

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

**Die p300 Protein Acetyltransferaseaktivität supprimiert  
eine dem humanen Systemischen Lupus Erythematosus  
ähnliche Autoimmunerkrankung in Mäusen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie  
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der



vorgelegt

von

**Nicole Forster**

aus Königs-Wusterhausen

Marburg an der Lahn, August 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation am 31.10.2008  
angenommen.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Martin Eilers

1. Korreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden im folgenden Artikel veröffentlicht:

Nicole Forster, Sven Gallinat, Jadwiga Jablonska, Siegfried Weiss, Hans-Peter Elsässer, and Werner Lutz: p300 protein acetyltransferase activity suppresses systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in mice. *The Journal of Immunology* (2007), 178, 6941-6948.

*Für meinen Freund Thomas,  
meine Mutti und meine Geschwister*

1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Der Zellzyklus und die Kontrolle der Proliferation .....	1
1.2 Die Organisation der DNA zum Chromatin .....	3
1.3 Die Transkription von Genen.....	4
1.4 Epigenetische Modifikationen von Histonen zur Regulation der Chromatinstruktur ..	5
1.4.1 Die Histonacetyltransferasen .....	6
1.4.2 Die Histondeacetylasen.....	8
1.4.3 Acetylierungen von Proteinen beeinflussen zelluläre Prozesse.....	9
1.5 Das multifunktionelle Protein p300 .....	10
1.5.1 Der strukturelle Aufbau von p300.....	10
1.5.2 Die Acetyltransferasefunktion von p300 .....	11
1.5.3 p300 als transkriptioneller Koregulator .....	12
1.5.4 Die Bedeutung von p300 und Cbp während der Ontogenese von Mäusen.....	13
1.5.5 Die Bedeutung von p300 während der Tumorgenese .....	14
1.5.6 Die Bedeutung der Acetyltransferaseaktivität von p300 .....	15
1.6 Die Entwicklung von Lymphozyten und das Immunsystem.....	16
1.6.1 Die Immunglobuline .....	17
1.6.2 Die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark von Mäusen .....	19
1.6.3 Die B-Zell-Differenzierung in der Milz von Mäusen .....	20
1.6.4 Die B-Zell-Aktivierung als Reaktion auf Fremdantigene.....	21
1.6.5 Zahlreiche Signalwege kontrollieren die B-Zell-Entwicklung .....	23
1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit.....	25
2 MATERIALIEN.....	26
2.1 Stämme und Zelllinien.....	26
2.1.1 Bakterienstämme.....	26
2.1.2 Säugerzellen .....	26
2.1.3 Mausstämme .....	26
2.2 DNA.....	27
2.2.1 Primer zur Genotypisierung .....	27
2.2.2 Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination in CH12.LX-Zellen...	27
2.2.3 Primer für die RT-PCR .....	27
2.2.4 Primer für qPCR nach ChIP .....	28
2.2.5 Expressionsplasmide .....	29

2.2.6 Plasmid zur Herstellung einer DNA-Sonde .....	29
2.3 <i>Antikörper</i> .....	29
2.3.1 Primäre Antikörper.....	29
2.3.2 Sekundäre Antikörper .....	30
2.3.3 Antikörper für Immunfluoreszenz.....	30
2.3.4 Antikörper für ELISA .....	31
2.3.5 Antikörper für FACS .....	31
2.4 <i>Chemikalien</i> .....	31
2.5 <i>Medien</i> .....	31
2.5.1 Medien für die Kultivierung von Bakterien.....	31
2.5.2 Medien für die Säugerzellkultur.....	31
2.6 <i>Sterilisation von Lösungen und Equipment</i> .....	32
2.7 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	32
2.8 <i>Gebrauchsmaterialien</i> .....	37
2.9 <i>Geräte, Membranen und Filme</i> .....	38
3 METHODEN.....	39
3.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	39
3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und deren Vermehrung .....	39
3.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien.....	39
3.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben und Zellkulturzellen.....	40
3.1.4 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation.....	40
3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	41
3.1.6 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel.....	41
3.1.7 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA .....	41
3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten .....	42
3.1.9 Polymerase-Kettenreaktion .....	42
3.1.10 Isolierung von Gesamt-RNA.....	43
3.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	43
3.1.12 cDNA-Synthese mit anschließender PCR (RT-PCR).....	44
3.1.12.1 Semiquantitative RT-PCR.....	45
3.1.12.2 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR, Real time-PCR) .....	45
3.1.13 cDNA-Microarray .....	46
3.1.14 Random-Prime-Methode zur Herstellung von <sup>32</sup> P-radiativ-markierter DNA .....	46

3.1.15 Southern Blot .....	47
3.1.16 Hybridisierung von Nukleinsäuren .....	47
3.2 <i>Zellbiologische Methoden</i> .....	48
3.2.1 Auftauen von Zellen.....	48
3.2.2 Passagieren von Zellen.....	48
3.2.3 Einfrieren von Zellen .....	49
3.2.4 Trypanblaufärbung von Zellen.....	49
3.2.5 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen mittels Elektroporation.....	49
3.2.6 Aktivierung von primären B-Zellen.....	51
3.2.7 Nachweis der Proliferation mittels Einbau von radioaktiv-markiertem <sup>3</sup> H- Thymidin .....	51
3.3 <i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	52
3.3.1 Herstellen von Proteinlysaten für Western Blot.....	52
3.3.2 Histonextraktion für Western Blot .....	52
3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford .....	53
3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	53
3.3.5 Western Blot.....	54
3.3.6 Autoradiografie .....	55
3.3.7 Strippen von PVDF-Membranen .....	55
3.3.8 Immunpräzipitation .....	55
3.3.9 Chromatin-Immunpräzipitation.....	57
3.3.9.1 Isolierung von Chromatin.....	57
3.3.9.2 Überprüfung der Qualität des Chromatins und Konzentrationsbestim- mung .....	58
3.3.9.3 Blockieren der Protein A-Sepharose Beads.....	58
3.3.9.4 Preclearing und Immunpräzipitation der Chromatin-Immuno- präzipitation .....	58
3.3.9.5 Waschen der Chromatin-Immunpräzipitationsproben.....	59
3.3.9.6 Auflösen der Quervernetzung und Reinigung der immunpräzipitierten DNA.....	59
3.3.10 Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie .....	60
3.3.10.1 FACS zur Detektion von Oberflächenmarkern .....	60
3.3.10.2 FACS zur Detektion von intrazellulären Proteinen.....	61
3.3.10.3 FACS zum Sortieren von Zellen .....	61

3.3.11 Magnetische Depletion von Zellen .....	61
3.3.12 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten .....	62
3.3.13 Immunfluoreszenz von <i>Crithidia spec.</i> .....	63
3.3.14 Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	63
3.3.14.1 ELISA zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentration im Blut .....	63
3.3.14.2 ELISA zur Bestimmung der humoralen Immunantwort gegenüber Ovalbumin .....	65
3.3.14.3 ELISA zur Detektion von Autoantikörpern.....	65
3.3.15 Versuch zum Nachweis von <i>in vitro</i> Histonacetylierung (HAT-Versuch) .....	66
3.3.16 Szintillationsmessung.....	66
3.4 Tierexperimentelle Methoden .....	67
3.4.1 Zucht von Mäusen.....	67
3.4.2 Intraperitoneale Injektion von Ovalbumin.....	67
3.4.3 Intraperitoneale Injektion von Tamoxifen .....	67
3.4.4 Retroorbitale Blutentnahme von einer Maus .....	68
3.4.5 Entnahme von Organen einer Maus.....	68
3.4.6 Isolierung von primären Milzzellen einer Maus .....	68
3.4.7 Isolierung des Knochenmarks einer Maus .....	69
3.4.8 Herstellung von Paraffinschnitten.....	69
3.4.8.1 Gewebepreparation.....	69
3.4.8.2 Schnitte von einem Paraffinblock.....	70
3.4.8.3 Hämatoxylin & Eosin Färbung (H&E Färbung) von histologischen Schnitten .....	70
3.4.9 Herstellung von Gefrierschnitten .....	70
3.5 Statistische Analysen.....	71
4 ERGEBNISSE.....	72
4.1 Analyse von Mäusen mit B-Zell-spezifischer Expression eines <i>p300</i> mit reduzierter Acetyltransferasefunktion .....	72
4.1.1 Mäuse mit B-Zell-spezifischer Expression von Acetyltransferase-defizientem <i>p300</i> weisen eine erhöhte Mortalität auf .....	74
4.1.2 Mäuse mit fehlender <i>p300</i> -Acetyltransferaseaktivität in B-Zellen sterben an einer Autoimmunerkrankung ähnlich dem humanen Systemischen Lupus Erythematosus .....	75



4.1.3 p300-Acetyltransferaseaktivität ist für die Differenzierung der B-Zellen notwendig .....	81
4.1.4 Die Acetyltransferaseaktivität von p300 hat einen Einfluss auf die Bildung der Immunglobuline.....	84
4.1.5 Reduzierte p300-Acetyltransferaseaktivität verringert die Proliferation der B- Zellen nach Stimulation des BCR-Signalweges .....	88
4.1.6 Acetyltransferase-defizientes p300 beeinflusst die Expression zahlreicher Gene in B-Zellen.....	91
4.2 Mäuse mit ubiquitärer Expression von Acetyltransferase-defizientem <i>p300AS</i> <i>entwickeln ebenfalls eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung</i> .....	97
4.3 Herstellung einer B-Zelllinie mit Expression von mutiertem <i>p300AS</i> .....	101
5 DISKUSSION .....	108
5.1 Mäuse mit fehlender p300-Acetyltransferaseaktivität in B-Zellen sterben an einer <i>Autoimmunerkrankung ähnlich dem humanen SLE</i> .....	108
5.1.1 Die p300-Acetyltransferaseaktivität ist für die Suppression der Autoimmunität notwendig .....	109
5.1.2 Die p300-Acetyltransferaseaktivität ist für die Differenzierung der B-Zellen notwendig .....	111
5.1.3 Der beobachtete Phänotyp zeigt Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Mausmodellen .....	113
5.1.4 Der positive Effekt der T-Zell-Aktivierung durch B-Zellen.....	114
5.1.5 Die p300-Acetyltransferaseaktivität beeinflusst die Bildung der Immunglobuline.....	115
5.1.6 Eine Hemmung des BCR-Signalweges durch Acetyltransferase-defizientes p300 könnte die Autoimmunerkrankung einleiten .....	117
5.1.7 B-Zellen mit Expression eines Acetyltransferase-defizientem <i>p300</i> zeigen eine reduzierte Acetylierung von Proteinen .....	119
5.1.8 Erweiterung des Acetyltransferase-defizienten p300-Mausmodells.....	121
5.1.9 Die p300-Acetyltransferase-defiziente Maus als ein Modell für SLE.....	122
5.1.10 Therapiemöglichkeiten bei SLE in Mäusen und beim Menschen .....	123
5.2 Mäuse mit ubiquitärer Expression von Acetyltransferase-defizientem <i>p300AS</i> <i>entwickeln ebenfalls eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung</i> .....	124
5.3 Ausblick.....	126

6 ZUSAMMENFASSUNG .....	127
<i>6.1 Deutsche Zusammenfassung</i> .....	127
<i>6.2 English Summary</i> .....	129
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	131
8 ANHANG.....	156
<i>8.1 Abkürzungen</i> .....	156
<i>8.2 Ergebnisliste des cDNA-Microarray von primären reifen B-Zellen</i> .....	161
<i>8.3 Lebenslauf</i> .....	172
<i>8.4 Akademische Lehrer</i> .....	173
<i>8.5 Ehrenwörtliche Erklärung</i> .....	174
<i>8.6 Danksagung</i> .....	176

## 1 EINLEITUNG

Die Entwicklung eines vielzelligen Organismus (Metazoa) beginnt mit der Befruchtung einer einzelnen Zelle, der Eizelle, mit einem Spermium und wird Ontogenese genannt. Im Genom der befruchteten Eizelle, der diploiden Zygote, ist die gesamte Erbinformation enthalten. Während der Embryonalentwicklung entstehen aus der Zygote durch zahlreiche Zellteilungen viele Millionen Zellen, die komplexe Organe und Strukturen, wie Augen, Gliedmaßen, Herz oder Gehirn, ausbilden. Dazu ist eine regulierte Genexpression nötig, die die Abfolge der zellulären Prozesse während der Ontogenese steuert, wie die Zellteilung, die Morphogenese, die Zellmigration, das Zellwachstum und den Zelltod. Für die Entstehung unterschiedlicher Zelltypen im Organismus ist eine Zelldifferenzierung notwendig, bei der die Merkmale der Zellen durch das Muster der Genexpression und die daraus synthetisierten Proteine bestimmt werden.

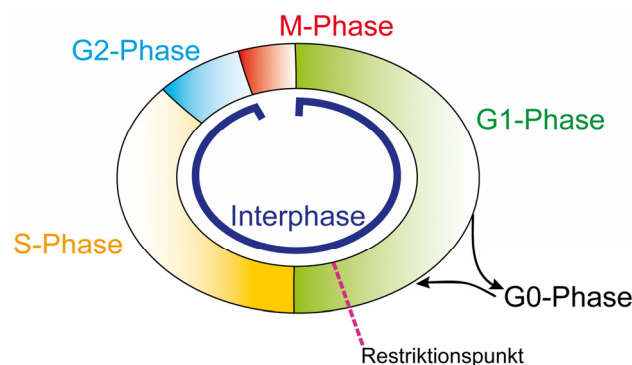
Während der Ontogenese wird das Schicksal bestimmter Zellen durch äußere Einflüsse und die Kommunikation zwischen den Zellen in jedem Stadium präziser festgelegt. Dafür sind verschiedene Signalwege, wie der TGF- $\beta$ - oder der Wnt-Signalweg, verantwortlich, die aus mehreren Proteinen bestehen, die eine Signalkaskade zur Verstärkung und Weiterleitung des Signals hervorrufen. Durch die Beteiligung von einzelnen Proteinen an unterschiedlichen Signalwegen werden diese miteinander verknüpft. In dem komplexen Signaltransduktionssystem wird somit eine gegenseitige Regulation ermöglicht. Defekte in einem Signalweg rufen nicht nur eine Störung in der Embryonalentwicklung hervor, sondern können im adulten Tier oder Menschen zum Verlust der Kontrolle der Zellteilung und des Zelltodes führen. Dies kann im extremsten Fall die Ursache für Krankheiten, wie Krebs oder Autoimmunerkrankungen, sein.

### ***1.1 Der Zellzyklus und die Kontrolle der Proliferation***

Das Wachstum und die Teilung einer eukaryontischen Zelle, die Proliferation, erfolgen innerhalb eines Zyklus, in dem die Zelle alle wichtigen zellulären Bestandteile vervielfältigt und sich dann in zwei Tochterzellen separiert (Murray and Hunt, 1993). Der sogenannte Zellzyklus besteht aus mehreren Phasen: den Gap (Lücken)-phasen G1 und G2, der Synthesephase (S-Phase) und der Mitosephase (M-Phase) (Abb. 1). Die G1-, die G2- und die S-Phase werden auch als Interphase zusammengefasst. Vor der Zellteilung befindet sich die Zelle im Grundzustand, der G1-Phase des Zellzyklus. In dieser Phase erfolgen das Zellwachstum und die Synthese von Zellbestandteilen, die für die folgende Phase des Zellzyklus, die S-Phase, benötigt werden. Während der S-Phase erfolgt die DNA-

Replikation, in der das Genom mit Hilfe von Proteinen und Enzymen verdoppelt wird. Anschließend geht die Zelle in die prämitotische Phase, die G2-Phase, über, die ein erneutes Wachstum und das Abrunden der Zelle einleitet. Des Weiteren werden in dieser Phase Zellteilungs-spezifische Proteine synthetisiert.

In der M-Phase findet die Verteilung des Genoms und aller anderen Zellbestandteile auf zwei Tochterzellen statt. Die Mitose endet mit der Zytokinese, in der das Zytoplasma der Zelle durch Invagination der Zellmembran geteilt wird und zwei Tochterzellen gebildet werden. Danach befinden sich beide Tochterzellen erneut in der G1-Phase, die demnach die postmitotische Phase darstellt, und können den Zellzyklus erneut durchlaufen. Sobald das proliferative Potential der Zelle erschöpft ist, sie sich differenzieren möchte oder die Umgebung der Zelle deren Teilung negativ beeinflusst, verlässt sie den Zellzyklus und wird ausgehend von der G1-Phase in die bezüglich der Zellteilung genannte Ruhephase, die G0-Phase, überführt. In dieser G0-Phase ist die Zelle weiterhin metabolisch aktiv.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Zellzyklus und dessen Kontrollpunkte (modifiziert nach: Alberts *et al.*, 2002).

Der Zellzyklus wird in die Interphase (blau), bestehend aus der G1-, der S- und der G2-Phase, und in die Mitosephase (M-Phase) unterteilt. Zellen können den Zellzyklus verlassen und in die als G0 bezeichnete Ruhephase eintreten. Durch verschiedene Stimuli ist ein Wiedereintritt in den Zellzyklus möglich, solange das proliferative Potential nicht erschöpft ist oder die Umgebung der Zelle deren Teilung nicht negativ beeinflusst. Zellen, die den Restriktionspunkt („Point of no Return“) in der späten G1-Phase passiert haben, müssen den Zellzyklus dann vollständig durchlaufen.

Da die während des Zellzyklus stattfindende Replikation der DNA und die Zellteilung anfällig für genetische Veränderungen und somit Entartungen sind, gibt es mehrere Kontrollpunkte (*Checkpoints*). Dadurch kann der Zellzyklus gestoppt werden und die Zellen arretieren (Murray, 1992; Morgan, 1997; Pavletich, 1999). Erkannte Zellschäden werden dann entweder repariert oder bei zu schwerwiegenden Schädigungen wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet. In der späten G1-Phase werden die Größe der Zelle, die DNA auf Schäden und die Zellumgebung auf Wachstumsfaktoren überprüft (*G1-Checkpoint*). Sollte dies korrekt sein, kann die Zelle den Restriktionspunkt

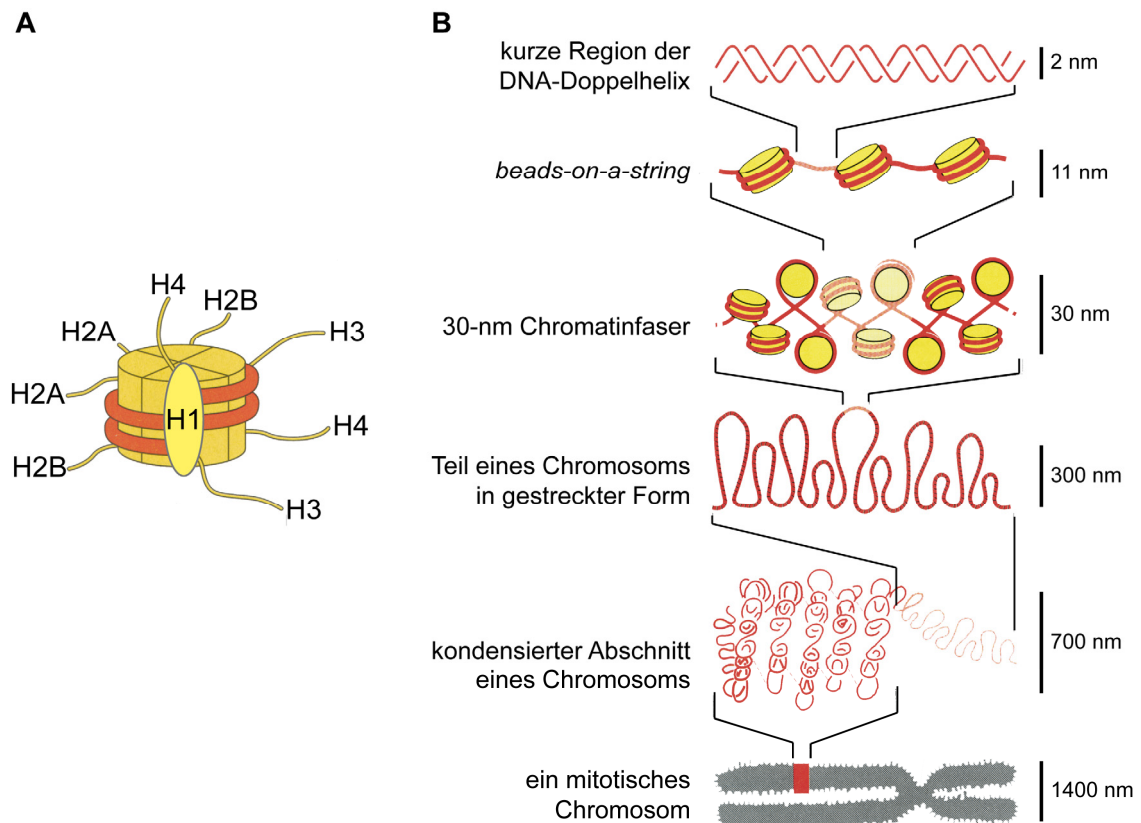
überschreiten und den Zellzyklus durchlaufen (Abb. 1). Die vollständige DNA-Replikation, etwaige Schäden in der DNA und die Größe der Zelle werden an einem weiteren *Checkpoint* in der späten G2-Phase (*G2-Checkpoint*) kontrolliert. Während der M-Phase wird die Ansammlung aller Chromosomen am Spindelapparat vor der letztendlichen Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen überprüft (*Mitotic spindle checkpoint*).

## **1.2 Die Organisation der DNA zum Chromatin**

Die DNA der Eukaryonten ist in Chromosomen organisiert, von denen jedes zu der Struktur des Chromatins gepackt wird (Kornberg 1974; Luger *et al.*, 1997). Die DNA als anionisches Polymer wird durch die Bindung mit basischen Histonproteinen stark kompaktiert. Die Grundeinheit des Chromatins sind Nukleosomen. Diese bestehen aus einem Oktamer von vier Kernhistonen, gebildet aus zwei H2A-H2B-Dimeren mit einem gebundenen H3-H4-Tetramer, und 146 Basenpaaren der um das Oktamer gewickelten DNA-Doppelhelix (Abb. 2A) (Kornberg, 1974; Shaw *et al.*, 1976; Noll and Kornberg, 1977; Hayes and Hansen, 2001).

Die Nukleosomen zusammen mit den zwischen ihnen frei liegenden, 50 bp-langen DNA-Bereichen (engl. *linker-DNA*) bilden eine relativ schwache Kondensation des Chromatins aus (*Beads-on-a-string*), die bei den in Transkription befindlichen Genen vorliegt und als Euchromatin bezeichnet wird (Abb. 2B) (Widom, 1989; Hayes and Hansen, 2001; Georgel, 2002; Hansen, 2002). Durch die Bindung vom *Linker-Histon* H1-Protein an Nukleosomen werden diese stabilisiert und es wird eine kompaktere Struktur, die 30-nm Chromatinfaser, aufgebaut (Widom, 1989; Hayes and Hansen, 2001; Georgel, 2002; Hansen, 2002). Diese Stufe der Organisation ist das transkriptionell inaktive Heterochromatin.

Die weitere Faltung des Chromatins erfolgt über Bindungen und Wechselwirkungen mit Gerüstproteinen. Dies führt letztendlich zur Ausbildung des aktiven Chromosoms, das in der Interphase des Zellzyklus vorliegt. Bei der Chromosomensegregation während der M-Phase des Zellzyklus ist eine weitere Kondensation des Chromatins mit Hilfe von Proteinen zum Metaphasechromosom erforderlich. Das Chromatin ist somit eine hoch dynamische Struktur, da die Grade der Kompaktierung der DNA sowohl während des Zellzyklus als auch während der Transkription zur Regulation der Aktivierung und Repression spezifischer Gene variabel sind.



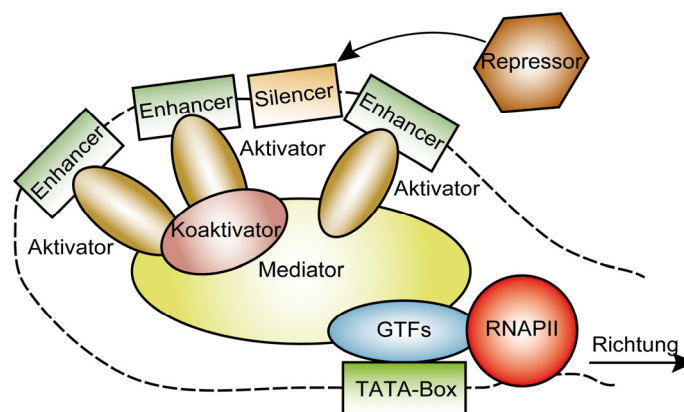
**Abbildung 2:** Die Kompaktierung der DNA-Doppelhelix zu Chromosomen erfolgt über die Faltung und Kondensation der aus einzelnen Nukleosomen aufgebauten Chromatinfasern (modifiziert nach: Alberts *et al.*, 2002).

**A)** Struktur eines Nukleosoms. Ein Nukleosom setzt sich aus einem Proteinkern, bestehend aus acht Histonen (Oktamer) und der 1,5-mal um diesen Kern gewundenen DNA-Doppelhelix (rot), was 146 Basenpaaren entspricht, zusammen. Das Histonoktamer wird von vier Kernhistonen gebildet, die zwei Histon H2A-H2B-Dimere und ein Histon H3-H4-Tetramer aufbauen. Nukleosomen können vom Linker-Histon H1 bei der Bildung der 30-nm Chromatinfaser stabilisiert werden. **B)** Schematisches Modell ausgewählter Stufen der Faltung zu der kompakten Struktur eines hoch-kondensierten mitotischen Chromosoms.

### 1.3 Die Transkription von Genen

Zur Herstellung von Proteinen wird die DNA des Genoms zunächst in RNA transkribiert, um danach in der Translation ein Protein zu synthetisieren: *DNA makes RNA makes Protein* (DNA macht RNA macht Protein) (Crick, 1970). Während der Transkription von Protein-kodierender DNA wird die DNA von dem RNA-Polymerase-Holoenzym II in einen komplementären RNA-Strang umgeschrieben, der als Ausgangsmaterial für die Synthese des entsprechenden Proteins benötigt wird. Bei Eukaryonten wird die Rekrutierung der RNA-Polymerase an die DNA und die damit verbundene Initiation der Transkription durch genspezifische und generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF, TFIIH) und Koaktivatoren bzw. -repressoren reguliert (Kim *et al.*, 1993; Weideman *et al.*, 1997; Littlefield *et al.*, 1999; Woychik und Hampsey, 2002). Erst nach der vollständigen Assemblierung der Transkriptionsfaktoren zusammen mit dem Mediator zu einem Präinitiationskomplex, kann die DNA-abhängige RNA-Polymerase II

an den Promotor des Gens auf der DNA binden (Abb. 3) (Flanagan *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1994). Danach leitet die RNA-Polymerase II an der einzelsträngigen DNA-Matrize die Elongation stromabwärts in 5'-3'-Richtung ein, bei der komplementäre Basenpaarungsreaktionen zur Verlängerung der einzelsträngigen RNA führen. Die RNA-Polymerase benötigt für die Termination eines Gens die Interaktion mit weiteren Proteinen. Diese Proteinkomplexe erkennen die Polyadenylierungssequenz, schneiden die Prä-mRNA (*messenger* RNA, Boten-RNA) und leiten die Polyadenylierung, ein Ankoppeln von Adenosinen, ein. Nach Modifikationen der Prä-mRNA wird die fertige mRNA in das Zytoplasma transportiert, wo sie dann in Protein umgeschrieben wird.



**Abbildung 3:** Präinitiationskomplex der Transkription (modifiziert nach: Alberts *et al.*, 2002).

Für die Initiation der Transkription wird die Bindung der generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) benötigt, die eine Rekrutierung der RNA-Polymerase II (RNAPII) ermöglichen. Erst nach weiteren Bindungen von transkriptionellen Aktivatoren an deren Zielsequenz (Enhancer) und Koaktivatoren an den Mediator kann die RNA-Polymerase II die Transkription in 5'-3'-Richtung einleiten (Pfeil). Für die Regulation der Transkription spezifischer Gene werden zusätzlich Repressoren benötigt, die nach Bindung an die Silencerregion auf der DNA die Transkription inhibieren können.

#### 1.4 Epigenetische Modifikationen von Histonen zur Regulation der Chromatinstruktur

Die Proteine bzw. die assoziierten Proteinkomplexe zur Regulation der Chromatinaktivität werden in drei Klassen unterteilt. Zum einen werden die Histone entlang des Chromatins mit Hilfe von ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Proteinkomplexen, wie dem SWI/SNF-, dem RSC- oder dem NURF-Komplex, mobilisiert (Kingston and Narlikar, 1999; Varga-Weisz and Becker, 2006). Zum anderen rekrutieren Histonchaperonproteine die verschiedenen Histonvarianten an das Chromatin, entfernen sie oder tauschen sie aus (Loyola and Almouzni, 2004). Die dritte Proteinklasse besitzt enzymatische Aktivitäten, die eine Kopplung oder Entfernung von funktionellen Gruppen an Histonen durchführen können (Nightingale *et al.*, 2006).

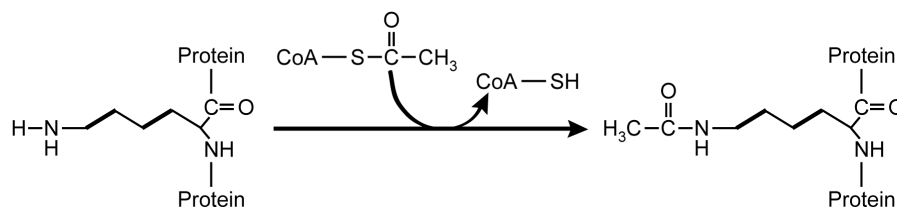
Durch die letztgenannten Modifikationen der Histone werden die Faltung des Chromatins und somit die Genaktivität verändert (Fischle *et al.*, 2003; Qiu, 2006; Li *et al.*, 2007). Sie zählen zusammen mit chemischen Modifikationen der DNA (z.B. Cytosin-Methylierung) zur Epigenetik, die die Veränderung der Genomfunktion ohne Änderung der DNA-Sequenz beschreibt (Yoo and Jones, 2006). Die Kombination von unterschiedlichen Modifikationen der Histone, wie Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung und der Transfer von Ubiquitin- oder SUMO-Proteinen, bildet ein Model des epigenetischen Codes (Histon-Code) (Turner, 2002; Qiu, 2006). Diese Erkennungssignale ermöglichen die Rekrutierung von Proteinen, die zur transkriptionellen Regulation benötigt werden, wie Transkriptionsfaktoren (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001). Die Histonmodifikationen sind unter anderem in Signaltransduktionskaskaden wichtig, da sie zur Modifikation der Genexpression nach einem extrazellulären Stimulus beitragen. Ein klassischer Weg ist eine Aktivierung oder Repression der Histonacetyltransferasen (HATs) durch Phosphorylierung bzw. Acetylierung (Cheung *et al.*, 2000a; Kouzarides, 2000). Des Weiteren erfolgt zum Beispiel bei der durch Wachstumsfaktoren induzierten, sehr frühen Expression von bestimmten Genen (engl. *immediate early genes*) in höheren Eukaryonten eine Koregulation über HATs und Kinasen (Cheung *et al.*, 2000b; Clayton *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2001). Diese Beispiele verdeutlichen ein Zusammenwirken verschiedener posttranslationaler Histonmodifikationen zur Regulation des Signaltransduktionssystems. Dadurch können die Histon-modifizierenden Proteine in Verbindung mit nahezu jedem biologischen Prozess und somit zahlreichen Krankheiten, einschließlich Krebs, gebracht werden. Da epigenetische Modifikationen im Gegensatz zu genetischen Veränderungen reversibel sind, wurden in den letzten Jahren Medikamente, die gegen Enzyme der epigenetischen Regulation gerichtet sind, bei klinischen Studien untersucht (Bolden *et al.*, 2006; Minucci and Pelicci, 2006; Marks, 2007). Zu ihnen zählen insbesondere Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen und der Histondeacetylasen (HDACs).

#### **1.4.1 Die Histonacetyltransferasen**

Die HATs, die den Transfer einer Acetylgruppe bei Histonen vermitteln, sind die sowohl auf funktioneller als auch auf struktureller Ebene am besten untersuchten Histon-modifizierenden Enzyme (Marmorstein, 2001; Marmorstein and Roth, 2001). Eine Acetylierung von Lysinen an den N-Termini der freiliegenden Regionen von den Kernhistonen neutralisiert die positive Ladung und reduziert durch die Aufhebung der Ionenbindung die Interaktion von den Histonen mit der DNA (Shabazian and Grunstein, 2007). Es ist eine Acetyl-



Koenzym A (*Acetyl-coenzyme A*, Acetyl-CoA)-abhängige Reaktion, da die Acetylgruppe von Acetyl-CoA an die ε-Aminogruppe des Lysins transferiert wird (Abb. 4). Die lockere Chromatinstruktur nach einer Acetylierung verdeutlicht, warum viele transkriptionelle Koaktivatoren, wie Gcn5, PCAF, p300, CBP oder SRC-1, unter anderem eine intrinsische HAT-Aktivität aufweisen. Histonacetylierungen können durch HDACs revertiert werden. Ähnlich den Koaktivatoren weisen zahlreiche transkriptionelle Repressorkomplexe, wie mSin3a, NCoR/SMRT und NURD/Mi-2, eine HDAC-Aktivität auf (Khochbin *et al.*, 2001; Denslow and Wade, 2007; Shahbazian and Grunstein, 2007).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der chemischen Reaktion der Acetylierung von einem Lysin in einem Peptid.

Bei der chemischen Reaktion einer Acetylierung dient das Acetyl-CoA als Donor der Acetylgruppe, die an die ε-Aminogruppe des Lysins übertragen wird und dadurch zu Acetylysin führt.

In Mammalia umfasst die Proteinfamilie der HATs mehr als 15 Mitglieder, die in A-Typ (nukleär) und B-Typ (zytoplasmatisch) unterteilt werden (Ogryzko *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 2001). B-Typ HATs katalysieren Acetylierungen von Histonen, die den Transport der neu synthetisierten Histone vom Zytoplasma in den Nukleus für eine Bindung an die neu replizierte DNA beeinflussen (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Allis *et al.*, 1985). Im Vergleich dazu acetylieren A-Typ HATs Histone, die in der Transkriptionsregulation involviert sind. Zu den HATs gehören drei Proteinfamilien: die GNAT (*Gcn5-related N-acetyltransferases*)-Familie, die MYST-Familie und die p300/CBP (*CREB-binding protein*)-Familie (Tab. 1) (Sterner and Berger, 2000; Marmorstein, 2001). Da p300 die meisten beschriebenen Interaktionspartner und demzufolge zahlreiche Substrate neben Histonen besitzt, nimmt es unter den HATs eine besondere Stellung ein.

HAT-Familie	GNAT	MYST	p300/CBP
Mitglieder	Gcn5 PCAF Elp3 Hpa2 Hat1 (B-Typ HAT)	MOZ Ybf2/Sas3 Sas2 Tip60 MOF Esa1 Hbo1 MORF	p300 CBP

**Tabelle 1:** Übersicht der Familien von HATs.

### 1.4.2 Die Histondeacetylasen

HDACs katalysieren die Umkehrreaktion der Acetylierung von Lysinen der Proteine. Durch phylogenetische Analysen konnten die HDACs in vier Familien unterteilt werden (Tab. 2). Die Mitglieder der Familie HDAC-Klasse I (HDAC *class* I) sind homolog zu dem Protein Rpd3p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Gregoretto *et al.*, 2004; Hodawadekar and Marmorstein, 2007). Zu dem Protein Hda1p in *S. cerevisiae* homologe HDACs sind in der Familie HDAC-Klasse II, die aufgrund ihrer Unterschiede in der Domänenanordnung und der Proteinsequenz in IIa und IIb unterteilt werden. Die Proteine der HDAC-Klasse III werden nach dem Protein Sir2p (*Silent information regulator 2*) in *S. cerevisiae* auch Sirtuine (SIRT) genannt. Mit dem humanen HDAC11- verwandte HDACs werden in der HDAC-Klasse IV zusammengefasst.

HDAC-Familie	HDAC-Klasse I	HDAC-Klasse IIa	HDAC-Klasse IIb	HDAC-Klasse III	HDAC-Klasse IV
Mitglieder	HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC8	HDAC4 HDAC5 HDAC7 HDAC9	HDAC6 HDAC10	SIRT1 SIRT2 SIRT3 SIRT4 SIRT5 SIRT6 SIRT7	HDAC11

**Tabelle 2:** Übersicht der Familien von HDACs.

Eine Störung der Proteinaktivität von HDACs und eine daraus resultierende Beeinträchtigung des Gleichgewichts zwischen Acetylierung und Deacetylierung in Tieren oder im Menschen können weit reichende Folgen haben. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass die Rekrutierung von HDACs der Klassen I und II an das Chromatin mit der Entwicklung von Leukämien und Lymphomen gekoppelt ist. Daher werden HDACs als Ziele für die Krebstherapie untersucht. In den letzten Jahren wurden Inhibitoren gegen sie entwickelt, die nachgewiesene Antikrebstherapiepotentiale aufweisen (Kelly *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2003; Marks and Jiang, 2005; Bolden *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006). HDACs der Klassen I, II und IV jedoch nicht der Klasse III sind sensitiv gegenüber dem HDAC-Inhibitor Trichostatin-A (TSA) (Imai *et al.*, 2000; Landry *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Bitterman *et al.*, 2002; Sauve and Schramm, 2004). Der Erste in der Klinik eingesetzte HDAC-Inhibitor Suberoylanilid-hydroxamidsäure (*Suberoylanilide hydroxamic acid*, SAHA, Vorinostat) hemmt das Wachstum pankreatischer Krebszellen (Kumagai *et al.*, 2007) und wurde bereits für die Behandlung von kutanen (die Haut betreffenden) T-Zell-Lymphomen zugelassen.

Die Sirtuine sind in verschiedenen biologischen Prozessen, einschließlich Metabolismus und Langlebigkeit, involviert (Haigis and Guarente, 2006). Daher besteht an ihnen ebenso ein therapeutisches Interesse wie an anderen HDACs. Sie können aufgrund ihrer NAD-Abhängigkeit durch Nicotinamid inhibiert werden. In Mammalia supprimieren sie altersabhängige Erkrankungen, wie Typ II-Diabetes, Fettsucht oder Krebs (Wood *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2005; Anekonda and Reddy, 2006; Baur *et al.*, 2006).

### 1.4.3 Acetylierungen von Proteinen beeinflussen zelluläre Prozesse

Durch die Identifikation transkriptioneller Aktivatoren und Koaktivatoren als HATs wurde die Verknüpfung von Histonacetylierung mit Genaktivierung geklärt (Sterner and Berger, 2000; Chen *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2001). Bei höheren Eukaryonten liegt das Genom vorwiegend in nicht-aktiver, hypoacetylierter Form vor. Eine Histonacetylierung führt meistens zur Aktivierung des Zielgens (Strahl and Allis, 2000). Eine Ausnahme und damit ein Beispiel für eine repressive Wirkung ist die in *S. cerevisiae* entdeckte Acetylierung des Lysins 12 vom Histon H4 (Braunstein *et al.*, 1996). Der Grundzustand (engl. *steady-state level*) der Histonacetylierung wird durch ein Gleichgewicht von Acetylierung und Deacetylierung bestimmt (Reid *et al.*, 2000; Vogelauer *et al.*, 2000; Katan-Khaykovich and Struhl, 2002; de Ruijter *et al.*, 2003). Bei einer Acetylierung bestimmen die Untereinheiten von Multiproteinkomplexen die Funktion, die Substratspezifität und das Ziel der integrierten HAT-Aktivität (Wolffe and Hayes, 1999; Nakatani, 2001; Litt *et al.*, 2001; Ogryzko, 2001; Schübeler *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2004).

Neben Histonen können andere Proteine von HATs, wie PCAF (*p300- and CBP-associated factor*), p300 und CBP, acetyliert und durch HDACs deacetyliert werden (Luo *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003; Brunet *et al.*, 2004; Serrador *et al.*, 2004). Die Acetylierung von nukleären Proteinen, wie p53, p73, pRb oder E2F, an Lysinien nahe ihrer Sequenz-spezifischen DNA-bindenden Domäne verstärkt deren Promotorbindung und führt zur transkriptionellen Aktivierung der Zielgene (Gopalakrishna *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu reduziert die Acetylierung von Lysinien anderer Proteine, wie HMG 1Y, in ihrer DNA-bindenden Domäne deren transkriptionelle Aktivität (Munshi *et al.*, 1998; Munshi *et al.*, 2001). Des Weiteren können durch die Acetylierung von Proteinen deren Interaktionen mit anderen Proteinen beeinträchtigt werden, wie im Fall von pRb (Chan *et al.*, 2001; Markham *et al.*, 2006) und Mdm2 (Wang *et al.*, 2004; Lavin and Gueven, 2006). Eine Acetylierung von Proteinen kann ebenso zum nukleären Import oder zur Mikrotubuli-Ansammlung führen (Takemura *et al.*, 1992).

## 1.5 Das multifunktionelle Protein p300

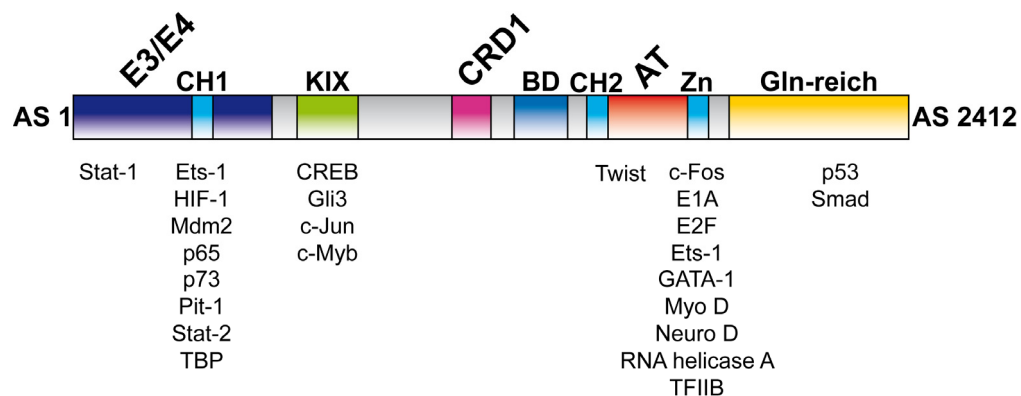
Zu den ersten im Jahr 1996 beschriebenen und den am besten untersuchten HATs in der transkriptionellen Regulation von Vertebraten zählen p300 und dessen gleichzeitig identifiziertes Paralog CBP (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996). p300 wurde als Interaktionspartner des adenoviralen E1A-Proteins (Eckner *et al.*, 1994) und CBP als Bindeprotein der phosphorylierten Form des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP-responsive element binding protein*) entdeckt (Chrivia *et al.*, 1993). Beide Proteine weisen auf Aminosäureebene eine Homologie von 63% auf (Arany *et al.*, 1994) und sind bei Eukaryonten hoch konserviert. Homologe von p300 und CBP konnten in *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) und *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), jedoch nicht in *S. cerevisiae* oder bei Prokaryonten identifiziert werden (Giordano and Avantaggiati, 1999; Goodman and Smolik, 2000).

Aufgrund der bis zu 95%-igen Homologie in den funktionellen Domänen ist der Großteil der Funktionen von p300 oder CBP durch das jeweils andere Protein in kultivierten Zellen ersetzbar (Arany *et al.*, 1995; Lundblad *et al.*, 1995; Giordano and Avantaggiati, 1999). Unter bestimmten Bedingungen binden p300 und CBP andere HATs, wie Gen5 oder PCAF (Yang *et al.*, 1996; Phan *et al.*, 2005). Dies ermöglicht die Assemblierung von Komplexen mit zwei oder mehreren HATs zur Verstärkung des Signals oder zur schnelleren transkriptionellen Regulation von Zielgenen.

### 1.5.1 Der strukturelle Aufbau von p300

Das Protein p300 mit einer Größe von 2412 Aminosäuren in der Maus bzw. 2414 beim Menschen (ca. 265 kDa) weist mehrere funktionelle Domänen auf (Abb. 5). Diese umfassen neben der Acetyltransferasedomäne drei putative Zinkfingerregionen (CH1, CH2 und Zn), eine Bromodomäne, die KIX-Domäne und eine Glutamin-reiche C-terminale Region (Jankrecht and Hunter, 1996; Shikama *et al.*, 1997; Goodman and Smolik, 2000). Mit Hilfe der nahe an der Acetyltransferasedomäne lokalisierten Bromodomäne, die der Bindung acetylierter Proteine dient, kann p300 selbst acetylierte Proteine binden und somit diese an Promotoren rekrutieren (Abb. 6) (Manning *et al.*, 2001; Polesskaya *et al.*, 2001; Remboutsika *et al.*, 2002; Fukuda *et al.*, 2006; Di Padova *et al.*, 2007). Die Wichtigkeit der Bromodomäne von p300 wird durch die Beobachtung deutlich, dass eine Deletionsmutante dieser Domäne zur vollständigen Hemmung der Acetylierung der nukleosomalen Histone durch p300 führt (Kraus *et al.*, 1999).

Des Weiteren besitzt p300 eine transkriptionelle Repressordomäne CRD1 (*Cell cycle regulatory domain 1*), die von dem Zellzyklus-regulierten Protein p21CIP1 kontrolliert wird (Snowden *et al.*, 2000; Girdwood *et al.*, 2003), und eine am N-Terminus lokalisierte E3/E4-Ubiquitinligaseaktivität, die zur Polyubiquitinierung von p53 beiträgt (Abb. 5) (Grossman *et al.*, 2003). Zusätzlich zu diesen Funktionen liegen verteilt über das p300-Protein mehrere Motive für die Interaktion von p300 mit anderen Proteinen. Zu ihnen zählen die CH1-, die CH2- und die Zn-Region, die KIX-Domäne und die Glutamin-reiche Region (Abb. 6). Es sind bis heute über 320 Interaktionspartner von p300 bekannt, die zur Involvierung von p300 in einer Vielzahl von biologischen Prozessen führen (Kasper *et al.*, 2006). Dazu zählen unter anderem die Proliferation, die Regulation des Zellzyklus, die Apoptose, der Wachstumsarrest, die Differenzierung, die DNA-Schadens-Antwort und die zelluläre Antwort auf Stress, wie Hypoxie oder Entzündung (Giles *et al.*, 1998; Giordano and Avantaggiati, 1999; Goodman and Smolik, 2000; Chan and La Thangue, 2001).



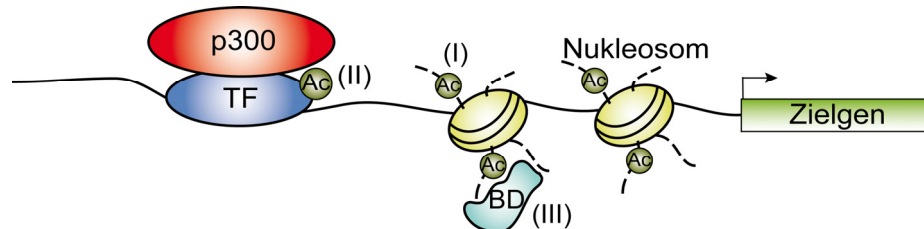
**Abbildung 5:** Schema des strukturellen Aufbaus des murinen p300 als multifunktionelles Protein (modifiziert nach: Goodman and Smolik, 2000).

Das Protein p300 besitzt zusätzlich zur Acetyltransferasefunktion (AT) eine E3/E4-Ubiquitinligaseaktivität (E3/E4) am N-Terminus und eine transkriptionelle Repressordomäne (CRD1). Die Bromodomäne (BD) ermöglicht p300 die Wechselwirkung mit acetylierten Proteinen. Über mehrere Bindemotive, zu denen die CH1-, CH2- und Zn-Regionen sowie die KIX-Domäne und eine am C-Terminus lokalisierte Glutamin-reiche Region (Gln-reich) zählen, kann p300 mit zahlreichen Proteinen interagieren, von denen ausgewählte unter den entsprechenden Regionen aufgelistet sind.

### 1.5.2 Die Acetyltransferasefunktion von p300

Im Gegensatz zu anderen HATs, bei denen nur einzelne Histone als Substrate dienen, werden von p300 *in vitro* alle vier Kernhistone acetyliert (Abb. 6) (Schiltz *et al.*, 1999; An and Roeder, 2003). Daraufhin wird eine Rekrutierung weiterer Proteine oder eine Regulation der transaktivierenden Funktion des gebundenen Proteins ermöglicht. Die Acetyltransferaseaktivität von p300 kann sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Expression der Zielgene wirken (Chen *et al.*, 1999) und ist für die Funktion von p300 als

transkriptioneller Koregulator essentiell. Mutationen in der enzymatischen Region der Acetyltransferasedomäne heben die transaktivierende Funktion von p300 auf (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996).



**Abbildung 6:** Die Acetyltransferaseaktivität von p300 kann mehrere Auswirkungen haben. Schematische Darstellung der Auswirkungen einer Proteinacetylierung durch p300. Zum einen kann die Acetylierung von Histonen zur Änderung der Chromatinstruktur auf einem lokal eingeschränkten Bereich führen (I). Zum anderen kann durch die p300-vermittelte Acetylierung von Transkriptionsfaktoren deren Aktivität moduliert werden (II). Eine dritte Folge der durch p300 katalysierten Acetylierung von Histonen kann die Rekrutierung weiterer Proteine mit einer Bromodomäne (BD) an das acetylierte Lysin sein und dadurch eine Signaltransduktion einleiten (III).

Neben den Histonen zählen zu den Substraten der durch p300-vermittelten Acetylierung zahlreiche Onkoproteine, wie c-Jun (Bannister *et al.*, 1995), c-Myb (Dai *et al.*, 1996; Oelgeschlager *et al.*, 1996) und c-Fos (Janknecht *et al.*, 1995), virale Proteine, wie E1A (Zhang *et al.*, 2000) und das *large T*-Antigen (Nemethova *et al.*, 2004), sowie Tumorsuppressorproteine, wie p53 (Chao *et al.*, 2006), E2Fs (Martinez-Balbas *et al.*, 2000), pRb (Chan *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2004) und Smads (Simonsson *et al.*, 2006; Tu and Luo, 2007). Weitere zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie TFIID (Ferreri *et al.*, 1994), MyoD (Yuan *et al.*, 1996; Sartorelli *et al.*, 1997; Poleskaya and Harel-Bellan, 2001), NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2002), Bcl-6 (Bereshchenko *et al.*, 2002) und nukleäre Hormonrezeptoren (Janknecht and Hunter, 1996; Kamei *et al.*, 1996) können von p300 gebunden und acetyliert werden. Die Acetylierung von zahlreichen Proteinen mittels p300 kann somit unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung und Reaktion der Zelle haben, das in dieser Arbeit näher untersucht wird.

### 1.5.3 p300 als transkriptioneller Koregulator

Bei der Umgestaltung des Chromatins (engl. *remodelling*) fungiert p300 zusätzlich als transkriptioneller Koaktivator (Kwok *et al.*, 1994; Bisotto *et al.*, 1996; Janknecht and Hunter, 1996; Swope *et al.*, 1996). p300 bindet nicht direkt an die DNA, sondern wird als Brücken- bzw. Gerüstprotein (engl. *scaffold*) über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren, wie p53, und anderen transkriptionellen Aktivatoren, wie TFIIB oder TFIID, an Promotoren und die basale Transkriptionsmaschinerie rekrutiert (Korzus *et al.*, 1998;

Kraus and Kadonaga, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Dieses Modell wurde durch den Nachweis der Bindung von p300 an das RNA-Polymerase-Holoenzym II bestätigt (Kee *et al.*, 1996). Wichtig für die Funktion als Koaktivator ist die Interaktion von p300 mit anderen Koregulatoren, wie dem Mediator- oder dem SWI/SNF-Komplex (Huang *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2006), und mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie (Felzien *et al.*, 1999).

Neben der aktivierenden Funktion kann p300 ebenso als Korepressor wirken. Dies wurde unter anderem bei Versuchen mit einer Überexpression von p300 und einer daraus resultierenden, Acetyltransferase-unabhängigen Hemmung der *C-MYC*-Transkription beobachtet (Baluchamy *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass eine Depletion von p300 zu einer Hochregulation von *C-MYC* führt (Kolli *et al.*, 2001). Die Repression von Zielgenen kann zum einen durch die SUMO-regulierte Repressordomäne CRD1 erfolgen (Snowden *et al.*, 2000; Gregory *et al.*, 2002; Girdwood *et al.*, 2003). Eine Sumoylierung führt daraufhin unter anderem zur Rekrutierung von HDAC6, das transkriptionell reprimierend auf die Promotoren der Zielgene wirken kann. Zum anderen kann p300 nach einer Acetylierung als transkriptioneller Korepressor fungieren (Santoso and Kadonaga, 2006). Diese p300-vermittelte Repression ist ebenso reversibel wie die durch SUMO-vermittelte und nicht von der Acetyltransferasedomäne, jedoch von der Bromodomäne von p300 abhängig. Somit können posttranslationale Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung und Sumoylierung am p300-Protein selbst deren Funktion regulieren (Yaciuk and Moran, 1991; Banerjee *et al.*, 1994; Goodman and Smolik, 2000; Chan and La Thangue, 2001; Chevillard-Briet *et al.*, 2002; Girdwood *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004).

#### **1.5.4 Die Bedeutung von p300 und Cbp während der Ontogenese von Mäusen**

Die Expression von *p300* beginnt bereits früh während der Embryonalentwicklung (E7.5 *days postcoitum*, dpc) (Yao *et al.*, 1998). Während der postnatalen Entwicklung und im adulten Zustand der Maus wird p300 ubiquitär exprimiert. Trotz der hohen Sequenzhomologie von p300 und Cbp weisen sie zum Teil verschiedene Funktionen in der Mausogenese und frühen Embryonalentwicklung auf, da sie während der Oozyt- und Präimplantationsentwicklung von Mäusen unterschiedlich reguliert werden (Kwok *et al.*, 2006). Anfangs sind beide Proteine im Zytoplasma lokalisiert und werden in verschiedenen Stadien des Oozytenwachstums in den Nukleus transportiert (Partanen *et al.*, 1999).

Dennoch zeigen der *p300* und der *Cbp Knock-Out* ähnliche Phänotypen der Embryonen, die in beiden Fällen zu einer embryonalen Letalität im Stadium E8.5-E11 dpc bzw. E10-E12 dpc führen (Yao *et al.*, 1998; Kung *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000). Die Embryonen weisen Defekte beim Schließen des Neuralrohrs, in der Zellproliferation und in der Herzentwicklung auf. Dies verdeutlicht die essentiellen Funktionen beider Proteine in der Embryonalentwicklung der Maus. Im Gegensatz zu homozygoten *p300 Knock-Out*-Mäusen weisen heterozygote Mäuse zwar eine erhöhte Mortalität im Uterus auf, jedoch sind die meisten Embryonen ohne spätere Fehl- oder Missbildungen lebensfähig (Yao *et al.*, 1998).

Alle Mäuse, die heterozygot für *Cbp* sind, sind im Gegensatz zu *p300 Knock-Out*-Mäusen lebensfähig (Tanaka *et al.*, 1997). Sie entwickeln jedoch Abnormalitäten des Skeletts. Ähnliche Missbildungen werden bei einer Entwicklungsstörung des Menschen, dem Rubinstein-Taybi-Syndrom, beschrieben (Rubinstein, 1990; Petrij *et al.*, 1995). Patienten mit diesem Syndrom weisen heterozygote Keimbahnmutationen (Punktmutationen, Translokationen oder Deletionen) von entweder *CBP* oder *P300* auf (Petrij *et al.*, 1995; Blough *et al.*, 2000; Petrij *et al.*, 2000; Roelfsema *et al.*, 2005; Bartholdi *et al.*, 2007). Bereits Mutationen in der Acetyltransferasedomäne von CBP mit Verlust der Acetyltransferaseaktivität sind ausreichend für die Initiation des Syndroms (Murata *et al.*, 2001; Kalkhoven *et al.*, 2003). Des Weiteren besitzen die Patienten eine erhöhte Prädisposition für Krebs (Miller and Rubinstein, 1995).

Mäuse, die heterozygot für sowohl *p300* als auch *Cbp* sind, zeigen im Vergleich zu homozygoten *Knock-Out*-Mäusen von *p300* oder *Cbp* ähnliche Defekte, die zu einer frühen embryonalen Letalität führen (Yao *et al.*, 1998). Zusammenfassend verdeutlicht dies, dass beide Proteine für die Ontogenese essentiell sind. Das Überleben von heterozygoten *p300* oder *Cbp Knock-Out*-Mäusen im Vergleich zur embryonalen Letalität von Mäusen, die heterozygot für beide Allele sind, symbolisiert zusätzlich einen Dosiseffekt beider Proteine. Dies bedeutet, dass für eine korrekte Ontogenese eine bestimmte Mindestmenge beider Proteine notwendig ist.

### **1.5.5 Die Bedeutung von p300 während der Tumorgenese**

Viele Krebsarten, wie Glioblastome, Leukämien, kolorektale Karzinome und Brustkrebs, weisen Mutationen von p300 auf, bei denen danach zum Teil ein Verlust der Heterogenität des Genlokus (*Loss of heterozygosity*, LOH) nachgewiesen werden kann (Muraoka *et al.*, 1996; Gayther *et al.*, 2000; Ohshima *et al.*, 2001; Shigeno *et al.*, 2004). Untersuchungen



von primären Tumoren und Tumorzelllinien zeigen zum Teil Mutationen von p300, die unter anderem eine Deletion der Acetyltransferasedomäne oder der p53-bindenden Zn-Domäne betreffen (Roth *et al.*, 2001). Zusätzlich zu Deletions-, Punkt- oder Insertionsmutationen weisen Patienten mit Leukämien Translokationen von Chromosomen auf, die das *P300*-Gen zerstören. Ein Beispiel hierfür ist eine t(11;22)(q23;q13) Translokation, die p300 mit dem MLL-Protein (*Mixed lineage leukemia*) fusioniert, die in Patienten mit akuter myeloider Leukämie (*Acute myeloid leukemia*, AML) vorhanden ist (Ida *et al.*, 1997). Eine t(8;22)(p11;q13) Translokation, die das monozytische Leukämie-Zinkfingerprotein (*Monocytic leukemia zinc finger protein*, MOZ) mit p300 fusioniert, tritt in seltenen Fällen bei Patienten mit AML auf (Lai *et al.*, 1985; Chaffanet *et al.*, 2000; Kitabayashi *et al.*, 2001). Obgleich diese Mutationen selten vorkommen, deuten sie auf eine Funktion von p300 als Tumorsuppressor hin.

Weitere Anzeichen dafür lieferte die Bindung von p300 an virale Onkoproteine, wie E1A (Arany *et al.*, 1994; Eckner *et al.*, 1994; Smits *et al.*, 1996; Giles *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1999). Des Weiteren interagiert p300 mit Proteinen, die an Tumorsuppressorsignalwegen beteiligt sind. Zum einen arbeitet p300 mit den Tumorsuppressoren der Smad-Familie zusammen, die in einer Vielzahl von bösartigen Tumoren inaktiv sind, um die Transkription von Zielgenen nach Aktivierung des antiproliferativen TGF- $\beta$ -Signalweges einzuleiten (Pouponnot *et al.*, 1998, Ghosh *et al.*, 2000; Ito and Miyazono, 2003). Zum anderen wird der Signalweg des Tumorsuppressorproteins p53 an mehreren Stellen von p300 beeinflusst. Dazu zählen die durch p300 vermittelte Regulation der Ubiquitinierung und der damit verbundene Abbau von p53 (Grossman *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2001; Grossman *et al.*, 2003). Des Weiteren erhöht eine durch p300 hervorgerufene Acetylierung von p53 nach DNA-Schäden die Stabilität des p53-p300-DNA-Komplexes und verstärkt dadurch die Zielgenaktivierung von p53-abhängigen Promotoren, wie *Mdm2*, *p21Cip1* und *Bax* (Gu and Roeder, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Dornan *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2004). Ferner wird p300 für die Transaktivierung der Zielgene von p53 durch dessen Koaktivatorfunktion und die Acetylierung von Histonen der Zielgene benötigt (Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997; Barlev *et al.*, 2001; Espinosa and Emerson, 2001).

### 1.5.6 Die Bedeutung der Acetyltransferaseaktivität von p300

Eine ubiquitäre Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300* in konditionellen *Knock-In*-Mäusen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, mit Hilfe der in der Keimbahn exprimierten *CMV-cre* Rekombinase (Schwenk *et al.*, 1995) oder der *EIIA-cre*

Rekombinase (Lasko *et al.*, 1996) führt zur embryonalen oder neonatalen Letalität (Shikama *et al.*, 2003). Die p300-Acetyltransferasemutation ruft zahlreiche Defekte des Herzens, der Lungen und des Darms während der Embryonalentwicklung hervor. Dies deutet auf eine Funktion der p300-Acetyltransferaseaktivität in der Organogenese hin.

Eine systemische, heterozygote Expression des Acetyltransferase-mutierten *p300* in Maus-embryonen mit Hilfe der *CMV-cre* Rekombinase führt zu einer verzögerten terminalen Differenzierung und einer reduzierten Muskelmasse der Embryonen (Roth *et al.*, 2003). Dies könnte aufgrund der fehlenden Interaktion und damit verbundenen Acetylierung der primären Myogenese-regulierenden Proteine (*Myogenic regulatory factors*, MRFs) MyoD und Myf5 während der Myogenese hervorgerufen werden (Eckner *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1996; Puri *et al.*, 1997; Sartorelli *et al.*, 1997).

Zusammenfassend verdeutlicht die heterozygote Expression eines Acetyltransferase-mutierten *p300* in Mäusen im Vergleich zu heterozygoten *p300 Knock-Out*-Mäusen (Tanaka *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1998) die Notwendigkeit der Acetyltransferaseaktivität für die Embryonalentwicklung, Organogenese (Shikama *et al.*, 2003) und Myogenese (Roth *et al.*, 2003). Der Unterschied beider Phänotypen könnte durch folgendes Modell erklärt werden: Es ist bekannt, dass die Autoacetylierung von p300 für dessen Dissoziation von den Promotor-gebundenen Proteinen und der anschließenden Bindung von TFIID an die basale Transkriptionsmaschinerie benötigt wird (Black *et al.*, 2006). Da Acetyltransferase-defizientes p300 durch eine fehlende Autoacetylierung sich nicht ablöst, ist die Transkriptionsaktivierung oder -repression am Promotor konstitutiv vorhanden.

Nach der Funktionsanalyse der p300-Acetyltransferaseaktivität in der Embryonalentwicklung, Organogenese und Myogenese, soll in der vorliegenden Arbeit dessen Relevanz in der Hämatopoese untersucht werden. Obwohl bereits bekannt ist, dass p300 mit zahlreichen Proteinen in B-Zellen interagiert und diese acetyliert (Kasper *et al.*, 2006), ist die Funktion der Acetyltransferaseaktivität von p300 während der B-Zell-Entwicklung noch ungeklärt. Daher wird im folgenden Kapitel zunächst die Entwicklung der Lymphozyten, die B-Zell-Typen und die Kontrolle der Funktion der B-Zellen beschrieben.

## **1.6 Die Entwicklung von Lymphozyten und das Immunsystem**

Die Produktion von Lymphozyten, die Lymphopoese, findet in den zentralen lymphoiden Geweben, zu denen das Knochenmark und der Thymus zählen, statt. Sowohl B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) als auch NK-Zellen (*Natural killer cells*, natürliche Tötungszellen) entwickeln sich aus undifferenzierten Vorläuferzellen im Knochenmark,

die ursprünglich aus hämatopoetischen Stammzellen (*Hematopoietic stem cells*, HSCs) entstanden sind. Im Knochenmark vervollständigen die B-Zellen den Großteil ihrer Entwicklung, wohingegen T-Zellen im Thymus aus den vom Knochenmark gewanderten Vorläuferzellen generiert werden. Im Fötus von Menschen und Tieren können sich B-Zellen zusätzlich zum Knochenmark ebenfalls in der Leber entwickeln.

Die Funktion von B- und T-Zellen als Antigen-bindende Zellen befähigt sie, eine Immunantwort gegenüber Pathogenen auszuüben, die durch die sehr früh während der Differenzierung festgelegte Antigenspezifität der Antigenrezeptoren dieser Zellen erzielt wird. Nach der Expression eines Rezeptors auf der Oberfläche der Lymphozyten, der die Erkennung von Rezeptor-bindenden Liganden ermöglicht, wird dieser auf dessen Antigen-bindenden Eigenschaften gegenüber Antigenen in der direkten Umgebung (Selbstantigenen) überprüft. Eine schwache Bindeaffinität des Rezeptors gegenüber dem gebundenen Selbstantigen aktiviert ein Signal, dass zum Überleben und somit zur Differenzierung (Reifung) des Lymphozyten führt (Healy and Goodnow, 1998).

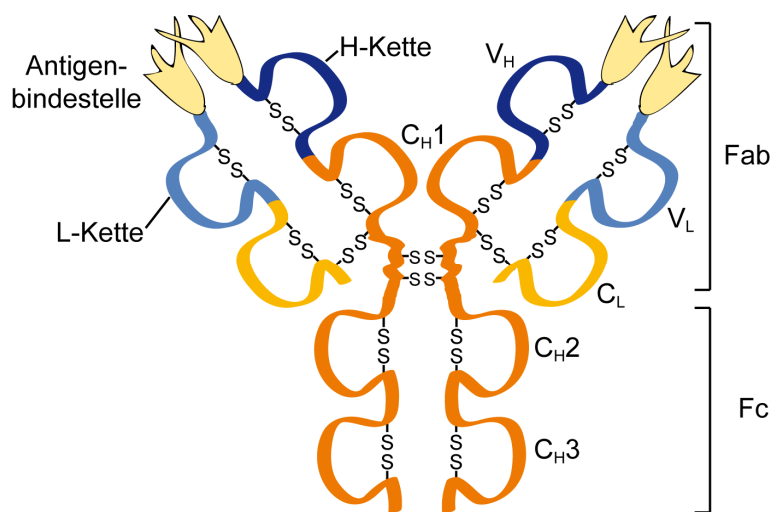
Im Gegensatz zu dieser Positivselektion wird bei einer Negativselektion, die durch eine starke Bindung des Rezeptors mit Selbstantigenen ausgelöst wird, in dem Lymphozyt eine Veränderung des Rezeptors (Rezeptor *Editing*) oder die Rezeptor-vermittelte Apoptose eingeleitet (klonale Deletion) bzw. der Lymphozyt reaktionsunfähig gemacht (Anergie) (Nemazee and Burki, 1989; Goodnow, 1996). Somit werden Lymphozyten, die auf Selbstantigene reagieren, noch bevor sie den Reifungszustand erreichen und daraufhin eine Autoimmunreaktion auslösen könnten, aus dem Repertoire entfernt. Dies führt zur Entwicklung einer immunologischen Toleranz gegenüber Selbstantigenen (Selbsttoleranz). Aufgrund der Positiv- und Negativselektion sowie dem Sterben von Lymphozyten, die keine Bindung eines Antigens durchführen, stellen die Lymphozyten, die der reifen Lymphozytenpopulation angehören, nur einen kleinen Bruchteil von ca. 2-5% der im Knochenmark oder Thymus hergestellten Zellen dar (Jacobi and Diamon, 2005).

### **1.6.1 Die Immunglobuline**

Das Rearrangement der Rezeptorgene bei B-Zellen führt zur Ausbildung von Immunglobulinen, die als membrangebundene Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden (Grawunder *et al.*, 1998). Immunglobuline können ebenfalls als lösliche Antikörper ins Serum oder auf die Schleimhäute sezerniert werden. Ein Immunglobulinmolekül (Ig) besteht aus jeweils zwei identischen, schweren Ketten (*Heavy chain*, H-Kette, Immunglobulin H-Kette, IgH) und zwei identischen, leichten Ketten (*Light chain*, L-Kette,

Immunglobulin  $\underline{L}$ -Kette, IgL) (Abb. 7). Die Verknüpfung beider H-Ketten untereinander und jeweils einer L- mit einer H-Kette erfolgt über Disulfidbindungen.

Ein Heterodimer aus einer H- und einer L-Kette bildet eine Antigenbindungsstelle an ihren N-terminalen variablen Domänen (V-Domäne), so dass ein Immunglobulin zwei identische Bindungsstellen besitzt. Die V-Domäne der L-Kette ( $V_L$ ) setzt sich aus einem V (*Variable*)- und einem J (*Joining*)-Genabschnitt zusammen, wohingegen die V-Domäne der H-Kette ( $V_H$ ) aus drei Genabschnitten aufgebaut ist (V-, D (*Diversity*)- und J-Genabschnitt). Zusätzlich zu den V-Domänen weisen die L-Ketten eine und die H-Ketten bis zu vier konstante C-terminale Domänen (*Constant region*, C-Domäne) auf.



**Abbildung 7:** Schematischer Aufbau eines Immunglobulins (modifiziert nach: Janeway *et al.*, 2005).

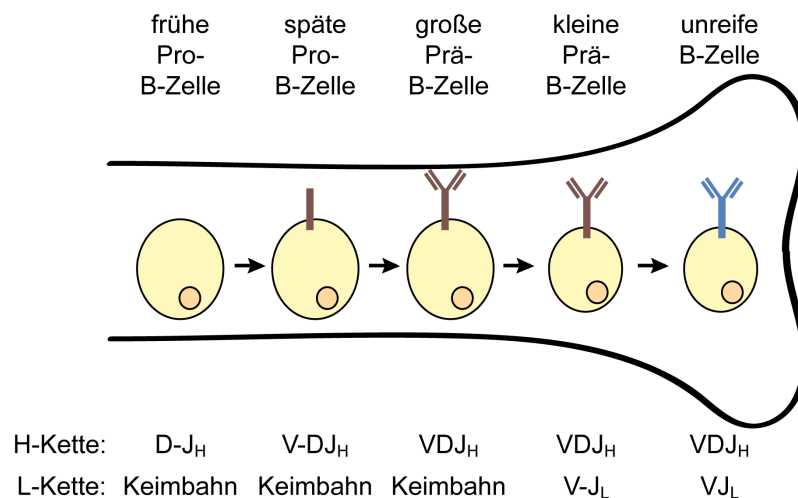
Ein Immunglobulinmolekül besteht aus zwei identischen, leichten Ketten (L-Kette) und zwei identischen, schweren Ketten (H-Kette), die jeweils durch Disulfidbindungen (-SS-) miteinander verknüpft sind. Jede H-Kette setzt sich aus einer variablen Domäne ( $V_H$ , dunkelblau) und bis zu drei konstanten Domänen (hier drei:  $C_{H1}$ - $C_{H3}$ , orange) und jede L-Kette aus einer V-Domäne ( $V_L$ , hellblau) und nur einer C-Domäne ( $C_L$ , gelb) zusammen. Die V-Domänen beider Ketten bilden jeweils eine Antigenbindungsstelle. Des Weiteren wird ein Immunglobulinmolekül in einen Fc-Teil (*Fragment of constant region*) und einen Fab-Teil (*Fragment of antigen binding*) unterteilt.

Der Isotyp einer H-Kette und die daraus resultierende Funktion des Immunglobulins werden durch die konstante Domäne der H-Kette festgelegt (Fanning *et al.*, 1996). Dies führt zu einer Unterteilung der Immunglobuline in fünf Isotypen: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE, für die jeweils ein Gen kodiert ( $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_\gamma$ ,  $C_\alpha$  und  $C_\epsilon$ ). Zur Erkennung von zahlreichen Pathogenen werden eine Vielzahl an Antikörperspezifitäten und eine daraus resultierende Immunglobulindiversität benötigt. Dies wird durch somatische Rekombination der Genabschnitte der H-Kette und der L-Kette eines Typs gewährleistet (Schatz and Spanopoulou, 2005). Durch die allelische Ausschließung (engl. *allelic exclusion*) wird sichergestellt, dass eine B-Zelle nur Immunglobuline einer einzigen Spezifität exprimieren (Nussenzweig *et al.*, 1987; Kitamura *et al.*, 1992; Kitamura and Rajewsky, 1992).

### 1.6.2 Die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark von Mäusen

Die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark beginnt mit dem Stadium der Pro-B-Zellen (engl. *pro-B cells*), in denen bereits das Rearrangement der H-Kette von Immunglobulinen erfolgt (Abb. 8). Die frühen Pro-B-Zellen (engl. *early pro-B cells*) verknüpfen den D<sub>H</sub>- mit dem J<sub>H</sub>-Teil der H-Kette der Immunglobuline. Danach wird in den späten Pro-B-Zellen (engl. *late pro-B cells*) der V<sub>H</sub>-Teil mit dem bereits verknüpften DJ<sub>H</sub>-Teil verbunden, was bei einer korrekten Zusammensetzung zur Expression der intakten μ H-Kette führt.

In den danach folgenden großen Prä-B-Zellen (engl. *large pre-B cells*) ist die H-Kette zusammen mit einer Ersatz-L-Kette intrazellulär und in kleinen Mengen an der Zelloberfläche lokalisiert, um den Prä-B-Zell-Rezeptor zu bilden (Sakaguchi and Melchers, 1986; Kudo and Melchers, 1987; Bossy *et al.*, 1991; Melchers *et al.*, 1993). Über eine Signalkaskade werden das Rearrangement des Genlokus der H-Kette und die Produktion der Ersatz-L-Kette gestoppt und zahlreiche Zellteilungen eingeleitet (Rajewsky, 1996). Dies leitet den Übergang der Entwicklung von der großen zur kleinen Prä-B-Zelle (engl. *small pre-B cell*) ein, in dem das Rearrangement der L-Kette der Immunglobuline erfolgt.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung im zentralen lymphatischen Organ (modifiziert nach: Benschop and Cambier, 1999).

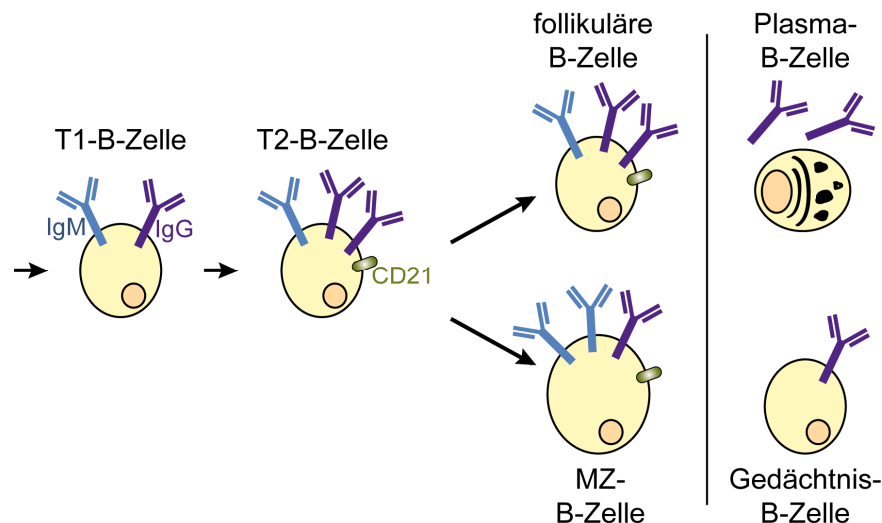
Während der B-Zell-Entwicklung im zentralen lymphatischen Organ, dem Knochenmark, von der frühen Pro-B-Zelle zur unreifen B-Zelle erfolgt schrittweise das Rearrangement der Genloci für eine funktionelle H- und L-Kette des BCR-Rezeptors als wesentliches Merkmal der Stadien. Die einzelnen Schritte des Rearrangements beider Ketten sind jeweils unter den Stadien der B-Zelle dargestellt.

Nach der korrekten Verknüpfung des Genlokus der L-Kette und der Präsentation des vollständigen Immunglobulins sIgM (*Surface immunoglobulin M*) auf der Zelloberfläche, ist die Entwicklung zu einer unreifen B-Zelle (engl. *immature B cell*) abgeschlossen. Sofern kein funktioneller, monospezifischer B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR), in diesem Fall sIgM, auf der Zelloberfläche der B-Zellen vorhanden ist, kann diese das

Knochenmark nicht verlassen (Hesslein and Schatz, 2001). Das Immunglobulin sIgM wird als Ausgang für die spätere Rekombination weiterer Immunglobuline benötigt. Nur etwa 30% der täglich produzierten Prä-B-Zellen überleben und entwickeln sich zu unreifen B-Zellen (Osmond, 1993).

### 1.6.3 Die B-Zell-Differenzierung in der Milz von Mäusen

Nach der Entwicklung der Pro-B-Zellen zu unreifen B-Zellen im Knochenmark werden sie bezüglich ihrer Selbsttoleranz selektioniert (siehe 1.6) (Edry and Melamed, 2004). Die positiv selektionierten unreifen B-Zellen werden in die peripheren lymphatischen Organe transportiert, zu denen die Milz, die Lymphknoten und das Mukosa-assozierte lymphatische Gewebe (MALG: Tonsillen, Peyersche Plaques) zählen. Bei der Maus erfolgt die Reifung der B-Zellen nur in der Milz, wohingegen sie beim Menschen in allen peripheren lymphatischen Organen stattfindet. In der Milz der Maus differenzieren die unreifen B-Zellen über transitionelle B-Zellen als Zwischenstufe (engl. *transitional B cells*) zu reifen B-Zellen (engl. *mature B cells*) (Abb. 9) (Allman *et al.*, 1992; Allman *et al.*, 1993; Carsetti *et al.*, 1995; Rolink *et al.*, 1998; Loder *et al.*, 1999; Allman *et al.*, 2001).



**Abbildung 9:** Schematische Übersicht der Differenzierung der B-Zellen in der Milz von Mäusen (modifiziert nach: Benschop and Cambier, 1999; Niiro and Clark, 2002).

Nach der Entwicklung der Vorläuferzellen im Knochenmark zu unreifen B-Zellen wandern diese in die Milz und differenzieren über das Stadium der transitionellen B-Zellen (T1 und T2) zu reifen B-Zellen. Die reifen B-Zellen werden in follikuläre B-Zellen und B-Zellen der Marginalzone (MZ-B-Zellen) unterteilt. Nach einer Aktivierung der reifen B-Zellen entstehen aus ihnen langlebige Antikörper-sekretierende Plasma-B-Zellen oder Gedächtnis-B-Zellen mit einer gleich bleibenden Antigen-spezifität.

Die aus transitionellen B-Zellen hervorgehenden reifen B-Zellen werden auch als naive B-Zellen bezeichnet, da sie noch nicht durch die Bindung von Antigenen aktiviert wurden. Sie sind im Vergleich zu den anderen B-Zellen langlebig (Kumarakratne and MacLennan,

1982; Loder *et al.*, 1999). Durch ihre Fähigkeit zur Zirkulation im Blut und in der Lymphe verbreiten sie sich in den Lymphknoten und in der Milz. In diesen Geweben können sie Fremdartigene binden, dadurch aktiviert werden und eine Immunantwort induzieren.

In der Milz einer Maus erfolgt eine weitere Unterteilung der reifen B-Zellen in folliculäre B-Zellen (engl. *follicular B cells*, *FO B cells*) und B-Zellen der Marginalzone (engl. *marginal zone B cells*, *MZ B cells*, MZ-B-Zellen) (Kumararatne *et al.*, 1981; Martin and Kearney, 2002). Folliculäre B-Zellen oder B-2 B-Zellen sind kleine, rezirkulierende Lymphozyten mit einer geringen Expression von sIgM (sIgM<sup>gering</sup>) und einer hohen Produktion von sIgD (sIgD<sup>hoch</sup>). Diese B-Zellen bilden die B-Zell-Follikel innerhalb der Weißen Pulpa der Milz und interagieren mit folliculären dendritischen Zellen (*Follicular dendritic cells*, FDCs) (Kosco and Gray, 1992). Zusätzlich sind folliculäre B-Zellen zusammen mit T-Zellen für die adaptive Immunantwort verantwortlich. In adulten Organismen bilden sie den Großteil der reifen B-Zellen.

Im Vergleich zu den folliculären B-Zellen werden MZ-B-Zellen als mittelgroße, nicht zirkulierende Lymphozyten mit hoher sIgM- (sIgM<sup>hoch</sup>) und geringer sIgD-Expression (sIgD<sup>gering</sup>) beschrieben (Kumararatne *et al.*, 1981). Sie liegen in der Marginalzone der Milz, die an der Grenze zwischen Weißer und Roter Pulpa lokalisiert ist. Die Marginalzone dient zum einen dem Wiedereintritt von B-Zellen in die Milz und zum anderen der Präsentation von aktivierten B-Zellen (Liu *et al.*, 1988). MZ-B-Zellen können schnell auf einzelne Antigene oder Pathogene, die aus dem Blutstrom gefiltert werden, reagieren und somit ergänzend zur adaptiven Immunantwort wirken (Guinamard *et al.*, 2000; Martin and Kearney, 2002).

#### 1.6.4 Die B-Zell-Aktivierung als Reaktion auf Fremdartigene

In naiven B-Zellen der Milz löst die Bindung an ein Fremdartigen Überlebens- und Proliferationssignale aus. Hierbei wird zwischen T-Zell-abhängigen und -unabhängigen Antigenen unterschieden. Da in der vorliegenden Arbeit unter anderem die T-Zell-abhängige Immunantwort untersucht wird, wird diese im Folgenden beschrieben. Sofern eine naive B-Zelle mit ihrer Antigenbindestelle des BCR ein T-Zell-abhängiges Antigen, meist Protein, bindet, erfolgt zum einen eine Quervernetzung des BCR, das zur Initiation verschiedener Signalkaskaden führt (siehe 1.6.5). Zum anderen nimmt die B-Zelle das Antigen zusammen mit dem Rezeptor auf und präsentiert beides über den Haupt-Histokompatibilitätskomplex der Klasse II (*Major histocompatibility complex II*, MHC II) auf ihrer Zelloberfläche. Dieser MHC II wird von einer T-Helferzelle des Typs II (TH2-Zelle)

gebunden, die durch das gleiche Antigen aktiviert wurde. Die anschließende Ausschüttung von Zytokinen und die Sekretion von Liganden der TH2-Zelle an die B-Zelle liefern ein weiteres Signal zur Aktivierung der B-Zelle (Parker, 1993). Ein Beispiel für einen sekretierten Liganden ist der CD40-Ligand (CD40L,  $\alpha$ -CD40) der T-Zelle, der mit dem CD40-Rezeptor (CD40) auf der Oberfläche der B-Zelle interagieren kann. Die durch T-Zell-B-Zell-Kontakte vermittelten Signale führen zu einer klonalen Selektion der aktivierten B-Zelle.

Nach der Proliferation der aktivierten B-Zellen führt ein Teil dieser einen Isotypwechsel von IgM zu IgG1 durch (Gray *et al.*, 1996). Dieser Prozess erfolgt über eine nicht-homologe Rekombination der *Switch*-Regionen der Immunglobulingenloci (engl. *class switch recombination*) (Maizels, 2005). Die Umschaltung zu einem bestimmten Isotyp wird hauptsächlich von Zytokinen und Signalen der T-Zelle reguliert (Jacquot, 2000). Anschließend differenzieren die aktivierten B-Zellen zu extrafollikulären Plasmazellen mit gleicher Antigen-spezifität, die niederaffine Antigen-spezifische Antikörper sezernieren (MacLennan *et al.*, 2003). Während ein Teil der aktivierten B-Zellen dadurch eine schnelle, jedoch nicht spezifische Immunantwort aufgrund der Sekretion von niederaffinen Antikörpern hervorruft, führt ein anderer Teil zur Herstellung hochaffiner Antikörper eine Keimzentrumsreaktion durch. Dabei kann die Funktionalität des BCR durch somatische Hypermutation verbessert werden (Jacob and Kelsoe, 1992; Neuberger and Milstein, 1995; Nitschke *et al.*, 1997; Papavasiliou and Schatz, 2002).

Die B-Zellen mit einem hochaffinen BCR proliferieren und entwickeln sich unter dem Einfluss von Interleukinen zu Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen, die für eine Erinnerungsantwort benötigt werden (McHeyzer-Williams and Ahmed, 1999). Neben dem Antigenkontakt benötigen diese B-Zellen wiederum eine Kostimulation durch TH2-Zellen über die Bindung an das vom MHC II präsentierte Antigen. Dadurch lösen die TH2-Zellen die von CD40-vermittelte Signalkaskade bei B-Zellen aus, die zu einem Isotypwechsel von IgM zu IgG, IgA oder IgE führt (Jabara *et al.*, 1990; Hasbold *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zur T-Zell-abhängigen Immunantwort benötigen die B-Zellen bei einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort nur ein einziges Signal, das durch Quervernetzung des BCR erzeugt wird. Zu den T-Zell-unabhängigen Antigenen zählen vor allem Polysaccharide, die auf der Oberfläche von Bakterien vorhanden sind. Die B-Zelle wird durch die Quervernetzung des BCR aktiviert, was zum Anschalten der Proliferation und zur Bildung von Antikörpern des Isotyps IgM führt. Bei dieser Form der Aktivierung finden kein Isotypwechsel und keine Bildung von Gedächtnis-B-Zellen statt. Diese Form der Antikörper-

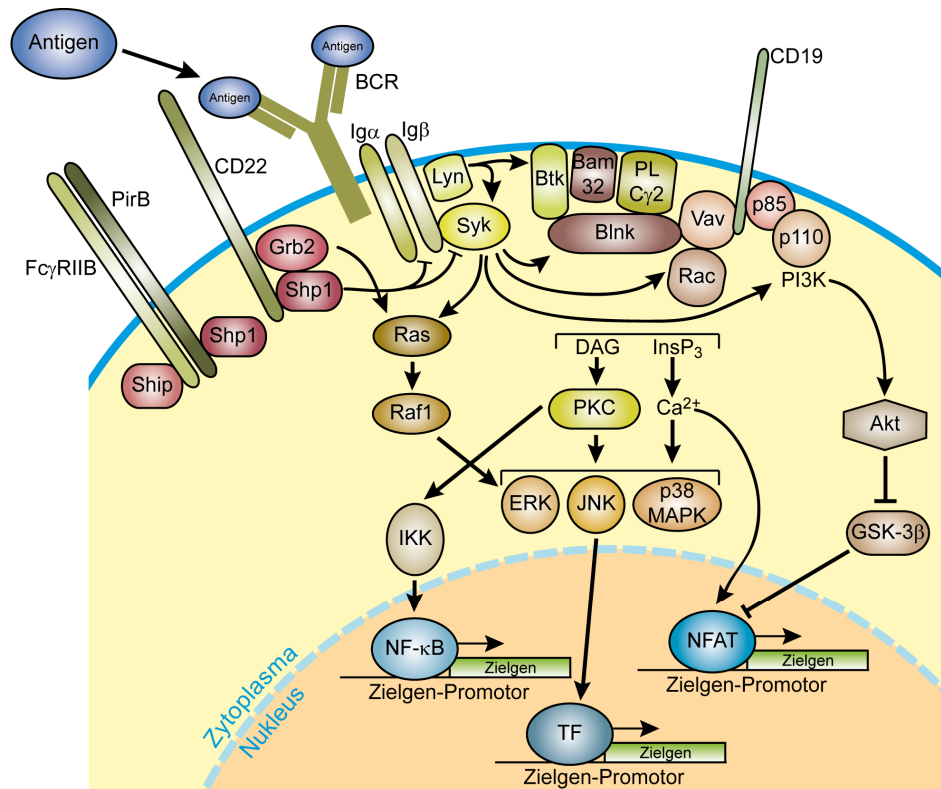


produktion erfolgt somit schneller als die T-Zell-abhängige und ist in der angeborenen Immunantwort involviert.

### 1.6.5 Zahlreiche Signalwege kontrollieren die B-Zell-Entwicklung

Zusätzlich zum Einfluss der Stromazellen ist die Entwicklung von der frühen Prä-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle ebenso von der Signaltransduktion über den BCR-Signalweg abhängig (Turner *et al.*, 1995; Benschop and Cambrier, 1999; Kraus *et al.*, 2004). Der BCR-Signalweg vermittelt eine Mitogenese und Immunantworten über die Initiation von biochemischen Signalkaskaden, in denen Tyrosinkinasen und *Second Messenger*, wie Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), involviert sind (Abb. 10) (Niiro and Clark, 2002). Die für die Bildung eines funktionellen Rezeptorkomplexes zusätzlich nötigen Zelloberflächenproteine  $\text{I}\alpha$  (CD79 $\alpha$ ) und  $\text{I}\beta$  (CD79 $\beta$ ) dienen der Weiterleitung des Signals vom BCR an die intrazellulären Tyrosinkinasen über dessen Interaktion. Diese und andere Transmembranproteine werden über ihre zytoplasmatische ITAM-Region (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) phosphoryliert und somit aktiviert. Die anschließende Weiterleitung des Signals mittels Tyrosinkinasen führt letztendlich zur Expression verschiedener Zielgene mit Hilfe von Translokationen zytoplasmatischer Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B und NFAT, in den Nukleus (Niiro and Clark, 2002). Zusätzlich werden durch Mitogenaktivierende Proteinkinasen (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), wie ERK (*Extracellular signal-regulated protein kinase*) und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), aktiviert, die nukleäre Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (Davis, 1994; Karin and Hunter, 1995).

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg ist ein weiterer Signalweg, der mit dem BCR-Signalweg verknüpft ist und einen Einfluss auf die Entwicklung von sowohl folliculären als auch MZ-B-Zellen ausübt. Dieser wird durch das Protein BAFF (*B cell activating factor of TNF family*), einem Mitglied der TNF-Familie (*Tumor necrosis factor*, Tumor-Nekrose-Faktor), aktiviert, das von myeloiden und dendritischen Zellen sekretiert wird (Schiemann *et al.*, 2001; Mackay and Browning, 2002). Die Entwicklung der MZ-B-Zellen benötigt zusätzlich die Aktivierung des extrazellulär-lokalisierten Signalmoleküls Notch2 durch dessen Bindung mit dem Protein *Delta-like 1* und der anschließenden Aktivierung der Notch-abhängigen Signalkaskade (Saito *et al.*, 2003; Hozumi *et al.*, 2004). Das Zusammenspiel dieser verschiedenen Signalwege mit zahlreichen anderen ermöglicht somit eine geregelte und kontrollierte Entwicklung sowie Differenzierung der B-Zellen.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des BCR-Signalweges (modifiziert nach: Niiro and Clark, 2002). Nach der Bindung eines Antigenes an den BCR werden drei wesentliche Tyrosinkinassen aktiviert (Lyn, Syk und Btk). Die Kinase PI3K und die Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) sind wesentliche stromabwärts liegende Effektoren des BCR-Signalweges. Das effiziente Verknüpfen von Kinassen mit Effektoren erfolgt über BCR-Adapter, wie Blnk (*B cell linker*) und Bam32 (*B-lymphocyte adaptor molecule 32*). Mit Hilfe der PI3K wird die stromabwärts liegende Kinase Akt aktiviert. Die Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 2 führt zur Freisetzung von intrazellulärem Ca $^{2+}$  und der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Sowohl Ca $^{2+}$  als auch die PKC sind für die Aktivierung von zum einen den MAPK, wie ERK, JNK und die p38 MAPK, und zum anderen den Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B und NFAT, verantwortlich. Die MAPK können wiederum andere Transkriptionsfaktoren (TF) aktivieren, wobei die anschließende Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren zu den Zielsequenzen der Gene das Zellschicksal der B-Zelle bestimmt. DAG: *Diacylglycerol*; Fc $\gamma$ RIIB: *Low-affinity Fc receptor for IgG*; IKK: *Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase*; Grb2: *Growth factor receptor-bound protein 2*; GSK-3 $\beta$ : *Glycogen synthase kinase-3 $\beta$* ; PirB: *Paired immunoglobulin-like receptor B*; SHIP: *SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5' phosphatase*; Shp1: *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1*.

## 1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Das multifunktionelle Protein p300 spielt in zahlreichen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Während der Differenzierung von Zellen, besonders von hämatopoetischen Zellen, führt ein Verlust von p300 zu einer verminderten Zahl differenzierter Zelltypen. Die embryonale Letalität von Mäusen, die heterozygot für ein Acetyltransferase-defizientes *p300* sind, verdeutlicht, dass die Acetyltransferaseaktivität von p300 während der Ontogenese essentiell ist. Des Weiteren spielt p300 in Leukämien und anderen Krebsformen eine Rolle. In Hinblick auf die Entstehung von Leukämien ist die B-Zell-Entwicklung als ein wesentlicher und sehr komplexer Prozess während der Ontogenese zu berücksichtigen, bei dem p300 an zahlreichen Positionen deren Funktion ausüben kann. Eine Untersuchung der B-Zell-Entwicklung in Mäusen mit mutiertem p300 könnte dabei Hinweise für eine Rolle der reversiblen Acetylierung von Proteinen bei der Entstehung von Leukämien geben. Daher ist die Aufklärung der Rolle einzelner biochemischer Funktionen von p300 während der B-Zell-Entwicklung von besonderem Interesse.

Aufgrund dieser Beobachtungen war eine Zielsetzung dieser Arbeit die Untersuchung der Acetyltransferaseaktivität von p300 in B-Zellen von Mäusen *in vivo* mit Hilfe einer konditionellen *Knock-In*-Maus. Ferner sollten die Folgen der B-Zellen mit einem Acetyltransferase-defizienten p300 auf die Entwicklung der Maus identifiziert werden. Diese Arbeit sollte, wenn möglich, die erste Verbindung zwischen p300 als Protein in der B-Zell-Entwicklung und als Tumorsuppressor in der Krebsentstehung herstellen. Substrate der p300-Acetyltransferaseaktivität sind neben Histonen ebenfalls zahlreiche andere Proteine. Dennoch ist weitestgehend ungeklärt, bei welchen der Proteine eine fehlende p300-vermittelte Acetylierung zu den beschriebenen Störungen in der Ontogenese führt. Daher sollte mit dieser Arbeit zum ersten Mal aufgeklärt werden, welche Proteine die kritischen Substrate der Acetyltransferase *in vivo* sind. Zusätzlich zu den Untersuchungen in den Mäusen sollte eine B-Zelllinie mit Expression des Acetyltransferase-defizienten p300 hergestellt werden. Beide Ansätze könnten zur Identifikation von p300-Acetyltransferase-abhängigen Genen in B-Zellen beitragen.

Mit Hilfe einer induzierbaren, ubiquitären Expression des Acetyltransferase-defizienten p300 in heterozygoten Mäusen sollte die Rolle der Acetyltransferaseaktivität in anderen Zelltypen und Geweben als den B-Zellen untersucht werden. Somit würde eine Funktion von p300 nach der Embryonalentwicklung näher beschrieben werden können. Dadurch könnte herausgefunden werden, welcher Zelltyp auf die Acetyltransferaseaktivität von p300 angewiesen ist.

## 2 MATERIALIEN

### 2.1 Stämme und Zelllinien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$  *E.coli* F $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYAaegF)U169 *deoR recA1*  
*endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>i</sup>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 $\lambda$ -thi-1 gyrA96 relA1*

#### 2.1.2 Säugerzellen

Die verwendeten CH12.LX B-Zellen (Bishop and Haughton, 1986) wurden freundlicherweise von Bruce S. Hostager (University of Minnesota, USA) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.3 Mausstämmen

Die Mäuse wurden artgerecht und unter keimarmen Bedingungen in der Tierhaltung der Universität Marburg gepflegt, dabei wurde ihnen frisches Wasser und konventionell erhältliches Futter verabreicht. Sie wurden sowohl in einzeln belüfteten Käfigsystemen als auch in offenen Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 20°C und einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h gehalten. In allen Experimenten wurden entweder Mäuse aus demselben Wurf oder Alters- und Geschlechts-gleiche Mäuse als Kontrollen eingesetzt.

Die verwendeten C57BL/6 Mäuse (Fellfarbe: schwarz) stellen den meistgenutzten Inzuchtstamm der Labormäuse dar, da dieser auf 20 Generationen von Inzuchtverpaarungen zurückgeht, wodurch der Geno- und Phänotyp der Mäuse sehr einheitlich wurde. Der 129/Sv Inzuchtstamm (Fellfarbe: agouti) wird häufig zum Einführen von Mutationen in embryonale Stammzellen verwendet. Des Weiteren weist er eine Prädisposition für Erkrankungen auf. Mäuse des Inzuchtstammes FVB/N (Fellfarbe: albino) entwickeln keine spontanen Tumore und wurden als ein weiterer genetischer Stammhintergrund eingesetzt.

Die *p300<sup>+AS-neo</sup>* Maus wurde von Werner Lutz aus Zürich mit reinem C57BL/6 genetischen Stammhintergrund mitgebracht (Roth *et al.*, 2003, Shikama *et al.*, 2003) und entsprechend verpaart bzw. zurückgekreuzt. Die *CD19-cre* Maus wurde freundlicherweise von Klaus Rajewsky (CBR Institute, Boston) mit einem reinen 129/Sv genetischen Stammhintergrund bezogen (Rickert *et al.*, 1997). Mariano Barbacid (CNIO, Madrid) stellte freundlicherweise die *RERTn-cre* Maus zur Verfügung (Guerra *et al.*, 2003), die einen gemischten genetischen Stammhintergrund (C57BL/6  $\times$  129/Sv) aufwies.

## 2.2 DNA

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

### 2.2.1 Primer zur Genotypisierung

*p300AS-neo*:

forward 5'-GTG TTC ATT TCT TCC GTC CTA-3'  
reverse 5'-TGT CAA GCA TCT TTT TGC TAG C-3'

*CD19-cre*:

forward 5'-ACC CTG ATC CTG GCA ATT TC-3'  
reverse 5'-GTC GAT GCA ACG AGT GAT GA-3'

*RERTn-cre*:

forward 5'-GTC AGT ACA CAT ACA GAC TT-3'  
reverse 5'-TGA GCG AAC AGG GCG AA-3'

### 2.2.2 Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination in CH12.LX-Zellen

*p300AS-neo*:

forward 5'-TGC CTG CTT GCC GAA TAT CAT G-3'  
reverse 5'-GCT CCT TGA TGC TTT CTT CTA G-3'

*p300AS-lox* vs. *p300wt*:

forward 5'-GGA TAG AAC AAA GGC AGG TAG-3'  
reverse 5'-AGC TCA CTA TGT AAA GCA GG-3'

### 2.2.3 Primer für die RT-PCR

Die in dieser Arbeit genutzten Primer für semiquantitative und quantitative RT-PCR-Analysen wurden mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Design Center* von Roche entworfen ([www.roche-applied-science.com/sis/rtqpcr/upl/index.jsp](http://www.roche-applied-science.com/sis/rtqpcr/upl/index.jsp)). Es wurde darauf geachtet, dass das von den Primern flankierte PCR-Produkt möglichst eine Exon-Intron-Grenze überschreitet, wodurch eine mögliche Amplifikation genomischer DNA während der PCR verhindert wurde. Alle Primer waren gegen murine mRNA gerichtet und das PCR-Produkt lag im Bereich von 75-120 bp.

*cd55* bzw. *ms4a1*:

forward 5'-CAG GCA TAT AGG TGT CTC ATT TTC-3'  
reverse 5'-GTT TTT CCG CAT TTC CTC TAT C-3'

<i>cd72:</i>	
forward	5'-TTG CAA AAC TTC TTG CTT GG-3'
reverse	5'-TGG AAC TGC TGA GAC ACC TG-3'
<i>cy2b:</i>	
forward	5'-TCT TCT TCA CGC GGC TCC ACA T-3'
reverse	5'-CTG CCA ACT CCT CCC CAT CCT C-3'
<i>daf1:</i>	
forward	5'-GTT GTG GGT TTC TGA GGC GTT GAG-3'
reverse	5'-ACC CCG GTG CAT AGA GAA ATC C-3'
<i>hcph:</i>	
forward	5'-TCT GCC GAC CGC TGC TTC TT-3'
reverse	5'-ACG TAC CCT CCC GCT GTG A-3'
<i>ighg:</i>	
forward	5'-TCG CTC ACA TCC ACC ACC ACA-3'
reverse	5'-CAG CGG GCC CAT TTC AAC A-3'
<i>il2rg:</i>	
forward	5'-AAG GGA AGG CAG TGA GCA TTG G-3'
reverse	5'-GAA GCC GGA AGC CTG AAC ATC-3'
<i>p300:</i>	
forward	5'-GTG TTC ATT TCT TCC GTC CTA-3'
reverse	5'-TGT CAA GCA TCT TTT TGT ACC A-3'
<i>p300AS:</i>	
forward	5'-GTG TTC ATT TCT TCC GTC CTA-3'
reverse	5'-TGT CAA GCA TCT TTT TGC TAG C-3'
<i>ptpn22:</i>	
forward	5'-AAA TCC AGA GGT GCG TTA CAT A-3'
reverse	5'-CTC ACC AAG CAA GCC TAC AGA A-3'
<i>rac2:</i>	
forward	5'-AGT AGG GGT TGG CTG AG-3'
reverse	5'-CAT GCT GGG ATA CCT TCT-3'
<i>rps16:</i>	
forward	5'-AGG AGC GAT TTG CTG GTG TG-3'
reverse	5'-GCT ACC AGG GCC TTT GAG AT-3'

#### 2.2.4 Primer für qPCR nach ChIP

<i>cd55</i> Promotor:	
forward	5'-TCC TGG GTG TTT CCC TAT TTC-3'
reverse	5'-TTG CAA AGG GAA GGG TAG G-3'

*cy2b* Promotor:

forward 5'-CTC CCC TAC CCC AGA CAC-3'  
reverse 5'-CAA CCC ACA GAC TAA GAA CAG GAT-3'

*ins1*:

forward 5'-GGA TTT GGG ATA TAA CTT TTA CTT GG-3'  
reverse 5'-GGA TTT TAC CAT AAT ACT TTG CAT TTG-3'

## 2.2.5 Expressionsplasmide

pXXC9- <i>XbaI</i>	diente als Zielvektor für die Herstellung der embryonalen Stammzellen für die <i>p300<sup>+AS-neo</sup></i> Maus; freundlicherweise von Werner Lutz zur Verfügung gestellt (Roth <i>et al.</i> , 2003; Shikama <i>et al.</i> , 2003)
pSEPT	kodiert unter anderem für eine Neomycin-Resistenz ohne eigenen Promotor; freundlicherweise von Fred Bunz zur Verfügung gestellt (Topaloglu <i>et al.</i> , 2005)
pPGK cre	kodiert unter anderem für eine konstitutiv-aktive Cre-Rekombinase; freundlicherweise von Werner Lutz zur Verfügung gestellt
pXXC9- <i>XbaI-p300AS-neo</i>	Zielvektor für die homologe Rekombination der CH12.LX B-Zellen; Neomycin-Resistenzgen wurde mit Hilfe eines <i>EcoRI-XbaI-EcoRI</i> -Linker und Restriktion mit <i>XbaI</i> aus pSEPT in pXXC9- <i>XbaI</i> kloniert

## 2.2.6 Plasmid zur Herstellung einer DNA-Sonde

pp300 <i>ecol</i>	enthält die p300-Sequenz für die DNA-Sonde zur Überprüfung der Rekombination; freundlicherweise von Werner Lutz zur Verfügung gestellt
-------------------	--

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primäre Antikörper

$\alpha$ -Acetyl-Lysin	polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der acetylierte Lysine der Proteine erkennt (Cell Signaling; #9441) Verdünnung 1:1.000 für Western Blot (WB)
$\alpha$ -CBP	polyklonaler Kaninchen-Antikörper; gegen den C-Terminus von CBP (Ratte, Maus, Mensch) gerichtet (Santa Cruz; C-20; #sc-583)

$\alpha$ -Cdk2	Verdünnung 1:500 für WB; 2 $\mu$ g für IP eingesetzt polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der Cdk2 aus dem Menschen und der Maus erkennt (Santa Cruz, #sc-163)
$\alpha$ -H2B	Verdünnung 1:2.000 für WB polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der Histon H2B aus dem Menschen, der Maus und der Ratte erkennt (Abcam, #ab1790)
$\alpha$ -H3	Verdünnung 1:1.000 für WB; 2 $\mu$ g für IP eingesetzt polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Histon H3 aus dem Menschen und der Maus (Abcam, #ab1791)
$\alpha$ -H3K18ac	Verdünnung 1:500 für WB; 2 $\mu$ g für IP eingesetzt polyklonales Kaninchen-Antiserum, das acetyliertes Lysin an der Position 18 von Histon H3 aus dem Menschen und der Hefe erkennt (Upstate, #07-354)
Kontrollserum Kaninchen	Verdünnung 1:500 für WB; 1 $\mu$ L für IP eingesetzt polyklonales Kaninchenserum IgG (Sigma, #I5006)
$\alpha$ -p300	2 $\mu$ g für IP eingesetzt polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den N-Terminus von p300 (Maus, Mensch, Ratte) gerichtet (Santa Cruz; N-15; #sc-584) Verdünnung 1:500 für WB; 2 $\mu$ g für IP eingesetzt

### 2.3.2 Sekundäre Antikörper

$\alpha$ -Kaninchen-HRP	$\alpha$ -Kaninchen-Immunglobulin aus dem Esel mit Meerrettich Peroxidase ( <u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase, HRP) gekoppelt (Amersham Biosciences) Verdünnung 1:3.000 für WB
-------------------------	--

### 2.3.3 Antikörper für Immunfluoreszenz

$\alpha$ -Maus-IgG	FITC-gekoppelter Immunglobulin (Fab'2)-Antikörper (Dianova; #115-096-006)
--------------------	---



### 2.3.4 Antikörper für ELISA

$\alpha$ -Maus Ig's	polyvalenter Immunglobulin-Antikörper (IgG, IgA, IgM) aus der Ziege, Peroxidase-konjugiert (Sigma; #A 0412)
$\alpha$ -Ovalbumin (OVA)-IgG	polyklonaler Antikörper, der Ovalbumin-spezifische Antikörper der Klasse IgG erkennt (Abcam; #ab1221)
$\alpha$ -Ovalbumin (OVA)-IgG2b	monoklonaler Antikörper, der Ovalbumin-spezifische Antikörper des Isotypes IgG2b erkennt (Abcam; #ab1221)

### 2.3.5 Antikörper für FACS

Folgende gegen Maus gerichtete Antikörper wurden für die FACS-Messungen eingesetzt: Klon RA3-6B2 ( $\alpha$ -CD45R), Klon B3B4 ( $\alpha$ -CD23), Klon 11-26c.2a ( $\alpha$ -IgD), Klon 7G6 ( $\alpha$ -CD21/CD35), Klon 17A2 ( $\alpha$ -CD3), Klon H1.2F3 ( $\alpha$ -CD69; alle von BD Pharmingen), Klon AA4.1 ( $\alpha$ -C1qRp; eBioscience), Klon 6D5 ( $\alpha$ -CD19; Immunotools, Friesoythe) und Klon 1B4B1 ( $\alpha$ -IgM; Southern Biotechnology Associates).

## 2.4 Chemikalien

Sofern nicht gesondert aufgeführt, wurden die Chemikalien in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma Aldrich (München), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Acros Organics (Geel, Belgien) und AppliChem (Heidelberg) verwendet. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad wurden von Sigma (Deisenhofen) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Agarose für präparative Zwecke	Sekam
Baktoagar	Difco
Baktotrypton	Difco

## 2.5 Medien

### 2.5.1 Medien für die Kultivierung von Bakterien

LB-Medium	50 g Baktotrypton
	25 g Hefeextrakt
	50 g NaCl
	in 5 L ddH <sub>2</sub> O

LBA-Medium:	100 µg/mL Ampicillin in LB-Medium
LB-Agar:	6 g Baktoagar in 500 mL LB-Medium

Das LB-Medium wurde in ddH<sub>2</sub>O angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

### 2.5.2 Medien für die Säugerzellkultur

Medien für die Säugerzellkultur wurden von der Firma Lonza und fötales Kälberserum (FCS) wurde von der Firma Sigma bezogen. Natriumpyruvat wurde von der Firma Gibco und Penicillin/Streptomycin von der Firma PAA bezogen.

Vollmedium:	10% (v/v) FCS, Hitze-inaktiviert (30 min, 56°C) 1% (v/v) Penicillin (10.000 U/mL)/Streptomycin (10 mg/mL) 50 µM 2-Mercaptoethanol in RPMI-1640
Einfriermedium:	70% (v/v) Vollmedium 20% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO

Vollmedium für primäre B-Zellen:	10% (v/v) FCS, Hitze-inaktiviert (30 min, 56°C) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 5% (v/v) Natriumpyruvat 50 µM 2-Mercaptoethanol in RPMI-1640
----------------------------------	---

### 2.6 Sterilisation von Lösungen und Equipment

Alle Lösungen wurden entweder im Autoklav (Biomedis Laborservice) Hitze-inaktiviert (120°C, 20 min) oder steril-filtriert (Porengröße der Membran: 0,2, 0,45 oder 0,7 µm). Plastikmaterialien wurden autoklaviert (120°C, 20 min). Die Glaswaren wurden durch Erhitzen auf 60°C oder 120°C über Nacht sterilisiert. Das Präparationsbesteck wurde mittels Ethanol gereinigt und durch Inkubation bei 160°C sterilisiert.

### 2.7 Puffer und Lösungen

1 kb DNA-Größenstandard:	50% (v/v) 1 kb DNA-Marker (1 µg/µL, Invitrogen) 33,3% (v/v) DNA-Ladepuffer 6x 66,7% (v/v) TE pH 8,0
--------------------------	---

ACK-Lysepuffer:	150 mM NH <sub>4</sub> Cl 1 M KHCO <sub>3</sub> 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA in ddH <sub>2</sub> O (steril-filtriert)
Blocklösung für Western Blot:	5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS-T
Bradford-Lösung:	10% (v/v) Phosphorsäure (85%) 4,75% (v/v) Ethanol abs. 10% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G in ddH <sub>2</sub> O
DEPC-Wasser:	0,1% (v/v) DEPC in ddH <sub>2</sub> O (über Nacht bei 37°C inkubiert)
DNA-Ladepuffer 6x:	40% (w/v) Saccharose 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylencyanol 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA in ddH <sub>2</sub> O
DNA-Lysepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM Na <sub>2</sub> EDTA 100 mM NaCl 0,5% (v/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O
Elutionspuffer (EB):	10 mM Tris-HCl, pH 8,5 bezogen von QIAGEN (RNase-frei)
Hybridisierungslösung:	500 mM Phosphatpuffer pH 7,2 7% (v/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O
IPH-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 5 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,5% (v/v) NP-40 in ddH <sub>2</sub> O
Luminol-Substratlösung:	100 mM Tris-HCl pH 8,5 1,25 mM Luminol (in DMSO)

---

	200 $\mu$ M p-Cumarinsäure (in DMSO)
	0,003% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% (v/v))
	in ddH <sub>2</sub> O
Lysepuffer I für ChIP:	5 mM PIPES pH 8,0
	85 mM KCl
	0,5% (v/v) NP-40
	in ddH <sub>2</sub> O
Lysepuffer II für ChIP (RIPA):	10 mM Tris-HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	1% (v/v) NP-40
	1% (w/v) DOC
	0,1% (v/v) SDS
	1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
	in ddH <sub>2</sub> O
NET-N 100:	10 mM Tris-HCl pH 8,0
	100 mM NaCl
	1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
	0,5% (v/v) NP-40
	in ddH <sub>2</sub> O
NET-N 250:	10 mM Tris-HCl pH 8,0
	250 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,5% (v/v) NP-40
	in ddH <sub>2</sub> O
PBS-Puffer:	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	in ddH <sub>2</sub> O
Sammelgel 4% (v/v):	650 $\mu$ L 30% (v/v) Acrylamid-Stammlösung
	1,2 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	3 mL ddH <sub>2</sub> O
	50 $\mu$ L 10% (w/v) SDS-Lösung
	50 $\mu$ L 10% (w/v) APS-Lösung

---

	5 µL TEMED
SDS-Ladepuffer 3x:	3,75 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 3 mL Glycerol 600 mg SDS 3 mg Bromphenolblau 1,5 mL β-Mercaptoethanol ad 10 mL ddH <sub>2</sub> O
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O
SSC 20x:	3 M NaCl 3 M NaCl in ddH <sub>2</sub> O (pH 7,0)
SSC 2x:	Verdünnung von SSC 20x mit ddH <sub>2</sub> O
STET-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 8% (w/v) Sucrose 50 mM EDTA 0,5% (v/v) Triton X-100 (frisch zugegeben) 500 µg/mL Lysozym (frisch zugegeben) in ddH <sub>2</sub> O
Stripp-Puffer für PVDF-Membran:	200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 1% (v/v) Tween-20 in ddH <sub>2</sub> O (pH 2,3 mit HCl eingestellt)
TAE-Puffer 50x:	2 M Tris-HCl pH 8,0 5,7% (v/v) Essigsäure 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA in ddH <sub>2</sub> O
TAE-Puffer 1x:	Verdünnung von TAE-Puffer 50x mit ddH <sub>2</sub> O
TBS-T:	25 mM Tris-HCl pH 7,4 140 mM NaCl 0,2% (v/v) Tween-20 in ddH <sub>2</sub> O

---

TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA in ddH <sub>2</sub> O
TNN-Lysepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,5 120 mM NaCl 5 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,5% (v/v) NP-40 10 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 100 mM NaF in ddH <sub>2</sub> O
Transferpuffer 10x:	112,9 g Glycin 30 g Tris-Base 30 mL 10% (w/v) SDS-Lösung ad 1000 mL ddH <sub>2</sub> O
Transferpuffer 1x:	10% (v/v) Transferpuffer 10x 15% (v/v) Methanol in ddH <sub>2</sub> O.
Trenngel 7,5% (v/v):	3,75 mL 30% (v/v) Acrylamid-Stammlösung 3,75 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 7,35 mL ddH <sub>2</sub> O 150 µL 10% (w/v) SDS-Lösung 150 µL 10% (w/v) APS-Lösung 15 µL TEMED
Trenngel 10% (v/v):	5,1 mL 30% (v/v) Acrylamid-Stammlösung 3,75 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 6 mL ddH <sub>2</sub> O 150 µL 10% (w/v) SDS-Lösung 150 µL 10% (w/v) APS-Lösung 15 µL TEMED
Trenngel 15% (v/v):	7,5 mL 30% (v/v) Acrylamid-Stammlösung 3,75 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 3,6 mL ddH <sub>2</sub> O 150 µL 10% (w/v) SDS-Lösung

	150 $\mu$ L 10% (w/v) APS-Lösung
	15 $\mu$ L TEMED
Triton-Extraktionspuffer:	0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS
Trypanblau-Lösung:	375 mg in 50 mL PBS (steril-filtriert)
Waschpuffer I für ChIP:	20 mM Tris-HCl pH 8,1 150 mM NaCl 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,1% (v/v) SDS 1% (v/v) Triton X-100 in ddH <sub>2</sub> O (filtriert)
Waschpuffer II für ChIP:	20 mM Tris pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,1% (v/v) SDS 1% (v/v) Triton X-100 in ddH <sub>2</sub> O (filtriert)
Waschpuffer III für ChIP:	10 mM Tris pH 8,1 0,25 M LiCl 1% (v/v) NP-40 1% (w/v) Natriumdeoxycholat 1 mM EDTA in ddH <sub>2</sub> O (filtriert)
Waschlösung für Hybridisierung:	40 mM Phosphatpuffer pH 7,2 1% (v/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O

## 2.8 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt und Kimberly-Clark bezogen. Dazu zählten unter anderem Reaktionsgefäße der verschiedenen Größen, Zellkulturflaschen, 96-well-, 24-well- bzw. 6-well-Zellkulturplatten, Papierfilter und Einwegspritzen.

## 2.9 Geräte, Membranen und Filme

Begasungsbrutschrank:	BBD 6220, Heraeus
Blotkammer:	SD Apparatur, Harnischmacher
Brutschrank:	BBD 6220, Heraeus
Durchflusszytometer:	FACSCalibur, BD Biosciences
Elektroporationsgerät:	GenePulser X cell™, Bio-Rad
ELISA-Reader:	Spectra Max 340, MWG-Biotech
Entwicklermaschine:	X-OMAT 2000 Processor, Kodak
Filterpapiere:	3 MM Whatman®, Schleicher und Schuell Dickere Filterpapiere, Bio-Rad
Glasfaserfilter:	GF/A Whatman®, Schleicher und Schuell
Mikroskop:	Axiovert25, Zeiss
Nylonmembran:	Hybond™-N <sup>+</sup> , GE Healthcare
PCR-Geräte:	Primus 96 plus, MWG AG Biotech
Photometer:	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer
PVDF-Membran:	Immobilon-P, PVDF Transfer Membran, Millipore
qPCR-Geräte:	AbiPrism, 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems Mx 3000P™, Stratagene
Röhrenrotor:	400 BE-HY; Bachofer GmbH
Röntgenfilme:	ECL Hyperfilm, Amersham Medical X-Ray Film, Fuji
Schüttelinkubatoren:	Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc
SDS-Gelgießstand:	Minigel, Bio-Rad
SDS-Gelapparatur:	Minigel, Bio-Rad
Sonifier:	W-250 D; G. Heinemann
Spannungsquellen:	Power Pac 200, 300 oder 1000, Bio-Rad
Sterilarbeitsbank:	HeraSafe, Heraeus
Scintillationszähler:	LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Beckman Coulter
UV-Leuchttisch:	Transilluminator, Bio-Rad
Zentrifugen:	Sorvall® RC-5B DuPont Instruments Zentrifuge 5417R, Eppendorf Megafuge 1.0R, Heraeus



## 3 METHODEN

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und deren Vermehrung

Die zu transformierende Plasmid-DNA (1-2 µg) bzw. der gesamte Ligationsansatz (siehe 3.1.8) wurde mit 100 µL kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) des Stammes DH5a gemischt (Ausubel *et al.*, 1994). Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wurde die DNA mittels Hitzeschock (90 s, 42°C) in die Zellen eingebracht. Der Ansatz wurde dann für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde dem Ansatz 1 mL LB-Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für mindestens 45-90 min bei 37°C geschüttelt. Sofern die Transformation der reinen Vervielfältigung des Plasmides diene, wurde der gesamte Ansatz in einen 2-L-Kolben mit 400 mL LBA-Medium für eine anschließende Plasmidpräparation (siehe 3.1.2) überführt. Bei Transformation eines Ligationsansatzes in die Bakterien wurden die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert. Danach wurde ca. 90% des Überstandes abgenommen und das Pellet in dem verbliebenen LB-Medium resuspendiert. Die somit ankonzentrierten *E. coli*-Bakterien wurden auf einer LBA-Agarplatte mit Drigalskispatel ausplattiert. Anschließend erfolgte die Vermehrung der *E. coli*-Bakterien durch Inkubation über Nacht (12-16 h) bei 37°C. Im Fall der 2-L-Kolben wurde dies unter Schütteln und bei LBA-Agarplatten im Brutschrank durchgeführt. Bakterienkolonien, die am nächsten Tag auf der LBA-Agarplatte wuchsen, wurden in ein Reagenzglas mit 5 mL LBA-Medium überführt und für eine weitere Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

#### 3.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

Nach Vermehrung der transformierten Bakterien in einer 400 mL Flüssigkultur wurde eine Plasmid-Präparation gemäß den Angaben des Herstellers (JETSTAR 2.0 *Plasmid Purification Maxi Kit*, Genomed, Löhne) durchgeführt. Das am Ende erhaltene DNA-Pellet wurde in TE-Puffer gelöst, auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt und bei -20°C gelagert.

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus einer 5-mL-Flüssigkultur (Mini-Präparation) wurden 1,5 mL dieser in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 2.500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 110 µL STET-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde anschließend für 5 min bei Raumtemperatur und für 1 min bei 95°C inkubiert. Danach wurde sie für 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Zu der zurückgebliebenen Lösung wurden 110 µL Isopropanol

gegeben und der Ansatz gut gemischt. Nach einer Zentrifugation der Probe für 5 min bei 18.000 x g und 4°C wurde das erhaltene Pellet mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und die Plasmid-DNA in 25 µL TE-Puffer gelöst.

### 3.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben und Zellkulturzellen

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben (Laird *et al.*, 1991) wurden 1-2 cm des abgeschnittenen Schwanzes der Maus in 750 µL DNA-Lysepuffer zusammen mit 50 µL Proteinase K (10 µg/µL, Roche) aufgenommen und über Nacht bei 55°C inkubiert. Im Fall der Isolierung von genomischer DNA aus ca. 10<sup>6</sup> Zellkulturzellen wurden 500 µL DNA-Lysepuffer und 5 µL Proteinase K eingesetzt. Zu dem Gewebe- bzw. Zelllysat wurde eine gleiche Volumeneinheit an PCI gegeben. Die Probe wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 5 min bei 18.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Transferieren der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die DNA durch Zugabe von einem gleichen Volumen an Isopropanol und anschließender Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) präzipitiert. Das Pellet wurde mit 500 µL 70% (v/v) Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert (5 min, 18.000 x g, 4°C). Danach wurde das Pellet durch Zugabe von 100-200 µL ddH<sub>2</sub>O und anschließender Inkubation für 10-20 min bei 60°C gelöst. Die genomische DNA wurde bei 4°C aufbewahrt.

### 3.1.4 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

Die Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen sowie die Entfernung von Verunreinigungen der Nukleinsäuren mit Proteinen erfolgten durch Zugabe eines gleichen Volumens eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (PCI; 25:24:1). Sofern das Volumen der Probe unter 100 µL lag, wurde es auf mindestens 100 µL mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Emulsion wurde nach dem Vortexen für 5 min bei 18.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäure wurde durch Zugabe von Natriumacetat (Endkonzentration 0,3 M) und 2,6 Volumeneinheiten Ethanol abs. präzipitiert. Dann wurde die Probe durch Vortexen kurz gemischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 18.000 x g, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol versetzt und die Probe zentrifugiert (5 min, 18.000 x g, 4°C). Zum Schluss wurde der Überstand verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen sterilem RNase-freiem Wasser oder TE-Puffer gelöst.

### 3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Analyse und Trennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese mit Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid durchgeführt (Sharp *et al.*, 1973). Bei der Gelelektrophorese werden die negativ geladenen Makromoleküle, in diesem Fall die DNA-Fragmente, in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Mobilität, die proportional zum Ladungs-Massen-Verhältnis der Makromoleküle ist, separiert.

Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurde eine Lösung aus 1-2% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C wurde sie mit 20 µL/L einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/mL) versetzt und in einen Gelträger mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Dann wurde die zu analysierende DNA- bzw. cDNA-Lösung mit einem Fünftel des Volumens 6x DNA-Ladepuffer und die Probe in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei Anlegen einer Spannung von 120 V für 30-60 min. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm (Kemp *et al.*, 1989). Die DNA-Banden im Gel wurden auf einem UV-Leuchttisch visualisiert und anhand eines 1 kb DNA-Größenstandards ihre Größe bestimmt bzw. kontrolliert.

### 3.1.6 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Zur Reinigung eines DNA-Fragments mit bestimmter Größe wurde die gelelektrophoretische Auftrennung (siehe 3.1.5) genutzt. Diese Auftrennung erfolgte solange bis das gewünschte DNA-Fragment deutlich von den anderen separiert wurde. Danach wurde das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe eines Gelextraktionskits (*Gele Extraction Kit*, QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt.

### 3.1.7 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA

Eine sequenzspezifische Hydrolyse der DNA (Restriktionsanalyse) erfolgt durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen. Dies sind bakterielle Enzyme, die DNA sequenzspezifisch an Palindromen schneiden. Dafür wurde die zu schneidende DNA-Menge mit den vom Hersteller empfohlenen Einheiten an Restriktionsendonukleasen (Invitrogen oder Fermentas) und mit dem für das Enzym entsprechenden Reaktionspuffer zusammengegeben. Nach einer Inkubation für 3-12 h bei 37°C wurde die Hydrolyse gelelektrophoretisch analysiert (siehe 3.1.5).

Restriktionsansatz:           5-50 µg DNA  
                                   x Einheiten Restriktionsendonuklease  
                                   1/10 Vol. Reaktionspuffer (10x)  
                                   ad 10-100 µL ddH<sub>2</sub>O.

Sofern eine analytische Hydrolyse der Plasmid-DNA von einer Mini-Präparation erfolgte, wurde dem Ansatz zusätzlich 10 µg RNase A (10 µg/µL, Roche) zugesetzt.

### 3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Ligation) wurden 50-100 ng des linearisierten Plasmids und ein 10-facher molarer Überschuss an Insert (zu inserierendes DNA-Fragment) zusammengegeben. Dem Ligationsansatz wurde die T4-DNA-Ligase mit dem entsprechenden Ligasepuffer zugesetzt. Dieser wurde anschließend für 12-16 h bei 16°C inkubiert.

Ligationsansatz:           50-100 ng linearisiertes Plasmid  
                                   x ng Insert-DNA  
                                   1 µL T4-DNA-Ligasepuffer (10x, Fermentas)  
                                   1 µL T4-DNA-Ligase (Fermentas)  
                                   ad 10 µL ddH<sub>2</sub>O.

### 3.1.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ist eine sensitive Methode zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes (Saiki *et al.*, 1988). Dabei katalysiert die hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) die Synthese des neuen, komplementären DNA-Stranges ausgehend von einem Oligonukleotid (Primer) in 5'-3'-Richtung mittels Primer-Extensions-Reaktion bis zum anderen Primer. Diese Methode wurde zur Genotypisierung der Maus-DNA und zur Überprüfung der Rekombination des Plasmides eingesetzt. Des Weiteren wurde die PCR in dieser Arbeit zur Quantifizierung der eingesetzten cDNA, die aus proportionalen Mengen an RNA eines speziellen Gens synthetisiert wurde, verwendet (siehe 3.1.12). Die PCR-Reaktionsmischung wurde für alle Proben angesetzt und aufgeteilt. Dann wurde zu jedem Ansatz 1 µL der genomischen DNA gegeben und die PCR mit folgendem Programm je nach Primer und Reaktionsprodukt im PCR-Gerät gestartet:

1 Zyklus       95°C für 4 min

30-36 Zyklen 95°C für 1 min

54-60°C für 45 s - 1 min (je nach Schmelztemperatur der Primer)

72°C für 1 min pro kb PCR-Produkt

1 Zyklus 72°C für 10 min

Die PCR-Proben wurden nach der PCR für die Analyse der Genotypen gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.1.5).

PCR-Reaktionsmischung: 5 µL RedTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase-Puffer (10x, Sigma)  
 2 µL Primermix (forward und reverse, je 10 pmol/µL)  
 1 µL dNTPs (10 mM, Roth)  
 1 µL RedTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Sigma)  
 ad 49 µL ddH<sub>2</sub>O.

### 3.1.10 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA von Zellen wurde mittels TRIzol<sup>®</sup> Reagenz (Invitrogen) isoliert. Dafür wurden die Zellen zunächst in kaltem PBS-Puffer aufgenommen und durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 500 x g pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 0,5 oder 1 mL TRIzol<sup>®</sup> (entsprechend der Zellzahl: 10<sup>6</sup> bzw. 10<sup>7</sup> Zellen) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µL Chloroform hinzugegeben und die Probe durch 15-sekündigem Vortexen gemischt. Danach folgten eine Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 10 min bei 18.000 x g und 4°C. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zum Präzipitieren der RNA mit 500 µL Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubation für mindestens 30 min bei -20°C wurde die Probe für 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75% (w/v) Ethanol in DEPC-Wasser versetzt und erneut zentrifugiert (5 min, 18.000 x g, 4°C). Nach dem Trocknen des Pellets wurde es in bis zu 30 µL DEPC-Wasser gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### 3.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können durch das gemittelte Extinktionsmaximum der heterozyklischen Basen bei 260 nm und dem Lambert-Beer'schen-Gesetz photometrisch quantifiziert werden. Das Gesetz beschreibt die Extinktion (E) als Funktion des molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), der molaren Konzentration (c) und der Schichtdicke der absorbierenden Flüssigkeit (d):  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ . Der Zusammenhang kann durch Näherungen für die Massenkonzentration von Nukleinsäuren vereinfacht werden. Eine Extinktion von 1 bei einer

Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht daher einer Konzentration von 50 µg/mL für dsDNA, 33 µg/mL für ssDNA und 40 µg/mL für RNA (Ausubel *et al.*, 1994). Dieser Unterschied beruht auf der höheren Extinktion ungepaarter Nukleinsäuren im Vergleich zu doppelsträngigen Nukleinsäuren und wird als Hyperchromie bezeichnet.

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben wurde mittels NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Zur Berechnung wurde die Absorption von 1 µL einer Probe bei 260 nm verwendet. Des Weiteren wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dieses sollte für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen. Ein geringerer Wert deutet auf eine Kontamination der Lösung mit Proteinen oder Phenol hin (Ausubel *et al.*, 1994). Diese wurde durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation beseitigt (siehe 3.1.4).

### 3.1.12 cDNA-Synthese mit anschließender PCR (RT-PCR)

Bei der Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) wird zunächst die isolierte RNA in eine DNA-Kopie (*copy DNA*, cDNA) umgeschrieben (Reverse Transkription). Die RNA dient dabei dem Enzym Reverse Transkriptase als Matrize. Danach wird die erhaltene cDNA bestimmter Gene mittels PCR amplifiziert. Diese Methode wird zur Bestimmung der Expression von Genen in verschiedenen Geweben eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurden 0,2-2 µg Gesamt-RNA in 10 µL DEPC-Wasser vorgelegt. Durch Inkubation der Probe für 1 min bei 65°C und anschließendem sofortigen Abkühlen auf Eis wurden Sekundärstrukturen aufgelöst. Danach wurde die Probe mit der Reaktionsmischung versetzt und, wie folgt, inkubiert:

Raumtemperatur für 10 min

37°C für 50 min

70°C für 15 min (Inaktivierung der Reversen Transkriptase).

Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Reaktionsmischung:

- 10 µL „First Strand Buffer“ (5x, Invitrogen)
- 5 µL DTT (0,1 M, Invitrogen)
- 5 µL dNTPs (2,5 mM, Roth)
- 2 µL Random Primer p(dN)<sub>6</sub> (2 mg/mL, Roche)
- 0,2 µL RNasin® Plus (Promega)
- 1 µL Reverse Transkriptase M-MLV (200 U/µL, Invitrogen)
- ad 40 µL DEPC-Wasser.

### 3.1.12.1 Semiquantitative RT-PCR

Die PCR-Reaktionsmischung wurde zunächst für alle Proben angesetzt und aufgeteilt (siehe 3.1.9). Dabei wurde der RedTaq<sup>®</sup>-Reaktionspuffer in zweifacher Konzentration eingesetzt und pro Reaktion 2,5 µL DMSO zur besseren Effizienz der Primerbindung hinzugegeben. Danach wurde zu jedem Ansatz 1 µL der cDNA gegeben und die PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

1 Zyklus      95°C für 4 min  
25-33 Zyklen 95°C für 45 s  
                 58-60°C für 45 s  
                 72°C für 1:30 min  
1 Zyklus      72°C für 5 min

Bei der semiquantitativen RT-PCR wurde die exponentielle Amplifikation vor Erreichen des Plateaus des Produkts unterbrochen. Anschließend wurden gleiche Volumina der PCR-Proben mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe 3.1.5). Der Einsatz gleicher Mengen RNA für die cDNA-Synthese wurde durch die Amplifikation des ribosomalen Gens *Rps16* überprüft. Die Stärke der DNA-Banden im Agarosegel lieferte Rückschlüsse über die ursprünglich eingesetzte mRNA-Menge eines Gens im Vergleich zwischen zwei Proben.

### 3.1.12.2 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR, Real time-PCR)

Für quantitative PCRs (qPCRs) nach einer Reversen Transkription (siehe 3.1.12; qRT-PCR) und nach einer Chromatin-Immunpräzipitation (siehe 3.3.9) wurde das *qPCR Core kit for SYBR<sup>®</sup> Green I* von Eurogentec verwendet. Die PCR-Reaktionsmischung wurde vorgelegt und dann 1 µL cDNA zugegeben. Durch *SYBR<sup>®</sup> Green* konnten die amplifizierten DNA-Fragmente im qPCR-Gerät detektiert werden. Das verwendete PCR-Programm enthielt folgende Inkubationsschritte:

1 Zyklus      95°C für 10 min  
40 Zyklen    95°C für 15 s  
                 60°C für 1 min

Die Quantifizierung erfolgte entsprechend der relativen  $\Delta\Delta C_t$  Quantifizierungsmethode (Applied Biosystems User Bulletin #2), wobei das ribosomale Gen *Rps16* der Maus als Referenz verwendet wurde. Die PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Für die Triplikate wurde anschließend die Standardabweichung nach dem Gauss'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet.

PCR-Reaktionsmischung: 2,5 µL Reaktionspuffer (10x, Eurogentec)  
1,75 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Eurogentec)  
1 µL dNTPs (5 mM, Eurogentec)  
1 µL Primermix (forward und revers, je 10 pmol/µL)  
0,75 µL SYBR<sup>®</sup> Green-Lösung (Eurogentec)  
0,125 µL Hot Goldstar Enzym (Eurogentec)  
ad 25 µL DEPC-Wasser.

### 3.1.13 cDNA-Microarray

Für den cDNA-Microarray wurde die Gesamt-RNA aus 100.000 mittels FACS sortierten B-Zellen der Milz isoliert. Jeweils 600 ng der Gesamt-RNA wurden mit dem *Message Amp II aRNA* Kit (Ambion) nach Anweisung des Herstellers amplifiziert. Danach wurden 3 µg der amplifizierten RNA (aRNA) mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 nach Anweisung des Herstellers markiert (*CyScribe Post-Labeling* Kit, Amersham Biosciences). Die Durchführung wurde detailliert in Berwanger *et al.*, 2002 beschrieben. Die fluoreszierenden aRNA-Proben wurden gereinigt, kurz bei 95°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen, und über Nacht bei 55°C zwischen zwei hauseigen hergestellten cDNA-Microarray-Objektträgern gegeben (Sandwich). Auf diesen Objektträgern befanden sich 21.000 einzelsträngige, sequenzverifizierte, murine cDNAs (VanBuren *et al.*, 2002; Kargul *et al.*, 2001), die mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben hybridisierten. Jede Probe wurde einmal mit Cy3 und einmal mit Cy5 markiert, um letztendlich 4 Datensätze vergleichen zu können. Nach dem Waschen der Objektträger wurden die Daten eingelesen und ausgewertet.

### 3.1.14 *Random-Prime*-Methode zur Herstellung von <sup>32</sup>P-radiativ-markierter DNA

Für die radioaktive Markierung der DNA-Sonde wurde das *Prime-It<sup>®</sup> II Random Primer Labeling* Kit (Stratagene) verwendet (Denhardt, 1966; Feinberg and Vogelstein, 1989). Diese Methode basiert auf dem *Random-Priming*-Prinzip, bei dem beliebige (random) Hexanukleotide an zahlreiche Stellen entlang des DNA-Fragmentes binden (Feinberg and Vogelstein, 1989). Danach werden die gebundenen Primer vom Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I erkannt und in 5'-3'-Richtung vervollständigt. Durch Zugabe von radioaktiv-markiertem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP wird die neu synthetisierte DNA radioaktiv markiert. Zuerst wurden 25 ng der Sonden-DNA zusammen mit 10 µL Random-Oligonukleotid-Primern in einem Volumen von 34 µL 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die



Probe sofort bei Raumtemperatur kurz zentrifugiert. Dann wurden dem Ansatz 10 µL des 5x Puffers (enthält 0,1 mM dATP, dGTP und dTTP), 5 µL [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (3.000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) und 1 µL Klenow-Fragment (5 U/µL) zugegeben. Die Markierungsreaktion erfolgte durch Inkubation der Mischung für 10 min bei 37°C. Danach wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 2 µL Stopplösung (0,5 M EDTA) angehalten. Zum Denaturieren der synthetisierten DNA-Sonde wurde die Probe 5 min bei 95°C inkubiert.

### 3.1.15 Southern Blot

Im Southern Blot wird denaturierte DNA aus einem Agarosegel unter Ausnutzen der Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran transferiert (Southern, 1975; Ausubel *et al.*, 1992). Nach dem Auftrennen von 20 µg geschnittener, genomischer DNA mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.5) wurde das Gel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert. Dadurch wurden die glykolytischen Bindungen der DNA hydrolysiert (Depurinierung). Währenddessen wurde ein auf das Gel zugeschnittenes Stück Nylonmembran kurz in ddH<sub>2</sub>O und anschließend zusammen mit dem Gel für mindestens 5 min in Alkali-Transferpuffer (400 mM NaOH) äquilibriert. Parallel wurde eine Schale mit Alkali-Transferpuffer gefüllt. Auf die Schale wurde eine Glasplatte gelegt. Über die Glasplatte wurde ein in Alkali-Transferpuffer getränktes Stück Filterpapier so gelegt, dass es an zwei gegenüberliegenden Seiten im Puffer der Schale lag. Das Gel wurde luftblasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Danach wurde auf das Gel von unten nach oben folgende Schichtung aufgebaut: Nylonmembran (luftblasenfrei); 2 in Alkali-Transferpuffer angefeuchtete Filterpapiere (luftblasenfrei); ein Stapel Papierhandtücher und eine weitere Glasplatte. Parafilmstücke wurden direkt an den Rand des Geles platziert, um Verdunstung und Kurzschluss zu verhindern. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Dann wurde der Blot auseinander gebaut und die Nylonmembran zur Neutralisierung zweimal für je 15 min unter Schwenken in 2x SSC gewaschen. Anschließend wurde der Filter zur Hybridisierung eingesetzt (siehe 3.1.16).

### 3.1.16 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Zur Hybridisierung der Membran wird diese nach einem Southern Blot mit einer spezifischen, radioaktiv-markierten DNA-Sonde inkubiert (Denhardt, 1966). Bei Vorhandensein der komplementären DNA-Sequenz auf der Membran lagert sich die Sonde an diese Sequenz an (Hybridisierung) und kann anschließend mit einer Autoradiographie detektiert werden. Die Nylonmembran wurde nach dem Southern Blot (siehe 3.1.15) mit

der Nukleinsäure-haltigen Seite nach innen in einer Hybridisierungsröhre mit 20 mL Hybridisierungslösung für mindestens 1 h bei 68°C unter Drehen prähybridisiert. Die radioaktiv-markierte DNA-Sonde (siehe 3.1.14) wurde kurz vor Gebrauch 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Danach wurde die Hybridisierungslösung bis auf 5 mL aus der Hybridisierungsröhre entfernt. Die denaturierte DNA-Sonde wurde zur verbleibenden Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 68°C unter Drehen hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen oder für einen erneuten Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Dann wurde die Membran in der Hybridisierungsröhre zweimal in je 10 mL einer 68°C-warmen Waschlösung für je 5 min bei 68°C unter Drehen inkubiert. Anschließend folgten vier Waschschriffe für jeweils 30 min bei 68°C unter Drehen in je ca. 50 mL Waschlösung. Die Nylonmembran wurde nun in Folie eingeschweißt, in eine Filmkassette gelegt und ein Röntgenfilm zur Autoradiografie aufgelegt (siehe 3.3.6).

### **3.2 Zellbiologische Methoden**

Die Zellen wurden während der Kultivierung bzw. den Versuchen stets in einem Inkubator (Begasungsbrutschrank) bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> angezogen.

#### **3.2.1 Auftauen von Zellen**

Die gefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen eines Einfriergefäßes wurden in 10 mL kaltem Medium überführt und für 5 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben.

#### **3.2.2 Passagieren von Zellen**

Während der Kultivierung proliferierten die verwendeten Suspensionszellen. Sie setzten sich am Boden der Zellkulturflaschen ab. War der Boden nahezu vollständig mit Zellen bedeckt, wurden die Zellen auf mehrere neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Dafür wurde ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension mit neuem Vollmedium versetzt und in eine Zellkulturflasche überführt. In die 50-mL-Zellkulturflasche wurden insgesamt 6 mL Medium und in die 200-mL-Zellkulturflasche 20 mL Medium gegeben. Die Anzahl der Zellen, die jeweils passagiert oder für einen Versuch kultiviert wurden, richtete sich nach der Proliferationszeit und Zelldichte der zu passagierenden Zellen.

### 3.2.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden für 5 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen Einfriermedium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Einfriergefäße von je 1 mL verteilt. Die Einfriergefäße wurden zunächst für 20 min auf Eis und dann für 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen bis zu mehrere Wochen bei -80°C gelagert. Für eine langfristige Lagerung wurden die Einfriergefäße in einen Tank mit flüssigem Stickstoff gestellt.

### 3.2.4 Trypanblaufärbung von Zellen

Zur Kontrolle der Anzahl von lebenden Zellen wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff und als Anion bindet er an Zellproteine. Bei toten Zellen gelangt Trypanblau durch die defekten Zellmembranen in das Zytoplasma und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop dagegen leuchtend hell. Für die Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurden 20 µL einer 1:1-Mischung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung angesetzt. Diese wurden auf eine Neubauer-Zählkammer mit Deckgläschen gegeben. Anschließend wurden die lebenden Zellen ausgezählt und die Zellzahl nach den Angaben der Zählkammer bestimmt:  $X$  in Zellen pro mL = Anzahl Zellen pro Großquadrat x 10.000.

### 3.2.5 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen mittels Elektroporation

Für die Transfektion von B-Zellen wurde die Elektroporation gewählt. Dabei erzeugen die Pulse eines sich entladenden Kondensators kurzzeitig ein elektrisches Feld, das die Zellmembran vorübergehend ohne Zerstören der Membranstruktur permeabilisiert. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen. Bei einer stabilen Transfektion wird eine längerfristige Integrierung (stabile) der Plasmid-DNA in die genomische DNA der Empfängerzelle hervorgerufen. Dazu werden Plasmide verwendet, die zusätzlich ein Antibiotika-Resistenzgen besitzen. Bei einer Behandlung mit dem Antibiotikum überleben nur die Zellen, die die Plasmid-DNA und somit das Resistenzgen integriert haben. Im Gegensatz dazu wird bei einer transienten Transfektion nur eine kurzzeitige Expression des Vektors hervorgerufen. Dies erfolgt ohne Selektion auf eine Antibiotika-Resistenz.

Die zu transfizierenden Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und nach einer Zentrifugation (5 min, 150 x g, 4°C) in RPMI-1640-Medium ohne jegliche Zusätze aufgenommen. Dabei wurden sie auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/mL eingestellt.

Danach wurden sie durch Zentrifugation für 5 min bei 150 x g und 4°C pelletiert, um Reste von Antibiotika zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 400 µL pro 10<sup>7</sup> Zellen RPMI-1640 mit 5 mM Glutathion aufgenommen. Es wurden jeweils 400 µL der Zellsuspension in eine 4 mm dicke Elektroporationsküvette (Peqlab) überführt. Diese wurden mit 10 µg des mit *NotI*-linearisierten pXXC9-*XbaI*-*p300AS-neo* Vektors versetzt. Danach folgte die Elektroporation mit einem *Square Wave* Protokoll und einem Puls für 30 ms bei 220 V im Elektroporationsgerät. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension einer Küvette in 10 mL Vollmedium mit 15% (v/v) FCS aufgenommen und in eine 50 mL-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden über Nacht im Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Zahl der lebenden Zellen mittels Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach einer Zentrifugation der Zellen (5 min, 150 x g, 4°C) wurde die Zellzahl auf 100.000 lebende Zellen/mL in Vollmedium mit 10% (v/v) FCS und 400 ng/mL G418 sowie 0,2 µM FIAU (Moravek Biochemicals) eingestellt. Das G418 diente der Selektion auf Neomycin, da es ein Derivat von Neomycin ist. FIAU diente der Negativ-Selektion der Zellen auf Expression des mutierten *p300AS-neo*, da durch die homologe Rekombination das Thymidinkinase-Gen exprimiert werden sollte. Die Zellsuspension wurde in wells von 24-well-Zellkulturplatten zu je 1 mL aufgeteilt und im Begasungsbrutschrank kultiviert.

Die eingesetzte Konzentration der Zellen sollte ein Heranwachsen von maximal 1 positiven Klon in einem well ermöglichen. Bei einem Einzelklon entstammen alle Zellen aus einer einzelnen Mutterzelle, die die Selektion überlebt und dann Zellteilung die Tochterzellen hervorbrachte. Jeden 4. Tag wurden 500 µL Vollmedium mit G418 und FIAU dazugegeben. Sofern das Medium im well einen Grenzwert von 2-2,5 mL erreicht hatte, wurde es vorsichtig bis auf ca. 1 mL abgesaugt und danach 500 µL neues Vollmedium mit G418 und FIAU hinzugegeben. Wenn in einem well ausreichend Zellen waren, um den Boden fast zu bedecken, wurden die Zellen im Medium auf eine 6-well-Zellkulturplatte mit mindestens 3 mL Medium überführt und dort weiter kultiviert. Bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte wurden die Zellen in 50-mL-Zellkulturflaschen überführt und für die weiteren Versuche kultiviert.

Die transiente Transfektion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben. Hierfür wurde jedoch kein linearisierter Vektor, sondern direkt das Ausgangsplasmid pPGK cre, auf dem die konstitutiv-aktive Cre-Rekombinase enthalten ist, eingesetzt. In diesem Fall wurden die Zellen am nächsten Tag nach der Elektroporation auf eine Zahl von 1 lebende Zelle/200 µL Vollmedium eingestellt, da keine Selektion möglich war.

Diese wurden dann zu je 200  $\mu\text{L}$  in wells von 96-well-Zellkulturplatten verteilt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage durch vorsichtiges Absaugen des Mediums bis auf wenige Mikroliter und Zugabe von neuem Vollmedium. Das Kultivieren von Klonen wurde, wie oben beschrieben, bis zur weiteren Verarbeitung der Zellen durchgeführt. Zum Testen der Neomycin-Sensitivität wurden die angezogenen Zellen parallel in G418-haltigem (400 ng/mL) Vollmedium in 24-well-Zellkulturplatten kultiviert.

### 3.2.6 Aktivierung von primären B-Zellen

Die mittels magnetischer Depletion isolierten primären, naiven B-Zellen einer Milz (siehe 3.3.11) wurden in RPMI-Medium (Vollmedium für primäre B-Zellen) auf eine Zellzahl von  $10^6$  Zellen/mL eingestellt. Es wurden in eine entsprechende Anzahl an wells einer 96-well Zellkulturplatte mit rundem Boden 100  $\mu\text{L}$  RPMI-Medium mit der entsprechenden Menge der folgenden Reagenzien je nach Experiment vorgelegt: 20  $\mu\text{g/mL}$  Lipopolysaccharid; 5-40  $\mu\text{g/mL}$   $\alpha$ -IgM (Jackson ImmunoResearch); 2 ng/mL Interleukin-4 (R&D Systems); 10  $\mu\text{g/mL}$   $\alpha$ -CD40 (BD Pharmingen) oder 500  $\mu\text{M}$  der Oligodesoxynukleotide (ODNs, freundlicherweise von Stefan Bauer, Marburg, zur Verfügung gestellt). Bei Doppelstimulation der Zellen mit  $\alpha$ -IgM und einem weiteren Reagenz wurden 10  $\mu\text{g/mL}$   $\alpha$ -IgM eingesetzt. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension gegeben, die somit durch die Reagenzien *in vitro* zur Proliferation angeregt worden sind. Als Negativkontrolle erfolgte die Zellkultivierung ohne Zugabe von Stimulantien. Die Zellen wurden für 24 h (im Fall der ODNs) oder 48 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C kultiviert.

Für die Messung der Proliferation wurden die Zellen für jede Bedingung in Triplikaten ausplattiert. Im Fall der Messung der Apoptose wurden die Zellen in der entsprechenden Zellzahl ( $10^5$  Zellen/mL) in 6-well-Zellkulturplatten zu je 3 mL angezogen. Für die Messung der TGF- $\beta$ -vermittelten Signaltransduktion wurden die Zellen für 6 h mit 1 ng/mL TGF- $\beta$  stimuliert.

### 3.2.7 Nachweis der Proliferation mittels Einbau von radioaktiv-markiertem $^3\text{H}$ -Thymidin

Die Proliferation von Zellen kann durch den Einbau eines radioaktiv-markierten Nukleotides in die neu synthetisierte DNA der Zellen während der S-Phase gemessen werden. Dafür wurde 24 oder 48 h nach Stimulation der primären, naiven B-Zellen im Begasungsbrutschrank (siehe 3.2.6) in jedes well für weitere 12 h (im Fall der ODNs) oder

16 h 1  $\mu\text{L}$  radioaktiv-markiertes  $^3\text{H}$ -Thymidin (25 Ci/mmol; Amersham Biosciences) gegeben. Dabei wurde stets ein well ohne  $^3\text{H}$ -Thymidin als Negativkontrolle belassen. Nach der Inkubation wurden 10  $\mu\text{L}$  vom Überstand jedes wells abgenommen und die Szintillation gemessen (siehe 3.3.16). Somit wurde sichergestellt, dass in jedem well die gleiche Menge Radioaktivität enthalten war. Die restliche Zellsuspension von jedem well wurde vorsichtig im verbleibenden Volumen resuspendiert und auf je einen Glasfaserfilter gegeben, der anschließend luftgetrocknet wurde. Um das nicht eingebaute  $^3\text{H}$ -Thymidin zu entfernen, wurde der Glasfaserfilter nacheinander für je 2 min in folgende, eiskalte Lösungen gründlich gewaschen: 10% (v/v) Trichloressigsäure; zweimal 5% (v/v) Trichloressigsäure; Ethanol abs. und zweimal 70% (v/v) Ethanol. Dadurch wurde das überschüssige  $^3\text{H}$ -Thymidin präzipitiert und vom Glasfaserfilter entfernt. Anschließend wurde der Glasfaserfilter luftgetrocknet und der Einbau von radioaktiv-markiertem  $^3\text{H}$ -Thymidin durch eine Szintillationsmessung des Glasfaserfilters (siehe 3.3.16) bestimmt.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellen von Proteinlysaten für Western Blot

Die Zellen wurden zunächst in 1 mL kaltem PBS-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen (30-200  $\mu\text{L}$ ) TNN-Lysepuffer mit frisch zugesetzten Proteinaseinhibitoren (1:1.000 einsetzen; *Protease inhibitor cocktail*, Sigma) resuspendiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Bei Bedarf wurden dem TNN-Lysepuffer HDAC-Inhibitoren zugesetzt: 20  $\mu\text{L}$  Nicotinamid (500 mM), 5  $\mu\text{L}$  Natriumbutyrat (1 M) und 0,5  $\mu\text{L}$  Trichostatin A (0,2 mg/mL). Durch Einfrieren bei -80°C für 15 min und Auftauen auf Eis wurden die Zellen aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 18.000 x g und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Konzentration nach Bradford bestimmt (siehe 3.3.3) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 3.3.2 Histonextraktion für Western Blot

Für eine Isolierung der Histone von Zellen wurde eine saure Extraktion verwendet. Dabei wurde das in PBS-Puffer gewaschene Zellpellet in 50  $\mu\text{L}$  Triton-Extraktionspuffer mit frisch zugesetzten Proteinaseinhibitoren (1:1.000 einsetzen; *Protease inhibitor cocktail*, Sigma) resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension zur Lyse der Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde 10 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet, das die Zellkerne enthielt, wurde in 25  $\mu\text{L}$  Triton-

Extraktionspuffer aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 500 x g, 4°C) wurde das Pellet zum Aufbrechen der Zellkerne in 12,5 µL 0,2 M HCl aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 µL 1 M NaOH gestoppt. Dann wurde die Probe 10 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration des Extraktes, das zum Großteil Histone enthielt, wurde nach Bradford bestimmt (siehe 3.3.3). Bis zur weiteren Verwendung wurde das Histonextrakt bei -80°C aufbewahrt.

### 3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Lysate oder Extrakte wurde nach der Methode von Bradford ermittelt (Bradford, 1976). Der in der Bradford-Lösung vorhandene Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* reagiert im sauren Milieu mit den Aminogruppen der Proteine. Es entsteht ein Konjugat, das bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen werden kann. Es wurden 100 µL NaCl (150 mM) in eine Halbmikroküvette (Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt) vorgelegt. Dann wurde 1 µL der zu bestimmenden Probe hinzupipettiert. Nach Zugabe von 900 µL Bradford-Lösung wurde alles gründlich gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde nach Abgleich gegen eine Probe ohne Proteinlysate bestimmt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit verschiedenen Konzentrationen *Bovine Serum Albumin* (BSA, Rinderserumalbumin) in ddH<sub>2</sub>O eine Eichkurve erstellt und die Konzentration anhand der Absorption berechnet.

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proteine werden durch Aufkochen der Lysate in Anwesenheit von reduzierenden Agenzien, wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol, denaturiert und monomerisch. Die normalerweise aufgrund ihrer Ladung unterschiedlichen Proteine werden von dem im Ladepuffer, im Gel und im Laufpuffer enthaltenen Detergenz SDS gebunden, das negativ geladen ist. Somit werden alle Proteine im Gel negativ geladen und aufgrund ihres Ladungs-Massen-Verhältnisses im Gel aufgetrennt. Daher erfolgt im Gel eine Auftrennung anhand der Größe der Proteine.

Das SDS-Gel, das aus einem 7,5% (v/v)-, 10% (v/v)- oder 15% (v/v)-igem Trenn- und einem 4% (v/v)-igem Sammelgel bestand, wurde in eine mit SDS-Laufpuffer gefüllte SDS-Gelapparatur gestellt und der Gelkamm vorsichtig gezogen. Für eine SDS-PAGE wurden

2-30 µg der Proteinlysate (siehe 3.3.1) oder Histonextrakte (siehe 3.3.2) mit einem halben Volumenanteil 3x SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und in die gereinigten Taschen des SDS-Geles pipettiert. Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurden 7-10 µL des Protein-Größenstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas oder HiMark™ Prestained Protein Standard, Invitrogen) in eine Geltasche gegeben und mit aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach dem Durchlaufen des Sammelgeles bei 80 V für insgesamt ca. 3-4 h bei 120 V im Trenngel.

### 3.3.5 Western Blot

Beim Western Blot werden über Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran transferiert. Im Anschluss werden spezifische Proteine auf der Membran durch Verwendung eines Primärantikörpers gebunden. Die Detektion dieser Bindung erfolgte durch Interaktion mit einem Sekundärantikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.4) wurden sie über einen Tank-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die auf das Gel zugeschnittene Membran wurde kurz in Methanol inkubiert, mit ddH<sub>2</sub>O gespült und in Transferpuffer äquilibriert. Danach wurden das Gel und auf die Gelgröße zurechtgeschnittene Filterpapiere in Transferpuffer gelegt. Dann wurde der Western Blot in folgender Reihenfolge luftblasenfrei vom Plus- zum Minuspol in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer aufgebaut: Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 5 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h bei Proteinen bis zu 20 kDa bzw. für bis zu 4 h bei steigender Proteingröße.

Der Transfer der Proteine wurde die Membran für mindestens 2 h in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert und danach in Blocklösung mit einer entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C geschwenkt. Im Fall des α-Acetyl-Lysin wurde nach Anweisung des Herstellers 5% (w/v) BSA in TBS-T als Lösung anstelle Blocklösung eingesetzt. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte bei Raumtemperatur für jeweils 10 min in TBS-T. Dann wurde die Membran in einer Blocklösung mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Nachdem die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Detektion. Dazu wurde entweder das *ECL*<sup>+</sup> *Western Blot* Detektionssystem (Amersham Biosciences) nach Anweisung vom Hersteller genutzt oder eine selbst hergestellte Luminol-Substratlösung. Bei der Detektion mit der Luminol-Substratlösung wurde die in TBS-T gewaschene Membran 1 min mit frisch angesetzter Luminol-Substrat-



lösung unter Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran kurz zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Chemolumineszenz der Substratumsetzung beider Detektionsmethoden wurde mittels eines Röntgenfilmes nachgewiesen. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einer Entwicklermaschine.

### 3.3.6 Autoradiografie

Radioaktiv-markierte Proben im SDS-Gel (siehe 3.3.15) oder auf einer Nylonmembran (siehe 3.1.15) wurden durch Autoradiografie detektiert. Dabei verursachte die bei radioaktivem Zerfall entstehende ionisierende Strahlung eine Schwärzung von Röntgenfilmen. Der Grad der Schwärzung im Autoradiogramm ist in einem bestimmten Bereich proportional zur Intensität der emittierten Strahlung. Auf das getrocknete SDS-Gel für die Detektion von  $^{14}\text{C}$  wurde ein Röntgenfilm für bis zu 25 Wochen und auf die Nylonmembran für den Nachweis von  $^{32}\text{P}$  für ca. 24-72 h gelegt. Anschließend wurden die Banden durch eine fotografische Entwicklung des Exponats in der Entwicklermaschine detektiert.

### 3.3.7 Strippen von PVDF-Membranen

Zum Entfernen des gebundenen Primärantikörpers von der PVDF-Membran für eine Detektion eines anderen Proteins wurde die Membran, sofern sie trocken war, zunächst kurz in Methanol inkubiert. Danach wurde die Membran in ddH<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurde sie für 1-2 h bei Raumtemperatur in Stripp-Puffer geschwenkt. Dann wurde sie durch dreimalige Inkubation für je 10 min in TBS-T von den Überständen des Stripp-Puffers befreit. Es folgte eine erneute Blockierung der Membran für mindestens 2 h bei Raumtemperatur in Blocklösung. Die Detektion des zweiten Primärantikörpers erfolgte, wie oben beschrieben (siehe 3.3.5).

### 3.3.8 Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation (IP) dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen oder der Isolierung eines bestimmten Proteins aus einem Proteingemisch. Dabei wird mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen ein bestimmtes Protein gerichtet ist, dieses Protein samt Interaktionspartnern aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert. Dazu wird Protein A und/oder Protein G eingesetzt, die mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Immunglobuline (Antikörper) von Säugern binden. Mit diesen Proteine werden Kügelchen beschichtet (so genannte *Beads*, z.B. aus Sepharose oder magnetischen Partikeln), um in

einer IP die Antikörper-Protein-Komplexe an sich zu binden. Das präzipitierte Protein und seine Interaktionspartner können im Western Blot nachgewiesen werden.

Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation (4 min, 500 x g, 4°C) pelletiert und zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen IPH-Puffer (500 µL pro  $2,5 \times 10^6$  Zellen), dem Proteinaseinhibitoren (1:1.000; *Protease inhibitor cocktail*, Sigma) zugesetzt wurden, aufgenommen. Die Probe wurde zur Lyse der Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde sie für 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Pro Probe der IP wurden 100 µL eines 50:50-Gemisches von Protein A-Sepharose *Beads* (Invitrogen) mit 20% (v/v) Ethanol entnommen und dreimal mit insgesamt ca. 10 mL IPH-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die *Beads* 5 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Überstand soweit abgenommen, dass erneut ein 50:50-Gemisch vorlag.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, erfolgte vor der IP ein so genanntes *Preclearing*. Dies umfasste eine Inkubation von 1 mg Protein pro Ansatz mit je 50 µL des 50:50-Gemisches der gewaschenen *Beads* für 2 h bei 4°C unter Drehen in einem größeren Volumen (insgesamt ca. 5 mL), das mit IPH-Puffer aufgefüllt wurde. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4°C) und der Überstand auf die entsprechende Anzahl an Reaktionsgefäßen, die der Anzahl an IPs einer Ausgangszellsuspension entspricht, aufgeteilt. Das Volumen eines jeden Ansatzes wurde mit IPH-Puffer auf 500 µL aufgefüllt. Danach wurden jedem Ansatz mit Ausnahme der Negativkontrolle ohne Antikörper 2 µg des entsprechenden Antikörpers zugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zu jedem Ansatz 50 µL des 50:50-Gemisches gewaschener *Beads* gegeben und die Proben für 2 h bei 4°C drehend inkubiert. Im Anschluss wurden die *Beads* zentrifugiert (5 min, 950 x g, 4°C), dreimal mit je 1 mL NET-N 250, einmal mit NET-N 100 und jeweils anschließender Zentrifugation (5 min, 950 x g, 4°C) gewaschen. Zu den *Beads* (ca. 25 µL) wurden nach dem Waschen 25 µL 2x SDS-Ladepuffer gegeben. Danach wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert, so dass die Bindung zwischen *Beads* und Proteinen verloren ging. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die zuvor präzipitierten Proteine, die im Überstand waren, über ein SDS-PAGE (siehe 3.3.4) mit anschließendem Western Blot (siehe 3.3.5) analysiert.

### 3.3.9 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dient der Identifizierung von DNA-bindenden Proteinen in einem bestimmten Genbereich, meist in der Promotorregion. Dabei werden Proteine und DNA mit Hilfe von Formaldehyd quervernetzt. Die Zellen werden lysiert und das erhaltene Chromatin mittels Sonifizieren fragmentiert. Bei einer anschließenden IP wird an die Proteine, in diesem Fall Histone, gebundene DNA gleichzeitig mit präzipitiert. Im Anschluss wird die Quervernetzung gelöst und die DNA mittels qPCR analysiert.

#### 3.3.9.1 Isolierung von Chromatin

Die Zahl der Zellen, aus denen Chromatin isoliert werden sollte, wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden DNA und Proteine sowie Proteine mit Proteinen in den Zellen quervernetzt (*Crosslinking*). Dafür wurde 37% (v/v)-ige Formaldehyd-Lösung auf eine Endkonzentration von 1% (v/v) zu den Zellen gegeben, vorsichtig geschwenkt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 2,5 M Glyzin auf eine Endkonzentration von 0,125 M, vorsichtigem Schwenken und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Quervernetzung gestoppt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt, in ein 15-mL-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 150 x g, 4°C). Danach wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. An dieser Stelle konnte das Zellpellet bei Bedarf in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt werden.

Auf je  $3 \times 10^7$  Zellen wurden 3 mL Lysepuffer I, dem Proteinaseinhibitoren (1:1.000; *Protease inhibitor cocktail*, Sigma) zugesetzt wurden, gegeben. Das Zellpellet wurde im Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde die Probe zentrifugiert (5 min, 150 x g, 4°C) und das Pellet in dem gleichen Volumen Lysepuffer II, der ebenso mit Proteinaseinhibitoren versetzt wurde, aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde das Zelllysate auf mehrere 15-mL-Reaktionsgefäße zu je 1 mL Volumen aufgeteilt. Danach folgte das Sonifizieren der Proben mit den folgenden zelltypspezifischen Parametern bei dem Einsatz von primären B-Zellen: 10 x 15 s bei 40% Amplitude und einer jeweiligen Pause von 40 s. Während dem Sonifizieren wurden die Proben in einem Ethanol-Eis-Bad gekühlt. Danach wurden die Proben in 1,5-mL-Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15-mL-Reaktionsgefäß pipettiert. Dabei wurden die Proben von einer gemeinsamen Ausgangszellsuspension wieder zusammengeführt. Zur Kontrolle der Effizienz des Sonifizierens und zum Bestimmen der Konzentration wurden von jeder

Probe 50  $\mu\text{L}$  abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Das restliche Chromatin wurde an dieser Stelle entweder bei 4°C für einige Tage aufbewahrt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für mehrere Wochen gelagert.

#### 3.3.9.2 Überprüfung der Qualität des Chromatins und Konzentrationsbestimmung

Zu den abgenommenen 50  $\mu\text{L}$  Proben wurden 2  $\mu\text{L}$  RNase A (10 mg/mL, Roche) und 2  $\mu\text{L}$  Proteinase K (10 mg/mL, Roche) gegeben. Danach wurde die Quervernetzung durch Inkubation der Proben für 3 h bei 55°C und anschließend über Nacht bei 65°C aufgelöst. Am nächsten Tag wurde das Volumen der Proben auf 300  $\mu\text{L}$  mit TE-Puffer aufgefüllt und dann eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation durchgeführt (siehe 3.1.4). Bei der Ethanol-Präzipitation dienten 50  $\mu\text{g}$  Glykogen (Fermentas) als Präzipitationshilfe. Das DNA-Pellet wurde am Ende in 50  $\mu\text{L}$  TE-Puffer gelöst. Dann wurde die Konzentration bestimmt (siehe 3.1.11) und die Qualität der DNA mittels Agarosegelelektrophorese von 600-800 ng DNA untersucht (siehe 3.1.5). Sofern die Fragmentgröße der DNA vorwiegend bei kleiner 1 kB und maximal 3 kB lag, wurde das Chromatin weiter verarbeitet.

#### 3.3.9.3 Blockieren der Protein A-Sepharose Beads

Zum Blockieren der *Beads* wurden pro IP 120  $\mu\text{L}$  eines 50:50-Gemisches von Protein A-Sepharose *Beads* (Invitrogen) in 20% (v/v) Ethanol mit RIPA-Puffer (Lysepuffer II) in einem Reaktionsgefäß auf 15 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Dann wurden die *Beads* zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4°C) und zweimal in je 10 mL RIPA-Puffer mit jeweiliger Zentrifugation (5 min, 200 x g, 4°C) gewaschen. Anschließend wurde das Volumen der *Beads* mit RIPA-Puffer auf 10 mL aufgefüllt. Zum Blockieren wurden dieser Suspension 1 mg/mL BSA (Stock: 20 mg/mL in TE-Puffer), 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sonifizierte Lachsspermien-DNA (Invitrogen) und 1/1.000 Volumenanteil Proteinaseinhibitoren zugegeben. Danach wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Die blockierten *Beads* konnten wenige Tage bei 4°C bis zur Verarbeitung gelagert werden.

#### 3.3.9.4 Preclearing und Immunpräzipitation der Chromatin-Immunpräzipitation

Die blockierten *Beads* wurden 5 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert, das Chromatin, auf Eis aufgetaut und das notwendige Volumen für die entsprechende Anzahl an IPs mit je 60  $\mu\text{g}$  entnommen. Danach wurde ein entsprechendes Volumen der blockierten *Beads* (60  $\mu\text{L}$  x Anzahl IPs) zu jeder Probe Chromatin in einem 15-mL-Reaktionsgefäß gegeben.

Das *Preclearing* erfolgte durch Inkubation der Proben unter Drehen für 1 h bei 4°C. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand einer Probe, das Chromatin, wurde auf eine der Zahl der IPs entsprechende Menge an 1,5-mL-Reaktionsgefäßen gleichmäßig aufgeteilt. An dieser Stelle wurde 1% des Gesamtvolumens jeder Chromatin-Probe entnommen und bei 4°C aufbewahrt, das später als Inputprobe diente. Das Volumen der Ansätze für die IP wurde mit RIPA-Puffer auf 1 mL aufgefüllt. Zu jedem IP-Ansatz wurden 1-4 µg des gewünschten Antikörpers gegeben. Die IP wurde über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. Anschließend wurden zu jeder IP 60 µL der blockierten *Beads* gegeben und die Proben 2 h bei 4°C drehend inkubiert.

#### 3.3.9.5 Waschen der Chromatin-Immunpräzitationsproben

Nach der IP wurden die *Beads* 5 min bei 950 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde das Sepharose-Pellet mit je 1 mL der im Folgenden aufgeführten Puffer gewaschen: zweimal Waschpuffer I, dreimal Waschpuffer II, dreimal Waschpuffer III und einmal TE-Puffer. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurden die Proben 5 min bei 950 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Bei jedem Schritt im Waschpuffer III wurden die Proben vor dem Zentrifugieren 5 min bei 4°C rotiert. Mit dem letzten Waschschrtritt im Waschpuffer II wurden die *Beads* in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Am Ende des Waschens wurden die *Beads* in 400 µL TE-Puffer aufgenommen.

#### 3.3.9.6 Auflösen der Quervernetzung und Reinigung der immunpräzipitierten DNA

Zum Auflösen der Quervernetzung von DNA und Proteine wurden die in TE-Puffer aufgenommenen *Beads* mit 20 µL 10% (v/v) SDS, 10 µg Proteinase K (10 mg/mL) und 10 µg RNase A (10 mg/mL) versetzt. Anschließend wurden die Proben für 3 h bei 55°C und dann über Nacht bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierte DNA der Proben und die DNA des Inputs mittels *Qiaquick PCR purification Kit* (QIAGEN) nach Anweisung des Herstellers gereinigt. Für die Elution wurden 50 µL Elutionspuffer des Kits auf die Säule gegeben und dann den Anweisungen des Herstellers weiter gefolgt. Die gereinigte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die anschließende quantitative PCR in einem qPCR-Gerät wurde je 1 µL der DNA in Triplikaten eingesetzt.

### 3.3.10 Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) beruht auf der Erfassung von Reflexions- und Streulichtphänomenen. Diese entstehen, wenn das Licht definierter Wellenlänge auf Fluoreszenzfarbstoffe trifft und sie zur Emission charakteristischer elektromagnetischer Wellen anregt. Das resultierende Fluoreszenzspektrum kann von einem FACS-Gerät detektiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an Antikörper, die spezifisch an die jeweiligen Antigene binden, gekoppelt. Als Antigene können Oberflächenmoleküle von Immunzellen oder intrazelluläre Proteine zählen. Durch Messung von Intensität und Wellenlänge können so quantitative Aussagen über die Antigene getroffen werden. In diesem Fall wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) als Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt.

#### 3.3.10.1 FACS zur Detektion von Oberflächenmarkern

Für die Markierung von Milz- oder Knochenmarkszellen mit Oberflächen-Antikörpern und der anschließenden Messung dieser wurde zunächst die Zellzahl der Einzelzellsuspension mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Danach wurde die in PBS-Puffer aufgenommene Zellsuspension auf eine entsprechende Anzahl an 1,5-mL-Reaktionsgefäßen mit je  $0,3 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  Zellen aufgeteilt. Das Volumen der einzelnen Ansätze wurde mit PBS-Puffer auf 100  $\mu$ L aufgefüllt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 0,5  $\mu$ L eines Fc-Blockers ( $\alpha$ -Maus CD16/CD32; 0,5 mg/mL) und die entsprechende Kombination der Oberflächen-Antikörper gegeben. Der Fc-Blocker dient dem Sättigen der Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten. Für Doppelmarkierungen wurden die Zellen parallel mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, die mit unterschiedlich fluoreszierenden Molekülen (FITC und PE) markiert waren. Die Kombination der Oberflächen-Antikörper umfasste je 1  $\mu$ L eines FITC-konjugierten Antikörpers (z.B. B220; 0,2-0,5 mg/mL) und je 1  $\mu$ L eines PE-konjugierten Antikörpers (z.B. CD3; 0,2-0,5 mg/mL). Die Markierung erfolgte durch Inkubation der Ansätze für 20-60 min bei 4°C in Dunkeln. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (2 min, 500 x g, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet mit 1 mL eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (2 min, 500 x g, 4°C) wurde das Zellpellet in 400  $\mu$ L eiskaltem PBS-Puffer aufgenommen. Danach wurde die Probe in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences) überführt und 50.000 Zellen pro Probe im FACS-Gerät gemessen. Dabei wurden der FITC-markierte Antikörper im FL1-H-Kanal und der PE-markierte Antikörper im FL2-H-Kanal detektiert. Des Weiteren wurden die Zellen im Forward/Sideward-Scatter

vom FACS gemessen, was Aussagen über die Größe und Granularität der Zellen lieferte. Die Messung und Auswertung erfolgte mit der Software *CellQuest Pro* (BD Biosciences) nach Anweisungen des Herstellers.

#### 3.3.10.2 FACS zur Detektion von intrazellulären Proteinen

Im Gegensatz zur Detektion von Oberflächenproteinen mittels FACS müssen bei der Detektion von intrazellulären Proteinen die Zellen fixiert werden, um die Membran permeabel für den Antikörper zu machen. Dies zerstört jedoch die Struktur der Membran. Daher wird bei Doppelmarkierung eines Oberflächenproteins mit einem intrazellulären Protein zuerst die Markierung des Oberflächenproteins durchgeführt. Für die durchflusszytometrische Analyse der aktivierten Caspase 3 in den Zellen wurde das *FITC-conjugated Monoclonal Active Caspase3 Antibody Apoptosis Kit* (BD Biosciences) nach Anweisung des Herstellers verwendet.

#### 3.3.10.3 FACS zum Sortieren von Zellen

Zum Sortieren der Zellen im FACS-Gerät wurde bei den im *CellQuest Pro* angezeigten Dot Plots der beiden Fluoreszenzdetektoren eine Region festgelegt. Diese wurde während einer Probemessung eingestellt und definierte die gewünschten Zellen mit den bestimmten relativen Mengen an Oberflächenmarkern. Dann wurde das Sortierprogramm der Software gestartet. Die gewünschten Zellen wurden im Sortiermodul des FACS-Gerätes in mit 3% (w/v) BSA in PBS-beschichteten 50-mL-Reaktionsgefäßen aufgefangen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt.

#### 3.3.11 Magnetische Depletion von Zellen

Für die Isolierung primärer, naiver B-Zellen aus der Milz wurde eine Depletion mittels magnetischer Zellsortierung (*Magnetic-activated cell sorting*, MACS) gewählt. Da die B-Zellen nach der Reinigung nicht mit Antikörpern oder ähnlichem markiert wurden, ist ihre Zelloberfläche frei für die Bindung von Stimulantien *ex vivo*. In dieser Arbeit wurde eine CD43-Depletion gewählt, da CD43 auf der Oberfläche von nahezu allen Leukozyten mit Ausnahme der unreifen und reifen B-Zellen vorhanden ist. Daher werden beim Einsatz von  $\alpha$ -CD43 magnetischen *Beads* (*MicroBeads*) alle CD43<sup>+</sup>-Zellen der Milzzellsuspension von den *Beads* gebunden und verbleiben in der Säule. Währenddessen können die unreifen und reifen B-Zellen die Säule durchlaufen, aufgefangen und weiter verarbeitet werden.

Für die magnetische Depletion wurde das  $\alpha$ -CD43 *MicroBeads* Kit (Miltenyi Biotec) verwendet. Die Einzelzellsuspension der Milz wurde nach Zentrifugation (2-4 min, 500 x g, 4°C) in 90  $\mu$ L PBS/0,5% (w/v) BSA/2 mM EDTA pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Danach wurden auf je 90  $\mu$ L Zellsuspension 10  $\mu$ L  $\alpha$ -CD43 *MicroBeads* (Miltenyi Biotec) gegeben. Dies wurde durch Invertieren kurz gemischt und 15-20 min bei 4°C inkubiert. Eine in den Mini-MACS Magneten (Miltenyi Biotec) eingespannte MS-Säule (Miltenyi Biotec) wurde durch dreimaliges Hinzugeben von 500  $\mu$ L PBS/0,5% (w/v) BSA/2 mM EDTA gewaschen. Danach wurde die Zellsuspension mit den *Beads* zentrifugiert (5 min, 500 x g, 4°C) und zweimal mit je 1 mL PBS/0,5% (w/v) BSA/2 mM EDTA gewaschen. Die Zellsuspension wurde in 500  $\mu$ L PBS/0,5% (w/v) BSA/2 mM EDTA aufgenommen und auf die MS-Säule gegeben. Durch Zugabe von fünfmal je 500  $\mu$ L PBS/0,5% (w/v) BSA/2 mM EDTA auf die Säule wurden die CD43<sup>-</sup>, naiven B-Zellen im Durchfluss gesammelt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Zellsuspension auf Eis aufbewahrt. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 3.2.4).

### 3.3.12 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

Die fixierten Gefrierschnitte (siehe 3.4.9) wurden aufgetaut, mit einem Fettstift (Super Pan Pen, Immunotech) zum Verhindern des Verlaufs der Flüssigkeiten umkreist und in PBS-Puffer rehydriert. Danach wurden sie mit PBS/3% (v/v) Ziegen Serum überzogen und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer zum Blockieren der unspezifischen Bindestellen inkubiert. Dann wurden auf jeden Gefrierschnitt 100-200  $\mu$ L eines 1:200 in PBS/3% (v/v) Ziegen Serum verdünnten FITC-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Immunglobulin-Antikörpers gegeben. Dieser Antikörper erkannte sowohl die leichte als auch die schwere Kette der Immunglobuline. Die Schnitte wurden mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal in PBS-Puffer für je 5-10 min gewaschen. Zur Detektion der DNA in den Nuklei wurden 15  $\mu$ L einer 1:2.500-Verdünnung von Hoechst H33958 (5 mg/mL) in PBS-Puffer auf die Gefrierschnitte gegeben. Anschließend wurden die Färbungen für 10 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen der Objektträger in PBS-Puffer im Dunkeln wurden diese mit 1-2 Tropfen Mowiol bedeckt und ein Deckgläschen möglichst luftblasenfrei aufgebracht. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Deckgläschen mittels Nagellack verschlossen.



### 3.3.13 Immunfluoreszenz von *Crithidia spec.*

Mittels indirekter Immunfluoreszenz mit tierpathogenen Hämoflagellaten der Art *Crithidia luciliae* lassen sich Autoantikörper gegen dsDNA nachweisen. Diese Einzeller besitzen ein dsDNA-haltiges Riesenmitochondrium, den so genannten Kinetoplast. Er weist im Wesentlichen keine der anderen in den Nuklei enthaltenen Antigene auf. Autoantikörper von Serenproben, die mit dem Kinetoplasten reagieren, sind daher ausschließlich gegen dsDNA gerichtet. Für die indirekte Immunfluoreszenz von *Crithidia luciliae* wurde ein klinisches Versuchssystem nach Anweisung des Herstellers genutzt (Euroimmun, Lübeck). Dabei wurde der im Kit enthaltene  $\alpha$ -Human Sekundärantikörper durch den in 3.3.12 genutzten FITC-konjugierten  $\alpha$ -Maus Immunglobulin-Antikörper ausgetauscht. Dieser wurde 1:200 in PBS/3% (v/v) Ziegen Serum eingesetzt. Die Serenproben wurden in PBS/0,2% (v/v) Tween-20 1:50 verdünnt.

### 3.3.14 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Zum spezifischen und quantitativen Nachweis von Antikörpern bzw. Immunglobulinen wird der so genannte *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) eingesetzt. Ein ELISA basiert auf der Antikörper-Antigen-Reaktion. Es werden auf einem Trägermedium entweder Antigene zum Nachweis von Antigen-spezifischen Immunglobulinen oder Antikörper zur Detektion von im Serum enthaltenen Immunglobulinen aufgebracht. Das im Serum enthaltene Immunglobulin bindet an das Antigen bzw. den Antikörper des Trägermediums und ein sekundärer Antikörper kann diese Bindung detektieren. Durch Kopplung des sekundären Antikörpers an ein Enzym kann eine quantitative Aussage über die Menge an Antikörpern im gemessenen Serum durch eine Substratreaktion gemacht werden.

#### 3.3.14.1 *ELISA zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentration im Blut*

Für den Nachweis von Immunglobulinkonzentrationen im Serum von Mäusen wurde das *SBA Clonotyping System/HRP* Kit verwendet (Southern Biotech). Es wurde in jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte (Immuno Plate Maxisorp, Nunc) 100  $\mu$ L einer 1:400-Verdünnung in PBS-Puffer des gegen alle Immunglobuline gerichteten Primärantikörpers (*Coating/Capture*  $\alpha$ -Immunglobuline) gegeben. Zum Beschichten wurde die Platte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert (*Coating*). Am nächsten Tag wurden durch dreimaliges Waschen der wells mit je 300  $\mu$ L Waschpuffer (PBS/0,05% (v/v) Tween-20) überschüssige Antikörper entfernt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS/0,05% (v/v) Tween-20/0,25% (w/v) BSA (200  $\mu$ L/well) durch

Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur gesättigt. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen (s.o.). Im nächsten Schritt wurden ein Standard-Referenzserum (Dunn Labortechnik), der das zu messende Immunglobulin in bekannter Konzentration enthielt, und die Serumproben in einer entsprechenden Verdünnung aufgetragen (je 50  $\mu\text{L}$ /well). Für alle Proben, sowohl Standard als auch Serumproben, wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die Verdünnungen wurden in PBS/0,05% (v/v) Tween-20/0,25% (w/v) BSA angesetzt. Folgende Konzentrationen wurden bei dem Standard je nach Isotyp-Detektion eingesetzt, wobei der entsprechende Standard und ein Leerwert auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt wurden:

IgA	3,14-23,55 ng/mL
IgG1	1,28-9,6 ng/mL
IgG2a	1,38-10 ng/mL
IgG2b	1,58-11,85 ng/mL
IgG3	17,7-212 ng/mL
IgM	0,48-4,83 ng/mL

Die Serenproben wurden je nach Isotyp-Bestimmung, wie folgt, verdünnt:

für IgA	1:200.000
für IgG1	1:400.000
für IgG2a	1:400.000
für IgG2b	1:200.000
für IgG3	1:20.000
für IgM	1:400.000

Die Platte mit den Proben wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden ungebundene Immunglobuline durch dreimaliges Waschen (s.o) entfernt. Anschließend wurden in jedes well 100  $\mu\text{L}$  des jeweils Isotyp-spezifischen Sekundärantikörpers (*SBA Clonotyping System/HRP Kit*, Southern Biotech) in einer Verdünnung von 1:600 in PBS/0,05% (v/v) Tween-20/0,25% (w/v) BSA gegeben. Dieser war mit einer Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur wurden die wells der Mikrotiterplatte dreimal gewaschen. In jedes well wurden dann 100  $\mu\text{L}$  einer nach Anweisung des Herstellers frisch angesetzten ABTS-Substratlösung gegeben. Die Platte wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln so lange inkubiert, bis eine deutliche Grünfärbung der Lösungen im Unterschied zum Leerwert zu erkennen war. Dann wurde die Extinktion photometrisch im ELISA-Reader gemessen (Messfilter 405 oder 450 nm, Referenzfilter 530 nm) und die Konzentrationen

über die Standarddeichkurve nach Abzug eines mitgeführten Leerwerts berechnet. Dabei korrelierten der enzymatisch bedingte Farbumschlag und die Extinktion mit der Konzentration der Immunglobuline.

#### 3.3.14.2 ELISA zur Bestimmung der humoralen Immunantwort gegenüber Ovalbumin

Zur Analyse der Ovalbumin-spezifischen Immunglobuline wurden in jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte 50  $\mu$ L Ovalbumin (20  $\mu$ g/mL in PBS-Puffer) gegeben. Die weiteren Schritte wurden, wie unter 3.3.15.1 beschrieben, durchgeführt. Der entsprechende Standard wurde in folgenden Konzentrationen auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt:

$\alpha$ -OVA-IgG (Abcam)	20-500 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -OVA-IgG2b (Abcam)	0,06-2 ng/mL

Für den ELISA wurden folgende Verdünnungen der Mausseren des entsprechenden Zeitpunktes nach Ovalbumin-Sensibilisierung genutzt:

Für $\alpha$ -OVA-IgG Detektion:	Seren vom Tag 0	1:500
	Seren vom Tag 7	1:500
	Seren vom Tag 14	1:10.000
	Seren vom Tag 38	1:100.000
Für $\alpha$ -OVA-IgG2b Detektion:	Seren vom Tag 0	1:10
	Seren vom Tag 7	1:10
	Seren vom Tag 14	1:25
	Seren vom Tag 38	1:100

Als Sekundärantikörper wurde eine 1:600-Verdünnung in PBS/0,05% (v/v) Tween-20/0,25% (w/v) BSA eines gegen alle Immunglobuline gerichteten Antikörpers (*Screening* Immunglobulin-Antikörper, *SBA Clonotyping System/HRP* Kit, Southern Biotech) eingesetzt (100  $\mu$ L/well), der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Detektion erfolgte nach dem unter 3.3.15.1 beschriebenen Prinzip.

#### 3.3.14.3 ELISA zur Detektion von Autoantikörpern

Zur Detektion von Autoantikörpern wurden der  $\alpha$ -dsDNA ELISA Kit (Euroimmun, Lübeck) und der  $\alpha$ -ENA ELISA Kit (Euroimmun, Lübeck) nach Anweisung des Herstellers genutzt und die Absorption der Proben im ELISA-Reader gemessen. Statt des im Kit enthaltenen Sekundärantikörpers wurde ein polyvalenter  $\alpha$ -Maus, Peroxidase-konjugierter Immunglobulin-Antikörper (IgM, IgG, IgA; Sigma Aldrich), der 1:10.000 in PBS-Puffer verdünnt wurde, eingesetzt. Für den dsDNA-ELISA wurde eine 1:200-Verdünnung und für den

ENA-ELISA eine 1:100-Verdünnung des Serums eingesetzt. Es wurde jeweils eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Die Substratreaktion wurde im Fall des dsDNA-ELISA nach 15 min und beim ENA-ELISA nach 30 min gestoppt. Zur Detektion der Isotypen der Autoantikörper wurde der Sekundärantikörper des Kits durch einen entsprechenden Isotyp-spezifischen Antikörper (*SBA Clonotyping System/HRP Kit*, Southern Biotech) ausgetauscht. Dieser wurde 1:3.000 und die Serenproben 1:600 in PBS/0,05% (v/v) Tween-20/0,5% (w/v) BSA verdünnt eingesetzt und einfach gemessen.

### **3.3.15 Versuch zum Nachweis von *in vitro* Histonacetylierung (HAT-Versuch)**

Das Prinzip des Nachweises einer *in vitro* Histonacetylierung beruht auf der Inkubation von mittels IP isolierten Histonacetyltransferasen, in diesem Fall p300 oder CBP, mit rekombinanten Histonen und radioaktiv-markiertem Acetyl-CoA. Dabei wird durch die Histonacetyltransferase die radioaktiv-markierte Acetylgruppe des Acetyl-CoA auf Histone übertragen. Dies wird mittels SDS-PAGE der Histone und anschließender Autoradiografie detektiert. Für den Versuch wurden zunächst IPs mit einem Kontrollantikörper (Kontrollserum Kaninchen), einem CBP- und einem p300-Antikörper durchgeführt (siehe 3.3.8). Danach wurden die gewaschenen Protein A-Sepharose *Beads* (ca. 25 µL) jeder Probe mit je 20 µg rekombinanten Kernhistonen (*Bulk Histones, Calf Thymus Type II-A*; Sigma) und 1 µL <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (59 mCi/mmol; Amersham Biosciences) versetzt. Das Reaktionsvolumen wurde mit IPH-Puffer auf 45 µL aufgefüllt. Durch Inkubation für 90 min bei 37°C wurde die Acetylierung der Histone hervorgerufen. Danach wurde die Probe kurz zentrifugiert, um ein Absetzen der *Beads* zu ermöglichen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss folgte eine SDS-PAGE der Proben auf einem 15% (v/v)-igen Trenngel (siehe 3.3.4). Die aufgetrennten Proteine wurden im Gel durch eine Inkubation des Geles in 25% (v/v) 2-Propanol/10% (v/v) Essigsäure für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde das Gel für 15 min bei Raumtemperatur in Amplify<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences) geschwenkt, um eine Verstärkung des radioaktiven Signals zu erhalten, und mittels *Gel drying Kit* (Promega) getrocknet. Zur Detektion der radioaktiv-markierten Proteine wurde eine Autoradiografie (siehe 3.3.6) durchgeführt.

### **3.3.16 Szintillationsmessung**

Die Quantifizierung radioaktiver β-Zerfälle erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillationsmessgerät. In der Messflüssigkeit enthaltene Szintillationsmoleküle werden durch die Wechselwirkung mit ionisierender Strahlung über den photoelektrischen Effekt angeregt.

Diese polychromatischen Lichtsignale werden über einen Sekundärelektronenvervielfacher detektiert. Die zu vermessenden, flüssigen Proben und Filterpapiere (siehe 3.2.7) wurden in 3 mL Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint<sup>®</sup> eco plus, Roth) aufgenommen und im Szintillationszähler vermessen.

### **3.4 Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.4.1 Zucht von Mäusen**

Ein Weibchen und ein Männchen mit einem Mindestalter von 6 Wochen wurden in einem Käfig verpaart. In großen Käfigen wurden manchmal zwei Weibchen und ein Männchen zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden 3 Wochen nach dem Zusammensetzen der Mäuse geboren, im Alter von 10-16 Tagen am Ohr markiert und ein Stück Schwanz für die Genotypisierung abgeschnitten. Im Alter von 18-21 Tagen wurden die Nachkommen aus dem Käfig der Elterntiere entnommen und in separate, nach Geschlecht getrennte Käfige gesetzt. Sie konnten bei Bedarf im Alter von mindestens 6 Wochen verpaart werden.

#### **3.4.2 Intraperitoneale Injektion von Ovalbumin**

Zur Überprüfung der humoralen Immunantwort von Mäusen und der damit verbundenen Sensibilisierung erhielten die entsprechenden Mäuse ( $p300^{+/AS-neo}$ ; *CD19-cre* oder *CD19-cre*) im Alter von 10 Monaten eine intraperitoneale (i.p.) und damit systemische Injektion mit 200  $\mu$ L einer Sensibilisierungslösung. Diese Injektion enthielt 10  $\mu$ g Ovalbumin (OVA) und 70  $\mu$ L Imject Alum (40 mg/mL; Pierce) in PBS-Puffer, das steril-filtrierte wurde (0,2  $\mu$ m Filter). Für eine Analyse der Erinnerungsantwort wurde den Mäusen 22 Tage nach der ersten eine zweite Injektion verabreicht, die die gleiche Menge an OVA enthielt.

#### **3.4.3 Intraperitoneale Injektion von Tamoxifen**

Tamoxifen dient der Induktion der Rekombination in  $p300^{+/AS-neo}$ ; *RERTn-cre* Mäusen (Guerra *et al.*, 2003). Den  $p300^{+/AS-neo}$ ; *RERTn-cre* Mäusen und den Kontrollmäusen ( $p300^{+/+}$ ; *RERTn-cre* Mäuse;  $p300^{+/AS-neo}$  Mäuse) wurde im Alter von 8-12 Wochen i.p. über einen Zeitraum von 4 aufeinander folgenden Tagen jeweils 4 mg Tamoxifen (40 mg/mL in Olivenöl (Heirler Cenovis GmbH)) injiziert. Einer Gruppe von Mäusen (Wildtypmäuse) wurden 100  $\mu$ L Olivenöl injiziert, um einen Placeboeffekt auszuschließen.

#### **3.4.4 Retroorbitale Blutentnahme von einer Maus**

Der retroorbitale Sinus des Auges einer Maus ist durch eine Kapillare leicht zugänglich. Zur retroorbitalen Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran (Baxter) betäubt. Eine kurze Pasteurpipette wurde durch vorsichtige Drehbewegungen hinter das Auge geführt und der Druck solange erhöht, bis Blut in die Pasteurpipette lief. Es wurden ca. 200-500 µL Blut aus einem Auge der Maus gewonnen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zwischen zwei Zeitpunkten der Blutentnahmen einer Maus wurde die Seite gewechselt (vom linken aufs rechte Auge bzw. umgekehrt). Das nach etwa 3 h Inkubation bei Raumtemperatur geronnene Blut wurde für 20 min bei 4°C und 18.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, das Serum, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

#### **3.4.5 Entnahme von Organen einer Maus**

Zur Organentnahme wurde die mit Ether betäubte Maus durch zervikale Dislokation getötet. Sie wurde äußerlich mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert und auf dem Rücken liegend mit Kanülen auf einem Styroporstück fixiert. Danach wurde die Bauchhöhle der Maus mit einer Schere geöffnet und das gewünschte Organ herauspräpariert (z.B. Milz, Leber, Lunge). Das Organ wurde in eine Zellkulturschale mit eiskaltem PBS-Puffer gegeben und in mehrere Stücke zerschnitten. Je nach weiterer Verwendung des Organs wurde es fixiert (siehe 3.4.8.1), homogenisiert (siehe 3.4.6) oder für Gefrierschnitte eingefroren (siehe 3.4.9).

#### **3.4.6 Isolierung von primären Milzzellen einer Maus**

Zur Isolierung der Milzzellen einer Maus wurde die Milz in eiskaltem PBS-Puffer in einer Zellkulturschale gewaschen und gewogen. Mittels der Rückseite des Stempels einer 10-mL-Einwegspritze wurde die Milz in einem Zellsieb (70 µm Porengröße, BD Biosciences) über ein 50-mL-Reaktionsgefäß homogenisiert. Damit die Zellen beim Durchfallen des Siebes nicht sofort platzen, wurde in das Reaktionsgefäß 5 mL eiskalter PBS-Puffer vorgelegt. Durch Zugabe von 10 mL eiskaltem PBS-Puffer wurde das Zellsieb gespült. Danach wurde die Zellsuspension durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 150 x g) pelletiert. Zum Lysieren der Erythrozyten wurde das Pellet vorsichtig in 5 mL ACK-Lysepuffer resuspendiert und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 15-20 mL eiskaltem PBS-Puffer gestoppt, damit nicht auch die Lymphozyten der Milz lysiert wurden. Nach einer erneuter Zentrifugation (10 min, 150 x g, 4°C) wurde der

Überstand verworfen. Das Pellet wurde je nach weiterer Bearbeitung in einem entsprechenden Volumen RPMI-1640-Medium oder eiskaltem PBS-Puffer aufgenommen. Wenn die Zellen für eine *in vitro* Stimulation benötigt wurden (siehe 3.2.6), erfolgte die vollständige Prozedur nach dem Präparieren der Milz aus der Maus unter einer Sterilbank.

### 3.4.7 Isolierung des Knochenmarks einer Maus

Zur Isolierung des Knochenmarks wurde der Femur beider Hinterbeine der Maus vorsichtig mit einer Schere und Pinzette herauspräpariert. Die Knochen wurden in eine Zellkulturschale mit eiskaltem PBS-Puffer gelegt. Danach wurden sie mit Hilfe einer Schere von dem übrigen Gewebe befreit und in neue Zellkulturschale mit eiskaltem PBS-Puffer gelegt. Anschließend wurden die Knochen an beiden Enden soweit mit einem Skalpell aufgeschnitten, bis die Röhrenknochen mit Hilfe einer Insulinspritze und den 5-10 mL PBS-Puffer der Schale durchgespült werden konnten. Dann wurde die erhaltene Zellsuspension in ein 50-mL-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden durch eine Inkubation des Zellpellets im ACK-Lysepuffer lysiert (siehe 3.4.6). Das nach erneuter Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen PBS-Puffer aufgenommen und verarbeitet.

### 3.4.8 Herstellung von Paraffinschnitten

#### 3.4.8.1 Gewebepreparation

Für die Einbettung von Gewebe in Paraffin wurde frisch präpariertes Gewebe in einem 50-mL-Reaktionsgefäß mit 20-30 mL 3,7% (v/v) Formaldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Dadurch wurden Veränderungen der zellulären Struktur verhindert. Das später in Paraffin eingebettete Gewebestück sollte Wasser-frei sein. Daher folgte eine Dehydratation durch Inkubation des fixierten Gewebestückes nacheinander in den folgenden Lösungen einer ansteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur: ddH<sub>2</sub>O für 3 h; 70% (v/v) Ethanol für 2 h (oder mehrere Tage bei 4°C); 80% (v/v) Ethanol für 2 h und 96% (v/v) Ethanol für 2 h. Zum Schluss wurde das Gewebestück zweimal in Isopropanol für je 1,5-2 h gelegt, um das Ethanol zu entfernen. Danach wurde es bei 60°C über Nacht in Paraffin (Paraplast<sup>®</sup>, Merck KGaA) gegeben. Dieses Paraffin wurde dreimal gewechselt mit jeweiliger über Nacht Inkubation des Gewebestückes in dem neuen Paraffin. Danach wurde das Gewebestück in eine Gussform gelegt und mit Paraffin übergossen, bis es vollständig umhüllt ist. Der Block wurde gekühlt, bis er hart war und aus der Gussform entnommen werden konnte. Die fertigen Paraffinblöcke wurden entweder geschnitten oder bei 4°C gelagert.

#### 3.4.8.2 Schnitte von einem Paraffinblock

Die Paraffinblöcke wurden anfangs mit einem Mikrotom geschnitten, bis das Gewebe angeschnitten wurde. Die Schnittdicke des Paraffins lag bei 3-7  $\mu\text{m}$ . Mit dem Mikrotom geschnittene Paraffinscheiben wurden sofort vorsichtig in ein 40°C warmes Wasser gelegt. Danach wurde der Schnitt auf einen mit Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger aufgebracht. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden bei Raumtemperatur gelagert.

#### 3.4.8.3 Hämatoxylin & Eosin Färbung (H&E Färbung) von histologischen Schnitten

Die Objektträger mit in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten wurden durch Inkubation bei Raumtemperatur in den folgenden Lösungen entparaffiniert: dreimal in Xylol für je 3 min; in 100% (v/v), 96% (v/v), 80% (v/v) und 70% (v/v) Ethanol für jeweils 2 min. Anschließend wurden sie für 2-3 min mit Saurem Hämalaun (Merck) nach Mayer gefärbt. Danach wurden sie 10 min unter fließendem Wasser gespült und für 15 min mit 0,1% (w/v) Eosinlösung (Merck) gefärbt. Nach kurzem Schwenken der Objektträger in 80% (v/v) Ethanol und anschließend 96% (v/v) Ethanol wurden sie für 2-3 min in Isopropanol inkubiert. Dann wurden sie zweimal für je 5 min in Xylol gewaschen und anschließend mit Entellan (Merck) und einem Deckgläschen abgedeckt.

#### 3.4.9 Herstellung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurde das zu untersuchende Organstück mit Gewebekleber (TissueTek, Sakura) auf einem Filterpapier oder Kork fixiert. Danach wurde das mit Gewebekleber vollständig umhüllte Stück zügig in ein mit Isopentan gefülltes, in flüssigem Stickstoff schwimmendes Gefäß gegeben. Dies schützte das Gewebe vor einem Zerreißen und Zerplatzen der Zellen beim Kälteschock. Sobald der Gewebekleber fest geworden war, wurde das gefrorene Gewebestück in Alufolie bei -80°C gelagert.

Die Gefrierschnitte von einem gefrorenen Organstück wurden an einem Gefriermikrotom (KryoStat) bei einer Gerätetemperatur von -20°C hergestellt. Dafür wurde das gefrorene Gewebestück (Transport in flüssigem Stickstoff) mit Gewebekleber auf einem Metallstück fixiert, das dann am Mikrotom eingespannt wurde. Nach dem Abschneiden des Gewebeklebers vom eingehüllten Gewebestück wurden die erhaltenen Gefrierschnitte des Organs mit einer Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$  vorsichtig auf einen mit Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger überführt und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte auf dem Objektträger durch eine 10-15 min Inkubation in eiskaltem Aceton fixiert, luftgetrocknet und dann bei -20°C aufbewahrt.



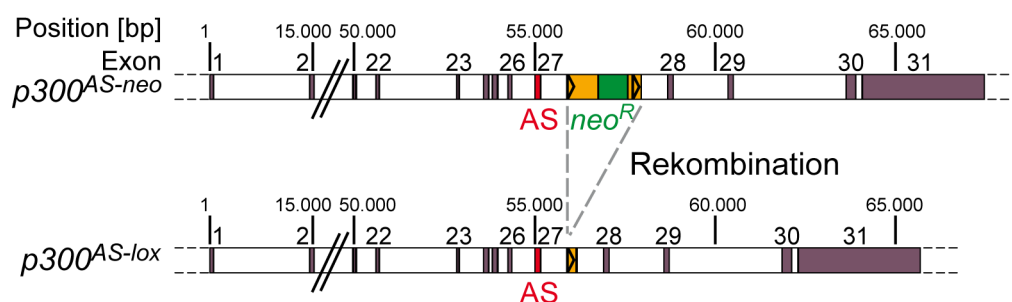
### **3.5 Statistische Analysen**

Die Kaplan-Meier-Analysen wurden mit dem Programm *GraphPad Prism* erstellt. Für alle anderen statistischen Analysen wurde der *two-tailed* Mann-Whitney U *t* test angewendet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Analyse von Mäusen mit B-Zell-spezifischer Expression eines p300 mit reduzierter Acetyltransferasefunktion

Die spezifische Analyse der Funktion der Acetyltransferaseaktivität von p300 erfolgte mit Hilfe einer Knock-In-Maus, in die eine Mutation in der Acetyltransferasedomäne mittels homologer Rekombination eingeführt wurde. Diese Mutation umfasste eine Substitution zweier benachbarter Aminosäuren von Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) zu Alanin (A) und Serin (S) an den Positionen 1466-1467 von p300 (Abb. 11) (Bordoli *et al.*, 2001). Der eingesetzte Zielvektor zur Einführung der Mutation in die Maus enthielt unter anderem ein von *LoxP*-Sequenzen (*LoxP*) flankiertes *Neomycin*-Resistenzgen (*neo<sup>R</sup>*) im nächstgelegenen Intron stromabwärts vom Exon der Mutation (Exon 27). Dieses Resistenzgen wird in umgekehrter Orientierung relativ zur Richtung des *p300*-Gens transkribiert. Mäuse, die heterozygot für das mutierte *p300*-Allel mit dem *Neomycin*-Resistenzgen sind (*p300<sup>+/AS-neo</sup>*), entsprechen heterozygoten Knock-Out-Mäusen, da das *Neomycin*-Resistenzgen die Expression des mutierten *p300*-Gens reprimiert.



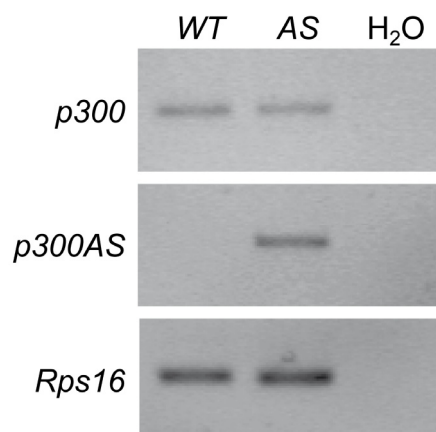
**Abbildung 11:** Schematische Darstellung des Aufbaus des mutierten *p300<sup>AS-neo</sup>* und der Rekombination zu *p300<sup>AS-lox</sup>* (modifiziert nach: Roth *et al.*, 2003).

In das 27. Exon des genomischen p300-Genlokus wurde durch homologe Rekombination eines Zielvektors Mutationen eingeführt, die eine Substitution der Aminosäuren von Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) zu Alanin (A) und Serin (S) zur Folge hatten. Zusätzlich wurde in das nächstgelegene Intron stromabwärts ein *Neomycin*-Resistenzgen (*neo<sup>R</sup>*) eingeführt, das durch zwei *LoxP*-Sequenzen (Dreiecke) flankiert wurde. Nach Rekombination des *p300<sup>AS-neo</sup>* mit Hilfe einer konstitutiv-aktiven, Gewebe-spezifischen oder induzierbaren Cre-Rekombinase erfolgt die Expression des mutierten *p300<sup>AS-lox</sup>*.

Das mutierte *p300*-Gen der konditionellen Knock-In-Maus wird somit nach der durch eine Cre-Rekombinase vermittelten Entfernung des *Neomycin*-Resistenzgens exprimiert (*p300<sup>+/AS-lox</sup>*, im Folgenden *p300<sup>+/AS</sup>* genannt). Zur Rekombination des *Neomycin*-Resistenzgens werden Mäuse mit Expression einer konstitutiv-aktiven, Gewebe-spezifischen oder induzierbaren Cre-Rekombinase zur Verpaarung eingesetzt. Nach der Rekombination wird ein vollständig-langes p300-Protein synthetisiert, dem die Acetyltransferaseaktivität fehlt (Bordoli *et al.*, 2001). Die embryonale Letalität von

Mäusen mit einer heterozygoten Expression des mutierten *p300AS* in der Keimbahn mittels *CMV-cre*-Rekombinase (Roth *et al.*, 2003) in Verbindung mit dem normalen Phänotyp von heterozygoten *p300* Knock-Out-Mäusen (Yao *et al.*, 1998) verdeutlichen eine dominant-negative Wirkung der Acetyltransferaseaktivität von *p300* auf das verbleibende Wildtyp-*p300*-Allel in *p300<sup>+/AS</sup>* Mäusen (Roth *et al.*, 2003; Shikama *et al.*, 2003).

Für die Untersuchung der Funktion der Acetyltransferaseaktivität von *p300* in B-Zellen wurden *p300<sup>+/AS-neo</sup>* Mäuse (Roth *et al.*, 2003; Shikama *et al.*, 2003) mit homozygoten *CD19-cre* Mäusen gekreuzt. *CD19-cre* Mäuse exprimieren eine Cre-Rekombinase unter der transkriptionellen Kontrolle des *Cd19*-Promotors (Rickert *et al.*, 1997). Diese konstitutiv-aktive Cre-Rekombinase führte zur B-Zell-spezifischen Deletion des *neo*-Gens aus dem Intron des mutierten *p300*-Allels (Abb. 12) (Roth *et al.*, 2003; Shikama *et al.*, 2003). Dadurch wurde das Acetyltransferase-defiziente *p300AS* in den B-Zellen der Milz ( $CD45R^+$ ) und in Pro-B-Zellen des Knochenmarks dereprimiert (Roth *et al.*, 2003; Forster *et al.*, 2007).



**Abbildung 12:** B-Zell-spezifische Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300AS* in *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen.

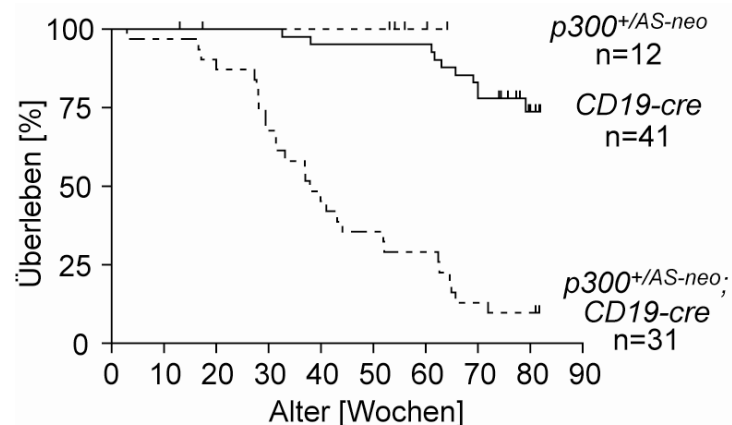
Primäre, naive B-Zellen wurden aus der Milz einer *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus und deren *CD19-cre* Kontrollmaus isoliert und mittels magnetischer Depletion aufgereinigt. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert. Über eine RT-PCR wurde anschließend die mRNA des Wildtyp-*p300* und die des mutierten *p300AS* detektiert. *Rps16* diente als Mengenkontrolle der eingesetzten cDNA. H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle der PCR.

Die Deletion des *neo<sup>R</sup>*-Gens führt zur Derepression des mutierten Allels *p300AS* (Roth *et al.*, 2003). Diesbezüglich wurde die Rekombinationseffizienz anhand der relativen Expression des Wildtyp- und des mutierten Allels bestimmt. Dafür wurde zum einen eine Allel-spezifische semiquantitative RT-PCR mit reifen, naiven B-Zellen der Milz (*CD43*-Depletion) von doppelt heterozygoten *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen im Vergleich zu deren *CD19-cre* Kontrollmäusen durchgeführt (Abb. 12). B-Lymphozyten von *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen exprimierten ähnliche Mengen des Wildtyp- und des mutierten

*p300*-Gens. *CD19-cre* Kontrollmäuse hingegen wiesen keine Expression des mutierten *p300AS*-Gens auf. Zum anderen wurden qRT-PCR Analysen für eine genauere Bestimmung durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine Rekombinationseffizienz von durchschnittlich  $95,4 \pm 4,6\%$  ( $n=3$ ; Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.1 Mäuse mit B-Zell-spezifischer Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300* weisen eine erhöhte Mortalität auf

Ein konditioneller Knockout von *p300* spezifisch in B-Zellen weist keine Defekte in der Differenzierung auf (Xu *et al.*, 2006). Mäuse mit einer reduzierten *p300*-Acetyltransferaseaktivität in B-Zellen zeigten ebenso im Alter von bis zu 12 Wochen eine normale B-Zell-Entwicklung mit Ausnahme einer Reduktion rezirkulierender B-Zellen im Knochenmark (Forster *et al.*, 2007; Daten von Sven Gallinat). Auf einem gemischten genetischen Stammhintergrund (129/Sv  $\times$  C57B6) starben *p300<sup>+/-AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse jedoch signifikant früher als die Kontrollmäuse, *CD19-cre* bzw. *p300<sup>+/-AS-neo</sup>* (Abb. 13).

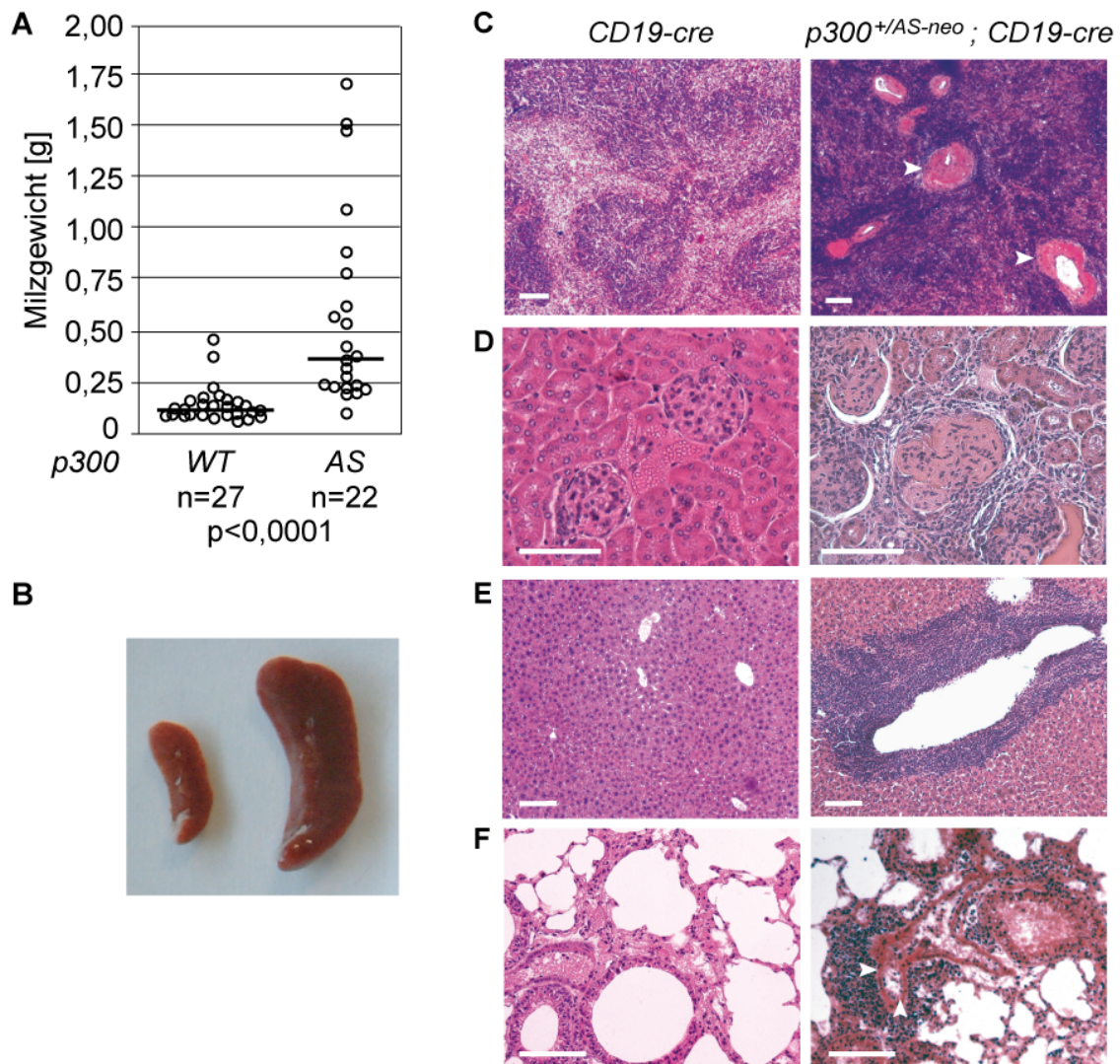


**Abbildung 13:** Mäuse mit defizienter *p300*-Acetyltransferasefunktion sterben früher als Kontrollmäuse. Kaplan-Meier-Analysen von *p300<sup>+/-AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen und *CD19-cre* sowie *p300<sup>+/-AS-neo</sup>* Kontrollmäusen. Alle Mäuse der verschiedenen Genotypen besaßen den gleichen gemischten genetischen Stammhintergrund (129/Sv  $\times$  C57B6). Der *p*-Wert für den Vergleich von *p300<sup>+/-AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen mit *CD19-cre* Mäusen lag bei  $<0,0001$ ; für den Vergleich von *p300<sup>+/-AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen mit *p300<sup>+/-AS-neo</sup>* lag er bei  $0,0012$ .

#### 4.1.2 Mäuse mit fehlender p300-Acetyltransferaseaktivität in B-Zellen sterben an einer Autoimmunerkrankung ähnlich dem humanen Systemischen Lupus Erythematosus

Mäuse mit Acetyltransferase-defizientem p300 spezifisch in B-Zellen starben vorzeitig (Abb. 13). Um die Ursache des Sterbens der Mäuse zu klären, wurden pathologische Analysen auffälliger  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse durchgeführt. Zu den Auffälligkeiten zählten ein Zusammenkauern des Körpers, gestäubtes Fell und weiße Zehen an den Gliedmaßen als Zeichen für Anämie. Die Analysen ergaben, dass die Mäuse Vergrößerungen der Milz, eine Splenomegalie, auswiesen (Abb. 14A und B). Diese trat bei ca. 60% der untersuchten Mäuse im Zusammenhang mit einer krankhaften Schwellung der Lymphknoten, einer so genannten Lymphadenopathie, auf (Daten nicht gezeigt). Die Gewebestruktur der vergrößerten Milz bei kranken  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen war aufgelöst. Es war in diesen Fällen keine Trennung des Parenchyms der Milz, das aus der Roten und Weißen Pulpa besteht, zu erkennen (Abb. 14C). Des Weiteren wies die Milz auch Entzündungen der Arterien, eine so genannte Vaskulitis, auf. Zudem konnte gezeigt werden, dass die vergrößerte Milz der Mäuse eine erhöhte extramedulläre Blutbildung und eine erhöhte Anzahl von Megakaryozyten aufwies (Daten von Sven Gallinat; Daten nicht gezeigt).

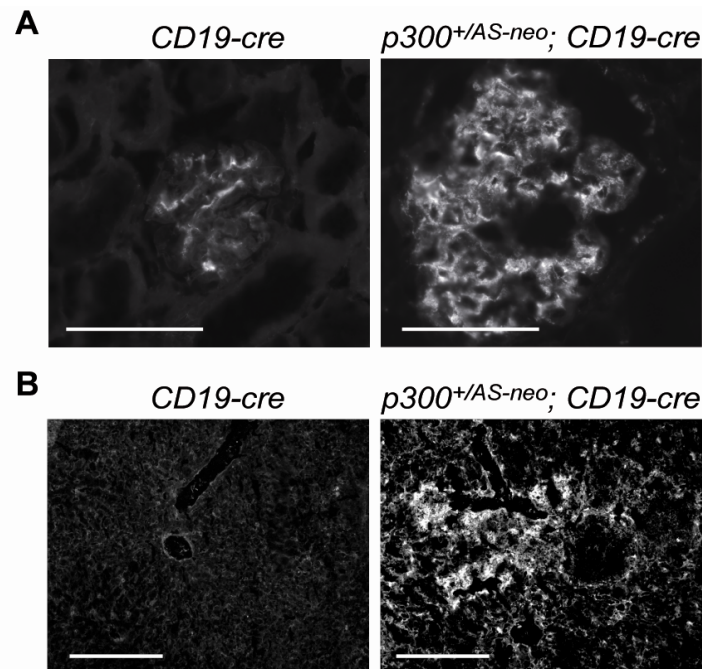
Zusätzlich zur Splenomegalie entwickelten kranke  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen  $CD19-cre$  Kontrollmäusen eine Nierenpathologie. Diese umfasste eine interstitielle Nephritis, Glomerulonephritis und Fibrose (Abb. 14D). Als Fibrose wird eine krankhafte Vermehrung des Bindegewebes bezeichnet. Bei einer Glomerulonephritis werden die kapillaren Gefäße der Nierenkörperchen, die so genannten Glomeruli, vergrößert und häufig mit homogen-gefärbten Proteinablagerungen gefüllt (sklerotisiert). Die Nephritis umfasst auch paravaskuläre Zellinfiltrationen und verdickte Wände der Arterien. Solche Zeichen von Nephritis wurden zusätzlich bei anderen Organen, wie der Milz (Abb. 14C), der Leber (Abb. 14E), den Lungen (Abb. 14F) und den Speicheldrüsen (Daten nicht gezeigt) gefunden. Diese Pathologie der Mäuse wurde in beiden Haltungformen, einzeln belüfteten Käfigsystemen und offenen Käfigen, beobachtet, so dass sie nicht auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Pathogenen der offenen Käfighaltung zurückgeführt werden kann.



**Abbildung 14:** Eine B-Zell-spezifische Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300* verursacht Splenomegalie, Nephritis und Vasculitis.  
**A)** Graphische Darstellung des Milzgewichtes von *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* (*AS*) und *CD19-cre* Mäusen (*WT*) im Alter von 4-6 Monaten. In diesem Altersbereich war die Milz von *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* im Durchschnitt 4,5-fach größer als die Milz der *CD19-cre* Kontrollmäuse (Durchschnittsgewicht: 734 mg vs. 164 mg). Die horizontalen Linien repräsentieren den Median der Milzgewichte. **B)** Milz einer *CD19-cre* Kontrollmaus (110 mg, links) und vergrößerte Milz einer *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus (900 mg, rechts) (von Sven Gallinat). **C)** H&E-gefärbte Schnitte von einer normalgroßen Milz einer *CD19-cre* Kontrollmaus und einer vergrößerten Milz einer *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus. Die vergrößerte Milz wies einen Verlust der Gewebestruktur und eine Vasculitis auf. Pfeile zeigen auf die Zentralarterien der Weißen Pulpa. **D)** H&E-gefärbte Nierenschnitte von einer *CD19-cre* Kontrollmaus und einer *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus mit Nierenpathologie einschließlich sklerotisierten Glomeruli, Nephritis und Fibrose. **E)** Leberschnitte nach H&E-Färbung von einer *CD19-cre* Kontrollmaus und einer *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus mit Infiltrationen mononukleärer Zellen an einem Blutgefäß. **F)** H&E-Färbung von Lungenschnitten einer *CD19-cre* Maus und einer *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus mit Infiltrationen von Zellen um ein Blutgefäß (Pfeile). Größenbalken: 100 µm. (Abbildungen der Schnitte zum Teil von Sven Gallinat).

Diese beschriebenen, pathologischen Befunde der verschiedenen Organe der *p300<sup>+ / AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse deuteten auf eine systemische Erkrankung hin. Da die *p300* Mutation nur in B-Zellen auftrat, konnte eine systemische Autoimmunerkrankung durch Defekte in der B-Zell-Differenzierung hervorgerufen worden sein. Zur weiteren Charakterisierung der Erkrankung wurden indirekte Immunfluoreszenzanalysen von Gefrierschnitten

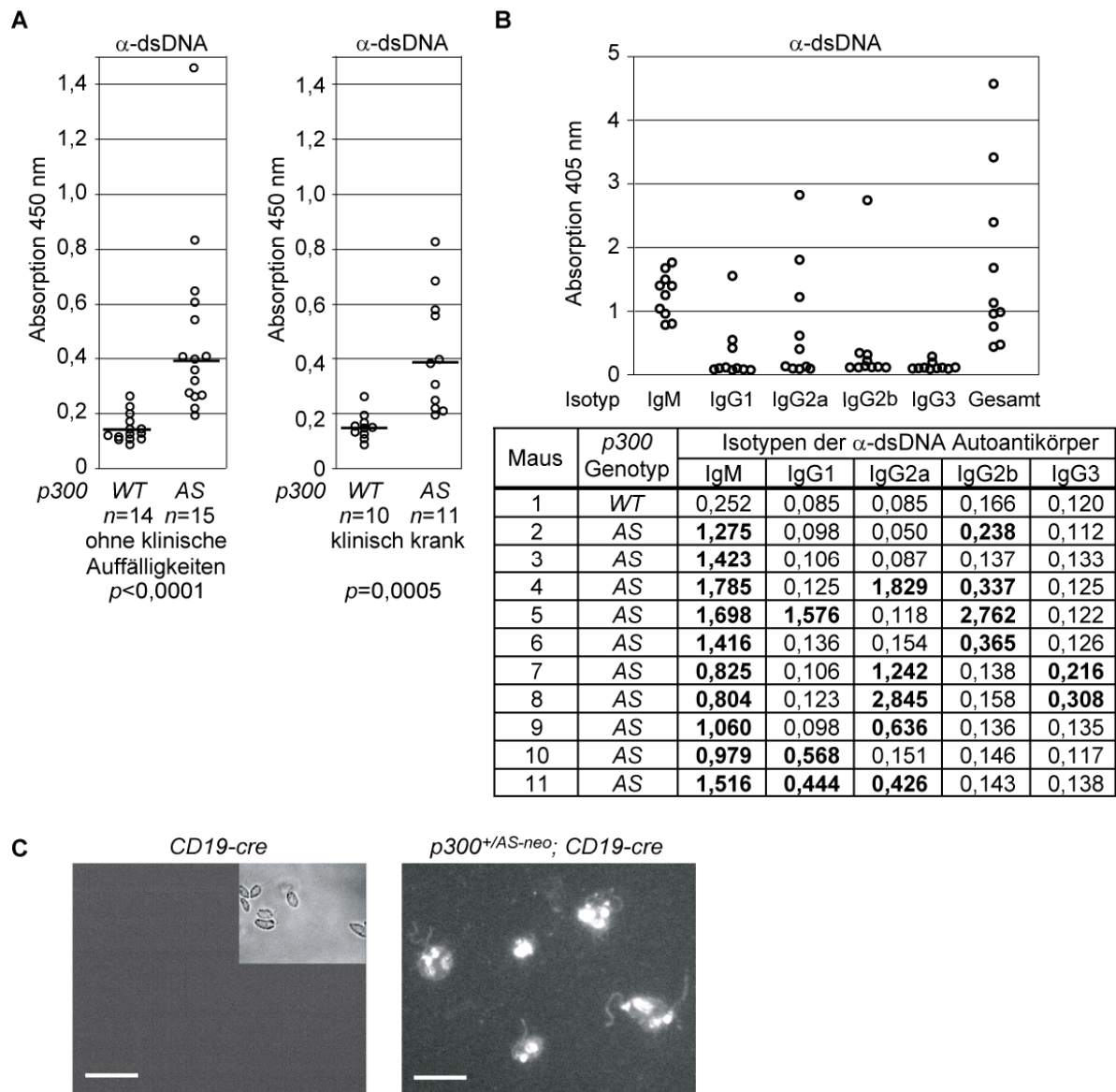
verschiedener Organe durchgeführt. Dafür wurde ein direkter Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper, der die schwere und die leichte Kette der Immunglobuline erkennt, eingesetzt. Die Immunfluoreszenzen zeigten bei  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen Ablagerungen von Immunglobulinkomplexen in den Glomeruli der Nieren (Abb. 15A). Auch die Leber und die Lunge von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen wiesen solche Immunglobulinkomplexe auf (Abb. 15B und Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15:** Eine defiziente p300-Acetyltransferasefunktion in B-Zellen führt zu Ablagerungen von Immunglobulinkomplexen.

**A und B)** Immunhistochemie von Gefrierschnitten der Nieren (A) und der Lebern (B) einer kranken  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus und einer gleichaltrigen  $CD19-cre$  Kontrollmaus mit einem gegen die beiden Ketten der Maus-Immunglobuline (H- und L-Kette) gerichteten FITC-gekoppelten Antikörper. Größenbalken: 50  $\mu\text{m}$  (A) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (B).

Ein weiteres Indiz für das Auftreten einer systemischen Autoimmunerkrankung ist die Produktion von Autoantikörpern. Diesbezüglich wurde die Menge an Antikörpern gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) in den Seren der Mäuse mittels ELISA bestimmt, da sowohl das Auftreten selbst aber auch die Menge an dsDNA-spezifischen Antikörpern Indizien für verschiedene Autoimmunerkrankungen sind. In Abbildung 16A ist zu erkennen, dass  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse eine erhöhte Produktion von dsDNA-spezifischen Antikörpern im Vergleich zu  $CD19-cre$  Mäusen besaßen. Dies war sowohl bei Mäusen ohne klinische Auffälligkeiten als auch bei kranken  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen zu beobachten. Die Nierenpathologie stimmte mit der Produktion der Autoantikörper überein, da bei allen getesteten Mäusen mit beobachteter Nierenschädigung auch eine erhöhte Produktion von dsDNA-spezifischen Antikörpern gemessen wurde (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 16:**  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse produzieren Antikörper gegen dsDNA.

**A)** Mäuse mit Expression von Acetyltransferase-defizientem  $p300$  spezifisch in B-Zellen produzieren sowohl im kranken als auch im äußerlich unauffälligen Zustand Antikörper gegen dsDNA. dsDNA-spezifische Antikörper in Seren von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen (AS) im Vergleich zu Seren von  $CD19-cre$  Kontrollmäusen (WT) wurden mit einem ELISA bestimmt. Dabei wurde zwischen Tieren ohne äußerlichen Auffälligkeiten (links) mit einem Durchschnittsalter von 8,8 Monaten und klinisch kranken Tieren (rechts) mit einem Durchschnittsalter von 9,8 Monaten unterschieden. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median der Absorptionswerte. **B)** Alle getesteten  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse produzieren dsDNA-spezifische Antikörper vom Isotyp IgM und 90% der Mäuse zusätzlich Antikörper vom Isotyp IgG. Die Isotypen der dsDNA-spezifischen Antikörper von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen (AS, n=10) wurden im Vergleich zum Kontrollserum von einer gleichaltrigen  $CD19-cre$  Maus (WT) mit ELISA untersucht. Für die Analyse der  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse wurden die 10 Seren mit höchster Absorption von A ausgewählt. Die erhöhten Absorptionswerte als Zeichen erhöhter Produktion von dsDNA-spezifischen Antikörpern der  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse sind in der Tabelle in dick gekennzeichnet (unten). **C)** Detektion der dsDNA-spezifischen Antikörper im Serum einer repräsentativen  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus im Vergleich zum Serum einer  $CD19-cre$  Maus mittels Immunfluoreszenz von *Crithidia spec.*. Bei der  $CD19-cre$  Kontrollmaus ist im kleinen Bild das dazugehörige Phasenkontrastbild zum Nachweis der Crithidien dargestellt. Größenbalken: 10  $\mu$ m.

Um einen möglichen Klassenwechsel zu überprüfen, die Subklassen der Autoantikörper in Isotyp-spezifischen ELISAs untersucht. Alle getesteten Mäuse mit einer erhöhter Menge an

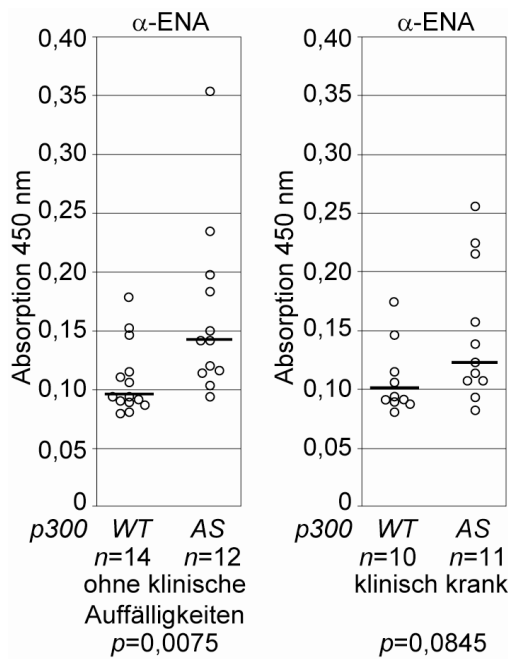


dsDNA-spezifischen Antikörpern produzierten diese vom Isotyp IgM und 90% der Mäuse wiesen zusätzlich dsDNA-spezifische Antikörper des Isotyps IgG auf, der IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 einschließt (Abb. 16B).

Das vorzeitige Sterben der Mäuse, die Schädigungen der verschiedenen Organe, wie Milz, Niere, Leber und Lunge, die Ablagerungen von Immunglobulinkomplexen in verschiedenen Organen und die Produktion von Autoantikörpern, speziell von dsDNA-Antikörpern in hohen Mengen, sind spezifische Merkmale einer humanen Autoimmunerkrankung, dem so genannten Systemischen Lupus Erythematosus (SLE).

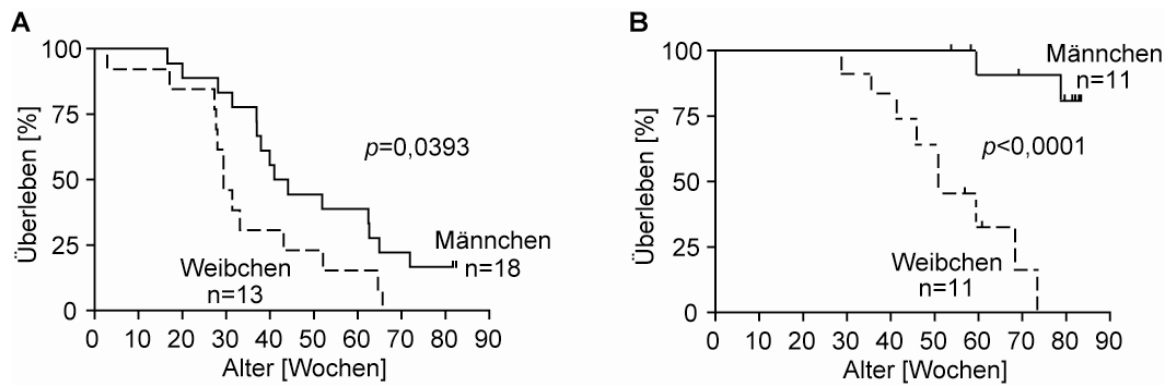
In der Klinik wird routinemäßig eine so genannte *Crithidia spec.* Immunfluoreszenz zum Nachweis dieser Autoimmunerkrankung eingesetzt. *Crithidia spec.* sind Flagellaten, die einen DNA-haltigen Kinetoplasten besitzen, der fast den vollständigen Organismus ausfüllt. Nach Inkubation der Crithidien mit Seren von Mäusen und anschließender Färbung mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen Immunglobuline erhält man eine positive Färbung der DNA in den Crithidien, sofern die Serenproben positiv für dsDNA-spezifische Antikörper sind. Die Seren von  $p300^{+/AS-neo}$ ; *CD19-cre* Mäusen zeigten eine positive Färbung in der Immunfluoreszenz, wohingegen die Seren von *CD19-cre* Mäusen keine Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 16C).

Eine Autoimmunerkrankung wird durch ein weiteres Merkmal, die Produktion verschiedener Klassen von Autoantikörpern, beschrieben. Daher wurde die Produktion weiterer Autoantikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) untersucht. Der Begriff ENA geht auf die ersten Isolierungen von Zellkernantigenen mittels Extraktion zurück. Er umfasst eine Vielzahl von Autoantikörpern gegen definierte Zellkernantigene. Etablierte ENA-Antikörper sind gegen nukleäre Ribonukleinsäurepartikel (nRNP) oder deren Proteine mit teilweise ungeklärten Funktionen (Smith, Sm; Sjögren-Syndrom-A, SS-A), gegen das RNA-Polymerase III assoziierte Protein La (SS-B), die DNA-Topoisomerase I (Scl-70) oder die Histidyl-tRNA-Synthetase (Jo-1) gerichtet. Ähnlich der Produktion von dsDNA-spezifischen Antikörpern war auch bei der Messung der ENA-Antikörper eine erhöhte Produktion bei  $p300^{+/AS-neo}$ ; *CD19-cre* Mäusen zu erkennen (Abb. 17). Diese verstärkte Produktion von ENA-spezifischen Antikörpern war sowohl bei Mäusen ohne klinische Auffälligkeiten als auch bei kranken Mäusen mit geringerer Penetranz zu beobachten. Somit ist zuerst eine Produktion von Autoantikörpern zu beobachten, bevor die Mäuse äußerliche Merkmale einer Erkrankung aufweisen.



**Abbildung 17:**  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse produzieren Antikörper gegen nukleäre Antigene. Die Menge an Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) im Serum von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen (AS) im Vergleich zu  $CD19-cre$  Kontrollmäusen (WT) wurde mittels ELISA bestimmt. Dabei wurden die gleichen Serenproben wie in Abb. 16A untersucht. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median der jeweiligen Absorptionswerte.

Die Autoimmunerkrankung SLE trifft beim Menschen zum Großteil Frauen (Whitacre, 2001). Aufgrund dessen wurden die Überlebensraten der verschiedenen Geschlechter der  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse miteinander verglichen. Um zu überprüfen, ob die Erkrankung spezifisch an einen Stammhintergrund gekoppelt ist, wurden die Mäuse auf zwei verschiedenen gemischten genetischen Stammhintergründen gezüchtet. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigten ein früheres Sterben der Weibchen gegenüber den Männchen (Abb. 18). Dies war sowohl auf einem gemischten genetischen 129/Sv × C57BL/6 (Abb. 18A) als auch auf einem gemischten genetischen 129/Sv × FVB/N Stammhintergrund (Abb. 18B) zu beobachten. Auf dem gemischten genetischen 129/Sv × C57BL/6 Stammhintergrund hatten die Weibchen eine durchschnittliche Lebenserwartung von 29,4 Wochen im Vergleich zu den Männchen mit 42,5 Wochen (Abb. 18A). Im Vergleich dazu trat die Erkrankung bei dem gemischten genetischen 129/Sv × FVB/N Stammhintergrund später ein (Abb. 18B). Die durchschnittliche Lebenserwartung der Weibchen betrug bei diesem Stammhintergrund 49,7 Wochen und die der Männchen konnte aufgrund einer zu langen Lebenszeit nicht berechnet werden. Die pathologischen Untersuchungen dieser Tiere ergab ähnliche Beobachtungen wie die zuvor für den Stammhintergrund 129/Sv × C57BL/6 (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei den Mäusen ähnlich wie beim SLE des Menschen die Ausprägung der Erkrankung vorrangig bei den Weibchen stattfindet.



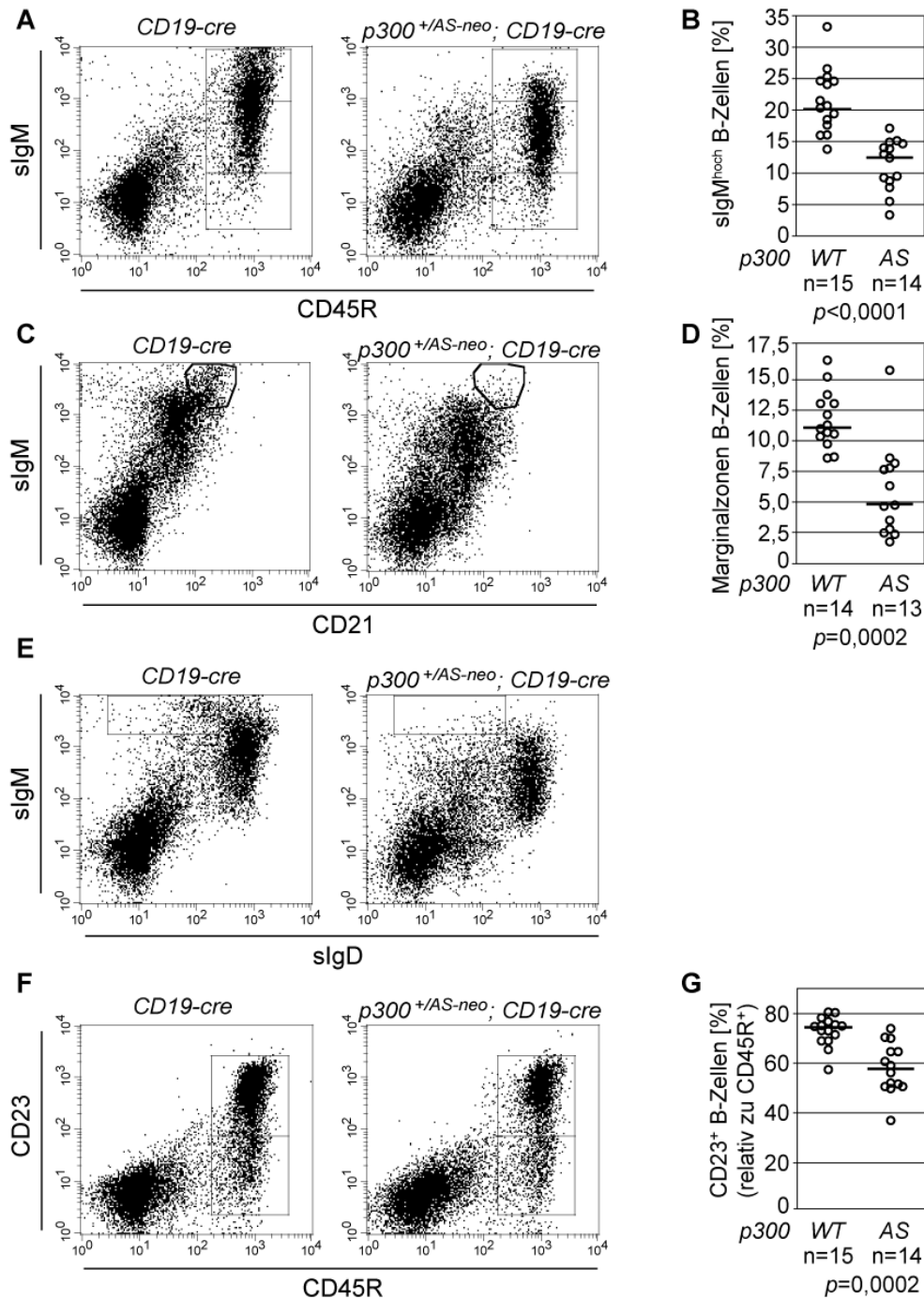
**Abbildung 18:** Weibliche  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse sterben früher als männliche  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse auf zwei verschiedenen gemischten genetischen Stammhintergründen.

**A)** Kaplan-Meier-Kurven von männlichen und weiblichen  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen mit einem gemischten 129/Sv  $\times$  C57BL/6 Stammhintergrund. **B)** Kaplan-Meier-Kurven von männlichen und weiblichen  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen mit einem gemischten 129/Sv  $\times$  FVB/N Stammhintergrund.

#### 4.1.3 $p300$ -Acetyltransferaseaktivität ist für die Differenzierung der B-Zellen notwendig

Da die Expression des Acetyltransferase-defizienten  $p300AS$  auf die B-Zellen der  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse beschränkt war, wurde die Differenzierung der B-Zellen untersucht. Dafür wurden Knochenmarks- und Milzzellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen und deren  $CD19-cre$  Wurfgeschwistern aufgereinigt. Die Expression verschiedener Differenzierungsmarker von diesen Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch im FACS analysiert. Die B-Zellen im Knochenmark von äußerlich gesunden als auch kranken  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen zeigten die zuvor erwähnte Reduktion rezirkulierender B-Zellen (Daten nicht gezeigt), die bereits bei jungen Mäusen im Alter von bis zu 12 Wochen auftrat (Forster *et al.*, 2007; Daten von Sven Gallinat). Ansonsten wurden keine weiteren auffälligen Unterschiede in der Differenzierung der B-Zellen im Knochenmark beobachtet. Die Anzahl von  $CD3^+$  T-Zellen und  $CD45R^+$  B-Zellen in der Milz relativ zur Milzgröße war in gesunden als auch kranken  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen ähnlich derer in  $CD19-cre$  Kontrollmäusen (Daten nicht gezeigt).

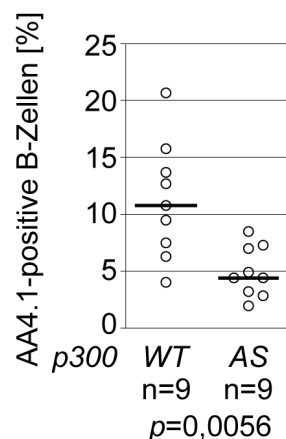
Die FACS-Analysen von repräsentativen 5 Monate alten, gesunden, weiblichen Wurfgeschwistern der verschiedenen Genotypen und die jeweilige Quantifizierung einer Gruppe von Mäusen sind in Abbildung 19 zusammengefasst. Eine Färbung der B-Zellen mit einem Antikörper gegen den B-Zell-spezifischen Oberflächenmarker  $CD45R$  und einem  $sIgM$ -Antikörper zeigte eine Reduktion der B-Zellen mit hoher  $sIgM$ -Expression (Abb. 19A und B). Diese Reduktion war konsistent mit einer erhöhten Menge an B-Zellen ohne  $sIgM$  auf.



**Abbildung 19:** Abnormale Differenzierung der B-Zellen von *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen.

**A)** *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse produzieren im Vergleich zu *CD19-cre* Kontrollmäusen eine reduzierte Anzahl von B-Zellen mit hoher slgM-Expression (oberes Viereck; 5,7% vs. 20,3%). Milzzellen von 5 Monate alten, repräsentativen, weiblichen Wurfgeschwistern der verschiedenen Genotypen wurden mit den angegebenen Antikörpern markiert und mittels FACS analysiert (A, C, E und F). Die *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus war zum Zeitpunkt der Analyse ohne klinische Auffälligkeiten und hatte eine Milzgröße von 440 mg vs. 110 mg der Kontrollmaus. **B)** Statistische Auswertung von in A beschriebenen FACS-Messungen von Mäusen im Alter von 4-6 Monaten. Horizontale Linien stellen den Median dar. **C)** *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse haben eine reduzierte Anzahl von MZ-B-Zellen (slgM<sup>hoch</sup>CD21<sup>hoch</sup>). Milzzellen wurden mit den angegebenen Antikörpern markiert und mittels FACS analysiert. **D)** Statistische Auswertung von in C beschriebenen FACS-Messungen von Mäusen im Alter von 4-6 Monaten. Horizontale Linien verdeutlichen den Median. **E, F und G)** *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse produzieren eine abnormale Population reifer B-Zellen, die slgD<sup>+</sup> (E) aber mit dem Alter zunehmend CD23<sup>+</sup> sind (F und G). **G)** Statistische Auswertung der prozentualen Anteile an CD23<sup>+</sup> B-Zellen bezogen auf CD45R<sup>+</sup> von Mäusen im Alter von 4-6 Monaten mit der in F dargestellten FACS-Messung. Horizontale Linien stellen den Median dar. AS: *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse; WT: *CD19-cre* Mäuse.

In Übereinstimmung mit der Reduktion der B-Zellen mit hoher sIgM-Expression wurde keine Erhöhung der Anzahl der B1 B-Zellen (sIgM<sup>hoch</sup>CD43<sup>+</sup>) festgestellt (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigten die *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* Mäuse eine reduzierte Anzahl an MZ-B-Zellen (sIgM<sup>hoch</sup>CD21<sup>hoch</sup>) in der Milz (Abb. 19C und D). Diese Reduktion der MZ-B-Zellen wurde durch immunhistologische Färbungen bestätigt (Forster *et al.*, 2007; Jadwiga Jablonska, persönliche Mitteilung). Die B-Zellen von *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* Mäusen wiesen keine Veränderungen in der sIgD-Expression, einem Marker für reife B-Zellen, auf (Abb. 19E). Somit wurde kein Unterschied in der Differenzierung der folliculären B-Zellen beobachtet.



**Abbildung 20:** *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* Mäuse besitzen im Vergleich zu *CD19-cre* Mäusen eine reduzierte Anzahl transitioneller B-Zellen in der Milz. Milzzellen von 3-6 Monate alten *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* (AS) und *CD19-cre* Mäusen (WT) wurden mit den Antikörpern gegen CD45R und AA4.1, einem Marker für transitionelle B-Zellen, angefärbt und im FACS analysiert. Horizontale Linien repräsentieren den Median der jeweiligen Prozentwerte.

Im Gegensatz zur unveränderten sIgD-Expression wurde bereits bei gesunden *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* Mäusen eine Reduktion eines weiteren Differenzierungsmarkers, CD23, beobachtet (Abb. 19F und G). Das zunehmende Alter und das Fortschreiten der Krankheit führte zu einem vollständigen Fehlen von CD23<sup>+</sup> B-Zellen (Forster *et al.*, 2007; Daten von Sven Gallinat). Zusammenfassend ist festzustellen, dass *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* Mäuse aberrante reife B-Zellen produzieren. Diese sind zwar positiv für sIgD, aber negativ für CD23. Eine Untersuchung von Mäusen unterschiedlichen Alters zeigte, dass die abnormale Differenzierung der B-Zellen einer Produktion von Autoantikörpern zeitlich vorausging (Daten nicht gezeigt).

Eine Analyse der transitionellen B-Zellen (AA4.1<sup>+</sup>) der Milz zeigte eine Reduktion des Anteils an AA4.1<sup>+</sup>-Zellen an allen B-Zellen in *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* Mäusen im Vergleich zu *CD19-cre* Kontrollmäusen (Abb. 20). Dies war konsistent mit der Reduktion der B-Zellen mit hoher sIgM-Expression, da transitionelle B-Zellen eine hohe sIgM-

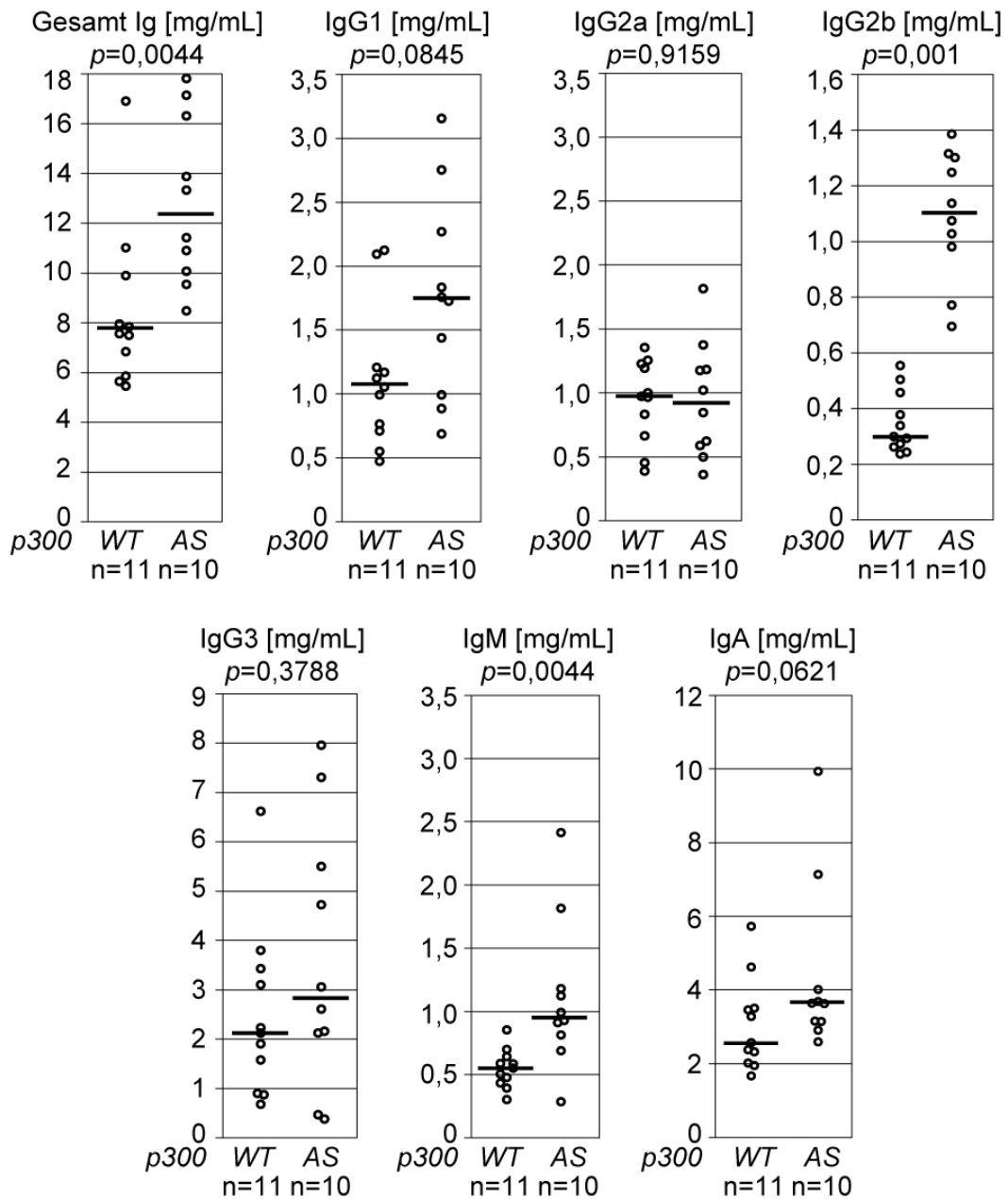
Expression besitzen. Hingegen waren die absoluten Zahlen der transitionellen B-Zellen zwischen  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  und  $CD19-cre$  Mäusen ohne signifikanten Unterschied ( $3,0 \pm 1,9 \times 10^6$  vs.  $2,6 \pm 1,0 \times 10^6$  AA4.1<sup>+</sup> Zellen; n=6; p=0,94).

#### 4.1.4 Die Acetyltransferaseaktivität von p300 hat einen Einfluss auf die Bildung der Immunglobuline

Aufgrund der abnormalen Differenzierung der B-Zellen in den  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen wurde die Funktionsfähigkeit der Zellen *in vivo* untersucht. Dafür wurden zunächst die Konzentrationen an Immunglobulinen im Serum mittels Isotyp-spezifischen ELISAs bestimmt. Die Gesamtkonzentration an Immunglobulinen war bei 10 Monate alten  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen im Durchschnitt 1,6-fach höher als bei gleichaltrigen  $CD19-cre$  Kontrollmäusen desselben Wurfes (Abb. 21). Dies wurde insbesondere durch eine signifikante Erhöhung der Immunglobuline IgG2b und IgM verursacht. Für IgG2b wurde ein Anstieg um das 3,7-fache und für IgM ein Anstieg um das 2,0-fache beobachtet. Die sIgD<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>-B-Zellen der  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse sind somit in der Lage, Immunglobuline zu produzieren. Daher wurde die humorale Immunantwort dieser Mäuse gegenüber dem T-Zell-abhängigen Antigen Ovalbumin untersucht. Vor der Immunisierung der Mäuse mit Ovalbumin produzierten die  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse bereits im Durchschnitt 2-mal mehr Ovalbumin-spezifische Antikörper als die  $CD19-cre$  Kontrollmäuse (Abb. 22B). Diese erhöhte Produktion von Ovalbumin-spezifischen Immunglobulinen bestätigte die zuvor beobachtete erhöhte Anzahl an Immunglobulinen bei den Mäusen mit reduzierter p300-Acetyltransferasefunktion (Abb. 21). Nach der Immunisierung wurde den Mäusen im wöchentlichen Abstand Serum entnommen, um ihre Immunglobulinproduktion über die Zeit mittels weiteren ELISAs zu beobachten (Abb. 22A).

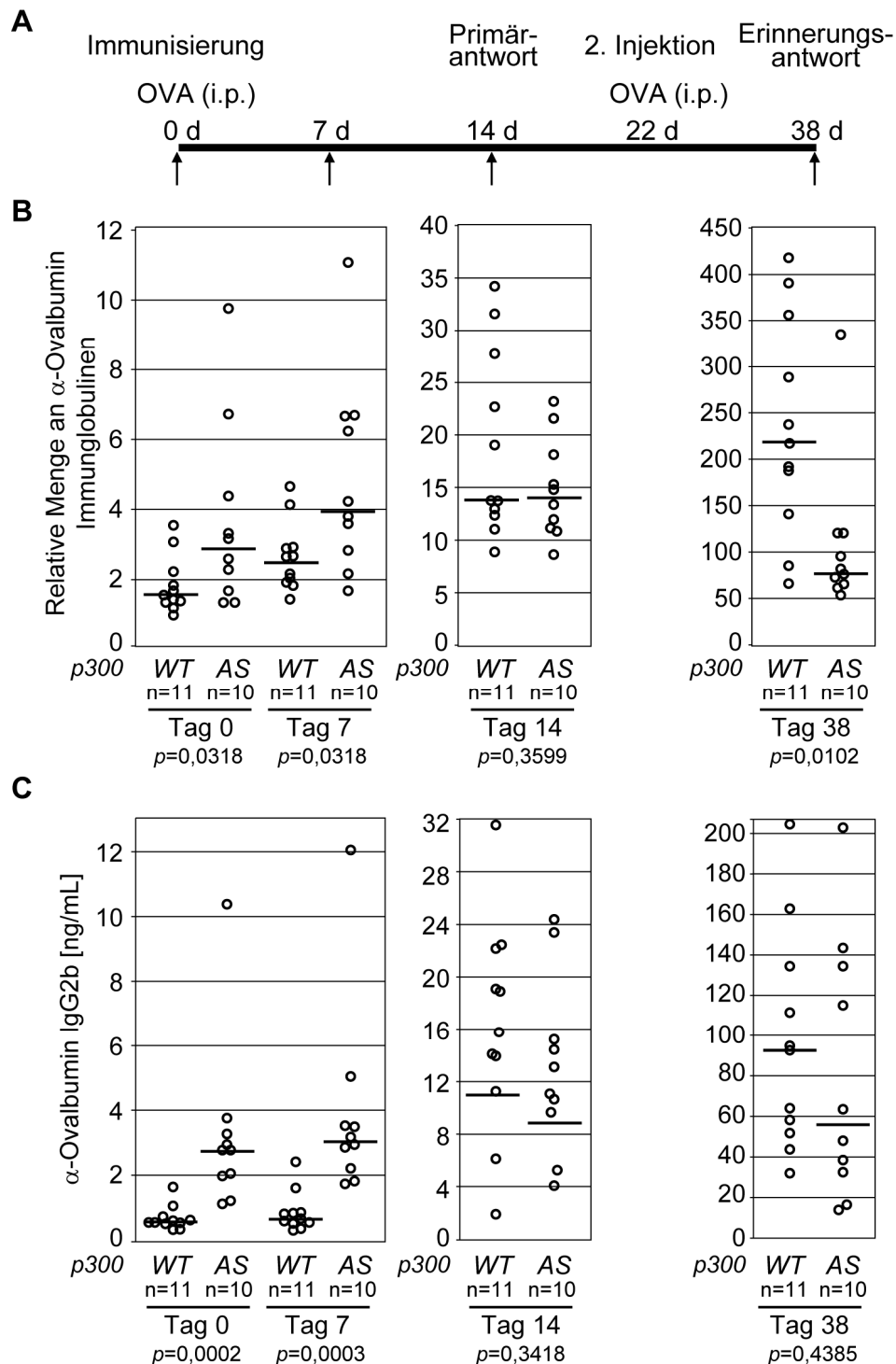
In der ersten Woche nach der Immunisierung blieben die relativen Mengen an Ovalbumin-spezifischen Antikörpern ungefähr gleich (Abb. 22B). Somit war zu diesem Zeitpunkt noch keine Primärantwort gegenüber dem Antigen Ovalbumin zu beobachten. Die erhöhte Produktion von Ovalbumin-spezifischen Immunglobulinen in  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen im Vergleich zu  $CD19-cre$  Kontrollmäusen war weiterhin erkennbar. Zwei Wochen nach der Immunisierung war ein Anstieg der relativen Mengen an Ovalbumin-spezifischen Antikörpern aufgrund der Primärantwort zu beobachten. Dieser war zwischen den  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen und deren  $CD19-cre$  Kontrollmäusen gleich. Somit war der anfängliche Unterschied in der Menge an Immunglobulinen nicht mehr deutlich. Die Erinnerungsantwort 16 Tage nach einer zweiten Injektion mit Ovalbumin (Abb. 22A)

war jedoch in  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen im Vergleich zu  $CD19-cre$  Kontrollmäusen deutlich reduziert. Demzufolge wiesen Mäuse mit einer reduzierten p300-Acetyltransferaseaktivität eine zu Kontrollmäusen vergleichbare Primärantwort auf. Im Gegensatz dazu zeigten sie aber eine reduzierte Erinnerungsantwort.



**Abbildung 21:** B-Zellen von Mäusen mit Acetyltransferase-defizientem p300 produzieren mehr Immunglobuline, insbesondere IgG2b und IgM.

Die Konzentration an Immunglobulinisotypen im Serum von 10 Monate alten  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen (AS) und  $CD19-cre$  Kontrollmäusen (WT) desselben Wurfes wurde mit Isotyp-spezifischen ELISAs bestimmt. Die Gesamt-Immunglobulinkonzentrationen (Gesamt Ig; links) stellen eine jeweilige Addition der Werte der einzelnen Isotypen dar. Die horizontalen Linien repräsentieren die Medianwerte der jeweiligen Immunglobulinkonzentrationen.

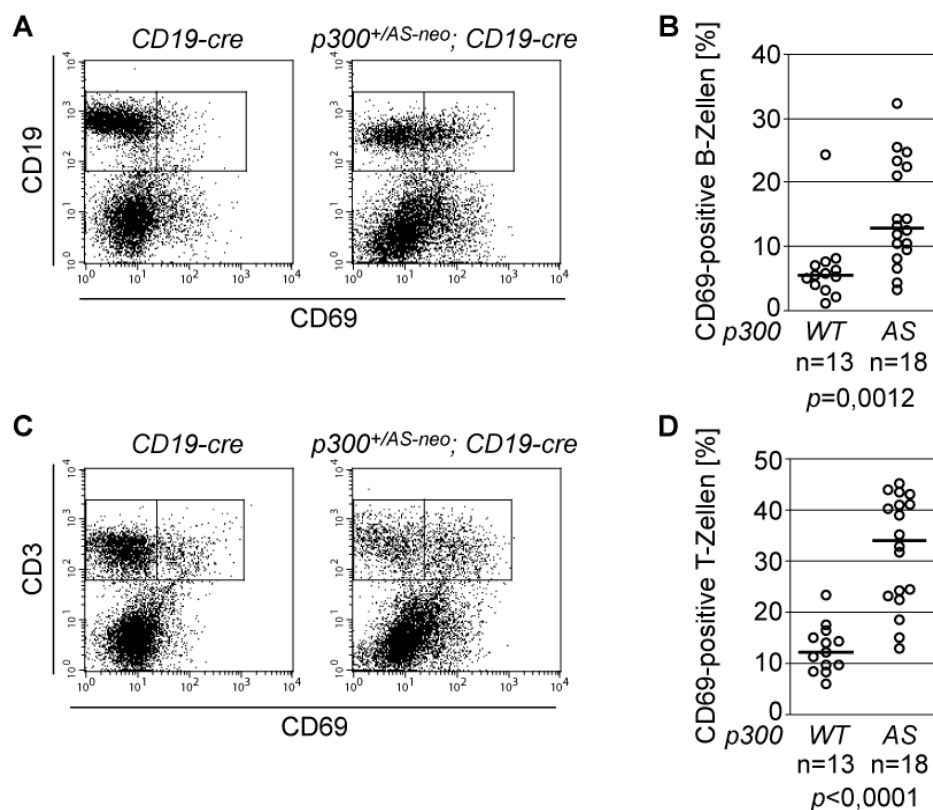


**Abbildung 22:**  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse zeigen eine normale Primär- aber eine reduzierte Erinnerungantwort *in vivo*.

**A)** Schema der Vorgehensweise zum Test der humoralen Immunantwort der Mäuse. Nach der Immunisierung der Mäuse zum Zeitpunkt 0 wurde ihnen in bestimmten Zeitabständen (Pfeile) Serum zur weiteren Analyse entnommen. **B)** Die  $CD19-cre$  (WT) und  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse (AS) von Abb. 21 wurden im Alter von 10 Monaten mit dem  $T_H2$ -Zell-abhängigen Antigen Ovalbumin (OVA) mittels intraperitonealer Injektion (i.p.) immunisiert. Nach 22 Tagen erhielten die Mäuse eine zweite Injektion zum Testen der Erinnerungantwort. Serenproben vom Tag 0 (vor Immunisierung), 7, 14 (Primärantwort) und 38 (Erinnerungsantwort) wurden mittels ELISA auf die Antikörpermenge gegenüber Ovalbumin untersucht. Die horizontalen Linien repräsentieren die Medianwerte der jeweiligen Immunglobulinmengen. **C)**  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse (AS) produzieren mehr Ovalbumin-spezifische Antikörper des Isotyps IgG2b als  $CD19-cre$  Kontrollmäuse (WT). Die Serenproben von A wurden mittels ELISA auf Ovalbumin-spezifische Antikörper des Isotyps IgG2b untersucht. Die horizontalen Linien repräsentieren die Medianwerte der jeweiligen Immunglobulinmengen.



Zusätzlich zur Bestimmung der gesamten Anzahl Ovalbumin-spezifischer Immunglobuline wurde speziell die Konzentration der Antikörper des Isotypes IgG2b untersucht, da IgG2b das Immunglobulin mit dem größten Unterschied zwischen den Mäusen bereits ohne Immunisierung war. Die  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse zeigten auch bei Antigen-spezifischen IgG2b-Antikörpern eine erhöhte Anzahl im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 22C, Tag 0 und 7). Ähnlich dem Ergebnis der Gesamt-Immunglobuline gegen Ovalbumin war auch die Menge an IgG2b zum Zeitpunkt der Primärantwort ähnlich (Abb. 22C, Tag 14). Im Gegensatz dazu war der Unterschied in der Erinnerungsantwort von der Gesamt-Immunglobulinmenge (Abb. 22B, Tag 38) bei den Ovalbumin-spezifischen IgG2b's nicht mehr deutlich (Abb. 22C, Tag 38). Dies zeigt, dass die  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse bei der Erinnerungsantwort mehr Ovalbumin-spezifische IgG2b's als Antikörper anderer Isotypen produzieren.



**Abbildung 23:** Mäuse mit Acetyltransferase-defizientem p300 bilden im Vergleich zu *CD19-cre* Kontrollmäusen eine erhöhte Anzahl an aktivierten Lymphozyten.

**A und B)** Milzzellen von einer 4,5 Monate alten  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus und der *CD19-cre* Kontrollmaus des gleichen Wurfes wurden mit dem Antikörper CD69, der an aktivierte Lymphozyten bindet, und dem B-Zell-spezifischen Antikörper CD19 markiert und mittels FACS untersucht. Die Punktdiagramme von A und C sind von einem repräsentativen Mauspaar. **B)** Graphische Darstellung der Ergebnisse verschiedener FACS-Messungen entsprechend A von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  (AS) und *CD19-cre* Mäusen (WT) im Alter von 3-8 Monaten. Die horizontalen Linien verdeutlichen die Medianwerte der jeweiligen Prozentwerte. **C und D)** FACS-Doppelfärbungen von Milzzellen der angegebenen Genotypen mit  $\alpha$ -CD69 als Aktivierungs- und  $\alpha$ -CD3 als T-Zellmarker. **D)** Graphische Darstellung der FACS-Ergebnisse nach C von Milzzellen der Mäuse aus B. Die horizontalen Linien repräsentieren jeweils den Median der Prozentwerte.

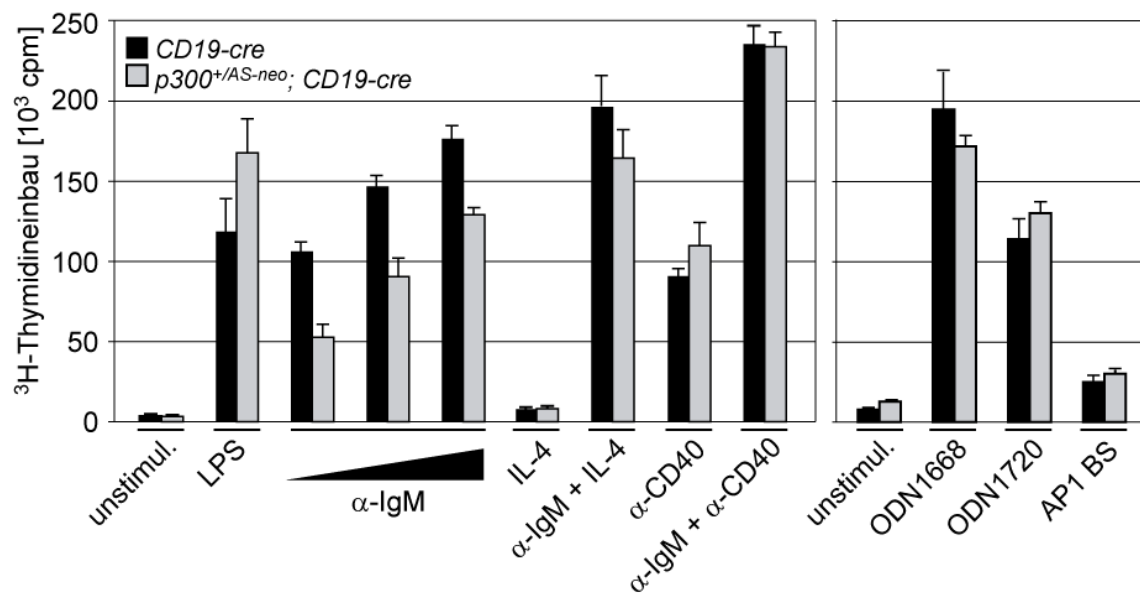
Während einer Autoimmunerkrankung bilden die aktivierten B- und T-Zellen einen Rückkopplungseffekt. Dieser führt zur weiteren Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten (Shlomchik *et al.*, 2001; Edwards and Cambridge, 2006). Daher wurde die Anzahl an aktivierten B- und T-Zellen in der Milz der Mäuse durchflusszytometrisch bestimmt. Milzzellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen zeigten eine erhöhte Anzahl an sowohl aktivierten B-Zellen ( $CD69^+CD19^+$ ; Abb. 23A und B) als auch aktivierten T-Zellen ( $CD69^+CD3^+$ ; Abb. 23C und D). Dies spiegelt die vorher beobachteten Ergebnisse der erhöhten Mengen an Immunglobulinen wieder (Abb. 21). Weiterhin liegt es nahe, dass die T-Zellen zur Ausprägung der Autoimmunerkrankung in den  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen beitragen.

#### 4.1.5 Reduzierte p300-Acetyltransferaseaktivität verringert die Proliferation der B-Zellen nach Stimulation des BCR-Signalweges

Die Entwicklung und Differenzierung der B-Zellen wird durch verschiedene Signalwege beeinflusst (siehe Einleitung). Zum Beispiel beeinflusst der BCR-Signalweg alle wesentlichen Differenzierungs- und Entwicklungsentscheidungen von B-Zellen, einschließlich der Positiv- und Negativselektion (siehe 1.6.6, Abb. 10) (Jun and Goodnow, 2003). Ferner wird die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen durch den Interleukin-Signalweg gesteuert (Davis *et al.*, 2007; Rieger and Bar-Or, 2008). Die Antwort von B-Zellen nach Aktivierung durch T-Zellen ist ein weiterer Signalweg, der auch zur Proliferation der B-Zellen beiträgt (Coffman *et al.*, 1988; Snow *et al.*, 1994; Jelinek, 2000). Des Weiteren ist an dieser Stelle die Stimulation des Toll-ähnlichen Rezeptors (*Toll-like receptor*, TLR) zu nennen (Pasare and Medzhitov, 2005).

Aufgrund der verschiedenen Signalwege, die das Schicksal der B-Zellen beeinflussen, wurde untersucht, ob die B-Zellen der Mäuse mit Acetyltransferase-defizientem p300 nach einer Aktivierung der verschiedenen Signalwege proliferieren. Dafür wurden primäre, naive B-Zellen der Milz von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  und  $CD19-cre$  Mäusen isoliert und in Kultur mit unterschiedlichen Stimuli behandelt (*ex vivo*). Die Messung der Proliferation erfolgte durch den Einbau von radioaktiv-markiertem  $^3\text{H}$ -Thymidin während der Zellteilung. Bei einer *ex vivo* Aktivierung der B-Zellen mit einem nicht-physiologischen Agens, in diesem Fall Lipopolysaccharid (LPS), war kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollmäusen und  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen zu erkennen (Abb. 24). Ähnliches war bei der Stimulation des Interleukin-Signalweges der B-Zellen durch Zugabe von Interleukin-4 (IL-4) in Kombination mit  $\alpha$ -IgM zur Steigerung der Proliferation zu

beobachten. IL-4 allein führte nicht zur Proliferation der B-Zellen. Die Antwort der B-Zellen nach einem Kontakt mit T-Zellen wurde durch die Zugabe von  $\alpha$ -CD40, das auf T-Zellen exprimiert wird, gemessen (siehe 1.6.4). Diese Stimulation der B-Zellen zeigte ebenso keinen Unterschied zwischen beiden Genotypen, selbst wenn die Proliferation durch zusätzliche Inkubation mit  $\alpha$ -IgM verstärkt wurde (Abb. 24).



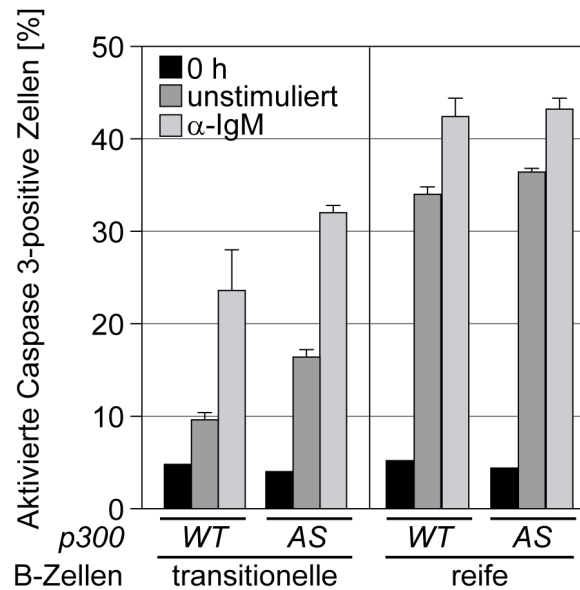
**Abbildung 24:** Mäuse mit einer Expression von Acetyltransferase-defizientem p300 spezifisch in B-Zellen weisen eine reduzierte Proliferation nach einer Aktivierung des BCR-Signalweges auf. Primäre, naive B-Zellen wurden aus der Milz von *CD19-cre* (schwarz) und *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen (grau) ohne klinische Auffälligkeiten in einem Alter von 4-5 Monaten durch magnetische Depletion angereichert. Anschließend wurden die Zellen mit LPS, verschiedenen Konzentrationen an  $\alpha$ -IgM, IL-4,  $\alpha$ -CD40 bzw. unterschiedlichen Kombinationen dieser stimuliert. Die Proliferation wurde auch durch Zugabe des Phosphorthiolat-Oligodesoxynukleotides ODN1668, einem Agonisten des TLR-9, bzw. des ODN1720, dem das CpG-Motiv von ODN1668 fehlt, und einem Kontroll-ODN mit einer AP-1-Bindestelle (AP1 BS) untersucht. Nach 72 h oder 49 h im Fall der Stimulation mit ODNs wurde die Proliferation durch den Einbau von mit <sup>3</sup>H-radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Das Ausplattieren der Zellen und die darauf folgende Messung der Proliferation erfolgten in Triplikaten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Triplikate.

Zur Untersuchung der Reaktion auf den TLR-Signalweg wurde TLR-9 gewählt, da dieser durch Bindung mit Selbstantigenen eine Ko-Stimulation der autoreaktiven B-Zellen einleitet (Krieg, 2002). Der TLR-9 erkennt nicht-methylierte CpG-Sequenzen in der DNA. Dies führt dann zu einer intrazellulären Aktivierung einer Signalkaskade. Bei Gabe eines Agonisten von TLR-9, dem Phosphothiolat-Oligodesoxynukleotid 1668 (ODN1668), wiesen die B-Zellen der verschiedenen Genotypen auch eine ähnliche Proliferation auf (Abb. 24). Es wurde zusätzlich ODN1720, dem das CpG-Motiv von ODN1668 fehlt und somit katalytisch inaktiv ist, und ein ODN mit einer AP-1-Bindestelle als Negativkontrolle eingesetzt. Das ODN1720 zeigte einen schwächeren Effekt auf die Proliferation der B-Zellen ohne Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Im Gegensatz zu den zuvor

untersuchten Signalwegen wies die Stimulation des BCR-Signalweges mittels Zugabe von  $\alpha$ -IgM eine reduzierte Proliferation der B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen im Vergleich zu denen von  $CD19-cre$  Kontrollmäusen auf. Der Unterschied war auch bei verschiedenen Konzentrationen von  $\alpha$ -IgM zu beobachten. Dabei war er bei niedriger  $\alpha$ -IgM Konzentration am höchsten (2-fach) und nahm mit der Zunahme der Konzentration ab. Zusammenfassend zeigt dies, dass die Positiv- und Negativselektion der B-Zellen in den  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen aufgrund der Expression des Acetyltransferase-defizienten p300 beeinträchtigt war.

Die verringerte Antwort der B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen gegenüber der Stimulation des BCR-Signalweges kann entweder direkt durch eine reduzierte Proliferation oder indirekt durch eine erhöhte Apoptose der B-Zellen verursacht werden. Zur Unterscheidung zwischen beiden Möglichkeiten wurde die Apoptose der transitionellen und der reifen B-Zellen vor und nach Stimulation mit  $\alpha$ -IgM gemessen. Hierfür wurden B-Zellen aus der Milz isoliert. Ein Teil der B-Zellen wurde mit  $\alpha$ -IgM stimuliert, wohingegen der andere Teil unbehandelt blieb. Danach wurde die Apoptose mittels Markierung der B-Zellen mit einem Antikörper, der die Aktivierung der Caspase 3 als eins der Merkmale apoptotischer Zellen erkennt, mittels FACS bestimmt. Ein weiterer Antikörper,  $\alpha$ -AA4.1, wurde zur Unterscheidung zwischen transitionellen ( $AA4.1^+$ ) und reifen B-Zellen ( $AA4.1^-$ ) während der FACS-Messung eingesetzt.

Die Anzahl apoptotischer transitioneller B-Zellen im Vergleich zu reifen B-Zellen direkt nach der Isolierung war ähnlich (Abb. 25). Dabei bestand auch kein Unterschied zwischen B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  und  $CD19-cre$  Mäusen. Nach einer 16-stündigen Kultivierung der B-Zellen zeigten transitionelle B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen eine erhöhte Apoptose im Vergleich zu denen von  $CD19-cre$  Kontrollmäusen. Dies war sowohl nach Stimulation der B-Zellen mit  $\alpha$ -IgM als auch bei unbehandelten B-Zellen zu beobachten. Zum Teil kann dadurch die reduzierte Anzahl transitioneller B-Zellen in  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen erklärt werden (Abb. 20). Im Gegensatz zu den transitionellen B-Zellen gab es keinen Unterschied in der Anzahl apoptotischer, reifer B-Zellen zwischen  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen und  $CD19-cre$  Kontrollmäusen, sowohl mit Stimulation als auch ohne (Abb. 25). Diese reifen B-Zellen sind diejenigen Zellen, die auf eine Stimulation des BCR-Signalweges reagieren. Demzufolge wurde die reduzierte Reaktion der B-Zellen nach Stimulation des BCR-Signalweges aufgrund einer verminderten Proliferation der Zellen und nicht aufgrund erhöhter Apoptose hervorgerufen.



**Abbildung 25:** Die transitionellen jedoch nicht die reifen B-Zellen von und  $p300^{+/AS-neo}$ ;  $CD19-cre$  Mäusen zeigen eine erhöhte Apoptose nach Stimulation des BCR-Signalweges.

Primäre, naive B-Zellen aus der Milz von  $CD19-cre$  (WT) und  $p300^{+/AS-neo}$ ;  $CD19-cre$  Mäusen (AS) ohne klinische Auffälligkeiten im Alter von 4-5 Monaten wurden durch magnetische Depletion angereichert. Die Zellen wurden für 16 h mit  $\alpha$ -IgM stimuliert (hellgrau) oder unbehandelt gelassen (dunkelgrau). Danach wurden sie mit dem Antikörper AA4.1 zum Unterscheiden zwischen unreifen/transitionellen (AA4.1<sup>+</sup>) und reifen B-Zellen (AA4.1<sup>-</sup>) und einem Antikörper, der gegen die aktivierte Caspase 3 gerichtet ist und somit apoptotische Zellen erkennt, markiert. Direkt nach der Aufreinigung der Zellen wurde auch eine Doppelfärbung durchgeführt (0 h, schwarz), um den Anteil an apoptotischen Zellen in frisch isolierten primären, naiven B-Zellen zu bestimmen. Die Prozentwerte repräsentieren den Anteil an apoptotischen Zellen der jeweiligen B-Zell-Population, unreifen bzw. reifen B-Zellen. Das Ausplattieren der B-Zellen und die FACS-Messung erfolgten in Triplikaten. Die Fehlerbalken verdeutlichen die Standardabweichungen der Triplikate.

#### 4.1.6 Acetyltransferase-defizientes p300 beeinflusst die Expression zahlreicher Gene in B-Zellen

Zur molekularen Analyse des Einflusses der p300 Acetyltransferasefunktion wurde zunächst das Genexpressionsprofil der B-Zellen mit einem cDNA-Microarray analysiert. Der Microarray umfasste ca. 21.000 verschiedene, murine cDNAs. Für den Microarray wurden primäre B-Zellen der Milz durchflusszytometrisch anhand der sIgD-Expression und der damit verbundenen CD23-Expression (siehe 4.3) isoliert. Es wurde eine kranke  $p300^{+/AS-neo}$ ;  $CD19-cre$  Maus mit fehlender Expression von CD23 im Vergleich zur gleichaltrigen  $CD19-cre$  Kontrollmaus untersucht. Durch den Einsatz der erkrankten  $p300^{+/AS-neo}$ ;  $CD19-cre$  Maus konnten Unterschiede in der Genexpression besser erkannt werden, da diese höher als bei jüngeren Mäusen ohne klinische Auffälligkeiten sein sollten.

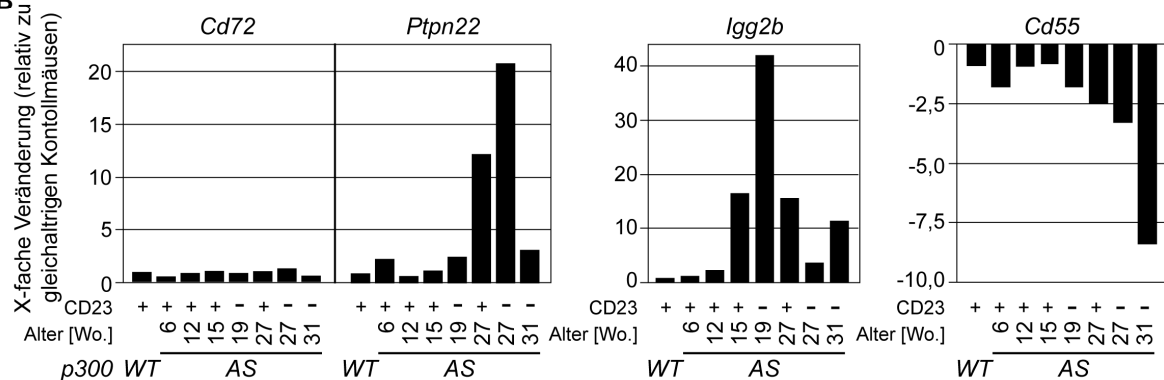
Mit dem Microarray konnten nach der statistischen Auswertung von Birgit Samans insgesamt 554 annotierte Gene, deren Expression mehr als 3-fach in  $p300AS$ -exprimierenden B-Zellen verändert war, identifiziert werden (siehe Anhang). Von diesen

wurden 267 Gene in den B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen herunterreguliert und 287 Gene hochreguliert. Insgesamt wurden 7 von 8 ausgewählte deregulierte Gene mit einem unabhängigen Mauspaar ohne klinische Auffälligkeiten mittels qRT-PCR verifiziert (Abb. 26A). Zu diesen zählte unter anderem das hochregulierte *Ighg*, das für die schwere Kette von IgG2b kodiert, und das hochregulierte *Ptpn22*, das für eine Tyrosinphosphatase kodiert und von dem die Beteiligung an verschiedenen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden konnte (Vang *et al.*, 2005). Des Weiteren konnten auch Gene, die eine Rolle im BCR-Signalweg besitzen, als herunterregulierte Gene identifiziert werden, wie zum Beispiel *Hcph* oder *Rac2*.

A

Symbol	Name	X-fache Veränderung Microarray	Richtung	X-fache Veränderung qRT-PCR
<i>Ms4a1</i>	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	17,3	reprimiert	48,3
<i>Hcph</i>	Hemopoietic cell phosphatase ( <i>Shp1</i> )	10,3	reprimiert	6,7
<i>Daf1</i>	Decay accelerating factor 1 ( <i>Cd55</i> )	10,3	reprimiert	9,1
<i>Rac2</i>	RAS-related C3 botulinum substrate 2	9,8	reprimiert	3,7
<i>Il2rg</i>	Interleukin 2 receptor, gamma chain	8,3	reprimiert	2,5
<i>Ighg</i>	Immunoglobulin heavy chain, gamma polypeptide ( <i>Igg2b</i> )	5,6	aktiviert	12,1
<i>Ptpn22</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor	2,4	aktiviert	4,0

B



**Abbildung 26:** Die Expression mehrerer B-Zell-spezifischer Gene wird durch die Acetyltransferaseaktivität von p300 altersabhängig reguliert.

**A)** Auswahl deregulierter Gene eines cDNA-Microarrays und deren Verifizierung mittels qRT-PCR. Primäre, sIgD<sup>+</sup> B-Zellen der Milz von einer kranken  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus und von deren  $CD19-cre$  Kontrollmaus wurden durchflusszytometrisch isoliert. Das Genexpressionsprofil wurde durch einen cDNA-Microarray untersucht. Die aufgelisteten Gene wurden aus einer Liste mit insgesamt 554 regulierten Genen mit Hilfe verschiedener Parameter ausgesucht. Die Expression dieser Gene wurde mittels qRT-PCR von einem unabhängigen Mauspaar verifiziert. **B)** Die B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen zeigen eine alterabhängige Deregulation der untersuchten Gene. qRT-PCR-Analysen von primären B-Zellen mehrerer  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse (AS) unterschiedlichen Alters im Vergleich zu den jeweiligen  $CD19-cre$  Kontrollmäusen (WT). Die B-Zellen wurden, wie in A beschrieben, isoliert. Die  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse wiesen teilweise eine Reduktion der CD23<sup>+</sup> B-Zellen auf (unter Graph vermerkt). Die Veränderung der Expression der angezeigten Gene wurde jeweils relativ zu der entsprechenden Kontrollmaus berechnet. Zur Normalisierung wurde das Gen des ribosomalen Proteins S16, *Rps16*, benutzt.

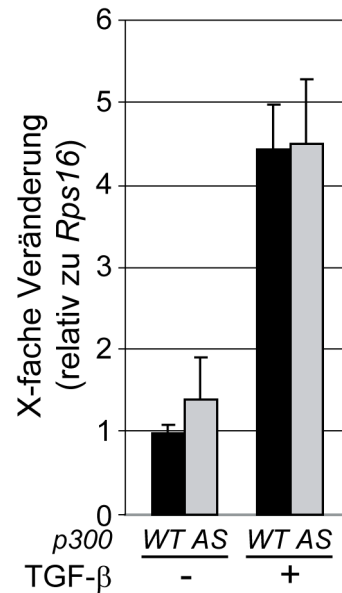
Die Deregulation ausgewählter Gene wurde über den Verlauf der Erkrankung mit Mauspaaren verschiedenen Alters untersucht (Abb. 26B). Es wurden zwei hochregulierte

Gene, *Ptpn22* und *Ighg*, sowie ein herunterreguliertes Gen, *Cd55/Daf1*, getestet. Als Kontrolle für diese Analyse wurde ein nicht beeinflusstes Gen, *Cd72*, verwendet. Alle deregulierten Gene zeigten eine alters- und somit auch krankheitsabhängige Deregulation. Das hochregulierte Gen *Ptpn22* und das herunterregulierte Gen *Cd55* zeigten einen alterabhängigen Anstieg der Deregulation. Dieser Anstieg war unabhängig von der Expression des *Cd23*. Im Vergleich dazu zeigte *Ighg* anfänglich einen altersabhängigen Anstieg der Expression. Dieser nahm jedoch mit zunehmendem Alter wieder ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zahlreiche Gene durch die p300-Acetyltransferasefunktion reguliert werden. Die veränderte Expression einiger Gene führte letztendlich zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung. In keinem dieser Fälle wurde ein Verlust der Expression des verbleibenden Wildtypgens von *p300* noch Veränderungen in der Expression des homologen Gens *Cbp* beobachtet (Daten nicht gezeigt). Aus dem Ergebnis des cDNA-Microarrays war auch durch verschiedene Auswertungsmethoden (zum Beispiel GSEA, *Gene set enrichment analysis*) kein spezieller Signalweg mit einer Deregulation ersichtlich (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte das Ergebnis vereinzelte, deregulierte Gene aus verschiedenen Signalwegen.

Ein Signalweg, von dem die Involvierung von p300 bekannt war, ist der TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor*  $\beta$ ; transformierender Wachstumsfaktor)-Signalweg (Massague *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2004; Schmierer and Hill, 2007). In diesem Signalweg wirkt p300 als Koaktivator über die Bindung der Effektorproteine Smads stromabwärts vom TGF- $\beta$ -Signalweg proliferationshemmend (Janknecht *et al.*, 1998, Pouponnot *et al.*, 1998; Saganuma *et al.*, 2002; Simonsson *et al.*, 2006; Tu and Luo, 2007). Des Weiteren interagiert p300 mit Mitgliedern der Familie der Smad-Transkriptionsfaktoren und acetyliert diese (Simonsson *et al.*, 2006). Zudem entwickeln Mäuse, die einen konstitutiven Knockout des Liganden TGF- $\beta$ 1 besitzen, eine Autoimmunerkrankung, die ähnlich der von *p300<sup>+AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen ist (Yaswen *et al.*, 1996).

Daraufhin wurde der direkte Einfluss von Acetyltransferase-defizientem p300 auf den TGF- $\beta$ -Signalweg untersucht. Es wurden primäre, naive B-Zellen von *p300<sup>+AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen und *CD19-cre* Kontrollmäusen *ex vivo* mit TGF- $\beta$  zur Aktivierung des Signalweges inkubiert. Danach wurde eine qRT-PCR-Analyse auf die Expression von *Cd72*, als ein B-Zell-spezifisches Zielgen des TGF- $\beta$ -Signalweges, durchgeführt. Das Ergebnis zeigte einen mehr als 4-fachen Anstieg der Expression von *Cd72* nach Inkubation mit TGF- $\beta$  unabhängig vom Genotyp (Abb. 27). Somit ist die Acetyltransferasefunktion von p300 in B-Zellen nicht für die TGF- $\beta$ -vermittelte Aktivierung von *Cd72* essentiell.

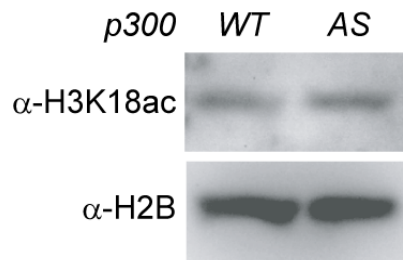


**Abbildung 27:** B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen zeigen eine gleiche Induktion von *Cd72* nach Aktivierung des TGF-β-Signalweges wie B-Zellen von *CD19-cre* Kontrollmäusen. Primäre, naive B-Zellen wurden aus der Milz einer  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus (AS) und einer *CD19-cre* Kontrollmaus (WT) durch magnetische Depletion angereichert. Anschließend wurden die B-Zellen mit TGF-β inkubiert. Danach wurde die RNA der B-Zellen isoliert und eine qRT-PCR auf Expression des TGF-β-Zielgens *Cd72* durchgeführt. Zur Normalisierung wurde das Gen des ribosomalen Proteins S16, *Rps16*, eingesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von Triplikaten der qPCR.

Weitere Substrate von p300 sind die vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 (siehe 1.2; Bannister and Kouzarides, 1996). Daher wurde die Acetylierung von Lysinen der Kernhistone untersucht. Dafür wurden primäre B-Zellen aus der Milz klinisch unauffälliger Mäuse im Alter von 5-6 Monaten isoliert und mittels magnetischer Depletion die naiven B-Zellen angereicht. Anschließend wurden die Histone der B-Zellen isoliert, gelelektrophoretisch getrennt und im Western Blot detektiert.

*In vitro* acetyliert p300 H2A an Position 5 (H2AK5), alle freiliegenden Lysine von H2B, die Lysine an Position 14 und 18 vom Histon H3 (H3K14 und H3K18), die Lysine an Position 5 und 8 von H4 (H4K5 und H4K8) und mit einer geringeren Effizienz auch das Lysin an der Position 12 von Histon H4 (H4K12) (Schiltz *et al.*, 1999). Die Acetylierung dieser Lysinreste in Abhängigkeit von Acetyltransferase-defizientem p300 wurde mit verschiedenen Antikörpern untersucht. Für die Detektion der Lysinacetylierung von H3 und H4 wurden 4 Antikörper getestet ( $\alpha$ -H3K14ac,  $\alpha$ -H3K18ac,  $\alpha$ -H4K5ac,  $\alpha$ -H4K8ac). Allerdings lieferte nur der  $\alpha$ -H3K18ac bei den geringen Mengen an Histonextrakt eine eindeutige Bande. Der Acetylierungsstatus von Histon H3 an der Position K18 zeigte im Western Blot keinen Unterschied zwischen B-Zellen einer repräsentativen  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus und denen der *CD19-cre* Kontrollmaus (Abb. 28).



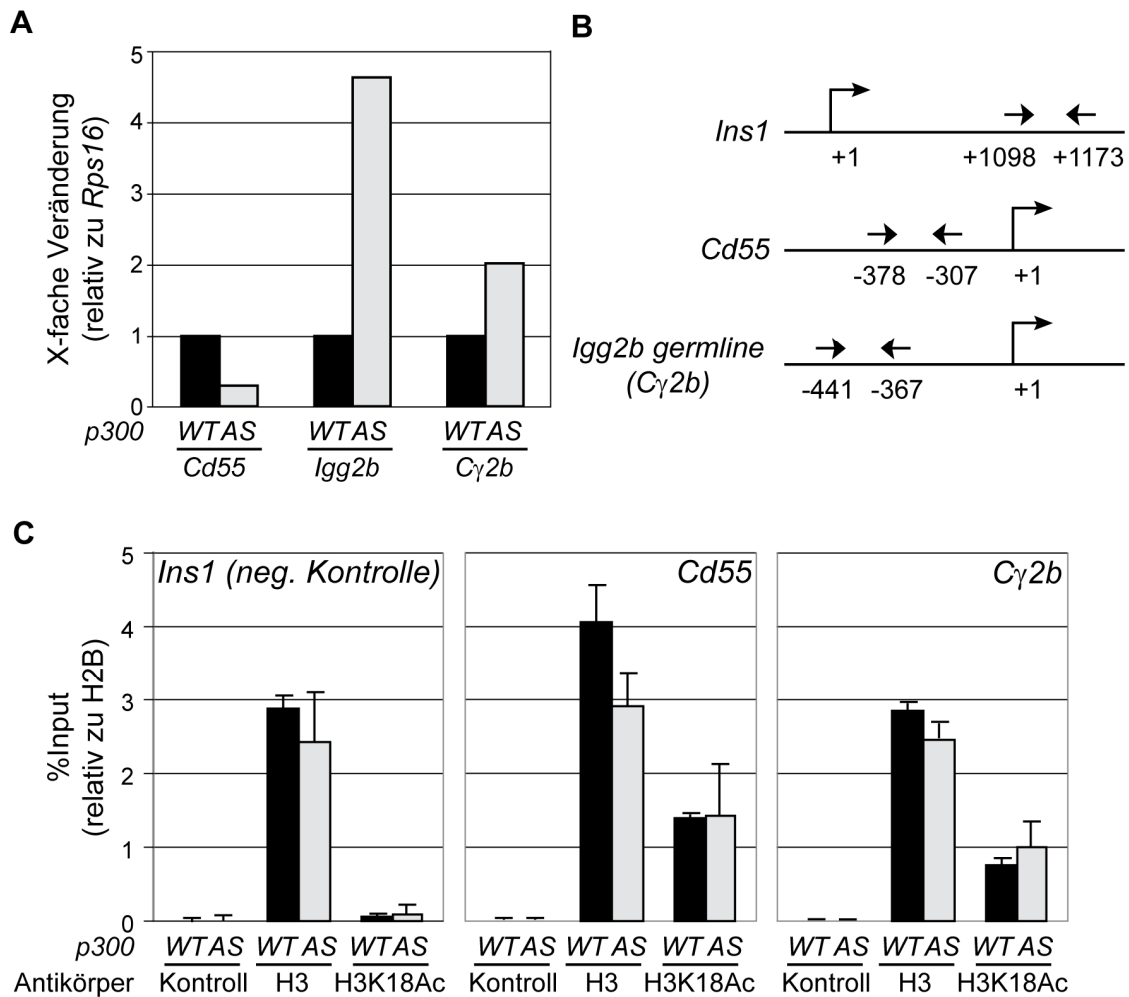


**Abbildung 28:** Acetyltransferase-defizientes p300 zeigt keinen Unterschied in der globalen Acetylierung von H3K18 in B-Zellen.

Primäre, naive B-Zellen einer  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus (AS) und deren  $CD19-cre$  Kontrollmaus (WT) wurden aus der Milz durch magnetische Depletion isoliert. Dann wurden die Histone extrahiert, über SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert. H2B diente als Ladekontrolle.

Die Gesamtmenge an H3K18-Acetylierung wurde offensichtlich nicht durch die Expression des Acetyltransferase-defizienten p300 verändert. Der Western Blot könnte in diesem Fall nicht sensitiv genug sein, um geringe Unterschiede der Acetylierung zu detektieren. Die Acetylierung von DNA-gebundenen Histonen könnte in geringem Ausmaß verändert sein. Somit wäre dies in der Gesamtmenge nicht erkennbar. Daher wurde die spezifische H3K18-Acetylierung im Promotorbereich von deregulierten Genen nach dem Ergebnis des Microarrays untersucht. Hierfür wurden primäre, naive B-Zellen der Milz von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  und  $CD19-cre$  Mäusen desselben Wurfes isoliert. Zunächst wurde von einem Teil der B-Zellen die RNA extrahiert und qRT-PCR-Analysen durchgeführt, um eine Deregulation bestimmter Gene zu untersuchen. Sowohl *Cd55* als reprimiertes Gen als auch *Igg2b* und sein Keimbahngen *Cy2b* als aktivierte Gene zeigten eine Deregulation zwischen B-Zellen der  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus und denen der Kontrollmaus (Abb. 29A).

Aus den restlichen B-Zellen wurde das Chromatin isoliert. Bei den Kontrollmäusen wurde aufgrund des geringen Materials das Chromatin dreier Mäuse eines Wurfes zusammengegeben. Für die ChIPs wurde neben dem Antikörper, der spezifisch eine Acetylierung an H3K18 erkennt, zum einen ein H2B-Antikörper zur Normalisierung der eingesetzten Chromatinmenge und zum anderen ein H3-Antikörper zum Vergleich der Nukleosomendichte an einzelnen Genloci verwendet. In der anschließenden qPCR Analyse der Promotorbereiche der deregulierten Gene und der Kontrollregion (*ins1*; *Insulin1*) wurden die in Abbildung 29B dargestellten Primer eingesetzt. Die ChIPs zeigten keine Veränderung der H3K18-Acetylierung deregulierter Gene (*Cd55* und *Cy2b*) der B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 29C).



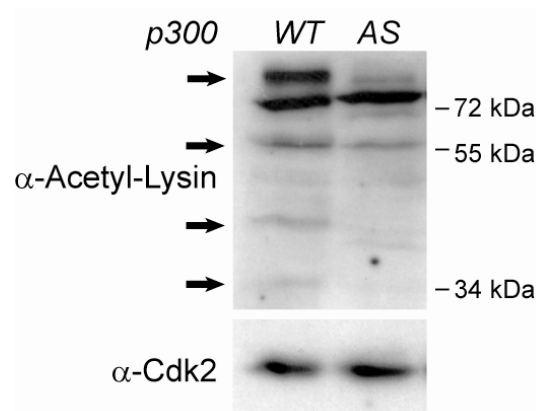
**Abbildung 29:** Die Acetylierung von H3K18 an Promotoren deregulierter Gene der  $p300^{+/AS-neo}$ ; *CD19-cre* Mäuse wies keinen Unterschied auf.

**A)** Die Gene *Cd55* und *Igg2b* sowie dessen Keimbahntranskript *C $\gamma$ 2b* sind in den B-Zellen der 6 Monate alten, klinisch unauffälligen  $p300^{+/AS-neo}$ ; *CD19-cre* Maus (*AS*) im Vergleich zur *CD19-cre* Kontrollmaus (*WT*) des gleichen Wurfes dereguliert. Es wurden primäre, naive B-Zellen der Milz der Mäuse durch magnetische Depletion isoliert. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA wurden qRT-PCR-Analysen für die angegebenen Gene durchgeführt. Die Genexpressionsunterschiede wurden relativ zum ribosomalen *Rps16* kalkuliert. Dabei dienten die Werte der Kontrollmaus als Referenz. **B)** Schematische Darstellung der Promotorregionen der deregulierten Gene, *Cd55* und *C $\gamma$ 2b*, sowie dem Genlocus eines Kontrollgens, *Ins1*. Die für C eingesetzten Primer sind mit Pfeilen und der jeweiligen Basenposition im Genlocus dargestellt. **C)** Die Promotorregionen der deregulierten Gene in B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}$ ; *CD19-cre* Mäusen zeigen keinen Unterschied in der H3K18-Acetylierung. Aus den in A beschriebenen B-Zellen wurde das Chromatin isoliert und mit den angezeigten Antikörpern präzipitiert. Dabei wurde für die Kontrolle das Chromatin von 3 *CD19-cre* Wurfgeschwistern zusammengegeben. ChIPs mit einem H2B-Antikörper dienen zur Normalisierung. Als Kontroll-Antikörper wurden Immunglobuline von Kaninchenserum eingesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von Triplikaten der qPCR.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass weder die Gesamtmenge an H3K18-Acetylierung noch die spezifische Acetylierung des Lysinrestes H3K18 in der Promotorregion von deregulierten Genen bei B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}$ ; *CD19-cre* Mäusen verändert ist. Daher kann entweder ein anderer Lysinrest der Histone das kritische Substrat p300-vermittelter Acetylierung sein oder ein bzw. mehrere Nicht-Histonprotein(e). Zur Identifizierung kritischer Substrate von p300 wurden die Proteine von primären,

magnetisch depletierten, naiven B-Zellen der Mäuse lysiert, gelelektrophoretisch getrennt und im Western Blot analysiert (Abb. 30).

Zur Detektion der Acetylierung von Proteinen wurde ein Antikörper verwendet, der Acetyl-Lysine erkennt. Daher waren auf der Autoradiografie mehrere Banden zu erkennen, die jeweils acetylierte Proteine der bestimmten Größe darstellen. Der Vergleich acetylierter Proteine der B-Zellen von  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäusen und denen von  $CD19-cre$  Mäusen zeigte mehrere Banden, die bei den B-Zellen mit Acetyltransferase-defizientem p300 in ihrer Intensität im Vergleich zur Kontrolle abnahmen (Abb. 30). Die Reduktion der Intensität mehrerer Banden wurde bei mehreren unabhängigen Mauspaaren beobachtet. Dies verdeutlicht, dass mehrere Proteine der B-Zellen durch p300 acetyliert werden. Aufgrund des limitierenden Materials von primären B-Zellen konnte keine Identifizierung der Proteine, zum Beispiel durch Massenspektrometrie, durchgeführt werden.



**Abbildung 30:** B-Zellen mit Expression des Acetyltransferase-defizienten p300 zeigen eine reduzierte Acetylierung von Proteinen.

Primäre, naive B-Zellen einer  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Maus (AS) und deren  $CD19-cre$  Kontrollmaus (WT) wurden aus der Milz durch magnetische Depletion isoliert. Dann wurden die Zellen lysiert, die Proteine über SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

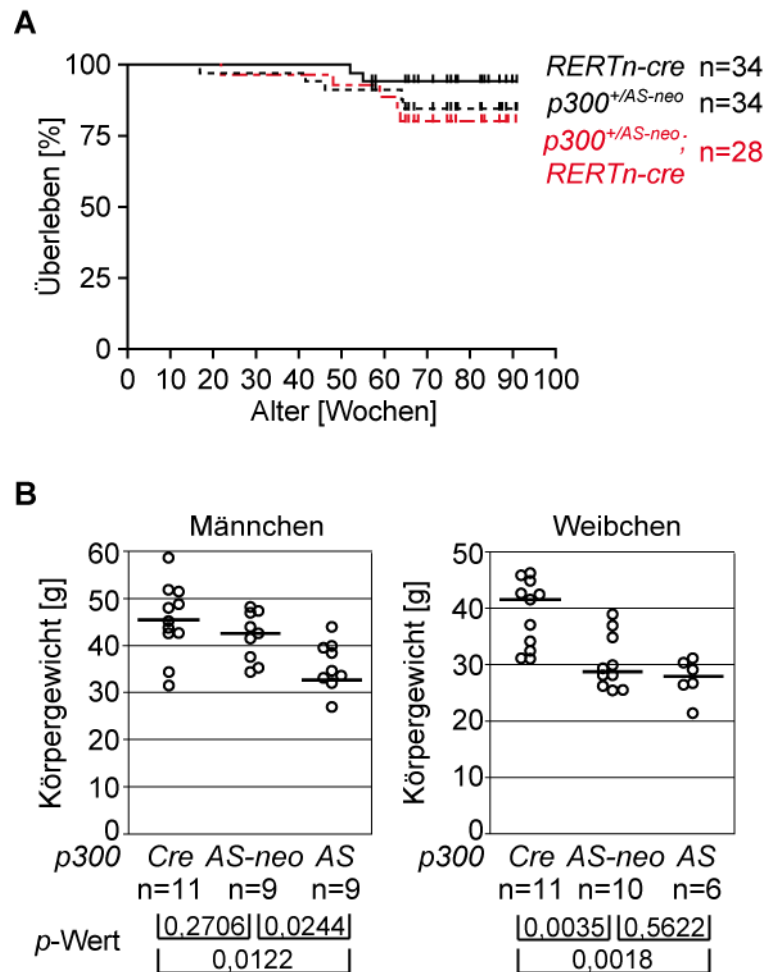
#### 4.2 Mäuse mit ubiquitärer Expression von Acetyltransferase-defizientem p300AS entwickeln ebenfalls eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung

Die B-Zell-spezifische Expression des Acetyltransferase-defizienten p300AS führte zu einer Autoimmunerkrankung der Mäuse. Jedoch war weiterhin offen, wie die Mäuse auf eine ubiquitäre Expression des mutierten  $p300AS$  reagieren. Mäuse mit ubiquitärer, heterozygoter Expression des mutierten  $p300AS$  sterben während der Embryonalentwicklung (Roth *et al.*, 2003; Shikama *et al.*, 2003; siehe Einleitung). Daher wurden an dieser Stelle Mäuse mit einer induzierbaren, ubiquitär-exprimierten Cre-Rekombinase, die  $RERTn-cre^{+/ERT}$  Mäuse, verwendet.  $RERTn-cre^{+/ERT}$  Mäuse sind *Knock-In*-Mäuse, die eine

induzierbare Cre-Rekombinase, die so genannte Cre-ERT2 (Brocard *et al.*, 1997), unter der Kontrolle des Promotors der großen Untereinheit der RNA Polymerase II exprimieren (Guerra *et al.*, 2003).

Die  $p300^{+/AS-neo}$  Mäuse wurden mit  $RERTn-cre^{+/ERT}$  Mäusen gekreuzt. Nach der Verpaarung wurde den Nachkommen im Alter von 8-12 Wochen über einen Zeitraum von 4 aufeinander folgenden Tagen täglich 4 mg Tamoxifen intraperitoneal injiziert. Dies führte zur Aktivierung der Cre-Rekombinase und somit zur Rekombination des *loxP*-flankierten  $p300AS-neo$  Allels. Die Effizienz der Rekombination in den Organen der  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre^{+/ERT}$  Mäuse (im Folgenden mit  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre$  bezeichnet) wurde mittels Allel-spezifischer qRT-PCR bestimmt (Daten nicht gezeigt, Christine Gessner, persönliche Mitteilung, siehe 4.1.1).

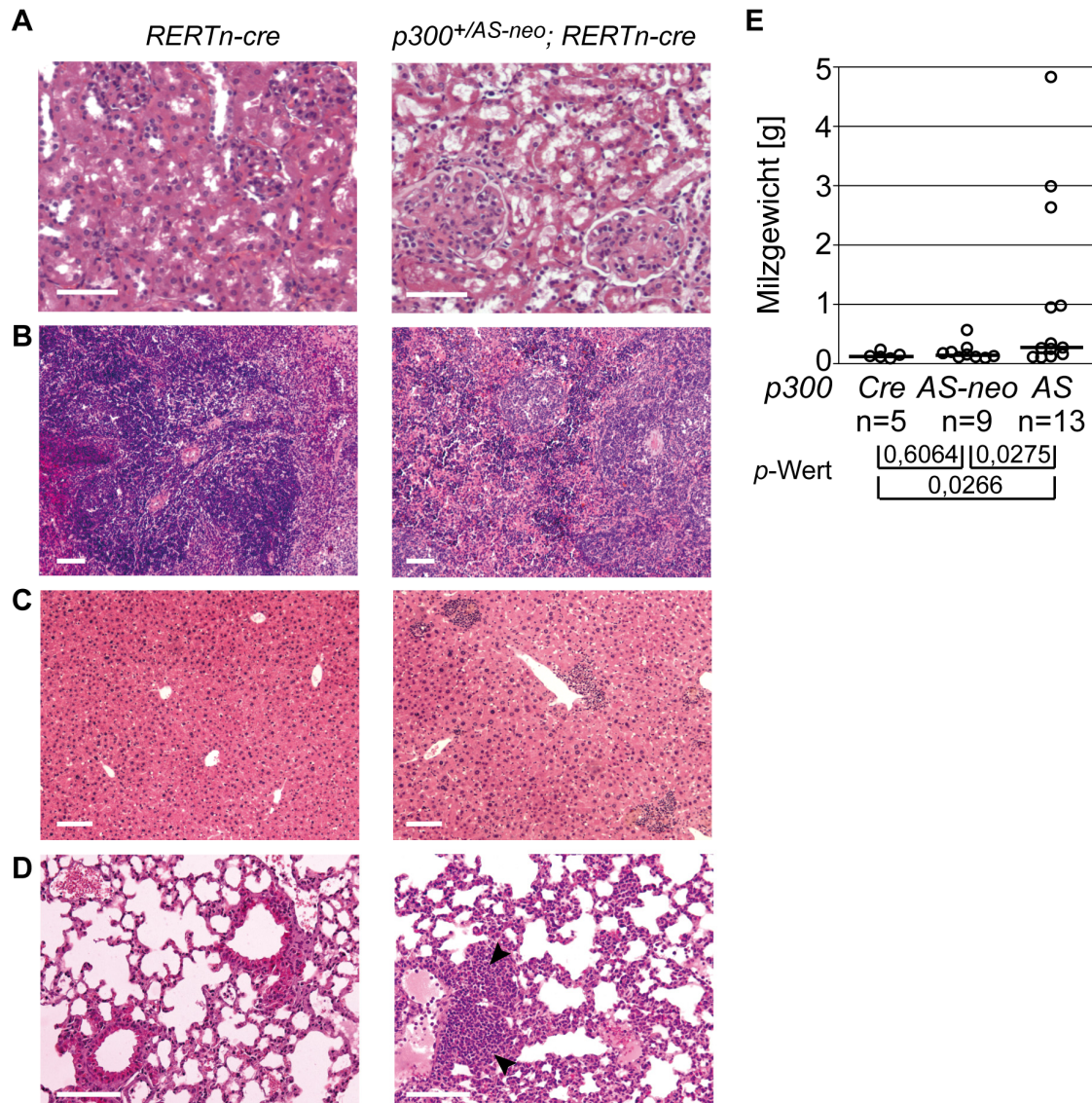
Eine Untersuchung der Überlebensverteilung der Mäuse zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre$  Mäusen und ihren Kontrollgruppen, den  $p300^{+/AS-neo}$  sowie den  $RERTn-cre$  Mäusen (Abb. 31A). Es war zwar ein früheres Sterben der  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre$  Mäuse im Vergleich zu den  $RERTn-cre$  Mäusen erkennbar, jedoch war dies nicht signifikant ( $p=0,1323$ ). Die  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre$  Mäuse starben später als die  $p300^{+/AS-neo}; CD19-cre$  Mäuse mit B-Zell-spezifischer Expression des mutierten  $p300AS$  (Abb. 13). Da Körpergewichtsverlust ein Zeichen für die Bildung von Krankheiten ist, wurde von den Mäusen im Alter von 64-66 Wochen das Gewicht bestimmt. Die  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre$  Mäuse wiesen ein niedrigeres Körpergewicht als die  $RERTn-cre$  Kontrollmäuse auf, sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen (Abb. 31B). Bei den Männchen wurde ein ähnlicher Unterschied zwischen den  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre$  Mäusen und ihren  $p300^{+/AS-neo}$  Kontrollmäusen beobachtet. Die  $p300^{+/AS-neo}$  Weibchen hingegen zeigten eine Reduktion des Körpergewichtes im Vergleich zu  $RERTn-Cre$  Kontrollmäusen. Diese Verringerung des Körpergewichtes von  $p300^{+/AS-neo}$  Weibchen war vergleichbar mit der von weiblichen  $p300^{+/AS-neo}; RERTn-cre$  Mäusen.



**Abbildung 31:** Mäuse mit einer systemischen Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300* zeigen keinen Unterschied in der Mortalität aber ein niedrigeres Körpergewicht gegenüber ihren Kontrollmäusen. **A)** Kaplan-Meier-Analysen von *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäusen und *RERTn-cre* sowie *p300<sup>+/AS-neo</sup>* Kontrollmäusen. Alle Mäuse besaßen den gleichen gemischten genetischen Stammhintergrund (129/Sv × C57B6). Der *p*-Wert für den Vergleich von *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* mit *RERTn-cre* Mäusen liegt bei 0,1323; für den Vergleich von *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* mit *p300<sup>+/AS-neo</sup>* Mäusen liegt er bei 0,7171. **B)** *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäuse (*AS*) sind im Körpergewicht leichter als die Kontrollmäuse, *RERTn-cre* (*Cre*) und *p300<sup>+/AS-neo</sup>* (*AS-neo*). Die Mäuse wurden im Alter von 64-66 Wochen gewogen. Das Körpergewicht wurde separat für Männchen und Weibchen dargestellt.

Eine pathologische Analyse der *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäuse zeigte ähnliche histologische Befunde wie bei den *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen (siehe 4.2). Es wurde bei den Mäusen eine Nierenpathologie (11 von 14 untersuchten Mäusen) mit sklerotisierten und vergrößerten Glomeruli festgestellt (Abb. 32A). Des Weiteren zeigten ca. 50% der *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäuse ab einem Alter von 15 Monaten eine Auflösung der Gewebestruktur der Milz (Abb. 32B). Die Leber und die Lunge wiesen bei vereinzelt Mäusen (35% bzw. 60%) eine Nephritis mit Infiltrationen mononukleärer Zellen auf (Abb. 32C und D). Des Weiteren wurde bei 77% der untersuchten Mäuse Infiltrationen in der Speicheldrüse beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Splenomegalie wurde auch bei den *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäusen beobachtet (Abb. 32E). Dabei wiesen 5 von 13 Mäusen ein erhöhtes Milzgewicht von  $\geq 1000$  mg im Vergleich zu

Kontrollmäusen auf. Eine ubiquitäre Expression von *p300AS* in den Mäusen ruft ebenso eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung hervor wie eine B-Zell-spezifische Expression. Darüber hinaus weisen die *p300<sup>+AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäuse eine schwächere Penetranz des Phänotyps auf.



**Abbildung 32:** Eine ubiquitäre Expression von *p300* mit fehlender Acetyltransferasefunktion verursacht Nephritis und Splenomegalie ähnlich einer B-Zell-spezifischen Expression von *p300AS*.

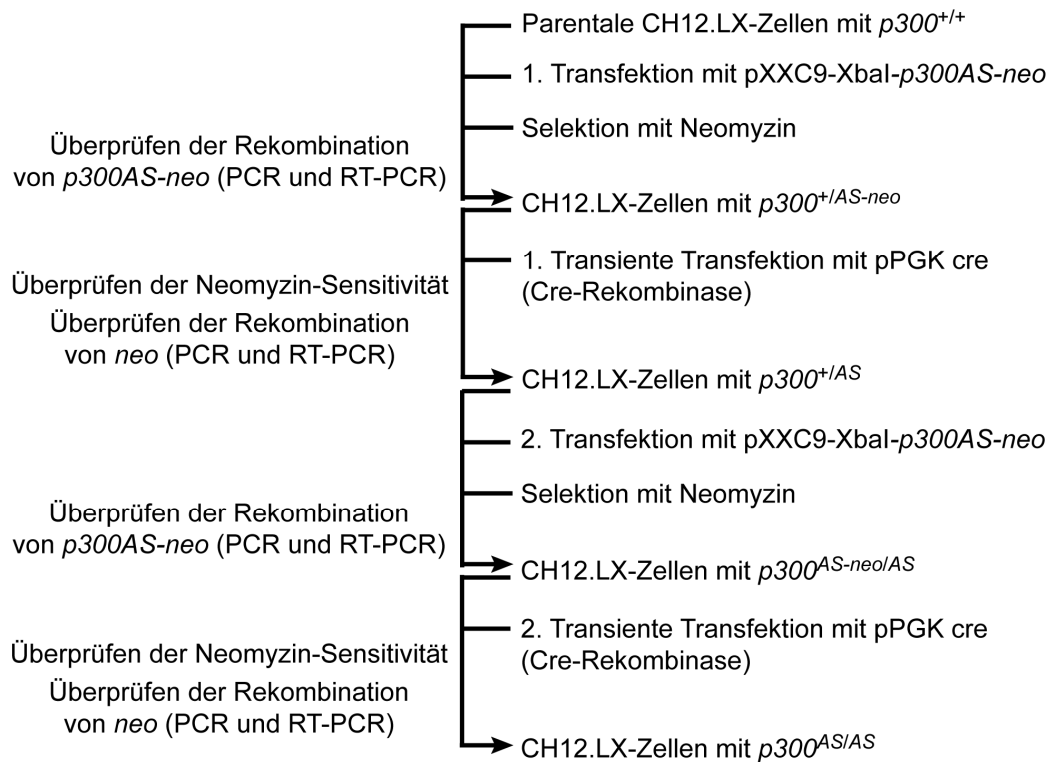
**A)** H&E-gefärbte Nierenschnitte von einer *RERTn-cre* Kontrollmaus und einer *p300<sup>+AS-neo</sup>; RERTn-cre* Maus mit Nierenpathologie einschließlich sklerotisierten Glomeruli und Nephritis. **B)** H&E-gefärbte Schnitte von einer normalgroßen Milz einer *RERTn-cre* Kontrollmaus (125 mg) und einer vergrößerten Milz (370 mg) einer *p300<sup>+AS-neo</sup>; RERTn-cre* Maus. Die vergrößerte Milz zeigte einen Verlust der Gewebestruktur. **C)** H&E-gefärbte Leberschnitte von einer *RERTn-cre* Kontrollmaus und einer *p300<sup>+AS-neo</sup>; RERTn-cre* Maus mit Infiltrationen mononukleärer Zellen an einem Blutgefäß. **D)** H&E-Färbung von Lungenschnitten einer *RERTn-cre* Maus und einer *p300<sup>+AS-neo</sup>; RERTn-cre* Maus mit Infiltrationen von Zellen um ein Blutgefäß (Pfeile). Größenbalken: 100  $\mu$ m. **E)** Graphische Darstellung des Milzgewichtes von *p300<sup>+AS-neo</sup>; RERTn-cre* (*AS*), *p300<sup>+AS-neo</sup>* (*AS-neo*) und *RERTn-cre* Mäusen (*Cre*) im Alter von 17-24 Monaten. In diesem Altersbereich war die Milz von *p300<sup>+AS-neo</sup>; RERTn-cre* im Durchschnitt 7-fach größer als die Milz der *RERTn-cre* Kontrollmäuse (Durchschnittsgewicht: 1107 mg vs. 157 mg). Die horizontalen Linien repräsentieren den Median der Milzgewichte.

### 4.3 Herstellung einer B-Zelllinie mit Expression von mutiertem p300AS

Aufgrund des begrenzenden Materials von den primären B-Zellen der Mäuse war eine biochemische Analyse schwer zu realisieren. Des Weiteren war die heterozygote Expression des mutierten *p300AS* ein Nachteil der Analyse der Mäuse. Obwohl das mutierte p300AS dominant-negativ im Fall der Acetyltransferasefunktion fungiert (siehe Einleitung), könnten bei der Analyse heterozygoter B-Zellen auftretende Effekte im Vergleich zu homozygotem Status schwächer sein. Wie bereits in den Mäusen mit B-Zell-spezifischer Expression von *p300AS* gezeigt, werden verschiedene Nicht-Histonproteine durch mutiertes p300AS schwächer acetyliert (Abb. 32). Aufgrund dessen sollte für die Identifikation der *in vivo* Substrate von p300 eine B-Zelllinie von Vorteil sein.

Hierfür wurden aufgrund mehrerer Eigenschaften CH12.LX-Zellen (Arnold *et al.*, 1983; Bishop and Haughton, 1986), die in ihren Charakteristika diploiden B-Zellen von Lymphomen ähnlich sind, gewählt. Die Zellen sind reife B-Zellen mit einer Expression von sIgM und einer fehlenden oder geringen Expression von sIgD. Sie sind die einzigen bekannten Zellen von Mäusen, die die Fähigkeit besitzen, homologe Rekombination ähnlich den humanen Hct116-Zellen durchzuführen (Hostager *et al.*, 2003). Der Zielvektor mit murinem *p300*, der zur Herstellung der embryonalen Stammzellen der Mäuse verwendet wurde (Roth *et al.*, 2003; Shikama *et al.*, 2003), konnte daher direkt eingesetzt werden. Des Weiteren können diese Zellen auf verschiedene physiologische Signale reagieren, einschließlich der Aktivierung des BCR-Signalweges, der Stimulation mit  $\alpha$ -CD40 oder LPS (Haxhinasto and Bishop, 2004). Dadurch ist es möglich, die Kinetik der p300-vermittelten Acetylierung zu bestimmen, um direkte Effekte von p300 von indirekten unterscheiden zu können. Zudem kann die Veränderung der Genexpressionsprofile vor und nach Aktivierung untersucht werden. Durch den Einsatz dieser Zellen, die in ihren Eigenschaften ähnlich den B-Zellen der Mäuse sind (siehe oben), kann der Effekt des Acetyltransferase-defizienten p300 aus der Maus in der Zellkultur überprüft werden.

Die Herstellung dieser B-Zelllinie mit einer homozygoten Expression des Acetyltransferase-defizienten p300 beinhaltete mehrere Teilschritte (Abb. 33). Als Erstes wurde der Vektor *pXXC9-Xba-p300AS-neo*, in dem das *neomycin(neo)*-Gen durch eines ohne eigenen Promotor ausgetauscht wurde, in die CH12.LX-Zellen transfiziert. Danach wurden Neomycin-resistente Klone isoliert. Insgesamt waren 191 Klone angewachsen.



**Abbildung 33:** Schema der Vorgehensweise zur Herstellung einer homozygoten B-Zelllinie mit ausschließlicher Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300AS*.

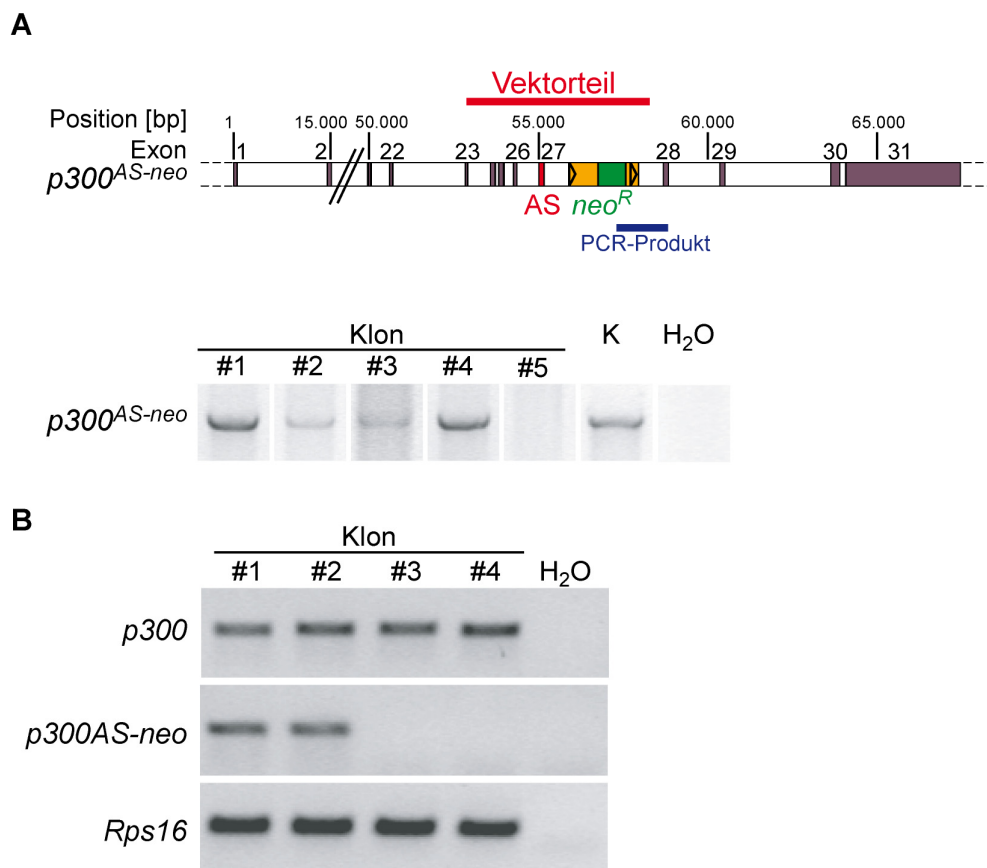
CH12.LX Zellen mit homozygoter Expression von *p300AS* wurden durch aufeinander folgende Transfektionen der angezeigten Konstrukte hergestellt. Dabei wurden nach jeder Transfektion die positiven Klone mit den angegebenen Methoden überprüft.

Von den erhaltenen Klonen wurde nach Abschluss der Selektion die genomische DNA auf Vorhandensein des *p300<sup>AS-neo</sup>*-Allels überprüft. Eine PCR der genomischen DNA, die speziell das mutierte *p300<sup>AS-neo</sup>*-Allel amplifiziert (Schema Abb. 34A), zeigte bei 4 von 87 getesteten Klonen eine positive Bande (Abb. 34A). Von diesen Klonen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurden semiquantitative RT-PCRs dieser RNA-Proben auf sowohl Wildtyp-*p300* als auch mutiertes *p300AS-neo* durchgeführt. Diese zeigten, dass bei 2 der 4 Klone (#1 und #2) beide Allele transkribiert wurden (Abb. 34B). Bei den anderen beiden Klonen (#3 und #4) wurde nur die Wildtyp-*p300*-mRNA detektiert.

Nachdem eine homologe Rekombination des mutierten *p300<sup>AS-neo</sup>* in Klonen #1 und #2 der CH12.LX-Zellen detektiert wurde, wurde Klon #1 transient mit einem Vektor, der für eine konstitutiv-aktive Cre-Rekombinase kodiert, transfiziert (Schema Abb. 33). Dadurch konnte das *neo*-Resistenzgen bei erfolgreicher Transfektion der Cre-Rekombinase aus dem Locus entfernt werden. Da die erfolgreich transfizierten Zellen kein *neo*-Resistenzgen besitzen sollten, sollten sie sensitiv auf eine Neomycin-Behandlung reagieren. Dies erfolgte durch zusätzliches Ausplattieren der Klone in Neomycin-haltigem Medium (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wurde die genomische DNA von Neomycin-sensitiven Klonen isoliert und mittels PCR untersucht. Dafür wurden Primer gewählt, die das *p300*-



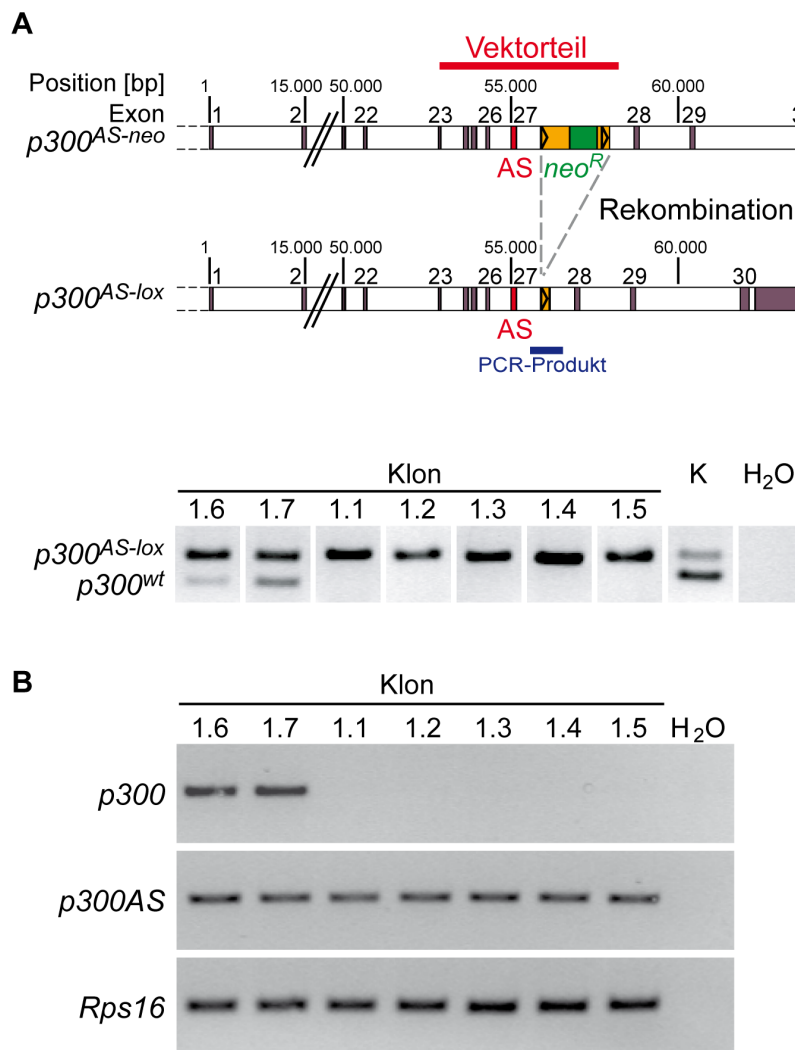
Wildtypgen und das  $p300^{AS}$ -Gen ohne das  $loxP$ -flankierte  $neo$ -Gen amplifizieren (Schema Abb. 35A). Bei der Rekombination des  $neo$ -Gens verbleibt eine  $loxP$ -Sequenz, die das  $p300^{AS}$ -Gen um 34 Basenpaare im Vergleich zum Wildtypgen vergrößert ( $p300^{AS-lox}$ ). Die Analyse von insgesamt 191 Klonen zeigte bei 7 Klonen sowohl eine Neomycin-Sensitivität (Daten nicht gezeigt) als auch eine erfolgreiche Rekombination des  $neo$ -Gens (Abb. 35A). Einige der Klone wiesen die rekombinierte Bande des  $p300^{AS-lox}$  aber keine Wildtypbande im Gegensatz zu Klonen mit beiden Banden auf (Abb. 35A, Vergleich Spur 1-2 mit 3-7).



**Abbildung 34:** CH12.LX-Zellen exprimieren das mutierte  $p300^{AS-neo}$  nach genetischer Manipulation. **A)** CH12.LX-Zellen wurden mit dem Zielvektor  $pXXC9-Xba-p300^{AS-neo}$  mittels Elektroporation transfiziert. Nach Abschluss der Neomycin-Selektion wurde von den erfolgreich transfizierten Klonen genomische DNA isoliert. Die Rekombination von  $p300^{AS-neo}$  wurde mittels PCR des angezeigten Bereiches (oben) und anschließender gelelektrophoretischer Analyse (unten) untersucht. Insgesamt zeigten 4 von 87 getesteten Klonen eine positive Bande für  $p300^{AS-neo}$ . Dreieck:  $loxP$ -Sequenzabschnitt;  $neo^R$ :  $neo$ -Resistenzgen; K: Zielvektor  $pXXC9-Xba-p300^{AS-neo}$  als Positivkontrolle; H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle. **B)** Von den 4 aus A erhaltenen positiven Klonen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Über eine RT-PCR wurde anschließend die mRNA des Wildtyp- $p300$  und die des mutierten  $p300^{AS-neo}$  detektiert. 2 der 4 positiven Klone wiesen auf mRNA-Ebene eine Bande für das mutierte  $p300^{AS-neo}$  auf.  $Rps16$  diente als Mengenkontrolle der eingesetzten cDNA. H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle der PCR.

Zur Überprüfung der Transkription der jeweiligen  $p300$ -Gene wurde von den Klonen die Gesamt-RNA isoliert. Danach wurde diese mittels semiquantitativer RT-PCR auf die Transkription des Wildtyp- $p300$  und des mutierten  $p300^{AS}$  untersucht. Bei den Klonen 1.6

und 1.7 wurden beide Gene, Wildtyp-*p300* und mutiertes *p300AS*, in gleichem Maße transkribiert (Abb. 35B, Spur 1 und 2). Hingegen zeigten die Klone 1.1 bis 1.5 nur eine Expression des mutierten *p300AS* und keine Wildtyp-*p300* mRNA (Abb. 35B, Spur 3-7). Daraus lässt sich schließen, dass die Klone 1.1-1.5 entweder homozygot für das mutierte *p300AS* sind oder bei ihnen das verbleibende Wildtypallel so verändert worden sein könnte, dass es weder auf genomischer DNA- noch auf mRNA-Ebene detektierbar war.



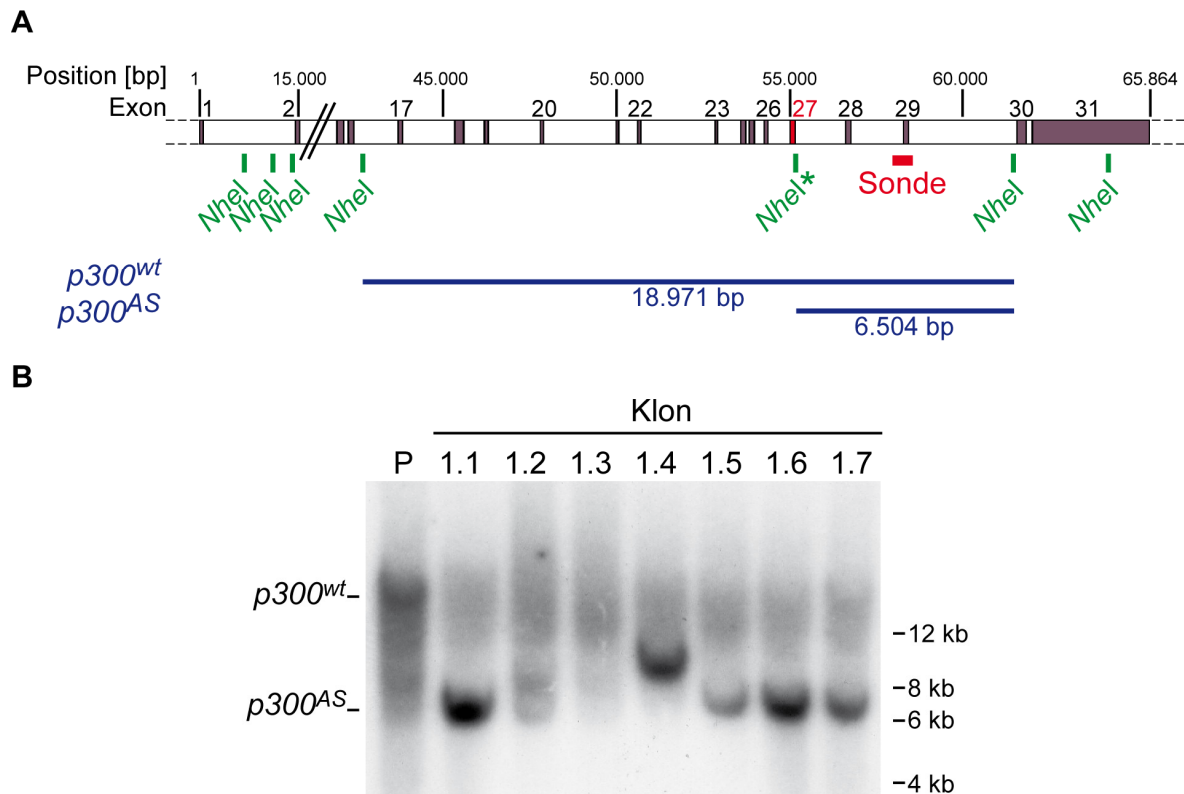
**Abbildung 35:** CH12.LX-Zellen exprimieren das mutierte *p300AS* nach Cre-vermittelter Rekombination des *neo*-Gens.

**A)** CH12.LX-Zellen des Klons #1 von Abb. 34 wurden mit einem Vektor, der für eine konstitutiv-aktive Cre-Rekombinase kodiert, mittels Elektroporation transfiziert. Nach der Vermehrung von Klonen wurde aus ihnen genomische DNA isoliert. Die Rekombination des *neo*-Resistenzgens (*neo<sup>R</sup>*, grün) von *p300AS-neo* wurde mittels Amplifikation der angezeigten Region (blau, oben) und anschließender gelelektrophoretischer Analyse (unten) untersucht. Durch eine erfolgreiche Rekombination war das *p300AS*-Gen (*p300AS-lox*) im Vergleich zum Wildtyp-*p300* (*p300wt*) aufgrund des Zurückbleibens einer *loxP*-Sequenz um 34 Basenpaare größer. Insgesamt waren von 288 wells 191 Klone angewachsen, von denen 7 eine positive Bande für *p300AS-lox* zeigten. Dreieck: *loxP*-Sequenzabschnitt; K: Positivkontrolle von einer Milz einer *p300<sup>+AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus; H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle. **B)** Von den 7 aus A erhaltenen positiven Klonen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Über eine RT-PCR wurde anschließend die mRNA des Wildtyp-*p300* und die des mutierten *p300AS* detektiert. Dabei zeigten 2 der 7 Klone eine Bande bei sowohl Wildtyp-*p300* als auch mutiertem *p300AS*, hingegen war bei den restlichen 5 nur das mutierte *p300AS* detektierbar. *Rps16* diente als Mengenkontrolle der eingesetzten cDNA. H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle der PCR.

Durch den Erhalt von Zellklonen, die ausschließlich das mutierte *p300AS* exprimierten, wurde die zweite Runde dieser Transfektionen hinfällig (Schema Abb. 33). Um den Genlokus von *p300* in den Klonen zu untersuchen, wurde als Nächstes ein Southern Blot durchgeführt. Durch die Einführung der Mutation in *p300* entsteht eine zusätzliche Schnittstelle für *NheI* (Abb. 36A). Daher wurde die genomische DNA der Klone 1.1-1.7 aus Abb. 35 isoliert und mit dem Restriktionsenzym *NheI* geschnitten. Danach wurde die geschnittene, genomische DNA der Klone mittels Southern Blot und einer Hybridisierung mit einer radioaktiven <sup>32</sup>P-dCTP-markierten Sonde detektiert. Die Sonde erkennt eine Sequenz, die sowohl im Wildtyp-*p300* als auch im mutierten *p300AS* vorhanden ist.

Die zusätzliche *NheI*-Schnittstelle des mutierten *p300AS* ergab bei der Detektion mit der Sonde eine kleinere DNA-Bande im Fall des mutierten *p300AS* (6,5 kB) als beim Wildtyp-*p300* (19 kB) (Abb. 36). Das Ergebnis des Southern Blot zeigte für die parentalen Zellen eine einzelne Bande in Höhe des DNA-Fragmentes, in dem das Wildtypgen von *p300* lokalisiert war (Spur 1). Für die Klone 1.1, 1.5, 1.6 und 1.7 wurde eine Bande in der Höhe des DNA-Fragmentes, in dem das mutierte *p300* lokalisiert war, nachgewiesen (Spur 2, 6, 7 und 8). Bei dem Klon 1.2 wurde eine schwache Bande in der Höhe des Lokus mit mutiertem *p300AS*, jedoch aber auch eine Bande bei etwa 8 kB detektiert (Spur 3). Beim Klon 1.3 wurde keine Bande detektiert (Spur 4). Der Klon 1.4 zeigte eine Bande in einer Größe, die weder dem Wildtyp noch dem mutierten *p300* Lokus entsprach (Spur 5).

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Klone 1.1 und 1.5 ausschließlich das *p300AS* exprimieren, wohingegen die restlichen Klone aus verschiedenen Gründen für eine weitere Analyse in Frage kamen (siehe Diskussion). Bei den Klonen 1.2, 1.3 und 1.4 liegen keine oder unvollständige homologe Rekombinationen vor (Abb. 36). Die Klone 1.6 und 1.7 zeigten auf mRNA-Ebene eine Expression beider Gene, Wildtyp *p300* und mutiertes *p300AS* (Abb. 35). Jedoch wurde im Southern Blot für diese Klone nur eine Bande in Höhe des Genlokus mit mutiertem *p300AS* nachgewiesen (Abb. 36). Daraus folgt, dass bei diesen Klonen die Expression des Wildtyp-*p300* nicht ausreichend erklärt werden kann, da der Genlokus nicht von der DNA-Sonde erkannt werden konnte.



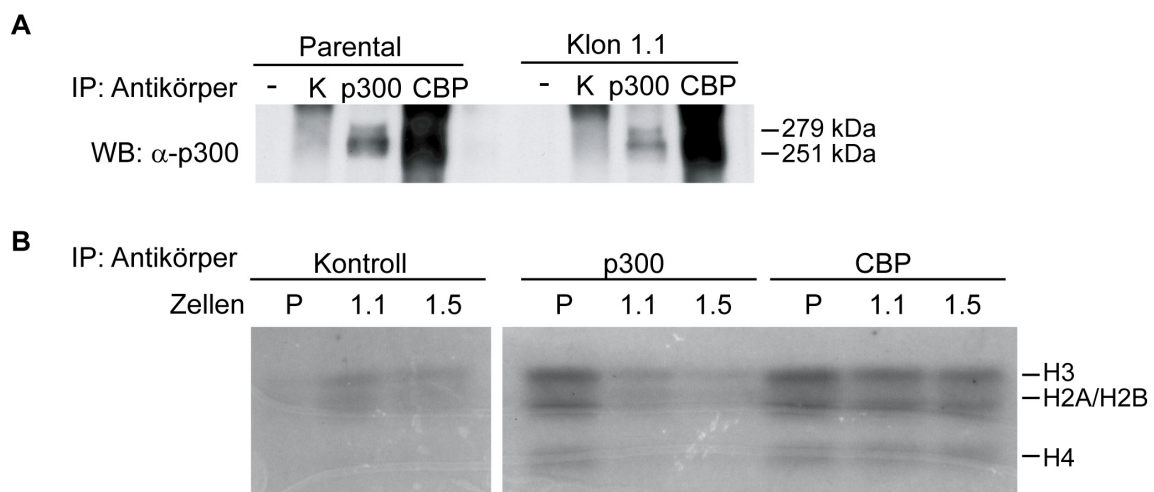
**Abbildung 36:** CH12.LX-Zellen zeigen eine homologe Rekombination des mutierten *p300AS* in den *p300* Genlocus.

**A)** Schema der genomischen DNA von *p300* mit den *NheI*-Schnittstellen (grün) und Lokalisation der für den Southern Blot eingesetzten DNA-Sonde (rot). \*: Durch Einführen der Mutation in Exon 27 entstandene *NheI*-Schnittstelle. **B)** Die genomische DNA von den Klonen der CH12.LX-Zellen von Abb. 35 wurde mit *NheI* geschnitten, gelelektrophoretisch getrennt und mittels Southern Blot detektiert. Für die Hybridisierung wurde eine DNA-Sonde eingesetzt, die an eine Sequenz des Wildtyp-*p300* (*p300*<sup>wt</sup>) und des mutierten *p300AS* (*p300*<sup>AS</sup>) bindet. Bei 4 von 7 Klonen (1.1, 1.5, 1.6, 1.7) wurde nur die Bande des Genlocus, der das mutierte *p300AS* enthält, detektiert. Von diesen 4 Klonen wurden bei den letzten beiden Klonen beide mRNAs, *p300* Wildtyp und *p300AS*, detektiert (Abb. 35), so dass 2 Klone (1.1 und 1.2) positiv für die vollständige Rekombination des mutierten *p300AS* in den *p300* Genlocus waren. P: Parentale CH12.LX Zellen.

Für die Überprüfung der Acetyltransferasefunktion von *p300AS* in CH12.LX-Zellen wurde ein Versuch zum Nachweis der Histonacetylierung durchgeführt. Aufgrund des Ergebnisses vom Southern Blot (Abb. 36) wurden die Klone 1.1 und 1.5 für diesen Versuch ausgewählt, da diese nur das mutierte *p300AS* exprimierten (Abb. 35 und 36). Für diesen Versuch wurden zunächst Immunpräzipitationen mit Proteinextrakten der parentalen CH12.LX-Zellen und den Klonen 1.1 und 1.5 durchgeführt. Dafür wurden zum einen ein *p300*-Antikörper und zum anderen ein CBP-Antikörper eingesetzt (Abb. 37A). Anschließend wurden die laut Western Blot erfolgreich präzipitierten Proben (Abb. 37A) mit rekombinanten Histonen und radioaktiv-markiertem <sup>14</sup>C-Acetyl-CoenzymA *in vitro* inkubiert, um die Effizienz der Acetylierung des präzipitierten *p300* bzw. CBP zu überprüfen. Die acetylierten Histone wurden dann mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiografie detektiert (Abb. 37B). Die Autoradiografie wies 3 spezifische Banden auf,

die die Histone H4 (untere Bande, ca. 11 kDa), H2A/H2B (mittlere Bande, ca. 14/15 kDa) und H3 (obere Bande, 17 kDa) repräsentierten.

Parentale CH12.LX-Zellen wiesen bei der Immunpräzipitation mit dem p300-Antikörper stärkere Bandenintensitäten in der *in vitro* Histonacetylierung auf als die beiden Klone 1.1 und 1.5. Dabei ist anzumerken, dass die Immunpräzipitationen mit dem Kontrollantikörper bei den Klonen einen höheren Hintergrund in der Histonacetylierung im Vergleich zu den parentalen Zellen zeigten. Die Immunpräzipitationen mit dem CBP-Antikörper zeigten hingegen keinen Unterschied in der *in vitro* Histonacetylierung zwischen den parentalen Zellen und den Klonen. Beide getesteten Klone (1.1 und 1.5) zeigten eine deutlich schwächere p300-vermittelte *in vitro* Acetylierung von Histonen. Die Cbp-vermittelte Acetylierung von Histonen war durch die Expression des mutierten *p300AS* in diesen Klonen nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, dass die Klone 1.1 und 1.5 eine reduzierte p300 Acetyltransferaseaktivität aufweisen. Des Weiteren kann anhand dieses Ergebnisses geschlussfolgert werden, dass die Einführung der p300-Mutation nicht die Cbp-Acetyltransferaseaktivität in den Klonen beeinträchtigte.



**Abbildung 37:** Klone von CH12.LX-Zellen mit Expression des mutierten *p300AS* weisen eine zu parentalen Zellen vergleichbare Cbp- aber ein schwächere p300-vermittelte *in vitro* Acetylierung von Histonen auf.

**A)** Die Lysate von CH12.LX-Zellen und dem Klon 1.1, der das mutierte *p300AS* exprimiert, wurden mit den angezeigten Antikörpern präzipitiert. Mittels Western Blot (WB) und p300-Antikörper wurde die erfolgreiche Immunpräzipitation (IP) detektiert. -: ohne Antikörper; K: Kontroll-Antikörper (Kaninchenserum). **B)** Beide Klone mit alleiniger Expression des mutierten *p300AS*, 1.1 und 1.5, zeigen eine schwächere *in vitro* Acetylierung von Histonen mittels p300, jedoch nicht mit Hilfe von Cbp. Die Immunpräzipitate mit Kontroll-, p300- und CBP-Antikörper der nach A beschriebenen Methode wurden *in vitro* mit radioaktiv-markiertem  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA und rekombinanten Histonen inkubiert. Danach wurden die löslichen Histone über eine SDS-PAGE getrennt. Die Acetylierung der Histone H3, H2A/H2B und H4 wurde mittels Autoradiografie detektiert. P: Parentale Zellen. 1.1 bzw. 1.5: Klon 1.1 bzw. 1.5.

## 5 DISKUSSION

Bei der Regulation der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung sind zahlreiche Signalwege involviert, bei denen p300 als Koregulator fungiert (siehe 1.5.3). Zusätzlich sind bisher zahlreiche Proteine, die eine Funktion in der Entwicklung der Lymphozyten von Mäusen aufweisen, als Interaktionspartner von p300 bekannt (Blobel, 2000; Bereshchenko *et al.*, 2002; Bradney *et al.*, 2003; Kasper *et al.*, 2006). Eine Vielzahl der Proteine sind in der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung beteiligt, zu denen unter anderem NF- $\kappa$ B, PU.1, EBF (*Early B cell factor*) und Pax5 zählen (Xu *et al.*, 2006). Das p300-Protein besitzt mit seiner Acetyltransferaseaktivität eine zentrale Funktion in der Regulation der Aktivität dieser Proteine. Darüber hinaus werden in einigen Typen der humanen Leukämie chromosomale Translokationen von *p300* nachgewiesen, die zu Fusionsproteinen mit überhöhten Funktionen (engl. *gain-of-function*) führten (Blobel, 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen und beschriebenen Funktionen von p300 ist die Analyse von p300 in B-Zellen und während ihrer Entwicklung von besonderem Interesse.

### 5.1 Mäuse mit fehlender p300-Acetyltransferaseaktivität in B-Zellen sterben an einer Autoimmunerkrankung ähnlich dem humanen SLE

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass konditionelle *Knock-In*-Mäuse, die ein Acetyltransferase-defizientes p300-Protein ausschließlich in B-Zellen synthetisieren, eine fatale Autoimmunerkrankung entwickeln, die zu einem frühzeitigen Sterben der Mäuse führt (Abb. 13) und ähnliche Symptome wie der humane SLE zeigt (Abb. 14, 15, 16, 17 und 18). Zu diesen Symptomen zählen eine Splenomegalie (Abb. 14A und B), eine Pathologie der Niere mit Nephritis, Glomerulonephritis, Fibrose und Nephritis in anderen Organen (Abb. 14C, D, E und F), Einlagerungen von Immunglobulinkomplexen in verschiedenen Organen, wie Niere, Leber und Lunge (Abb. 15 und Daten nicht gezeigt), die Produktion von Autoantikörpern gegen dsDNA (Abb. 16) und andere extrahierbare nukleäre Antigene (ENA, Abb. 17) und ein früheres Sterben der Weibchen im Vergleich zu den Männchen als charakteristisches Merkmal von SLE beim Menschen (Abb. 18). Somit führt ein einziger primärer genetischer Defekt in den B-Zellen, eine Punktmutation in der Acetyltransferasedomäne eines *p300*-Allels, zur Auslösung einer systemischen Autoimmunerkrankung. Daher supprimiert p300 über dessen Acetyltransferaseaktivität diese Autoimmunerkrankung.

Dieser beobachtete Phänotyp wird weder in Mäusen, bei denen p300 vollständig in den B-Zellen fehlt, noch in Mäusen mit einer deletierten KIX-Domäne beobachtet (Kasper *et al.*,

2002; Xu *et al.*, 2006). Mäuse, die homozygot für eine Punktmutation in der KIX-Domäne von p300 sind, weisen Defekte in zahlreichen hämatopoetischen Zelltypen auf, einschließlich einer Reduktion der B-Zellen (Kasper *et al.*, 2002; Sandberg *et al.*, 2005). Ein konditioneller *Knock-Out* von *p300* nach dem Stadium der Pro-B-Zelle mit Hilfe der *CD19-cre* Rekombinase zeigt eine geringe Reduktion der peripheren B-Zellen im Blut, in der Milz und in den Lymphknoten (Xu *et al.*, 2006). Murine *p300*-defiziente embryonale Stammzellen zeigen ebenfalls eine verminderte hämatopoetische Differenzierung, jedoch keine Entwicklung einer Autoimmunerkrankung (Rebel *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass p300 wichtig für die Entwicklung der B-Zellen ist und das Paralog CBP in diesem Stadium der Entwicklung nicht diese Funktion von p300 übernehmen kann. Aufgrund der Ausprägung der unterschiedlichen Phänotypen kann zusätzlich geschlussfolgert werden, dass der Verlust von p300 nicht funktionell äquivalent zu einer selektiven Inaktivierung der Acetyltransferaseaktivität von p300 ist.

### **5.1.1 Die p300-Acetyltransferaseaktivität ist für die Suppression der Autoimmunität notwendig**

Zur Beschreibung und Identifikation der Erkrankung werden mehrere Phänotypen untersucht. Dazu zählen unter anderem H&E-Färbungen der verschiedenen Organe, um die systemische Erkrankung zu belegen. Die auftretenden homogen-gefärbten Proteineinlagerungen in den Glomeruli der Nieren (Abb. 14D) enthalten größtenteils Immunglobulin-komplexe (Abb. 15). Diese Aggregate sind ein Zeichen der systemischen Erkrankung, da sie zum Beispiel durch autoreaktive B-Zellen präsentiert bzw. sekretiert werden können. Ein Hinweis für das Vorhandensein von aktivierten autoreaktiven B- und/oder T-Zellen in mehreren Organen, wie Niere, Leber, Lunge, liefern die mittels H&E-Färbungen nachgewiesenen Infiltrate mononukleärer Zellen (Abb. 14D, E und F). Die Lymphozyten können aus der Milz in diese Organe gewandert sein. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, dass es sich bei den Infiltraten um Lymphozyten handelt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es andere Zelltypen, wie zum Beispiel NK-Zellen oder dendritische Zellen, sind.

Der Geschlechterunterschied bei dieser Erkrankung, der in der vorliegenden Arbeit beobachtet wird, konnte bereits bei klinischen Studien SLE-Patienten festgestellt werden. In diesen ist ein häufigeres Auftreten der Autoimmunerkrankung bei Frauen im Vergleich zu Männern auffällig (Whitacre, 2001). Statistische Analysen verdeutlichen, dass ca. 90% der SLE-Patienten Frauen sind und dadurch zählt SLE neben dem Sjögren's Syndrom zu

den Autoimmunerkrankungen mit dem auffälligsten Geschlechterunterschied. Dieser Unterschied ist bei Mäusen mit Expression eines Acetyltransferase-defizienten *p300* in B-Zellen auf zwei verschiedenen genetischen Stammhintergründen zu beobachten (Abb. 18). Somit wird der Geschlechterunterschied unabhängig von dem genetischen Stammhintergrund gezeigt. Dennoch ist ein stärkerer Unterschied zwischen Weibchen und Männchen beim gemischten 129/Sv  $\times$  FVB/N Stammhintergrund mit einem späteren Sterben der Mäuse im Vergleich zum gemischten 129/Sv  $\times$  C57BL/6 zu beobachten. Dies zeigt, dass der Einfluss von genetischen Unterschieden der Geschlechter aufgrund der verschiedenen Stammhintergründe bei einem langsameren Verlauf der Erkrankung stärker ist. Jedoch ist aufgrund des verschiedenen Phänotyps beider Stämme keine genauere Einschränkung der Ursache des Unterschiedes möglich.

Es wird vermutet, dass die vorrangige Anfälligkeit von Frauen für SLE durch Geschlechtshormone (Steroide) gesteuert wird und Östrogen die Lymphozytenentwicklung beeinflussen kann (Schuurs and Verheul, 1990; Smithson *et al.*, 1998). Des Weiteren wird in SLE-Patienten manchmal ein erhöhter Östrogenspiegel beobachtet, wodurch die therapeutische Behandlung zur Modulation des Geschlechtshormonspiegels klinische Vorteile bietet (Strand, 1999). Zahlreiche Gene des BCR-Signalweges werden durch Östrogen in B-Zellen von Mäusen reguliert (Grimaldi *et al.*, 2002). Zu den hochregulierten Genen nach Östrogengabe zählen *Cd22*, *Shp-1*, *Bcl-2* und *Vcam-1*, die zusammen für die Aktivierung und das Überleben von B-Zellen von Bedeutung sind. Die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  werden in B-Zellen exprimiert und aktivieren direkt die Expression von *Cd22*, *Shp-1* und *Bcl-2*. Zusätzlich wird gezeigt, dass eine Östrogenbehandlung von isolierten primären B-Zellen deren BCR-vermittelte Apoptose verhindert (Grimaldi *et al.*, 2002). Somit führt die Östrogenbehandlung von Mäusen zu molekularen Veränderungen der B-Zellen, die das Überleben von unreifen B-Zellen beeinflussen und ein peripheres B-Zell-Repertoire mit autoreaktiven B-Zellen, die normalerweise im Organismus entfernt werden, hervorbringen. Daher wäre eine Hypothese, dass die Acetyltransferaseaktivität von *p300* die Östrogenproduktion der Mäuse beeinflusst und somit eine fehlende Herunterregulation der Östrogene die Autoimmunerkrankung einleitet. Eine Analyse der durch Östrogen beeinträchtigten Gene zeigt hingegen eine Herunterregulation bei Mäusen mit Expression eines Acetyltransferase-defizienten *p300* in B-Zellen (zum Beispiel *Shp-1*, Abb. 26A und siehe Anhang), wohingegen diese bei Östrogenüberschuss und einer daraus resultierenden Induktion einer Autoimmunität hochreguliert werden. Aus dieser gegensätzlichen Beziehung kann geschlossen werden, dass die Östrogenproduktion der Mäuse vermutlich



nicht durch die fehlende Acetyltransferaseaktivität von p300 hochreguliert wird. Demzufolge ist eine erhöhte Östrogenproduktion in diesem Mausmodell voraussichtlich nicht die Ursache für die Entwicklung der Autoimmunerkrankung.

Ein weiteres Merkmal der Autoimmunerkrankung SLE ist die Produktion von Antikörpern gegen dsDNA, die in Mäusen mit B-Zell-spezifischer Expression eines Acetyltransferase-defizienten *p300* unabhängig von den äußerlichen Auffälligkeiten ist (Abb. 16A). Die Mäuse bilden bereits in einem frühen Alter, in dem noch keine äußerlichen Auffälligkeiten zu beobachten sind, Autoantikörper in erhöhten Mengen (ca. 2-3-fach). Des Weiteren ergibt die Analyse der Autoantikörper, dass ebenso wie bei SLE-Patienten die Produktion der dsDNA-spezifischen Autoantikörper ein spezifisches Merkmal für SLE im Vergleich zur ENA-Messung ist (Abb. 16A und 17). Bei der Messung der ENA-spezifischen Autoantikörper war nicht nur die absolute Menge der Antikörper schwächer, sondern auch der Unterschied zu den Kontrollmäusen geringer (Abb. 17).

### **5.1.2 Die p300-Acetyltransferaseaktivität ist für die Differenzierung der B-Zellen notwendig**

Warum entwickeln Mäuse mit einer B-Zell-spezifischen Expression von Acetyltransferase-defizientem p300 eine systemische Autoimmunerkrankung, die zum Tod der Mäuse führt? Ein Ansatzpunkt zur Klärung der Fragestellung war die Charakterisierung, ob und an welchem Schritt die B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung durch p300 und dessen Acetyltransferaseaktivität beeinflusst wird. Im Knochenmark werden unreife autoreaktive B-Zellen entweder durch Apoptose (klonale Deletion), durch funktionelles *Silencing* (Anergie) oder durch weiteres Re-Arrangement der V-Gene bis hin zu einem nicht autoreaktiven Immunglobulin (Rezeptor *Editing*) aussortiert. Nachdem die B-Zellen diese Selektionsprozesse durchlaufen haben, können unreife B-Zellen in die Peripherie wandern und sich dort zu reifen naiven B-Zellen differenzieren, die in der Milz in folliculäre und MZ-B-Zellen aufgeteilt werden bzw. in der Peritonealflüssigkeit sich zu B-1 B-Zellen entwickeln (Hayakawa *et al.*, 1983; Hayakawa and Hardy, 1988; Kantor and Herzenberg, 1993; Hardy and Hayakawa, 1994; Wen *et al.*, 2005). Die reifen B-Zellen werden allen Selbstantigenen, die nicht im Knochenmark vorhanden sind, ausgesetzt. Sofern sie diese Selbstantigene tolerieren, können die B-Zellen in einen langlebigen Pool von B-Zellen übergehen.

Mäuse mit B-Zell-spezifischer Expression eines Acetyltransferase-defizienten *p300* weisen bis auf eine Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen keine weiteren auffälligen

Änderungen der B-Zellen im Knochenmark auf (Daten nicht gezeigt). Die FACS-Analysen der Milzzellen veranschaulichen hingegen eine reduzierte Anzahl an B-Zellen mit hoher sIgM-Expression (Abb. 19A). Zusätzlich und in Einklang mit dieser Beobachtung sind die MZ-B-Zellen in der Milz dieser Mäuse reduziert (Abb. 19B). Des Weiteren besitzen die Mäuse eine abnormale Population reifer B-Zellen, die zwar IgD als Oberflächenmoleküle jedoch kein oder nur zum Teil CD23 als Reifungs- und Differenzierungsmarker besitzt (Abb. 19E, F und G). Da dieser partielle Verlust der Reifung der B-Zellen bereits bei Mäusen ohne klinische Auffälligkeiten zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt), ist es ein frühes Zeichen der Erkrankung, das zusammen mit der Autoantikörperproduktion zeitlich vor der Nierenpathologie und der Schädigung anderer Organe auftritt.

Diese FACS-Ergebnisse der Milzzellen von Mäusen zeigen, dass einzelne Signalwege der B-Zell-Differenzierung in der Peripherie durch die fehlende p300-vermittelte Acetylierung altersabhängig in ihrer Wirkung beschränkt werden. Dadurch veranschaulichen sie eine kritische Rolle der B-Zellen in der Initiation einer SLE-ähnlichen Autoimmunerkrankung. Mehrere Studien zeigen, dass B-Zellen essentiell für die Entwicklung einer Autoimmunität und deren Erkrankungen sind (Lipsky, 2001). Der Transfer von kultivierten Prä-B-Zellen, die aus der fötalen Leber von SLE-prädisponierten (NZB  $\times$  NZW) F1-Mäuse stammen, in SCID-Mäuse (Nacktmäuse) ist ausreichend für die Ausbildung eines SLE-ähnlichen Syndroms (Reininger *et al.*, 1992). Da sich aus diesen Zellen keine T-Zellen entwickeln können, weist dies zusätzlich zu der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass intrinsische Defekte der B-Zellen eine primäre Rolle in der Pathogenese einer Autoimmunerkrankung bilden.

Des Weiteren ist bekannt, dass sowohl (NZB  $\times$  NZW) F1-Mäuse als auch SLE-Patienten vor dem Ausbrechen der Erkrankung eine hohe Anzahl an B-Zellen besitzen, die spontan niederaffine Antikörper des Isotyps IgM gegen DNA produzieren (Steward and Hay, 1976; Viau and Zouali, 2005). Die pathogenen, hochaffinen IgG-Autoantikörper, die gegen DNA gerichtet sind, entstehen vermutlich durch einen Antigen-vermittelten Prozess, wodurch die adaptive Immunität für deren Produktion verantwortlich ist (Demaison *et al.*, 1994; Radic and Weigert, 1994). Dennoch wird aufgrund anderer Beobachtungen vermutet, dass B-Zellen mit angeborenen Immunitätseigenschaften ebenso eine Rolle in der Autoimmunität spielen können. Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen werden zum Beispiel erhöhte Mengen an B-1 B-Zellen beobachtet (Sidman *et al.*, 1986; Burastero *et al.*, 1988; Dauphinee *et al.*, 1988). Dies liegt jedoch nicht in den Mäusen mit B-Zell-spezifischer Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* vor (Daten nicht gezeigt).

B-1 B-Zellen exprimieren eine bestimmte Anzahl autoreaktiver Spezifitäten und sind für die meisten im Serum, natürlich vorkommenden Autoantikörper verantwortlich (Herzenberg *et al.*, 1986; Hardy and Hayakawa, 1994; Hayakawa *et al.*, 1999).

Obwohl in den meisten Fällen von Autoimmunerkrankungen bei Mäusen eine erhöhte Anzahl an MZ-B-Zellen beobachtet wird, ist in dem vorliegenden Mausmodell dies nicht der Fall. Dies kann an der erhöhten Anzahl aktivierter B-Zellen liegen (Abb. 23A und B). Aktivierte B-Zellen liegen zum Großteil in der Marginalzone der Milz vor und sind aufgrund der Anzeichen einer Autoimmunerkrankung vermutlich autoreaktiv. Diese Autoreaktivität wird durch den ELISA auf dsDNA-spezifische Autoantikörper bestätigt (Abb. 16A). Nach der Aktivierung verlassen die B-Zellen die Marginalzone der Milz und wandern im Körper zu Organen, in denen sie sich ablagern können. Die gefärbten Infiltrate mononukleärer Zellen in den Nieren (Abb. 14D) weisen auf B-Zellen hin, da in der Niere ebenso wie in der Leber hohe Mengen an Immunglobulinen nachweisbar sind (Abb. 15). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass diese Immunglobuline zum Isotyp IgM gehören, da die produzierten Autoantikörper vorrangig IgM sind.

Neben einer Beeinträchtigung der Differenzierung der reifen B-Zellen ist die Anzahl der transitionellen B-Zellen in den Mäusen mit Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* in B-Zellen aufgrund einer erhöhten Apoptose reduziert (Abb. 20 und 25). Die absoluten Mengen transitioneller B-Zellen bezogen auf die Milzgröße sind jedoch unverändert (siehe 4.1.3). Dies verdeutlicht zusammen mit den FACS-Analysen der B-Zellen im Knochenmark, dass die Autoimmunerkrankung nicht aufgrund eines Defektes in der Selektion der Selbsttoleranz der unreifen B-Zellen im Knochenmark entsteht. Der Defekt in der Negativselektion muss demzufolge an einem späteren Schritt der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung in der Peripherie nach dem Stadium der transitionellen B-Zellen sein.

### **5.1.3 Der beobachtete Phänotyp zeigt Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Mausmodellen**

Einige der beobachteten Phänotypen der B-Zellen, die durch eine reduzierte Acetyltransferaseaktivität von *p300* verursacht werden, spiegeln Phänotypen wider, die in anderen Mausstämmen auffällig sind. Zum Beispiel fehlen Mäusen, die defizient für den Transkriptionsfaktor Aiolos sind, in der Milz MZ-B-Zellen und B-Zellen mit hoher Expression von IgM, CD21/35 und IgD (Wang *et al.*, 1998; Cariappa *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003). Diese Mäuse weisen ebenso wie die *p300<sup>+/-AS-neo</sup>*; *CD19-cre* Mäuse eine

reduzierte Anzahl an rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark auf. Sie haben jedoch einen vergrößerten Pool an hyperaktiven folliculären B-Zellen. Eine Bestimmung der Expression von *Aiolos* in den Mäusen mit B-Zell-spezifischer Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* weist eine 50%-ige Reduktion in der mRNA-Menge dieses Transkriptionsfaktors auf (Daten nicht gezeigt). Diese reduzierte Expression von *Aiolos* könnte mit für die Entwicklung der Autoimmunerkrankung verantwortlich sein.

Ähnlich dem Phänotyp der *Aiolos*-defizienten Mäuse besitzen Mäuse mit einer konditionellen Deletion des Transmembranrezeptors Notch2 keine MZ-B-Zellen und keine CD21/35<sup>hoch</sup> CD23<sup>+</sup> Milzzellen (Saito *et al.*, 2003). Die folliculären B-Zellen hingegen sind bei diesen Mäusen in ihrer Anzahl und Funktion unverändert. Mäuse mit einer fehlenden Signaltransduktion über den Notch-Signalweg besitzen einen ähnlichen Phänotyp (Maillard *et al.*, 2004). Jedoch ist in dem vorliegenden Mausmodell kein direkter Effekt auf den Notch-Signalweg ersichtlich (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Ergebnisse einer Maus mit einer Punktmutation in der im BCR-Signalweg involvierten Kinase *Lyn*, die zu einem konstitutiv-aktiven Protein führt, könnte eine Deregulation dieses Gens in Betracht gezogen werden. Die Maus zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Maus mit einer Reduktion von sIgM, einer verringerten Antwort des BCR-Signalweges, einer verminderten Anzahl an MZ-B-Zellen, einer Glomerulonephritis und einer erhöhten Produktion von Autoantikörpern (Hibbs *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung der Expression von *Lyn* ist jedoch keine Veränderung in den B-Zellen mit Acetyltransferase-defizientem *p300* zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Somit gehört *Lyn* ähnlich den Proteinen des Notch-Signalweges nicht zu den Proteinen, die von der *p300*-Acetyltransferaseaktivität in B-Zellen abhängig sind.

#### **5.1.4 Der positive Effekt der T-Zell-Aktivierung durch B-Zellen**

Mäuse mit Acetyltransferase-defizientem *p300* in B-Zellen haben nicht nur eine erhöhte Anzahl an aktivierten B-Zellen sondern ebenso an aktivierten T-Zellen (Abb. 23). Dies beruht darauf, dass zwischen B- und T-Zellen eine Zwei-Wege-Interaktion existiert: Die B-Zellen vermitteln über Antigenpräsentationen Signale an die T-Zellen und die T-Zellen können als Hilfe für die B-Zellen durch die Freisetzung von Zytokinen und Zelloberflächenliganden fungieren. Diese Interaktionen führen zu einem positiven Rückkopplungseffekt. Es wird vermutet, dass bereits ein kleiner Unterschied in der initialen B- oder T-Zell-Aktivierung über einen bestimmten Zeitraum zur Amplifikation dieser Zellen und somit zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung anstelle einer Selbsttoleranz führen

kann (Shlomchik *et al.*, 2001). Genetische *Knock-Out*-Mäuse mit fehlenden B- oder T-Zellen zeigen die Notwendigkeit beider Zelltypen für die Entwicklung von SLE (Peng *et al.*, 1996a; Peng *et al.*, 1996b; Chan and Shlomchik, 1998).

MRL/*Fas*<sup>lpr</sup> Mäuse, in denen die B-Zellen keine Immunglobuline sekretieren können, entwickeln eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung, obwohl sie jedoch keine zirkulierenden Autoantikörper besitzen (Chan *et al.*, 1999a). Dies legt nahe, dass die T-Zell-Autoimmunität eine sekundäre Antwort auf eine Autoantikörper-vermittelte Gewebepathologie ist. Des Weiteren weisen die MRL/*Fas*<sup>lpr</sup> Mäuse mit einer manipulierten B-Zell-Defizienz keine erhöhte Anzahl aktivierter T-Zellen auf (Chan *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1999b). Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass die in dieser Arbeit beobachtete Aktivierung der T-Zellen vermutlich ein sekundäres Ereignis nach der Einleitung der Autoimmunerkrankung darstellt. Die unbeeinträchtigte Proliferation der primären naiven B-Zellen nach Induktion der T-Zell-Hilfe zeigt ebenfalls, dass die T-Zellen nicht direkt für die Auslösung der Autoimmunität verantwortlich sind.

Der in dieser Arbeit beobachtete Phänotyp ist nicht bei einem konditionellen *Knock-Out* von *p300* zu beobachten, bei dem eine essentielle Funktion von *p300* vor oder im Pro-B-Zell-Stadium beschrieben wird (Xu *et al.*, 2006). Eine Inaktivierung von *p300* in zum Beispiel hämatopoetischen Stammzellen (*Mx1-cre*) führt zu einer Reduktion der Zahl der Pro- und Prä-B-Zellen (Xu *et al.*, 2006). Diese Arbeit verdeutlicht hingegen eine Funktion der *p300*-Acetyltransferaseaktivität nach dem Pro-B-Zell-Stadium, da die *CD19-cre* Rekombinase erst beim Stadium der Pro-B-Zelle einsetzt. Daher können in diesem Mausmodell die frühzeitigen Effekte, die der konditionelle *Knock-Out* von *p300* zeigt, nicht beobachtet werden.

### **5.1.5 Die *p300*-Acetyltransferaseaktivität beeinflusst die Bildung der Immunglobuline**

Zusätzlich zur unvollständigen Differenzierung der B-Zellen und erhöhten Anzahl aktivierter B- und T-Zellen produzieren die B-Zellen eine höhere Anzahl an Immunglobulinen im Serum der Mäuse mit B-Zell-spezifischer Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* (Abb. 21). Die erhöhte Menge an Antikörpern des Isotypes IgG2b im Serum der Mäuse zusammen mit der hochregulierten Expression von *Igg2b* und des Keimbahntranskripts *Cy2b* von IgG2b (Abb. 26 und 29) sind Anzeichen für einen Klassenwechsel der Immunglobuline zu IgG2b. Jedoch zeigt die Messung der Isotypen der Autoantikörper gegen dsDNA, dass sie zum Isotyp IgM gehören (Abb. 16B). Dies

verdeutlicht eine generelle Erhöhung der Immunglobulin- bzw. Antikörperbildung und spiegelt keinen Klassenwechsel von IgM zu IgG2b wider.

Des Weiteren besitzen zwar 90% der untersuchten Mäuse zusätzlich zu IgM-Autoantikörpern ebenso einige des Isotypes IgG, jedoch nur insgesamt 40% sind vom Isotyp IgG2b. Die erhöhten Mengen der Immunglobuline im Serum dieser Mäuse (Abb. 21) sind nicht nur mit der erhöhten Anzahl aktivierter (CD69<sup>+</sup>) B-Zellen in der Milz (Abb. 23A) konsistent, sondern ebenso mit der erhöhten Anzahl an Ovalbumin-spezifischen Immunglobulinen bereits vor der Immunisierung (Abb. 22B, Tag 0). Eine zusätzlich erhöhte Menge an aktivierten (CD69<sup>+</sup>) T-Zellen (Abb. 23B) spiegelt den positiven Rückkopplungseffekt der Aktivierung von B- und T-Zellen wider.

Aufgrund der Detektion der erhöhten Mengen an Immunglobulinen und dem Nachweis, dass die B-Zellen der Mäuse Immunglobuline produzieren können, ist die Immunantwort gegenüber einem T-Zell-abhängigen Antigen von besonderem Interesse. Die Primärantwort der Mäuse mit Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* in B-Zellen gegenüber dem T-Zell-abhängigen Antigen Ovalbumin ist jedoch unbeeinflusst (Abb. 22B, Tag 14). Somit sind die Mäuse in der Lage, auf ein T-Zell-abhängiges Antigen mit der Produktion von spezifischen Antikörpern zu reagieren. Des Weiteren zeigt dies, dass die Signaltransduktionskaskaden zur Kommunikation zwischen B- und T-Zellen nicht von der *p300*-Acetyltransferaseaktivität abhängig sind. Im Vergleich zur Primärantwort ist hingegen eine reduzierte Erinnerungsantwort nach einer zweiten Injektion des Antigens zu beobachten (Abb. 22B, Tag 38). Daraus wird ersichtlich, dass die *p300*-Acetyltransferaseaktivität für die Bildung von Gedächtniszellen notwendig ist. Dies könnte den Einfluss der Acetyltransferaseaktivität auf den BCR-Signalweg widerspiegeln, der zu einem späteren Zeitpunkt noch genauer untersucht wird. Der BCR-Signalweg ist unter anderem für die Entwicklung der B-Zellen zu bestimmten Subtypen, wie Gedächtnis- oder Plasmazellen, verantwortlich. Die Mäuse besitzen dennoch eine gewisse Anzahl von Gedächtniszellen. Dies lässt sich aus dem Anstieg an Ovalbumin-spezifischen Antikörpern nach der zweiten Injektion schließen. Demzufolge wird der BCR-Signalweg durch die Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300* zwar gehemmt, jedoch nicht vollständig blockiert (siehe 5.1.6).

Die Messung von Ovalbumin-spezifischen Antikörpern vom Isotyp IgG2b zeigt bereits vor der Immunisierung eine Erhöhung (Abb. 21 und 22C, Tag 0). Dennoch ist die Erinnerungsantwort der Mäuse bei Ovalbumin-spezifischen IgG2b nicht signifikant reduziert im Vergleich zur Gesamtmenge an Ovalbumin-spezifischen Immunglobulinen (Abb. 22C,

Tag 38). Demzufolge sind andere Immunglobuline für die reduzierte Erinnerungsantwort verantwortlich.

### **5.1.6 Eine Hemmung des BCR-Signalweges durch Acetyltransferase-defizientes p300 könnte die Autoimmunerkrankung einleiten**

Zur Untersuchung der Reaktion der B-Zellen der Mäuse auf verschiedene Stimuli, die die wesentlichen Signalwege einer B-Zelle aktivieren, werden Proliferationsanalysen mit Hilfe des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus verwendet. Die Proliferation primärer B-Zellen nach Aktivierung des Interleukin-Signalweges durch IL-4 oder nach Induktion der T-Zell-Hilfe mittels  $\alpha$ -CD40 zeigt keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen (Abb. 24). B-Zellen mit Acetyltransferase-defizientem p300 weisen nach Aktivierung des BCR-Signalweges mit  $\alpha$ -IgM eine schwächere Proliferation auf. Dies wird nicht durch eine erhöhte Apoptose der reifen B-Zellen mit Acetyltransferase-defizientem p300 verursacht, da die Anzahl der apoptotischen, reifen B-Zellen nach Stimulation nicht beeinflusst ist (Abb. 25). Der Unterschied zwischen den Genotypen nimmt zwar mit steigender Konzentration von  $\alpha$ -IgM ab, jedoch bleibt er vorhanden. Der Grenzwert zur Aktivierung des BCR-Signalweges liegt bei den B-Zellen mit Acetyltransferase-defizientem p300 somit höher als in den Kontrollzellen. Dies legt nahe, dass der BCR-Signalweg in diesen Zellen durch die fehlende Acetylierung mittels p300 beeinträchtigt ist. Die Menge an aktivierten B-Zell-Rezeptor kontrolliert die Negativselektion der B-Zelle. Mutationen, die den Grenzwert der Aktivierung des BCR-Signalweges verändern, können somit die Selbsttoleranz beeinträchtigen (Cyster *et al.*, 1996; Bolland and Ravetch, 2000; Grimaldi *et al.*, 2005). Zum Beispiel kann das Fehlen der Tyrosinkinase Lyn, was zu einer reduzierten Aktivierung des BCR-Signalweges führt, eine Autoimmunerkrankung in Mäusen induzieren (Nishizumi *et al.*, 1995). Demzufolge könnte die in dieser Arbeit beobachtete Hemmung der Aktivierung des BCR-Signalweges eine Ursache für die Entwicklung des SLE-ähnlichen Phänotyps sein.

Prinzipiell kann das Acetyltransferase-defiziente p300 eine reduzierte Proliferation als Antwort auf die Aktivierung des BCR-Signalweges zum einen durch eine Veränderung der Synthese der Komponenten des Signalweges hervorrufen. Zum anderen könnte das mutierte p300-Protein die Aktivierung einzelner Gene, die Zielgene des BCR-Signalweges sind, hemmen. Zahlreiche Transkriptionsfaktoren, dessen Aktivität durch den BCR-Signalweg reguliert wird, wie NF- $\kappa$ B oder NF-AT, benötigen p300 als Koaktivator (Garzia-Rodriguez and Rao, 1998; Zhong *et al.*, 1998). Des Weiteren wird die Aktivität von NF- $\kappa$ B

durch eine p300-abhängige Acetylierung geregelt (Chen *et al.*, 2002). Jedoch führt nicht nur die Aktivierung des BCR-Signalweges, sondern ebenso die Stimulation der peripheren B-Zellen mit  $\alpha$ -CD40 oder LPS zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren, die zahlreiche Gene in den lymphoiden Zellen regulieren (Grilli *et al.*, 1993; Baeuerle and Henkel, 1994; Siebenlist *et al.*, 1994). Im Einklang mit der unveränderten Proliferation der B-Zellen nach diesen Stimuli (Abb. 24) zeigt ebenfalls der cDNA-Microarray keine Deregulation von NF- $\kappa$ B (Daten nicht gezeigt).

Jedoch weisen die untersuchten, reifen B-Zellen der Mäuse mit Acetyltransferase-defizientem p300 eine Vielzahl von deregulierten Genen, die im BCR-Signalweg beteiligt sind, auf. Zu den herunterregulierten Genen zählen unter anderem *Rac2*, *Syk*, *Shp1*, *Baff-r*, *Blk*, *Cd45* und *Cd33* (Abb. 26 und siehe Anhang). Dadurch wird die Verknüpfung von p300 mit der reduzierten Proliferation nach Aktivierung des BCR-Signalweges verstärkt und eine essentielle Funktion der p300-Acetyltransferaseaktivität in der Regulation des BCR-Signalweges identifiziert. Eine Beteiligung von p300 in dem BCR-Signalweg wird außerdem durch die konditionelle *Knock-Out*-Maus mit einem vollständigen Verlust von p300 nach dem Stadium der Pro-B-Zelle beschrieben, da diese eine Reduktion der BCR-abhängigen Genexpression aufweist (Xu *et al.*, 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass B-Zellen von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen zahlreiche Defekte im BCR-Signalweg besitzen (Tsokos and Liossis, 1999; Hasler and Zouali, 2001; Tuscano *et al.*, 2003; Zouali and Sarmay, 2004).

Eine exakte Regulation des BCR-Signalweges ist für die Entwicklung der reifen B-Zellen zu folliculären oder MZ-B-Zellen verantwortlich. Die Entwicklung von folliculären B-Zellen benötigt einen hohen Grenzwert des BCR-Signalweges, wohingegen die MZ-B-Zellen bereits bei einer niedrigeren Aktivierung des Signalweges reagieren (Cariappa *et al.*, 2001; Croker *et al.*, 2002; Martin and Kearney, 2002). Dies wird in der vorliegenden Arbeit in der Analyse der Proliferation nach Aktivierung des BCR-Signalweges mittels  $\alpha$ -IgM bestätigt (Abb. 24). Dabei ist ersichtlich, dass eine reduzierte Anzahl an MZ-B-Zellen (Abb. 19C und D) zu einer geringeren Proliferation dieser führt. Daher ist eine höhere Menge an  $\alpha$ -IgM notwendig, um die reifen B-Zellen, die überwiegend folliculäre B-Zellen und weniger MZ-B-Zellen sind, zur Proliferation anzuregen. Der Grenzwert zur Aktivierung des BCR-Signalweges liegt dabei höher als in den Kontrollmäusen. Somit könnte die reduzierte Aktivierung des BCR-Signalweges zu der beobachteten, unvollständigen Differenzierung der B-Zellen führen (siehe 5.1.2).



Zusätzlich zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit nach Aktivierung des BCR-Signalweges ist die Reaktion der B-Zellen nach Induktion des TLR-Signalweges zu beachten. Sowohl B-Zellen von Mäusen als auch vom Mensch besitzen Toll-like Rezeptoren und exprimieren hohe Mengen des TLR-9 und TLR-10 (Applequist *et al.*, 2002; Bourke *et al.*, 2003). Der TLR-9 erkennt unmethylierte CpG-Motive, die charakteristisch für die bakterielle DNA sind, und ist in der direkten Immunantwort gegenüber einem weit reichenden Spektrum an Mikroorganismen beteiligt. Die induzierbare Expression der TLR in B-Zellen stellt daher die Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Da in der Proliferationsrate der B-Zellen mit Acetyltransferase-defizientem p300 keine Veränderung zu sehen ist, scheint die p300-Acetyltransferaseaktivität keinen Einfluss auf die erworbene Immunität im Hinblick auf den TLR-Signalweg zu haben.

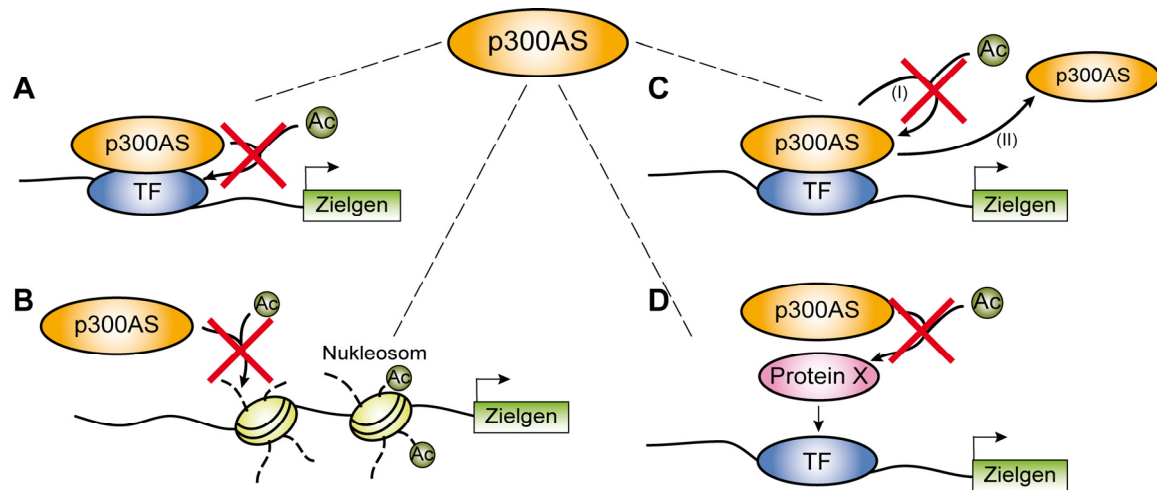
Zusätzlich zu den B-Zell-spezifischen Signalwegen sind ebenso andere allgemeine Signalwege in der Entwicklung von B-Zellen involviert, wie der antiproliferative TGF- $\beta$ - oder der proliferationsanregende Wnt-Signalweg. In diesen Signalwegen ist p300 auch als Koregulator beteiligt. Es interagiert zum Beispiel mit Mitgliedern der Smad-Proteinfamilie und acetyliert diese Transkriptionsfaktoren, die stromabwärts liegende Effektorproteine des TGF- $\beta$ -Signalweges sind (siehe 4.1.6) (Simonsson *et al.*, 2006). Objektive Analysen zur Überprüfung der Anreicherung von Gengruppen (GSEA, *Gene set enrichment analysis*) oder bestimmten Enzymfamilien, wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die spezifisch in einem Signalweg beteiligt sind, zeigen keine signifikante Deregulation (Daten nicht gezeigt).

### **5.1.7 B-Zellen mit Expression eines Acetyltransferase-defizientem p300 zeigen eine reduzierte Acetylierung von Proteinen**

Während eine vollständige Deletion von p300 zu einem gleichzeitigen Verlust aller biochemischen Funktionen von p300 am Promotor führt, kann das Acetyltransferase-defiziente p300-Protein dennoch zum Promotor rekrutiert werden. Dort besitzt p300AS weiterhin die Möglichkeit andere Funktionen auszuüben, wie zum Beispiel die als Adapterprotein oder die E3/E4-Ubiquitinligaseaktivität. Die p300-Acetyltransferase-aktivität kann über mehrere Mechanismen wirken (Abb. 38). Zum einen können direkt Lysinreste an Histonen acetyliert werden (Abb. 38B). In der vorliegenden Arbeit zeigt sowohl eine globale als auch eine promotorspezifische Analyse der Histon H3K18-Acetylierung, das *in vitro* ein spezifisches Substrat von p300 ist (Schiltz *et al.*, 1999), keine Veränderung in B-Zellen mit Acetyltransferase-defizientem p300 (Abb. 28 und 29).

Zum anderen kann p300 Transkriptionsfaktoren (Abb. 38A) oder andere Proteine, die dann wiederum weitere Proteine an den Promotor rekrutieren können (Abb. 38D), acetylieren. Diesbezüglich ist in den B-Zellen der Mäuse mit Acetyltransferase-defizientem p300 eine reduzierte Acetylierung von Proteinen, die ein höheres Molekulargewicht als Histone besitzen, zu detektieren (Abb. 30). Somit wäre eine Identifizierung dieser Proteine mit einer fehlenden oder verminderten Acetylierung zum Beispiel mit Hilfe von Massenspektrometrie von Interesse. Aufgrund des zu geringen Materials aus primären naiven B-Zellen ist jedoch die Herstellung der B-Zelllinie mittels homologer Rekombination mit nachgewiesener Expression von Acetyltransferase-reduziertem *p300* hilfreich (Abb. 34, 35, 36 und 37). Keine bzw. eine verminderte Acetylierung eines oder mehrerer dieser Proteine mittels p300 könnte demzufolge die Ursache für die Entwicklung der Autoimmunerkrankung SLE in den Mäusen sein (Abb. 38A und D). Es könnten Proteine sein, die im BCR-Signalweg involviert sind, und somit zu der reduzierten Aktivierung des Signalweges führen. p300 kann ebenso andere Proteine mit einer Acetyltransferaseaktivität rekrutieren, wie zum Beispiel PCAF, die vielleicht Histone oder andere Proteine als gemeinsame Substrate von p300 acetylieren können (Schiltz *et al.*, 1999). Daher ist zu beachten, dass in p300-defizienten Zellen eine Hypoacetylierung eines bestimmten Proteins nicht direkt bedeuten muss, dass p300 selbst dieses Substrat acetyliert. Es könnte sein, dass p300 die Substrat-spezifische Acetyltransferase des Proteins nicht rekrutieren kann.

Des Weiteren ist die Acetyltransferaseaktivität von p300 für dessen Autoacetylierung mit einer anschließenden Dissoziation von p300 vom Proteinkomplex am Promotor notwendig (Abb. 38C). Da das Acetyltransferase-defiziente p300 womöglich zu einer reduzierten Dissoziation aufgrund einer fehlenden Autoacetylierung führt, könnte dies zusätzlich eine Blockade der transkriptionellen Aktivierung und dadurch ein Einfrieren des Promotors zur Folge haben. Die Autoacetylierung innerhalb der Acetyltransferasedomäne hängt mit einem Aktivierungsloop zusammen, so dass die fehlende Acetyltransferaseaktivität zu einer Hemmung der Aktivierung von p300 führt (Ogryzko *et al.*, 1996; Hamamori *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2004).



**Abbildung 38:** Acetyltransferase-defizientes p300 kann über mehrere Mechanismen zu einer veränderten Expression des Zielgens führen.

Schematische Darstellung der Modelle der Auswirkungen von Acetyltransferase-defizientem p300. **A)** Acetyltransferase-defizientes p300 (p300AS) kann zum einen nicht mehr die für die Expression des Zielgens notwendigen Transkriptionsfaktoren (TF) acetylieren. **B)** Zum anderen können die Histone der Nucleosomen im Promotorbereich durch mutiertes p300AS nicht mehr acetyliert werden. **C)** Des Weiteren kann die fehlende Autoacetylierung (I) bei einer Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300* zu einer reduzierten Dissoziation (II) und somit zu einem Einfrieren des Promotors führen. **D)** Als letztes ist der indirekte Einfluss der p300-Acetyltransferaseaktivität auf die Expression des Zielgens zu nennen, bei dem Acetyltransferase-defizientes p300 ein Protein (Protein X), das aktivierend oder reprimierend auf einen Transkriptionsfaktor des Zielgens wirken kann, nicht acetylieren und dadurch nicht regulieren kann.

### 5.1.8 Erweiterung des Acetyltransferase-defizienten p300-Mausmodells

Die Beobachtungen und Analysen in der vorliegenden Arbeit zur Genexpression, B-Zell-Differenzierung und Immunglobulinbildung zeigen jeweils einen partiellen Effekt des Acetyltransferase-defizienten p300. Durch die embryonale Letalität der Mäuse mit heterozygoter Expression des mutierten p300 ist zwar bekannt, dass p300AS einen dominant-negativen Effekt in Hinblick auf die Acetyltransferaseaktivität ausübt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das verbleibende Wildtypallel für *p300* nicht noch Acetylierungen durchführen kann. Diesbezüglich könnten die Untersuchungen der *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse nach Verpaarung mit konditionellen *p300 Knock-Out*-Mäusen (Kasper *et al.*, 2006) einen stärkeren Unterschied hervorbringen. Dabei würde ein Allel das mutierte, reprimierte *p300ASneo* und das zweite Allel Wildtyp-*p300* sein, die mit Hilfe der *CD19-cre* Rekombinase zum mutierten, aktiven *p300AS* und einem *Knock-Out* für *p300* rekombiniert werden können.

Durch die Mutation von p300 könnte ebenso dessen intramolekulares Gleichgewicht gestört werden. Dies würde den dominant-negativen Effekt zusätzlich erklären. Wenn p300 weitere enzymatische Aktivitäten besitzen sollte, die im Gleichgewicht mit der Acetyltransferaseaktivität stehen, führt dies zu einem unausgewogenen Aussetzen des Chromatins gegenüber der anderen Aktivität. Relevant hierfür wäre zum Beispiel die beschriebene

intrinsische E3/E4-Ubiquitinligaseaktivität am N-Terminus von p300 (Grossman *et al.*, 2003).

### 5.1.9 Die p300-Acetyltransferase-defiziente Maus als ein Modell für SLE

Analysen von Menschen und Mäusen legen nahe, dass zusätzlich zu zahlreichen Genen, die eine Autoimmunerkrankung fördern, ebenso andere Gene SLE supprimieren könnten (Morel *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2002). Das *p300*-Gen zählt nicht zu einem derzeit bekannten SLE-Prädispositions- oder -Suppressorlokus im Mensch oder in Mäusen. Dennoch scheinen die *p300*<sup>+/*AS-neo*</sup>; *CD19-cre* Mäuse ein neues Mausmodell für eine Subgruppe von SLE-Patienten darzustellen, das genetisch unabhängig von den weit verbreiteten *MRL/Fas*<sup>*lpr*</sup> Mäusen ist.. Alternativ könnte eine reduzierte Proteinacetylierung unabhängig von dem primären genetischen Defekt ein grundlegendes Ereignis bei humanem SLE sein, ähnlich wie bei der Entstehung und Progression von Krebs.

Die Penetranz der Entwicklung der Krankheit bei den untersuchten Mäusen verdeutlicht, dass die Reduktion der Acetyltransferaseaktivität von p300 in B-Zellen zu einer starken Prädisposition für eine Autoimmunerkrankung führt. Dies ist ähnlich dem Rubinstein-Taybi-Syndrom, das durch die Inaktivierung von nur einem Allel von *p300* oder dem Paralog *CBP* entstehen kann (Roelfsema *et al.*, 2005). Einige dieser Patienten enthalten Mutationen, die nur die Acetyltransferaseaktivität umfassen und somit zeigen, dass bereits eine Veränderung der Acetyltransferaseaktivität von p300 oder CBP pathologische Konsequenzen mit sich führen kann (Murata *et al.*, 2001).

Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell gibt Aufschlüsse über die Relevanz von B-Zellen in der Autoimmunität und liefert Hinweise für ein in der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung involviertes Protein und deren enzymatische Aktivität, die Acetyltransferasefunktion von p300. Zusätzlich wird durch die Beobachtung, dass die Acetyltransferaseaktivität von p300 essentiell für die Regulation der Selbsttoleranz ist, p300 als ein Enzym identifiziert, das für die Kontrolle der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in der Autoimmunität zuständig ist. Aufgrund der Beobachtungen verdeutlicht die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung in Mäusen, denen die p300-Acetyltransferaseaktivität in B-Zellen fehlt, dass das balancierte Gleichgewicht von Acetylierung und Deacetylierung der Proteine in den B-Zellen essentiell ist (Abb. 39). Eine Änderung des Gleichgewichts in Richtung einer verstärkten Deacetylierung führt in diesem Mausmodell zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung. Alternativ kann es ebenso zu Krebs führen,

wie es in Lungen- oder Darmkrebs gezeigt ist (Kikuchi *et al.*, 2002; Espino *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2006; Gallinari *et al.*, 2007).

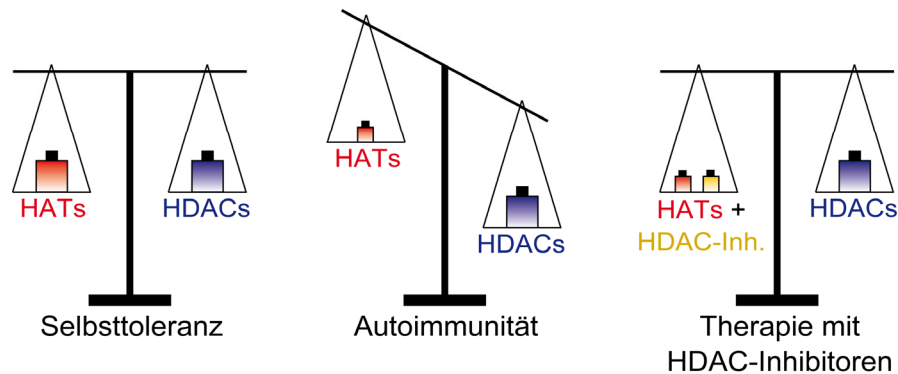
#### **5.1.10 Therapiemöglichkeiten bei SLE in Mäusen und beim Menschen**

SLE ist eine systemische Autoimmunerkrankung, bei der eine Reihe von Ereignissen des Immunsystems zum Verlust der Selbsttoleranz gegenüber nukleären Autoantigenen führen. Aus vielen Studien und ebenso aus der vorliegenden Arbeit ist bekannt, dass die periphere Toleranz überwiegend bei der Ausbildung einer Autoimmunerkrankung, wie SLE, beeinträchtigt ist. Bei der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten könnte sowohl die Heterogenität der Erkrankung (Arthritis, Hautausschlag, Nephritis, Serositis und Zytopenie in verschiedenen Kombinationen) als auch die Präsenz von verschiedenen Typen von Autoantikörpern (gegen Nukleinsäuren, Nukleinsäure-bindende Proteine (snRNP o.ä.), Phospholipide, rote (Erythrozyten) oder weiße Blutzellen, Blutplättchen (Trombozyten), nukleäre Proteine oder Antigene von neuronalen Zellen) eine Rolle spielen (Jacobi and Diamond, 2005; Singh, 2005).

Aufgrund der Defekte in der B-Zell-Funktion in MRL/*Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen und zahlreichen anderen Beobachtungen wird häufig eine Depletion der B-Zellen mittels Rituximab als Therapie von SLE in Betracht gezogen (Shlomchik *et al.*, 2001; Leandro *et al.*, 2002; Looney *et al.*, 2004; Anolik and Aringer, 2005; Leandro *et al.*, 2005). Rituximab wirkt als ein B-Zell-spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das Zelloberflächenprotein CD20, das von der Prä-B-Zelle bis hin zu der Vorstufe einer Plasmazelle exprimiert wird, zytolytisch (Grillo-Lopez *et al.*, 2002; Cragg *et al.*, 2005). Eine B-Zell-Depletion zur Behandlung von SLE ist jedoch in vielen Fällen wenig Erfolg versprechend, denn eine geringe oder nicht vollständige Reduktion der B-Zellen hat häufig keine bzw. eine schwache klinische Verbesserung für den Patienten (Leandro *et al.*, 2002; Looney *et al.*, 2004; Leandro *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wird jedoch gezeigt, dass eine B-Zell-Depletion nicht die zu empfehlende Therapieform ist, da die untersuchten Mäuse nach einer Beeinträchtigung der B-Zell-Differenzierung eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung entwickeln.

Stattdessen sollte aufgrund der Störung des Gleichgewichts zwischen Acetylierung und Deacetylierung der Einsatz von HDAC-Inhibitoren in Betracht gezogen werden. Eine Behandlung von MRL/*Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen mit HDAC-Inhibitoren führt zu einer verzögerten Ausbildung bzw. einer Therapie der Autoimmunerkrankung (Reilly *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2005). Die Milzzellen der Mäuse zeigen globale Veränderungen der posttranslationalen

Modifikationen, vor allem eine Hypoacetylierung von Histon H3 und H4 (Garcia *et al.*, 2005). Demzufolge wäre dies auch ein Ansatz zur Behandlung der Mäuse mit Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300*.



**Abbildung 39:** Die Selbsttoleranz einer B-Zelle kann durch eine reduzierte Acetylierung gestört werden und somit eine Autoimmunerkrankung auslösen.

Schematische Darstellung der Verteilung von Acetylierung und Deacetylierung und dessen Folgen. Solange das Gleichgewicht von Acetylierung und Deacetylierung aufrecht gehalten wird, weisen die B-Zellen eine Selbsttoleranz auf (links). Eine Veränderung des Gleichgewichts zu einer verstärkten Deacetylierung bzw. reduzierten Acetylierung von Proteinen kann eine Autoimmunreaktion hervorrufen (Mitte). Diese könnte durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren und einer somit wieder hervorgerufenen Balance zwischen beiden Modifikationen behandelt werden (rechts).

Der erste in der Klinik eingesetzte HDAC-Inhibitor SAHA verursacht einen Wachstumsarrest und induziert Apoptose in transformierten Zellen *in vitro* und *in vivo* in Konzentrationen, die wenige oder keine toxischen Effekte auf normale Zellen ausüben (Marks, 2007). SAHA induziert ähnlich TSA die Akkumulation von sowohl acetylierten Histonen als auch anderen acetylierten Proteinen in Komplexen mit Transkriptionsfaktoren, wie TFIIB. Der Mechanismus der Anti-Krebswirkung ist derzeit nicht vollständig geklärt. Vermutlich sind sowohl eine Änderung der Genexpression als auch der Funktion von in Signalwegen der Zellproliferation (wie Rb) und Apoptose (wie Bcl-2 Proteinfamilie) beteiligten Proteinen in dem Prozess involviert (Johnstone and Licht, 2003; Rosato *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2004; Bhalla, 2005; Dokmanovic and Marks, 2005; Minucci and Pelicci, 2006; Yoo and Jones, 2006).

## 5.2 Mäuse mit ubiquitärer Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300AS* entwickeln ebenfalls eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung

Durch die Entwicklung der SLE-ähnlichen Autoimmunerkrankung bei Mäusen mit einer induzierten ubiquitären Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300* (Abb. 32) wird die Funktion der B-Zellen in dieser Erkrankung weiter hervorgehoben. Der Phänotyp dieser Mäuse ist jedoch nicht so deutlich ausgebildet, wie bei der B-Zell-spezifischen

Expression von Acetyltransferase-defizientem *p300*. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wird die ubiquitäre Expression durch eine induzierbare Cre-Rekombinase erst nach der 8.-12. Woche nach Geburt der Mäuse ausgelöst. Dies ist ein deutlich späterer Zeitpunkt des Expressionsstarts im Vergleich zu den *CD19-cre* Mäusen, bei denen die Cre-Rekombinase bereits bei der Entwicklung der Pro-B-Zellen in der jungen Maus aktiv wird. Zum anderen ist die Rekombinationseffizienz in den B-Zellen der Mäuse schwächer als die beobachteten ca. 95% bei den *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen. Ein weiterer Grund ist die starke Schwankung der Rekombinationseffizienz zwischen den verschiedenen Mäusen und von Gewebe zu Gewebe, so dass eine gleiche Ausprägung der Merkmale nicht in jeder Maus gesehen werden kann. Dies erklärt vermutlich ebenso, warum die *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäuse trotz des ähnlichen Phänotyps älter als die *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäuse werden. Der ähnliche Phänotyp der *p300<sup>+/AS-neo</sup>; RERTn-cre* Mäuse im Vergleich zu den *p300<sup>+/AS-neo</sup>; CD19-cre* Mäusen verdeutlicht, dass speziell die B-Zellen im Körper einer Maus auf die p300-Acetyltransferaseaktivität angewiesen sind. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Acetyltransferaseaktivität von p300 eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung in Mäusen supprimiert und dabei vermutlich die B-Zellen kritisch für die Ausprägung der Erkrankung sind. Andere Effekte und Auswirkungen scheinen sekundärer Natur zu sein.

### 5.3 *Ausblick*

Es ist derzeit unklar, welcher der zahlreichen Kontrollpunkte in den B-Zellen durch das Acetyltransferase-defiziente p300 beeinträchtigt wird. Des Weiteren ist unbekannt, wie die reduzierte Acetyltransferaseaktivität von p300 zu solch drastischen und umfangreichen Veränderungen des B-Zell-Kompartiments mit einer daraus folgenden Autoimmunerkrankung führt. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse könnten eine vergleichende Analyse der Proteine der B-Zellen von SLE-Patienten, die mutiert sind oder dereguliert, mit *in vivo* Mausmodellen, wie dem vorliegenden Mausmodell, oder direkte Expressionsanalysen hilfreich sein. Dies würde ebenso Aufschlüsse über Gene liefern, die sowohl primär aber auch sekundär beeinflusst werden. Daraufhin könnten Inhibitoren oder Aktivatoren der entsprechenden Gene bzw. Proteine eingesetzt werden, wie zum Beispiel HDAC-Inhibitoren, die die Autoimmunerkrankung heilen. Zusätzlich hebt die Arbeit hervor, dass gezielt B-Zellen bei der Behandlung mit zum Beispiel HDAC-Inhibitoren betrachtet werden sollten. Das Mausmodell in der vorliegenden Arbeit zeigt ebenfalls, dass eine Hemmung des BCR-Signalweges Ursache der Autoimmunerkrankung sein könnte und daher die Aktivierung von Proteinen, die den BCR-Signalweg induzieren, eine weitere Therapiemöglichkeit wäre.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus könnte die hergestellte, reife B-Zelllinie CH12.LX mit reduzierter p300-Acetyltransferaseaktivität hilfreich sein. Neben zahlreichen biochemischen Analysen könnten ebenso cDNA-Microarray-Analysen und ChIP-*on-chip*-Versuche (NimbleGen Systems GmbH, Waldkraiburg, Deutschland) zur Identifikation von spezifischen Zielproteinen und Änderungen in dem Acetylierungsstatus bestimmter Proteine beitragen.

Darüber hinaus bleibt die Hypothese, dass p300 als Tumorsuppressor fungiert und dafür die Acetyltransferaseaktivität notwendig ist, weiterhin offen. Die Tumor-suppressive Funktion von p300 kann unter anderem in der Myc-induzierten Lymphomagenese gezeigt werden (Harris *et al.*, 1988). Diesbezüglich würde eine B-Zell-spezifische Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* mit Hilfe einer anderen, früher aktiven Cre-Rekombinase in Mäusen zur Klärung beitragen. Gleichzeitig müsste das zweite Allel zu einem *Knock-Out*-Allel rekombiniert werden und auf einem E $\mu$ -*Myc* Stammhintergrund untersucht werden. Dadurch könnte die Relevanz der p300-Acetyltransferaseaktivität in der Myc-induzierten Lymphomagenese als ein Tumormodell untersucht werden.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### 6.1 Deutsche Zusammenfassung

p300, als eine von 15 beschriebenen Acetyltransferasen der Mammalia, besitzt eine Vielzahl von Interaktionspartnern, die gleichzeitig als Substrate der Acetylierung fungieren. Unter diesen sind zahlreiche Proteine, die in der Hämatopoese eine essentielle Rolle spielen. Eine konditionelle *Knock-In*-Maus mit heterozygoter Expression eines Acetyltransferase-defizienten *p300* (*p300AS*) in der Keimbahn ist embryonal letal, wohingegen heterozygote *Knock-Out*-Mäuse für *p300* und embryonale Stammzellen, die homozygot für die Mutation waren, lebensfähig sind. Des Weiteren sind bereits mehrere Mutationen der p300-Acetyltransferaseaktivität in Leukämien bekannt. Zusammenfassend lassen diese Daten eine mögliche Rolle der p300-Acetyltransferaseaktivität in der Hämatopoese der Mäuse vermuten. Daher wurde mit dieser Arbeit die Funktion der p300-Acetyltransferaseaktivität während der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass Mäuse mit Expression eines Acetyltransferase-defizienten *p300* ausschließlich in B-Zellen aufgrund der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung frühzeitig sterben. Diese Erkrankung ist in ihrer Pathologie ähnlich dem humanen Systemischen Lupus Erythematosus (SLE), auch Wolfsröte genannt. Die pathologischen Erscheinungen der Mäuse umfassen eine Splenomegalie, Glomerulonephritis, Vaskulitis, Einlagerungen von Immunglobulinkomplexen in verschiedenen Organen und die Produktion von Autoantikörpern gegen dsDNA und andere nukleäre Antigene. Das frühere Sterben der Weibchen gegenüber den Männchen in diesem Mausmodell ist ein weiteres Merkmal des humanen SLE, bei dem zu über 90% der Patienten Frauen sind. Die fehlende p300-Acetyltransferaseaktivität in den B-Zellen führt zusätzlich neben einer reduzierten Anzahl an transitionellen und Marginalzonen-B-Zellen in der Milz zu einem partiellen Verlust der B-Zell-Differenzierung in den Mäusen. Mäuse mit einer induzierten ubiquitären Expression des mutierten *p300* entwickeln ebenfalls eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung, wie bei einer B-Zell-spezifischen Expression. Daraus lässt sich schließen, dass die p300-Acetyltransferaseaktivität notwendig für die Regulation und Kontrolle der Selbsttoleranz der B-Zellen sowie deren Differenzierung ist. Ebenso zeigt dies, dass die Acetyltransferaseaktivität von p300 die Ausbildung einer SLE-ähnlichen Autoimmunerkrankung supprimiert.

Neben diesem Phänotyp der B-Zellen konnte ich zeigen, dass die B-Zellen mit Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* dennoch in der Lage sind, *in vivo* Immunglobuline

zu bilden, welche insbesondere für die Isotypen IgG2b und IgM erhöht sind. FACS-Analysen zeigen, dass die erhöhten Mengen an Immunglobulinen mit einer höheren Anzahl an aktivierten B-Zellen in der Milz dieser Mäuse korrelieren. Eine Analyse der humoralen Immunantwort gegenüber einem T-Zell-abhängigen Antigen, in diesem Fall Ovalbumin, verdeutlicht die bereits erhöhte Anzahl an Ovalbumin-spezifischen Antikörpern bereits vor der Immunisierung. Wohingegen 14 Tage nach der Immunisierung die Primärantwort der Mäuse mit Acetyltransferase-defizientem p300 ähnlich der von den Kontrollmäusen ist. Im Gegensatz dazu wird bei der Erinnerungsantwort eine schwächere Bildung von Ovalbumin-spezifischen Antikörpern detektiert. Zusätzlich zu einem Anstieg der aktivierten B-Zellen zeigen die Mäuse mit Expression des Acetyltransferase-defizienten *p300* eine erhöhte Menge an aktivierten T-Zellen unabhängig von Ovalbumin. Da die Mäuse mit B-Zell-spezifischer Expression von Acetyltransferase-defizientem p300 nach Gabe des Antigens Ovalbumin eine B-Zell-Aktivierung zeigen, wird zusätzlich die Proliferation der B-Zellen *ex vivo* nach Aktivierung verschiedener Signalwege untersucht. Alleinig nach Induktion des BCR-Signalweges durch Zugabe von  $\alpha$ -IgM zur Quervernetzung des BCR proliferieren die B-Zellen schwächer. Die reduzierte Anzahl proliferativer Zellen wird dabei nicht durch eine erhöhte Apoptose verursacht. Daher deutet dies auf eine Hemmung der Proliferation durch die fehlende Acetyltransferaseaktivität von p300 hin, welches unter anderem durch eine im cDNA-Microarray detektierte Deregulation des BCR-Signalweges verdeutlicht wird. Biochemische Analysen des Effektes von Acetyltransferase-defizientem p300 auf den Acetylierungsstatus der Proteine zeigen keine globalen oder promotorspezifischen Veränderungen der Histon H3K18-Acetylierung in B-Zellen mit reduzierter p300-Acetyltransferaseaktivität auf. Allerdings ist eine reduzierte Acetylierung bei größeren Proteinen als Histonen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass vermutlich andere Proteine als Histone die kritischen Substrate der p300-Acetyltransferaseaktivität *in vivo* sind. Für weitere Analysen stellte ich eine B-Zelllinie her, in die durch homologe Rekombination das mutierte *p300AS* eingeführt wird. Diese B-Zelllinie synthetisiert nachweislich das mutierte p300AS, welches *in vitro* eine reduzierte Acetyltransferaseaktivität aufweist. Mit Hilfe der Zelllinie sind nun weitere Versuche, wie Proteomanalysen, zur Identifikation der Substrate, die auf die p300-Acetyltransferaseaktivität angewiesen sind, möglich.

## 6.2 English Summary

p300, one of 15 mammalian acetyltransferases known, interacts with a huge number of proteins which directly function as substrates for its acetyltransferase activity. Among them are several proteins involved in hematopoiesis. A conditional knock-in mouse with heterozygous expression of an acetyltransferase-deficient *p300* (*p300AS*) in the germline is embryonic lethal, whereas heterozygous *p300* knock-out mice and embryonic stem cells homozygous for the *p300* mutation are viable. Moreover, several mutations of p300 acetyltransferase activity were found in different leukemia patients. All together, these data suggest a function of p300 acetyltransferase activity in hematopoiesis. Therefore, the task of my thesis work was to define the role of p300 acetyltransferase activity during B cell development and differentiation.

During my studies, I showed that mice expressing an acetyltransferase-deficient p300 only in B cells develop an autoimmune disease similar to the Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in human and undergo premature death. The pathological manifestations of these mice include splenomegaly, glomerulonephritis, vasculitis, immune complex depositions in different organs, and production of autoantibodies against dsDNA and other nuclear antigens. A premature death of females in comparison to males was observed, reminiscent to another hallmark of human SLE which affects over 90% of women. In addition, the deficient acetyltransferase activity of p300 in B cells leads to a reduced number of transitional and marginal zone B cells in the spleen besides a partial loss of B cell maturation in these mice. Similar results are obtained by using mice having an inducible and ubiquitously expressed form of mutant p300. These results suggest that the p300 acetyltransferase activity is necessary for the regulation of self tolerance in B cells as well as for their differentiation. Moreover, the acetyltransferase activity of p300 suppresses the development of an SLE-like autoimmune disease.

In addition to the observed B cell phenotype, I prove that B cells expressing acetyltransferase-deficient p300 are still able to produce *in vivo* immunoglobulins with a specific increase for the isotypes IgG2b and IgM. FACS analysis show that the increased levels of total immunoglobulins are correlating with higher amounts of activated B cells in the spleen of those mice. An analysis of the humoral immune response against a T-cell-dependent antigen, in that case ovalbumin, reveals increased Ovalbumin-specific antibodies before the immunization. Whereas, after 14 days of immunization the primary immune response against ovalbumin of mice deficient for the p300 acetyltransferase activity in B cells is similar to control mice. In contrast, mice show an impaired memory

response. Notably, in addition to an increased amount of activated B cells, p300 acetyltransferase-deficient mice show a significant augmented number of activated T cells independently of ovalbumin.

Since the mice expressing the B-cell-specific acetyltransferase-deficient p300 are displaying B cell activation after administration of the antigen, the proliferation of the B cells is analyzed after activation of different signaling pathways *ex vivo*. Only the activation of the BCR signaling pathway *via* addition of  $\alpha$ -IgM antibodies leads to a reduced proliferation of the B cells. Notably, the reduced amount of proliferating cells is not due to an increased apoptosis rate suggesting a blockage of the proliferation by the acetyltransferase activity of p300. In addition, an observed deregulation of the BCR signaling pathway in microarray analysis in those B cells is consistent with that suggestion. In order to check whether the presence of an acetyltransferase activity deficient form of p300 had an incidence on the overall acetylation status, biochemical analyses of the histone acetylation levels didn't show any difference in the global or promoter-specific histone H3K18 acetylation in B cells with reduced p300 acetyltransferase activity. Rather, a reduced acetylation of proteins larger than histones is detectable suggesting that other proteins might be the critical substrates of the p300 acetyltransferase activity *in vivo*. For further analyses, I established a B cell line *via* homologous recombination expressing the mutant *p300AS*. This cell line which shows a reduced acetyltransferase activity *in vitro* will provide a helpful tool for the identification of the substrates which are dependent on the p300 acetyltransferase activity through proteomics or other analyses.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Alberts B, Bray D, Lewis J: (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Taylor & Francis

Allis CD, Chicoine LG, Richman R, Schulman IG: (1985) Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82:8048-52.

Allman DM, Ferguson SE, Cancro MP: (1992) Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *J Immunol*, 149:2533-40.

Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP: (1993) Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 151:4431-44.

Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR: (2001) Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol*, 167:6834-40.

An W, Roeder RG: (2003) Direct association of p300 with unmodified H3 and H4 N termini modulates p300-dependent acetylation and transcription of nucleosomal templates. *J Biol Chem*, 278:1504-10.

Anekonda TS, Reddy PH: (2006) Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 96:305-13.

Anolik JH, Aringer M: (2005) New treatments for SLE: cell-depleting and anti-cytokine therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 19:859-78.

Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG: (2002) Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol*, 14:1065-74.

Arany Z, Sellers WR, Livingston DM, Eckner R: (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell*, 77:799-800.

Arany Z, Newsome D, Oldread E, Livingston DM, Eckner R: (1995) A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature*, 374:81-4.

Arnold LW, LoCascio NJ, Lutz PM, Pennell CA, Klapper DG, Haughton G: (1983) Antigen-induced lymphomagenesis identification of a murine B cell lymphoma with known antigen specificity. *J. Immunol*, 131, 2064-8.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smitj J.A., Struhl K. (Hrsg.) (1994). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York

Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K: (1997) Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*, 89:1175-84.

Baeuerle PA, Henkel T: (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12:141-79.

- Baluchamy S, Rajabi HN, Thimmapaya R, Navaraj A, Thimmapaya B: (2003) Repression of c-Myc and inhibition of G1 exit in cells conditionally overexpressing p300 that is not dependent on its histone acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:9524-9.
- Banerjee AC, Recupero AJ, Mal A, Piotrkowski AM, Wang DM, Harter ML: (1994) The adenovirus E1A 289R and 243R proteins inhibit the phosphorylation of p300. *Oncogene*, 9:1733-7.
- Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T: (1995) Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene*, 11:2509-14.
- Bannister AJ, Kouzarides T: (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384:641-3.
- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL: (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell*, 8:1243-54.
- Bartholdi D, Roelfsema JH, Papadia F, Breuning MH, Niedrist D, Hennekam RC, Schinzel A, Peters DJ: (2007) Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: delineation of the phenotype of the first patients carrying mutations in EP300. *J Med Genet*, 44:327-33.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA: (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444:337-42.
- Benschop RJ, Cambier JC: (1999) B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol*, 11:143-51.
- Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R: (2002) Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet*, 32:606-13.
- Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schäfer H, Christiansen H, Eilers M: (2002) Loss of FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell*, 2:377-86.
- Bhalla KN: (2005) Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol*, 23:3971-93.
- Bishop GA, Haughton G: (1986) Induced differentiation of a transformed clone of Ly-1+ B cells by clonal T cells and antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:7410-4.
- Bisotto S, Minorgan S, Rehfuss RP: (1996) Identification and characterization of a novel transcriptional activation domain in the CREB-binding protein. *J Biol Chem*, 271:17746-50.

- Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA: (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*, 277:45099-107.
- Black JC, Choi JE, Lombardo SR, Carey M: (2006) A mechanism for coordinating chromatin modification and preinitiation complex assembly. *Mol Cell*, 23:809-18.
- Blobel GA: (2000) CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood*, 95:745-55.
- Blobel GA: (2002) CBP and p300: versatile coregulators with important roles in hematopoietic gene expression. *J Leukoc Biol*, 71:545-56.
- Blough RI, Petrij F, Dauwerse JG, Milatovich-Cherry A, Weiss L, Saal HM, Rubinstein JH: (2000) Variation in microdeletions of the cyclic AMP-responsive element-binding protein gene at chromosome band 16p13.3 in the Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*, 90:29-34.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW: (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 5:769-84.
- Bolland S, Ravetch JV: (2000) Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*, 13:277-85.
- Bordoli L, Netsch M, Lüthi U, Lutz W, Eckner R: (2001) Plant orthologs of p300/CBP: conservation of a core domain in metazoan p300/CBP acetyltransferase-related proteins. *Nucleic Acids Res*, 29:589-97.
- Bossy D, Milili M, Zucman J, Thomas G, Fougereau M, Schiff C: (1991) Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol*, 3:1081-90.
- Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A: (2003) The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*, 102:956-63.
- Braunstein M, Sobel RE, Allis CD, Turner BM, Broach JR: (1996) Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol*, 16:4349-56.
- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D: (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:14559-63.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME: (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303:2011-5.

- Burastero SE, Casali P, Wilder RL, Notkins AL: (1988) Monoreactive high affinity and polyreactive low affinity rheumatoid factors are produced by CD5+ B cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 168:1979-92.
- Cariappa A, Tang M, Parng C, Nebelitskiy E, Carroll M, Georgopoulos K, Pillai S: (2001) The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity*, 14:603-15.
- Carsetti R, Köhler G, Lamers MC: (1995) Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med*, 181:2129-40.
- Chaffanet M, Gressin L, Preudhomme C, Soenen-Cornu V, Birnbaum D, Pébusque MJ: (2000) MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes Chromosomes Cancer*, 28:138-44.
- Chan O, Shlomchik MJ: (1998) A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol*, 160:51-9.
- Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ: (1999a) B cells are required for lupus nephritis in the polygenic, Fas-intact MRL model of systemic autoimmunity. *J Immunol*, 163:3592-6.
- Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ: (1999b) A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med*, 189:1639-48.
- Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L, Demonacos C, La Thangue NB: (2001) Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol*, 3:667-74.
- Chan HM, La Thangue NB: (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*, 114:2363-73.
- Chao C, Wu Z, Mazur SJ, Borges H, Rossi M, Lin T, Wang JY, Anderson CW, Appella E, Xu Y: (2006) Acetylation of mouse p53 at lysine 317 negatively regulates p53 apoptotic activities after DNA damage. *Mol Cell Biol*, 26:6859-69.
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM: (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, 98:675-86.
- Chen H, Tini M, Evans RM: (2001) HATs on and beyond chromatin. *Curr Opin Cell Biol*, 13:218-24.
- Chen LF, Mu Y, Greene WC: (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J*, 21:6539-48.
- Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF: (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:10794-9.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P: (2000a) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103:263-71.



- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD: (2000b) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, 5:905-15.
- Chevillard-Briet M, Trouche D, Vandel L: (2002) Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J*, 21:5457-66.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH: (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, 365:855-9.
- Clayton AL, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC: (2000) Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J*, 19:3714-26.
- Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Chervinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW: (1988) The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev*, 102:5-28.
- Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ: (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*, 8:140-74.
- Crick F: (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227:561-3.
- Croker BA, Tarlinton DM, Cluse LA, Tuxen AJ, Light A, Yang FC, Williams DA, Roberts AW: (2002) The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes. *J Immunol*, 168:3376-86.
- Cyster JG, Healy JI, Kishihara K, Mak TW, Thomas ML, Goodnow CC: (1996) Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature*, 381:325-8.
- Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Hou DX, Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Takahashi T, Ishii S: (1996) CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb. *Genes Dev*, 10:528-40.
- Dauphinée M, Tovar Z, Talal N: (1988) B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 31:642-7.
- Davis RJ: (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci*, 19:470-3.
- Davis ID, Skak K, Smyth MJ, Kristjansen PE, Miller DM, Sivakumar PV: (2007) Interleukin-21 signaling: functions in cancer and autoimmunity. *Clin Cancer Res*, 13:6926-32.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB: (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370:737-49.
- Demaison C, Chastagner P, Thèze J, Zouali M: (1994) Somatic diversification in the heavy chain variable region genes expressed by human autoantibodies bearing a lupus-associated nephritogenic anti-DNA idiotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:514-8.

- Denslow SA, Wade PA: (2007) The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene*, 26:5433-8.
- Di Padova M, Caretti G, Zhao P, Hoffman EP, Sartorelli V: (2007) MyoD Acetylation Influences Temporal Patterns of Skeletal Muscle Gene Expression. *J Biol Chem*, 282: 37650-9.
- Dokmanovic M, Marks PA: (2005) Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem*, 96:293-304.
- Dornan D, Shimizu H, Perkins ND, Hupp TR: (2003) DNA-dependent acetylation of p53 by the transcription coactivator p300. *J Biol Chem*, 278:13431-41.
- Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingston DM: (1994) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*, 8:869-84.
- Eckner R, Ludlow JW, Lill NL, Oldread E, Arany Z, Modjtahedi N, DeCaprio JA, Livingston DM, Morgan JA: (1996) Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol*, 16:3454-64.
- Edry E, Melamed D: (2004) Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol*, 173:4265-71.
- Edwards JC, Cambridge G: (2006) B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*, 6:394-403.
- Espino PS, Drobic B, Dunn KL, Davie JR: (2005) Histone modifications as a platform for cancer therapy. *J Cell Biochem*, 94:1088-102.
- Espinosa JM, Emerson BM: (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell*, 8:57-69.
- Fanning LJ, Connor AM, Wu GE: (1996) Development of the immunoglobulin repertoire. *Clin Immunol Immunopathol*, 79:1-14.
- Felzien LK, Farrell S, Betts JC, Mosavin R, Nabel GJ: (1999) Specificity of cyclin E-Cdk2, TFIIB, and E1A interactions with a common domain of the p300 coactivator. *Mol Cell Biol*, 19:4241-6.
- Ferreri K, Gill G, Montminy M: (1994) The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:1210-3.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD: (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*, 15:172-83.
- Flanagan PM, Kelleher RJ, Sayre MH, Tschochner H, Kornberg RD: (1991) A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature*, 350: 436-8.

- Forster N, Gallinat S, Jablonska J, Weiss S, Elsässer HP, Lutz W: (2007) p300 protein acetyltransferase activity suppresses systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in mice. *J Immunol*, 178:6941-8.
- Fukuda H, Sano N, Muto S, Horikoshi M: (2006) Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5: 190-208.
- Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C: (2007) HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res*, 17:195-211.
- Garcia BA, Busby SA, Shabanowitz J, Hunt DF, Mishra N: (2005) Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition. *J Proteome Res*, 4:2032-42.
- Garzía-Rodríguez C, Rao A: (1998) Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J Exp Med*, 187:2031-6.
- Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JD, Ponder BA, Kouzarides T, Caldas C: (2000) Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet*, 24:300-3.
- Georgel PT: (2002) Chromatin structure of eukaryotic promoters: a changing perspective. *Biochem Cell Biol*, 80:295-300.
- Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Varga J: (2000) Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene*, 19:3546-55.
- Giles RH, Peters DJ, Breuning MH: (1998) Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet*, 14:178-83.
- Giordano A, Avantaggiati ML: (1999) p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol*, 181:218-30.
- Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, Garcia-Wilson E, Perkins ND, Hay RT: (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*, 11:1043-54.
- Goodman RH, Smolik S: (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, 14:1553-77.
- Goodnow CC: (1996) Balancing immunity and tolerance: deletion and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:2264-71.
- Grawunder U, West RB, Lieber MR: (1998) Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol*, 10:172-80.

- Gray D, Siepmann K, van Essen D, Poudrier J, Wykes M, Jainandunsing S, Bergthorsdottir S, Dullforce P: (1996) B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *Immunol Rev*, 150:45-61.
- Gregoretto IV, Lee YM, Goodson HV: (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, 338:17-31.
- Gregory DJ, Garcia-Wilson E, Poole JC, Snowden AW, Roninson IB, Perkins ND: (2002) Induction of transcription through the p300 CRD1 motif by p21WAF1/CIP1 is core promoter specific and cyclin dependent kinase independent. *Cell Cycle*, 1:343-50.
- Grilli M, Chen-Tran A, Lenardo MJ: (1993) Tumor necrosis factor alpha mediates a T cell receptor-independent induction of the gene regulatory factor NF-kappa B in T lymphocytes. *Mol Immunol*, 30:1287-94.
- Grillo-López AJ, Hedrick E, Rashford M, Benyunes M: (2002) Rituximab: ongoing and future clinical development. *Semin Oncol*, 29:105-12.
- Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B.: (2002) Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest*, 109:1625-33.
- Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B: (2005) B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol*, 174:1775-81.
- Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, Kumar S, Howley PM, Livingston DM: (1998) p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell*, 2:405-15.
- Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, Livingston DM: (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, 300:342-4.
- Gu W, Roeder RG: (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90:595-606.
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V, Barbacid M: (2003) Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*, 4:111-20.
- Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV: (2000) Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol*, 1:31-6.
- Haigis MC, Guarente LP: (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*, 20:2913-21.
- Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY, Nakatani Y, Kedes L: (1999) Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell*, 96:405-13.

- Hansen JC: (2002) Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31:361-92.
- Hardy RR, Hayakawa K: (1994) CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol*, 55:297-339.
- Harris AW, Pinkert CA, Crawford M, Langdon WY, Brinster RL, Adams JM: (1988) The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med*, 167:353-71.
- Hasbold J, Lyons AB, Kehry MR, Hodgkin PD: (1998) Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol*, 28:1040-51.
- Hasler P, Zouali M: (2001) B cell receptor signaling and autoimmunity. *FASEB J*, 15:2085-98.
- Haxhinasto SA, Bishop GA: (2004) Synergistic B cell activation by CD40 and the B cell antigen receptor: role of B lymphocyte antigen receptor-mediated kinase activation and tumor necrosis factor receptor-associated factor regulation. *J Biol Chem*, 279:2575-82.
- Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA: (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med*, 157:202-18.
- Hayakawa K, Hardy RR: (1988) Normal, autoimmune, and malignant CD5+ B cells: the Ly-1 B lineage? *Annu Rev Immunol*, 6:197-218.
- Hayakawa K, Asano M, Shinton SA, Gui M, Allman D, Stewart CL, Silver J, Hardy RR: (1999) Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science*, 285:113-6.
- Hayes JJ, Hansen JC: (2001) Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr Opin Genet Dev*, 11:124-9.
- Healy JI, Goodnow CC: (1998) Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol*, 16:645-70.
- Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, Sidman C, Moore WA, Parks DR, Herzenberg LA: (1986) The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev*, 93:81-102.
- Hesslein DG, Schatz DG: (2001) Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol*, 78:169-232.
- Hibbs ML, Harder KW, Armes J, Kountouri N, Quilici C, Casagrande F, Dunn AR, Tarlinton DM: (2002) Sustained activation of Lyn tyrosine kinase in vivo leads to autoimmunity. *J Exp Med*, 196:1593-604.
- Hodawadekar SC, Marmorstein R: (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene*, 26:5528-40.

- Hostager BS, Haxhinasto SA, Rowland SL, Bishop GA: (2003) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling. *J Biol Chem*, 278:45382-90.
- Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, Mailhos C, Ish-Horowicz D, Habu S, Owen MJ: (2004) Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol*, 5:638-44.
- Huang ZQ, Li J, Sachs LM, Cole PA, Wong J: (2003) A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *EMBO J*, 22:2146-55.
- Ida K, Kitabayashi I, Taki T, Taniwaki M, Noro K, Yamamoto M, Ohki M, Hayashi Y: (1997) Adenoviral E1A-associated protein p300 is involved in acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q13). *Blood*, 90:4699-704.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L: (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403:795-800.
- Ito Y, Miyazono K: (2003) RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 13:43-7.
- Iyer NG, Ozdag H, Caldas C: (2004) p300/CBP and cancer. *Oncogene*, 23:4225-31.
- Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D: (1990) CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J Exp Med*, 172:1861-4.
- Jacob J, Kelsoe G: (1992) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med*, 176:679-87.
- Jacobi AM, Diamond B: (2005) Balancing diversity and tolerance: lessons from patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, 202:341-4.
- Jacquot S: (2000) CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation. *Immunol Res*, 21:23-30.
- Janeway CA, Travers P, Walport M: (2005) *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*.
- Janknecht R, Cahill MA, Nordheim A: (1995) Signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis*, 16:443-50.
- Janknecht R, Hunter T: (1996) Transcription. A growing coactivator network. *Nature*, 383:22-3.
- Jelinek DF: (2000) Regulation of B lymphocyte differentiation. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 84:375-85.
- Jenuwein T, Allis CD: (2001) Translating the histone code. *Science*, 293:1074-80.

Johnstone RW, Licht JD: (2003) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*, 4:13-8.

Jun JE, Goodnow CC: (2003) Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat Immunol*, 4:1057-64.

Kalkhoven E, Roelfsema JH, Teunissen H, den Boer A, Ariyurek Y, Zantema A, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJ: (2003) Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet*, 12:441-50.

Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG: (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85:403-14.

Kantor AB, Herzenberg LA: (1993) Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 11:501-38.

Kargul GJ, Dudekula DB, Qian Y, Lim MK, Jaradat SA, Tanaka TS, Carter MG, Ko MS: (2001) Verification and initial annotation of the NIA mouse 15K cDNA clone set. *Nat Genet*, 28:17-8.

Karin M, Hunter T: (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*, 5:747-57.

Kasper LH, Boussouar F, Ney PA, Jackson CW, Rehg J, van Deursen JM, Brindle PK: (2002) A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature*, 419:738-43.

Kasper LH, Fukuyama T, Biesen MA, Boussouar F, Tong C, de Pauw A, Murray PJ, van Deursen JM, Brindle PK: (2006) Conditional knockout mice reveal distinct functions for the global transcriptional coactivators CBP and p300 in T-cell development. *Mol Cell Biol*, 26:789-809.

Katan-Khaykovich Y, Struhl K: (2002) Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev*, 16:743-52.

Kawai H, Nie L, Wiederschain D, Yuan ZM: (2001) Dual role of p300 in the regulation of p53 stability. *J Biol Chem*, 276:45928-32.

Kee BL, Arias J, Montminy MR: (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem*, 271:2373-5.

Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA: (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*, 11:1695-713.

Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, Curley T, MacGregor-Curtelli B, Tong W, Klang M, Schwartz L, Richardson S, Rosa E, Drobnjak M, Cordon-Cordo C, Chiao JH, Rifkind R, Marks PA, Scher H: (2003) Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res*, 9:3578-88.

- Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, Seigneurin-Berny D: (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*, 11:162-6.
- Kikuchi T, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Yamamoto H, Fujita M, Hosokawa M, Imai K: (2002) Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. *Int J Cancer*, 97:272-7.
- Kim JL, Nikolov D, Burley SK: (1993) Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature*, 365:520-7.
- Kim YJ, Bjorklund S, Li Y, Sayre MH, Kornberg RD: (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, 77:599-608.
- Kingston RE, Narlikar GJ: (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev*, 13:2339-52.
- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M: (1998) Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J*, 17:2994-3004.
- Kitabayashi I, Aikawa Y, Yokoyama A, Hosoda F, Nagai M, Kakazu N, Abe T, Ohki M: (2001) Fusion of MOZ and p300 histone acetyltransferases in acute monocytic leukemia with a t(8;22)(p11;q13) chromosome translocation. *Leukemia*, 15:89-94.
- Kitamura D, Kudo A, Schaal S, Muller W, Melchers F, Rajewsky K: (1992) A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell*, 69:823-31.
- Kitamura D, Rajewsky K: (1992) Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature*, 356:154-6.
- Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N: (2005) SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med*, 16:237-43.
- Kolli S, Buchmann AM, Williams J, Weitzman S, Thimmapaya B: (2001) Antisense-mediated depletion of p300 in human cells leads to premature G1 exit and up-regulation of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:4646-51.
- Kornberg RD: (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184:868-71.
- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG: (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*, 279:703-7.
- Kosco MH, Gray D: (1992) Signals involved in germinal center reactions. *Immunol Rev*, 126:63-76.
- Kouzarides T: (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J*, 19:1176-9.



- Kraus W, Kadonaga J: (1998) p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev*, 12:331-42.
- Kraus WL, Manning ET, Kadonaga JT: (1999) Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates. *Mol Cell Biol*, 19:8123-35.
- Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K: (2004) Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell*, 117:787-800.
- Krieg AM: (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 20:709-60.
- Kudo A, Melchers F: (1987) A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J*, 6:2267-72.
- Kumagai T, Wakimoto N, Yin D, Gery S, Kawamata N, Takai N, Komatsu N, Chumakov A, Imai Y, Koeffler HP: (2007) Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer*, 121:656-65.
- Kumararatne DS, Bazin H, MacLennan IC: (1981) Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens. *Eur J Immunol*, 11:858-64.
- Kumararatne DS, MacLennan IC: (1982) The origin of marginal-zone cells. *Adv Exp Med Biol*, 149:83-90.
- Kung AL, Rebel VI, Bronson RT, Ch'ng LE, Sieff CA, Livingston DM, Yao TP: (2000) Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev*, 14:272-7.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH: (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, 370:223-6.
- Kwok RP, Liu XT, Smith GD: (2006) Distribution of co-activators CBP and p300 during mouse oocyte and embryo development. *Mol Reprod Dev*, 73:885-94.
- Laï JL, Jouet JP, Bauters F, Deminatti M: (1985) Chronic myelogenous leukemia with translocation (8;22): report of a new case. *Cancer Genet Cytogenet*, 17:365-6.
- Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R: (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:5807-11.
- Lavin MF, Gueven N: (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*, 13:941-50.

- Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA: (2002) An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 46:2673-7.
- Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC, Ehrenstein MR, Isenberg DA: (2005) B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)*, 44:1542-5.
- Li B, Carey M, Workman JL: (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128:707-19.
- Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM: (1997) Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature*, 387:823-7.
- Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS: (2006) Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev*, 26:397-413.
- Lipsky PE: (2001) Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol*, 2:764-6.
- Litt MD, Simpson M, Recillas-Targa F, Prioleau MN, Felsenfeld G: (2001) Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J*, 20:2224-35.
- Littlefield O, Korkhin Y, Sigler, PB: (1999) The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:13668-73.
- Liu YJ, de Bouteiller O, Fugier-Vivier I: (1997) Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol*, 9:256-62.
- Liu YJ, Oldfield S, MacLennan IC: (1988) Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur J Immunol*, 18:355-62.
- Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhattar R, Berger SL: (2001) Snf1-a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, 293:1142-6.
- Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R: (1999) B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*, 190:75-89.
- Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Arend LJ, Sloand JA, Rosenblatt J, Sanz I: (2004) B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum*, 50:2580-9.
- Loyola A, Almouzni G: (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta*, 1677:3-11.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389:251-60.

- Lundblad JR, Kwok RP, Laurance ME, Harter ML, Goodman RH: (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, 374:85-8.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W: (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107:137-48.
- Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W: (2004) Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:2259-64.
- Mackay F, Browning JL: (2002) BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol*, 2:465-75.
- MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG: (2003) Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev*, 194:8-18.
- Maillard I, Weng AP, Carpenter AC, Rodriguez CG, Sai H, Xu L, Allman D, Aster JC, Pear WS: (2004) Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. *Blood*, 104:1696-702.
- Maizels N: (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet*, 39:23-46.
- Manning ET, Ikehara T, Ito T, Kadonaga JT, Kraus WL: (2001) p300 forms a stable, template-committed complex with chromatin: role for the bromodomain. *Mol Cell Biol*, 21:3876-87.
- Markham D, Munro S, Soloway J, O'Connor DP, La Thangue NB: (2006) DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1. *EMBO Rep*, 7:192-8.
- Marks PA, Jiang X: (2005) Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle*, 4:549-51.
- Marks PA: (2007) Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene*, 26:1351-6.
- Marmorstein R: (2001) Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure*, 9:1127-33.
- Marmorstein R, Roth SY: (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*, 11:155-61.
- Martin F, Kearney JF: (2002) Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*, 2:323-35.
- Martínez-Balbás MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T: (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J*, 19:662-71.
- Massague J, Blain SW, Lo RS: (2000) TGF $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 103:295-309.

- McHeyzer-Williams MG, Ahmed R: (1999) B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol*, 11:172-9.
- Melchers F, Karasuyama H, Haasner D, Bauer S, Kudo A, Sakaguchi N, Jameson B, Rolink A: (1993) The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today*, 14:60-8.
- Miller RW, Rubinstein JH: (1995) Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*, 56:112-5.
- Minucci S, Pelicci PG: (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 6:38-51.
- Morales V, Straub T, Neumann MF, Mengus G, Akhtar A, Becker PB: (2004) Functional integration of the histone acetyltransferase MOF into the dosage compensation complex. *EMBO J*, 23:2258-68.
- Morel L, Tian XH, Croker BP, Wakeland EK: (1999) Epistatic modifiers of autoimmunity in a murine model of lupus nephritis. *Immunity*, 11:131-9.
- Morgan DO: (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:261-91.
- Munshi N, Merika M, Yie J, Senger K, Chen G, Thanos D: (1998) Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell*, 2:457-67.
- Munshi N, Agalioti T, Lomvardas S, Merika M, Chen G, Thanos D: (2001) Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation. *Science*, 293:1133-6.
- Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM, Iwama T, Miyaki M: (1996) p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene*, 12:1565-9.
- Murata T, Kurokawa R, Krones A, Tatsumi K, Ishii M, Taki T, Masuno M, Ohashi H, Yanagisawa M, Rosenfeld MG, Glass CK, Hayashi Y: (2001) Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet*, 10:1071-6.
- Murray AW: (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 359:599-604.
- Murray AW, Hunt T. *The cell cycle: an introduction*. New York: WH Freeman
- Nakatani Y: (2001) Histone acetylases-versatile players. *Genes Cells*, 6:79-86.
- Nemazee D, Burki K: (1989) Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*, 337: 562-6.
- Nemethova M, Smutny M, Wintersberger E: (2004) Transactivation of E2F-regulated genes by polyomavirus large T antigen: evidence for a two-step mechanism. *Mol Cell Biol*, 24:10986-94.

- Neuberger MS, Milstein C: (1995) Somatic hypermutation. *Curr Op Immunol*, 7:248-54.
- Nguyen C, Limaye N, Wakeland EK: (2002) Susceptibility genes in the pathogenesis of murine lupus. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S255-63.
- Nguyen DX, Baglia LA, Huang SM, Baker CM, McCance DJ: (2004) Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *EMBO J*, 23:1609-18.
- Nightingale KP, O'Neill LP, Turner BM: (2006) Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev*, 16:125-36.
- Niiri H, Clark EA: (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*, 2:945-56.
- Nishizumi H, Taniuchi I, Yamanashi Y, Kitamura D, Ilic D, Mori S, Watanabe T, Yamamoto T: (1995) Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lym-deficient mice. *Immunity*, 3:549-60.
- Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Köhler G, Lamers MC: (1997) CD22 is a negative regulator of B cell receptor signaling. *Curr Biol*, 7: 133-43.
- Noll M, Kornberg RD: (1977) Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J Mol Biol*, 109:393-404.
- Nussenzweig MC, Shaw AC, Sinn E, Danner DB, Holmes KI, Morse HC, Leder P: (1987) Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin. *Science*, 236: 816-9.
- Oelgeschläger M, Janknecht R, Krieg J, Schreek S, Lüscher B: (1996) Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb-specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *EMBO J*, 15:2771-80.
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y: (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87:953-9.
- Ogryzko VV: (2001) Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. *Cell Mol Life Sci*, 58:683-92.
- Ohshima T, Suganuma T, Ikeda M: (2001) A novel mutation lacking the bromodomain of the transcriptional coactivator p300 in the SiHa cervical carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 281:569-75.
- Osmond DG: (1993) The turnover of B-cell populations. *Immunol Today*, 14: 34-7.
- Papavasiliou FN, Schatz DG: (2002) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*, 109 Suppl:S35-44.
- Parker DC: (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*, 11:331-60.

- Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, Lambert E, Tourette C, Catoire H, Néri C: (2005) Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet*, 37:349-50.
- Partanen A, Motoyama J, Hui CC: (1999) Developmentally regulated expression of the transcriptional cofactors/histone acetyltransferases CBP and p300 during mouse embryogenesis. *Int J Dev Biol*, 43:487-94.
- Pasare C, Medzhitov R: (2005) Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, 438:364-8.
- Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ: (1999) The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*, 18:5061-72.
- Pavletich NP: (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 287:821-8.
- Peng SL, Madaio MP, Hughes DP, Crispe IN, Owen MJ, Wen L, Hayday AC, Craft J: (1996a) Murine lupus in the absence of alpha beta T cells. *J Immunol*, 156:4041-9.
- Peng SL, Madaio MP, Hayday AC, Craft J: (1996b) Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells. *J Immunol*, 157:5689-98.
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ: (1995) Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, 376:348-51.
- Petrij F, Dauwerse HG, Blough RI, Giles RH, van der Smagt JJ, Wallerstein R, Maaswinkel-Mooy PD, van Karnebeek CD, van Ommen GJ, van Haeringen A, Rubinstein JH, Saal HM, Hennekam RC, Peters DJ, Breuning MH: (2000) Diagnostic analysis of the Rubinstein-Taybi syndrome: five cosmids should be used for microdeletion detection and low number of protein truncating mutations. *J Med Genet*, 37:168-76.
- Phan HM, Xu AW, Coco C, Srajer G, Wyszomierski S, Evrard YA, Eckner R, Dent SY: (2005) GCN5 and p300 share essential functions during early embryogenesis. *Dev Dyn*, 233:1337-47.
- Polesskaya A, Harel-Bellan A: (2001) Acetylation of MyoD by p300 requires more than its histone acetyltransferase domain. *J Biol Chem*, 276:44502-3.
- Polesskaya A, Naguibneva I, Duquet A, Bengal E, Robin P, Harel-Bellan A: (2001) Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300. *Mol Cell Biol*, 21:5312-20.
- Pouponnot C, Jayaraman L, Massagué J: (1998) Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem*, 273:22865-8.
- Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, Sang N, Graessmann A, Giordano A, Levrero M: (1997a) p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J*, 16:369-83.

- Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, Kedes L, Wang JY, Graessmann A, Nakatani Y, Levrero M: (1997b) Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell*, 1:35-45.
- Qiu J: (2006) Epigenetics: unfinished symphony. *Nature*, 441:143-5.
- Radic MZ, Weigert M: (1994) Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu Rev Immunol*, 12:487-520.
- Rajewsky K: (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381:751-8.
- Rebel VI, Kung AL, Tanner EA, Yang H, Bronson RT, Livingston DM, (2002) Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:14789-94.
- Reid JL, Iyer VR, Brown PO, Struhl K: (2000) Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol Cell*, 6:1297-307.
- Reilly CM, Mishra N, Miller JM, Joshi D, Ruiz P, Richon VM, Marks PA, Gilkeson GS: (2004) Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by suberoylanilide hydroxamic acid. *J Immunol*, 173:4171-8.
- Reininger L, Radaszkiewicz T, Kosco M, Melchers F, Rolink AG: (1992) Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term "in vitro" proliferating (NZB x NZW)F1 pre-B cells. *J Exp Med*, 176:1343-53.
- Remboutsika E, Yamamoto K, Harbers M, Schmutz M: (2002) The Bromodomain Mediates Transcriptional Intermediary Factor 1alpha -Nucleosome Interactions. *J. Biol. Chem*, 277: 50318-25.
- Rickert RC, Roes J, Rajewsky K: (1997) B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 25:1317-8.
- Rieger A, Bar-Or A: (2008) B-cell-derived interleukin-10 in autoimmune disease: regulating the regulators. *Nat Rev Immunol*. 8:391-7.
- Roelfsema JH, White SJ, Ariyürek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, Bacino CA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJ: (2005) Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet*, 76:572-80.
- Rolink AG, Andersson J, Melchers F: (1998) Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur J Immunol*, 28:3738-48.
- Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S: (2003) Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther*, 2:1273-84.

- Roth SY, Denu JM, Allis CD: (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 70:81-120.
- Roth JF, Shikama N, Henzen C, Desbaillets I, Lutz W, Marino S, Wittwer J, Schorle H, Gassmann M, Eckner R: (2003) Differential role of p300 and CBP acetyltransferase during myogenesis: p300 acts upstream of MyoD and Myf5. *EMBO J*, 22:5186-96.
- Rubinstein JH: (1990) Broad thumb-hallux (Rubinstein-Taybi) syndrome 1957-1988. *Am J Med Genet, Suppl.*;6:3-16.
- Ruiz-Carrillo A, Wangh LJ, Allfrey VG: (1975) Processing of newly synthesized histone molecules. *Science*, 190:117-28.
- Sakaguchi N, Melchers F: (1986) Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature*, 324:579-82.
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E: (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, 12:2831-41.
- Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto G, Seo S, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Hamada Y, Aizawa S, Hirai H: (2003) Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, 18:675-85.
- Sandberg ML, Sutton SE, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Hogenesch JB, Cooke MP: (2005) c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Dev Cell*, 8:153-66.
- Santoso B, Kadonaga JT: (2006) Reconstitution of chromatin transcription with purified components reveals a chromatin-specific repressive activity of p300. *Nat Struct Mol Biol*, 13:131-9.
- Sartorelli V, Huang J, Hamamori Y, Kedes L: (1997) Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol Cell Biol*, 17:1010-26.
- Sauve AA, Schramm VL: (2004) SIR2: the biochemical mechanism of NAD(+)-dependent protein deacetylation and ADP-ribosyl enzyme intermediates. *Curr Med Chem*, 11:807-26.
- Schatz DG, Spanopoulou E: (2005) Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr Top Microbiol Immunol*, 290:49-85.
- Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML: (2001) An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 293:2111-4.
- Schiltz RL, Mizzen CA, Vassilev A, Cook RG, Allis CD, Nakatani Y: (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem*, 274:1189-92.



- Schmierer B, Hill CS: (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:970-82.
- Schübeler D, Groudine M, Bender MA: (2001) The murine beta-globin locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:11432-7.
- Schuurs AH, Verheul HA: (1990) Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem*, 35:157-72.
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K: (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, 23:5080-1.
- Serrador JM, Cabrero JR, Sancho D, Mittelbrunn M, Urzainqui A, Sánchez-Madrid F: (2004) HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity*, 20:417-28.
- Sfikakis PP, Boletis JN, Tsokos GC: (2005) Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. *Curr Opin Rheumatol*, 17:550-7.
- Shahbazian MD, Grunstein M: (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, 76:75-100.
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X: (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:18030-5.
- Shigeno K, Yoshida H, Pan L, Luo JM, Fujisawa S, Naito K, Nakamura S, Shinjo K, Takeshita A, Ohno R, Ohnishi K: (2004) Disease-related potential of mutations in transcriptional cofactors CREB-binding protein and p300 in leukemias. *Cancer Lett*, 213:11-20.
- Shikama N, Lutz W, Kretzschmar R, Sauter N, Roth JF, Marino S, Wittwer J, Scheidweiler A, Eckner R: (2003) Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J*, 22:5175-85.
- Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ: (2001) From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*, 1:147-53.
- Sidman CL, Shultz LD, Hardy RR, Hayakawa K, Herzenberg LA: (1986) Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science*, 232:1423-5.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K: (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 10:405-55.
- Simonsson M, Kanduri M, Grönroos E, Heldin CH, Ericsson J: (2006) The DNA binding activities of Smad2 and Smad3 are regulated by coactivator-mediated acetylation. *J Biol Chem*, 281:39870-80.

- Singh RR: (2005) SLE: translating lessons from model systems to human disease. *Trends Immunol*, 26:572-9.
- Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD: (2000) A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:6658-63.
- Smithson G, Couse JF, Lubahn DB, Korach KS, Kincade PW: (1998) The role of estrogen receptors and androgen receptors in sex steroid regulation of B lymphopoiesis. *J Immunol*, 161:27-34.
- Smits PH, de Wit L, van der Eb AJ, Zantema A: (1996) The adenovirus E1A-associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation. *Oncogene*, 12:1529-35.
- Snow EC, Pittner B, Reid S: (1994) T helper cell regulation of normal and neoplastic B cell growth. *Semin Immunol*, 6:311-26.
- Snowden AW, Anderson LA, Webster GA, Perkins ND: (2000) A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol*, 20:2676-86.
- Sterner DE, Berger SL: (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:435-59.
- Steward MW, Hay FC: (1976) Changes in immunoglobulin class and subclass of anti-DNA antibodies with increasing age in N/ZBW F1 hybrid mice. *Clin Exp Immunol*, 26:363-70.
- Strahl BD, Allis CD: (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403:41-5.
- Strand V: (1999) Biologic agents and innovative interventional approaches in the management of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*, 11:330-40.
- Sun J, Matthias G, Mihatsch MJ, Georgopoulos K, Matthias P: (2003) Lack of the transcriptional coactivator OBF-1 prevents the development of systemic lupus erythematosus-like phenotypes in Aiolos mutant mice. *J Immunol*, 170:1699-706.
- Swope DL, Mueller CL, Chrivia JC: (1996) CREB-binding protein activates transcription through multiple domains. *J Biol Chem*, 271:28138-45.
- Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N: (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci*, 103:953-64.
- Tanaka Y, Naruse I, Maekawa T, Masuya H, Shiroishi T, Ishii S: (1997) Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:10215-20.

- Tanaka Y, Naruse I, Hongo T, Xu M, Nakahata T, Maekawa T, Ishii S: (2000) Extensive brain hemorrhage and embryonic lethality in a mouse null mutant of CREB-binding protein. *Mech Dev*, 95:133-45.
- Thompson PR, Wang D, Wang L, Fulco M, Pediconi N, Zhang D, An W, Ge Q, Roeder RG, Wong J, Levrero M, Sartorelli V, Cotter RJ, Cole PA: (2004) Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol*, 11:308-15.
- Topaloglu O, Hurley PJ, Yildirim O, Civin CI, Bunz F: (2005) Improved methods for the generation of human gene knockout and knockin cell lines. *Nucleic Acids Res*, 33:e158.
- Tsokos GC, Liossis SN: (1999) Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today*, 20:119-24.
- Tu AW, Luo K: (2007) Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *J Biol Chem*, 282:21187-96.
- Turner BM: (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 22:836-45.
- Turner BM: (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111:285-91.
- Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL: (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature*, 378:298-302.
- Tuscano JM, Harris GS, Tedder TF: (2003) B lymphocytes contribute to autoimmune disease pathogenesis: current trends and clinical implications. *Autoimmun Rev*, 2:101-8.
- VanBuren V, Piao Y, Dudekula DB, Qian Y, Carter MG, Martin PR, Stagg CA, Basseley UC, Aiba K, Hamatani T, Kargul GJ, Hide W, Ko MS: (2002) Assembly, verification, and initial annotation of the NIA mouse 7.4K cDNA clone set. *Genome Res* 12:1999-2003.
- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Taskén K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N: (2005) Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet*, 37:1317-9.
- Varga-Weisz PD, Becker PB: (2006) Regulation of higher-order chromatin structures by nucleosome-remodelling factors. *Curr Opin Genet Dev*, 16:151-6.
- Verma M, Seminara D, Arena FJ, John C, Iwamoto K, Hartmuller V: (2006) Genetic and epigenetic biomarkers in cancer : improving diagnosis, risk assessment, and disease stratification. *Mol Diagn Ther*, 10:1-15.
- Viau M, Zouali M: (2005) B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin Immunol*, 114:17-26.
- Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M: (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature*, 408:495-8.

- Wang JH, Avitahl N, Cariappa A, Friedrich C, Ikeda T, Renold A, Andrikopoulos K, Liang L, Pillai S, Morgan BA, Georgopoulos K: (1998) Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity*, 9:543-53.
- Wang X, Taplick J, Geva N, Oren M: (2004) Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett*, 561:195-201.
- Weideman CA, Netter RC, Benjamin LR, McAllister JJ, Schmiedekamp LA, Coleman RA, Pugh BF: (1997). Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA. *J Mol Biol*, 271: 61-75.
- Wen L, Shinton SA, Hardy RR, Hayakawa K: (2005) Association of B-1 B cells with follicular dendritic cells in spleen. *J Immunol*, 174:6918-26.
- Whitacre CC: (2001) Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*, 2:777-80.
- Widom J: (1989) Toward a unified model of chromatin folding. *Annu Rev Biophys Chem*, 18:365-95.
- Wolffe AP, Hayes JJ: (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*, 27:711-20.
- Wong BR, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES: (2004) Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, 13:743-62.
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D: (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430:686-9.
- Woychik NA, Hampsey M: (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, 108:453-63.
- Xu W, Edmondson DG, Evrard YA, Wakamiya M, Behringer RR, Roth SY: (2000) Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat Genet*, 26:229-32.
- Xu W, Fukuyama T, Ney PA, Wang D, Reh J, Boyd K, van Deursen JM, Brindle PK: (2006) Global transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 are highly essential collectively but not individually in peripheral B cells. *Blood*, 107:4407-16.
- Yaciuk P, Moran E: (1991) Analysis with specific polyclonal antiserum indicates that the E1A-associated 300-kDa product is a stable nuclear phosphoprotein that undergoes cell cycle phase-specific modification. *Mol Cell Biol*, 11:5389-97.
- Yadav N, Lee J, Kim J, Shen J, Hu MC, Aldaz CM, Bedford MT: (2003) Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:6464-8.
- Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y: (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382:319-24.

Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, Eckner R: (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*, 93:361-72.

Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, Mittleman B, Schiffman R, Payne S, Longenecker G, Mozes E, Karlsson S: (1996) Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood*, 87:1439-45.

Yoo CB, Jones PA: (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 5:37-50.

Yuan W, Condorelli G, Caruso M, Felsani A, Giordano A: (1996) Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J Biol Chem*, 271:9009-13.

Zhang Q, Yao H, Vo N, Goodman RH: (2000) Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:14323-8.

Zhong H, Voll RE, Ghosh S: (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*, 1:661-71.

Zouali M, Sarmay G: (2004) B lymphocyte signaling pathways in systemic autoimmunity: implications for pathogenesis and treatment. *Arthritis Rheum*, 50:2730-41.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungen

Abkürzungen für Chemikalien und Puffer wurden in den Abschnitten 2 Materialien und 3 Methoden erläutert. Chemische Elemente und Verbindungen wurden dem internationalen Standard entsprechend abgekürzt.

$^3\text{H}$	radioaktiv markiertes Wasserstoffatom (Trizium)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\alpha$ -	anti-
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (100%)
ac	Acetylgruppe
Acetyl-CoA	<i>Acetyl-coenzyme A</i> (Acetyl-Koenzyme A)
Akt	Proteinkinase B
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i> (Akute myeloide Leukämie)
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
AT	Acetyltransferaseaktivität
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	<i>B cell activating factor of TNF family</i>
Bam32	<i>B-lymphocyte adaptor molecule 32</i>
BCR	<i>B cell receptor</i> (B-Zell-Rezeptor)
BD	Bromodomäne
Blnk	<i>B cell linker</i>
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphthalein
BSA	Rinderserumalbumin Fraktion V
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
bzw.	beziehungsweise
c	zenti ( $10^{-2}$ )
C	Cytidin
ca.	circa
cAMP	cyclic AMP (zyklisches AMP)

---

CBP	<i>CREB binding protein</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (Zyclin-abhängige Kinase)
cDNA	<i>Copy DNA</i> (Kopie der DNA)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i> (Zähleinheiten pro Minute)
CRD1	<i>Cell cycle regulatory domain 1</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
C-Terminus	Carboxy-terminales Proteinende
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DOC	Desoxycholat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DTT	Dithiothreitol
E1A	<i>Early region 1A</i>
E2F	<i>E2 promotor binding factor</i>
EB	Elutionspuffer
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i> (Östrogenrezeptor)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	und andere
Fab	<i>Fragment of antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FasL	Fas-Ligand
Fc	<i>Fragment of constant region</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FcγRIIB	<i>Low-affinity Fc receptor for IgG</i>
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung = 9.81 m/s <sup>2</sup>
g	Gramm

Gcn5	<i>General control nonderepressible 5</i>
Gln	Glutamin
GNAT	<i>Gcn5-related N-acetyltransferases</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK-3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase-3<math>\beta</math></i>
h	Stunde(n)
H	Histon
H3K18	Lysin an der Position 18 von Histon H3
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B kinase</i>
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP	Immunpräzipitation
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i> (Jun N-terminale Kinase)
k	kilo (10 <sup>3</sup> )
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
lpr	<i>lymphoproliferation syndrom</i>
LOH	<i>Loss-of-heterozygosity</i> (Verlust der Heterogenität)
M	Molar
m	Meter
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated kinase</i>
min	Minute(n)
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i>
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mol	Mol
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)



Myc	Myelocytomatose protein
MZ-B-Zelle	Marginalzonen-B-Zelle
n	nano ( $10^{-9}$ )
NAD	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-terminales Proteinende
NURF	<i>Nucleosome remodeling factor complex</i>
OVA	Ovalbumin
p	piko ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCAF	<i>p300 and CBP-associated factor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PBS	<i>Phosphat buffer solution</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PirB	<i>Paired immunoglobulin-like receptor B</i>
PKC	Proteinkinase C
PLCγ2	Phospholipase Cγ2
pRB	Retinoblastomprotein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	quantitativ
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	<i>quantitative Realtime-PCR</i> (quantitative Echtzeit-PCR)
R	Arginin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
RNAPII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
RSC	<i>Remodeling the structure of chromatin</i>
s	Sekunde
SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i> (Suberoylanilid-hydroxamidsäure)

---

SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Shp	<i>SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5' phosphatase</i>
Shp1	<i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1</i>
SLE	<i>Systemic lupus erythematosus</i> (Systemischer Lupus erythematosus)
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like modifier</i>
SWI/SNF	<i>Switch/Sucrose non fermentable</i> Proteinkomplex
Syk	<i>Splenic tyrosine kinase</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Essigsäure (Acetat)/EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TSA	Trichostatin-A
U	Units
U	Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
W	Watt
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zinkfingerregion

## 8.2 Ergebnisliste des cDNA-Microarray von primären reifen B-Zellen

**Tabelle 3: Übersicht der Gene, deren Expression in primären reifen B-Zellen von Mäusen mit Acetyltransferase-defizientem p300 mindestens 3,5-fach reprimiert wurde.** Primäre, reife B-Zellen wurden aus der Milz einer Maus mit Expression von Acetyltransferase-defizientem p300 und einer Kontrollmaus isoliert. Nach der Isolierung der mRNA wurde diese für einen cDNA-Microarray verwendet. Dabei diente die Probe der Kontrollmaus als Referenz. Die erhaltenen Rohdaten wurden von Birgit Samans ausgewertet. x-fach: x-fache Änderung der Genexpression.

x-fach	Richtung	Symbol	Bezeichnung des Gens
19,9	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
17,3	herunter	Ms4a1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
15,6	herunter	Sh3bgrl3	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein-like 3
14,8	herunter	Ii	Ia-associated invariant chain
14,5	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
14,1	herunter		Transcribed locus, moderately similar to XP_533197.1 similar to 60S acidic ribosomal protein P2 [Canis familiaris]
14,0	herunter	Lamr1	Laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)
13,8	herunter	Cnn2	Calponin 2
13,4	herunter	Arpc2	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2
12,4	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
11,9	herunter	Plac8	Placenta-specific 8
11,8	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
11,8	herunter	Capg	Capping protein (actin filament), gelsolin-like
11,5	herunter	Serf2	Small EDRK-rich factor 2
11,5	herunter	Gnb2-rs1	Guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence 1
11,4	herunter	Hspa5	Heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)
11,2	herunter	Eef2	Eukaryotic translation elongation factor 2
10,6	herunter	Gnas	RIKEN cDNA A930027G11 gene
10,5	herunter	Coro1a	Coronin, actin binding protein 1A
10,3	herunter	Hcph	Hemopoietic cell phosphatase
10,3	herunter	Daf1	Decay accelerating factor 1
10,3	herunter	Cnih	Cornichon homolog (Drosophila)
10,1	herunter	Prg1	Proteoglycan 1, secretory granule
10,0	herunter	Mylc2b	Myosin light chain, regulatory B
9,9	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
9,8	herunter	Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2
9,7	herunter	H2-Eb1	Histocompatibility 2, class II antigen E beta
9,6	herunter		RIKEN cDNA 1200009K13 gene
9,3	herunter	Atp5g2	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2
9,0	herunter	Senp6	SUMO/sentrin specific protease 6
9,0	herunter	Iigs1	Interferon inducible GTPase 1
8,8	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
8,7	herunter		EST AA792894
8,7	herunter	Crlf3	Cytokine receptor-like factor 3
8,7	herunter	Msn	Moesin
8,7	herunter	Pum2	Pumilio 2 (Drosophila)
8,3	herunter	Ramp2	RIKEN cDNA 9430072K23 gene
8,3	herunter	Ldb3	LIM domain binding 3
8,3	herunter	Il2rg	Interleukin 2 receptor, gamma chain
8,2	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
8,0	herunter	Ncl	Nucleolin
7,8	herunter	Eef1a1	Similar to Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) (Elongation factor Tu)
7,7	herunter	Npm1	Nucleophosmin 1
7,6	herunter	Ly6e	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E
7,6	herunter	Sf3b1	Splicing factor 3b, subunit 1
7,6	herunter		RIKEN cDNA 4930517K11 gene

7,5	herunter	Clic1	Chloride intracellular channel 1
7,3	herunter	Hspcb	Heat shock protein 1, beta
7,2	herunter	Calm2	Calmodulin 2
7,2	herunter	Rpl18	Ribosomal protein L18
7,0	herunter	Arhgdib	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
6,9	herunter	Snx2	Sorting nexin 2
6,8	herunter	D3Jfr1	DNA segment, Chr 3, MJeffers 1
6,8	herunter	Arl6ip1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1
6,8	herunter	Eef2	Eukaryotic translation elongation factor 2
6,7	herunter		RIKEN cDNA B930006L02 gene
6,6	herunter	Actb	Actin, beta, cytoplasmic
6,6	herunter		Rho GTPase activating protein 20
6,6	herunter	Sat1	Spermidine/spermine N1-acetyl transferase 1
6,6	herunter	Cdc42	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)
6,5	herunter	Slc14a1	Solute carrier family 14 (urea transporter), member 1
6,5	herunter		RIKEN cDNA 2610027O18 gene
6,4	herunter		Transcribed locus, strongly similar to XP_342950.1 similar to 60S ribosomal protein L11 [Rattus norvegicus]
6,4	herunter	Cst3	Cystatin C
6,4	herunter	Hspca	Heat shock protein 1, alpha
6,4	herunter	Cul1	RIKEN cDNA A930035D04 gene
6,4	herunter	Hsp105	Heat shock protein 105
6,4	herunter	Slc28a2	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2
6,4	herunter	Cd2	CD2 antigen
6,4	herunter	Dbn1	Drebrin-like
6,4	herunter	Rod1	ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)
6,3	herunter	Hspcb	Heat shock protein 1, beta
6,3	herunter	Hspcb	Heat shock protein 1, beta
6,3	herunter	Rnu64	Similar to 40S ribosomal protein S2
6,2	herunter	Gimap6	GTPase, IMAP family member 6
6,2	herunter		RIKEN cDNA 2900073G15 gene
6,2	herunter		RIKEN cDNA D430042O09 gene
6,2	herunter		RIKEN cDNA 3110003A17 gene
6,2	herunter	Acta2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
6,1	herunter	Psmb8	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional protease 7)
6,1	herunter	Scotin	Scotin gene
6,1	herunter	Armet	Arginine-rich, mutated in early stage tumors
6,1	herunter		Similar to inner nuclear membrane protein
6,0	herunter	Scp2	Sterol carrier protein 2, liver
6,0	herunter	Hmox1	Heme oxygenase (decycling) 1
5,9	herunter	Scp2	Sterol carrier protein 2, liver
5,9	herunter	Fos	FBJ osteosarcoma related oncogene
5,9	herunter	Hspcb	Heat shock protein 1, beta
5,8	herunter	Myl6	Myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle
5,7	herunter	Igh-6	Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)
5,7	herunter	Capzb	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
5,7	herunter	Rpl15	Ribosomal protein L15
5,7	herunter	D6Mit97	DNA segment, Chr 6, Massachusetts Institute of Technology 97
5,6	herunter	H2-Aa	Histocompatibility 2, class II antigen A, alpha
5,6	herunter		RIKEN cDNA 2010309L07 gene
5,5	herunter	Rpl15	Ribosomal protein L15
5,5	herunter	H19	H19 fetal liver mRNA
5,4	herunter	Capza2	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2
5,4	herunter	Ldh1	Lactate dehydrogenase 1, A chain
5,4	herunter		RIKEN cDNA 1500005K14 gene
5,4	herunter	Senp6	SUMO/sentrin specific protease 6
5,4	herunter	Icsbp1	Interferon consensus sequence binding protein 1

5,3	herunter	H2-DMa	Histocompatibility 2, class II, locus DMa
5,3	herunter	Bcap31	B-cell receptor-associated protein 31
5,3	herunter	Pabpn1	Poly(A) binding protein, nuclear 1
5,1	herunter	Cox7c	Cytochrome c oxidase, subunit VIIc
5,1	herunter		RIKEN cDNA E030004N02 gene
5,1	herunter	Txnip	Thioredoxin interacting protein
5,1	herunter	Tuba1	Tubulin, alpha 1
5,1	herunter	Tnc	Tenascin C
5,1	herunter		RIKEN cDNA 2410015M20 gene
5,0	herunter	Hnrpu	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
5,0	herunter	Arbp	Acidic ribosomal phosphoprotein P0
5,0	herunter	Psma4	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4
5,0	herunter	Vasp	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
5,0	herunter	Eif4a1	Eukaryotic translation initiation factor 4A1
4,9	herunter	Rpl4	Ribosomal protein L4
4,9	herunter	Eif2s3x	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked
4,9	herunter		RIKEN cDNA 3010027A04 gene
4,8	herunter	Ctsz	Cathepsin Z
4,8	herunter	Colla1	Procollagen, type I, alpha 1
4,8	herunter	Rpl15	Ribosomal protein L15
4,8	herunter		MRNA fragment for heat shock cognate hsc73
4,8	herunter	Ppp1ca	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform
4,8	herunter	Ifi204	Myeloid cell nuclear differentiation antigen
4,8	herunter	Bloc1s1	Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 1
4,8	herunter	Dncl1	Dynein, cytoplasmic, light chain 1
4,8	herunter	Eif3s3	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 (gamma)
4,7	herunter	Gm2a	GM2 ganglioside activator protein
4,7	herunter	Stk17b	Serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
4,7	herunter	Evl	RIKEN cDNA D130067P18 gene
4,7	herunter	Wbscr5	Williams-Beuren syndrome chromosome region 5 homolog
4,7	herunter	Eef1a1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
4,7	herunter	Adam19	A disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)
4,7	herunter	Ube2d3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)
4,6	herunter	Ly6e	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E
4,6	herunter	Itgal	Integrin alpha L
4,6	herunter	Hspcb	Heat shock protein 1, beta
4,6	herunter	Eif4g2	RIKEN cDNA 1700012D14 gene
4,6	herunter	Hnrpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C
4,6	herunter	Slc25a17	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, peroxisomal membrane protein), member 17
4,6	herunter	Luc7l2	LUC7-like 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )
4,6	herunter	Flna	Filamin, alpha
4,6	herunter	Ebf1	Early B-cell factor 1
4,5	herunter		Transcribed locus, strongly similar to NP_082138.1 ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d [ <i>Mus musculus</i> ]
4,5	herunter	Gpiap1	GPI-anchored membrane protein 1
4,5	herunter	Ubc	Ubiquitin C
4,5	herunter	Galnt1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1
4,5	herunter		RIKEN cDNA 6330577E15 gene
4,5	herunter	Calm1	Calmodulin 1
4,5	herunter		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
4,5	herunter	Rpl10	Ribosomal protein 10
4,4	herunter	Orc11	Origin recognition complex, subunit 1-like ( <i>S.cerevisiae</i> )
4,4	herunter	H2-DMb1	Histocompatibility 2, class II, locus Mb1
4,4	herunter		RIKEN cDNA 6330577E15 gene
4,4	herunter	Pim3	Proviral integration site 3

4,3	herunter		RIKEN cDNA 2900090M10 gene
4,3	herunter	Mat2a	Methionine adenosyltransferase II, alpha
4,3	herunter	Lbr	Lamin B receptor
4,3	herunter	Hspcb	Heat shock protein 1, beta
4,3	herunter	Gdap1	Ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1
4,3	herunter	Napsa	Napsin A aspartic peptidase
4,3	herunter	Ctsc	Cathepsin C
4,3	herunter	Raly	RIKEN cDNA 8030497I03 gene
4,3	herunter	Rap1b	RAS related protein 1b
4,2	herunter	Mafg	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene protein G
4,2	herunter		Septin 7
4,2	herunter	Ctsc	Cathepsin C
4,2	herunter		Presenilin enhancer 2 homolog ( <i>C. elegans</i> )
4,2	herunter	Wwox	WW domain-containing oxidoreductase
4,2	herunter	Ly6a	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A
4,2	herunter	Calm2	Calmodulin 2
4,2	herunter	Bcas3	Breast carcinoma amplified sequence 3
4,2	herunter	Tnpol	Transportin 1
4,1	herunter	Ptp4a3	Protein tyrosine phosphatase 4a3
4,1	herunter	Suz12	Suppressor of zeste 12 homolog ( <i>Drosophila</i> )
4,1	herunter		EST AA175286
4,1	herunter	Gcnt1	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
4,1	herunter	Nfatc4	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4
4,1	herunter	Tbc1d5	TBC1 domain family, member 5
4,1	herunter	Arl6ip1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1
4,1	herunter	Eef1g	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma
4,1	herunter	Ptprecap	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C polypeptide-associated protein
4,0	herunter	Cd24a	CD24a antigen
4,0	herunter	Zfp61	Zinc finger protein 61
4,0	herunter	Ppib	Casein kinase 1, gamma 1
4,0	herunter	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1
4,0	herunter	Ncf4	Neutrophil cytosolic factor 4
4,0	herunter	Mrg1	Myeloid ecotropic viral integration site-related gene 1
4,0	herunter	Sh3d1B	SH3 domain protein 1B
4,0	herunter	Lcp1	Lymphocyte cytosolic protein 1
4,0	herunter	Eno1	Enolase 1, alpha non-neuron
4,0	herunter	Acp5	Acid phosphatase 5, tartrate resistant
4,0	herunter	Phemx	Pan hematopoietic expression
4,0	herunter	Copeb	Kruppel-like factor 6
3,9	herunter	Taf13	TAF13 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
3,9	herunter	Pcp2	Purkinje cell protein 2 (L7)
3,9	herunter	Psma7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 7
3,9	herunter		RIKEN cDNA 2900010J23 gene
3,9	herunter	Rpl38	Ribosomal protein L38
3,9	herunter	Srp54	Signal recognition particle 54
3,9	herunter	Phf1	PHD finger protein 1
3,9	herunter	Slc40a1	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
3,9	herunter	Gpx4	Glutathione peroxidase 4
3,9	herunter	Lsp1	Lymphocyte specific 1
3,9	herunter	Ndufs8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8
3,9	herunter	Ebf1	Early B-cell factor 1
3,9	herunter		Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
3,9	herunter	Ftl1	Ferritin light chain 1
3,9	herunter	Kai1	Kangai 1 (suppression of tumorigenicity 6, prostate)
3,8	herunter	Cox7c	Cytochrome c oxidase, subunit VIIc
3,8	herunter	Igl-V1	Immunoglobulin lambda chain, variable 1

3,8	herunter	Cd53	CD53 antigen
3,8	herunter	Strbp	Spermatid perinuclear RNA binding protein
3,8	herunter		Similar to high mobility group protein
3,8	herunter	Icam2	Intercellular adhesion molecule 2
3,8	herunter		DNA segment, Chr 11, Brigham & Women's Genetics 0414 expressed
3,8	herunter	Fkbp4	FK506 binding protein 4
3,8	herunter	Rhog	Ras homolog gene family, member G
3,8	herunter	Mtdh	Metadherin
3,8	herunter	Snx5	Sorting nexin 5
3,8	herunter		Similar to Eno1 protein
3,8	herunter	Ntan1	N-terminal Asn amidase
3,8	herunter	Tm6sf1	Transmembrane 6 superfamily member 1
3,7	herunter		RIKEN cDNA 4631422O05 gene
3,7	herunter	Bcap37	B-cell receptor-associated protein 37
3,7	herunter	Mrps25	Mitochondrial ribosomal protein S25
3,7	herunter	Hnrpu	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
3,7	herunter	Agt	Angiotensinogen
3,7	herunter	S100a11	S100 calcium binding protein A11 (calizzarin)
3,7	herunter	Mdn1	Midasin homolog (yeast)
3,7	herunter	Fus	Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)
3,7	herunter	Eef1b2	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2
3,7	herunter	Mef2c	Myocyte enhancer factor 2C
3,7	herunter	Il13ra1	Interleukin 13 receptor, alpha 1
3,7	herunter	Entpd7	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7
3,6	herunter	Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble
3,6	herunter	Nras	Neuroblastoma ras oncogene
3,6	herunter	Ssr2	Signal sequence receptor, beta
3,6	herunter	Dncl2a	Dynein, cytoplasmic, light chain 2A
3,6	herunter	Cd22	CD22 antigen
3,6	herunter		RIKEN cDNA B430203M17 gene
3,6	herunter	Stx4a	Syntaxin 4A (placental)
3,6	herunter	Sfrs6	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
3,6	herunter	Rps16	Ribosomal protein S16
3,6	herunter	Ankrd28	Ankyrin repeat domain 28
3,6	herunter	Cst3	Cystatin C
3,6	herunter	Bst2	Bone marrow stromal cell antigen 2
3,6	herunter	Nme1	Expressed in non-metastatic cells 1, protein
3,6	herunter	Ubc	Ubiquitin C
3,6	herunter	Cd24a	CD24a antigen
3,6	herunter	Spna2	Spectrin alpha 2
3,6	herunter	Tra1	Tumor rejection antigen gp96
3,6	herunter	Cnbp1	Cellular nucleic acid binding protein 1
3,5	herunter		Transcribed locus, moderately similar to NP_795929.1 RIKEN cDNA 8030475D13 gene [Mus musculus]
3,5	herunter		Transcribed locus, strongly similar to NP_079640.1 RIKEN cDNA 1110005A23 gene [Mus musculus]
3,5	herunter	Arl6ip1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1
3,5	herunter	Mfap2	Microfibrillar-associated protein 2
3,5	herunter	Taldo1	Transaldolase 1
3,5	herunter	Epsti1	Epithelial stromal interaction 1 (breast)
3,5	herunter	Ptma	Prothymosin alpha
3,5	herunter	Mad111	Mitotic arrest deficient 1-like 1
3,5	herunter	Ptp4a2	Protein tyrosine phosphatase 4a2
3,5	herunter	Psmc1	Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha
3,5	herunter	Rps15	Ribosomal protein S15
3,5	herunter	Psmc1	Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha
3,5	herunter	Npc1	Niemann Pick type C1
3,5	herunter	Eno1	Enolase 1, alpha non-neuron
3,5	herunter	Vasp	Vasodilator-stimulated phosphoprotein

3,5	herunter	Mef2c	Myocyte enhancer factor 2C
3,5	herunter	Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
3,5	herunter	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
3,5	herunter	Idh3g	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+), gamma
3,5	herunter	Ebi2	Epstein-Barr virus induced gene 2
3,5	herunter	Fzd3	RIKEN cDNA D130009B15 gene
3,5	herunter	Rpia	Ribose 5-phosphate isomerase A
3,5	herunter	Rhoa	Ras homolog gene family, member A
3,5	herunter	Ddx3x	Fibroblast growth factor inducible 14
3,5	herunter	Rnf11	Ring finger protein 11
3,5	herunter	Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4
3,5	herunter	Ran	RAN, member RAS oncogene family

**Tabelle 4: Übersicht der Gene, deren Expression in primären reifen B-Zellen von Mäusen mit Acetyltransferase-defizientem p300 mindestens 3,5-fach hochreguliert wurde.** Primäre, reife B-Zellen wurden aus der Milz einer Maus mit Expression von Acetyltransferase-defizientem p300 und einer Kontrollmaus isoliert. Nach der Isolierung der mRNA wurde diese für einen cDNA-Microarray verwendet. Dabei diente die Probe der Kontrollmaus als Referenz. Die erhaltenen Rohdaten wurden von Birgit Samans ausgewertet. x-fach: x-fache Änderung der Genexpression.

x-fach	Richtung	Symbol	Bezeichnung des Gens
42,1	hoch	Hbb-bh1	Hemoglobin Z, beta-like embryonic chain
40,7	hoch	Hbb-bh1	Hemoglobin Z, beta-like embryonic chain
38,3	hoch	Hbb-bh1	Hemoglobin Z, beta-like embryonic chain
32,1	hoch	Sec1512	SEC15-like 2 (S. cerevisiae)
30,2	hoch	Hbb-bh1	Hemoglobin Z, beta-like embryonic chain
27,1	hoch	Stfa1	Stefin A1
27,1	hoch	Mt1	Metallothionein 1
24,8	hoch	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1
24,1	hoch	Plxna4	Plexin A4
23,3	hoch	Ate1	Arginine-tRNA-protein transferase 1
21,6	hoch	Gnpda2	Expressed sequence AA407526
19,5	hoch	Gtf3c2	General transcription factor IIIC, polypeptide 2, beta
18,7	hoch	Ddx3y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked
17,9	hoch		RIKEN cDNA C230076A16 gene
15,7	hoch	Prdm5	EST AI197291
15,6	hoch	Got2	Glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial
15,5	hoch	Phtf1	Putative homeodomain transcription factor 1
14,2	hoch	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1
13,9	hoch	Mogat2	Monoacylglycerol O-acyltransferase 2
13,9	hoch	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1
13,8	hoch	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1
13,4	hoch	Prkch	Protein kinase C, eta
13,3	hoch	Lepre1	Leprecan 1
13,1	hoch	Ptprg	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, G
12,5	hoch	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1
12,3	hoch	Slc12a7	Solute carrier family 12, member 7
12,3	hoch	Hmga2	High mobility group AT-hook 2
12,1	hoch		RIKEN cDNA 2810411K19 gene
12,1	hoch	Mllt3	RIKEN cDNA 4832441B07 gene
12,0	hoch	Fbxo3	F-box only protein 3
11,7	hoch	Prcl	Protein regulator of cytokinesis 1
11,2	hoch	Dido1	Death inducer-obliterator 1
11,1	hoch		RIKEN cDNA 4632434I11 gene
10,8	hoch		RIKEN cDNA 2410129H14 gene
10,5	hoch	Eraf	Erythroid associated factor
10,5	hoch	Wfdc1	WAP four-disulfide core domain 1
10,0	hoch	Efnb2	RIKEN cDNA E230020D15 gene
9,9	hoch	H19	H19 fetal liver mRNA
9,7	hoch	Trip13	Thyroid hormone receptor interactor 13



9,7	hoch	Ifitm2	Interferon induced transmembrane protein 2
9,5	hoch	Tcf20	Transcription factor 20
9,4	hoch	Sall2	Sal-like 2 (Drosophila)
9,4	hoch	Edg5	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 5
9,4	hoch	Dot1l	DOT1-like, histone H3 methyltransferase ( <i>S. cerevisiae</i> )
9,2	hoch		DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 678, expressed
9,2	hoch	Pou3f1	POU domain, class 3, transcription factor 1
9,2	hoch		RIKEN cDNA 1300012G16 gene
9,1	hoch	Ovgp1	Oviductal glycoprotein 1
9,0	hoch	Gldc	Glycine decarboxylase
8,9	hoch	Il11ra1	Interleukin 11 receptor, alpha chain 1
8,8	hoch	Hip2	Huntingtin interacting protein 2
8,8	hoch	Taf1a	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, A
8,8	hoch	Mcm10	Minichromosome maintenance deficient 10 ( <i>S. cerevisiae</i> )
8,7	hoch	Fibp	Fibroblast growth factor (acidic) intracellular binding protein
8,6	hoch	Gata2	GATA binding protein 2
8,4	hoch	Shc1	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1
8,4	hoch	Idh1	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
8,3	hoch	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1
8,2	hoch		Similar to ALY
8,2	hoch		RIKEN cDNA A530057A03 gene
8,2	hoch	Nxf1	Nuclear RNA export factor 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
8,2	hoch	Pcdh18	Protocadherin 18
8,1	hoch		RIKEN cDNA 2900054P12 gene
8,1	hoch	Pdlim5	PDZ and LIM domain 5
8,1	hoch	Nbl1	Neuroblastoma, shochpression of tumorigenicity 1
8,1	hoch	Ube4b	Ubiquitination factor E4B, UFD2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
7,9	hoch	Tfpi	Tissue factor pathway inhibitor
7,9	hoch	Rerg	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor
7,7	hoch		RIKEN cDNA A230006I23 gene
7,6	hoch		RIKEN cDNA 1600023N17 gene
7,6	hoch	Akr1c13	Aldo-keto reductase family 1, member C13
7,6	hoch	Safb2	Scaffold attachment factor B2
7,5	hoch	Pcx	Pyruvate carboxylase
7,4	hoch		RIKEN cDNA A230054D04 gene
7,4	hoch	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1
7,4	hoch	Lims1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1
7,3	hoch	Col3a1	Procollagen, type III, alpha 1
7,3	hoch	Hs1bp3	HS1 binding protein 3
7,1	hoch	Col1a2	Procollagen, type I, alpha 2
7,1	hoch	Pramel6	Preferentially expressed antigen in melanoma like 6
7,1	hoch	Dnaja3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3
7,0	hoch	Cdh22	Cadherin 22
7,0	hoch	Aof1	Amine oxidase, flavin containing 1
7,0	hoch	Riok1	RIO kinase 1 (yeast)
6,9	hoch	Tial1	Tial1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1
6,9	hoch	Trpc2	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2
6,8	hoch	Gspt1	G1 to S phase transition 1
6,8	hoch	Atbf1	AT motif binding factor 1
6,7	hoch	Centd2	Centaurin, delta 2
6,7	hoch	Rbbp6	Retinoblastoma binding protein 6
6,6	hoch	Tgfb1i4	RIKEN cDNA D430022A14 gene
6,6	hoch	Ppm1b	Protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform
6,5	hoch	Stra6	Stimulated by retinoic acid gene 6
6,4	hoch	Fbxl11	F-box and leucine-rich repeat protein 11
6,4	hoch	Psm8	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8
6,3	hoch	Lama5	Laminin, alpha 5

6,2	hoch	Dek	DEK oncogene (DNA binding)
6,2	hoch	Itsn1	Intersectin 1 (SH3 domain protein 1A)
6,2	hoch	Slc25a10	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, dicarboxylate transporter), member 10
6,2	hoch	Glg1	Golgi apparatus protein 1
6,1	hoch	Nosip	Nitric oxide synthase interacting protein
6,1	hoch	Tcfcp2	RIKEN cDNA D230015P20 gene
6,1	hoch	Usp9x	Ubiquitin specific protease 9, X chromosome
6,1	hoch	Nif311	Ngg1 interacting factor 3-like 1 (S. pombe)
6,1	hoch	Slc4a4	Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4
6,0	hoch	Col18a1	Procollagen, type XVIII, alpha 1
6,0	hoch	Rbms3	RNA binding motif, single stranded interacting protein
5,9	hoch	Stk31	Serine threonine kinase 31
5,9	hoch		RIKEN cDNA 2310065K24 gene
5,9	hoch	Dock5	Dedicator of cytokinesis 5
5,9	hoch	Bloc1s2	Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 2
5,8	hoch	Nxt1	NTF2-related export protein 1
5,8	hoch	Ctps	Cytidine 5'-triphosphate synthase
5,8	hoch	Acacb	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
5,8	hoch	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-like 2
5,7	hoch		Similar to hypothetical protein FLJ20811
5,7	hoch	Mrpl17	Mitochondrial ribosomal protein L17
5,6	hoch	Enpp5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5
5,6	hoch	Strn	Striatin, calmodulin binding protein
5,6	hoch	Ighg	Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)
5,6	hoch	Traf3ip1	TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1
5,6	hoch	Arl1	ADP-ribosylation factor-like 1
5,5	hoch	Ppp1r8	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 8
5,5	hoch	Mybl2	Myeloblastosis oncogene-like 2
5,4	hoch	Rhpn2	Rhopilin, Rho GTPase binding protein 2
5,4	hoch	Arl4	ADP-ribosylation factor-like 4
5,4	hoch	Pla2g4a	Phospholipase A2, grohoch IVA (cytosolic, calcium-dependent)
5,4	hoch	Pdgfd	Platelet-derived growth factor, D polypeptide
5,4	hoch	Akp5	Alkaline phosphatase 5
5,3	hoch	Ociad1	OCIA domain containing 1
5,3	hoch	Kbtbd9	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 9
5,3	hoch	Dnase2a	Deoxyribonuclease II alpha
5,3	hoch	Crebl1	CAMP responsive element binding protein-like 1
5,3	hoch	Cacnb2	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
5,2	hoch		RIKEN cDNA 6530403G13 gene
5,2	hoch		Similar to Zinc finger protein 267 (Zinc finger protein HZF2)
5,2	hoch	Alox12	Arachidonate 12-lipoxygenase
5,2	hoch		RIKEN cDNA 1200007D18 gene
5,2	hoch	Ddt	D-dopachrome tautomerase
5,1	hoch	Slc39a9	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 9
5,1	hoch		RIKEN cDNA 2410001C21 gene
5,1	hoch	Nxt1	NTF2-related export protein 1
5,1	hoch	Pcolce	Procollagen C-proteinase enhancer protein
5,0	hoch	Fkbp9	FK506 binding protein 9
5,0	hoch	Phf7	PHD finger protein 7
5,0	hoch	Mme	Membrane metallo endopeptidase
4,9	hoch		RIKEN cDNA 2610001E17 gene
4,9	hoch	Kcnn1	RIKEN cDNA A230052G05 gene
4,9	hoch	Ncbp2	Nuclear cap binding protein subunit 2
4,9	hoch	Pkhd1	RIKEN cDNA 4930486I03 gene
4,9	hoch		DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 721, expressed
4,9	hoch	Melk	Maternal embryonic leucine zipper kinase
4,8	hoch	Nckap1	NCK-associated protein 1
4,8	hoch		RIKEN cDNA 4930422I07 gene

4,8	hoch		RIKEN cDNA 2310036D04 gene
4,7	hoch	Vps45	Vacuolar protein sorting 45 (yeast)
4,7	hoch	Gtpbp4	GTP binding protein 4
4,7	hoch		RIKEN cDNA 1700020I14 gene
4,6	hoch	Tdrkh	Tudor and KH domain containing protein
4,6	hoch		Transcribed locus, moderately similar to NP_001001306.1 hypothetical protein D030034H08 [Mus musculus]
4,6	hoch	Frk	Fyn-related kinase
4,6	hoch	Fem1c	Fem-1 homolog c (C.elegans)
4,5	hoch	Ccni	Cyclin I
4,5	hoch		Jagunal homolog 1 (Drosophila)
4,5	hoch	Cacna2d3	Calcium channel, voltage dependent, alpha2/delta subunit 3
4,5	hoch	Arf6	ADP-ribosylation factor 6
4,4	hoch		Transcribed locus, moderately similar to XP_485237.1 similar to RIKEN cDNA 1700020M10 [Mus musculus]
4,4	hoch	Nsfl1c	NSFL1 (p97) cofactor (p47)
4,4	hoch	Stam2	Signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2
4,4	hoch	Slc6a6	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 6
4,4	hoch	Dmx12	Dmx-like 2
4,4	hoch	Odag	Ocular development associated gene
4,4	hoch	Metap2	Methionine aminopeptidase 2
4,4	hoch	Slc4a4	Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4
4,4	hoch	Pamci	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase COOH-terminal interactor
4,4	hoch	Rab6ip1	Rab6 interacting protein 1
4,4	hoch	Agtr2	Angiotensin II receptor, type 2
4,4	hoch	Mki67ip	Mki67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein
4,4	hoch		RIKEN cDNA A730091E08 gene
4,4	hoch	Rqcd1	Ubiquitin specific protease 37
4,3	hoch	Satb1	Special AT-rich sequence binding protein 1
4,3	hoch	Ppil3	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3
4,3	hoch		RIKEN cDNA C130032J12 gene
4,3	hoch		RIKEN cDNA 2810427I04 gene
4,3	hoch		RIKEN cDNA 1110019J04 gene
4,2	hoch	Rab11a	RAB11a, member RAS oncogene family
4,2	hoch	Hdc	Histidine decarboxylase
4,2	hoch		RIKEN cDNA 1110018G07 gene
4,2	hoch	Spred1	Sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence
4,2	hoch		DNA segment, Chr 17, ERATO Doi 657, expressed
4,2	hoch	Btbd9	BTB (POZ) domain containing 9
4,2	hoch	Dpysl5	Dihydropyrimidinase-like 5
4,2	hoch		RIKEN cDNA 1110067M05 gene
4,2	hoch	Ppp2r4	Protein phosphatase 2A, regulatory subunit B (PR 53)
4,2	hoch	Gtf2i	RIKEN cDNA 6030441I21 gene
4,2	hoch	Tbc1d15	TBC1 domain family, member 15
4,1	hoch	Smurf2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
4,1	hoch	Kdelr2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2
4,1	hoch		RIKEN cDNA 2410002F23 gene
4,1	hoch	Adrbk2	Adrenergic receptor kinase, beta 2
4,1	hoch	Nth11	Nth (endonuclease III)-like 1 (E.coli)
4,1	hoch	Ogdh	Oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)
4,1	hoch	Csnk1a1	Casein kinase 1, alpha 1
4,0	hoch	Efhd2	EF hand domain containing 2
4,0	hoch	Got1	Glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble
4,0	hoch		Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)
4,0	hoch		RIKEN cDNA D230014K01 gene
4,0	hoch	Efemp2	Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2

4,0	hoch		RIKEN cDNA 2510001I10 gene
4,0	hoch	Rora	RAR-related orphan receptor alpha
4,0	hoch	Hspa9a	RIKEN cDNA D330004O07 gene
4,0	hoch	Nmt2	N-myristoyltransferase 2
4,0	hoch	Esr1	Estrogen receptor 1 (alpha)
4,0	hoch	Maea	Macrophage erythroblast attacher
4,0	hoch		RIKEN cDNA 3110023E09 gene
3,9	hoch	Rragc	RIKEN cDNA 4930535I16 gene
3,9	hoch		RIKEN cDNA D130059P03 gene
3,9	hoch	Lgals1	Lectin, galactose binding, soluble 1
3,9	hoch	Rnf38	Ring finger protein 38
3,9	hoch	Za20d3	Zinc finger, A20 domain containing 3
3,9	hoch		RIKEN cDNA 2810012H18 gene
3,9	hoch		RIKEN cDNA 2900010M23 gene
3,9	hoch		Similar to RIKEN cDNA E130308A19
3,8	hoch	Homer1	Homer homolog 1 (Drosophila)
3,8	hoch	Dlgap4	Discs, large homolog-associated protein 4 (Drosophila)
3,8	hoch	Diablo	Diablo homolog (Drosophila)
3,8	hoch	Ccn1	Cyclin L1
3,8	hoch		RIKEN cDNA 1700021C14 gene
3,8	hoch		RIKEN cDNA 2310036D04 gene
3,8	hoch	Ches1	Expressed sequence AU017263
3,8	hoch		DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 300, expressed
3,8	hoch	Pea15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15
3,8	hoch	Rnf103	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 5
3,8	hoch	Mt2	Metallothionein 2
3,8	hoch	Klf3	Krhochpel-like factor 3 (basic)
3,8	hoch	Bgn	Biglycan
3,7	hoch	Trim44	Tripartite motif-containing 44
3,7	hoch		RIKEN cDNA 1200009K13 gene
3,7	hoch		Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)
3,7	hoch	Nlgn1	RIKEN cDNA A830010M09 gene
3,7	hoch	Ankib1	Ankyrin repeat and IBR domain containing 1
3,7	hoch	Irak1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
3,7	hoch	Slc25a3	Solute carrier family 25, member 3
3,7	hoch	Ube2s	Ubiquitin-conjugating enzyme E2S
3,7	hoch	Tomm34	Translocase of outer mitochondrial membrane 34
3,7	hoch	Trim41	Tripartite motif-containing 41
3,7	hoch	Tubb5	Tubulin, beta 5
3,7	hoch	Syncrip	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein
3,7	hoch	Tom112	Target of myb1-like 2 (chicken)
3,7	hoch	Osbp19	Oxysterol binding protein-like 9
3,7	hoch	B4galt7	Xylosylprotein beta1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I)
3,7	hoch		Similar to hypothetical protein FLJ20265
3,7	hoch	Sertad2	SERTA domain containing 2
3,7	hoch	Bnip31	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3-like
3,6	hoch	Xpo7	Exportin 7
3,6	hoch	Ube213	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3
3,6	hoch		RIKEN cDNA 1110004P21 gene
3,6	hoch		RIKEN cDNA D930015E06 gene
3,6	hoch	Ppp2r2a	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform
3,6	hoch		Transcribed locus, strongly similar to XP_545397.1 similar to histone 1, H3g [Canis familiaris]
3,6	hoch	Zdhhc21	RIKEN cDNA D130004H04 gene
3,6	hoch	Cdh2	Cadherin 2
3,6	hoch	Lrrtm3	Leucine rich repeat transmembrane neuronal 3
3,6	hoch	Icosl	Icos ligand

3,6	hoch	H1f0	H1 histone family, member 0
3,6	hoch	Pgm211	Phosphoglucomutase 2-like 1
3,6	hoch	Skiv21	Shoherkiller viralicidic activity 2-like (S. cerevisiae )
3,6	hoch	Bysl	Bystin-like
3,6	hoch		RIKEN cDNA B930094H20 gene
3,6	hoch	Mid1ip1	Mid1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12-like (zebrafish))
3,6	hoch	Gtl7	Gene trap locus 7
3,5	hoch	Rab1b	RAB1B, member RAS oncogene family
3,5	hoch	Il18bp	Interleukin 18 binding protein
3,5	hoch		DNA segment, Chr 1, Brigham & Women's Genetics 0212 expressed
3,5	hoch	Taz	Tafazzin
3,5	hoch	Slc31a1	Solute carrier family 31, member 1
3,5	hoch	Gss	Glutathione synthetase
3,5	hoch	H2-Ke6	H2-K region expressed gene 6
3,5	hoch	Fnbp4	Formin binding protein 4
3,5	hoch	Tnxb	Tenascin XB
3,5	hoch	Krt1-18	Keratin complex 1, acidic, gene 18
3,5	hoch		Transcribed locus, strongly similar to NP_001001306.1 hypothetical protein D030034H08 [Mus musculus]
3,5	hoch	Tcfcp211	Transcription factor CP2-like 1
3,5	hoch	Gpr22	G protein-coupled receptor 22

### 8.3 *Lebenslauf*

#### **Persönliche Daten**

Nicole Forster  
geb. am 14.11.1979 in Königs-Wusterhausen  
ledig

#### **Schulbildung**

August 1986 bis Juli 1992      Grundschule Storkow  
August 1992 bis Juli 1999      Gymnasium Beeskow  
Abschluss: Abitur

#### **Hochschulbildung**

Oktober 1999 bis September 2001      Grundstudium Biologie  
Technische Universität Darmstadt  
Abschluss: Vordiplom

Oktober 2001 bis November 2004      Hauptstudium Biologie  
Technische Universität Darmstadt  
Abschluss: Diplom

April 2004 bis November 2004      Diplomarbeit auf dem Gebiet der Genetik  
Technische Universität Darmstadt  
Institut für Mikrobiologie und Genetik  
Betreuung: Prof. Dr. H.-Ulrich Göringer  
Thema: „Ribosemodifikationen erhöhen die Serumstabilität von Trypanosomen-spezifischen RNA-Aptameren - eine Struktur-/Funktionsuntersuchung“

seit Dezember 2004      Promotionsarbeit in der Humanbiologie  
Philipps-Universität Marburg  
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
Labor von Prof. Dr. Martin Eilers  
Betreuung: PD Dr. Werner Lutz  
Thema: „Die p300 Protein Acetyltransferaseaktivität supprimiert eine dem humanen Systemischen Lupus Erythematosus ähnliche Autoimmunerkrankung in Mäusen“

#### **8.4 *Akademische Lehrer***

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Darmstadt:

Böhm, Buschinger, Dancker, Engelkamp, Gassen, Giersch, Gmeiner, Göringer, Hesch, Himstedt, Holstein, Homann, Ipsen, Kletzin, Klock, Klose, Kluge, Kostron, Kraft, Langner, Layer, Lindner, Loch, Lüttge, Nixdorff, Oeschler, Poser, Pfeifer, Scheu, Schleper, Schwabe-Kratochwil, Seelig, Thiel, Veith, Walhäuser-Franke, Wegmann, Wiegand, Wirth, Wollenweber, Wollny

In Marburg:

M. Eilers, W. Lutz

## 8.5 *Ehrenwörtliche Erklärung*

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich meine dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Die p300 Protein Acetyltransferaseaktivität supprimiert  
eine dem humanen Systemischen Lupus Erythematosus ähnliche  
Autoimmunerkrankung in Mäusen**

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn PD Dr. Werner Lutz (ehemals Fachbereich Medizin) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde wie folgt veröffentlicht:

### **Originalarbeit:**

Forster N., Gallinat S., Jablonska J., Weiss S., Elsässer H.-P., Lutz W. (2007): p300 protein acetyltransferase activity suppresses systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in mice. **The Journal of Immunology**, 178, 6941-6948.

### **Kongressbeiträge:**

Biology of B Lymphocytes (4<sup>th</sup> German B Cell Forum), März 2006, Kloster Banz

### **Poster:**

**Forster N., Gallinat S., Elsässer H.-P., and Lutz W.: p300 protein acetyltransferase activity suppresses SLE-like autoimmune disease in mice.**



7<sup>th</sup> Transcription Meeting (EMBL), September 2006, Heidelberg

**Poster:**

**Forster N., Gallinat S., Jablonska J., Weiss S., Elsässer H.-P., and Lutz W.: p300 protein acetyltransferase activity suppresses SLE-like autoimmune disease in mice.**

Chromatin Mediated Biological Decisions, Oktober 2006, Marburg

**Poster:**

**Forster N., Gallinat S., Jablonska J., Weiss S., Elsässer H.-P., and Lutz W.: p300 protein acetyltransferase-activity suppresses SLE-like autoimmune disease in mice.**

Nicole Forster

Marburg, den 06. August 2008

## 8.6 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zunächst möchte ich PD Dr. Werner Lutz danken, der mir die Chance ermöglichte, diese überaus interessante Doktorarbeit anzufertigen und mich nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch betreute. Mein weiterer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Eilers für die Begutachtung dieser Arbeit und dafür, dass er für Gespräche und Diskussionen immer ein offenes Ohr hatte. Meinen Thesis Komitee-Mitgliedern Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer und Prof. Dr. Stefan Bauer danke ich für die wertvollen Ratschläge, insbesondere Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer zusammen mit Prof. Dr. Peter Barth für die Hilfen bezüglich der komplexen Histologie der Mausorgane.

Für die Vorarbeiten zur Untersuchung der Mäuse und die Einweisung in die Mauspräparation möchte ich Sven Gallinat und Werner Lutz danken. Den Labor 117 Mädels Anja Feuer, Barbara Herkert und Katrin Nowak danke ich besonders für die sehr schön gestaltete Zeit des Laboralltags sowie der übrig gebliebenen Freizeit und dafür, dass sie immer, wenn sie Zeit fanden, mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Bei Katrin Nowak möchte ich mich außerdem für das hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit und bei Tobias Otto für die Urlaubsvertretung bezüglich der „Mäusebeobachtung“ bedanken. Caroline Bouchard und Jean-Francois Naud danke ich außerdem für die Korrektur meines *English Summary*.

Zusätzlich möchte ich speziell Antje Grzeschiczek für die zahlreiche Mausearbeit und Waltraud Ackermann für die Hilfe in der Bearbeitung der Organe für histologische Färbungen danken. Des Weiteren danke ich der AG Krause für die Hilfe beim Microarray, besonders Birgit Samans für die liebevolle Auswertung des Arrays, und zusätzlich Bärbel Casper für die Erklärungen bezüglich der Durchführung eines ELISA. Ein großer Dank geht an alle ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der Arbeitsgruppen Lutz, Eilers, Bauer und Gaubatz, die die zahlreichen Stunden im IMT angenehm gemacht haben, wodurch mir die Arbeit viel Spaß bereitete.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Freund Thomas für die persönliche „Betreuung“ sowie Aufheiterung in nicht so erfolgreichen Zeiten und die zahlreiche Hilfe in sowohl privater als auch wissenschaftlicher Hinsicht. Ebenso danke ich seinen Eltern für die Rechtschreibkontrolle meiner Arbeit.

Meiner Mutti Ines und meinen Geschwistern Andre und Andrea möchte ich für ihre ständig liebevolle Unterstützung und Hilfe in allerlei Hinsicht danken.