prokaryoten einen Zellkern. Dieser ermöglicht ihnen u. a. eine weitere Ebene der Regulation zellulärer Prozesse, basierend auf der räumlichen und zeitlichen Trennung von Agens und Substrat. So können z. B. Transkripte im Kern alternativ gespleißt werden, bevor sie im Zytoplasma translatiert werden. Der Transkriptionsfaktor NFκB, der nach Aktivierung spezifisch vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert, ist ein weiteres Beispiel. Wesentliches Element solcher Regulationsmechanismen ist der kontrollierte Austausch von Molekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma. Da im Rahmen dieser Dissertation auch untersucht wurde, inwieweit AID-Aktivität über subzelluläre Lokalisation reguliert wird, sollen hier kurz die zentralen Merkmale von klassischen Kerntransportvorgängen dargelegt werden (Gorlich & Kutay, 1999). In Abbildung 5 sind die wichtigsten Elemente klassischer Kerntransportvorgänge illustriert.

Der Transport zwischen Nukleus und Zytoplasma erfolgt über Kernporenkomplexe („Nuclear Pore Complexes“, NPC), die über die Kernmembran verteilt sind. Ionen, kleine Metabolite und Proteine, die nicht größer als 40 kDa sind, können passiv durch schmale Kanäle (ca. 10 nm Durchmesser) in der unmittelbaren Umgebung der Kernporen frei diffundieren. Moleküle, die diese Größe überschreiten, können nur in einem aktiven Prozess durch die Kernpore geschleust werden. In höheren Eukaryoten ist die Kernpore ein großer Proteinkomplex aus über 30 verschiedenen Proteinen (Nukleoporinen) und einer Masse von ungefähr 125 MDa. Das Innere der Pore ist hochgradig symmetrisch und setzt sich aus einer ringförmigen Struktur zusammen, die den so genannten zentralen Transporter umgibt. Der Kanal hat einen Durchmesser von ca. 50 nm und eine Länge von ungefähr 120 nm. Von der Pore ausgehend ragen kurze, faserige Filamente in das Zytoplasma hinein, auf der Innenseite der Kernmembran

befinden sich dagegen korbähnliche Strukturen, die in das Nukleoplasma hineinreichen (Beck et al., 2004).

Der aktive Transport von Proteinen wird durch spezifische Signalsequenzen vermittelt. Dabei handelt es sich entweder um eine Nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die für den Kernimport notwendig ist, oder um eine Nukleäre Exportsequenz (NES), die für den Export aus dem Kern verantwortlich ist. Die klassische NLS zeichnet sich durch eine Ansammlung von basischen Aminosäuren aus, z. B. die NLS des „Simian Virus 40 Large T-Antigen“ (PKKKKRRK; Kalderon et al., 1984).

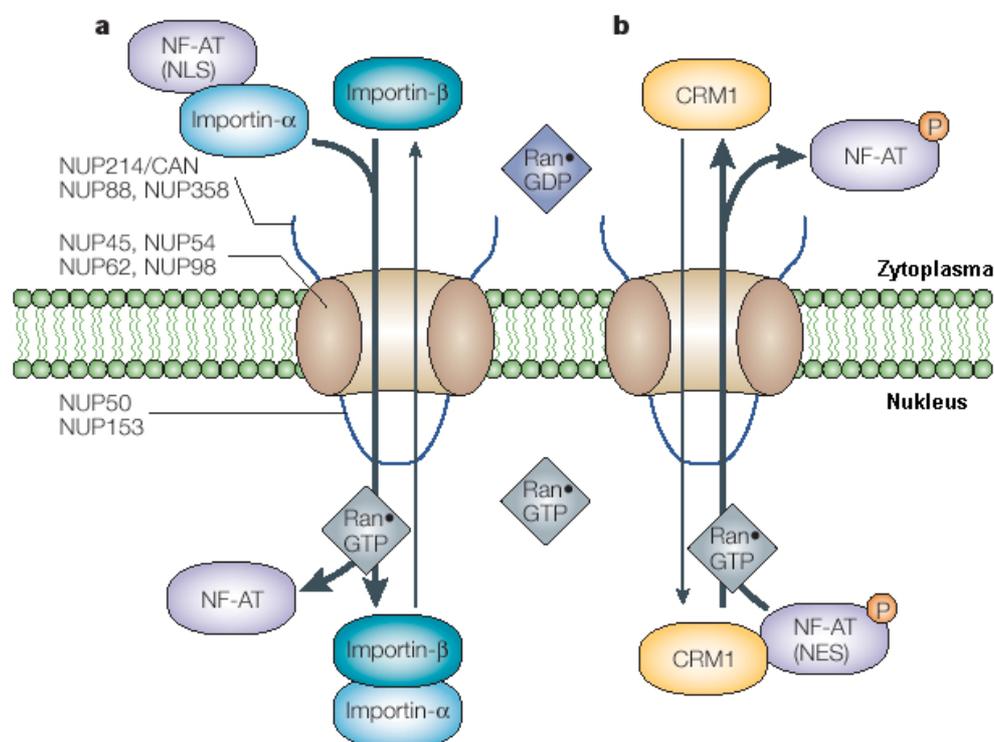


Abb. 5 Schematische Darstellung des klassischen NLS- und NES vermittelten Kerntransports über die Kernmembran hinweg (aus Xu & Massague, 2004; modifiziert). a) IMPORT: Importin β assoziiert mit Importin α . Importin α bindet an das klassische NLS-Motiv des Transportsubstrats, wie z. B. von NF-AT-Protein. Über die von Importin β vermittelte Wechselwirkung mit den Nucleoporinen (NUPs) wird der Komplex durch den Kernporenkomplex geschleust. Nach Bindung von RanGTP zerfällt der Transportkomplex im Nucleus. Das transportierte Substrat (NF-AT) verbleibt im Nucleus, Importin α und β werden zurück ins Zytoplasma transportiert. b) EXPORT: NF-AT-Protein trägt auch eine NES, die vom nukleären Export-Rezeptor CRM1 erkannt wird. CRM1 vermittelt den Kernexport durch direkte Interaktion mit den Nucleoporinen. RanGTP verstärkt die Bindung von CRM1 an NES-tragende Proteine und erleichtert so den Export. Im Zytoplasma wird die an sich geringe GTP-Hydrolyse-Aktivität von Ran stimuliert, so dass RanGDP entsteht. Dies führt wiederum zur Dissoziation des ternären Exportkomplexes aus Substrat, CRM1 und Ran.

Eine weitere Form der NLS, die zweiteilige NLS, besteht aus zwei basischen Abschnitten, die durch ca. 10 AS getrennt voneinander sind, wie z. B. beim Nukleoplasmin-Protein (Robbins et al., 1991). NES sind reich an hydrophoben Aminosäuren, vor allem an Leucinen, die für die Funktion unerlässlich sind. Die weithin akzeptierte Konsensussequenz $L-X_{2-3}-[LIVFM]-X_{2-3}-L-X-[LI]$ (Bogerd et al., 1996) hat sich experimentell als wenig zuverlässig erwiesen, da nur jedes dritte über eine NES exportierte Protein die Kriterien der Konsensussequenz erfüllt (la Cour et al., 2003).

Am NLS- bzw. NES-vermittelten Kerntransportvorgang sind viele Proteine beteiligt (für eine Übersicht siehe Gorlich & Kutay, 1999, und Fried & Kutay, 2003). Im klassischen Kerntransportmodell (siehe Abb. 5) bildet sich zunächst im Zytoplasma ein NLS-abhängiger Komplex, der „Nuclear Pore Targeting Complex“. Der Targeting-Komplex besteht aus zwei Komponenten, Importin α und Importin β . Importin α erkennt die basischen AS der NLS des Substrats und fungiert als Adaptermolekül zu Importin β . Dieses transportiert das von Importin α gebundene NLS-Substrat in den Kern, indem es mit den Nukleoporinen des NPC interagiert.

Proteine mit NES bilden im Nukleus einen ternären Komplex mit CRM1 (Chromosome Maintenance Region 1 = Exportin 1) und der GTP-Form von Ran (RanGTP) und werden durch Interaktion von CRM1 mit den Nukleoporinen des NPC in das Zytoplasma geschleust (Fornerod et al., 1997).

Der CRM1-vermittelte Export lässt sich spezifisch durch Leptomycin B (LMB) inhibieren (Nishi et al., 1994; Ossareh-Nazari et al., 1997). Leptomycin B ist ein Antibiotikum aus *Streptomyces spec.* (Hamamoto et al., 1983), das an einen Cystein-Rest von CRM1 bindet (Cys528 in humanem CRM1) und dadurch eine Bindung NES-tragender Proteine verhindert (Kudo et al., 1999).

Die Unidirektionalität des Transports wird über die kleine GTPase Ran reguliert. Die hydrolysierte Form RanGDP liegt im Zytoplasma vor, die RanGTP-Form im Zellkern. Dieser Gradient treibt den Transport an und gibt die Richtung vor. Im Kern fungiert das chromatingebundene RCC1 als GDP/GTP Austausch-Faktor („RanGDP/GTP Exchange Factor“, RanGEF), der RanGDP mit GTP belädt. Die Bindung der RanGTP-Form im Kern an Importin β bewirkt die Freisetzung des Importsubstrates. Auf der zytoplasmatischen Seite des NPC stimulieren RanGAP1, RanBP1 und RanBP2 die an sich nur geringe GTP-Hydrolyse-Aktivität von Ran, so dass RanGDP entsteht. Dies führt wiederum zur Dissoziation des ternären Exportkomplexes aus Substrat, CRM1 und Ran. RanGDP wird durch Interaktion mit NTF2 („Nuclear transport factor 2“), das die Dissoziation von GDP verhindert, wieder in den

Kern transportiert und so der Kreislauf geschlossen.

Die Importin α und β Familien (Karyopherine) sind große, speziesübergreifende Proteinfamilien, die nicht nur für den Transport von Proteinen sondern auch RNS verantwortlich sind. Die Substratspezifitäten der Karyopherine sind teils überlappend, teils distinkt.

Abweichend vom klassischen Kerntransportmodell deuten sich in letzter Zeit noch weitere mechanistische Möglichkeiten für den Transportvorgang an, für einen Überblick siehe Xu & Massague (2004).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID) ist essentiell für die Induktion Somatischer Hypermutation in Mensch und Maus. Zu Beginn dieser Arbeit war über den exakten Wirkungsmechanismus und die Regulation von AID-Aktivität nicht viel bekannt. Diese Dissertation sollte deshalb grundsätzlich zum Verständnis von AID-induzierter Somatischer Hypermutation beitragen, Hinweise auf etwaige Regulationsmechanismen geben und das onkogene Potenzial von AID evaluieren.

Dazu sollten geeignete Hypermutationsreportersysteme und AID-Expressionsvektoren verwendet oder hergestellt werden und Zelllinien auf Ihre Hypermutationsfähigkeit hin untersucht werden. Die Herstellung von AID-Proteinmutanten und deren Eigenschaften sollten Aufschluss über funktionelle Domänen von AID geben. Ein Schwerpunkt war dabei die Charakterisierung von Kerntransportsequenzen und deren Bedeutung für SHM. Zudem sollte ein System etabliert werden, mit dessen Hilfe potenzielle Interaktionspartner von AID in Zukunft identifiziert werden können.

In dieser Arbeit wurde dabei nachgewiesen, dass AID-induzierte SHM durch *cis*- und *trans*-Faktoren beeinflusst wird, und dass daher AID-Expression alleine nicht immer zur Induktion von SHM ausreicht. In Analogie dazu konnte gezeigt werden, dass AID in der Zelle Bestandteil großer Komplexe ist und dass eine Ebene der Regulation von AID-Aktivität vermutlich die Regulation seiner subzellulären Lokalisation umfasst.

3 Ergebnisse

3.1 Diskriminierung von *cis*- und *trans*-Einflüssen auf die Hypermutationsrate mit Hilfe eines dualen Reportersystems

3.1.1 In der Zelllinie 18-81 nimmt die Mutationsrate auf einem GFP-Reporter-Konstrukt mit der Zeit ab

Zhang et al. haben publiziert, dass die Mutationsrate in der konstitutiv hypermutierenden Zelllinie Ramos nicht konstant ist (Zhang et al., 2001). Subklone dieser Zelllinie weisen unterschiedliche Mutationsraten auf. Jürgen Bachl (GSF, München) hat in vorausgegangenen Experimenten beobachtet, dass die Mutationsrate in der Zelllinie 18-81 auch im Laufe längerer Zellkulturphasen scheinbar abnimmt (persönliche Mitteilung). Um diese Beobachtung detaillierter festzuhalten, wurde die Reversionsrate über einen Zeitraum von 7 Wochen für einen repräsentativen, mit dem Reporterkonstrukt pI-GFP_{stop} stabil transfizierten Klon beobachtet (siehe auch Bachl et al., 2001). Die Expression des GFP-Gens in pI-GFP_{stop} (Abb. 6) wird über einen Doxyzyklin (Dox)-induzierbaren tet-Promotor (Furth et al., 1994; Gossen et al., 1995) transkribiert. Das GFP-Gen selbst beinhaltet ein vorzeitiges Stopp-Kodon, wie schon in der Einleitung beschrieben worden ist.

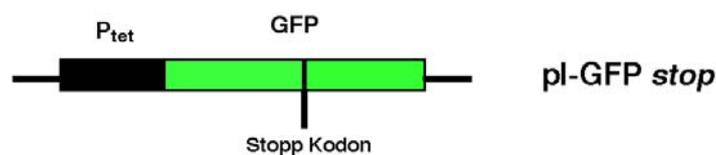


Abb. 6 Reporterkonstrukt pI-GFP_{stop} zur Messung von Hypermutationsaktivität. Das Konstrukt pI-GFP_{stop} kodiert für ein GFP, das ein vorzeitiges Stopp-Kodon trägt. Das rekombinante GFP-Gen wird über einen Doxyzyklin-induzierbaren Promotor transkribiert (P_{tet}).

Während des 7-wöchigen Beobachtungszeitraums wurde die pI-GFP_{stop}-Ausgangskultur in Doxyzyklin-freiem Medium gehalten, um Transkription und anschließende Hypermuation des GFP-Reporters zu vermeiden. Nach 1, 3 und 5 Wochen in Dox-freiem Medium wurde jeweils ein Aliquot Zellen der Ausgangskultur entnommen und zur Transkriptionsinduktion des Reportergens in Doxyzyklin-haltiges Medium überführt. Die induzierten Kulturen wurden dann für vier weitere Tage expandiert und täglich die Reversionsfrequenz an revertanten

Zellen bestimmt, indem 1×10^6 lebende Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Die Mutationsrate des pI-GFP_{stop} Klons fiel von anfänglich 6.1×10^{-5} mut/bp/gen in der ersten Woche auf 3.0×10^{-5} nach 3 Wochen und 1.2×10^{-5} nach 6 Wochen (Abb. 7). Folglich nahm die Mutierbarkeit des GFP-Transgens im Laufe des Beobachtungszeitraums stetig ab.

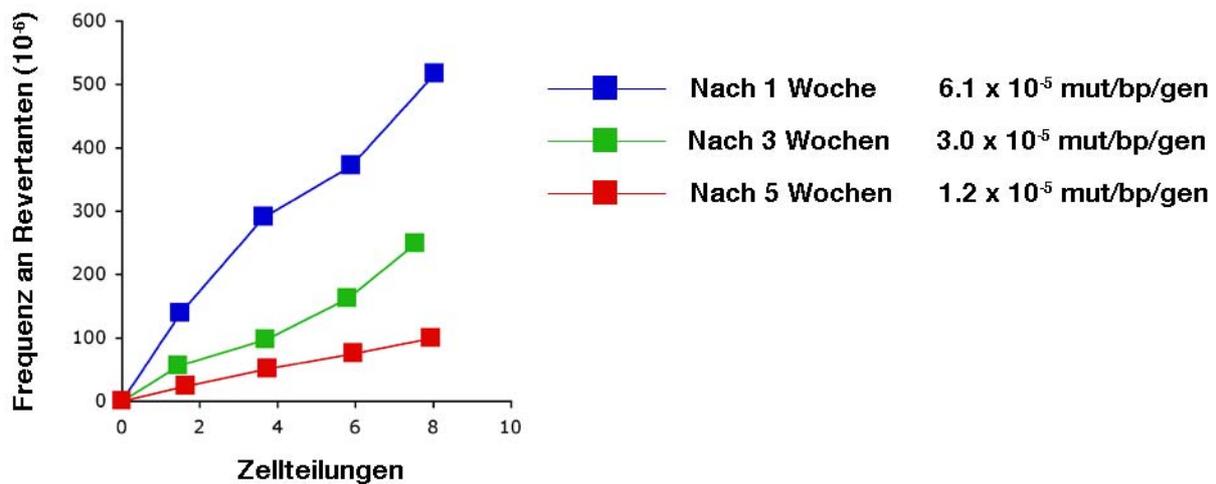


Abb. 7 Reversionsanalyse eines stabilen pI-GFP_{stop} Transfektionsklons der Zelllinie 18-81. Nach 1, 3 und 5 Wochen in Doxyzyklin-freiem Medium wurde jeweils ein Aliquot Zellen in Doxyzyklin-haltiges Medium überführt und für 4 weitere Tage expandiert. Während der Expansion wurde täglich die Anzahl an GFP-Revertanten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die ermittelten Daten sind als Funktion der Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen pro 10^6 lebende Zellen über der Anzahl an Zellteilungen aufgetragen. Die Tatsache, dass die Induktion mit Doxyzyklin nach 5 Wochen immer noch bei 0 Revertanten beginnt, verdeutlicht, dass ohne Induktion der Transkription keine SHM stattfinden kann, der Hintergrund also 0 bleibt. Die nicht-induzierte Ausgangskultur weist keinerlei GFP-Fluoreszenz auf (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Subklone der pI-GFP_{stop} Ausgangskultur variieren in ihren Mutationsraten

Um zu unterscheiden, ob nun alle Zellen der Ausgangskultur (ohne Dox) prinzipiell mit der Zeit zu einer schwächeren Mutationsaktivität tendieren, oder ob nur ein Teil der Zellpopulation die anfänglich hohe Mutationsaktivität verloren hat, wurden verschiedene Subklone mittels limitierender Verdünnung aus der seit 7 Wochen in Kultur befindlichen Ausgangskultur gewonnen. 5 Subklone wurden zufällig ausgewählt und ihre Mutationsrate bestimmt. Hierzu wurden sie in Dox-haltigem Medium expandiert und täglich ihre Reversionsrate auf dem GFP-Transgen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Mutationsraten der Subklone variierten deutlich (Abb. 8).

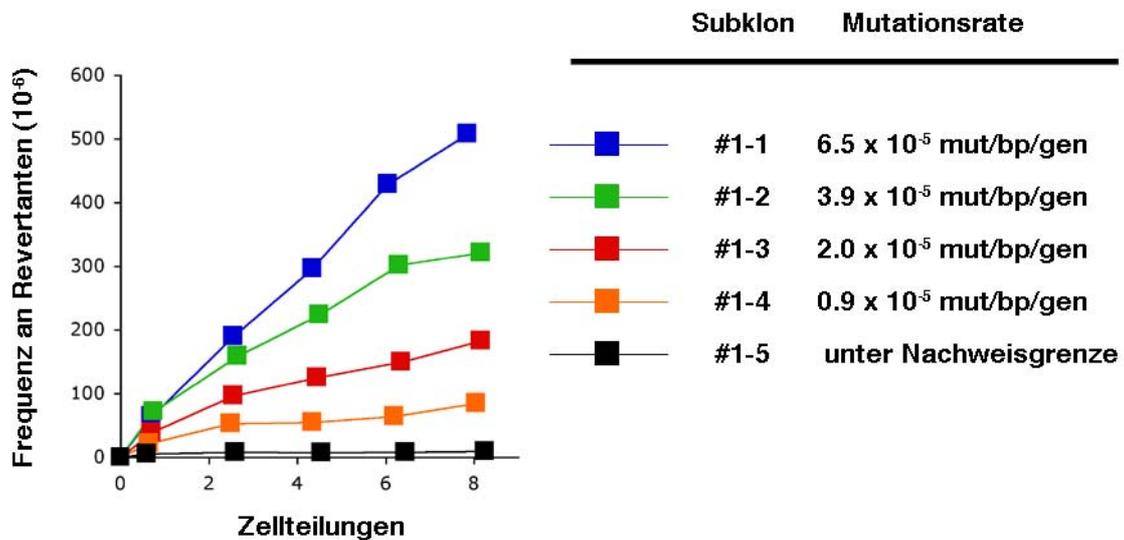


Abb. 8 Expansionsanalyse von jeweils fünf unabhängigen Subklonen, die aus der pI *GFPstop*-Ausgangskultur hervorgegangen sind. Während der Expansion wurde täglich die Anzahl an GFP-Revertanten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die ermittelten Daten sind als Funktion der Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen pro 10^6 lebende Zellen über der Anzahl an Zellteilungen aufgetragen.

Subklon #1-1 besaß die höchste Mutationsrate der fünf analysierten Subklone (6.5×10^{-5} mut/bp/gen) und Subklon #1-5 die niedrigste Mutationsrate (1.2×10^{-6} mut/bp/gen). Die Mutationsraten der anderen Subklone lagen zwischen den Raten dieser beiden Klone. Die Mutationsrate von Klon #1-1 war auf einem vergleichbaren Niveau wie die ursprüngliche Reversionsrate der Ausgangskultur. Die unterschiedlichen Mutationsraten der analysierten Subklone beweisen, dass die Zellen in der 7 Wochen alten pI-*GFPstop*-Ausgangskultur nicht mehr in gleichem Ausmaß das GFP-Transgen hypermutieren können und eine heterogene Zellpopulation darstellen. Das kann verschiedene Ursachen haben. Entweder sinkt mit der Zeit das Expressionsniveau der am Mutationsvorgang beteiligten Proteine in unterschiedlichem Ausmaß (*trans*-Effekt) oder das GFP-Transgen wird, trotz hoher Ig-Mutator-Aktivität, weniger zugänglich für das Mutator-System z. B. durch epigenetische Veränderungen (*cis*-Effekt). Eine weitere mögliche Erklärung für die Abnahme der Mutierbarkeit wäre, dass sich die Doxzyklin-abhängige Induktion des GFP-Transgens im Lauf der Zellkulturphase verschlechtert hat.

3.1.3 Mit einem zweiten Reporter-Transgen lassen sich *cis*- von *trans*-Effekten unterscheiden

Um die oben erwähnten verschiedenen Möglichkeiten zu überprüfen, wurde ein weiteres Reporterkonstrukt in die pI-GFP*stop*-Subklone #1-1 und #1-5 transfiziert. Die Überlegung dahinter war, dass wenn ein verringertes Expressionsniveau an *trans*-Hypermutionsfaktoren für die verringerte Mutationsrate in Subklon #1-5 verantwortlich ist, dann sollte auch ein zweites Reporter-Transgen nur schwach hypermutiert werden. Im Gegenzug müsste das zweite Reporter-Transgen in Subklon #1-1 stark hypermutiert werden. Sollte die verringerte Mutationsrate in Subklon #1-5 durch einen epigenetischen *cis*-Effekt verursacht werden, dann würde ein zweites, neues Reporterkonstrukt in beiden Subklonen, #1-1 und #1-5, gleich stark hypermutiert werden.

Als zweites Reporterkonstrukt wurde das Plasmid ptk-YFP*stop* generiert, in dem YFP („Yellow-Fluorescent Protein“) konstitutiv über den tk-Promotor transkribiert wird (Abb. 9). In Analogie zum GFP-Transgen beinhaltet das YFP-Transgen ebenfalls ein vorzeitiges Stopp-Kodon. Die DNS-Sequenz von GFP und YFP ist beinahe identisch (Baldwin et al., 1990; Prasher et al., 1992). Deshalb wurde das vorzeitige Stopp-Kodon im YFP-Gen an der gleichen Stelle wie im GFP-Reporter eingeführt. Revertierte Zellen, die entweder GFP oder YFP exprimieren, können aufgrund ihrer unterschiedlichen Lichtemissionseigenschaften mittels Durchflusszytometrie voneinander unterschieden werden.

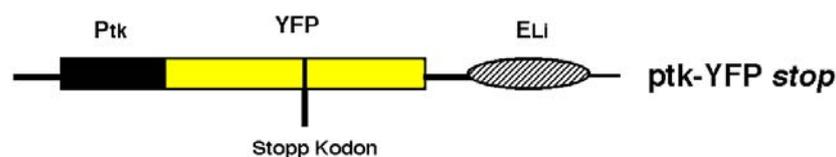


Abb. 9 Reporterkonstrukt ptk-YFP*stop* zur Messung von Hypermutionsaktivität. Das Konstrukt kodiert für YFP mit vorzeitigem Stopp-Kodon und wird über den Thymidinkinasepromotor (ptk) transkribiert. Der Intron-Enhancer der Ig-schweren Kette (E_{LI}) verstärkt die Transkription des YFP-Transgens.

Das ptk-YFP*stop*-Konstrukt wurde stabil in die pI-GFP*stop*-Subklone #1-1 und #1-5 transfiziert (s.o.) und für jeden dieser Subklone wurden wiederum unabhängige GFP/YFP-Klone etabliert. Die Integrationsstelle des Transgens in das Genom kann Einfluss auf die Mutierbarkeit des YFP-Transgens haben. Deshalb wurden für 24 verschiedene GFP/YFP-Klone, die aller Voraussicht nach das YFP-Transgen an unterschiedlichen Stellen ins Genom integriert haben, die Reversionsfrequenz nach 3-tägiger Kultur in Dox-haltigem Medium bestimmt. Das GFP-Transgen ist in allen GFP/YFP-Transfektionsklonen an der (oder den)

gleichen genomischen Integrationsstelle(n), da alle diese Zellen vom Ausgangsklon pI-GFP_{stop} abstammen.

Die Frequenz an YFP- und GFP-Revertanten war eindeutig höher in denjenigen Klonen, die von Subklon #1-1 abstammten, als im Vergleich zu denen, die von Subklon #1-5 abstammten (Abb. 10). 79% (19 aus 24) der von Subklon #1-1 abgeleiteten GFP/YFP-Klone hatten Zellen mit revertiertem YFP (mit einer durchschnittlichen Reversionsfrequenz von 16.9 YFP-Revertanten pro 10^5 Zellen) und 96% der Zellen hatten GFP revertiert (durchschnittliche Frequenz: 10.5 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen). Von den von Subklon #1-5 abgeleiteten GFP/YFP-Klonen enthielten im Gegensatz dazu nur 33% (8 aus 24) der Zellen revertiertes YFP (durchschnittliche Frequenz: 1.4 YFP-Revertanten pro 10^5 Zellen) und nur 29% (7 aus 24) GFP-Revertanten (0.4 pro 10^5 Zellen). Das heißt, dass in von Subklon #1-5 abgeleiteten GFP/YFP-Klonen die Mutationsrate für beide Transgene (GFP und YFP) erheblich reduziert war. Dieses Ergebnis legt nach der anfänglich aufgestellten Hypothese eine verminderte Aktivität oder ein vermindertes Expressionsniveau eines Ig-Mutator-spezifischen *trans*-Faktors nahe.

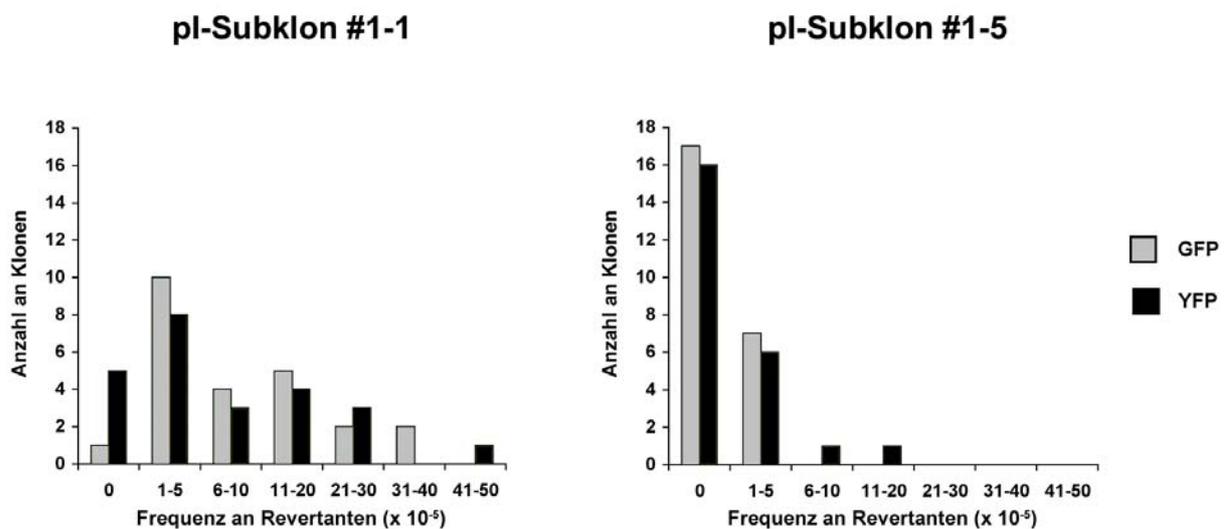


Abb. 10 Verteilung der Frequenzen an GFP- und YFP-Revertanten für je 24 unabhängige GFP/YFP-Transfektionsklone, die aus den Subklonen #1-1 und #1-5 nach stabiler Transfektion mit ptk-YFP_{stop} hervorgegangen sind. Die Frequenz an Revertanten pro 10^5 lebende Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Doxyzyklin wurde 3 Tage vor der Durchflusszytometrie dem Kulturmedium der GFP/YFP-Transfektionsklone zugesetzt. Die Skalierung der X-Achse ist wie folgt zu lesen: 0 Revertanten pro 10^5 Zellen, 1-5 Revertanten pro 10^5 Zellen, 6-10 Revertanten pro 10^5 Zellen, 11-20 Revertanten pro 10^5 Zellen, 21-30 Revertanten pro 10^5 Zellen, 31-40 Revertanten pro 10^5 Zellen, 41-50 Revertanten pro 10^5 Zellen; Y-Achse: Anzahl an unabhängigen Transfektionsklonen (von 24).

3.1.4 Die AID mRNS-Mengen variieren in den pI-GFP $stop$ -Subklonen und korrelieren mit den jeweiligen Mutationsraten

Die Variabilität der Mutationsraten in Subklonen der Zelllinie Ramos geht laut Zhang et al. mit dem Expressionsniveau des endogenen AID einher (Zhang et al., 2001). Dito könnte das AID-Expressionsniveau auch in den analysierten pI-GFP $stop$ -Subklonen der Zelllinie 18-81 variieren. In Zusammenarbeit mit R. Mailhammer (GSF, München) wurde mittels quantitativer Real-time PCR der AID mRNS-Spiegel für die fünf Subklone #1-1 bis #1-5 bestimmt. Die AID mRNS-Mengen unterschieden sich innerhalb der pI-GFP $stop$ -Subklone um bis zu 400% (Abb. 11). Subklon #1-1 hatte die höchste Mutationsrate und das höchste AID mRNS-Niveau, wohingegen Subklon #1-5 mit dem niedrigsten AID mRNS-Niveau auch die geringste Mutationsrate hatte. Der AID mRNS-Spiegel der anderen 3 Subklone (#1-2, #1-3, #1-4) lag zwischen den beiden Extremen und korrelierte ebenfalls mit den auf dem GFP-Transgen gemessenen Mutationsraten. Das bedeutet, dass das endogene AID-Expressionsniveau in der Zelllinie 18-81 nicht stabil ist und dass die gemessenen Mutationsraten auf dem GFP-Reportertransgen mit dem endogenen AID mRNS-Spiegel korrelieren.

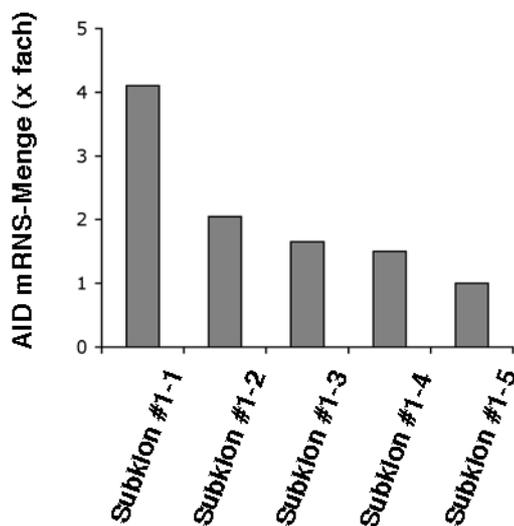


Abb. 11 Bestimmung der AID mRNS-Mengen für die fünf pI-GFP $stop$ -Subklone mittels quantitativer Real-time PCR. Die AID mRNS-Mengen wurden normalisiert auf die Aldolase mRNS-Mengen, wobei das mRNS-Niveau von Subklon #1-5 als Bezugswert für die anderen Subklone (auf 1) gesetzt wurde.

3.1.5 Die Überexpression von humanem AID rekonstituiert den Mutationsphänotyp in Subklon #1-5

Um herauszufinden, ob das reduzierte AID-Expressionsniveau in Subklon #1-5 der einzige Grund für die verminderte Mutationsrate ist, wurde rekombinantes AID in diesem Klon über-

exprimiert. Dazu wurde humanes AID-Protein (hnAID) benutzt, um zeitgleich festzustellen, ob es das AID-Protein der Maus ersetzen kann.

Der entsprechende Expressionsvektor pAID-ngfr ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Vektor wurde co-transfiziert mit dem bereits erwähnten Konstrukt *ptk-YFP_{stop}*, das eine Puromycin-Resistenzkassette als selektionierbaren Transfektionsmarker enthält. Da es zu diesem Zeitpunkt noch keinen verlässlichen anti-AID-Antikörper gab, wurde das rekombinante hnAID-Protein N-terminal mit einem Hämagglutinin-Epitop (HA) fusioniert. Dadurch lässt sich dieses HAhnAID-Fusionsprotein in einer Western-Blot-Analyse mit einem kommerziell erhältlichen anti-HA-Antikörper nachweisen. Das Konstrukt pAID-ngfr besteht aus einer bicistronischen Expressionskassette, die neben der kodierenden Sequenz für HA-markiertes rekombinantes humanes AID die kodierende Sequenz für die extrazelluläre Domäne des Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (NGFR) enthält. Da die zytoplasmatische Signaldomäne des NGFR fehlt, kann dieses NGFR-Protein keine intrazellulären Signalkaskaden auslösen. Die beiden Gene sind über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) verbunden und werden konstitutiv vom *bos*-Promotor (Elongationsfaktor 1a) transkribiert (Mizushima & Nagata, 1990).



Abb. 12 Der Vektor pAID-ngfr dient der Expression von humanem AID. Die Transkription der bicistronischen Expressionskassette erfolgt über den *bos*-Promotor (P_{bos}). Das Transkript kodiert für Hämagglutininepitop-markiertes AID und für eine verkürzte Form des Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (NGFR). Die kodierenden Bereiche von AID und NGFR sind durch eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) getrennt.

Die Expression des verkürzten NGFR-Proteins an der Zelloberfläche dient als Indikator für eine erfolgreiche Transfektion. Mittels einer anti-NGFR-Immunfluoreszenzfärbung kann schnell nach hnAID-überexprimierenden Klonen (Abb. 13A) gesucht werden. Der direkte Nachweis von HAhnAID-Protein innerhalb dieser NGFR-positiven Klone wurde via Western-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 13B). Die Mutationsraten des induzierbaren GFP- und die des konstitutiv getriebenen YFP-Transgens wurden erneut via Expansionsanalyse für vier unabhängige NGFR-positive GFP/YFP-Subklone (A bis D) durchgeführt (Abb. 13C). Die Reversionsrate lag bei 7.2×10^{-5} mut/bp/gen in Transfektionsklon #1-5-A, bei 3.1×10^{-5} , 10.2×10^{-5} und 12.4×10^{-5} mut/bp/gen für die Transfektionsklone #1-5 B bis D. NGFR-negative GFP/YFP-Klone ohne transgene AID-Expression hypermutierten weder das GFP- noch das

YFP-Transgen (Daten nicht gezeigt). Wie bereits für den endogenen AID mRNS-Spiegel beobachtet, ergab sich eine generelle Korrelation zwischen der Menge an transgenem hnAID und der Mutationsrate auf dem GFP-Transgen. Daraus ergibt sich, dass humanes AID das AID aus der Maus ersetzen kann, und dass AID die einzig notwendige Komponente ist, um den Mutationsphänotyp in Subklon #1-5 zu rekonstituieren.

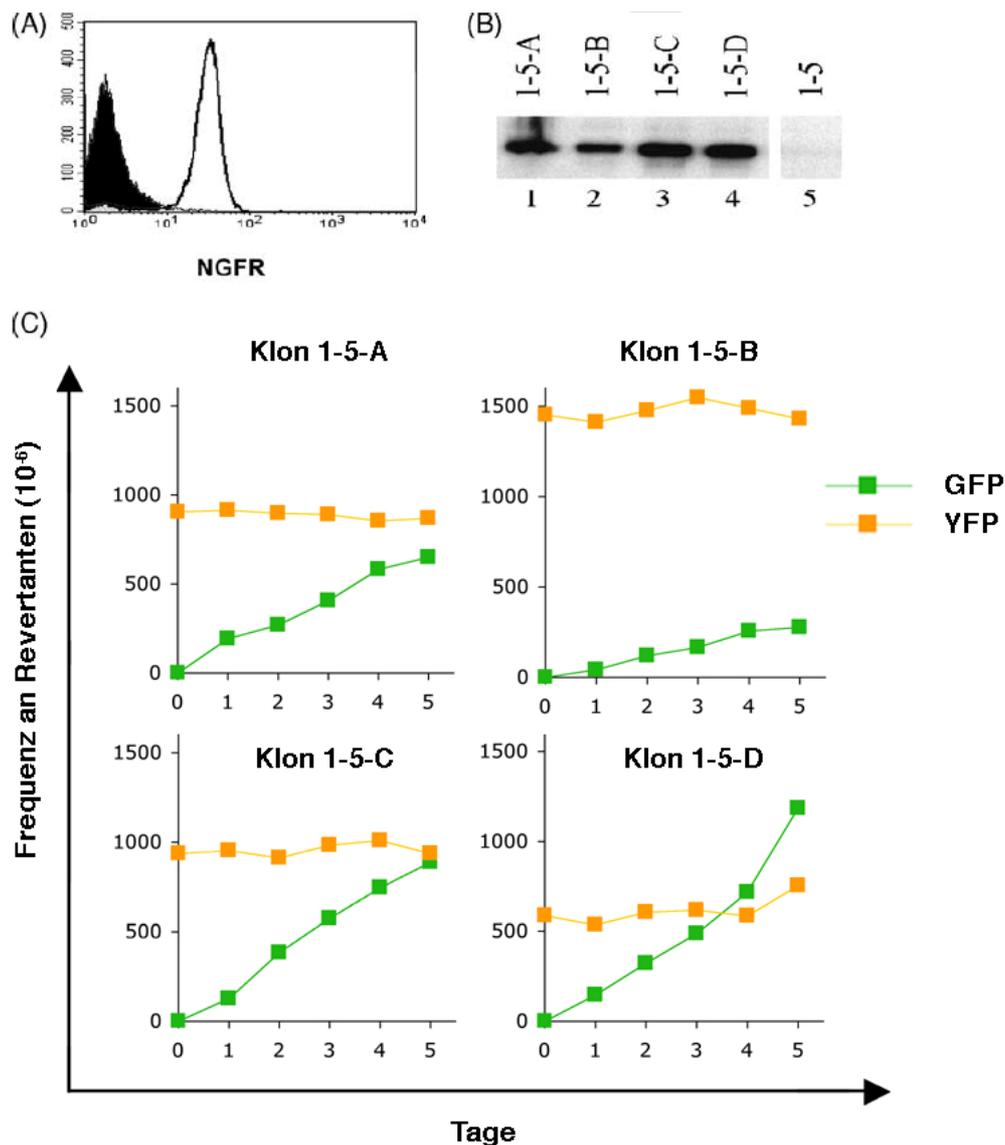


Abb. 13 Rekombinantes humanes AID rekonstituiert die Mutationsaktivität in GFP/YFP-Transfektionsklonen. (A) Durchflusszytometrische Analyse eines NGFR-negativen (schwarz) und eines NGFR-positiven (weiß) Transfektionsklons nach Immunfluoreszenzfärbung der extrazellulären NGFR-Domäne. (B) Anti-HA Western-Blot-Analyse für vier NGFR-positive GFP/YFP-Transfektionsklone und den Ausgangssubklon #1-5. (C) Expansionsanalyse für vier NGFR-positive GFP/YFP-Transfektionsklone in der Anwesenheit von Doxyzyklin über einen Zeitraum von 5 Tagen. Die mittels durchflusszytometrischer Analyse gewonnenen Daten sind dargestellt als Funktion von GFP- (grüne Linie) bzw. YFP-Revertanten (gelbe Linie) pro 10^6 lebende Zellen über der Anzahl an Tagen.

3.1.6 Die Frequenz an YFP-Revertanten bleibt konstant

Die hnAID-überexprimierenden Klone #1-5-A bis D beinhalten schon zu Beginn der Expansionsanalyse eine substantielle Anzahl an YFP-Revertanten. Offensichtlich wurde das YFP-Transgen schon vor der Expansionsanalyse während der Selektionsphase durch das AID-induzierte Mutator-System erkannt und mutiert. Das führte zu YFP-Reversionsfrequenzen zwischen 0.5×10^{-3} und 1.5×10^{-3} in diesen Kulturen. Dieses ist an sich nicht überraschend, weil das ptk-YFP_{stop}-Transgen konstitutiv transkribiert wird und daher im Prinzip dauerhaftes Ziel für das AID-induzierte Mutator-System ist. Während der eigentlichen Expansionsanalyse dagegen änderte sich die YFP-Reversionsfrequenz in den GFP/YFP-Klonen #1-5-A bis D während des Beobachtungszeitraums von 4 Tagen nicht mehr wesentlich (Abb. 13C). Das Fehlen messbarer konstanter Hypermutation des YFP-Transgens kann nicht auf das Versagen des Mutator-Systems an sich zurückzuführen sein, weil im selben Klon das pI-GFP_{stop}-Transgen konstant hypermutiert wird. Folglich müssen spezifische *cis*-Effekte auf dem YFP-Transgen für das abweichende Verhalten der zwei Reportertransgene verantwortlich sein. Die wahrscheinlichste Erklärung für die gleich bleibende Frequenz an YFP-Revertanten während der Expansionsanalyse ist das Erreichen einer Balance in diesen Zellen zwischen Reversionsmutationen, die zu funktionellem YFP-Protein führen und spezifischen Vorwärtsmutationen, die die YFP-Funktion zerstören. Es bleibt festzuhalten, dass die Verwendung von zwei unterschiedlichen Reporterkonstrukten (GFP/YFP) in einem dualen Reporterassay für Hypermutation eine klare Diskriminierung von *cis*- und *trans*-Effekten ermöglicht.

3.2 Wildtyp AID kann keinen Hypermutationsphänotyp in der humanen prä-B-Zelllinie Nalm-6 induzieren

3.2.1 Das GFP-Reporter-Transgen wird in der Zelllinie Nalm-6 nicht hypermutiert und nur sehr schwach in BL70

Wie oben bereits gezeigt, kann exogenes AID Hypermutation induzieren. Um zu überprüfen, ob dies grundsätzlich der Fall ist, wurden zwei humane B-Zelllinien, Nalm-6 und BL70, auf den Effekt von AID-Überexpression hin analysiert. BL70 ist eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie, (also aus dem Keimzentrum hervorgegangen), die durch eine *c-myc*-Translokation in den Ig-

Locus transformiert wurde (Cohen et al., 1987). Nalm-6 ist ein humanes prä-B Zell-Lymphom vom Typ der „Akuten lymphoblastischen Leukämie“ (Hurwitz et al., 1979). In einer Northern-Blot-Analyse zeigen Nalm-6 Zellen keinerlei endogene AID-Transkripte und BL70 Zellen nur sehr geringe Mengen an endogener AID mRNS (Abb. 14A).

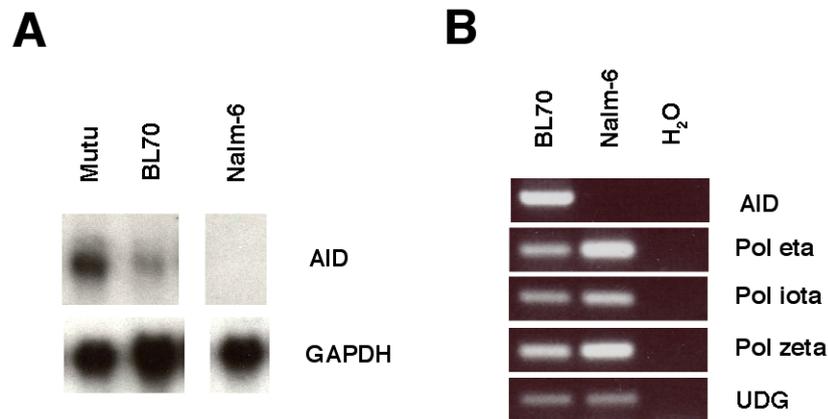


Abb. 14 Endogenes AID wird in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien Mutu III und BL70 und der prä-B Zelllinie Nalm-6 nicht gleichmäßig exprimiert. (A) Gesamt-RNS wurde aus den Burkitt-Lymphom-Zelllinien Mutu III und BL70 sowie aus der prä-B-Zelllinie Nalm-6 gewonnen und in einer Northern-Blot-Analyse auf AID mRNS-Mengen überprüft. Die GAPDH mRNS-Mengen wurden als Ladekontrolle verwendet. Die Membran wurde sequentiell mit Sonden für AID und GAPDH hybridisiert. (B) Das Expressionsprofil verschiedener, potenziell am Hypermutationsmechanismus beteiligter *trans*-Faktoren wurde über RT-PCR für Nalm-6 und BL70 Zellen bestimmt. Wasser diente als Negativkontrolle.

Die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Mutu III, die konstitutiv somatisch hypermutiert (persönliche Mitteilung von J. Bachl) wurde als Positivkontrolle für AID-Transkription verwendet. Zusätzlich wurde Rreverse Transkription-PCR (RT-PCR) für Nalm-6 und BL70 Zellen durchgeführt, um die Expression anderer *trans*-Hypermutationsfaktoren zu kontrollieren. Der Uracil-DNS-Glycosylase (UDG) und den fehleranfälligen DNS Polymerasen eta, iota und zeta wird eine Beteiligung am Hypermutationsmechanismus nachgesagt (Diaz et al., 1999; Zeng et al., 2001; Faili et al., 2002a; Rada et al., 2002b). In den beiden Zelllinien lassen sich aber außer der abweichenden AID-Expression keine augenfälligen Expressionsunterschiede für diese *trans*-Faktoren finden (Abb. 14B). Um die Hypermutationsfähigkeit dieser Zellen zu analysieren, wurde das Reporterkonstrukt ptk-GFP_{stop} (Abb. 15) benutzt.

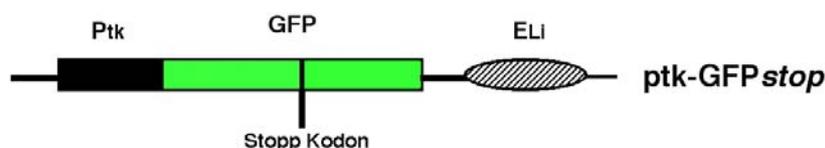


Abb. 15 Das Reporterkonstrukt *ptk-GFPstop* kodiert für GFP mit vorzeitigem Stopp-Kodon und wird über den Thymidinkinasepromotor (*ptk*) transkribiert. Der Intron-Enhancer der Ig-schweren Kette (E_{LI}) verstärkt die Transkription des GFP-Transgens.

Mit diesem Plasmid wurden für beide Zelllinien (Nalm-6 und BL70) 24 unabhängige, stabil transfizierte Klone hergestellt und mittels Durchflusszytometrie die Revertantenfrequenz pro 10^5 lebende Zellen analysiert (Abb. 16).

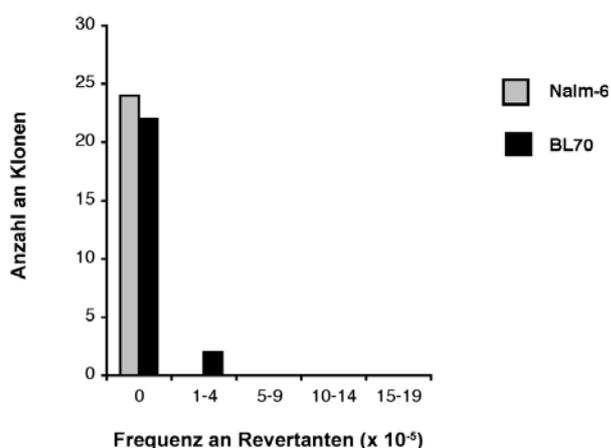


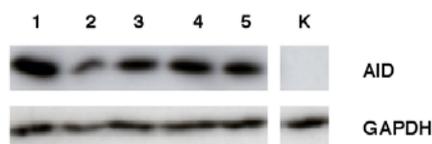
Abb. 16 Verteilung der Reversionsfrequenzen für Nalm-6 und BL70 Zellen, die stabil mit dem Reporterkonstrukt *ptk-GFPstop* transfiziert worden sind. Die Revertantenfrequenz pro 10^5 lebende Zellen wurde durch durchflusszytometrische Analyse von jeweils 24 unabhängigen Transfektionsklonen für Nalm-6 und BL70 bestimmt. Die Skalierung der X-Achse ist wie folgt zu lesen: 0 Revertanten pro 10^5 Zellen, 1-4 Revertanten pro 10^5 Zellen, 5-9 Revertanten pro 10^5 Zellen, 10-14 Revertanten pro 10^5 Zellen, 15-19 Revertanten pro 10^5 Zellen; Y-Achse: Anzahl an unabhängigen Transfektionsklonen (von 24).

Keiner der 24 Nalm-6 Klone zeigte GFP-exprimierende Revertanten und nur eine kleine Menge (2 von 24) der BL70 Transfektionsklone beinhalteten GFP-Revertanten in zudem geringer Anzahl (2 bzw. 3). Diese seltenen Revertanten in BL70 Transfektionsklonen rühren vermutlich von den geringen Mengen an endogenem AID her (Abb. 14B). Alternativ könnte auch die spontane Mutationsrate in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL70 grundsätzlich AID-unabhängig erhöht sein. Nichtsdestotrotz zeigt keine der beiden Zelllinien einen echten Hypermutationsphänotyp.

3.2.2 Ektopische AID-Expression induziert Hypermutation in BL70, nicht aber in Nalm-6 Zellen

Um zu untersuchen, ob die Expression von exogenem AID Somatische Hypermutation in den Zelllinien Nalm-6 und BL70 induzieren kann, wurden die Plasmide *ptk-GFP_{stop}* und *pAID-ngfr* stabil in diese Zelllinien co-transfiziert. Co-Transfektion hat zwei Vorteile: (i) man kann stabil transfizierte Klone mit verschiedenen AID-Expressionsniveaus erhalten, und (ii) genomische Integrationseffekte, die im Prinzip die Zugänglichkeit des GFP-Reporters beeinflussen, werden in der Reversionsanalyse minimiert, weil das Reporter-Transgen in den einzelnen unabhängigen Klonen an verschiedenen Stellen ins Genom integriert.

Nalm-6



BL70

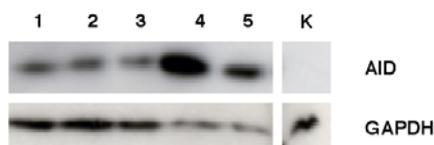


Abb. 17 Anti-HA Western-Blot-Analyse für jeweils 5 unabhängige Nalm-6 und BL70 GFP/AID-Transfektionsklone. Zum quantitativen Vergleich der Ergebnisse wurde GAPDH-Protein als Ladekontrolle verwendet. K: Untransfizierte Zellen (Kontrolle).

Die Suche nach AID-exprimierenden Transfektionsklonen wurde erneut mit Hilfe von anti-NGFR (extrazellulären) und mit anti-HA (intrazellulären) Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Ich erhielt 8 unabhängige Nalm-6 Klone und 8 unabhängige BL70 Klone mit variierenden AID-Proteinmengen. Die AID-Proteinmengen der Nalm-6 und BL70 Transfektionsklone wurden mittels Western-Blot-Analyse über das HA-Epitop bestimmt (Abb. 17). Keiner (0 von 8) der AID-exprimierenden Nalm-6 Transfektionsklone beinhaltete GFP-exprimierende Revertanten (Abb. 18), und zwar völlig unabhängig von den jeweils exprimierten AID-Proteinmengen. Im Gegensatz dazu erhöhte AID-Überexpression in BL70 Zellen deutlich die Mutationsfrequenz. 100% (8 von 8) der AID-exprimierenden Transfektionsklone beinhalteten GFP-exprimierende Zellen (Abb. 18), im Vergleich zu nur 8% (2 von 24) in Abwesenheit von exogener AID-Expression (Abb. 16). In beiden Zelllinien schwankte innerhalb der analysierten Transfektionsklone die Menge an HA-markiertem AID. In Nalm-6 Zellen zeigten jedoch nicht einmal GFP/AID-Transfektionsklone mit hohem AID-Spiegel einen Mutationsphänotyp. Das zeigt, dass die Überexpression von AID in der

Zelllinie Nalm-6 keine Hypermutation auf dem GFP-Transgen induzieren kann, ganz im Gegensatz zu AID-Überexpression in der BL70 Zelllinie.

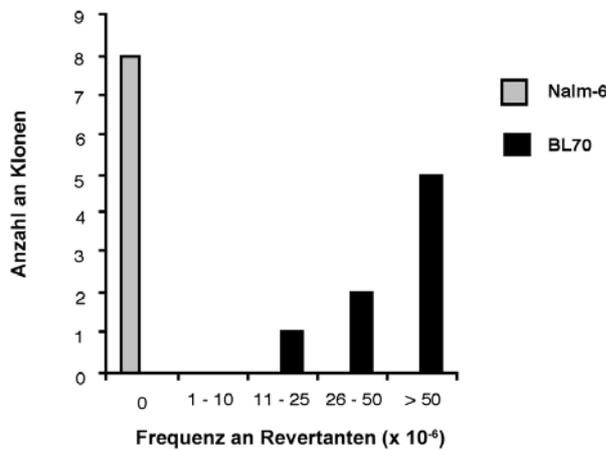


Abb. 18 Verteilung der Reversionsfrequenzen für Nalm-6 und BL70 Zellen, die stabil mit den Vektoren *ptk-GFPstop* und *pAID-ngfr* transfiziert worden sind. Die Revertantenfrequenz pro 10^6 lebende Zellen wurde über durchflusszytometrische Analyse von jeweils 8 unabhängigen Transfektionsklonen für Nalm-6 und BL70 bestimmt. Die Skalierung der X-Achse ist wie folgt zu lesen: 0 Revertanten pro 10^6 Zellen, 1-10 Revertanten pro 10^6 Zellen, 11-25 Revertanten pro 10^6 Zellen, 26-50 Revertanten pro 10^6 Zellen, über 50 (>50) Revertanten pro 10^6 Zellen; Y-Achse: Anzahl an unabhängigen Transfektionsklonen (von 8).

3.2.3 Thymidin induziert einen Mutationsphänotyp in Nalm-6 Zellen

Um auszuschließen, dass der Mangel an GFP-Revertanten in Nalm-6 AID-Transfektionsklonen auf eine fehlerhafte GFP-Reporter-Expression zurückzuführen ist, wurden Nalm-6 Zellen verschiedenen mutagenen Agenzien ausgesetzt. Die Überlegung dahinter war, dass mutagene Agenzien unter Umständen bestimmte Mutationen auf dem GFP-Transgen einführen könnten, die zur Reversion des GFP-Stopp-Kodons führen würden. Wir beobachteten, dass Zusatz von Thymidin (in Kombination mit geringen Mengen an Cytidin zur Vermeidung von Zelltod) zum Kulturmedium wirklich einen starken Mutationsphänotyp in Nalm-6 Transfektionsklonen bewirken konnte. Jedoch reagierten nicht alle *ptk-GFPstop*-Transfektionsklone auf die Behandlung mit Thymidin, was wiederum nahe legt, dass genomische Integrationsstellen die Anfälligkeit für Thymidin-induzierte Mutagenese beeinflussen können. Die Thymidin-induzierten Mutationsraten wurden für vier unabhängige *ptk-GFPstop*-Klone bestimmt. Abbildung 19A zeigt das Ergebnis einer Expansionsanalyse für einen unabhängigen Transfektionsklon über einen Zeitraum von vier Tagen hinweg mit und ohne Zusatz von Thymidin zum Kulturmedium.

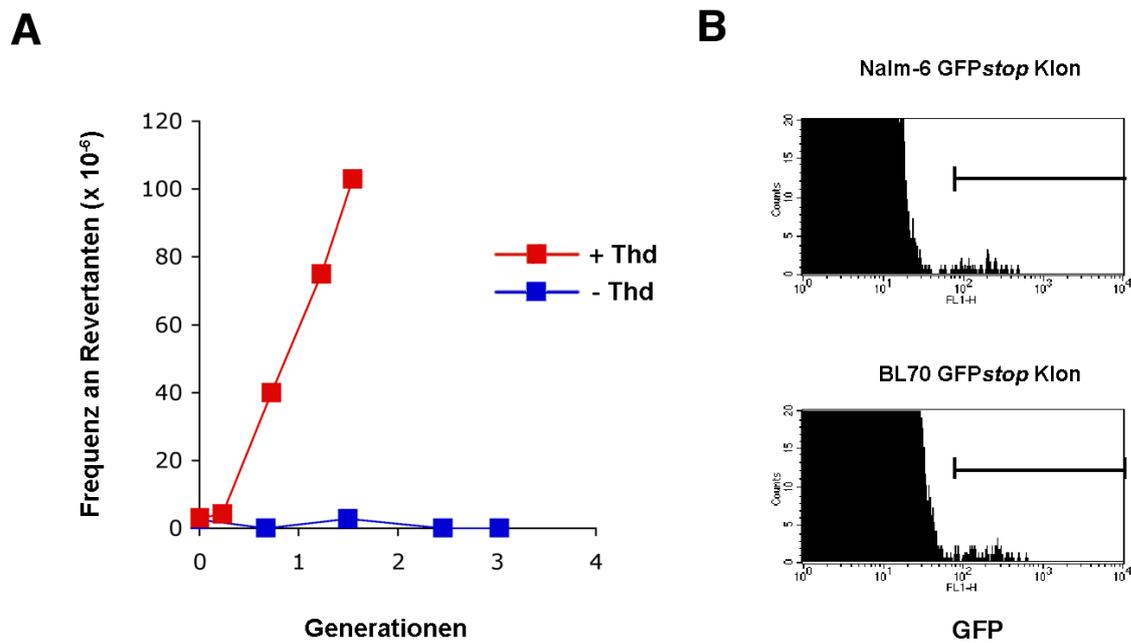


Abb. 19 Expansionsanalyse eines Nalm-6 ptk-GFP^{stop}-Transfektionsklons mit und ohne Zusatz von Thymidin zum Kulturmedium. (A) Die mittels durchflusszytometrischer Analyse gewonnenen Daten aus der 4-tägigen Expansionsphase sind dargestellt als Funktion der Frequenz an GFP-Revertanten pro 10^6 lebende Zellen über der Anzahl an Zellteilungen. Rote Symbole/Linie: mit Thymidinzusatz; Blaue Symbole/Linie: ohne Thymidinzusatz (B) Durchflusszytometrische Analyse eines Nalm-6 ptk-GFP^{stop}-Transfektionsklons nach drei Tagen in Thymidin-haltigem Medium und eines BL70 ptk-GFP^{stop}/pAID-ngfr-Transfektionsklons. X-Achse: Relative Fluoreszenzintensität von GFP; Y-Achse: Anzahl an Zellen.

Die Reversionsraten variierten zwischen 1.9×10^{-5} und 7.9×10^{-5} mut/bp/gen innerhalb der analysierten ptk-GFP^{stop}-Transfektionsklone (Tabelle 1). GFP-exprimierende Zellen von vier unterschiedlichen, mit Thymidin kultivierten Transfektionsklonen wurden sortiert und anschließend sequenziert, um die Reversionsursache zu analysieren. In allen vier Fällen verursachte eine Punktmutation von G nach C innerhalb des TAG Stopp-Kodons die Reversion.

	Klon	Mutationsrate ($\times 10^{-5}$)
Ohne AID	1	7.9
	2	4.9
	3	6.3
	4	1.9
Mit AID	1	2.8
	2	1.8
	3	6.5
	4	1.4
	5	5.2

Tab. 1 GFP-Reversionsraten von Thymidin-behandelten Nalm-6 GFP- und GFP/AID-Transfektionsklonen.

J. Bachl (GSF, München) hatte früher schon gezeigt, dass die mittels Durchflusszytometrie gemessene GFP-Fluoreszenzintensität von revertierten Zellen direkt mit der Transkriptionsrate des GFP-Reporter-Transgens (Bachl et al., 2001) korreliert. Die GFP-Expressionsmengen waren vergleichbar zwischen revertierten Zellen in BL70 (AID-induziert) und Nalm-6 (Thymidin-induziert; Abb. 19B). Das bedeutet, dass das mutierte Reporterkonstrukt in beiden Zelllinien vermutlich gleich stark transkribiert wird. Trotzdem wurden zusätzlich noch eine Northern-Blot-Analyse und parallel eine quantitative Real-time-PCR durchgeführt (Abb. 20), um die tatsächliche Menge an GFP-Transkript für die GFP/AID-Klone 1 bis 5 (siehe Abb. 17) beider Zelllinien zu bestimmen (Nalm-6 ohne Thymidin-Behandlung). Der GFP-Transkriptspiegel unterschied sich zwar zwischen den einzelnen Klonen, nicht aber im allgemeinen Vergleich der beiden Ausgangszelllinien (Nalm-6 oder BL70). Daher kann das Fehlen von GFP-Revertanten in AID-überexprimierenden Nalm-6 Klonen (in der Abwesenheit von Thymidin) nicht mit einer zu geringen Transkriptionsrate des GFP-Reporters erklärt werden.

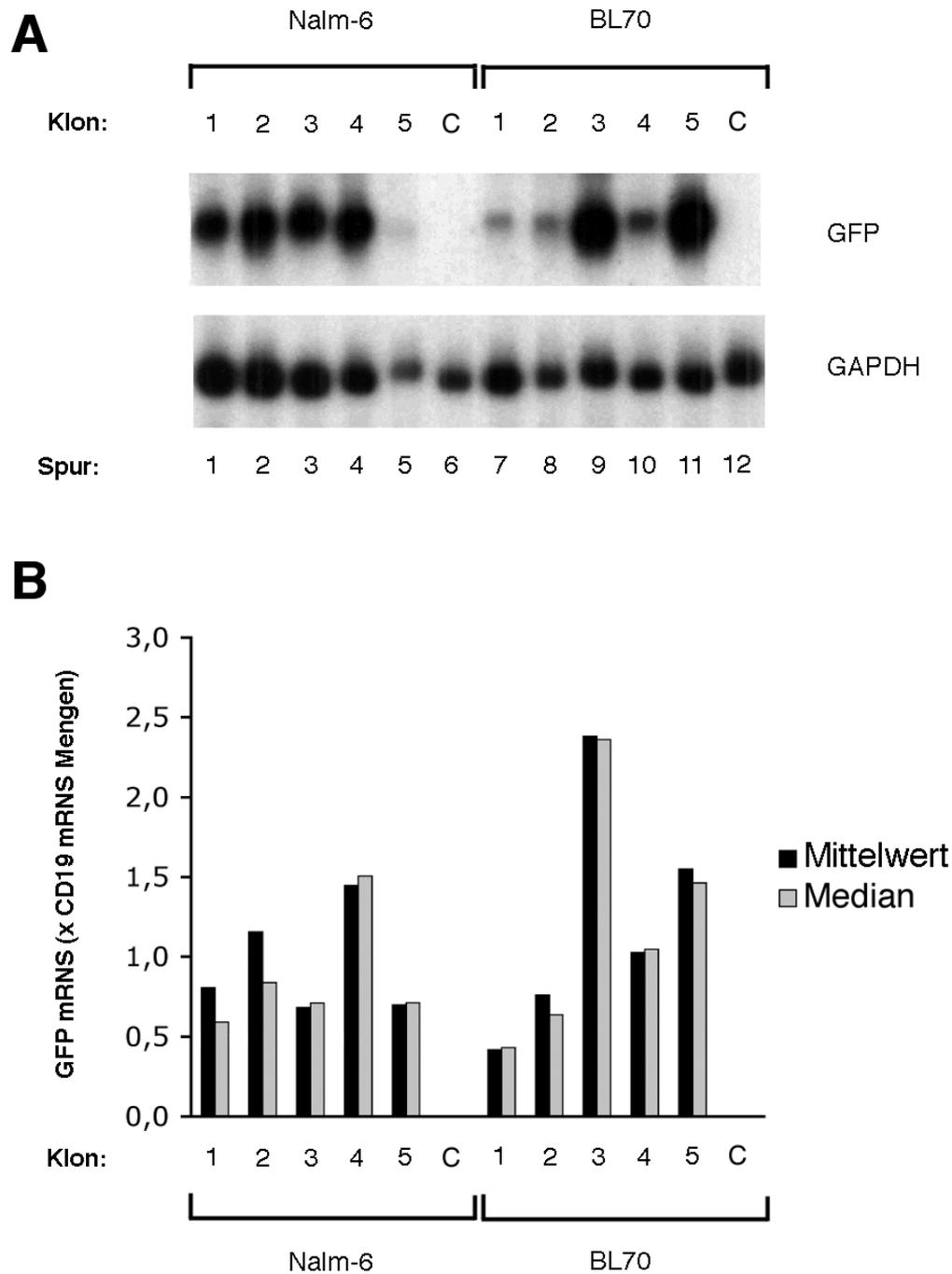


Abb. 20 Vergleich der Transkription des GFP-Reporters in Nalm-6 und BL70 Transfektionsklonen.

(A) Northern-Blot-Analyse von GFP und GAPDH-Transkripten in den stabilen Transfektionsklonen 1 bis 5 der Zelllinien Nalm-6 und BL70 (Nummerierung der Klone gemäß Abbildung 17). (B) Bestimmung der GFP-Transkriptmengen in den jeweiligen Transfektionsklonen 1 bis 5 der Zelllinien Nalm-6 und BL70 mittels quantitativer Real-time PCR. Dargestellt sind Durchschnittswert und Medianwert von vier unabhängigen Real-time PCRs pro Transfektionsklon. C: Untransfizierte Ausgangszelllinien Nalm-6 und BL70.

3.2.4 Thymidin induziert nicht die endogene AID-Expression in Nalm-6 Zellen

Da die G zu C Transversionen sehr den GC-Mutationsphänotypen in hypermutierenden Zelllinien ähneln, erschien es möglich, dass evtl. die endogene AID-Expression durch Thymidin-Zusatz zum Medium in Nalm-6 Zellen induziert wird. Deshalb wurde für einen *ptk-GFP^{stop}*-Transfektionsklon zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultur in Thymidin-haltigem Medium eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 21). Die Burkitt-Lymphom-Zelllinien Mutu III und BL70 wurden als Kontrollen für die endogene AID Expression verwendet (s. a. Abb. 14A). Weder die Thymidin-behandelten noch die unbehandelten Nalm-6 Zellen exprimierten nachweisbare Mengen an AID-Transkript. Daraus folgt, dass die GC-lastigen Reversionsereignisse nicht durch einen AID-induzierten Mutationsmechanismus verursacht werden, sondern eher durch die intrinsische, mutagene Eigenschaft erhöhter Mengen an Thymidin (Bradley & Sharkey, 1978; Kresnak & Davidson, 1992).

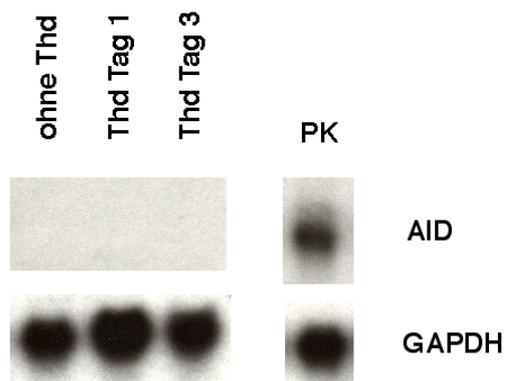


Abb. 21 Northern-Blot-Analyse des endogenen AID-Expressionsniveaus von Nalm-6 Zellen nach Zusatz von Thymidin (Thd; 1mM Thymidin + 0.1mM Cytidin) zum Kulturmedium. Die Gesamt-RNS für die Analyse wurde einen Tag bzw. drei Tage nach Zusatz von Thymidin zum Kulturmedium gewonnen. Die Membran wurde sequentiell mit Sonden für AID und GAPDH hybridisiert. PK: Mutu III Gesamt-RNS fungierte als Positiv-Kontrolle für AID-Expression.

3.2.5 AID-Überexpression hat keinen Einfluss auf Thymidin-induzierte Mutagenese in Nalm-6 Zellen

Um herauszufinden, ob AID-Überexpression mit dem Thymidin-induzierten Mutationsmechanismus interferiert oder gar kooperiert, wurden 5 AID-überexprimierende Nalm-6 Transfektionsklone mit Thymidin behandelt. Anstatt die Mutationsfrequenz zu bestimmen, die evtl. nicht ausreichend ist, um kleine Veränderungen in der Mutationsrate durch AID-Überexpression zu bemerken, wurde die reale Mutationsrate für diese 5 AID-überexprimierenden Klone bestimmt. Die Mutationsraten rangierten von 1.4×10^{-5} bis $6.5 \times$

10^{-5} mut/bp/gen und unterscheiden sich nur unwesentlich von denen in Nalm-6 Transfektionsklonen ohne transgene AID-Expression (Tabelle 1). Exogene AID-Expression, selbst auf hohem Niveau, hat also keinen offensichtlichen Einfluss auf die Thymidin-induzierten Reversionsraten.

3.3 Subzelluläre Lokalisation von AID

3.3.1 Die Aminosäuresequenz von AID deutet die Existenz von Kerntransportsignalen an

Die Tatsache, dass AID in Nalm-6 Zellen keine Hypermutation zu induzieren vermag, ist absolut einzigartig, weil bislang die Überexpression von AID in allen publizierten Systemen zu Hypermutation führte (Martin & Scharff, 2002; Petersen-Mahrt et al., 2002; Yoshikawa et al., 2002; Pham et al., 2003; Krause et al., 2005). Da zumindest augenscheinlich alle bekannten *trans*-Hypermutationsfaktoren exprimiert werden (siehe Abb. 14), kann über die Ursache nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass überexprimiertes AID in Nalm-6 Zellen in seiner subzellulären Lokalisation anders reguliert wird als in BL70. Es ist augenfällig, dass die beschriebene subzelluläre Lokalisation von AID im Zytoplasma (Rada et al., 2002a) den postulierten Aktivitäten widerspricht. Sowohl „mRNS-Editing“ als auch eine direkte Desaminierung von Cytidin auf der DNS setzen die Anwesenheit von AID im Zellkern voraus. Auch das zu AID homologe und RNS-editierende Protein APOBEC-1 transloziert in den Zellkern. Deshalb wäre es möglich, dass AID über seine subzelluläre Lokalisation reguliert wird und nur unter bestimmten Umständen in den Kern translozieren kann. Ein guter Hinweis auf eine derartige Translokation wäre die Anwesenheit von Kerntransportsignalen in der Aminosäuresequenz von AID. Tatsächlich weist humanes AID am N-Terminus eine Sequenz auf, die einer zweiteiligen (bipartiten) NLS ähnelt (Abb. 22). Die Aminosäuren 7-10 (NRRK) und 23-26 (GRRE) erfüllen im Prinzip die Anforderungen an eine bipartite NLS: zwei basische Sequenzblöcke getrennt durch einen ca. 10 AS großen Block anderer Aminosäuren. Ein Vergleich mit AID von Maus und Huhn ergibt, dass das Motiv zwar nicht zu 100% konserviert ist, dass sich aber die chemische Natur der Aminosäureblöcke (basisch) und die Größe des dazwischen liegenden Blocks (in diesem Fall 12 AS) nicht ändert. Gestützt wird die Hypothese durch die Beobachtung, dass Patienten mit Mutationen an Position 24 im AID-Protein (R24W, Revy et al., 2000) am Hyper-IgM-

Syndrom erkranken und weder SHM noch CSR durchführen können. Der Hypothese zufolge wäre dieses AID nicht in der Lage, sein Substrat zu erreichen, weil die Translokation in den Kern aufgrund der zerstörten NLS-Sequenz nicht mehr möglich ist.

Am C-Terminus von humanem AID finden sich gehäuft Leucine (9 Leucine auf die letzten 36 AS). Eine Häufung von Leucinen ist oft ein Charakteristikum nukleärer Exportsequenzen. Die C-terminalen Leucine humanen AIDs sind ebenfalls sehr gut in Maus (8/36) und Huhn (9/36) konserviert. Die letzten 10 AS im humanen AID (L-RDA-[F]-RT-L-G-L) würden sogar der Konsensussequenz für nukleäre Exportsignale (NES) entsprechen (L-X₂₋₃-[LIVFM]-X₂₋₃-L-X-[LI]).

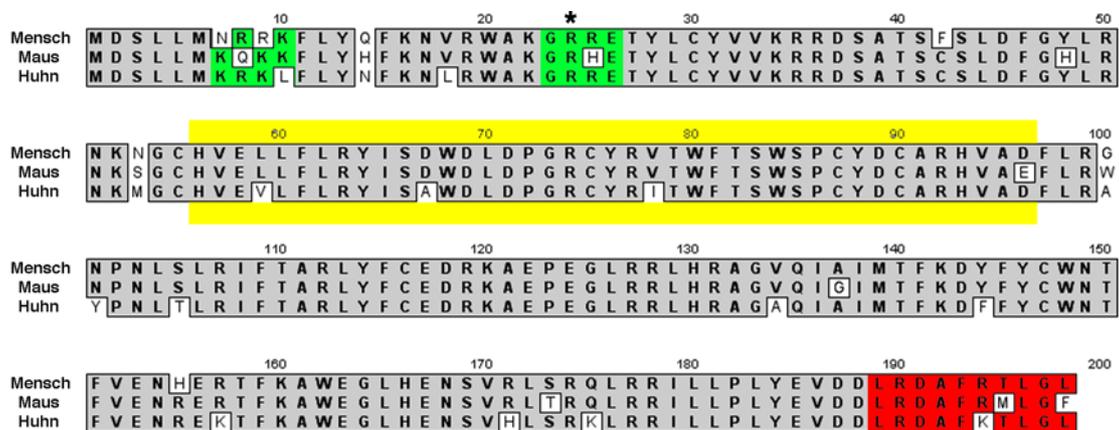


Abb. 22 Sequenzhomologie auf Ebene der Aminosäuren von AID aus Mensch, Maus und Huhn. Konservierte Aminosäurereste sind in grau unterlegt, nicht-konservierte weiss. Das Cytidin-Deaminase-Motiv ist von gelben Balken eingerahmt. Die potenzielle NLS am N-Terminus von AID ist grün unterlegt, die postulierte NES am C-Terminus ist rot unterlegt. Ein von Revy et al. (2000) beschriebener Hyper-IgM-Patient trägt die Mutation R24W (*), die zum Verlust von SHM- und CSR-Aktivität führte.

Es bleibt festzuhalten, dass AID im Prinzip durchaus über Kerntransportsignale, die das aktive Zentrum des Enzyms flankieren, verfügen könnte. Deshalb wäre auch eine Regulation von AID über seine subzelluläre Lokalisation denkbar.

3.3.2 Herstellung von AID-Lokalisationsmutanten

Um zu untersuchen, ob das AID-Protein tatsächlich Kerntransportsignalsequenzen trägt, wurden verschiedene Expressionskonstrukte hergestellt, die für unterschiedliche Mutanten des humanen AID-Proteins (Abb. 23) kodieren. Revy et al. (2000) hatten einen Hyper-IgM-Patienten beschrieben, der im offenen Leserahmen des *aicda*-Gens (Gen für AID-Protein) an

Position 70 statt einem C ein T haben. Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch (R24W). Das Arginin 24 liegt mitten im zweiten basischen Block der postulierten bipartiten NLS. Eine solche Mutation (in Zukunft als bix bezeichnet) sollte AID in Anlehnung an den beschriebenen Patienten funktionslos machen (AIDbix). Sofern es sich in der Tat um eine NLS handelt und deren Zerstörung die einzige Ursache für die Inaktivierung von AID ist, so sollte durch die Fusion von AID mit einer exogenen NLS-Sequenz, z. B. der NLS des „SV40 Large T-Antigen“, die ursprüngliche Aktivität wieder herstellbar sein. Dazu wurden die Mutanten NLS-AIDbix und AIDbix-3xNLS hergestellt. Außerdem sollte überprüft werden, ob durch die Einführung exogener NLS-Sequenzen auf Grund forcierter Kernlokalisierung von AID allgemein die Hypermutationsaktivität erhöht wird (NLS-AID und AID-3xNLS).

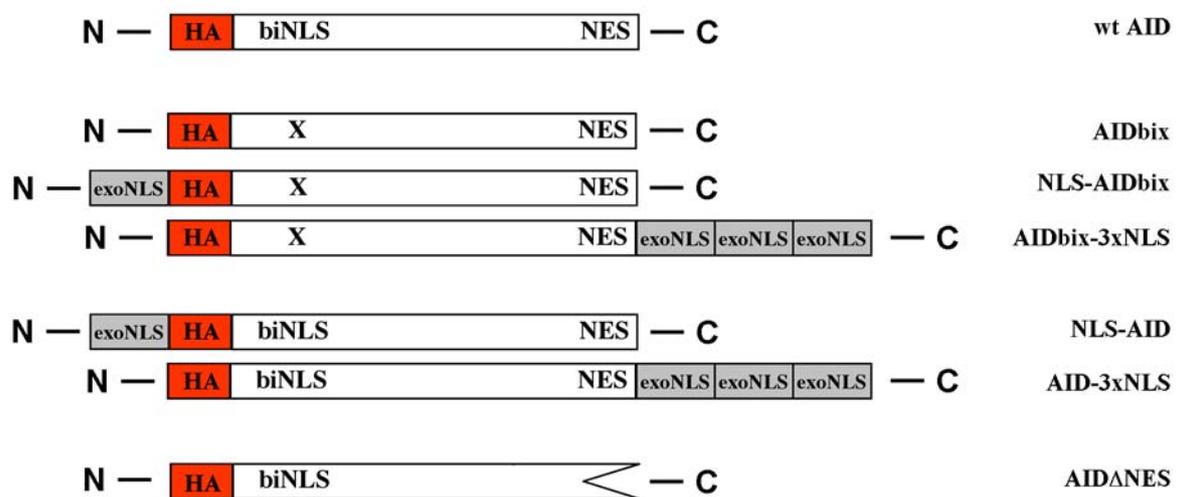


Abb. 23 Schematische Darstellung der rekombinanten AID-Proteine bzw. Lokalisationsmutanten. Alle rekombinanten Proteine tragen eine Hämagglutininepitop-Markierung am N-Terminus (HA, rot unterlegt). Eine Punktmutation (R24W) in der Sequenz der postulierten zweiteiligen NLS (biNLS) wird durch ein X symbolisiert. Eine N- oder C-terminale Fusion von AID mit der NLS des „SV40 Large T-Antigen“ wird durch „exoNLS“ gekennzeichnet. Die Deletion der letzten 14 AS von AID am C-Terminus, die zum Verlust der potenziellen NES-Sequenz führt, ist durch einen horizontalen Einschnitt am C-Terminus symbolisiert (AID Δ NES).

Der Nachweis einer NES in AID sollte durch die Deletion der 14 C-terminalen AS von AID adressiert werden (fortan als AID Δ NES bezeichnet). Dadurch verliert humanes AID 3 der 9 Leucine am C-Terminus und darüber hinaus die Sequenz, die dem Konsensusmotiv für eine NES entspricht (letzte 10 AS). Alle mutierten Proteine tragen wie bereits beschrieben unmittelbar am N-Terminus von AID ein HA-Epitop.

Als Expressionsvektor fungierte pCAGGS, in dem die Transkription des Transgens über den Beta-Aktin-Promotor des Huhns erfolgt. Das jeweilige rekombinante AID-Transgen ist über eine IRES mit einer Puromycin-Resistenzkassette verknüpft (bicistronisches Transkript). Dadurch kann effizient auf die Expression der oben beschriebenen, rekombinanten AID-Proteine selektioniert werden. Außerdem wurden zwei weitere Plasmide hergestellt. Das erste Plasmid kodiert für HA-AID, im Folgenden auch als Wildtyp AID bezeichnet (wt AID), um Aktivitätsunterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten ermitteln zu können. Das zweite Kontrollplasmid (Leervektor) enthält kein AID-Transgen sondern kodiert nur für die Puromycin-Resistenz und dient der Messung von Hintergrundmutationsaktivität.

3.3.3 Kernlokalisationsmutanten wirken sich auf Hypermutationsfrequenz und –rate aus

Um die Hypermutationsfrequenzen der Kernlokalisationsmutanten analysieren zu können, wurde der bereits oben erwähnte pI-GFP $_{stop}$ -Subklon #1-5 (von der Zelllinie 18-81 abgeleitet) wegen seines geringen endogenen AID-Niveaus als Zelllinie zur Analyse gewählt. Da das GFP-Reportertransgen in diesem Fall bereits integriert vorliegt, also für alle weiteren Transfektionsklone an der (oder den) gleichen genomischen Stelle(n), lassen sich die gemessenen Reversionsraten allein auf die Expression und Aktivität der AID-Proteine zurückführen. Die oben beschrieben abgewandelten AID-Proteine sowie wt HA-AID und der „Leervektor“ wurden einzeln stabil in Subklon #1-5 transfiziert. Sechzehn unabhängige Klone für jedes Konstrukt wurden auf die Hypermutationsfrequenz nach 3-tägiger Induktion des Reporters mittels Doxyzyklin untersucht (Abb. 24). Von den mit dem „Leervektor“ transfizierten Klonen revertierten 50% (8 von 16), mit durchschnittlich 1.0 Revertanten pro 10^5 lebendige Zellen. Dies ist Ausdruck der residualen Hypermutationsaktivität des endogenen AIDs. Von den mit wt HA-AID transfizierten Klonen hatten 81% (13 von 16) GFP-Revertanten mit einer durchschnittlichen Reversionsfrequenz von 6.5 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen. Das bestätigt erneut die hypermutierende Wirkung von exogenem AID in der Zelllinie 18-81 wie schon im ersten Teil der Ergebnisse beschrieben. Von den 16 AIDbix-Transfektionsklonen (mit zerstörter bipartiter NLS) wiesen nur 31% (5 von 16) grün-fluoreszierende Zellen auf mit einer durchschnittlichen Reversionsfrequenz von 1.0 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen. Diese Frequenz liegt deutlich unter der mit rekombinantem HA-AID (wt) erzielbaren Hypermutationsaktivität und geht vermutlich auf die Hintergrundaktivität des endogenen AIDs zurück.

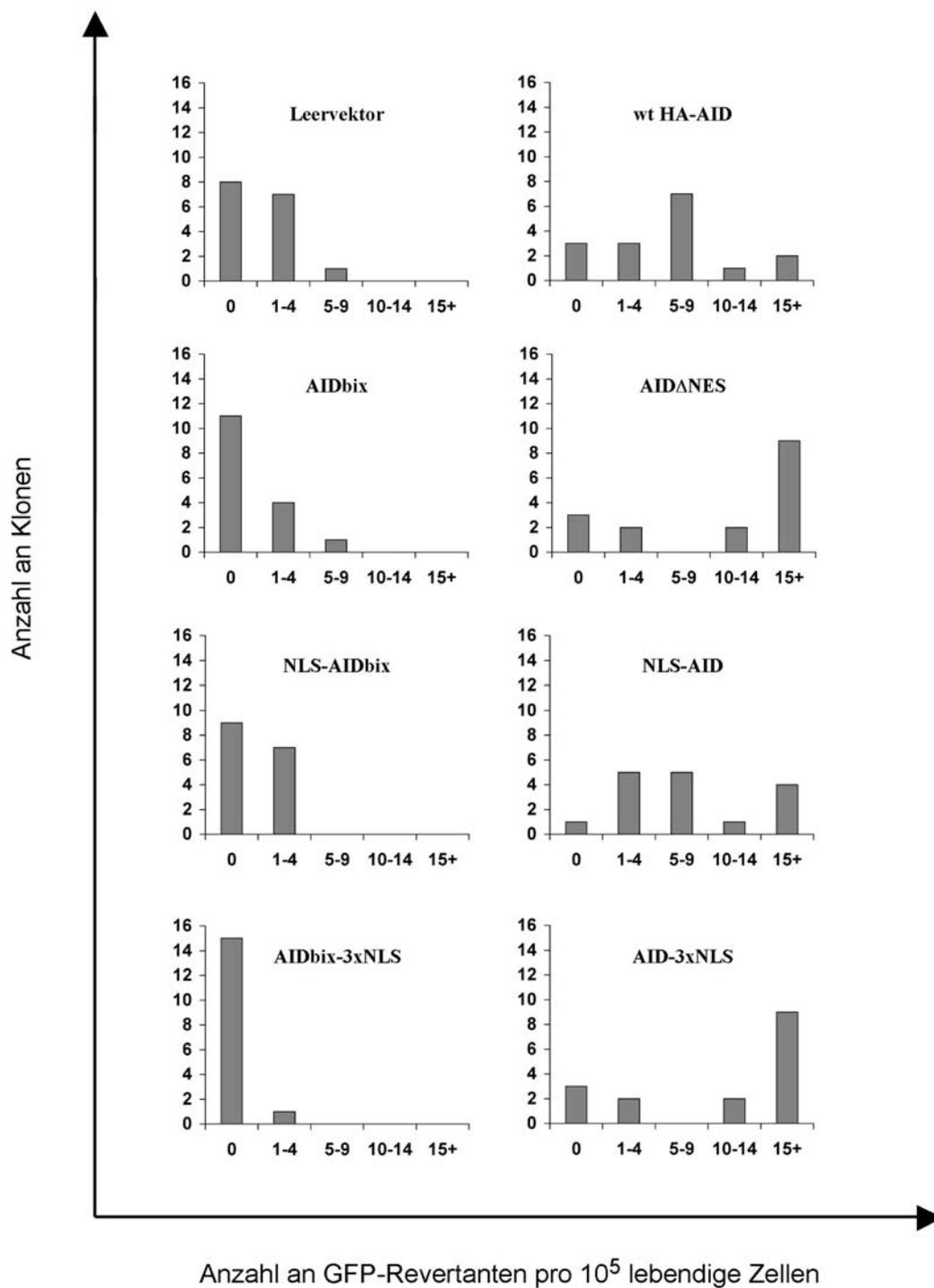


Abb. 24 GFP-Reversionsfrequenzen für verschiedene Lokalisationsmutanten von AID, die stabil in Subklon #1-5 (von 18-81 abgeleitet) transfiziert worden sind. Die Revertantenfrequenz pro 10⁵ lebende Zellen wurde durch durchflusszytometrische Analyse von jeweils 16 unabhängigen Transfektionsklonen bestimmt. Die Skalierung der X-Achse ist wie folgt zu lesen: 0 Revertanten pro 10⁵ Zellen, 1-4 Revertanten pro 10⁵ Zellen, 5-9 Revertanten pro 10⁵ Zellen, 10-14 Revertanten pro 10⁵ Zellen, über 15 (>15) Revertanten pro 10⁵ Zellen; Y-Achse: Anzahl an unabhängigen Transfektionsklonen (von 16).

Der Aktivitätsverlust von AID, verursacht durch die Mutation R24W in der potenziellen NLS, stimmt mit der von Revy und Kollegen für einige Hyper-IgM-Patienten gemachten Beobachtung überein. Unerwarteterweise kann dieser Verlust der Hypermutationsaktivität nicht durch das Anfügen exogener NLS-Sequenzen an AIDbix kompensiert werden.

Von den AIDbix-3xNLS-Klonen revertierten nur 6% (1 von 16; durchschnittliche Frequenz: 0.1 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen) das GFP-Reportertransgen, von den NLS-AIDbix-Klonen immerhin 44% (7 von 16), allerdings auch nur mit einer durchschnittlichen Hypermutationsfrequenz von 0.9 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen. Das könnte bedeuten, dass die R24W-Mutation noch weitere Funktionen von AID beeinträchtigt, die nichts mit einer potenziellen Translokation in den Zellkern zu tun haben.

Die Fusion einer bzw. von drei exogenen NLS-Sequenzen an wt HA-AID bewirkt eine Erhöhung der Mutationsfrequenz. Im Fall von NLS-AID revertierten 94% der Klone das vorzeitige GFP Stopp-Kodon mit einer durchschnittlichen Reversionsfrequenz von 7.8 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen. AID-3xNLS-Transfektionsklone weisen in 81% der analysierten Klone (13 von 16) grün fluoreszierende Zellen mit einer durchschnittlichen Reversionsfrequenz von 25.6 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen auf. Beide Frequenzen liegen über der durch den Wildtyp induzierten Frequenz, wobei die Einführung mehreren NLS-Sequenzen offensichtlich noch stärker die Mutator-Aktivität fördert.

Die Deletion der 14 C-terminalen AS von AID (Eliminierung der postulierten NES) führte dazu, dass wie im Wildtyp 81% der AID Δ NES-Transfektionsklone (13 von 16) GFP-Revertanten aufwiesen. Die durchschnittliche Hypermutationsfrequenz war allerdings mit 35.5 GFP-Revertanten pro 10^5 Zellen ungleich höher als im Wildtyp.

Das Protein-Expressionsniveau der exogenen AID-Mutanten wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abb. 25). Fast alle Mutanten wiesen ähnliche Proteinmengen an exogenen AID-Proteinen auf, mit Ausnahme von AID-3xNLS und AIDbix-3xNLS, die beide deutlich schwächer exprimiert wurden. Daraus lässt sich unmittelbar ableiten, dass die erhöhte Hypermutationsaktivität einiger AID-Mutanten nicht auf eine erhöhte Proteinexpression zurückzuführen ist.

Für wt AID, AID Δ NES, NLS-AID und AID-3xNLS wurde jeweils mit drei repräsentativen Klonen zusätzlich noch eine 5-tägige Expansionsanalyse durchgeführt, um die eigentliche Mutationsrate festzustellen (Abb. 26). Die mittlere GFP-Reversionsrate für die drei gezeigten Klone betrug 37.7 GFP-Revertanten pro Tag für wt HA-AID, 147.3 für AID Δ NES, 136.4 für NLS-AID und 183.5 für AID-3xNLS.

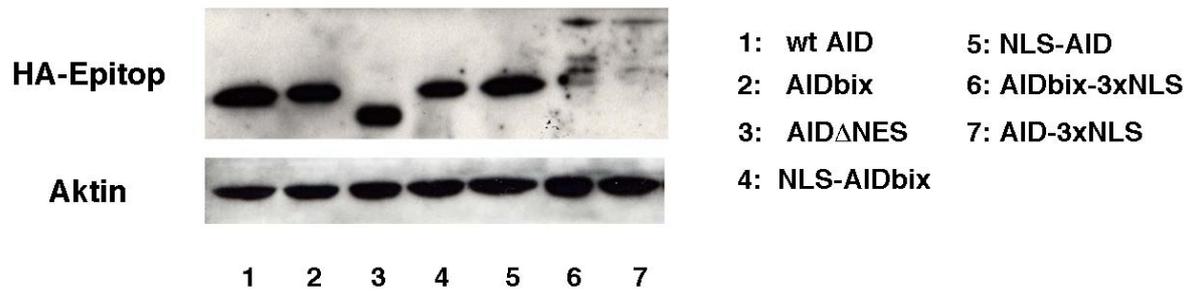


Abb. 25 Anti-HA Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des Expressionsniveaus der AID-Mutanten. Es wurde je ein repräsentativer Klon für wt AID (1), AIDbix (2), AID Δ NES (3), NLS-AIDbix (4), NLS-AID (5), AIDbix-3xNLS (6) und AID-3xNLS (7) ausgewählt und analysiert. Zum quantitativen Vergleich der Ergebnisse wurde Aktin als Ladekontrolle verwendet.

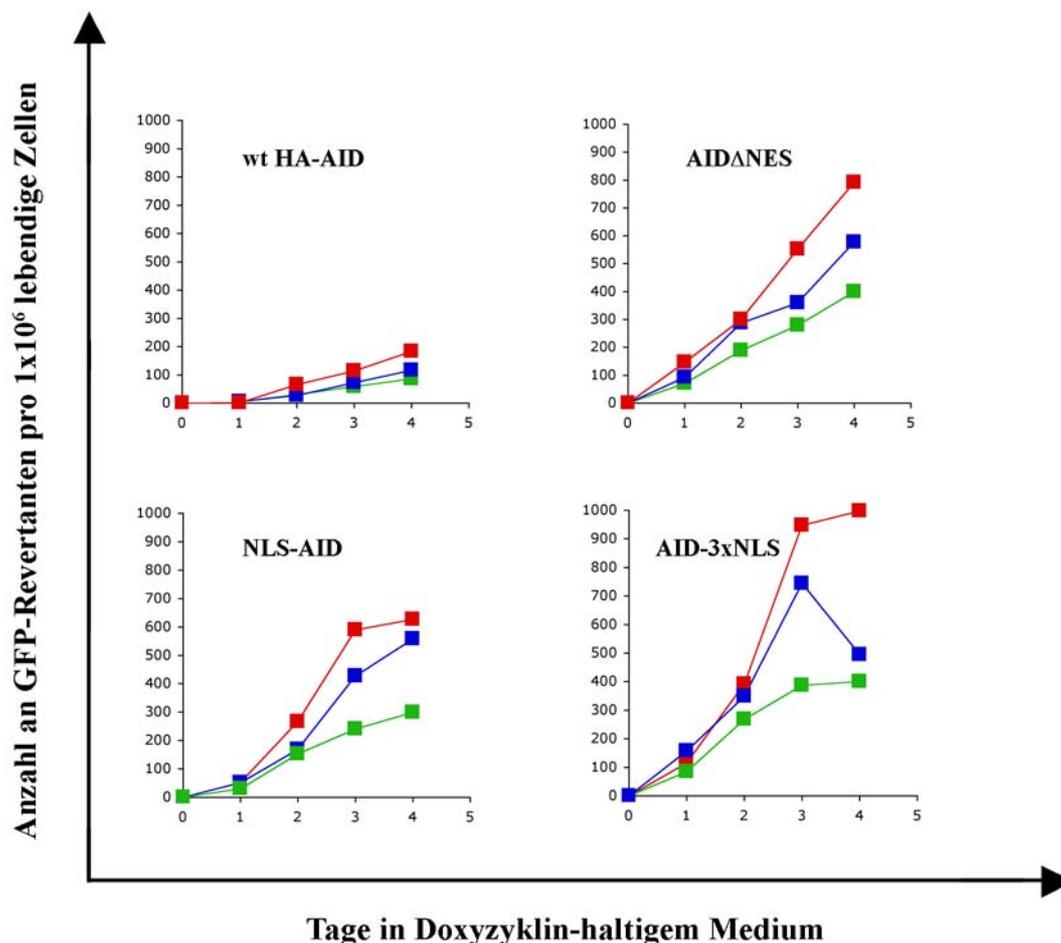


Abb. 26 Expansionsanalyse für wt AID, AID Δ NES, NLS-AID und AID-3xNLS Transfektionsklone, die stabil in den von 18-81 abgeleiteten Subklon #1-5 transfiziert worden sind. Abgebildet sind je drei unabhängige Klone pro Transfektion. Während der Expansion in der Anwesenheit von Doxyzyklin über einen Zeitraum von 5 Tagen wurde täglich die Anzahl an GFP-Revertanten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die ermittelten Daten sind als Funktion der Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen pro 10^6 lebende Zellen über der Anzahl an Tagen aufgetragen.

Die abgewandelten AID-Proteine, die im Prinzip ja die Lokalisation von AID in der Zelle beeinflussen sollten, vermögen also offensichtlich auch die Hypermutationsaktivität zu beeinflussen. Dabei zeigen Mutanten, die verstärkt im Kern anzutreffen sein sollten, eine erhöhte, Mutanten die nicht den Kern erreichen sollten eine stark erniedrigte Mutationsrate.

3.3.4 Die Veränderung der Kernlokalisationssequenzen wirkt sich nicht offensichtlich auf die subzelluläre Lokalisation von HA-markiertem AID aus

Ob die Veränderung der Hypermutationsfrequenz tatsächlich mit einer veränderten subzellulären Lokalisation einhergeht, sollte zunächst mittels Immunfluoreszenzmikroskopie geklärt werden. Die Immunfluoreszenzfärbung war dabei gegen die HA-Markierung gerichtet, die alle hier verwendeten AID-Proteine tragen. Sowohl Wildtyp HA-AID als auch die AID-Mutanten befinden sich prädominant im Zytoplasma (Abb. 27). Die Immunfärbung der Δ NES-Mutante war schwächer als die der anderen rekombinanten AID-Proteine (siehe auch schwache Expression im Western-Blot), wodurch die HA-spezifische Immunfluoreszenzfärbung nur schwierig von Hintergrundfärbungen zu unterscheiden war.

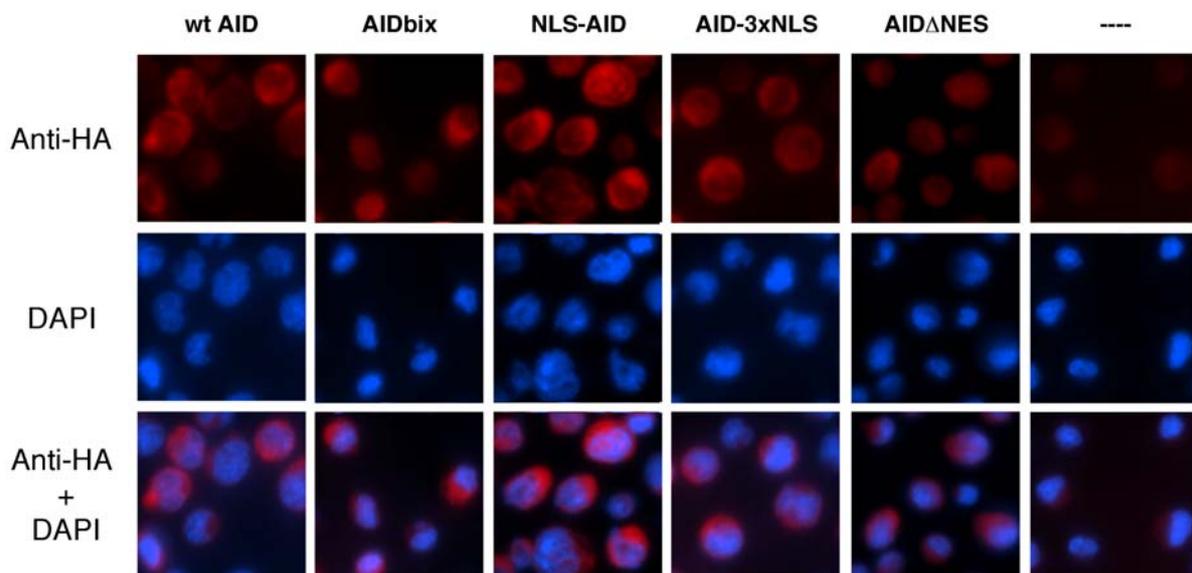


Abb. 27 Subzelluläre Lokalisation von AID-Lokalisationsmutanten in 18-81 Zellen (Subklon #1-5). Fluoreszenzaufnahmen von 18-81 Zellen (Subklon #1-5), die AID-Lokalisationsmutanten exprimieren. Die verschiedenen rekombinanten AID-Proteine wurden über das HA-Epitop nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. In der Reihe Anti-HA+DAPI wurden die Signale von HA und DAPI übereinander gelegt. Untransfizierte 18-81 Zellen dienten als Negativ-Kontrolle für die anti-HA-Färbung (Spalte: ----). Alle Fusionsproteine wurden in stabilen Zelllinien exprimiert.

Die Beobachtung, dass alle AID-Mutanten unverändert prädominant im Zytoplasma lokalisiert sind, kommt etwas unerwartet, weil einige Proteine exogene NLS-Sequenzen tragen. Für APOBEC-1 war die Fusion mit einer exogenen NLS-Sequenz alleine allerdings auch nicht ausreichend, um eine Translokation in den Kern zu bewirken (Yang & Smith, 1997). Eine mögliche Erklärung für die unverändert zytoplasmatische Lokalisation wäre, dass AID zwar über subzelluläre Lokalisationssequenzen verfügt, diese jedoch nicht zum Tragen kommen, weil die Lokalisation von AID in B-Zellen (zumindest in 18-81) noch von anderen, spezifischen Co-Faktoren bestimmt wird. Derartige B-Zell-spezifische Co-Faktoren wären in anderen Zelltypen vermutlich nicht zu erwarten. Deshalb wurden die Vektoren ebenfalls in die Ratten-Fibroblasten-Zelllinie TGR-1 transfiziert. Dennoch lies sich auch in TGR-1 Zellen mit den oben beschriebenen AID-Mutanten keine Veränderung der subzellulären Lokalisation beobachten. Wildtyp AID und alle davon abgeleiteten Mutanten befinden sich auch in Fibroblasten prädominant im Zytoplasma und nicht im Zellkern (Daten nicht gezeigt). Die über Immunfluoreszenzfärbung des HA-Epitops beobachtete Lokalisation der AID-Mutanten in 18-81 Zellen wird also nicht von B-Zell-spezifischen Kofaktoren verursacht. HA-AID wird in den Zelllinien überexprimiert, deshalb ist es schwierig zu entscheiden, ob physiologisch aktive Mengen im Zellkern sind.

3.3.5 Nukleäres AID ist maskiert

Eine mögliche Erklärung für die uniforme zytoplasmatische Lokalisation der AID-Proteine könnte eine Maskierung der Proteine im Zellkern sein. Demnach würden im Zellkern interagierende Proteine das HA-Epitop am N-Terminus bedecken, so dass es für den Antikörper unzugänglich ist. Aus diesem Grund wurden Konstrukte hergestellt, die für Fusionen von Wildtyp AID bzw. AID Δ NES mit GFP kodieren (AID-EGFP und AID Δ NES-EGFP; Abb. 28 A). Diese AID-GFP-Fusionen sollten sich aufgrund ihrer intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften in der Fluoreszenzmikroskopie auch ohne Antikörperfärbung nachweisen lassen. Gleichzeitig ermöglicht das in den AID-GFP-Fusionen immer noch vorhandene HA-Epitop die Verifizierung der Lokalisation durch Immunfluoreszenzfärbung. Da das GFP-Protein keinerlei Signalsequenzen enthält, die die subzelluläre Lokalisation beeinflussen könnten, sollte die Lokalisation allein auf etwaige Lokalisationssequenzen von AID zurückzuführen sein. Die Konstrukte für die Fusionsproteine AID-EGFP und AID Δ NES-EGFP wurden ebenfalls stabil in TGR-1 Zellen transfiziert und auf ihre AID-Lokalisation hin untersucht. Wildtyp AID-EGFP befindet sich ausschliesslich im Zytoplasma. Dagegen zeigte

die AID Δ NES-EGFP Mutante eine prädominante nukleäre Lokalisation (Abb. 28B). Die Existenz einer NES-Sequenz am C-Terminus von AID, die Wildtyp AID-EGFP aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert, ist also sehr wahrscheinlich, weil die Deletion des C-Terminus zu einem gestörten Export führt. Die Immunfluoreszenzfärbung der Fusionsproteine mit anti-HA-Antikörpern bestätigt, dass das HA-Epitop im Nukleus in der Tat maskiert ist. Während sich das im Zytoplasma befindliche AID-GFP problemlos mit den anti-HA Antikörpern nachweisen lässt, ist das HA-Epitop des im Nukleus befindlichen AID Δ NES-EGFP unzugänglich für den anti-HA Antikörper (GFP- und HA-Signal stimmen nicht überein; Abb. 28B). Das bedeutet vermutlich, dass AID im Kern in anderen, kompakteren Komplexen als im Zytoplasma vorliegt. Die Maskierung bleibt unabhängig von der Art (Methanol, PFA) und Dauer (2', 5', 10 und 20') der Fixierung erhalten (Daten nicht gezeigt). Immunfluoreszenzfärbungen des HA-Epitops sind also nicht zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von HA-AID und abgeleiteten Mutanten geeignet.

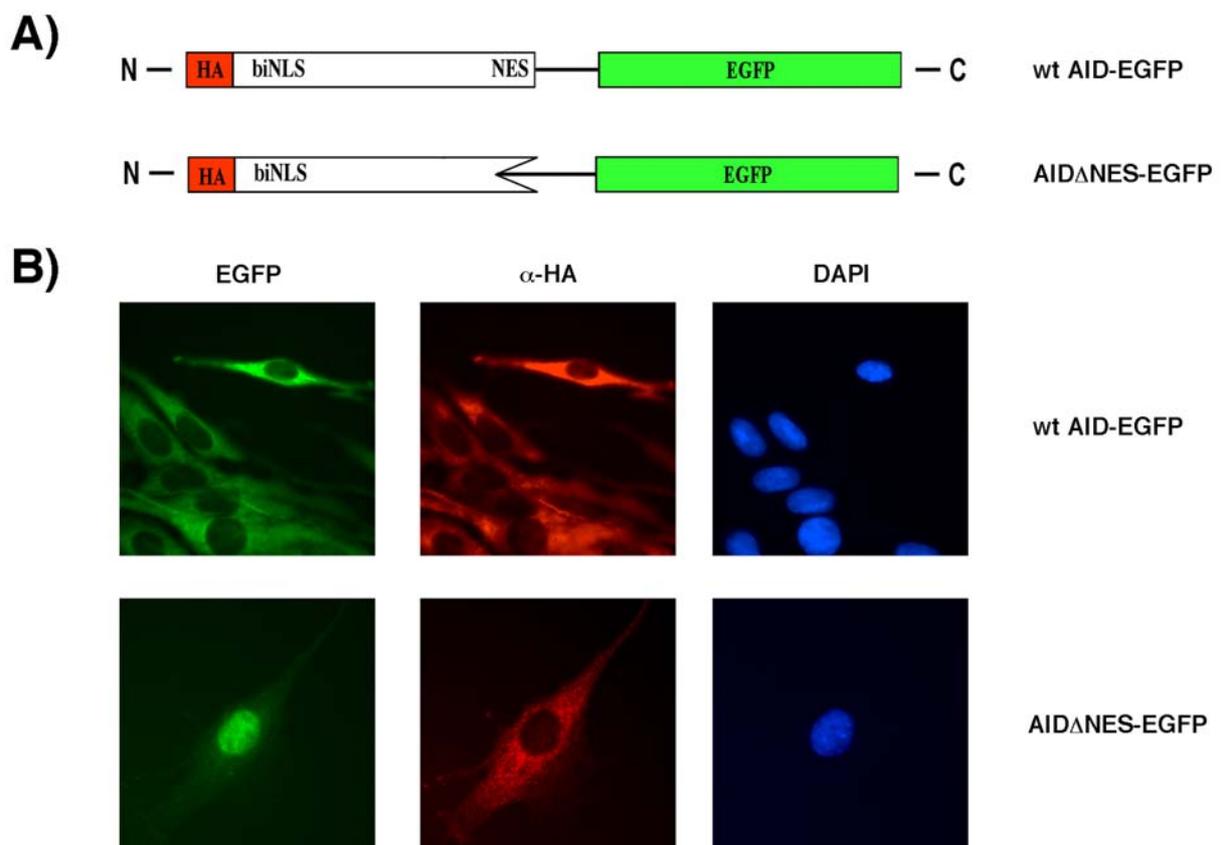


Abb. 28 Lokalisation von Fusionsproteinen aus AID und EGFP. (A) Schematische Darstellung der Proteinfusionen von wt AID und AID Δ NES mit GFP. Beide Fusionsproteine tragen eine Hämagglutininepitop-Markierung am N-Terminus (HA, rot unterlegt). (B) Fluoreszenzaufnahmen von TGR-1 Zellen, die stabil entweder mit wt AID-EGFP oder AID Δ NES-EGFP transfiziert worden sind. Abgebildet sind Zellen eines jeweils repräsentativen Klons nach Fixierung mit 4% PFA/PBS. Die Autofluoreszenz des GFP-Anteils der Fusionsproteine lässt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop direkt nachweisen (grün). Für beide Klone wurde außerdem die HA-Markierung der Fusionsproteine über einen anti-HA-Antikörper nachgewiesen (rot). Um den Zellkern vom Zytoplasma unterscheiden zu können, wurden die Zellkerne mit DAPI eingefärbt (blau).

3.3.6 Biochemische Zellfraktionierung zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von AID-Mutanten

Das AID-EGFP-Fusionsprotein ist doppelt so groß wie wt AID. Dadurch überschreitet das Protein aller Wahrscheinlichkeit nach die kritische Größe für Diffusion in und aus dem Zellkern. Inwieweit ein derart vergrößertes Protein also die tatsächliche Verteilung von wt AID in der Zelle wiedergeben kann, bleibt spekulativ. Da das HA-Epitop maskiert und AID-EGFP sehr groß ist, wurden die Zellen zusätzlich noch biochemisch in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt. Dazu wurden die Zellen in einem hypotonischen Puffer resuspendiert und mit geringen Mengen an Triton X-100 (0.04 %) lysiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend behutsam zentrifugiert und der Überstand (Zytoplasma) vom Pellet (Zellkerne) abgetrennt. Dies wurde für diverse stabile Transfektionsklone unterschiedlicher AID-Mutanten (wt AID, NLS-AID, AID-3xNLS, AID Δ NES, AIDbix, NLS-AIDbix, AIDbix-3xNLS) in 18-81 Zellen durchgeführt. Zur Kontrolle für eine erfolgreiche Trennung der beiden Zellfraktionen (Zytoplasma/Nukleus) wurde zusätzlich sowohl die Verteilung von Aktin (sollte v.a. zytoplasmatisch sein) als auch die Verteilung von an Lysin 4 methyliertem Histon H3 (ausschließlich nukleär) bestimmt. Abbildung 29 zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Experimente für wt AID, AID Δ NES und NLS-AID.

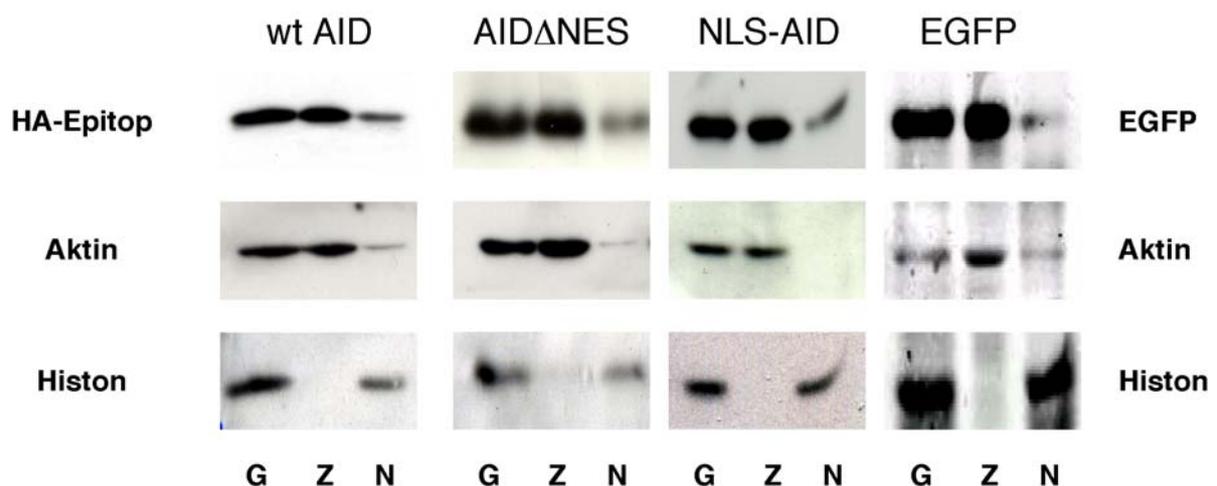


Abb. 29 Western-Blot-Analyse fraktionierter Zellextrakte je eines repräsentativen wt AID, AID Δ NES, NLS-AID oder GFP exprimierenden Klons in 18-81 Zellen (von Subklon #1-5 abgeleitet). Abgebildet sind für jeden Klon der Gesamtextrakt vor der Lyse (G), die zytoplasmatische Fraktion (Z) sowie die nukleäre Fraktion (N). Für wt AID, AID Δ NES und NLS-AID erfolgte die Bestimmung des AID-Proteingehalts über den Nachweis der HA-Markierung. EGFP wurde über einen anti-EGFP-Antikörper direkt nachgewiesen. Die Western-Blot-Analyse des Aktin-Proteingehalts (vorwiegend zytoplasmatisch) sowie des Gehalts an Lysin-4-methyliertem Histon H3 (rein nukleär) diente als Kontrolle für den Nachweis einer ordnungsgemäßen Fraktionierung der Extrakte.

Im Prinzip lässt sich wie schon bei der Immunfluoreszenz bzgl. der Lokalisation kein Unterschied zwischen den verschiedenen AID-Mutanten erkennen. Auffallend ist, dass alle Formen von AID (AID-Mutanten und Wildtyp AID) einen signifikanten Anteil an nukleärem AID aufweisen. Um zu kontrollieren, ob diese Art von Aufschluss geeignet ist, ein derart kleines, potenziell frei diffusibles Protein korrekt zu fraktionieren, wurde die Verteilung von GFP in analogen Zellfraktionierungsexperimenten analysiert, da GFP (26.9 kDa) in etwa die selbe Größe wie AID (23.9 kDa) hat. GFP ist in der Zelle ubiquitär verteilt, was auf freie Diffusion und mangelnde physiologische Interaktionspartner zurückzuführen ist. Deshalb wurden 18-81 Zellen mit einem ptk-GFP-Konstrukt ohne Stopp-Kodon transifiziert. Unerwarteterweise befindet sich GFP-Protein nach der Auftrennung in zytoplasmatische und Kernfraktion beinahe ausschliesslich in der zytoplasmatischen Fraktion (siehe Abb. 29). Vermutlich wird bei der Lyse die Kernmembran derart beschädigt, dass kleine, unkomplexierte Proteine aus dem Kern ausgeschwemmt werden, z. B. beim Waschen. Das ändert sich auch nicht, wenn man andere Detergenzien (NP-40, Digitonin etc.) benutzt, mit einem Dounce-Homogenisator die Zellen aufschliesst, oder Streptolysin O zur Permeabilisierung der Membran nutzt (Daten nicht gezeigt). Im Umkehrschluß bedeutet das, dass der nukleäre Anteil der AID-Proteine vermutlich in komplexierter Form im Kern vorliegt.

Offensichtlich kann durch die beschriebenen AID-Mutanten keine Zunahme des komplexierten AID-Anteils im Zellkern bewirkt werden.

3.3.7 AID hat keine NLS aber eine NES

Um eine prinzipielle Aussage über die Bedeutung des N- und des C-Terminus von AID für den Proteintransport zu machen, wurden die entsprechende Domänen an den N-Terminus von EGFP fusioniert. Das Protein aidNLS-EGFP (siehe Abb. 30C) setzt sich aus den ersten 38 AS von AID und EGFP zusammen. Die 38 AS beinhalten die postulierte zweiteilige NLS und scheinen in einer einfachen Strukturanalyse (PredictProtein-Server; Daten nicht gezeigt) relativ stabil bzgl. ihrer Sekundärstruktur. Deshalb ist es relativ wahrscheinlich, dass die Domäne ihre Funktionalität beibehalten kann. aidNLS-EGFP-Protein lokalisierte in den TGR-1 Rattenfibroblasten nicht spezifisch im Nukleus sondern ubiquitär verteilt. Die subzelluläre Verteilung ähnelt damit der von wt EGFP.

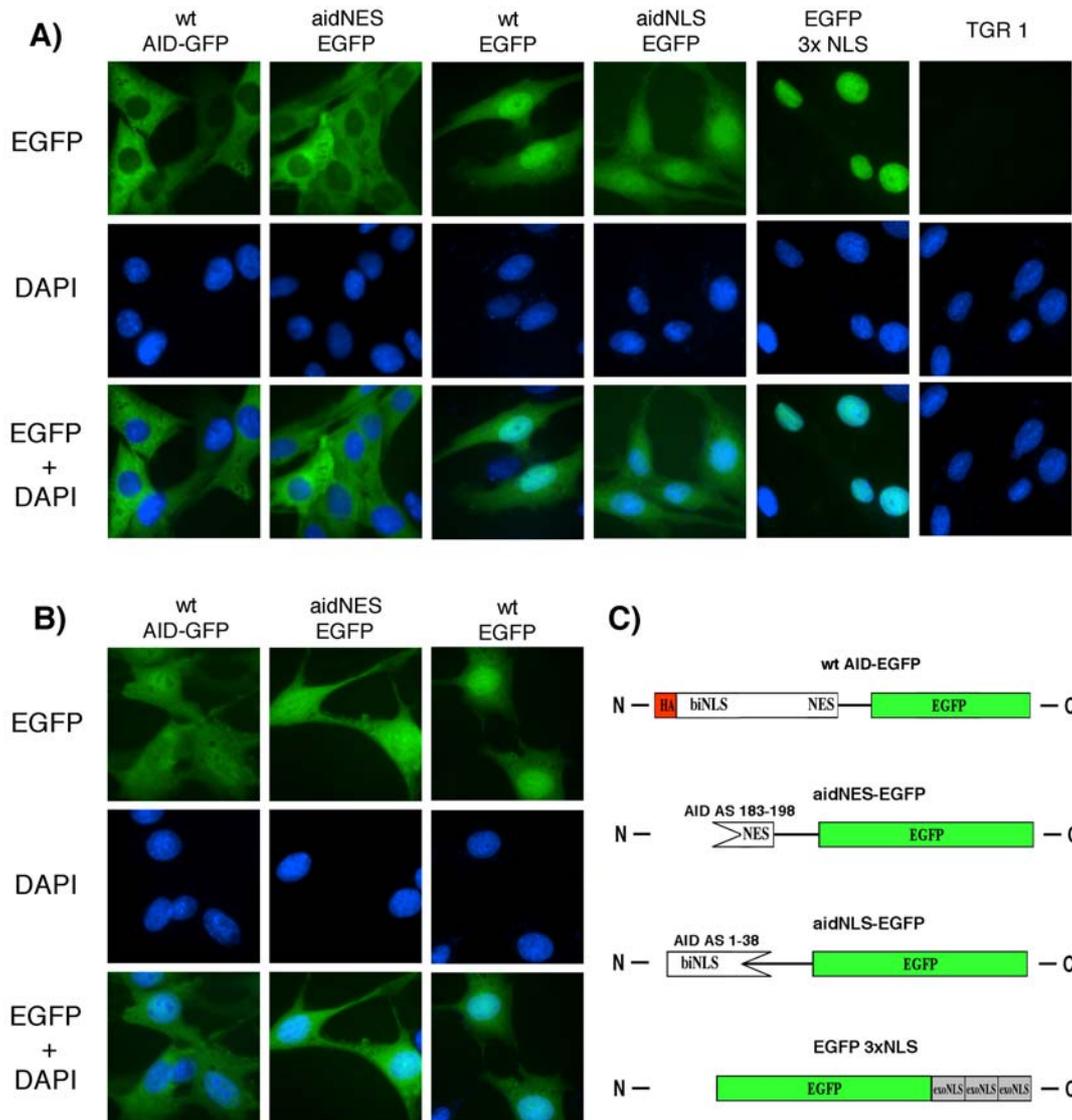


Abb. 30 Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen in TGR-1 mit und ohne Leptomycin B.

(A) **Ohne Leptomycin B:** Fluoreszenzaufnahmen von TGR-1-Zellen, die EGFP-Fusionsproteine exprimieren in Abwesenheit von Leptomycin B. (B) **Mit Leptomycin B:** Fluoreszenzaufnahmen von TGR-1-Zellen, die wt AID-EGFP, aidNES-EGFP oder wt EGFP exprimieren nach Kultur für 6h in Leptomycin B-haltigem Medium (20 ng/ml). (C) Schematische Darstellung der Fusionsproteine wt AID-EGFP, aidNES-EGFP, aidNLS-EGFP und EGFP-3xNLS. aidNES-EGFP setzt sich zusammen aus den letzten 16 AS von humanem AID und EGFP, aidNLS-EGFP ist eine Fusion der ersten 38 AS von hnAID mit EGFP. Die NLS in EGFP-3xNLS ist die aus dem „SV40 Large T-Antigen“-Protein. wt AID-EGFP wurde bereits in Abb. 28 beschrieben. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. In der Reihe EGFP+DAPI wurden die Signale von EGFP und DAPI übereinander gelegt. Untransfizierte TGR-1 Zellen dienen als Negativ-Kontrolle für EGFP. EGFP-3xNLS und wt EGFP werden nur transient exprimiert, wt AID-EGFP, aidNES-EGFP und aidNLS-EGFP werden in stabilen Zelllinien exprimiert.

Im Gegensatz dazu befindet sich eine Fusion von GFP mit 3 NLS-Sequenzen des „SV 40 Large T-Antigen“ (EGFP3xNLS) spezifisch im Nukleus (Abb. 30 A). Das bedeutet, unter der Voraussetzung, dass die Fusion mit GFP die Funktionalität wirklich nicht beeinträchtigt hat, dass die AS 6 bis 24 von AID vermutlich nicht die postulierte zweiteilige NLS-Sequenz bilden, oder aber nur eine extrem schwache NLS darstellen.

Die Fusion der letzten 16 C-terminalen AS von AID inklusive der potenziellen NES an EGFP (aidNES-EGFP; Abb. 30C) führte zu einer vollständigen zytoplasmatischen Lokalisation der GFP-Fluoreszenz. Offensichtlich wird EGFP in diesem Fall quantitativ aus dem Nukleus exportiert. Dieser Kernexport wird über den CRM1-Exportweg vermittelt, weil durch Zusatz von Leptomycin B zum Medium die Lokalisation von wt AID-EGFP und aidNES-EGFP von einer rein zytoplasmatischen Lokalisation zu einer ubiquitären Verteilung der Proteine wie bei wt GFP wechselte (Abb. 30B). Mit Leptomycin B lassen sich wie bereits erwähnt CRM1 abhängige Kernexportvorgänge blockieren (Nishi et al., 1994; Ossareh-Nazari et al., 1997).

3.3.8 Kerntransportmutanten von AID können Nalm-6 zur Hypermutation anregen

Einer der Gründe für die Suche nach Kerntransportsequenzen in AID war die Theorie, dass eine veränderte subzelluläre Lokalisation von überexprimiertem AID die Ursache für das Ausbleiben von Hypermutation in Nalm-6 sein könnte. Um diese Frage experimentell zu beantworten, wurden einige der Kerntransportmutanten von AID auf ihre Hypermutationsaktivität in Nalm-6 hin untersucht. Dazu wurden die pCAGGS-Expressionsvektoren für wt AID, AID Δ NES, NLS-AID und AID-3xNLS in Nalm-6 Zellen zusammen mit einem modifizierten Reporterkonstrukt, ptk-GFP $_{stop}$ -NGFR, co-transfiziert. Die Modifikation des Reportersystems wurde nötig, weil Nalm-6 Zellen nur auf Puromycin als Selektionsmarker sensitiv reagieren und dieser bereits durch die pCAGGS-Vektoren belegt ist. Der Aufbau von ptk-GFP $_{stop}$ -NGFR ist im Prinzip analog zu ptk-GFP $_{stop}$, die Puromycinresistenzkassette wurde aber durch eine NGRF-Expressionskassette ersetzt. Dadurch kann die Präsenz des GFP-Reporters in transfizierten Klonen durch anti-NGFR Immunfärbungen nachgewiesen werden. Für jede der vier Transfektionen (s.o.) wurden 10 unabhängige, NGFR-positive Klone etabliert (siehe Abb. 31). In Übereinstimmung mit den vorhergehenden Experimenten konnte auch diesmal wt AID keine Hypermutation in Nalm-6 bewirken. Keiner (0 von 10) der wt AID-Transfektionsklone enthielt in der Durchflusszytometrie GFP-Revertanten. Transfektion mit pCAGGS NLS-AID führte ebenfalls nicht zu Hypermutation. Verblüffenderweise konnten dagegen die Mutanten AID Δ NES und AID-3xNLS eindeutig Reversionsereignisse induzieren. Von den 10 AID Δ NES/GFP-Transfektionsklonen wiesen immerhin 5 Klone (50%) grün-fluoreszierende Zellen auf mit einer mittleren Reversionsfrequenz von 11.8 Revertanten pro 10^5 lebende Zellen. Die AID-3xNLS/GFP-

Transfektionsklone wiesen sogar zu 90% (9 von 10) GFP-Revertanten mit einer mittleren Reversionsfrequenz von 26.0 Revertanten pro Klon auf.

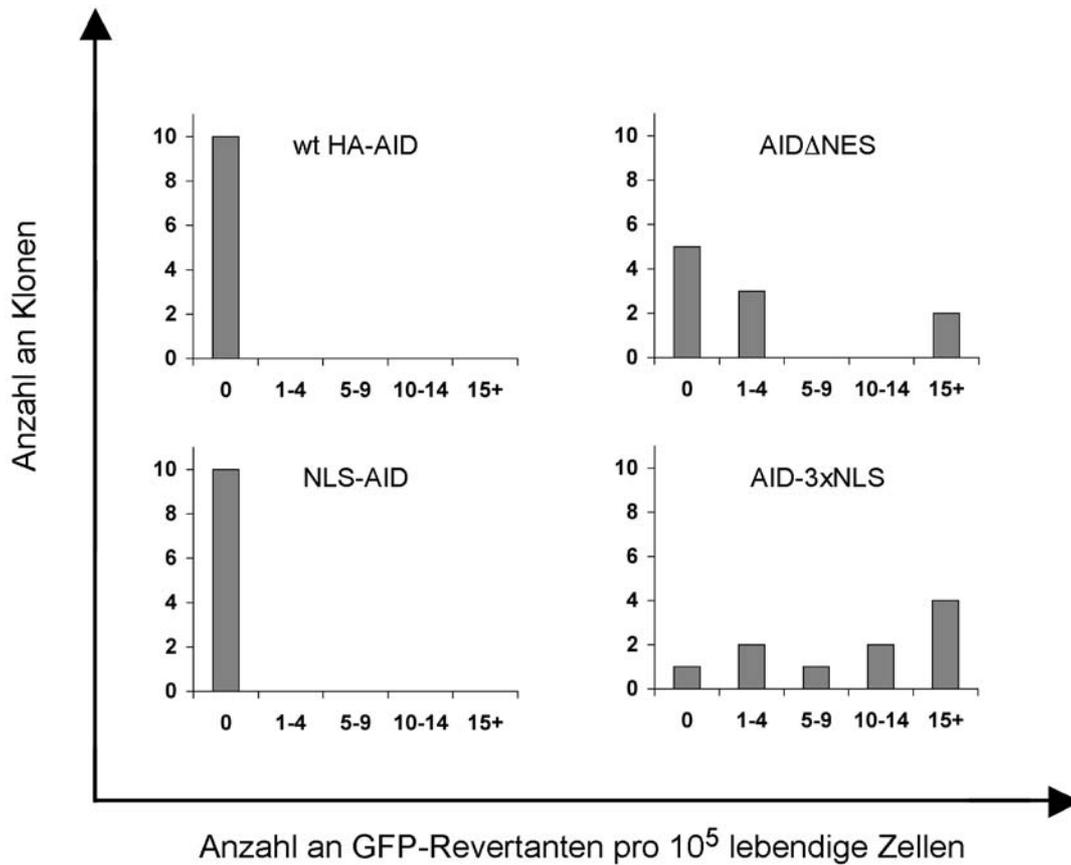


Abb. 31 GFP-Reversionsfrequenzen für verschiedene Lokalisationsmutanten von AID, die stabil zusammen mit dem Reporterkonstrukt *ptk-GFP^{stop}-NGFR* in Nalm-6-Zellen transfiziert worden sind. Die Revertantenfrequenz pro 10^5 lebende Zellen wurde durch durchflusszytometrische Analyse von jeweils 10 unabhängigen Transfektionsklonen bestimmt. Die Skalierung der X-Achse ist wie folgt zu lesen: 0 Revertanten pro 10^5 Zellen, 1-4 Revertanten pro 10^5 Zellen, 5-9 Revertanten pro 10^5 Zellen, 10-14 Revertanten pro 10^5 Zellen, über 15 (>15) Revertanten pro 10^5 Zellen; Y-Achse: Anzahl an unabhängigen Transfektionsklonen (von 10).

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse für 18-81 (Subklon #1-5) und Nalm-6 bzgl. der Induktion von Hypermutation durch diese AID-Proteine gegenübergestellt. Der Vergleich der Ergebnisse ist nur bedingt möglich, weil der 18-81 Subklon #1-5 im Gegensatz zu Nalm-6 endogenes AID exprimiert. Trotzdem ist offensichtlich, dass die AID-3xNLS-Mutante in beiden Systemen ungefähr gleich aktiv ist. Das beweist zum einen deutlich, dass im Prinzip in Nalm-6 alle für Hypermutation erforderlichen *trans*-Faktoren vorhanden sind. Zum anderen ist klar, dass wt HA-AID offensichtlich durch andere Einflüsse (z. B. über regulierte subzelluläre Lokalisation) in seiner Aktivität blockiert wird. Inwieweit die

Kerntransportmutanten wirklich zu einer veränderten subzellulären Lokalisation führen, lässt sich bis jetzt nicht bestimmen, weil der Nachweis über das maskierte HA-Epitop nicht möglich ist. Nichtsdestotrotz ist es offensichtlich, dass diese Mutanten in der Lage sind, den „Hypermutations-Block“ zu überwinden.

Zelllinie	Konstrukt	Durchschnittliche Anzahl an GFP-Revertanten pro hypermutierendem Klon	Frequenz an hypermutierenden Klonen [%]
#1-5 (18-81)	Leervektor	1.0	50
	wt AID	6.5	81
	NLS-AID	7.8	94
	AID-3xNLS	25.6	81
	AID Δ NES	35.5	81
Nalm-6	wt AID	0.0	0
	NLS-AID	0.0	0
	AID-3xNLS	26.0	90
	AID Δ NES	11.8	50

Tab. 2 Vergleich der Reversionsaktivität verschiedener AID-Lokalisationsmutanten in Subklon #1-5 (18-81) und Nalm-6 Zellen.

3.4 Charakterisierung von anti-AID-Antikörpern

3.4.1 Anti-AID-Antikörper erkennen AID in der Immunfluoreszenz

Die Experimente mit AID in Nalm-6 Zellen haben bewiesen, dass diese Zelllinie eine wichtige Rolle bei der Identifizierung AID-regulierender und evtl. interagierender Proteine spielen könnte. Deshalb sollte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von B. Jungnickel (GSF, München) eine Methode etabliert werden, um mittels Immunaffinitätsreinigung AID-interagierende Proteine identifizieren zu können. S. Tobollik stellte in Zusammenarbeit mit E. Kremmer im Rahmen ihrer Diplomarbeit 3 Peptidantikörper gegen humanes AID her. Diese Antikörper, die aus der Ratte stammen, sind gegen die letzten 15 AS von humanen AID gerichtet. Sie eignen sich zum Nachweis von endogenem, denaturiertem AID in Western-Blot-Analysen (persönliche Mitteilung, S. Tobollik, GSF, München, und Greiner et al., 2005).

Daher bietet es sich an, diese Antikörper für die Etablierung einer Immunaффinitätsreinigung von AID-Komplexen zu verwenden. Hierfür sollte überprüft werden, ob bzw. welcher dieser anti-AID Antikörper (EK2-5C7, EK2-5G9 und EK2-2H5) in der Immunfluoreszenz AID erkennen kann (Abb. 32). Die Immunfluoreszenzen wurden mit Nalm-6 Zellen durchgeführt, die kein endogenes AID besitzen. Mit den Antikörpern EK2-5C7, EK2-5G9 und EK2-2H5 sollte die Expression von HA-AID nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde ein AID Δ NES-Klon benutzt. Da AID in diesem Klon die letzten 14 C-terminalen AS fehlen und die anti-AID-Antikörper gegen die letzten 15 C-terminalen AS gerichtet sind, sollte dieses verkürzte AID-Protein nicht von den anti-AID-Peptidantikörpern erkannt werden können. Alle 3 Antikörper waren in der Lage, rekombinantes HA-AID-Protein nach PFA-Fixierung in Nalm-6 Zellen nachzuweisen. Der Antikörper EK2-2H5 zeigte dabei die größte Signalintensität, der Antikörper EK2-5G9 trotz geringerer Signalintensität jedoch das spezifischste Signal mit der geringsten Hintergrundfärbung. Der Antikörper 5C7 liegt bzgl. Signalintensität und Spezifität zwischen den beiden anderen. Keiner der Antikörper konnte AID Δ NES nachweisen. Offensichtlich sind alle drei Antikörper in der Lage, spezifisch gefaltetes AID-Protein zu erkennen.

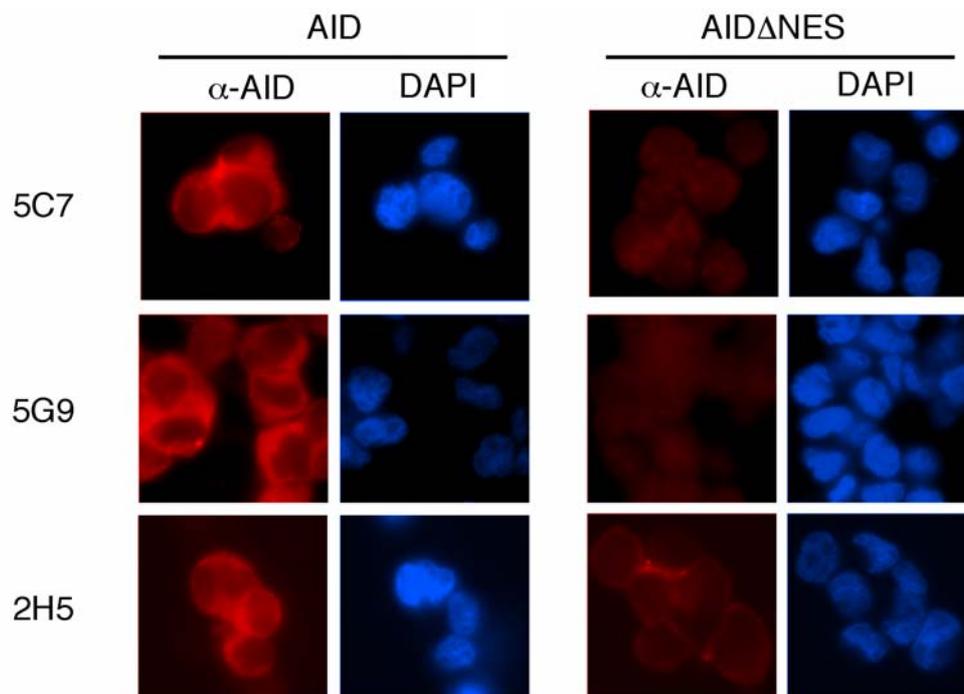


Abb. 32 Anti-AID-Antikörper erkennen überexprimiertes AID in der Immunfluoreszenz. Abgebildet sind Nalm-6-Zellen, die stabil entweder mit wt AID oder AID Δ NES transfiziert worden sind. Die Zellen eines jeweils repräsentativen Klons wurden mit 4% PFA/PBS fixiert. Für beide Klone wurde je eine anti-AID Immunfluoreszenzfärbung mit den Antikörpern EK2-5C7, EK2-5G9 und EK2-2H5 durchgeführt (rot). Da die anti-AID-Peptidantikörper gegen die letzten 15 AS des C-Terminus von AID gerichtet sind, fungiert der AID Δ NES-Transfektionsklon als Negativkontrolle. Die residuale Färbung der Zellen in den Negativkontrollen ist auf eine unspezifische Hintergrundfärbung des sekundären Antikörpers zurückzuführen. Um den Zellkern vom Zytoplasma unterscheiden zu können, wurden die Zellkerne mit DAPI eingefärbt (blau).

3.4.2 AID-Antikörper erkennen vermutlich AID in der Immunpräzipitation

Um die Antikörper für eine Immunaффinitätsreinigung von AID-interagierenden Proteinen benutzen zu können, müssen sie natives Protein in einer Immunpräzipitation (IP) erkennen können. Unglücklicherweise ist die leichte Kette von Antikörpern von ähnlichem Molekulargewicht wie AID. Im Gelelektrophoreseschritt einer Western-Blot-Analyse lassen sich die beiden Proteine nicht voneinander trennen, so dass in dem sich der IP anschließenden Western-Blot die Diskriminierung zwischen AID und der konsequenterweise sehr abundanten leichten Kette stark erschwert ist. Um die Immunpräzipitation von AID trotzdem nachweisen zu können und gleichzeitig das Co-Migrationsproblem zu umgehen, wurden Gesamtzellextrakte von Nalm-6 radioaktiv mit ^{35}S markiert. Das hat den Vorteil, dass die für die IP verwendeten Antikörper nicht radioaktiv markiert werden und demzufolge in der Autoradiographie das Signal für AID nicht überlagern können. In Abb. 33 ist ein Beispiel für eine derartige Immunpräzipitation gezeigt. In diesem Fall wurden Nalm-6 Zellen und ein NLS-AID-Klon radioaktiv markiert. Der NLS-AID-Klon wurde benutzt, weil er sich besser als wt HA-AID von einem anderen radioaktiv-markierten Protein diskriminieren lässt, das in der IP unspezifisch an die Sepharose-Matrix bindet (Daten nicht gezeigt). Die Immunpräzipitation wurde bei niedrigen Salzkonzentrationen durchgeführt, um die Bindung zwischen Antikörper und AID nicht einzuschränken.

Unter diesen Bedingungen bindet jeder der drei Antikörper (5C7, 5G9 und 2H5) spezifisch ein radioaktiv markiertes Protein, das auf der für NLS-AID zu erwartenden Höhe im Gel migriert (siehe Abb. 33). In AID-negativen Extrakten (untransfizierte Nalm-6 Zellen) fehlt diese deutliche Bande fast völlig. Das mutmaßliche AID-Protein wird spezifisch von den anti-AID-Antikörpern und nicht von der Sepharose-Matrix präzipitiert, weil die „AID“-Bande ohne die Verwendung von Antikörper in AID-positiven Extrakten in der Autoradiographie ebenfalls praktisch fehlt.

Demzufolge ist vermutlich jeder der drei Antikörper (5C7, 5G9 und 2H5) geeignet, nicht nur denaturiertes AID-Protein, sondern auch natives AID spezifisch zu binden. Nach diesem Resultat eröffnet sich nun die Möglichkeit, mit Hilfe dieser anti-AID-Antikörper AID-Komplexe zu präzipitieren.

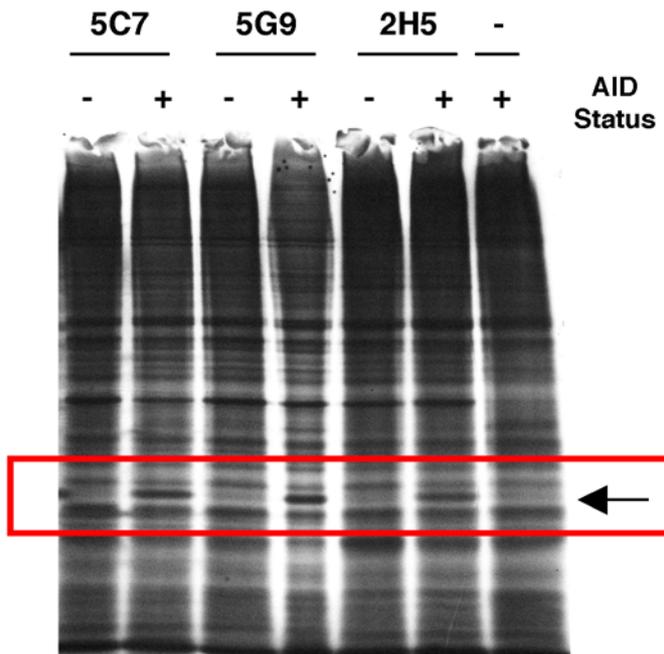


Abb. 33 Immunpräzipitation von radioaktiv markiertem NLS-AID. Nalm-6 Zellen (AID-Status: —) und Zellen eines Nalm-6 NLS-AID-Transfektionsklons (AID-Status: +) wurden radioaktiv mit ^{35}S markiert und Zellextrakte gewonnen. Mit beiden Extrakten und mit jeweils einem der anti-AID-Antikörper (EK2-5C7, EK2-5G9 und EK2-2H5) wurde jeweils ein Immunpräzipitationsexperiment durchgeführt. Um das Ausmaß unspezifischer AID-Bindung an die Matrix beurteilen zu können, wurde ein Experiment ohne Antikörper durchgeführt (letzte Spur). Die präzipitierten Proteine wurden via SDS-PAGE aufgetrennt, gebロットet und mittels Autoradiographie visualisiert. NLS-AID-Protein sollte auf der durch den Pfeil symbolisierten Laufhöhe migrieren.

3.4.3 AID liegt in der Zelle in Komplexen vor

Ziel einer Co-Immunpräzipitation ist es, bis dato nicht identifizierte AID-interagierende Proteine zu präzipitieren und anschließend mittels massenspektroskopischen Methoden zu identifizieren. Um zu klären, ob AID überhaupt in Komplexen vorliegt bzw. wie stabil diese Komplexe sind, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt.

In der sich der IP anschließenden massenspektroskopischen Analyse muss man sich sicher sein können, dass es sich bei den identifizierten Proteinen wirklich um Bestandteile von AID-Komplexen handelt. Deshalb ist es notwendig, dass man eine IP etabliert, die für AID-Protein hochspezifisch ist und eine geringstmögliche Kontamination an unspezifisch gebundenen Proteinen aufweist. Um die Anzahl an unspezifisch gebundenen Proteinen zu reduzieren, kann man die in der IP verwendete Salzkonzentration der Puffer erhöhen. Um zu überprüfen, ob dies aber gleichzeitig zum Zerfall und damit konsequenterweise zum Verlust von AID-Proteinkomplexen führt, wurden die Gelfiltrationsexperimente bei verschiedenen Salzkonzentrationen durchgeführt, und anschließend die Größe der AID-Komplexe im Western-Blot analysiert.

Bei einer Gelfiltration werden Proteine bzw. native Proteinkomplexe gemäß ihrer Größe (bzw. Volumen) aufgetrennt und anschließend in Fraktionen gesammelt, wobei die hochmolekularen Komplexe als erstes eluieren. Durch einen Vergleichslauf mit Proteinen definierter Größe kann man in etwa auf die Molekulargröße der Proteine in den verschiedenen Fraktionen schließen. In einer Western-Blot-Analyse können dann die Fraktionen auf den

Gehalt an bestimmten Proteinen hin untersucht werden. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse dieser Western-Blot-Analysen nach den Gelfiltrationsexperimenten abgebildet. In Nalm-6 liegt NLS-AID bei physiologischen Salzkonzentrationen (ca. 150 mM) fast ausschließlich in Komplexen mit einem Molekulargewicht über 200 kDa vor. Das Ausschlussvolumen der verwendeten Säule liegt bei ca. 5 MDa. Komplexe, die diese Größe überschreiten, werden nicht mehr weiter aufgetrennt. Das heißt, dass sich die ersten Elutionsfraktionen aus Proteinkomplexen mit einer Größe von über 5 MDa zusammensetzen. Mit zunehmender Salzkonzentration (350 mM, 550 mM) nimmt die Quantität an hochmolekularen Proteinkomplexen langsam ab und es entstehen kleinere Komplexe. Um auszuschließen, dass sich überexprimiertes, rekombinantes AID in Nalm-6 Zellen völlig anders verhält als endogen exprimiertes AID, wurde ein ähnliches Gelfiltrationsexperiment mit Raji-Zellextrakten bei 350 mM Salz durchgeführt. Die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji exprimiert endogenes AID und hypermutiert konstitutiv (J. Bachl, GSF, München, persönliche Kommunikation und Albert et al., 1994). Auch in diesen Zellen liegt AID in hochmolekularen Komplexen vor, allerdings auch als Mono- und Dimer. Zur Kontrolle der Bedingungen wurde der gleiche Versuch (350 mM) mit Nalm-6 Zellen durchgeführt, die GFP überexprimieren. GFP findet sich im Western-Blot nur in den niedermolekularen Fraktionen der Gelfiltration. Demzufolge liegt GFP als Monomer vor. Diese Kontrollen legen nahe, dass vermutlich die Herstellung der Extrakte nicht zu Aggregatbildung führt. Auffällig ist dennoch, dass AID insbesondere in Nalm-6 in fast allen Fraktionen vorkommt. Es lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht ausschliessen, dass sich in Nalm-6 durch die Überexpression von AID unphysiologische Komplexe bzw. Präzipitate bilden, die ein „Schmierer“ über die Säule bewirken. Es bedarf weiterer Gelfiltrationsexperimente mit anderen Zelllinien (v.a. endogen AID-exprimierender Zelllinien wie Raji), um die physiologische Authentizität distinkter Komplexe wirklich beweisen zu können.

Ich bin fest davon überzeugt, dass die Identifizierung der Zusammensetzung von AID-Komplexen und Abweichungen davon in verschiedenen Zelllinien (z. B. in Nalm-6-Zellen) in Zukunft erheblichen Einfluss auf die Erforschung der molekularen Mechanismen von Somatischer Hypermutation haben wird.

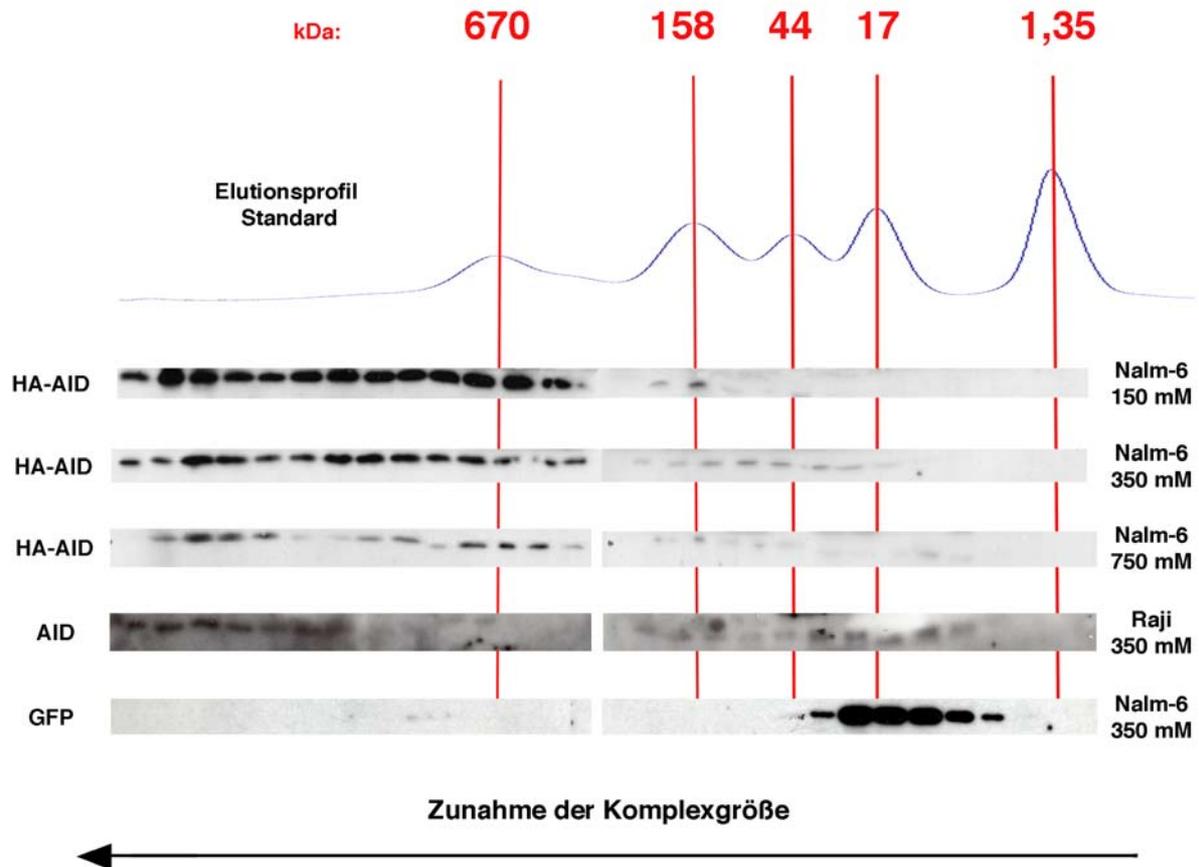


Abb. 34 Fraktionierung von AID-Komplexen bei unterschiedlichen Salzbedingungen. Um die Stabilität von AID-Komplexen zu untersuchen, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Die Gesamtzellextrakte wurden aus 1×10^8 Zellen eines Nalm-6 NLS-AID-Transfektionsklons, eines Nalm-6 GFP-Transfektionsklons oder der endogenen AID-exprimierenden und konstitutiv hypermutierenden Zelllinie Raji gewonnen. Die Extraktgewinnung und anschließende Gelfiltration wurden bei 150, 350 oder 750 mM KCl-Konzentration durchgeführt. Von den gesammelten Fraktionen wurden je zwei aufeinander folgende vereint, mit Trichloressigsäure die enthaltenen Proteine präzipitiert und anschließend mittels Western-Blot auf Gehalt an HA-AID, endogenem AID oder GFP Protein überprüft. Um die einzelnen Fraktionen einer ungefähren Komplexgröße von Proteinen zuordnen zu können, wurde ein Gelfiltrationsstandard (Biorad) analog in einem weiteren Gelfiltrationsexperiment aufgetrennt. Das mittels A_{280} -Messung ermittelte Elutionsprofil des Standards ist über den Western-Blots abgebildet. 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).

4 Diskussion

Mit der Entdeckung von AID hat die Erforschung der molekularen Mechanismen, die SHM und CSR zu Grunde liegend, einen Quantensprung gemacht. Die Beobachtung und Manipulation der von AID induzierten Prozesse ermöglicht es, direkte Erkenntnisse über die initialen Schritte der beiden Mechanismen zu gewinnen. Vor allem ein besseres Verständnis dafür, ob und wie es in Zellen zu einer Deregulation dieser AID-abhängigen Prozesse kommen kann, ist von großer Bedeutung. Die Deregulation dieser Prozesse steht im Verdacht, für aberrante Somatische Hypermuation (ASHM) und fehlerhafte Rekombinationsereignisse und damit letztendlich für Tumorentstehung (z. B. bei Burkitt-Lymphomen) verantwortlich zu sein.

4.1 Der Einfluss von *cis*- und *trans*-Faktoren auf SHM

Somatische Hypermuation ist ein hochkomplexer Prozess, der vermutlich auf zahlreichen Ebenen reguliert wird. Die Identifizierung all dieser regulatorischen Facetten ist Gegenstand aktueller Forschung und es besteht Bedarf an Methoden, die die Diskriminierung der unterschiedlichen Regulationsmechanismen ermöglichen. Die Verwendung von zwei Reportertransgenen im Reversionsassay kann bei dieser Unterscheidung hilfreich sein. Ich konnte dadurch bestimmen, ob die Veränderungen der Mutationsaktivität in der hypermutierenden Zelllinie 18-81 von *cis*- oder *trans*-Faktoren verursacht werden. Ich konnte zeigen, dass die Abnahme der Expression eines zentralen *trans*-Faktors, nämlich AID, ursächlich für die Abnahme der Hypermuationsfähigkeit der Zelllinie 18-81 verantwortlich ist. Im Laufe längerer Zellkulturphasen nimmt das endogene AID mRNA-Expressionsniveau ab. In Ermangelung verlässlicher Antikörper gegen AID aus der Maus wurde das AID-mRNA-Niveau anstelle des AID-Protein-Niveaus untersucht. Es ist gegenwärtig unklar, ob die Expression von AID posttranslational reguliert wird. In den untersuchten 18-81 Subklonen korrelierten jedoch die reduzierten mRNA-Mengen gut mit den verringerten Mutationsraten auf dem GFP-Reportertransgen. Eine sehr ähnliche Beobachtung hatten Zhang et al. (2001) in der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ramos gemacht. Sie spekulierten, dass ein Grund für eine etwaige Selektion gegen hohe AID-Expression der mutagene Effekt von AID sein könnte. In der Tat deuten einige Publikationen an, dass AID-induzierte Mutationen nicht exklusiv auf den Ig-Locus beschränkt sind (Pasqualucci et al., 2001; Martin & Scharff, 2002) und dass AID prinzipiell Genom-weit aktiv sein kann (Wang et al., 2004). Daher ist es

denkbar, dass AID-Expression *per se* schädlich für die Zellen ist, z. B. durch Einführung von Mutationen in essentiellen Genen. Zellen mit einem verminderten AID-Expressionsniveau wären demzufolge im Laufe längerer Zellkulturphasen in ihrem Wachstum bevorzugt. Die endogenen AID-Expressionsspiegel nahmen jedoch nicht in gleichem Maße in allen Zellen der 18-81 Ausgangskultur (pI-GFP*stop*) ab. Die Analyse der individuellen Subklone ergab ein breites Spektrum an AID mRNS-Mengen und korrespondierenden Mutationsraten. Allerdings ist die Expression von AID in keinem der Klone vollständig eingestellt worden. Eventuell gibt es einen Schwellenwert für AID-Expression, unterhalb dessen AID-Expression nicht mehr länger gegenselektioniert wird.

Die Expressionsunterschiede in den endogenen AID mRNS-Mengen innerhalb der analysierten pI-Subklone waren relativ gering. Ein Faktor von 4 trennt Subklon #1-1 von #1-5. Offensichtlich haben bereits geringe Alterationen im Transkriptionniveau von AID einen deutlichen Effekt auf die Mutationsrate. In Analogie dazu berichten Arakawa et al., dass monoallelische Expression von AID in für *aicda* +/- heterozygoten DT40 Zellen einen drastischen Verlust an AID-abhängiger Genkonversion bewirkt (Arakawa et al., 2002).

Überexpression von rekombinantem humanen AID rekonstituierte den Mutationsphänotyp in Subklon #1-5, und ist, offensichtlich aufgrund der hohen Konservierung (93%), in der Lage, das AID der Maus zu ersetzen. Die Mutationsraten, die auf dem GFP-Transgen gemessen wurden, waren für AID-überexprimierende Klone und stark hypermutierende 18-81 Zellen mit hohen endogenen AID mRNS-Mengen vergleichbar. Die Abnahme der endogenen AID-Expression ist also vermutlich der wichtigste Grund für die abnehmenden Mutationsraten in diesen Langzeitkulturen. In einigen seltenen YFP/GFP-Transfektionsklonen konnte ich beobachten, dass AID-Überexpression die Hypermutationsaktivität nicht wieder herstellen konnte (Daten nicht gezeigt). Vermutlich werden in diesen Zellen auch noch weitere *trans*-Faktoren, die die Aktivität von SHM beeinflussen können, moduliert. Alternativ könnten auch die Reportertransgene in diesen Klonen defekt gewesen sein.

Die Reversionsanalyse der von 18-81 abgeleiteten GFP/YFP/AID-Klone erbrachte eine weitere Erkenntnis. Während das GFP-Transgen nach transkriptioneller Induktion kontinuierlich im Verlaufe der fünftägigen Expansionsphase hypermutiert wurde, blieb die Frequenz der YFP-Revertanten im Wesentlichen unverändert. Die hohe Anzahl an YFP-Revertanten in den GFP/YFP/AID-Transfektionsklonen deutet jedoch eindeutig an, dass das konstitutiv transkribierte *ptk*-YFP*stop*-Transgen zumindest vorübergehend hypermutiert wurde. Durch die Verwendung des zweiten Reportergens (pI-GFP*stop*) kann diese Beobachtung klar auf einen *cis*-Effekt zurückgeführt werden. Die kontinuierliche

Hypermuation auf dem pI-GFP $stop$ -Transgen nach Induktion zeigt eindeutig, dass die stationäre Frequenz von YFP-Revertanten nicht auf einen *trans*-Effekt zurückzuführen ist. Das AID-induzierte Mutationssystem ist in diesen Zellen aktiv, weil seine Aktivität mit dem GFP-Transgen immer noch nachgewiesen werden kann.

Eine Erklärung für das divergierende Verhalten der beiden Reportertransgene wäre, dass sich in dem konstitutiv transkribierten YFP-Transgen bereits während der Selektionsphase Vorwärtsmutationen ereigneten. Diese zusätzlichen Mutationen könnten das YFP-Transgen bereits derart beeinträchtigt haben, dass eine Reversion des vorzeitigen Stopp-Kodons wirkungslos bleibt. Im Gegensatz zum YFP-Gen konnte das GFP-Transgen während der Selektionsphase noch keine Mutationen akkumulieren, da es nicht transkribiert wurde und demnach unzugänglich für das AID-induzierte Mutationssystem war. Yoshikawa et al. benutzten das gleiche induzierbare GFP-Transgen in AID-überexprimierenden Fibroblasten und konnten zeigen, dass sich nach dessen transkriptioneller Induktion Punktmutationen mit einer hohen Frequenz auf dem gesamten GFP-Gen befinden (Yoshikawa et al., 2002). Daher ist es anzunehmen, dass sich im Laufe der Zellkulturphase eine Balance zwischen Reversions- und Vorwärtsmutation auf den transkribierten Transgenen einstellt. Um dieser Frage nachzugehen, sollte man das YFP-Transgen sequenzieren und dessen „Mutationslast“ bestimmen. Alternativ, allerdings bislang völlig spekulativ, könnte das ptk-YFP $stop$ -Transgen während der Zellkulturphase eine Transition von hypermutierbar zu nicht-hypermutierbar gemacht haben. Epigenetische Veränderungen im Bereich des ptk-YFP $stop$ -Transgens, ohne direkten Einfluss auf die Transkription, könnten eine solche hypothetische Transition bewirken. Theoretisch wären solche epigenetische Veränderungen erreichbar z. B. durch ein verändertes DNS-Methylierungsmuster oder durch veränderte Histonmethylierung bzw. Histonacetylierung. In der Tat beschrieben Woo et al., dass eine unspezifische Hyperacetylierung des Immunglobulin-Locus (durch Behandlung von Zellen mit Trichostatin A) zu einer Verlängerung des Hypermuationsbereiches führte (Woo et al., 2003). Es wird deshalb in Zukunft wichtig sein, derartige epigenetische Veränderungen bei der Analyse von Hypermuationsfrequenzen zu berücksichtigen. Eine der nahe liegendsten Fragen ist, inwieweit die diversen Ig-Enhancer-Elemente und die Transkriptionsinduktion des pI-GFP $stop$ -Transgens zur Definition des Hypermuationsbereich beitragen (Targeting).

Die Benutzung des zweifachen Reportersystems kann dabei äußerst hilfreich sein, um *cis*- von *trans*-Faktor-verursachten Veränderungen während der SHM zu diskriminieren.

Des Weiteren zeigen meine Daten, dass der GFP-basierte Reversionsassay auch dazu benutzt werden kann, potenziell mutagene Agenzien in Zelllinien zu überprüfen. Thymidinzusatz zum

Medium induzierte einen starken Mutationsphänotyp in Nalm-6 Zellen. In einigen Experimenten zeigten bis zu 90 % aller ptkGFP^{stop}-Transfektionsklone signifikante Reversionsfrequenzen nach 3 Tagen in Thymidin-haltigem Medium (Daten nicht gezeigt). In einzelnen AID-Klonen von Nalm-6 konnten Mutationsraten bis zu 7.9×10^{-5} mut/bp/gen gemessen werden. Dieser Thymidin-induzierte Mutationsphänotyp ist nicht auf die Induktion endogener AID-Expression zurückzuführen. Thymidin-behandelte Nalm-6 Zellen exprimierten kein endogenes AID. Es bedarf weiterer Studien um zu verstehen, warum Thymidinzusatz zum Medium in Nalm-6 so hohe Hypermutationsraten induzieren kann. Dass Thymidin in hohen Konzentrationen mutagen sein kann, ist bereits seit langem bekannt (Bradley & Sharkey, 1978; Kresnak & Davidson, 1992). Vermutlich wird dadurch die dNTP-Biosynthese gestört (Goncalves et al., 1984). Diese Mutagenese erfolgt vermutlich nicht transkriptions- sondern replikationsabhängig (Phear & Meuth, 1989).

Offensichtlich ist unter gewissen Umständen der GFP-basierte Reversionsassay also geeignet, sowohl Protein-induzierte, als auch chemisch-induzierte Mutagenese zu messen.

4.2 Subzelluläre Lokalisation von AID und Domänenstruktur

Es ist sehr wahrscheinlich, dass AID durch Co-Faktoren in seiner Aktivität reguliert wird. Um festzustellen, auf welche Art und Weise diese Regulation erfolgen könnte, ist es unerlässlich die Domänenstruktur von AID näher zu charakterisieren. Aufgrund der Sequenzhomologie zu APOBEC-1 lässt sich das enzymatisch aktive Zentrum von AID sehr gut den AS 56 bis 94 zuordnen. Die weiteren Sequenzabschnitte weisen jedoch nur eine schwache Sequenzhomologie mit APOBEC-1 auf. Meine Arbeit sollte dazu beitragen, die offensichtliche Diskrepanz zwischen der beobachteten prädominant zytoplasmatischen Lokalisation von AID (Rada et al., 2002a) und der postulierten Wirkungsweise (DNS bzw. RNS-Desaminierung) besser zu verstehen. Da beide Theorien zwingend eine zumindest transiente Kernlokalisation von AID voraussetzen, muss es eine Möglichkeit für AID geben, in den Kern zu translozieren. Das würde auch erklären, warum die Hypermutationsraten in AID-exprimierenden *E. coli* (Petersen-Mahrt et al., 2002) deutlich höher sind als in B-Zelllinien. Da Prokaryoten im Gegensatz zu Eukaryoten keine Kompartimentierung in Kern und Zytoplasma haben, würde diese regulatorische Ebene entfallen.

Das RNS-editierende Enzym APOBEC-1 ist prädominant im Zytoplasma lokalisiert. Erst in Anwesenheit des APOBEC-1 Komplementationsfaktors (ACF) wird APOBEC-1 in den Kern transloziert (Blanc et al., 2001). Die für diese Translokation notwendige NLS wird von ACF

beigesteuert (Blanc et al., 2003). AID enthält auf Ebene der Aminosäure-Primärsequenz ebenfalls eine potenzielle zweiteilige NLS-Sequenz am N-Terminus. Ein spezieller NLS-tragender Co-Faktor (wie ACF) für den aktiven Kerntransport wäre also nicht zwingend notwendig. Deshalb habe ich versucht, den Einfluss der subzellulären Lokalisation von AID auf die Hypermutationsaktivität zu bestimmen. Dafür wurden mutiertere AID-Proteine mit potenziell unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation hergestellt.

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur subzellulären Lokalisation von humanem AID sind relativ eindeutig. Ich konnte in der Immunfluoreszenz bestätigen, dass exogen exprimiertes AID in B-Zellen der Maus überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 27). Ebenso befindet sich HA-AID in Rattenfibroblasten, humanen Fibroblasten und humanen embryonalen Nierenzellen (Zelllinie 293-T) prädominant im Zytoplasma (Daten nicht gezeigt). Die zytoplasmatische Lokalisation von humanem AID ist also vermutlich auf intrinsische Merkmale von AID zurückzuführen, weil sie unabhängig vom verwendeten Zellsystem (B-Zellen, Fibroblasten, Nierenzellen) und Modellorganismus (Mensch, Maus, Ratte) zu beobachten ist. Dies wird auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Rada et al., 2002a; Brar et al., 2004; Ito et al., 2004; McBride et al., 2004; Pasqualucci et al., 2004; Wu et al., 2005). Gleiches gilt auch für AID im Huhn (H. Arakawa, GSF-Neuherberg, München; persönliche Mitteilung). Die meisten dieser Beobachtungen basieren auf Fluoreszenzanalysen unter dem Mikroskop.

Eine wesentliche Ursache für die prädominante zytoplasmatische Lokalisation von AID ist die Anwesenheit einer nukleären Exportsequenz am C-Terminus von AID. Ich konnte zeigen, dass eine AID-Mutante ohne NES als Fusionsprotein mit EGFP (AID Δ NES-EGFP) nicht mehr prädominant zytoplasmatisch vorliegt. In Analogie verlagert sich die Lokalisation von GFP von einer ubiquitären Verteilung hin zu einer rein zytoplasmatischen, wenn man EGFP mit den 16 Aminosäuren des C-Terminus von AID fusioniert (aidNES-EGFP). Diese offensichtliche Exportsequenz führt in CRM1-abhängiger Weise zum Export von AID aus dem Zellkern. Sowohl AID-EGFP als auch aidNES-EGFP liegen nach Inkubation mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B wieder diffus in der gesamten Zelle verteilt vor. Offensichtlich wird der im Kern vorliegende Anteil an AID-Protein nicht mehr exportiert. Dies wird auch von anderen Gruppen bestätigt (Brar et al., 2004; Ito et al., 2004; McBride et al., 2004). Ito et al. konnten zeigen, dass bereits eine Deletion der letzten 3 Aminosäuren (LGL) zum Verlust des Kernexports von AID führt (Ito et al., 2004). McBride et al. berichten, dass die minimale Anzahl an Aminosäuren, die für die Exportfunktion notwendig sind, die der Konsensussequenz (Bogerd et al., 1996) entsprechenden letzten 10 AS am C-Terminus

von AID sind. Es wäre möglich, dass die NES-Sequenz in AID einen intrinsischen Schutzmechanismus darstellt, der das Genom so vor unkontrollierter AID-Aktivität und demzufolge unbeabsichtigter Mutagenese schützt. Alternativ, falls AID doch ein RNS-editierendes Protein sein sollte, könnte die NES-Sequenz zum Beispiel auch für den Kernexport des editierten RNS-Substrats notwendig sein, wobei AID als Shuttling-Faktor fungiert.

Die Immunfluoreszenzfärbung des HA-Epitops von AID Δ NES (ohne Fusion an EGFP) ergab keine diffuse, sondern eine prädominant zytoplasmatische Lokalisation von AID. Ich führe diese unerwartete Beobachtung auf eine Maskierung des HA-Epitops im Zellkern zurück. Danach würde AID (oder zumindest einzelne Domänen) im Zellkern entweder als Bestandteil großer, kompakter Proteinkomplexe vorliegen, oder AID verändert im Zellkern seine Konformation, so dass die HA-Markierung im Inneren des Proteins verborgen ist. Wu und Kollegen (Wu et al., 2005) konnten die (mit den Fluoreszenzproteinen) beobachtete nukleäre Lokalisation von AID mit Flag-markiertem AID ebenfalls nicht nachvollziehen. Da die Flag-Epitopmarkierung von ähnlicher Größe wie die HA-Markierung ist, haben diese rekombinanten Proteine vermutlich ähnliche Eigenschaften und sind im Kern ebenfalls maskiert. Rose Mage (Bethesda, USA), die mit Kaninchen-AID arbeitet, hat Antikörper gegen den N- und C-Terminus sowie gegen den mittleren Teil von AID generiert. Sie konnte nur mit dem Antikörper gegen den mittleren Teil von AID nukleäres AID nachweisen (persönliche Mitteilung). Es erscheint also sehr wahrscheinlich, dass der N- und der C-Terminus von AID stark an der Komplexbildung im Nukleus beteiligt sind und daher für Antikörper unzugänglich sind.

Wie der Import von AID in den Kern bewerkstelligt wird, bleibt bisher unklar. Meine Beobachtungen legen nahe, dass der N-Terminus von humanem AID keine Kernimportfunktion besitzt. Zwar führt eine Punktmutation in diesem Bereich zu einem vollständigen Verlust der Hypermutationsaktivität, wie auch in einigen Hyper-IgM-Syndrom-Patienten beobachtet (Revy et al., 2000), aber diese Mutation lässt sich nicht durch die Einführung einer (NLS-AIDbix) oder mehrerer exogener Kernimportsequenzen (AIDbix-3xNLS) kompensieren. Die Tatsache, dass die Fusion der ersten 38 N-terminalen AS von AID an EGFP keine deutliche Akkumulation des Fusionsproteins im Zellkern bewirkte, spricht klar gegen eine NLS-Funktion dieses Bereiches (Abb. 30A). Auch Brar et al. (2004) und McBride et al. (2004) sehen in Ihren Experimenten keinerlei Hinweis auf eine NLS in AID. Einzig Ito und Kollegen können zeigen, dass ihr Fusionsprotein aus der NLS von AID und EGFP im Zellkern akkumuliert (Ito et al., 2004). Die offensichtliche Diskrepanz der

Ergebnisse lässt sich nicht ohne weiteres erklären, da die Experimente teilweise in identischen Zelllinien mit sehr ähnlichen Konstrukten durchgeführt wurden und sich alle Ansätze Fusionsproteinen mit GFP oder RFP („Red fluorescent Protein“) bedienen. McBride et al. benutzen sogar ein Fusionsprotein, das neben GFP und AID auch noch die Pyruvat Kinase (PK) umfasste. Das so entstandene PK-GFP-AID-Protein ist definitiv zu groß, um über freie Diffusion in den Zellkern zu gelangen. Dieses Protein translozierte auch nicht in Anwesenheit von Leptomycin B in den Kern. Erst nach Fusion mit einer exogenen NLS konnte in Gegenwart von Leptomycin B die Akkumulation des Fusionsproteins im Zellkern beobachtet werden (McBride et al., 2004).

Ito et al. konnten zeigen, dass die R24W-Mutation nicht zum Verlust der katalytischen Aktivität führt, weil diese Mutante in *E. coli* immer noch in der Lage ist, DNS zu hypermutieren (Ito et al., 2004). Offensichtlich ist das Arginin 24 im AID-Protein also noch für eine andere essentielle Funktion notwendig. In der Tat konnte F. Alt (Boston, USA; persönliche Mitteilung) bestätigen, dass diese Aminosäure Teil des Bindungsmotivs für die Interaktion mit Replikationsprotein A (RPA) ist, einem der identifizierten Interaktionspartner von AID. RPA bindet Einzelstrang-DNS und ist in Replikations-, Rekombinations- und DNS-Reparaturprozesse involviert (Wold, 1997). Warum der Verlust der Interaktion mit RPA zu einem Verlust an Hypermutationsaktivität führen soll, ist momentan noch Gegenstand von Spekulation. Chaudhuri et al. vermuten, dass RPA die Affinität zu einzelsträngiger DNS bewirkt und somit für die Substratbindung von AID verantwortlich wäre. Außerdem soll RPA als Plattform für die Rekrutierung weiterer *trans*-Faktoren wie z. B. fehleranfällige Polymerasen verantwortlich sein (Chaudhuri et al., 2004). Die R24W-Mutation hätte also demnach relativ dramatische Auswirkungen, weil AID quasi nicht mehr an Einzelstrang-DNS binden könnte. Diese Bindung muss in Eukaryoten außerdem vom Chromatinaufbau abhängig sein, weil die AIDbix-Mutante in *E. coli* noch enzymatisch aktiv ist (Ito et al., 2004).

Vermutlich kann AID schlicht aufgrund seiner geringen Größe (24 kDa) frei in den Zellkern diffundieren, wird von dort jedoch sofort wieder exportiert. Alternativ erfolgt der aktive Transport über einen anderen AID-bindenden Co-Faktor, der eine starke NLS-Sequenz zum Transport beisteuert. Für einen aktiven Kernimport von AID spricht, dass auch das homologe APOBEC-1 über einen aktiven Mechanismus in den Zellkern transportiert wird (via ACF; Blanc et al., 2003). Ito et al. und McBride et al. haben in ihren Leptomycin B-Experimenten bereits nach einer Stunde eine Anreicherung von nukleärem AID (als Fusionsprotein) beobachtet (Ito et al., 2004; McBride et al., 2004). Offensichtlich erfolgt der Transport in den Kern (aktiv oder passiv) sehr schnell. Interessanterweise haben Wu et al. in MEFs („Mouse

Embryonic Fibroblasts“) eine Co-Lokalisation von rekombinantem AID mit Mikrotubuli beobachten können (Wu et al., 2005). Es wäre daher denkbar, dass ein potenzieller aktiver Transport von AID über das Zytoskelett erfolgt. Es wäre wichtig, in einem Experiment mit Leptomycin B die Kinetik des Erscheinens von GFP-AID im Kern mit dem Auftauchen von NES-GFP zu vergleichen. NES-GFP kann den Kern vermutlich nur über Diffusion erreichen und würde somit den zeitlichen Rahmen für freie Diffusion in den Zellkern bestimmen. Falls AID-GFP aktiv in den Kern transportiert wird, sollte es schneller im Kern akkumulieren als NES-GFP, weil aktive Transportprozesse schneller sind als Diffusionsvorgänge (Chatterjee & Stochaj, 1998). Dies zeigt sich auch in der zytoplasmatischen Lokalisation von NES-GFP, das im Prinzip immer noch klein genug für freie Diffusion ist. Dazu müssten die Zellen in einer Mikroskopie-geeigneten Kammer kultiviert und nach Leptomycin B-Zusatz gefilmt werden bzw. in regelmäßigen Abständen Fotos gemacht werden, um die Kinetik der Akkumulation von AID-GFP bzw. NES-GFP im Zellkern zeitlich zu dokumentieren.

Da sich das HA-markierte AID aus den beschriebenen Gründen in Immunfluoreszenzfärbungen im Zellkern nicht nachweisen lässt, versuchte ich auch über biochemische Zellfraktionierung die subzelluläre Lokalisation von AID und rekombinanten AID-Mutanten zu adressieren. Die bemerkenswerteste Beobachtung in diesen Experimenten ist der Nachweis von AID in der nukleären Fraktion. In allen von mir durchgeführten Zellfraktionierungsexperimenten fand sich ein signifikanter Anteil an wt AID im Zellkern. Die einfachste Erklärung für diese Beobachtung ist, dass der Anteil an nukleär lokalisiertem AID nicht hoch genug ist, um in der Immunfluoreszenz oder bei Fusionsproteinen ein Signal zu geben. Eine weitere Erklärung wäre, dass die nukleäre Fraktion aufgrund der hohen Expressionsrate mit präzipitiertem AID kontaminiert ist. Dagegen spricht der Sachverhalt, dass die Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL2 mit endogener AID-Expression ebenfalls eine ähnliche Verteilung von zytoplasmatischem und nukleärem AID aufweist (Daten nicht gezeigt). Pasqualucci et al. haben außerdem bei ähnlichen Zellfraktionierungsexperimenten in diversen normalen und transformierten B-Zelllinien ebenfalls einen nukleären Anteil an AID gefunden, der je nach untersuchter Zelllinie mehr oder weniger stark ausgeprägt war (Pasqualucci et al., 2004). Sie spekulierten, dass es sich dabei um einzelne Zellen handelt, in denen AID aktiviert worden ist und in den Zellkern transloziert. In Western-Blot-Analysen lässt sich nicht diskriminieren, ob das nukleäre Signal auf einzelne Zellen mit quantitativ in den Nukleus transloziertem AID zurückgeht oder ob in allen Zellen ein geringer Anteil von AID im Zellkern vorliegt. Monomeres GFP, das in Fluoreszenzaufnahmen eine diffuse Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern aufweist (Abb. 30), geht in den

Zellfraktionierungsexperimenten (Abb. 29) aus der nukleären Fraktion quantitativ verloren. In Anbetracht dessen gehe ich davon aus, dass das in den Zellfraktionierungsexperimenten identifizierte nukleäre AID in größeren, stabilen Komplexen im Nukleus vorliegt (z. B. Chromatin-assoziiert). Auch die Maskierung von AID im Nukleus deutet an, dass AID im Nukleus in Komplexen vorliegt, die nicht so leicht ausgewaschen werden können wie kleines, monomeres bzw. dimeres GFP, das im Nukleus keine Interaktionspartnern besitzt. Dieser Befund bestätigt sich unabhängig für mehrere verschiedene Zellfraktionierungsmethoden und Zelllinien. Die Verwendung eines mildereren Detergens z. B. NP-40 oder Digitonin, der Aufschluss mittels Dounce-Homogenisatoren, das Quervernetzen der Proteine mit chemischen Substanzen wie Dimethylpimelimidat (DMP) oder Dimethyldithio-bispropionimidat (DTBP), oder die Benutzung von Streptolysin O, eines für die äußere Zellmembran spezifischen Agens zur Zellyse, veränderte dieses Ergebnis nicht.

Warum die Einführung exogener NLS-Sequenzen nicht zu einer Anreicherung im Zellkern in Zellfraktionierungsexperimenten führt, lässt sich auf zwei Arten erklären. Die einfache, aber unwahrscheinlichere Erklärung ist, dass die exogenen NLS-Sequenzen nicht erkannt werden, z. B. aufgrund sterischer Behinderung nicht zugänglich sind. Alternativ würde AID zwar verstärkt in den Zellkern translozieren, würde dort aber nicht ausreichende Bindungspartner finden und analog wie GFP während des Zellaufschlusses wieder ausgewaschen werden. Brar et al. konnten in Immunfluoreszenzexperimenten zeigen, dass der Anteil an nukleärem RFP-AID signifikant erhöht wird (Brar et al., 2004), wenn Zellen mit DNS-schädigenden Agenzien wie Bleomycin, UV-Strahlung oder Wasserstoffperoxid behandelt werden. Die Autoren spekulieren deshalb, dass DNS-Doppelstrangbrüche oder alternativ die entsprechenden Reparaturplattformen Substrate für AID-Bindung sind. Es wäre interessant zu überprüfen, ob der Anteil an nukleärem, vermutlich komplexierten AID durch Behandlung mit DNS-schädigenden Agenzien auch in Zellfraktionierungsexperimenten ansteigt. Dies wäre eine gute Methode, um zu bestimmen, ob der nukleäre Anteil von AID in diesen Experimenten in der Tat Ausdruck von großen AID-Komplexen ist.

Mittlerweile ist die Domänenstruktur von AID noch detaillierter charakterisiert worden (Barreto et al., 2003; Ta et al., 2003; Zaim & Kierzek, 2003; Shinkura et al., 2004). Danach wirken sich Mutationen am C-Terminus beinahe ausschließlich auf CSR-Aktivität aus, während sich Mutationen am N-Terminus bevorzugt auf Somatische Hypermutation auswirken. So ist z. B. AID mit verkürztem C-Terminus ($\Delta 10$) katalytisch in *E. coli* bzgl. seiner Desaminierungsfähigkeit wesentlich aktiver als wt AID (Barreto et al., 2003), das gleiche Protein vermag aber keinen Klassenwechsel mehr zu induzieren. Shinkura und

Kollegen haben durch Zufallsmutagenese von AID (der Maus) Mutationen entdeckt, die sich nur auf SHM, nicht aber auf CSR auswirken. Alle diese Mutationen befinden sich am N-Terminus von AID (Shinkura et al., 2004). Offensichtlich sind der N- und der C-Terminus von AID also unterschiedlichen Funktionen zugeordnet. Da SHM und CSR unabhängig voneinander stattfinden können, ist davon auszugehen, dass es sich um distinkte Prozesse mit dementsprechend distinkten AID-Komplexen handelt. Daher sollte in Zukunft besonders darauf geachtet werden, mit welcher Domäne von AID potenzielle Interaktionspartner interagieren, da damit unter Umständen bereits eine Zuordnung zu einem der beiden Prozesse möglich wird.

4.3 Die Zelllinie Nalm-6 als Musterzelllinie zur Identifizierung AID-regulierender Faktoren

Eine zentrale Beobachtung meiner Dissertation ist die Tatsache, dass sich AID Überexpression im Gegensatz zur gegenwärtigen Vorstellung nicht zwingend mutagen auswirkt.

Ausgangspunkt für diese Feststellung war die Untersuchung des Einflusses von AID Überexpression auf die Mutierbarkeit eines GFP-Reportertransgens in zwei unterschiedlichen menschlichen B-Zell-Lymphom-Zelllinien, der prä-B-Zelllinie Nalm-6 und der Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL70.

Um den Ausgangszustand zu ermitteln, wurde über eine Northern-Blot-Analyse das endogene AID-Transkriptniveau in Nalm-6, BL70 und Mutu III bestimmt. Transkription des endogenen AID-Locus ist sehr schwach in BL70 und völlig abwesend in Nalm-6 Zellen. Während die endogenen AID-Mengen in Mutu III Zellen ausreichend sind, um Hypermutation auf einem Reporterkonstrukt auszulösen (persönliche Mitteilung J. Bachl, GSF, München), sind die AID-Mengen in BL70 Zellen nicht ausreichend. Überexpression von rekombinantem AID ist notwendig, um einen Hypermutationsphänotyp in BL70 Zellen zu induzieren. Dies manifestierte sich in einem eindeutigen Anstieg der GFP-Reversionsfrequenz. Diese Beobachtung stimmt mit dem gegenwärtigen Dogma überein, dass AID-Überexpression an sich ausreichend ist, um Somatische Hypermutation auszulösen. Im Gegensatz zu den BL70 Zellen vermochte AID-Überexpression in der humanen prä-B-Zelllinie Nalm-6 keine messbare Hypermutationsaktivität zu induzieren.

Ich habe eine große Anzahl an unabhängigen AID-überexprimierenden Nalm-6 GFP/AID-Transfektionsklonen getestet, um auszuschließen, dass die genomische Integrationsstelle mit

der Mutierbarkeit des *ptkGFPstop*-Transgens interferiert. Keiner dieser Transfektionsklone zeigte eine messbare Zunahme der Mutationsrate. Die *pAID-ngfr* Klone, die in dieser Arbeit generiert wurden, exprimierten HA-AID in unterschiedlichen Proteinmengen, vermutlich wegen unterschiedlicher Kopienzahlen und/oder genomischer Integrationsstellen des AID-Expressionsvektors. Dies wurde unabhängig für BL70 und Nalm-6 Transfektionsklone beobachtet. Unabhängig von den jeweiligen HA-AID-Expressionsmengen hypermutierten Nalm-6 Transfektionsklone nie das GFP-Reportertransgen. Demgegenüber hypermutierten AID-überexprimierende BL70 Transfektionsklone das GFP-Reportertransgen grundsätzlich selbst auf relativ geringen exogenen AID-Expressionsniveaus. Um auszuschließen, dass AID-induzierte Mutationen die Funktion des AID-Transgens beeinträchtigt hatten, wie von Martin und Scharff (Martin & Scharff, 2002) beobachtet, wurde das AID-Transgen von einem Nalm-6 GFP/AID-Transfektionsklon (mit dem höchsten AID-Expressionsniveau) über PCR amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzanalyse bestätigte, dass die für AID kodierende Region auf dem Transgen keine Mutationen trägt, das überexprimierte AID-Protein also im Prinzip funktionell sein müsste (Daten nicht gezeigt). Alles in allem bedeutet dies, dass wt AID-Überexpression auf dem GFP-Transgen in Nalm-6 keine Hypermutation induzieren kann, unabhängig von der genomischen Integrationsstelle des Reportertransgens und der exogenen AID-Menge.

Die Nalm-6 Zelllinie hat einen der für die schwere Kette kodierenden Immunglobulin-Loci rearrangiert; das zweite Allel und die Loci für die leichten Ketten sind immer noch in Keimbahn-Konfiguration (Drexler, 2001). Ursprünglich wollte ich den rearrangierten endogenen schwere-Kette-Locus in AID-überexprimierenden Nalm-6 Klonen sequenzieren, allerdings war das endogene μ -schwere-Kette-Protein in einer Immunfluoreszenzfärbung der schweren Kette kaum nachweisbar, vermutlich wegen der schwachen Transkription des Ig-schwere-Kette-Locus (Daten nicht gezeigt). Das Sequenzieren des endogenen μ -Locus wurde deshalb verworfen, weil die Mutationsraten bei Somatischer Hypermutation mit den Transkriptionsraten korrelieren (Goyenechea et al., 1997; Bachl et al., 2001). Eine geringere Transkription des GFP-Transgens in Nalm-6 Zellen im Vergleich zu BL70 Zellen hätte prinzipiell ebenfalls Ursache für das Fehlen einer nachweisbaren Mutationsaktivität in Nalm-6 sein können. Nalm-6 Zellen und BL70 Zellen exprimieren den GFP-Reporter aber auf vergleichbarem Niveau (Abb. 20).

Erstaunlicherweise kann durch die Expression der Kernlokalisationsmutanten AID Δ NES oder AID-3xNLS Hypermutationsaktivität in Nalm-6 induziert werden. Der induzierte Mutationsphänotyp nach Überexpression von AID-3xNLS ist ausgeprägter als nach

Überexpression von AID Δ NES (Abb. 31 und Tabelle 2). Durch diese Beobachtung wird auch automatisch ausgeschlossen, dass der „Hypermutationsblock“ in wt AID-überexprimierenden Nalm-6 auf Unzulänglichkeiten in den AID-nachgeschalteten Prozessierungsschritten zurückzuführen ist. Offensichtlich sind alle dafür notwendigen Faktoren in Nalm-6-Zellen vorhanden. Auch eine prinzipielle Unzugänglichkeit des Reportergens für das Mutator-System bzw. für AID *per se* kann somit ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass mit rekombinantem AID keine Somatische Hypermuation in Nalm-6 Transfektionsklonen induziert werden kann, erinnert an eine Beobachtung in der humanen Zelllinie BL2. Faili und Kollegen stellten fest, dass ein zeitgleicher Stimulus des B-Zell-Rezeptors und seiner Co-Rezeptoren notwendig ist, um Somatische Hypermuation auf dem endogenen Ig-schwere-Kette-Locus von BL2 auszulösen (Faili et al., 2002b). Endogenes AID wird aber schon vor dem Stimulus in BL2 Zellen auf gleichem Expressionsniveau exprimiert, ohne jedoch Mutation in den Ig-Loci zu induzieren. Diese Ergebnisse deuten einen gegenwärtig noch nicht charakterisierten Mechanismus an, der AID in seiner Funktion reguliert bzw. limitiert.

Dabei handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen generellen prä-B-Zell-Phänotyp, weil wt AID in 18-81 und 70Z/3, beides aus der Maus gewonnene prä-B Zelllinien, einen Mutationsphänotyp induzieren kann (s.o. und Daten nicht gezeigt).

In Abbildung. 35 sind vier mögliche Erklärungen für das Fehlen messbarer Hypermuation in mit wt AID transfizierten Nalm-6 Zellen abgebildet.

Zum einen könnte wt AID aus bislang unbekanntem Gründen katalytisch weniger aktiv sein als in vergleichbaren anderen Zelllinien (Abb. 35A). Mögliche Ursache für eine derartige katalytische Aktivitätsminderung könnte z. B. eine fehlende Phosphorylierung sein. In der Tat haben Chaudhuri et al. beschrieben, dass AID in B-Zellen phosphoryliert vorliegt und dass dieses phosphorylierte AID weitaus aktiver ist als unphosphoryliertes AID (Chaudhuri et al., 2004). Die AID-Mutanten AID-3xNLS und AID Δ NES müssten dann *per se* katalytisch aktiver sein. Barreto et al. hatten bereits gezeigt, dass ihre Form von AID Δ NES (Δ 10) in *E. coli* aktiver ist als wt AID (Barreto et al., 2003). Für AID-3xNLS müsste dies jedoch erst noch in *E. coli* getestet werden. Gemäß dieser Interpretation würde AID durch die Manipulation eine aktivere Konformation einnehmen, die dann auch in Nalm-6 Hypermuation induzieren kann. Um diese Theorie zu überprüfen, müsste man wt AID aus Nalm-6 und z. B. BL70 isolieren bzw. sogar aufreinigen und in einem *in vitro* Desaminierungsexperiment seine Aktivität unmittelbar vergleichen.

Die zweite Erklärung wäre, dass wt AID in Nalm-6 wesentlich substratspezifischer ist als in anderen, evtl. bereits deregulierten Lymphom-Zelllinien (Abb. 35B). Danach wäre wt AID

zwar prinzipiell in der Lage, geeignete Substrate zu hypermutieren, aufgrund der spezifischeren Anforderungen wird das artifizielle GFP-Reporterkonstrukt trotz Ig-Enhancer aber nicht erkannt. Akzeptiert man diese Theorie, dann muss man für diese verbesserte Substraterkennung einen *trans*-Faktor postulieren, der diese Spezifität in Nalm-6 bewirkt. Dieser Spezifitätsfaktor wäre dagegen nicht mehr in der Lage, die Kernlokalisationsmutanten oder mit ihnen das Substrat ordnungsgemäß zu binden, so dass diese AID-Proteine „unspezifisch“ das GFP-Reporterkonstrukt hypermutieren können. Gegen diese Theorie spricht die Wahrscheinlichkeit, denn wie wahrscheinlich ist es, dass gerade eine prä-B-Zelle einen spezifischen Faktor für Somatische Hypermutation exprimiert, der eigentlich erst in einer späteren Entwicklungsphase der B-Zelle benötigt wird? Neuesten Ergebnissen zufolge, kann AID aber auch schon in unreifen B-Zellen im Knochenmark exprimiert werden (Mao et al., 2004). Um diese Theorie zu überprüfen, müsste man die Komplexzusammensetzung von nukleärem wt AID bzw. AID-3xNLS in Nalm-6 und z. B. BL70 Zellen vergleichen. Alternativ könnte man versuchen, Nalm-6 mit anderen, evtl. physiologischeren Hypermutationsreportern zu transfizieren oder aber die Transkription der endogenen Loci durch artifizielle Stimuli zu verstärken.

Eine dritte, sehr ähnliche Erklärung für den „Hypermutationsblock“ in Nalm-6 bedarf ebenfalls eines weiteren *trans*-Faktors. Im Prinzip wäre es möglich, dass Nalm-6 einen Inhibitor exprimiert, der AID entweder im Zytoplasma zurückhält oder aber zumindest vom Substrat fernhält (Abb. 35C). Ein derartiger Schutzmechanismus in B-Zellen war bereits von Okazaki et al. postuliert worden (Okazaki et al., 2003). In einem solchen Modell, das der Regulation von NF κ B über I κ B ähnelt, bedürfte AID oder der Inhibitor eines spezifischen Signals von außen, bevor AID freigesetzt werden kann. AID Δ NES und AID-3xNLS würden demnach wie im vorherigen Fall nicht mehr gebunden werden und können so regulär das GFP-Substrat hypermutieren. Im Prinzip könnte auch in BL2 (Faili et al., 2002b), wie bereits angedeutet, ein solcher Inhibitor vorhanden sein, bis das Rezeptorsignal von außen kommt und AID aktiviert wird. Auch diese Frage lässt sich am besten über die Analyse von Komplexzusammensetzungen klären. Alternativ könnte es sein, dass der C-terminale Bereich von AID für die Bindung des Inhibitors notwendig ist, die bei AID Δ NES verloren geht (und im Falle von 3xNLS strukturell nicht mehr möglich ist). Experimentell könnte man versuchen, ein C-terminales Fragment von AID zu überexprimieren, dadurch evtl. den Inhibitor „weg zu titrieren“ und wt AID freizusetzen, so dass es wieder sein Substrat hypermutieren kann.

Eine vierte Erklärung für den Phänotyp in Nalm-6 stützt sich auf den Befund, dass es zwei Kernlokalisationsmutanten von AID sind, die Hypermuation in Nalm-6 zu induzieren vermögen. Bemerkenswert ist, dass die induzierte Hypermuationsaktivität der AID-3xNLS-Mutante bzgl. Reversionsfrequenz und durchschnittlicher Anzahl an Revertanten pro Klon in 18-81 und Nalm-6 quasi identisch ist (siehe Tabelle 2). Es könnte sich also in Nalm-6 konsequenterweise auch um ein generelles Importproblem von AID handeln, gesetzt den Fall, dass AID doch aktiv in den Kern transportiert wird (Abb. 35D). Auch APOBEC-1 lokalisiert erst nach Co-Expression mit ACF im Zellkern (Blanc et al., 2001). Demnach würde AID normalerweise über ein Importin und/oder einen anderen Shuttling-Faktor aktiv in den Kern importiert und „später“ über Exportin-1 (CRM1) wieder exportiert. Dieses für den Kernimport von AID zuständige Protein müsste relativ ubiquitär exprimiert werden, weil wt AID in den meisten experimentell analysierten Zellen hypermutierend wirkt, wohingegen dieses Protein in Nalm-6 Zellen fehlt. Der Wegfall des aktiven Imports würde das Gleichgewicht der AID-Lokalisation noch mehr auf die zytoplasmatische Seite verschieben. AID könnte dann den Zellkern bzw. die DNS nur noch über Diffusion erreichen. Die Tatsache, dass in Nalm-6 die AID-3xNLS-Mutante stärker hypermutiert als die AID Δ NES Mutante wäre dann Ausdruck dessen, dass es wichtiger ist, aktiv in den Zellkern transportiert zu werden, als „passiv“ dort länger verweilen zu können (weil der aktive Export entfällt). Die AID-3xNLS-Mutante würde sich demnach eines anderen Importwegs bedienen (nämlich über Importin α) und so den Ausfall des postulierten AID-Importweges kompensieren. Das einfachste Experiment um diese Theorie zu überprüfen, wäre die gezielte Inaktivierung der drei SV40 NLS-Sequenzen durch Punktmutationen. Sollte eine derartige, strukturell identische aber funktionell inaktive AID-3xNLS-Mutante nicht mehr den gleichen Phänotyp zeigen, so bietet sich eine Überprüfung der Funktionalität verschiedener Importwege bzw. Signalsequenzen in Nalm-6 Zellen an. Auch mit dieser Theorie lässt sich der Phänotyp in BL2 erklären (Faili et al., 2002b), wonach nach Rezeptorstimulation die Expression eines Importins oder Shuttling-Faktors angeregt wird, der anschließend den Transport von AID übernimmt. Diese Theorie würde auch elegant erklären, warum für Somatische Hypermuation *de novo* Proteinbiosynthese notwendig ist, obwohl AID bereits exprimiert wird (Doi et al., 2003; Begum et al., 2004; Nagaoka et al., 2005). Demnach wäre es nämlich der Shuttling-Faktor, der neu synthetisiert werden müsste.

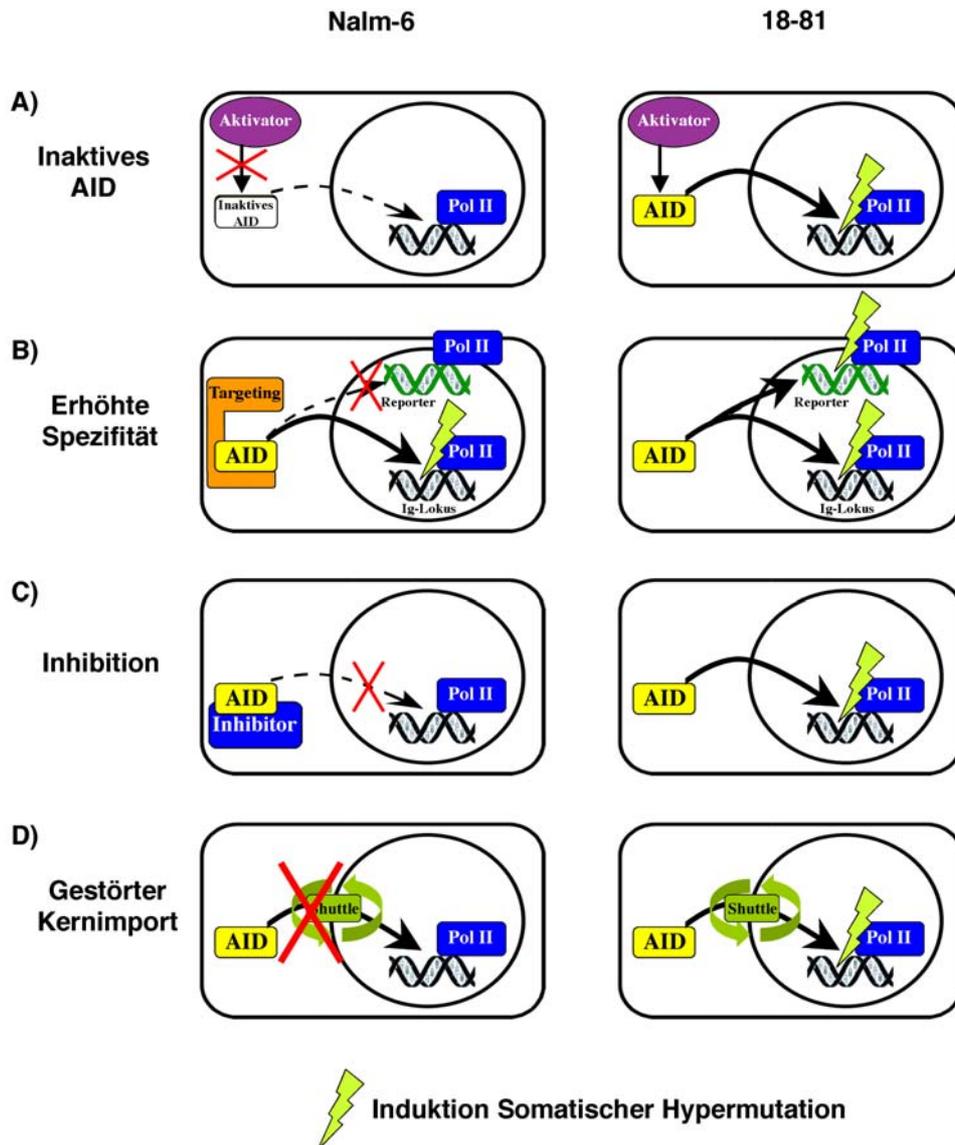


Abb. 35 Vier Modelle, um das Fehlen einer nachweisbaren Mutationsaktivität in Nalm-6 zu erklären.

(A) wt AID liegt in Nalm-6 Zellen in einer inaktiven Konformation vor, die keine Hypermutation induzieren kann. Diese inaktive Konformation wird in anderen Zellen, z. B. 18-81, durch ein aktivierendes Signal aufgehoben und AID kann Hypermutation induzieren. (B) In Nalm-6 Zellen wird ein Spezifitätsfaktor exprimiert, der die Substratspezifität von wt AID erhöht. Aufgrund der gestiegenen Anforderungen erkennt wt AID das artifizielle GFP-Reporterkonstrukt nicht mehr und kann auf diesem keine Hypermutation induzieren. In evtl. bereits deregulierten Lymphom-Zelllinien, wie z. B. 18-81, wird dieser Spezifitätsfaktor nicht exprimiert, weshalb wt AID weniger substratspezifisch ist und auch das GFP-Reporterkonstrukt hypermutiert. (C) Nalm-6 Zellen exprimieren einen Inhibitor, der entweder wt AID im Zytoplasma zurückhält oder aber im Zellkern eine Bindung an die DNS verhindert. In anderen Zelllinien (wie 18-81) wird dieser Inhibitor nicht exprimiert und wt AID hat freien Zugang zu seinem Substrat. Es kommt zur Induktion von Hypermutation. (D) wt AID bedarf des aktiven Imports in den Zellkern über einen Transportfaktor (Shuttle). In Nalm-6 Zellen ist dieser Import gestört. Das führt zum Fehlen einer nachweisbaren Mutationsaktivität. In konstitutiv hypermutierenden Zelllinien wie 18-81 wird dagegen dieser Transportfaktor exprimiert, und AID gelangt effizient zu seinem Substrat in den Zellkern, was zur Induktion von SHM führt.

Die oben diskutierten Erklärungsansätze, warum wt AID keine Hypermutation in Nalm-6 Zellen auslösen kann, schliessen sich nicht gegenseitig aus. Es ist durchaus denkbar, dass sich in der Realität einzelne Facetten dieser Modelle überschneiden.

Im Allgemeinen erscheint es sehr plausibel, dass unter physiologischen Bedingungen AID-Aktivität durch *trans*-Faktoren streng reguliert wird. Ein derartiger „AIDosome“-Komplex wäre theoretisch dazu notwendig, den im Prinzip schädlichen mutagenen Einfluss von AID zu kontrollieren. Ich konnte in Gelfiltrationsexperimenten zeigen, dass AID vermutlich in großen Komplexen in der Zelle vorliegt. Chaudhuri et al. berichteten ebenfalls, dass AID große Komplexe formiert (Chaudhuri et al., 2003). Es wird ganz klar eine Herausforderung in der Zukunft sein, dieses „AIDosome“ zu entschlüsseln und die beteiligten Proteine zu identifizieren.

4.4 Blick in die Zukunft

Mit unserem Verständnis für den mechanistischen Ablauf von Somatischer Hypermutation befinden wir uns noch ganz am Anfang. Es gibt eine beachtliche Anzahl an unterschiedlichen Hyper-IgM-Patienten, bei denen nur zum Teil geklärt ist, was die Ursache der Erkrankung ist (für einen Überblick siehe Durandy et al., 2003). Da die Krankheit sehr selten ist (1/500000), ist die Zahl der beschriebenen Patienten noch sehr überschaubar. Klar definiert sind Defekte in den Genen für CD40, CD40-Ligand, AID und UDG als Ursache für Hyper-IgM-Erkrankungen. Die ersten zwei Defekte betreffen die Signalkaskade zur Initiation von SHM, die letzteren die eigentliche Prozessierung. Es wird von zentraler Bedeutung sein, weiterhin Hyper-IgM-Patienten detailliert zu charakterisieren um dadurch möglicherweise weitere Schlüsselproteine für Somatische Hypermutation und Klassenwechsel zu identifizieren.

Ein weiterer wichtiger Schritt wird sein, exakt zu diskriminieren, wann man von aberranter SHM (ASHM) und wann man von physiologischer SHM sprechen kann und welche Determinanten die eine oder die andere Aktivität verursachen. Die Zahl der durch ASHM bewirkten malignen Erkrankungen lässt sich bis dato nicht definieren. Es erscheint jedoch sehr wahrscheinlich, dass AID für die *myc*-Translokation in den Immunglobulin-Locus in Burkitt-Lymphomen verantwortlich ist (Ramiro et al., 2004). Während in der westlichen Hemisphäre Burkitt-Lymphome relativ selten sind, treten sie in Afrika und Papua Neu-Guinea mit einer Frequenz von bis zu 1/10000 auf (endemische Burkitt-Lymphome). Außerdem gibt es auch HIV-assoziierte Burkitt-Lymphome. Es wird eine Herausforderung sein,

herauszufinden, wie es zu diesen verschiedenen Formen von Burkitt-Lymphomen kommt und inwieweit dabei AID aktiviert und dereguliert wird.

Die Expression von AID in zahlreichen anderen Lymphomen (Greeve et al., 2003; Smit et al., 2003; Babbage et al., 2004; Hardianti et al., 2004a; Hardianti et al., 2004b; Bodor et al., 2005; Greiner et al., 2005; Hardianti et al., 2005) und die Hypermutation von Proto-Onkogen durch ASHM (Pasqualucci et al., 2001) legt die Vermutung nahe, dass noch weitere Lymphom-Typen in AID-abhängiger Weise entstehen könnten. Während man sich in der Vergangenheit stark auf die Beschreibung dieser Phänotypen beschränkt hat, wird man in Zukunft Modelle entwickeln müssen, die eine exaktere Beurteilung des Einflusses von AID auf die Lymphomagenese erlauben. In Anbetracht der Tatsache, dass AID-Expression nicht zwangsläufig Hypermutation induziert - wie ich mit der Nalm-6 Zelllinie zeigen konnte - muss man allerdings ehrlicherweise eingestehen, dass das onkogene Potenzial von AID möglicherweise nicht so groß ist wie anfänglich vermutet. Auch die Tatsache, dass Mäuse, die AID ubiquitär überexprimieren, erst vergleichsweise spät (nach Monaten bis Jahren) Lymphome entwickeln (Okazaki et al., 2003), relativiert die von AID-Expression ausgehende Gefahr.

In letzter Zeit häufen sich die Berichte, dass AID nach viraler Infektion von B-Zellen exprimiert wird (Kirberg et al., 2005; Machida et al., 2005; Yang et al., 2005), eventuell durch die Stimulation der Toll-Like-Rezeptoren (Yang et al., 2005). Diese Beobachtung erinnert stark an eine andere Familie von Cytidin-Deaminasen: die APOBEC-3 Familie. Diese Cytidin-Deaminasen können virale Replikation inhibieren (Sheehy et al., 2002), indem sie Cytidine (Harris et al., 2002) während der Erststrangsynthese der cDNS im Laufe der retroviralen Replikation desaminieren (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Zhang et al., 2003; Harris & Liddament, 2004). Es wäre also durchaus möglich, dass AID neben seinen Funktionen in SHM und CSR auch noch antivirale Funktionen hat.

Ein weiterer Hinweis auf ein noch breiteres Aufgabenfeld von AID ist die Beobachtung von Morgan et al. (2004). Die Autoren beschrieben, dass AID auch methylierte Cytidine in CpG-Inseln desaminieren kann. Diese in Zellen sehr häufige Mutation wurde bislang nur spontanen Reaktionsabläufen zugeordnet. Das bedeutet, dass AID eventuell indirekt für Demethylierungen der DNS verantwortlich sein könnte, indem methylierte Cytidine über AID und anschließende Prozessierung entfernt und gegen nicht-methylierte Nukleotide ausgetauscht werden. Die Autoren beobachteten weiterhin, dass AID auch in Oozyten, embryonalen Keimzellen und embryonalen Stammzellen exprimiert wird. Das AID-Gen liegt in einer Gruppe von Genen, die für epigenetische Neuprogrammierung benötigt und ebenfalls

in diesen Zellstadien exprimiert werden. Deshalb spekulieren Morgan et al. (2004), dass AID auch in epigenetische Umprogrammierungen im Laufe von Zelldifferenzierungsprozessen involviert sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich mit Sicherheit festhalten, dass AID in Zukunft noch mehr wissenschaftliches Interesse gewidmet werden wird als bislang, weil man erst jetzt die Bedeutung von DNS-Desaminierung für zelluläre Prozesse zu verstehen beginnt.

5 Material

5.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Abgene (Hamburg), Amersham Biosciences (Freiburg), Applied Biosystems (Weiterstadt), BD Biosciences (Heidelberg), Biochrom (Berlin), BioRad (München), Costar (Bodenheim), Dianova (Hamburg), Eppendorf (Hamburg), 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), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen-München), Stratagene (Amsterdam, Niederlande).

5.2 Verwendete Kits

ECL Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); FastStart DNA Master SYBR Green I 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); Random Primed DNA labelling Kit (Roche Applied Science, Mannheim), RNeasy Kit (Qiagen, Hilden).

5.3 Bakterien

Für Klonierungen wurde der *Escherichia coli* -Stamm DH5 α verwendet.

Genotyp: F⁻, endA1, hsdR17, (r_k⁻, m_k⁻), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, RelA1, 80dlacZ, Δ M15.

5.4 Zelllinien

Name	Beschreibung/Bezugsquelle/Referenz
BL70	Humane Burkitt-Lymphom (BL) Zelllinie, von G.W. Bornkamm (GSF, München) zur Verfügung gestellt (Cohen et al., 1987).
Mutu III	Humane, EBV-positive BL-Zelllinie, von G.W. Bornkamm (GSF, München) zur Verfügung gestellt (Rowe et al., 1987).
Nalm-6	Humane prä-B-Zelllinie, von M. Cella (Washington University School of Medicine, St. Louis, USA) zur Verfügung gestellt (Hurwitz et al., 1979).
Raji	EBV-positive BL-Zelllinie, von ATCC (USA) bezogen (Pulvertaft, 1964).
18-81	Abelson-Virus transformierte Maus prä B-Zelle, von J. Bachl (GSF, München) zur Verfügung gestellt (Siden et al., 1979).
TGR-1	Rattenfibroblasten-Zelllinie, von D. Eick (GSF, München) zur Verfügung gestellt (Prouty et al., 1993).

5.5 Radioaktive Isotope

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ 3000Ci/mmol wurde von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.
 Tran³⁵S-Label wurde von MP Biomedicals (Eschwege) bezogen.

5.6 Enzyme

Restriktionsenzyme sowie dazugehörigen Reaktionspuffer (10x) wurden von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), NEB (Schwalbach) und Roche Applied Science (Mannheim) bezogen.
 T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, Klenow-Polymerase, Alkalische Phosphatase sowie die dazugehörigen 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.

Reverse Transkriptase (Superscript II) wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

5.7 Datenverarbeitung

Folgende Software wurde benutzt:

Adobe Photoshop 7.0; BD CellQuest Pro; MS Office; Mac:VektorTM 7.2; Openlab 3.1.2

Für die Strukturanalyse der aidNLS-Protein Fusion wurde der PredictProtein-Server verwendet: <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>

5.8 Antikörper

	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
<i><u>Primärantikörper</u></i>			
anti-AID 5C7	Ratte	1:10	E. Kremmer, GSF München
anti-AID 5G9	Ratte	1:10	E. Kremmer, GSF München
anti-AID 2H5	Ratte	1:10	E. Kremmer, GSF München
anti-Aktin (sc8432)	Maus	1:400	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
anti-GAPDH (ab9485-100)	Kaninchen	1:2000	Abcam/ Biozol, Eching
anti-GFP (sc8334)	Kaninchen	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
anti-HA (3F10)	Ratte	1:10	Roche Applied Science (Mannheim)
anti-K4(CH₃)-Histon H3	Ratte	1:10	M. Meisterernst, GSF München
anti-NGFR	Maus	1:10	E. Kremmer, GSF München
anti-RPA (RBF-4E4)	Ratte	1:10	E. Kremmer, GSF München
<i><u>Sekundärantikörper</u></i>			
anti-Ratte IgG HRP (sc2006)	Ziege	1:2000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
anti-Maus IgG HRP (W402B)	Kaninchen	1:5000	Promega (Mannheim)
anti-Ratte IgG Cy3	Ziege	1:1000	Dianova (Hamburg)
anti-Maus IgG PE	Ziege	1:1000	Dianova (Hamburg)
anti-Kaninchen HRP	Esel	1:10000	Promega (Mannheim)

5.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) hergestellt.

Oligo-Name Sequenz (5'→ 3')

AID 5' RM	GGCCAAGGGACGGCATGAGACC
AID 3' RM	GCGGTGCAGTCTCCGCAGCC
Aldolase 5'	AGCTGTCTGACATCGCTCACCG
Aldolase 3'	CACATACTGGCAGCGCTTCAAG
FR08A	GTCCGCTGGGCTAAGGGTTGGCGTGAGACCTACCTGTG
FR08B	CACAGGTAGGTCTCACGCCAACCTTAGCCCAGCGGAC
FR10	CCTCTAATACAGGGGCAAAAGGATGC
FR17	GGACACCACTATGGACAGCCTCTTG
FR18	GGAAGTTGCTATCAAAGTCCTAAAGTACG
FR19	TGTGTGCTTCTGCAACCTTAAAGCAC
FR20	TGGAAGCTGCTTGAAGACTTCTTGG
FR21	CTGTGCCCTTACCCGCTATGATG
FR22	GAATGATTCCAGAGACGTGGTTGC
FR31	ACTCCCCGCTGAGGTGCTTC
FR32	CTGGGGTGCCTGAGGAAAGC
FR45	CTTCGGCCAGTAACGTTAGG
FR46	GGTGGCGACCGGTGGATCAAGTCCTAAAGTACG
FR47	GGTGGCGACCGGTGGATCATACAGGGGCAAAAGGATGC
FR49	GGAGGAGGTACCGCCACCATGGAATATCCTTATGACG
FR52	AGGAGGACGGCAACATCCTG
FR53	TCGTTGGGGTCTTTGCTCAG
FR57	GGAGGAGAATTCCGCCACCATGCTGTATGAGGTTGATGACTTAC
FR58	GGAGGAGAATTCCGCCACCATGGACAGCCTCTTGATGAAC
FR59	GGAGGAACCGGTACTGTCACGCCTCTTCACTAC
FR63	GGAGGAACCGGTCGCGACACCATGGTGAGCAAGGGC

Oligo-Name	Sequenz (5'→ 3')
Linker-Oligo	
pCR-Flopo-N	AATTCTCGCGAG
MS70	CTCCTTCTCCAACGCT
MS70(right)	TGGAAGTGTCACTGGCATGT
YFP#3TAG	
Mutagenese	GGACGACGGCAACTAGTATACCCGCGCCGAGG
5' EGFP	GTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC
3' EGFP	GTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTC
5'hnAID-HA	GGGGGGGAATTCACCATGGAATATCCTTATGACGTTCTGACTATGCCGACAGCCTC
(B.B.)	TTGATGAACCGGAGG
5'/nls HA Primer	GCCACCATGGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAATATCCTTATGACGTTCTGAC
5'/primer hnAID-	
nls	CGACGTGGCCACCATGGAATATCC
3'/hnAID-nls	GCACAGTCGAGGCTGATCAGCGAG
3' IRES AID	CCTCGACTGCAGAATTCGCCCTTGGAAGTT
5'bos junction	GTCGTGAGGAATTGCTACCGGACTCAG
3' Zeta	AGTGAACATCCTTGACTCG
5' Zeta	CAGCATGTTGCAGTCATCCTC

6 Methoden

6.1 Standardmethoden

Standardmethoden molekularbiologischer Laboratorien, die hier nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei (Ausubel et al., 1995) oder (Sambrook & Russel, 2001) beschrieben durchgeführt. Bei kommerziellen Produkten wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen.

6.2 Klonierung von Expressionsvektoren

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle PCR-Reaktionen mit *Pfu*-Polymerase nach Angaben des Herstellers in einem PCR-Thermalcycler PTC 200 (MJ Research; Biorad, München) durchgeführt. Als Standardprogramm wurde über 35 Zyklen amplifiziert, wobei jeder Zyklus 45 s bei 94 °C, 30 s bei 57 °C und 2 min bei 72 °C umfasste. Alle PCR Produkte wurden nach Subklonierung in pCR-Topo (Invitrogen, Karlsruhe) sequenziert. Diese Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

6.2.1 Reporterkonstrukte

pI-GFPstop

Das Plasmid *pI-GFPstop* wurde bereits beschrieben (Bachl et al., 2001).

ptk-GFPstop

Das Plasmid *ptk-GFPstop* wurde ebenfalls beschrieben, allerdings unter dem Namen *pE* (Bachl & Olsson, 1999).

ptk-GFP

Das Plasmid wurde von J. Bachl (GSF, München) zur Verfügung gestellt (GFP ohne Stopp-Kodon).

ptk-YFPstop

Zur Herstellung des Plasmids *ptk-YFPstop* wurde das *AgeI-SspBI* Fragment aus dem Plasmid pE (Bachl & Olsson, 1999) durch ein *AgeI – SspBI* Fragment aus dem Plasmid pcDNA-EYFP (zur Verfügung gestellt von J. Bachl, GSF, München) ersetzt, das den kodierenden Bereich für YFP enthält. Das vorzeitige Stopp-Kodon wurde an Aminosäureposition 107 in das EYFP-Gen durch Oligonukleotid-gerichtete *in vitro* Mutagenese, wie in (Sambrook & Russel, 2001) beschrieben, über das Oligonukleotid „YFP#3TAG Mutagenese“ eingeführt.

ptk-GFPstop NGFR

Für das Konstrukt *ptk-GFPstop NGFR* wurde aus dem Vektor pMC35a (zur Verfügung gestellt von M. Conrad, GSF, München) die SV40 Promotor–IRES-ngfr Kasette mit *BglII/Bst1107I* ausgeschnitten, die Enden mit Klenow-Polymerase geglättet und in den mit *SmaI* geöffneten Vektor BS/KS+ Van (3#TAG) (J. Bachl, GSF München) ligiert. Die IRES wurde dann über *SmaI/Eco47III* entfernt und der Vektor religiert.

6.2.2 AID-Expressionsvektoren

pAID-ngfr

Um den Vektor *pAID-ngfr* herzustellen, wurde der kodierende Bereich für humanes AID (hnAID) mittels PCR amplifiziert. Die dazu notwendige cDNS wurde aus der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji gewonnen. Als Primer wurden benutzt: 5'hnAID-HA (B.B.) und FR18. Der 5'-Primer führt eine Hämagglutinin-Epitopmarkierung in das Leseraster unmittelbar 5' vom kodierenden Bereich für AID ein. Das PCR-Produkt wurde in den pCR-Topo-Vektor kloniert und sequenziert (im folgenden pCR-HAhnAID). Das HA-markierte humane AID wurde dann als *EcoRI*-Fragment ausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pExp (J. Bachl, GSF, München) ligiert, wodurch das AID-Gen unter die Kontrolle des bos-Promotors gebracht wurde. Die IRES-ngfr Kasette wurde als *XhoI* Fragment aus dem Plasmid pMC35a (zur Verfügung gestellt von M. Conrad, GSF, München) herausgeschnitten und in die *SalI* Schnittstelle 3' neben dem HA-markierten AID-Gen in den Vektor pExp eingefügt.

pCAGGS HAhnAID

Der Vektor *pCAGGS-IRES-PURO* (von J. Bachl, GSF, München) hat eine *EcoRI* Schnittstelle, um über diese Transgene unter die Kontrolle des β -Aktin-Promotors des Huhns

bringen zu können. Um den Vektor pCAGGS HAhnAID herzustellen, wurde der oben beschriebene Vektor pCRHAhnAID mit *EcoRI* geschnitten und das HAhnAID Fragment isoliert. Dann wurde der für AID aus der Maus kodierende Vektor pCAGGS moAID (J. Bachl, GSF, München) mit *EcoRI* geöffnet, das Maus-Transgen verworfen und das Rückgrat des Vektors mit dem HAhnAID-Fragment über die *EcoRI* Schnittstellen ligiert.

pCAGGS Leervektor

Um den Leervektor herzustellen, wurde pCAGGS HAhnAID mit *EcoRI* geschnitten, das HAhnAID Fragment entfernt und das Vektorrückgrat über die *EcoRI*-Schnittstelle religiert.

pCAGGS HAhnAIDbix

Über *in vitro* Mutagenese doppelsträngiger DNS-Substrate und *DpnI*-Restriktion (Ansaldi et al., 1996; Sambrook & Russel, 2001) wurde mit den Oligonukleotiden FR08A und FR08B das Plasmid pCR-HAhnAIDbix hergestellt. Diese Oligonukleotide führen die Mutation 70C>T in den kodierenden Bereich von *aicda* ein bzw. führen zum AS-Austausch R24W in AID. Der Vektor pCR-HAhnAIDbix wurde nach Sequenzierung mit *EcoRI* geschnitten und das HAhnAIDbix Fragment in den ebenfalls mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

pCAGGS NLS-HAhnAID

Mit dem 5'/nls HA Primer und dem Oligo FR18 wurde mittels PCR auf dem Vektor pCR-HAhnAID ein für NLS-HAhnAID kodierendes PCR-Produkt hergestellt. Der 5'/nls HA Primer führt eine starke Kozak-Sequenz und ein ATG-Start-Kodon ein. Der resultierende Vektor pCR-NLS-HAhnAID wurde mit *EcoRI* geschnitten und das NLS-HAhnAID Fragment in den ebenfalls mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

pCAGGS NLS-HAhnAIDbix

Über *in vitro* Mutagenese doppelsträngiger DNS-Substrate und *DpnI*-Restriktion (Ansaldi et al., 1996; Sambrook & Russel, 2001) wurde mit den Oligonukleotiden FR08A und FR08B (s.o.) das Plasmid pCR-NLS-HAhnAIDbix hergestellt (siehe pCAGGS HahnAIDbix). Der Vektor pCR-NLS-HAhnAIDbix wurde nach Sequenzierung mit *EcoRI* geschnitten und das HAhnAIDbix Fragment in den ebenfalls mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

pCAGGS HAhnAID-3xNLS

Für diese Fusion wurde der Vektor pCR-HAhnAIDnoStop (Jürgen Bachl, GSF München) verwendet. In diesem Vektor fehlt im kodierenden Bereich von HA-AID das Stopp-Kodon, wodurch er sich für Genfusionen an den C-Terminus von AID anbietet. Das Fragment für HA-AID ohne Stopp wurde mit *NcoI* und *NotI* ausgeschnitten und in den ebenso geöffneten pCMV/myc/nuc-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Mit den Oligonukleotiden 5'/primer hnAID-nls und 3'/hnAID-nls wurde dann der für HA-AID-3xNLS kodierende Bereich auf pCMV hnAID-3xNLS amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in pCR-Topo kloniert und über die so 5' und 3' erworbenen *EcoRI*-Schnittstellen in den mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

pCAGGS HAhnAIDbix-3xNLS

Über *in vitro* Mutagenese doppelsträngiger DNS-Substrate und *DpnI*-Restriktion (Ansaldi et al., 1996; Sambrook & Russel, 2001) wurde mit den Oligonukleotiden FR08A und FR08B pCAGGS HAhnAIDbix-3xNLS hergestellt. Der Vektor wurde nach Sequenzierung des AID Fragments mit *EcoRI* geschnitten und das HAhnAIDbix-3xNLS Fragment in den ebenfalls mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

pCAGGS HAhnAID Δ NES

Mit den Oligonukleotiden 5'hnAID-HA (B.B.) und FR10 wurde mittels PCR auf dem Plasmid pCR HAhnAID das HAhnAID Δ NES Fragment amplifiziert und in den pCR-Topo-Vektor kloniert. FR10 eliminiert die letzten 45 nt von AID und führt ein Stopp-Kodon ein. Der Vektor pCR-HAhnAID Δ NES wurde mit *EcoRI* geschnitten und das HAhnAID Δ NES Fragment in den ebenfalls mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

pCAGGS Nru I

Um den Vektor pCAGGS NruI herzustellen, wurde der pCAGGS Leervektor mit *EcoRI* geöffnet und mit dem *EcoRI*-geschnittenen, palindromen Linker-Oligo pCR-Flopo-N religiert. Dadurch wird zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen eine *NruI* Schnittstelle eingeführt.

pCAGGS HAhnAID-EGFP

Mit den Oligonukleotiden FR49 und FR46 wurde eine PCR auf pCAGGS HAhnAID durchgeführt. Die Oligonukleotide führen 5' von der HA-Markierung eine *Asp718I*-Schnittstelle sowie eine Kozaksequenz ein und auf der 3' Seite von AID eliminieren sie das

Stopp-Kodon und führen zwei AS als Linker vor einer *AgeI*-Schnittstelle ein. Das amplifizierte Fragment wurde mit *Asp718I* und *AgeI* geschnitten und in den analog geöffneten p-EGFP-N1 Vektor (BD Biosciences, Heidelberg) eingefügt. Dadurch entsteht ein fusionierter kodierender Bereich für AID und EGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors. Aus diesem Vektor pHAhnAID-EGFP-N1 wurde über *EcoRI* und *NotI* das HAhnAID-EGFP Fragment ausgeschnitten. Die überhängenden Enden wurde durch Auffüllen via Klenow-Polymerase geglättet und das resultierende Fragment in den mit *NruI* geöffnet Plasmid pCAGGS *NruI* ligiert. Der resultierende Vektor wurde erneut mit *EcoRI* geöffnet und das nun *EcoRI*-flankierte HAhnAID-EGFP Fragment in den mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

pCAGGS HAhnAID Δ NES-EGFP

Dieser Vektor wurde analog wie pCAGGS HAhnAID-EGFP hergestellt. Oligonukleotide: FR49 und FR47. PCR-Substrat: pCAGGS HAhnAID Δ NES

pCAGGS aidNLS-EGFP

Um den Vektor pCAGGS aidNLS-EGFP herzustellen, wurden die ersten 114 nt von AID mit den Oligonukleotiden FR58 und FR59 amplifiziert und in pCR-Topo kloniert (pCR aidNLS). Als PCR-Substrat fungierte der Vektor pCR-HAhnAID. Durch die PCR ging die HA-Epitopmarkierung verloren, wurde eine Kozak-Sequenz vor AID etabliert und eine flankierende *EcoRI* bzw. *AgeI* Schnittstelle eingeführt. Um aidNLS und EGFP ins gleiche Leseraster zu bringen, sind zwei weitere Schritte notwendig gewesen. Zuerst wurde der Vektor pCAGGS HAhnAID-EGFP mit *EcoRI/AgeI* geschnitten, und das für GFP kodierende *AgeI/EcoRI*-Fragment wurde zusammen mit dem *EcoRI/AgeI*-Fragment aus pCR aidNLS in einer Dreifach-Ligation in den mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert (pCAGGS aidNLS \neq EGFP). Dann wurde mit den Oligonukleotiden FR63 und FR45 GFP von diesem Vektor amplifiziert. Die Oligos führen eine *AgeI* sowie eine *SspBI* Schnittstelle ein und bringen GFP in das richtige Leseraster. PCR Fragment und Vektor wurden *AgeI* und *SspBI* geschnitten und das GFP des Vektors im falschen Leseraster durch das im richtigen (PCR-Fragment) über diese Schnittstellen ersetzt, wodurch der Vektor pCAGGS aidNLS-EGFP entsteht.

pCAGGS aidNES-EGFP

Für dieses Plasmid wurden die letzten 48 nt von AID und EGFP mit den Oligonukleotiden FR57 und FR45 von pCAGGS HAhnAID-EGFP amplifiziert und in pCR-Topo kloniert. Durch FR57 werden ein initiales ATG und eine *EcoRI* Schnittstelle 5' eingeführt. FR45 bindet 3' von HAhnAID-EGFP und *EcoRI*-Schnittstelle. Das aidNES-EGFP Fragment wurde aus pCR aidNES-EGFP über *EcoRI* ausgeschnitten und in den über *EcoRI* geöffneten pCAGGS Leervektor kloniert.

6.3 Zellkultur

Medien und Zusätze wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Firmen Biochrom (Berlin) und PAA (Pasching, Österreich) lieferten das fötale Kälberserum (FKS).

Die Maus prä-B Zelllinie 18-81 wurde in RPMI Medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 mM β-Mercaptoethanol kultiviert. Stabile Transfektionsklone mit pI-GFP_{stop} wurden zusätzlich in Gegenwart von 400 µg/ml G418 kultiviert, um den Verlust des Reporter-Transgens zu verhindern. Stabile Transfektionsklone von 18-81 mit pCAGGS- oder ptk-Vektoren wurden in Gegenwart von 1.25 µg/ml Puromycin kultiviert.

Die prä-B-Zelllinie Nalm-6 und die Burkitt-Lymphom Zelllinien BL70, Mutu III und Raji wurden in RPMI Medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Stabile Transfektionsklone mit pCAGGS- oder ptk-Vektoren wurden in Gegenwart von 0.4 µg/ml Puromycin kultiviert.

Für einige Experimente wurden Nalm-6 oder BL70 Transfektionsklone zusätzlich mit 1 mM Thymidin und 0.1 mM Cytidin kultiviert.

Die Rattenfibroblastenzelllinie TGR-1 wurde in D-MEM Medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Stabile Transfektionsklone mit pCAGGS- oder ptk-Vektoren wurden in Gegenwart von 1.0 µg/ml Puromycin kultiviert.

Für die Leptomycin B-Experimente wurden die TGR-1 Zellen für 6 h in Gegenwart von 20 ng/ml Leptomycin B im Medium kultiviert.

6.4 Transfektionen

Für die Etablierung stabiler Transfektionsklone wurden Zellen der Zelllinien 18-81, Nalm-6 und BL70 mit 250 V und 850 μF elektroporiert. TGR-1 Zellen wurden mit 230 V und 1000 μF elektroporiert. Für transiente Transfektionen wurden TGR-1 mit Kalziumphosphat (Sambrook & Russel, 2001) oder mit Polyfect (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers transfiziert.

6.5 Western-Blot-Analyse

Für Western-Blot-Analysen wurden ca. 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und in 3x 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. Die Proteine wurden (30 μg Protein pro Spur) mittels Elektrophorese in 12% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. 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 Chemilumineszenzreaktion mit Hilfe des ECL Kits gestartet und auf ECL-Chemilumineszenzfilmen visualisiert (beides Amersham Biosciences, Freiburg).

6.6 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für Immunfluoreszenzfärbungen und anschließende Analyse am Mikroskop wurden die Zellen mit PBS gewaschen und auf Objektträger transferiert. TGR-1-Zellen (adhärent) wurden in 6-Loch-Platten bereits auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden mit 4% PFA in PBS, pH 7,3, für 10 min fixiert, bevor sie mit 0.1% Tween in PBS gewaschen wurden. Dann wurden gegebenenfalls unspezifische Bindungsstellen mit 1% FKS in PBS für 1h blockiert, gefolgt von einer Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 3 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) gefärbt, erneut gewaschen, mit „Fluorescent

Mounting Medium“ (DakoCytomation, Hamburg) versetzt und mit einem Deckglas versehen respektive auf Objektträgern montiert. Die Fotoaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen wurden an einem Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit hochauflösender Digital Videokamera (Hamamatsu) unter Zuhilfenahme von Openlab 3.1.2 Software gemacht.

6.7 Northern-Blot-Analyse

Die Northern-Blot-Analyse wurde durchgeführt wie in den „Current Protocols in Molecular Biology“ empfohlen (Ausubel et al., 1995). Gesamt-RNS wurde von expandierenden Kulturen mittels TRIzol (Invitrogen) gewonnen und 15 mg an Gesamt-RNS pro Spur geladen. Fragmente des Glycerinaldehyd 3 Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Gens und des *aicda*-Gens (AID) wurden radioaktiv markiert durch Benutzung des „Random Primer labelling“ Kits (Roche Applied Science, Mannheim) und [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences, Freiburg).

6.8 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Um die Expression der verschiedenen *trans*-Faktoren zu bestimmen, von denen gezeigt worden ist, dass sie am Somatischen Hypermutationsmechanismus beteiligt sind, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die cDNS wurde über Standardbedingungen mittels Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt und in 45 Zyklen in einem Thermalcycler amplifiziert, wobei jeder Zyklus 45 sec bei 94°C, 30 sec bei 63°C und 30 sec bei 72°C umfasste. Folgende Primerkombinationen wurden benutzt: hnAID FR17/FR18; DNA-Polymerase Eta FR21/FR22; DNA-Polymerase Iota FR19/FR20; DNA-Polymerase Zeta: 5' Zeta/3' Zeta; Uracil-DNA-glycosylase (UDG) FR31/FR32.

6.9 Quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR)

Für die quantitative Bestimmung der AID-mRNS Mengen in 18-81 Subklonen wurde die RNS mit dem Isolierungskit von Qiagen gewonnen. Genomische DNA wurde mit RNase-freier DNase (Qiagen, Hilden) verdaut. 1 µg RNS der Gesamt-RNS wurde revers in cDNS mit Mo-MLVRT (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers transkribiert.

Für die quantitative Bestimmung der GFP mRNA-Mengen in Nalm-6 und BL70 AID-Transfektionsklonen wurde Gesamt-RNS von expandierenden Kulturen mittels Trizol Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) extrahiert. Ebenfalls 1 µg an Gesamt-RNS pro Kultur wurde über Standardverfahren mittels Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) revers in cDNA transkribiert.

Für die anschließende Quantifizierung der mRNA-Mengen (AID respektive GFP) durch Q-RT-PCR wurde ein LightCycler (Roche Applied Science, Mannheim) mit Software Version 3.5 benutzt. Für die Amplifikation wurden jeweils 20 ng von jeder cDNA und der FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science, Mannheim) benutzt. Für jedes Primerpaar wurde eine Standardkurve angelegt und die Effizienz der Reaktion aus der Steigung ermittelt. Die Anlagerungstemperatur und Elongationszeiten wurden auf Produktausbeute und Ausbleiben von Artefakten hin optimiert. Folgende Primerpaare wurden benutzt: AID 5' RM/AID 3' RM; Aldolase 5'/Aldolase 3'; GFP FR52/FR53; CD19 MS70/MS70 (right primer).

Zur Berechnung der relativen Mengen der jeweiligen mRNA wurde folgende Formel verwendet:

$$M_{\text{Probe}} = 100 \times \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Standard}})^{Cp \text{ Standard}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Probe}})^{Cp \text{ Probe}}}$$

Dabei ist M_{Probe} der relative Anteil an mRNA von AID oder GFP (Probe) als Vielfaches der relativen mRNA-Mengen an Aldolase respektive CD19 (Standard).

6.10 Durchflusszytometrie

Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen erst in PBS gewaschen und dann in PBS resuspendiert. Unmittelbar vor der Analyse der GFP-Revertanten wurde Propidiumiodid zugesetzt, um tote Zellen anzufärben. Die Messungen wurden auf FACScalibur oder FACSScan Geräten (beide BD Biosciences, Heidelberg) vorgenommen. Die Sortierung von revertierten Zellen wurde mit einem MoFlo (Cytomation, Fort Collin, USA) durchgeführt. Die Analyse der aufgezeichneten Daten wurde mit Hilfe der Cell Quest-Software von BD Sciences (Heidelberg) durchgeführt.

6.11 Erstanalyse von stabilen Transfektionsklonen

Nach Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten wurden die Zellen in 96-Lochplatten ausgesät. Einen Tag später wurde Selektionsmedium zugesetzt. Unabhängige Einzelklone wurden dann in 24-Lochplatten mit 2 ml frischem Selektionsmedium transferiert. Für pI-GFP^{stop}-Transfektionsklone wurde zusätzlich noch eine Replika-Platte mit 1 µg/ml Doxyzyklin im Medium angelegt. Sobald die Einzelklone dicht gewachsen waren, wurde die Frequenz an GFP-Revertanten pro 10⁵ bzw. 10⁶ lebende Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

6.12 Expansionsanalyse

Um Mutationsraten zu bestimmen, wurden jeweils 5 Millionen Zellen mit dem Farbstoff PKH-26 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen in mittlere Zellkulturflaschen überführt. Täglich (alle 24 h) wurde ein Aliquot Zellen den Flaschen entnommen und die Anzahl an fluoreszierenden Zellen innerhalb 1 Million lebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellteilungsrate lässt sich über die lineare Abnahme der PKH-26 Fluoreszenz-Intensität ermitteln (Bachl et al., 2001).

Für die Nalm-6 Transfektionsklone, bei denen der Einfluss von Thymidin auf die Mutationsrate getestet werden sollte, wurden zwei separate Kulturen angelegt und PKH-26 gefärbt, eine mit 1 mM Thymidin und 0.1 mM Cytidin, die andere ohne die Zusätze. Die PKH-26-Färbung konnte nicht für GFP/YFP-Transfektionsklone durchgeführt werden, weil der Farbstoff Phycoerythrin (PE) mit den Analyseparametern zur Diskriminierung von GFP und YFP interferiert. Da aber mit Hilfe dieser Methode ermittelt werden konnte, dass 18-81 Zellen im Mittel 1.8 Zellteilungen pro 24 h machen, konnte dieser Wert der Bestimmung der Mutationsrate in GFP/YFP- Transfektionsklonen zu Grunde gelegt werden.

6.13 Sequenzierungen von Transgenen

Um zu bestätigen, dass tatsächlich funktionsfähiges transgenes AID in Nalm-6 Transfektionsklonen exprimiert wird, wurde Gesamt-RNS mit Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) von einem AID-Transfektionsklon extrahiert und cDNA mittels Superscript II Reverse

Transkriptase und eines dT₁₇-Primers hergestellt. Die PCR-Reaktion wurde mit *Taq*-Polymerase im Puffer des Herstellers durchgeführt. Die für das *aicda*-Gen verwendeten Primer waren 5'bos junction und 3' IRES AID. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in den pCR-Topo Vektor kloniert und ein Klon sequenziert (Sequiserve, Vaterstetten).

Um die Reversionsereignisse mit Thymidin kultivierter Transfektionsklone zu charakterisieren, wurde das GFP-Transgen von sortierten GFP-positiven Revertanten via PCR mit *Taq*-Polymerase amplifiziert. Dazu wurden die Primer 5' EGFP/3'EGFP verwendet. Das gereinigte PCR-Produkt wurde direkt mit dem GFP #1TAG Mutagenese Primer über die Dideoxy-Kettenabbruchmethode mit T7 Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech) sequenziert.

6.14 Zellfraktionierung

Um die Zellen von AID-Transfektionsklonen in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion zu trennen, wurden 1×10^7 Zellen mit PBS gewaschen und in 150 μ l hypotonischem Puffer (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10% Glycerin, 0.33 M Saccharose, 0.5 mM DTT, Protease Inhibitoren [Roche Applied Sciences, Mannheim]) resuspendiert. 50 μ l der Suspension wurden abgenommen und als Gesamtextrakt (G) mit 75 μ l 3xLämmli versetzt. Die verbleibenden 100 μ l Zellsuspension wurden mit 66 μ l 0.1 % Triton-X in diesem hypotonen Puffer versetzt (final 0.04 % Triton-X 100) und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Lyse wurde visuell mit Hilfe von Trypanblau-Färbung unter dem Mikroskop überprüft. Danach wurden die lysierten Zellen für 5 min bei 300 g zentrifugiert. 125 μ l vom Überstand wurden abgenommen und in ein neues Gefäß überführt (Zytoplasma). Die sedimentierten Kerne (N) wurden zweimal mit hypotonem Puffer gewaschen und nach quantitativer Abnahme des Überstands in 125 μ l 3xLämmli resuspendiert. Die 125 μ l Zytoplasma wurden für 15 min bei 20.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 83 μ l abgenommen und in einem neuen Gefäß mit 42 μ l 3xLämmli versetzt (Z). Die Extrakte wurden wie oben beschrieben über Western-Blot-Analyse analysiert. Von Gesamtextrakt und Zytoplasma wurden gleiche Mengen, von der Kernfraktion nur das halbe Volumen aufgetragen, um die tatsächliche Verteilung der Proteine zu reflektieren.

6.15 Immunpräzipitationsexperimente mit radioaktiven Zellextrakten

Um die Immunpräzipitation von radioaktiv markiertem AID zu ermöglichen, wurden pro Ansatz 1×10^7 Zellen von wt Nalm-6 Zellen und Zellen eines NLS-AID Klons für 4 h in 4 ml Schwefel-freiem Medium (RPMI Medium ohne Methionin und ohne Cystin, 10% dialysiertes FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Danach wurde 1 mCi Tran³⁵S-label (MP Biomedicals, Eschwege) zugesetzt und über Nacht in diesem Medium inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen dann wie unter „Zellfraktionierung“ beschrieben aufgeschlossen und die zytoplasmatische Fraktion (radioaktiver Extrakt) für die IP verwendet. Dazu wurden 25 µl GammaBind Plus Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) für 4 h bei 4°C auf einem Drehrad mit 500 µl Zellkulturüberstand des entsprechenden Antikörpers inkubiert. Danach wurde der Überstand entfernt und die mit Antikörper beladene Sepharosematrix mit dem radioaktiven Überstand in einem Gesamtvolumen von 500 µl über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharosematrix 10-mal mit 500 µl hypotonem Puffer (siehe Zellfraktionierung) gewaschen, bevor die gebundenen Proteine mit Hilfe von 3xLämmli und Inkubation für 5 Minuten bei 100°C eluiert wurden. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie auf Autoradiographiefilmen von Amersham Biosciences (Freiburg).

6.16 Gelfiltrationsexperimente

Pro Gelfiltrationsexperiment wurden 1×10^8 Zellen in ca. 500 µl Lysepuffer (10 mM HEPES pH 7.9, 0.04% Triton-X 100, 1.5 mM MgCl₂, 10% Glycerin, 0.5 mM DTT, Protease Inhibitoren [Roche Applied Science, Mannheim]) mit KCl-Gehalt je nach Anforderung aufgenommen und sonifiziert. Die so gewonnen Gesamtextrakte wurden zentrifugiert und der Überstand (ca. 400 µl) 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 µl/min in 250 µl Fraktionen aufgetrennt. Die Laufpuffer entsprachen den entsprechenden Salzkonzentrationen des Gesamtzellextrakts. 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 350 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 125 µl von zwei direkt aufeinander folgenden Fraktionen (1+2; 3+4; etc.) vereinigt, mit Trichloressigsäure (final 15 %) gefällt, in 3xLämmli resuspendiert und mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse (s.o.) auf ihren Gehalt an HA-AID, AID oder GFP hin untersucht.

7 Literaturverzeichnis

- Albert, T., Urlbauer, B., Kohlhuber, F., Hammersen, B., und Eick, D. Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene* **9** (1994), 759-763
- Ansaldi, M., Lepelletier, M., und Mejean, V. Site-specific mutagenesis by using an accurate recombinant polymerase chain reaction method. *Anal Biochem* **234** (1996), 110-111
- Arakawa, H., Hauschild, J., und Buerstedde, J. M. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* **295** (2002), 1301-1306
- Ausubel, F. R., Brent, R. E., Kingston, D. D., Moore, J. G., Seidman, J. A., Smith, K., und Struhl. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York
- Babbage, G., Garand, R., Robillard, N., Zojer, N., Stevenson, F. K., und Sahota, S. S. Mantle cell lymphoma with t(11;14) and unmutated or mutated VH genes expresses AID and undergoes isotype switch events. *Blood* **103** (2004), 2795-2798
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M., und Olsson, C. Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol* **166** (2001), 5051-5057
- Bachl, J., und Olsson, C. Hypermutation targets a green fluorescent protein-encoding transgene in the presence of immunoglobulin enhancers. *Eur J Immunol* **29** (1999), 1383-1389
- Bachl, J., Olsson, C., Chitkara, N., und Wabl, M. The Ig mutator is dependent on the presence, position, and orientation of the large intron enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998), 2396-2399
- Bachl, J., und Wabl, M. Enhancers of hypermutation. *Immunogenetics* **45** (1996a), 59-64
- Bachl, J., und Wabl, M. An immunoglobulin mutator that targets G.C base pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (1996b), 851-855
- Baldwin, T. O., Treat, M. L., und Daubner, S. C. Cloning and expression of the luxY gene from *Vibrio fischeri* strain Y-1 in *Escherichia coli* and complete amino acid sequence of the yellow fluorescent protein. *Biochemistry* **29** (1990), 5509-5515
- Barreto, V., Reina-San-Martin, B., Ramiro, A. R., McBride, K. M., und Nussenzweig, M. C. C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol Cell* **12** (2003), 501-508
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., und Medalia, O. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306** (2004), 1387-1390

- Begum, N. A., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., und Honjo, T. De novo protein synthesis is required for activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA cleavage in immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004), 13003-13007
- Berek, C., und Milstein, C. The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev* **105** (1988), 5-26
- Betz, A. G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T., und Neuberger, M. S. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* **77** (1994), 239-248
- Blanc, V., Henderson, J. O., Kennedy, S., und Davidson, N. O. Mutagenesis of apobec-1 complementation factor reveals distinct domains that modulate RNA binding, protein-protein interaction with apobec-1, and complementation of C to U RNA-editing activity. *J Biol Chem* **276** (2001), 46386-46393
- Blanc, V., Kennedy, S., und Davidson, N. O. A novel nuclear localization signal in the auxiliary domain of apobec-1 complementation factor regulates nucleocytoplasmic import and shuttling. *J Biol Chem* **278** (2003), 41198-41204
- Bodor, C., Bognar, A., Reiniger, L., Szepesi, A., Toth, E., Kopper, L., und Matolcsy, A. Aberrant somatic hypermutation and expression of activation-induced cytidine deaminase mRNA in mediastinal large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* **129** (2005), 373-376
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., und Cullen, B. R. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* **16** (1996), 4207-4214
- Bradley, M. O., und Sharkey, N. A. Mutagenicity of thymidine to cultured Chinese hamster cells. *Nature* **274** (1978), 607-608
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M. D., und Goodman, M. F. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003), 4102-4107
- Brar, S., Watson, M., und Diaz, M. Activation-induced cytosine deaminase, AID, is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J Biol Chem* (2004),
- Brenner, S., und Milstein, C. Origin of antibody variation. *Nature* **211** (1966), 242-243
- Chatterjee, S., und Stochaj, U. Diffusion of proteins across the nuclear envelope of HeLa cells. *Biotechniques* **24** (1998), 668-674
- Chaudhuri, J., Khuong, C., und Alt, F. W. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* **430** (2004), 992-998
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., und Alt, F. W. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* **422** (2003), 726-730

- Cohen, J. H., Revillard, J. P., Magaud, J. P., Lenoir, G., Vuillaume, M., Manel, A. M., Vincent, C., und Bryon, P. A. B-cell maturation stages of Burkitt's lymphoma cell lines according to Epstein-Barr virus status and type of chromosome translocation. *J Natl Cancer Inst* **78** (1987), 235-242
- Diaz, M., Velez, J., Singh, M., Cerny, J., und Flajnik, M. F. Mutational pattern of the nurse shark antigen receptor gene (NAR) is similar to that of mammalian Ig genes and to spontaneous mutations in evolution: the translesion synthesis model of somatic hypermutation. *Int Immunol* **11** (1999), 825-833
- Diaz, M., Watson, N. B., Turkington, G., Verkoczy, L. K., Klinman, N. R., und McGregor, W. G. 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** (2003), 836-847
- Dickerson, S. K., Market, E., Besmer, E., und Papavasiliou, F. N. AID Mediates Hypermutation by Deaminating Single Stranded DNA. *J Exp Med* **197** (2003), 1291-1296
- Doi, T., Kinoshita, K., Ikegawa, M., Muramatsu, M., und Honjo, T. 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** (2003), 2634-2638
- Drexler, H. (2001) *The Leukemia-Lymphoma Cell Line*, 1st Ed. FactsBook, Academic Press, London
- Durandy, A., Revy, P., und Fischer, A. Hyper-immunoglobulin-M syndromes caused by an intrinsic B cell defect. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **3** (2003), 421-425
- Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Gueranger, Q., Reynaud, C. A., und Weill, J. C. Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature* **419** (2002a), 944-947
- Faili, A., Aoufouchi, S., Gueranger, Q., Zober, C., Leon, A., Bertocci, B., Weill, J. C., und Reynaud, C. A. AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat Immunol* **3** (2002b), 815-821
- Fornierod, M., Ohno, M., Yoshida, M., und Mattaj, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90** (1997), 1051-1060
- Fried, H., und Kutay, U. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60** (2003), 1659-1688
- Fukita, Y., Jacobs, H., und Rajewsky, K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* **9** (1998), 105-114
- Furth, P. A., St Onge, L., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., und Hennighausen, L. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994), 9302-9306

- Golding, G. B., Gearhart, P. J., und Glickman, B. W. Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics* **115** (1987), 169-176
- Goncalves, O., Drobetsky, E., und Meuth, M. Structural alterations of the aprt locus induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* **4** (1984), 1792-1799
- Gorlich, D., und Kutay, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15** (1999), 607-660
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., und Bujard, H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** (1995), 1766-1769
- Goyenechea, B., Klix, N., Yelamos, J., Williams, G. T., Riddell, A., Neuberger, M. S., und Milstein, C. Cells strongly expressing Ig(kappa) transgenes show clonal recruitment of hypermutation: a role for both MAR and the enhancers. *Embo J* **16** (1997), 3987-3994
- Green, N. S., Rabinowitz, J. L., Zhu, M., Kobrin, B. J., und Scharff, M. D. Immunoglobulin variable region hypermutation in hybrids derived from a pre-B- and a myeloma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (1995), 6304-6308
- Greeve, J., Philipsen, A., Krause, K., Klapper, W., Heidorn, K., Castle, B. E., Janda, J., Marcu, K. B., und Parwaresch, R. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **101** (2003), 3574-3580
- Greiner, A., Tobollik, S., Buettner, M., Jungnickel, B., Herrmann, K., Kremmer, E., und Niedobitek, G. Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol* **205** (2005), 541-547
- Guikema, J. E., Rosati, S., Akkermans, K., Bende, R. J., van Noesel, C. J., van Krieken, J. H., Hansmann, M. L., Schuurin, E., und Kluin, P. M. Quantitative RT-PCR analysis of activation-induced cytidine deaminase expression in tissue samples from mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* **105** (2005), 2997-2998; discussion 2998-2999
- Hamamoto, T., Gunji, S., Tsuji, H., und Beppu, T. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **36** (1983), 639-645
- Hardianti, M. S., Tatsumi, E., Syampurnawati, M., Furuta, K., Saigo, K., Kawano, S., Kumagai, S., Nakamura, F., und Matsuo, Y. Expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in Burkitt lymphoma cells: rare AID-negative cell lines with the unmutated rearranged VH gene. *Leuk Lymphoma* **45** (2004a), 155-160
- Hardianti, M. S., Tatsumi, E., Syampurnawati, M., Furuta, K., Saigo, K., Nakamachi, Y., Kumagai, S., Ohno, H., Tanabe, S., Uchida, M., und Yasuda, N. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular lymphoma: association between AID expression and ongoing mutation in FL. *Leukemia* **18** (2004b), 826-831

- Hardianti, M. S., Tatsumi, E., Syampurnawati, M., Furuta, K., Suzuki, A., Saigo, K., Kawano, S., Takenokuchi, M., Kumagai, S., Matsuo, Y., Koizumi, T., und Takeuchi, M. Presence of somatic hypermutation and activation-induced cytidine deaminase in acute lymphoblastic leukemia L2 with t(14;18)(q32;q21). *Eur J Haematol* **74** (2005), 11-19
- Harris, R. S., und Liddament, M. T. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* **4** (2004), 868-877
- Harris, R. S., Petersen-Mahrt, S. K., und Neuberger, M. S. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* **10** (2002), 1247-1253
- Harris, R. S., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Malim, M. H., und Neuberger, M. S. DNA deamination: not just a trigger for antibody diversification but also a mechanism for defense against retroviruses. *Nat Immunol* **4** (2003), 641-643
- Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I., und Kersey, J. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* **23** (1979), 174-180
- Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., und Honjo, T. 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** (2004), 1975-1980
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., und Shlomchik, M. (2005) *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 6th Ed., Garland Science Publishing, New York
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., und Smith, A. E. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311** (1984), 33-38
- Kirberg, J., Gschwendner, C., Dangy, J. P., Ruckerl, F., Frommer, F., und Bachl, J. Proviral integration of an Abelson-murine leukemia virus deregulates BCLF-expression in the hypermutating pre-B cell line 18-81. *Mol Immunol* **42** (2005), 1235-1242
- Klotz, E. L., und Storb, U. Somatic hypermutation of a lambda 2 transgene under the control of the lambda enhancer or the heavy chain intron enhancer. *J Immunol* **157** (1996), 4458-4463
- Kong, Q., Zhao, L., Subbiah, S., und Maizels, N. A lambda 3' enhancer drives active and untemplated somatic hypermutation of a lambda 1 transgene. *J Immunol* **161** (1998), 294-301
- Kotani, A., Okazaki, I. M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Begum, N. A., Nakajima, T., Saito, H., und Honjo, T. A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005), 4506-4511
- Krause, K., Marcu, K. B., und Greeve, J. The cytidine deaminases AID and APOBEC-1 exhibit distinct functional properties in a novel yeast selectable system. *Mol Immunol* (2005),
- Kresnak, M. T., und Davidson, R. L. Thymidine-induced mutations in mammalian cells: sequence specificity and implications for mutagenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1992), 2829-2833

- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., und Horinouchi, S. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (1999), 9112-9117
- la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M., und Brunak, S. NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res* **31** (2003), 393-396
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970), 680-685
- Larijani, M., Frieder, D., Basit, W., und Martin, A. The mutation spectrum of purified AID is similar to the mutability index in Ramos cells and in *ung(-/-)msh2(-/-)* mice. *Immunogenetics* **56** (2005), 840-845
- Lebecque, S. G., und Gearhart, P. J. 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** (1990), 1717-1727
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., und Hance, A. J. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300** (2003), 1112
- Liu, Y. J., Malisan, F., de Bouteiller, O., Guret, C., Lebecque, S., Banchereau, J., Mills, F. C., Max, E. E., und Martinez-Valdez, H. Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* **4** (1996), 241-250
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y., und MacLennan, I. C. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* **21** (1991), 2951-2962
- Machida, K., Cheng, K. T., Pavio, N., Sung, V. M., und Lai, M. M. Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J Virol* **79** (2005), 8079-8089
- MacLennan, I. C. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12** (1994), 117-139
- Mao, C., Jiang, L., Melo-Jorge, M., Puthenveetil, M., Zhang, X., Carroll, M. C., und Imanishi-Kari, T. T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype. *Immunity* **20** (2004), 133-144
- Martin, A., und Scharff, M. D. Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002), 12304-12308
- Martomo, S. A., Yang, W. W., Wersto, R. P., Ohkumo, T., Kondo, Y., Yokoi, M., Masutani, C., Hanaoka, F., und Gearhart, P. J. Different mutation signatures in DNA polymerase ϵ - and MSH6-deficient mice suggest separate roles in antibody diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005), 8656-8661

- McBride, K. M., Barreto, V., Ramiro, A. R., Stavropoulos, P., und Nussenzweig, M. C. Somatic Hypermutation Is Limited by CRM1-dependent Nuclear Export of Activation-induced Deaminase. *J Exp Med* **199** (2004), 1235-1244
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., und Weigert, M. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** (1984), 3180-3184
- Michael, N., Shen, H. M., Longerich, S., Kim, N., Longacre, A., und Storb, U. The E box motif CAGGTG enhances somatic hypermutation without enhancing transcription. *Immunity* **19** (2003), 235-242
- Milstein, C., Neuberger, M. S., und Staden, R. Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998), 8791-8794
- Mizushima, S., und Nagata, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* **18** (1990), 5322
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W., und Petersen-Mahrt, S. K. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* **279** (2004), 52353-52360
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., und Honjo, T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102** (2000), 553-563
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., und Honjo, T. 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** (1999), 18470-18476
- Nagaoka, H., Ito, S., Muramatsu, M., Nakata, M., und Honjo, T. DNA cleavage in immunoglobulin somatic hypermutation depends on de novo protein synthesis but not on uracil DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005), 2022-2027
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C. G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., und Shimizu, A. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* **302** (2003), 2137-2140
- Navaratnam, N., Bhattacharya, S., Fujino, T., Patel, D., Jarmuz, A. L., und Scott, J. Evolutionary origins of apoB mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell* **81** (1995), 187-195
- Navaratnam, N., Morrison, J. R., Bhattacharya, S., Patel, D., Funahashi, T., Giannoni, F., Teng, B. B., Davidson, N. O., und Scott, J. The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. *J Biol Chem* **268** (1993), 20709-20712
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., und Beppu, T. Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved

- in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem* **269** (1994), 6320-6324
- Okazaki, I. M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K., und Honjo, T. Constitutive Expression of AID Leads to Tumorigenesis. *J Exp Med* **197** (2003), 1173-1181
- Ossareh-Nazari, B., Bachelierie, F., und Dargemont, C. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* **278** (1997), 141-144
- Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., Polakiewicz, R., Chaganti, R. S., und Dalla-Favera, R. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood* **104** (2004), 3318-3325
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Kuppers, R., und Dalla-Favera, R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412** (2001), 341-346
- Peters, A., und Storb, U. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* **4** (1996), 57-65
- Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S., und Neuberger, M. S. AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* **418** (2002), 99-103
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., und Goodman, M. F. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* **424** (2003), 103-107
- Phear, G., und Meuth, M. The genetic consequences of DNA precursor pool imbalance: sequence analysis of mutations induced by excess thymidine at the hamster apt locus. *Mutat Res* **214** (1989), 201-206
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., und Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111** (1992), 229-233
- Prouty, S. M., Hanson, K. D., Boyle, A. L., Brown, J. R., Shichiri, M., Follansbee, M. R., Kang, W., und Sedivy, J. M. A cell culture model system for genetic analyses of the cell cycle by targeted homologous recombination. *Oncogene* **8** (1993), 899-907
- Pulvertaft, J. V. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* **39** (1964), 238-240
- Rada, C., Di Noia, J. M., und Neuberger, M. S. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* **16** (2004), 163-171
- Rada, C., Gonzalez-Fernandez, A., Jarvis, J. M., und Milstein, C. The 5' boundary of somatic hypermutation in a V kappa gene is in the leader intron. *Eur J Immunol* **24** (1994), 1453-1457

- Rada, C., Jarvis, J. M., und Milstein, C. AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002a), 7003-7008
- Rada, C., und Milstein, C. The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *Embo J* **20** (2001), 4570-4576
- Rada, C., Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T., und Neuberger, M. S. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* **12** (2002b), 1748-1755
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., und Nussenzweig, M. C. AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* **118** (2004), 431-438
- Ramiro, A. R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., und Nussenzweig, M. C. Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol* **4** (2003), 452-456
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., und Durandy, A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102** (2000), 565-575
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., und Dingwall, C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64** (1991), 615-623
- Rogerson, B. J. Mapping the upstream boundary of somatic mutations in rearranged immunoglobulin transgenes and endogenous genes. *Mol Immunol* **31** (1994), 83-98
- Rogozin, I. B., und Diaz, M. 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** (2004), 3382-3384
- Rogozin, I. B., und Kolchanov, N. A. Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1171** (1992), 11-18
- Rogozin, I. B., Pavlov, Y. I., Bebenek, K., Matsuda, T., und Kunkel, T. A. Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase eta error spectrum. *Nat Immunol* **2** (2001), 530-536
- Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H., und Rickinson, A. B. Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J* **6** (1987), 2743-2751
- Sambrook, J., und Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3 Ed., 3. 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., und Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418** (2002), 646-650
- Shinkura, R., Ito, S., Begum, N. A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H., und Honjo, T. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol* **5** (2004), 707-712
- Siden, E. J., Baltimore, D., Clark, D., und Rosenberg, N. E. Immunoglobulin synthesis by lymphoid cells transformed in vitro by Abelson murine leukemia virus. *Cell* **16** (1979), 389-396
- Smit, L. A., Bende, R. J., Aten, J., Guikema, J. E., Aarts, W. M., und van Noesel, C. J. Expression of activation-induced cytidine deaminase is confined to B-cell non-Hodgkin's lymphomas of germinal-center phenotype. *Cancer Res* **63** (2003), 3894-3898
- Ta, V. T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., und Honjo, T. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol* **4** (2003), 843-848
- Teng, B., Burant, C. F., und Davidson, N. O. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* **260** (1993), 1816-1819
- Tumas-Brundage, K. M., Vora, K. A., und Manser, T. Evaluation of the role of the 3'alpha heavy chain enhancer [3'alpha E(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol Immunol* **34** (1997), 367-378
- Unniraman, S., Zhou, S., und Schatz, D. G. Identification of an AID-independent pathway for chromosomal translocations between the Igh switch region and Myc. *Nat Immunol* **5** (2004), 1117-1123
- Wang, C. L., Harper, R. A., und Wabl, M. Genome-wide somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004), 7352-7356
- Wilson, P. C., de Bouteiller, O., Liu, Y. J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J. D., und Pascual, V. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med* **187** (1998), 59-70
- Wold, M. S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* **66** (1997), 61-92
- Wolniak, K. L., Shinall, S. M., und Waldschmidt, T. J. The germinal center response. *Crit Rev Immunol* **24** (2004), 39-65
- Woo, C. J., Martin, A., und Scharff, M. D. Induction of somatic hypermutation is associated with modifications in immunoglobulin variable region chromatin. *Immunity* **19** (2003), 479-489
- Wu, X., Geraldles, P., Platt, J. L., und Cascalho, M. The double-edged sword of activation-induced cytidine deaminase. *J Immunol* **174** (2005), 934-941

- Xie, K., Sowden, M. P., Dance, G. S., Torelli, A. T., Smith, H. C., und Wedekind, J. E. The structure of a yeast RNA-editing deaminase provides insight into the fold and function of activation-induced deaminase and APOBEC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004), 8114-8119
- Xu, L., und Massague, J. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5** (2004), 209-219
- Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. t., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., und Roden, R. B. B Lymphocyte Activation by Human Papillomavirus-Like Particles Directly Induces Ig Class Switch Recombination via TLR4-MyD88. *J Immunol* **174** (2005), 7912-7919
- Yang, Y., und Smith, H. C. Multiple protein domains determine the cell type-specific nuclear distribution of the catalytic subunit required for apolipoprotein B mRNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (1997), 13075-13080
- Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y. L., Gonzalez Fernandez, A., Pannell, R., Neuberger, M. S., und Milstein, C. Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* **376** (1995), 225-229
- Yi, M., Wu, P., Trevorrow, K. W., Claflin, L., und Garrard, W. T. Evidence that the Igkappa gene MAR regulates the probability of premature V-J joining and somatic hypermutation. *J Immunol* **162** (1999), 6029-6039
- Yoshikawa, K., Okazaki, I. M., Eto, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., und Honjo, T. AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* **296** (2002), 2033-2036
- Zaim, J., und Kierzek, A. M. Domain organization of activation-induced cytidine deaminase. *Nat Immunol* **4** (2003), 1153; author reply 1154
- Zeng, X., Winter, D. B., Kasmer, C., Kraemer, K. H., Lehmann, A. R., und Gearhart, P. J. DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol* **2** (2001), 537-541
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C., und Gao, L. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424** (2003), 94-98
- Zhang, J., MacLennan, I. C., Liu, Y. J., und Lane, P. J. Is rapid proliferation in B centroblasts linked to somatic mutation in memory B cell clones? *Immunol Lett* **18** (1988), 297-299
- Zhang, W., Bardwell, P. D., Woo, C. J., Poltoratsky, V., Scharff, M. D., und Martin, A. Clonal instability of V region hypermutation in the Ramos Burkitt's lymphoma cell line. *Int Immunol* **13** (2001), 1175-1184

8 Abkürzungsverzeichnis

Maßangaben erfolgten weitestgehend gemäß internationaler Konvention in SI-Einheiten (Système International d'Unités; <http://www.bipm.org/en/si>) oder in SI-abgeleiteten Einheiten (http://www.bipm.org/en/si/derived_units/2-2-2.html). Als Präfixe wurden grundsätzlich SI-Präfixe benutzt (<http://www.bipm.org/en/si/prefixes.html>).

Aminosäuren wurden gemäß dem IUPAC Einbuchstaben-Kode für Aminosäuren abgekürzt.

Weitere Abkürzungen:

%	Prozent
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACF	APOBEC-1 Komplementationsfaktors ("APOBEC-1 complementation factor")
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
APC	Antigen präsentierende Zelle ("Antigen Presenting Cell")
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid
AS	Aminosäure
ASHM	Aberrante Somatische Hypermutation
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNS	komplementäre DNS
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CRM1	„Chromosome Maintenance Region 1“
CSR	Klassenwechsel ("Class Switch Recombination")
CTP	Cytosintriphosphat

DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
FDC	Follikuläre dendritische Zelle ("Follicular Dendritic Cell")
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DMP	Dimethylpimelimidat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
DTBP	Dimethyldithiobispropionimidat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
E _{LI}	Großer Intron-Enhancer ("Large Intron Enhancer")
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	„Green Fluorescent Protein“
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HIGM	Hyper-IgM
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“
hn	human
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor von NFκB
IP	Immunpräzipitation
IRES	Interne Ribosomen Eintrittsstelle
kDa	Kilo-Dalton

L	Liter
M	Molar (mol/Liter)
MDa	Mega-Dalton
min	Minute
mRNS	Boten RNS ("Messenger RNS")
mut/bp/gen	Mutationen pro Basenpaar und Generation
NES	Nukleäre Exportsequenz
NFkB	„Nuclear factor kappa B“
NGFR	Nerwachstumsfaktor-Rezeptor ("Nerve Growth Factor Receptor")
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz ("Nuclear localization sequence")
NPC	Kernporenkomplex („ <u>N</u> uclear <u>P</u> ore <u>C</u> omplex“)
Oligo	Oligonukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ("Phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction")
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PK	Pyruvat Kinase
PVDF	Polyvinylideneffluorid
Q-RT-PCR	„Quantitative Real-time PCR“
RFP	„Red Fluorescent Protein“
RNS	Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
RT-PCR	Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHM	Somatische Hypermutation
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
T _H -Zellen	T-Helferzellen
Thd	Thymidin
tk	Thymidinkinase

U	„Unit“
u. a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
wt	Wildtyp
YFP	„Yellow Fluorescent Protein“
z. B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des Weges einer aktivierten B-Zelle durch das Keimzentrum.....	5
Abb. 2	Schematische Darstellung des humanen Genlokusses für die Schwere Kette (IgH) nach V(D)J-Rekombination.....	6
Abb. 3	Reparaturwege für AID-induzierte DNS-Desaminierung nach Rada et al. (2004).	11
Abb. 4	Schematische Darstellung des Prinzips des GFP-Reversions-Assays nach Bachl & Olsson (1999).....	14
Abb. 5	Schematische Darstellung des klassischen NLS- und NES vermittelten Kerntransports über die Kernmembran hinweg (aus Xu & Massague, 2004; modifiziert).....	16
Abb. 6	Reporterkonstrukt pI-GFP _{stop} zur Messung von Hypermutationsaktivität.....	19
Abb. 7	Reversionsanalyse eines stabilen pI-GFP _{stop} Transfektionsklons der Zelllinie 18-81.....	20
Abb. 8	Expansionsanalyse von jeweils fünf unabhängigen Subklonen, die aus der pI GFP _{stop} -Ausgangskultur hervorgegangen sind.....	21
Abb. 9	Reporterkonstrukt ptk-YFP _{stop} zur Messung von Hypermutationsaktivität.....	22
Abb. 10	Verteilung der Frequenzen an GFP- und YFP-Revertanten für je 24 unabhängige GFP/YFP-Transfektionsklone, die aus den Subklonen #1-1 und #1-5 nach stabiler Transfektion mit ptk-YFP _{stop} hervorgegangen sind.....	23
Abb. 11	Bestimmung der AID mRNS-Mengen für die fünf pI-GFP _{stop} -Subklone mittels quantitativer Real-time PCR.....	24

Abb. 12	Der Vektor pAID-ngfr dient der Expression von humanem AID.	25
Abb. 13	Rekombinantes humanes AID rekonstituiert die Mutationsaktivität in GFP/YFP-Transfektionsklonen.	26
Abb. 14	Endogenes AID wird in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien Mutu III und BL70 und der prä-B Zelllinie Nalm-6 nicht gleichmäßig exprimiert.	28
Abb. 15	Das Reporterkonstrukt ptk-GFP _{stop} kodiert für GFP mit vorzeitigem Stopp-Kodon und wird über den Thymidinkinasepromotor (ptk) transkribiert.	29
Abb. 16	Verteilung der Reversionsfrequenzen für Nalm-6 und BL70 Zellen, die stabil mit dem Reporterkonstrukt ptk-GFP _{stop} transfiziert worden sind.	29
Abb. 17	Anti-HA Western-Blot-Analyse für jeweils 5 unabhängige Nalm-6 und BL70 GFP/AID-Transfektionsklone.	30
Abb. 18	Verteilung der Reversionsfrequenzen für Nalm-6 und BL70 Zellen, die stabil mit den Vektoren ptk-GFP _{stop} und pAID-ngfr transfiziert worden sind.	31
Abb. 19	Expansionsanalyse eines Nalm-6 ptk-GFP _{stop} -Transfektionsklons mit und ohne Zusatz von Thymidin zum Kulturmedium.	32
Abb. 20	Vergleich der Transkription des GFP-Reporters in Nalm-6 und BL70 Transfektionsklonen.	34
Abb. 21	Northern-Blot-Analyse des endogenen AID-Expressionsniveaus von Nalm-6 Zellen nach Zusatz von Thymidin (Thd; 1mM Thymidin + 0.1mM Cytidin) zum Kulturmedium.	35
Abb. 22	Sequenzhomologie auf Ebene der Aminosäuren von AID aus Mensch, Maus und Huhn.	37

Abb. 23	Schematische Darstellung der rekombinanten AID-Proteine bzw. Lokalisationsmutanten.....	38
Abb. 24	GFP-Reversionsfrequenzen für verschiedene Lokalisationsmutanten von AID, die stabil in Subklon #1-5 (von 18-81 abgeleitet) transfiziert worden sind.	40
Abb. 25	Anti-HA Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des Expressionsniveaus der AID-Mutanten.	42
Abb. 26	Expansionsanalyse für wt AID, AID Δ NES, NLS-AID und AID-3xNLS Transfektionsklone, die stabil in den von 18-81 abgeleiteten Subklon #1-5 transfiziert worden sind.	42
Abb. 27	Subzelluläre Lokalisation von AID-Lokalisationsmutanten in 18-81 Zellen (Subklon #1-5).....	43
Abb. 28	Lokalisation von Fusionsproteinen aus AID und EGFP.	45
Abb. 29	Western-Blot-Analyse fraktionierter Zellektrakte je eines repräsentativen wt AID, AID Δ NES, NLS-AID oder GFP exprimierender Klons in 18-81 Zellen.....	46
Abb. 30	Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen in TGR-1 mit und ohne Leptomycin B.	48
Abb. 31	GFP-Reversionsfrequenzen für verschiedene Lokalisationsmutanten von AID, die stabil zusammen mit dem Reporterkonstrukt ptk-GFP $_{stop}$ -NGFR in Nalm-6-Zellen transfiziert worden sind.	50
Abb. 32	Anti-AID-Antikörper erkennen überexprimiertes AID in der Immunfluoreszenz.	52
Abb. 33	Immunpräzipitation von radio-aktiv markiertem NLS-AID.	54

Abb. 34	Fraktionierung von AID-Komplexen bei unterschiedlichen Salzbedingungen.	56
Abb. 35	Vier Modelle, um das Fehlen einer nachweisbaren Mutationsaktivität in Nalm-6 zu erklären.	71

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	GFP-Reversionsraten von Thymidin-behandelten Nalm-6 GFP- und GFP/AID-Transfektionsklonen.	33
Tab. 2	Vergleich der Reversionsaktivität verschiedener AID-Lokalisationsmutanten in Subklon #1-5 (18-81) und Nalm-6 Zellen.	51

Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die vielen hilfreichen Ideen, Hände und Aufmunterungen, die ich von anderen Menschen bekommen und erfahren habe. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle ganz, ganz herzlich bedanken:

Bei Dr. Jürgen Bachl, meinem Betreuer, der mir immer mit seiner lockeren und ausgeglichenen Art und seiner Begeisterung für Wissenschaft und Diskussionen imponiert hat. Wir waren ein prima Team.

Bei Claudia Gschwendner, Manuela Gruber und Steffi Graf, für ihre Unterstützung und die vielen augenzwinkernde Blicke.

Bei Maren Mierau, die mir bei meinen ersten Schritten der Zellfraktionierung geholfen hat und deren wissenschaftlicher Idealismus mir immer ein Vorbild war. Du bist meine Heldin. Auch vielen Dank für die nicht-wissenschaftlichen Momente, auch wenn sie uns manchmal nur eine trockene Breze einbrachten....

Bei Stephanie Tobollik, für das gleiche Schicksal: „AID – The major problem the world shares“ oder „wie man von FruCon 1 auf FruCon 3 in 2 Sekunden kommt (wie lange man halt braucht, um einen miserablen AID-Blot als solchen zu erkennen)“. Vielen Dank für die gemeinsamen „Analysen“ unserer „Ergebnisse“. Dank Dir (und des gemeinschaftlichen Kaffee-Trinkens) war geteiltes Leid auch wirklich halbes Leid.

Bei Reinhard Mailhammer, für seine Hilfe bei der Q-RT-PCR und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Bei Dr. Rob Chapman u. Dr. Martin Schlee, für die Hilfe bei den IP-Experimenten und der radioaktiven Markierung von Zellen.

Bei Dr. Elisabeth Kremmer, Dr. Ulla Zimmer-Strobl und Prof. M. Meisterernst, für die Antikörper, die sie mir zur Verfügung stellten.

Bei Dr. Michael Hölzel und Dr. Falk Nimmerjahn, für ihre Tipps bei der Immunfluoreszenz.

Bei Dr. Markus Münz und Michaela Rohrmoser, für die Hilfe bei B/N 2D PAGE bzw. den Saccharosegradienten.

Bei Prof. Dirk Eick, meinem Doktorvater, für die Betreuung und die stets interessierte, hilfsbereite und vorbildliche Art, in menschlicher wie in wissenschaftlicher Hinsicht.

Bei Birgit Schrezenmeir und Sylvia Manglkammer, für ihre stete Bereitschaft, einem völlig verwirrten und desorientierten Doktoranden auf die Sprünge zu helfen, wenn es um bürokratische Formulare und ähnliches ging. Und für die „Verpflegung“ im Sekretariat, ohne die ich bestimmt weniger Endorphine im Blut gehabt hätte.

Bei Anastassia Malamoussi, Thomas Grimm und Anita Gruber-Eber, für die TGR-1-Zellen und den fröhlichen Empfang im Erdgeschoss.

Bei Dr. Berit Jungnickel u. Dr. Katja Strässer, für Ihre Ratschläge und Ideen, die mir bei der Lösung so manchen Problems geholfen haben.

Bei den Damen aus der Spülküche und Guiseppe, weil Ihr fleißiger Einsatz im Alltag so selten gewürdigt wird.

Bei Herrn Prof. Georg Bornkamm, für die Möglichkeit, an seinem Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Bei den Firmen Aventis-Sanofi und GlaxoSmithKline für die finanzielle Unterstützung, mit deren Hilfe ich auf das Keystone Symposium nach Steamboat Springs, Colorado fahren konnte. Vielen Dank, es war eine unvergleichliche Erfahrung.

Bei den Automaten am Eingang, ohne die ich bestimmt (nicht) verhungert oder verdurstet wäre.

Beim Cafe Widmann für seinen sensationellen und sauteuren Eiskaffe und die inzwischen fast schon familiäre Bedienung.

Bei Hella Kohlhof (und Familie) für ihre auflockernde, unkomplizierte, erfrischende Art und die Inspiration zum Segeln.

Bei Nevzat Kelmendi für die vielen Nusschnecken etc. beim Kaffeetrinken, die ich in Zukunft aber alle leugnen werde. Und lass mein Fahrrad zufrieden....

Bei Cornelia Hömig für ihre stets aufmerksame und freundliche Art, für die tolle Zeit in Köln oder auf der Loisach, und das unermüdliche Engagement, in den lahmen Haufen Schwung zu bringen. Und danke für die Lektion, keinen Wein unter 3 € zu kaufen...

Bei Julia Rastelli, für ihren Elan und Esprit, der sich unweigerlich auch auf mich übertragen hat, die tolle Zeit in Wien und Steamboat Springs (Jonny Carpet lässt grüßen), beim Volleyball etc.

Bei Maren, Steffi, Sandra, Cornelia, Julia, Hella, Caro, Linda, Nevzat, Nathalie, Magda, Andrea, Stefan, Kristina, Isha, Judith, Martin und Hanna für das sensationelle „Arbeitsklima“ im Allgemeinen und die vielen schönen „Lunch Clubs“ und die netten Abende, ich werde Euch vermissen.

Bei meinen Eltern und meinem Bruder, ohne deren Hilfe und unermüdliche Unterstützung mir diese Leistung nie möglich gewesen wäre. Die wesentlichen Dinge im Leben kann man halt auch beim Schaffkopfen lernen!

Bei Susanne und ihrer Hilfe bei den Gelfiltrationsexperimenten, vor allem aber für Ihr Verständnis, ihre Geduld und die einzigartige Fähigkeit, mich zum Lachen zu bringen auch wenn der Tag im Labor besch...eiden war. Danke für Deine Kraft, Deine Energie und Deine Liebe. In Liebe Florian.

Ehrenwörtliche Versicherung

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

München, den 17. August 2005

(Florian Ruckerl)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Rückerl
Geburtsdatum: 26. September 1975
Geburtsort: München

Tabellarische Übersicht zu Schulzeit und Studienlaufbahn

1982-1986	Grundschule Altstadt; Dingolfing
1986-1987	Gymnasium Dingolfing
1987-1995	Josef-Hofmiller Gymnasium, Freising; Abitur
1995-1996	Wehrdienst im 8. Sanitätslehrbataillon der Bundeswehr
1996-2002	Studium Diplom Biochemie an der Universität Bayreuth; Studienaufenthalt an der Universität Stockholm, Schweden (April bis September 2000) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth Thema: <i>Subzelluläre Lokalisation von D. melanogaster Separase</i> (Juni bis Dezember 2001) Abschluss: Diplom-Biochemiker
2002 – 2005	Promotion (Dr. rer. nat.) am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München Thema: <i>Funktionelle Analyse der Induktion von somatischer Hypermutation durch die aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID)</i> Betreuer: Prof. Dr. D. Eick