
Die Rolle
der *Checkpoint*-Kinase 1
in der Immunglobulin-Diversifizierung

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

vorgelegt von
Samantha Frankenberger
aus Dachau

angefertigt am
Helmholtz Zentrum für Gesundheit und Umwelt München,
Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik

München, 28.02.2013

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Berit Jungnickel

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2013

Gewidmet meiner Familie.

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden wie folgt veröffentlicht:

Chk1 negatively regulates somatic hypermutation

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

Publikation; Manuskript eingereicht

A critical role for p53 in the germinal center reaction

Braunschmidt K., Kritsch D., Frankenberger S., Fischer-Burkart S., Böttcher K., Küppers R., Kosan C., Zimmer-Strobl U., Jungnickel B.

Publikation; in Revision, Journal of Immunology

Die Arbeit wurde bzw. wird auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

Checkpoint signalling in Ig diversification

Frankenberger S., Braunschmidt K., Davari K., Fischer-Burkart S., Zimmer-Strobl U., Jungnickel B.

Poster; 10. B-Zellforum, Bad Staffelstein, 2012

The role of checkpoint kinase 1 in Ig diversification

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

Poster; Keystone-Symposium, Banff, Kanada, 2013

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ZUSAMMENFASSUNG	XI
SUMMARY	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die adaptive Immunantwort.....	1
1.2 Struktur und Aufbau des Antikörpermoleküls	3
1.3 Die primären und sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen während der B-Zellentwicklung.....	3
1.3.1 Die primären Ig-Diversifizierungsmechanismen	3
1.3.2 Die sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen.....	4
1.3.3 Der molekulare Hintergrund der sekundären Ig-Diversifizierungs- mechanismen.....	5
1.3.4 Besonderheiten der Ig-Diversifizierungsmechanismen in <i>Gallus gallus</i> (Haushuhn)	8
1.4 Regulationsmechanismen der somatischen Hypermutation	9
1.4.1 Zeitliche Begrenzung der somatischen Hypermutation während der Keimzentrumsreaktion	9
1.4.2 Regulation der AID-Expression durch transkriptionelle und post- transkriptionelle Mechanismen.....	11
1.4.3 Regulation der AID-Aktivität durch Kompartimentalisierung und Phosphorylierung	11
1.4.4 Regulation der AID-Spezifität durch bevorzugte Rekrutierung an die <i>Ig</i> - Loci.....	12
1.4.5 B-Zelllymphome – eine mögliche Konsequenz fehlgeleiteter AID-Aktivität	12
1.4.6 Regulation der somatischen Hypermutation durch fehlerfreie und fehlerbehaftete Reparaturmechanismen.....	13
1.4.6.1 Der Rad6-Weg – ein Schaltbrett für Mechanismen der DNA- Schadensumgehung mit divergierender Fehlerrate	13

1.4.6.2	Die homologe Rekombinationsreparatur – ein fehlerfreier Schutzmechanismus gegen AID-induzierte Doppelstrangbrüche..	14
1.5	Die <i>Checkpoint</i>-Kinase 1 – ein möglicher Regulator der somatischen Hypermutation?	15
1.5.1	Einführung in die Funktionsweise der Zellzykluskontrollpunkte.....	15
1.5.2	Die multiplen Funktionen der <i>Checkpoint</i> -Kinase 1 in den Zellzykluskontrollpunkten	16
1.5.3	Verbindungspunkte zwischen der <i>Checkpoint</i> -Kinase 1 und der somatischen Hypermutation	17
1.5.3.1	Hinweise für eine Verbindung zwischen der <i>Checkpoint</i> -Kinase 1 und der somatischen Hypermutation	18
1.5.3.2	Die vielfältigen Funktionen der <i>Checkpoint</i> -Kinase 1 in der Regulation der DNA-Reparatur	18
1.6	Zielsetzung der Arbeit	21
2	ERGEBNISSE	22
2.1	Einfluss von Chk1-Inhibitoren auf die somatische Hypermutation in einer humanen B-Lymphomzelllinie	22
2.1.1	Inhibition der <i>Checkpoint</i> -Kinase 1 in der humanen B-Lymphomzelllinie Raji	22
2.1.2	Funktionsweise des Reportersystems zur Messung der somatischen Hypermutation	23
2.1.3	Chk1-Inhibition führt zu einer erhöhten somatischen Hypermutationsaktivität	25
2.1.4	Die Chk1-Inhibitoren beeinflussen in den eingesetzten Konzentrationen die zelluläre Vitalität kaum.....	25
2.1.5	Die Chk1-Inhibitoren beeinflussen in den eingesetzten Konzentrationen die Proliferation nicht.....	26
2.1.6	Die Chk1-Inhibitoren hemmen Chk1 während der somatischen Hypermutationsmessung.....	27
2.2	Analyse der <i>Chk1</i>- und <i>p53</i>-Expression in Keimzentrums-B-Zellen von <i>Mus musculus</i>	28
2.2.1	<i>Chk1</i> wird in Keimzentrums-B-Zellen von <i>M. musculus</i> hoch exprimiert..	28
2.2.2	<i>p53</i> -mRNA wird in Keimzentrums-B-Zellen von <i>M. musculus</i> trotz vorhandener <i>Bcl6</i> -mRNA-Expression gebildet.....	30
2.3	<i>Chk1</i>-Depletion in der Hühner-B-Lymphomzelllinie DT40	31

2.3.1	Die DT40-Zelllinie als Modellsystem zur Untersuchung der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion	31
2.3.2	<i>Chk1</i> -Depletion in der DT40Cre1- und DT40ΨV ⁻ -Zelllinie	33
2.3.2.1	Hinweise auf mehr als zwei <i>Chk1</i> -Allele in der DT40ΨV ⁻ -Zelllinie.	33
2.3.2.2	Hinweise auf mehr als zwei <i>Chk1</i> -Allele in der DT40Cre1-Zelllinie	34
2.3.2.3	Versuche zur vollständigen Inaktivierung der <i>Chk1</i> -Expression in den DT40ΨV ⁻ - und DT40Cre1-Zelllinien	37
2.4	DT40-Zelllinien mit zwei mutierten <i>Chk1</i>-Allelen zeigen eine Beeinträchtigung der Chk1-Funktion.....	38
2.5	Rekonstitution der DT40 <i>Chk1</i>^{+/+/-}-Zelllinien und Analyse der Proliferationsrate	40
2.6	Untersuchung der somatischen Hypermutation in <i>Chk1</i>-depletierten DT40ΨV⁻-Zelllinien	42
2.6.1	<i>Chk1</i> -depletierte DT40ΨV ⁻ -Zelllinien weisen eine erhöhte somatische Hypermutationsrate auf	42
2.6.2	Die Erhöhung der somatischen Hypermutation in den DT40ΨV ⁻ <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien wird nicht durch ein erhöhtes AID-Proteinlevel hervorgerufen	45
2.6.3	Die Erhöhung des Anteils an IgM-negativen Zellen in den DT40ΨV ⁻ <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien ist AID-abhängig	48
2.6.4	Sequenzanalyse des λ-Locus der leichten Ig-Kette	48
2.6.4.1	Die DT40ΨV ⁻ <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinie weist eine höhere Anzahl an Mutationen im <i>Ig_L</i> -Locus auf	49
2.6.4.2	Die DT40ΨV ⁻ <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinie weist ein verändertes Mutationsmuster im <i>Ig_L</i> -Locus auf	52
2.7	Die DT40 <i>Chk1</i>^{+/+/-}-Zelllinien zeigen geringfügig herabgesetzte Targeting-Effizienzen.....	53
2.8	Untersuchung der Ig-Genkonversionsaktivität in DT40Cre1 <i>Chk1</i>^{+/+/-}-Zelllinien	54
2.8.1	DT40Cre1 <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien generieren einen geringeren Anteil an IgM-positiven Zellen	55
2.8.2	DT40Cre1 <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien weisen eine herabgesetzte Ig-Genkonversionsaktivität auf	57
3	DISKUSSION	62
3.1	<i>Chk1</i> -Expression in Keimzentrums-B-Zellen	62
3.2	<i>Chk1</i> -Expression in B-Zelllymphomen	64

3.3	<i>Chk1</i>-Expression in der DT40-B-Lymphomzelllinie.....	65
3.4	Erhöhung der somatischen Hypermuation bei <i>Chk1</i>-Inhibition und -Depletion	66
3.4.1	Erhöhung der somatischen Hypermuation bei <i>Chk1</i> -Inhibition.....	66
3.4.2	Erhöhung der somatischen Hypermuation bei <i>Chk1</i> -Depletion	68
3.5	Ist die negative Regulation der somatischen Hypermuation eine generelle Eigenschaft der DNA-Schadensantwort?	68
3.6	Mögliche Funktionsweise von <i>Chk1</i> in der somatischen Hypermuation	70
3.6.1	<i>AID</i> -Expression	70
3.6.2	<i>AID</i> -Aktivität	71
3.6.3	<i>AID</i> -Substrat-Vorkommen.....	71
3.6.4	Zellzyklus	72
3.6.5	Reparaturmechanismen.....	73
3.6.5.1	Direkte Replikation über das Uracil.....	73
3.6.5.2	Basenexzisionsreparatur	74
3.6.5.3	Transläsionssynthese	74
3.6.5.4	Homologe Rekombinationsreparatur	75
3.7	Modell für die mechanistische Funktionsweise von <i>Chk1</i> in der Regulation der somatischen Hypermuation und Ig-Genkonversion ...	77
3.8	Bedeutung der Resultate für die Rolle von <i>Chk1</i> in B-Zelllymphomen	78
3.9	Ausblick.....	79
4	ANHANG	81
5	MATERIAL UND METHODEN.....	85
5.1	MATERIAL	85
5.1.1	Geräte.....	85
5.1.2	Chemikalien, Inhibitoren und Enzyme	86
5.1.2.1	DNA-schädigende Substanzen.....	86
5.1.2.1.1	Cisplatin	86
5.1.2.1.2	MMS.....	87
5.1.2.2	Inhibitoren	87
5.1.2.2.1	UCN-01 (<i>Chk1</i> -Inhibitor)	87

5.1.2.2.2 TCS 2312 (Chk1-Inhibitor)	87
5.1.2.3 Enzyme	88
5.1.3 Kits	88
5.1.4 Längenmarker	88
5.1.5 Antikörper	89
5.1.6 Oligonukleotide	90
5.1.7 Plasmide	92
5.1.7.1 pSHM-SV	92
5.1.7.2 pAK6	92
5.1.7.3 <i>Chk1-Targeting</i> -Vektoren	92
5.1.7.4 <i>Chk1</i> -Rekonstitutionsvektor	93
5.1.7.5 <i>AID</i> -Rekonstitutionsvektoren	93
5.1.7.6 <i>RDM1-Targeting</i> -Vektor	93
5.1.7.7 <i>Rad18-Targeting</i> -Vektor	94
5.1.8 Bakterien	94
5.1.9 Zelllinien	94
5.1.9.1 Raji-Zelllinie	94
5.1.9.2 DT40-Zelllinie	94
5.1.10 Mausstamm	95
5.1.11 Datenverarbeitung	95
5.2 METHODEN	96
5.2.1 Zellkultur	96
5.2.1.1 Bestimmung der Zelldichte	96
5.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	97
5.2.1.3 Transfektion von Zelllinien	97
5.2.1.3.1 Transfektion der Raji-Zelllinie	97
5.2.1.3.2 Transfektion der DT40-Zelllinie	97
5.2.1.4 Durchflusszytometrische Messung mit dem FACS-Gerät	99
5.2.1.5 Bestimmung der Hypermutationsaktivität in humanen B-Lymphomzelllinien	99
5.2.1.6 Bestimmung der Ig-Diversifizierungsaktivität der DT40-Zelllinie ..	100
5.2.1.6.1 Messung der somatischen Hypermutationsaktivität und Ig-Genkonversionsaktivität	100
5.2.1.6.2 Vorbereitung der DT40 Ψ V-Zelllinien für die Sequenzierung	101
5.2.1.6.3 Auswertung der Sequenzierung des <i>Ig_L</i> -Locus der DT40 Ψ V-Zelllinie	102
5.2.1.6.4 Vorbereitung der DT40Cre1-Zelllinien für die Sequenzierung	103

5.2.1.6.5	Auswertung der Sequenzierung des <i>Ig_L</i> -Locus der DT40Cre1-Zelllinie	103
5.2.1.7	Aktivierung der Cre-Rekombinase in DT40-Zellen	103
5.2.1.8	Bestimmung der Proliferationsrate.....	104
5.2.1.9	Induktion und Analyse der CDC25A-Degradation	105
5.2.1.10	Methylzellulose-Überlebensexperiment	105
5.2.2	Mausanalysen..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
5.2.2.1	Zellsortierung von Keimzentrums-B-Zellen und Nicht-Keimzentrums-B-Zellen der Maus	106
5.2.2.1.1	Immunisierung von Mäusen	106
5.2.2.1.2	Präparation der Milz-Zellen.....	107
5.2.2.1.3	Durchflusszytometrische Messung (FACS)	107
5.2.2.1.4	Zellsortierung	107
5.2.3	Techniken der DNA-Analyse.....	108
5.2.3.1	Isolierung von DNA	108
5.2.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	108
5.2.3.2.1	<i>Targeting</i> -PCR	108
5.2.3.2.2	PCR für die Herstellung des <i>Chk1</i> -Rekonstitutionsvektors... ..	109
5.2.3.3	Southern-Blot	109
5.2.3.4	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	110
5.2.3.5	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	111
5.2.3.6	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	111
5.2.3.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	111
5.2.3.8	Dephosphorylierung der Vektor-DNA	111
5.2.3.9	Ligation der DNA.....	112
5.2.3.10	Reinigung der DNA	112
5.2.4	Techniken der RNA-Analyse.....	112
5.2.4.1	RNA-Isolation.....	112
5.2.4.2	Erststrang cDNA-Synthese	112
5.2.4.3	Quantitative <i>Realtime</i> -PCR.....	112
5.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	114
5.2.5.1	Präparation von Proteinen aus Zellen.....	114
5.2.5.2	Proteinquantifizierung	114
5.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	115
5.2.5.4	Western-Blot-Analyse	116
5.2.5.5	Immundetektion von Proteinen	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	118
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	142

8 DANKSAGUNG.....	148
9 LEBENSLAUF.....	149
Ehrenwörtliche Versicherung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Erklärung	150

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Überblick über die Immunglobulindiversifizierungsmechanismen und den Aufbau des Antikörpermoleküls	2
Abbildung 1.2: Das Neuberger-Modell der somatischen Hypermutation (nach Di Noia und Neuberger ⁶)	7
Abbildung 1.3: Immunglobulindiversifizierungsmechanismen in <i>G. gallus</i> , dargestellt am Beispiel des <i>Ig_L</i> -Locus (nach Reynaud <i>et al.</i> ⁷²)	8
Abbildung 1.4: Die Funktionen von Chk1 in der homologen Rekombinationsreparatur	19
Abbildung 2.1: Messung der somatischen Hypermutationsaktivität in humanen B-Lymphomzelllinien	24
Abbildung 2.2: Erhöhte somatische Hypermutationsaktivität bei Chk1-Inhibition.....	26
Abbildung 2.3: Hohe <i>Chk1</i> -Expression in murinen Keimzentrums-B-Zellen	29
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des zellulären Hintergrunds der DT40Cre1- und DT40ΨV ⁻ -Zelllinien	32
Abbildung 2.5: Nachweis der Inaktivierung des 1. und 2. <i>Chk1</i> -Allels in der DT40ΨV ⁻ -Zelllinie.....	35
Abbildung 2.6: Nachweis der Inaktivierung des 1. und 2. <i>Chk1</i> -Allels in der DT40Cre1-Zelllinie.....	36
Abbildung 2.7: Nachweis der Inaktivierung des 3. <i>Chk1</i> -Allels in der DT40Cre1-Zelllinie	38
Abbildung 2.8: Beeinträchtigung der Chk1-Funktionalität nach Inaktivierung des 2. <i>Chk1</i> -Allels.....	40
Abbildung 2.9: Vergleichbare AID-Expression und ähnliche Proliferationsgeschwindigkeiten in den generierten DT40-Zellssets	41
Abbildung 2.10: Die DT40ΨV ⁻ -Zelllinie - Das Modellsystem zur Messung der somatischen Hypermutationsrate	43
Abbildung 2.11: Erhöhte somatische Hypermutationsrate in den DT40ΨV ⁻ <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien.....	44
Abbildung 2.12: Die erhöhte somatische Hypermutationsrate der DT40ΨV ⁻ <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien ist nicht auf einen Anstieg des AID-Proteinlevels zurückzuführen	47
Abbildung 2.13: Erhöhte Mutationsfrequenz und verändertes Mutationsmuster im λ-Locus der leichten Ig-Kette der DT40ΨV ⁻ <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien	50
Abbildung 2.14: Lokalisation der Mutationen im λ-Locus der leichten Ig-Kette der DT40ΨV ⁻ -Zelllinien	51
Abbildung 2.15: Stark vereinfachte Darstellung des Wettbewerbsmodells der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion.....	55
Abbildung 2.16: Die DT40Cre1-Zelllinie - Das Modellsystem zur Messung der Ig-Genkonversionsrate.....	56
Abbildung 2.17: Reduzierte Ig-Genkonversionsaktivität in den DT40Cre1 <i>Chk1</i> ^{+/+/-} -Zelllinien.....	57

Abbildung 2.18: Geringere Anzahl an Ig-Genkonversionsmutationen und erhöhte Anzahl an Punktmutationen in den DT40Cre1 Chk1 ^{+/-} -Zelllinien	59
Abbildung 2.19: Darstellung der einzelnen Sequenzen des <i>Ig_L</i> -Locus der DT40Cre1-Zelllinien.....	60
Abbildung 2.20: Tendenziell kürzere Genkonversionstrakte in DT40Cre1 Chk1 ^{+/-} -Zelllinien.....	61
Abbildung 3.1: Modell der <i>Chk1</i> -Regulation in Keimzentrums-B-Zellen.....	63
Abbildung 3.2: Modell für die Funktion von Chk1 in der Regulation der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion	78
Abbildung 4.1: Auswertung der Sequenzen des <i>λ</i> -Locus der leichten Ig-Kette mit ausschließlich einmal vorkommenden Mutationen (DT40ΨV ⁻ -Zelllinie)	81
Abbildung 4.2: Messung der somatischen Hypermutation in DT40ΨV ⁻ -Zelllinien nach Transfektion mit einem NES-deletierten <i>AID-GFP</i> -Transgen mit zusätzlicher Mutation an Serin 38.....	84

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: <i>Chk1-Targeting</i> -Effizienzen der DT40Cre1- und DT40ΨV-Zelllinien	37
Tabelle 2.2: <i>Rad18</i> - und <i>RDM1-Targeting</i> -Effizienzen der <i>Chk1^{+/+/+}</i> , <i>Chk1^{+/+/-}</i> und <i>Chk1^{+/-/-}</i> DT40-Zelllinien	54
Tabelle 4.1: Lokalisation der Mutationen im <i>Ig_{Lλ}</i> -Locus	82
Tabelle 4.2: Mutationsfrequenzen im <i>Ig_{Lλ}</i> -Locus der DT40Cre1-Zelllinien	83
Tabelle 5.1: Geräte	85
Tabelle 5.2: Chemikalien	86
Tabelle 5.3: Enzyme	88
Tabelle 5.4: Kits	88
Tabelle 5.5: Antikörper für Western-Blot-Analysen	89
Tabelle 5.6: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen und Zellsortierung	89
Tabelle 5.7: Oligonukleotide für quantitative RT-PCR-Reaktionen	90
Tabelle 5.8: Oligonukleotide für die Amplifikation der homologen Arme des <i>Chk1-Targeting</i> -Vektors	90
Tabelle 5.9: Oligonukleotide für die Sequenzierung des <i>Chk1-Targeting</i> -Vektors/ <i>Chk1</i> -Locus	90
Tabelle 5.10: Oligonukleotide für den Nachweis der gerichteten Integration des <i>Chk1-Targeting</i> -Vektors	91
Tabelle 5.11: Oligonukleotide für die Herstellung der Southern-Blot-Sonde	91
Tabelle 5.12: Oligonukleotide für die Herstellung des <i>Chk1</i> -Rekonstitutionsvektors ...	91
Tabelle 5.13: Oligonukleotide für den Nachweis der gerichteten Integration des <i>Rad18/RDM1-Targeting</i> -Vektors	91
Tabelle 5.14: Oligonukleotide für die Analyse des <i>λ</i> -Locus der leichten Ig-Kette	92
Tabelle 5.15: Datenverarbeitung	95
Tabelle 5.16: Konzentrationen der Selektionsreagenzien	98
Tabelle 5.17: PCR-Programm zur Amplifikation des <i>Ig</i> -Locus mit der <i>Phusion</i> -Polymerase	101
Tabelle 5.18: PCR-Programm für den Nachweis der gerichteten Integration eines <i>Targeting</i> -Vektors	108
Tabelle 5.19: PCR-Programm zur Amplifikation der kodierenden <i>Chk1</i> -Sequenz	109
Tabelle 5.20: Programm für die qRT-PCR-Analyse mit einem <i>LightCycler</i>	113

ZUSAMMENFASSUNG

Das Schlüsselenzym der sekundären Immunglobulin (Ig)-Diversifizierungsmechanismen ist die hochmutagene aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID). Nach neuesten Erkenntnissen induziert AID nicht nur im *Ig*-Locus, sondern zusätzlich genomweit DNA-Läsionen, die durch fehlerbehaftete DNA-Reparaturmechanismen zu Mutationen umgesetzt werden können. Bisher ist noch wenig bekannt, wie das mutagene Potenzial von AID eingeschränkt wird. Es gibt jedoch erste Hinweise, dass die Mutationsentstehung durch gezielte Regulation der fehlerbehafteten und fehlerfreien DNA-Reparaturmechanismen weitgehend auf den *Ig*-Locus begrenzt wird.

Checkpoint-Kinasen überwachen, kontrollieren und erhalten die genetische Stabilität zahlreicher Zelltypen. Aufgrund von Ergebnissen, die eine Wechselwirkung zwischen der AID-Aktivität und der *Checkpoint*-Kinase 1 (Chk1) implizieren, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, ob Chk1 an den Ig-Diversifizierungsmechanismen der B-Zellen beteiligt ist. In einer humanen B-Lymphomzelllinie wurde bei Chk1-Hemmung eine Erhöhung der somatischen Hypermutation nachgewiesen. Die *Chk1*-Depletion in DT40-Zellen, einem Modellsystem zur Untersuchung der Ig-Diversifizierung, führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Mutationsfrequenz im *Ig*-Locus, der durch *Chk1*-Rekonstitution wieder aufgehoben wurde.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass Chk1 die somatische Hypermutation negativ reguliert. Aus mechanistischer Sicht könnte Chk1 entweder auf Ebene der AID-Regulation oder auf Ebene der Reparaturmechanismen in die somatische Hypermutation eingreifen. Im Verlauf der Doktorarbeit wurde gezeigt, dass die AID-Expression und -Aktivität nicht entscheidend von Chk1 verändert wird. Die Rolle von Chk1 in der fehlerfreien Reparatur durch homologe Rekombination wurde u.a. durch Analyse der Ig-Genkonversionsaktivität näher untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, dass die *Chk1*-Depletion in DT40-Zellen zu einer signifikanten Herabsetzung der Ig-Genkonversionsereignisse, vermutlich durch eine eingeschränkte Funktionsweise der homologen Rekombination, führte.

Insgesamt betrachtet konnte gezeigt werden, dass Chk1 die somatische Hypermutationsrate anscheinend durch Aktivierung der fehlerfreien homologen Rekombinationsreparatur begrenzt. Chk1 könnte durch diese Funktion zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität in B-Zellen beitragen und somit die Entstehung von B-Zelllymphomen verhindern.

SUMMARY

The key enzyme of secondary immunoglobulin (Ig) diversification is the activation-induced cytidine deaminase (AID), which is highly mutagenic. According to latest research, AID introduces not only genetic alterations into *Ig* genes, but additionally induces genome-wide DNA lesions, which can be converted into mutations by error-prone repair mechanisms. So far, little is known about how the mutagenic potential of AID is limited. However, some studies suggest that the mutations are mainly restricted to the *Ig* locus by the targeted regulation of error-prone and error-free repair mechanisms.

Checkpoint kinases monitor, control and maintain the genetic stability of numerous cell types. Based on results implying an interplay between AID activity and the checkpoint kinase 1 (Chk1), in this study it was investigated whether Chk1 contributes to Ig diversification in B cells. Chk1 inhibition in a human B lymphoma cell line induced an increase in somatic hypermutation. A significant rise in mutation frequency in the *Ig* locus was also observed in *Chk1*-depleted DT40 cells, a model system for the investigation of Ig diversification. These findings were further corroborated by *Chk1*-reconstitution in DT40 cells which restored the wild type level of somatic hypermutation.

These results indicate that Chk1 negatively regulates somatic hypermutation. From a mechanistic point of view, Chk1 might interfere with somatic hypermutation at the stage of regulation of AID or of the repair mechanisms. In the course of this study it was observed that AID expression and activity were not changed substantially by Chk1. The role of Chk1 in error-free repair by homologous recombination was analysed for example by investigating Ig gene conversion. It was demonstrated that *Chk1*-depletion in DT40 cells led to a significant reduction of Ig gene conversion events, presumably due to limited promotion of homologous recombination.

All in all, it could be shown that Chk1 restricts the somatic hypermutation rate, apparently by activating the error-free homologous recombination repair pathway. By means of this function, Chk1 might contribute to the maintenance of genetic stability in B cells, thus preventing B cell lymphomagenesis.

1 EINLEITUNG

Die Zellen des adaptiven Immunsystems haben die einzigartige Eigenschaft pathogen-spezifische Rezeptoren auszubilden, deren Affinität sich im Verlauf der Immunantwort sogar weiter erhöhen kann. Die hohe Variabilität und Anpassungsfähigkeit der Rezeptoren beruhen jedoch auf risikobehafteten genetischen Veränderungen, wie der Einführung von Punktmutationen, Einzelstrangbrüchen und Doppelstrangbrüchen. Um die Aufrechterhaltung der genetischen Integrität während der adaptiven Immunantwort zu gewährleisten und die Entstehung von B-Zelllymphomen zu verhindern, sind deshalb strikte Regulationsmechanismen erforderlich.

1.1 Die adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort wird zum größten Teil durch zwei Zelltypen, die B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen), bestimmt¹. Das Hauptmerkmal dieser Zelltypen ist die Expression von Antigenrezeptoren mit einer einzigen Spezifität, die eine selektive Aktivierung der Zellen ermöglicht¹.

Die T-Lymphozyten werden anhand der Expression von Zelloberflächenproteinen, wie z.B. des CD4- und CD8-Moleküls, in verschiedene Untergruppen gegliedert². Die zytotoxischen CD8-T-Lymphozyten vernichten infizierte Körperzellen³, wohingegen die CD4-T-Lymphozyten sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems als auch spezifische B-Lymphozyten aktivieren, damit diese die Ursache der Infektion beseitigen⁴. Die aktivierten B-Zellen proliferieren in einem starken Ausmaß und differenzieren u.a. zu Plasmazellen, die den Antigenrezeptor nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimieren, sondern darauf spezialisiert sind, diesen in großen Mengen in löslicher Form als Antikörper zu sezernieren¹.

Antikörper sind ein essenzieller Bestandteil des adaptiven Immunsystems, da diese spezifisch an die Antigene derjenigen Pathogene binden, die zur Auslösung der Immunreaktion geführt haben¹. Die spezifische Bindung der Antikörper verhindert einerseits die Anheftung von Viren und mikrobiellen Toxinen an die Rezeptoren der Wirtszelle und aktiviert andererseits Mechanismen des angeborenen Immunsystems, die zur Eliminierung des Pathogens beitragen¹.

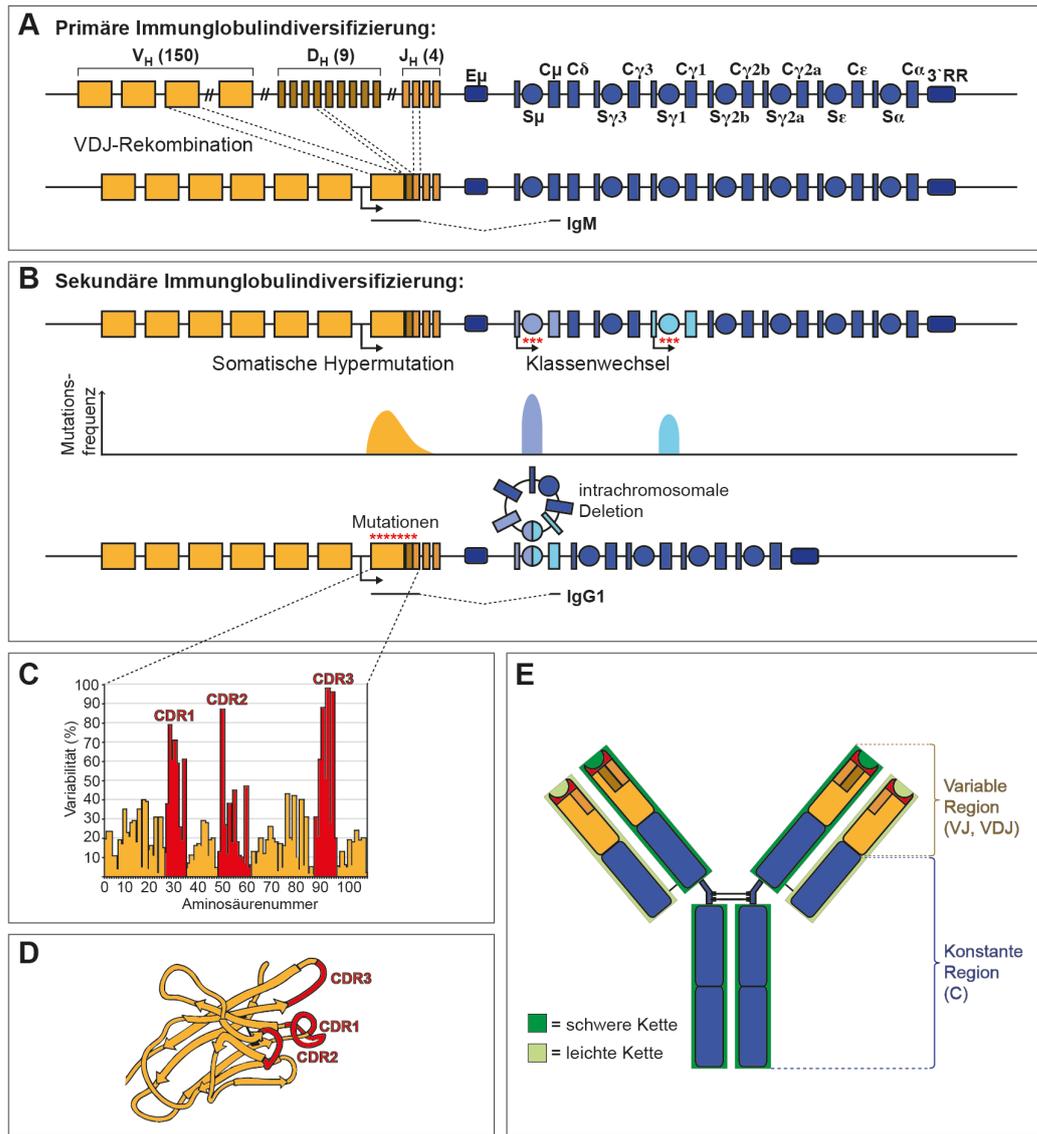


Abbildung 1.1: Überblick über die Immunglobulindiversifizierungsmechanismen und den Aufbau des Antikörpermoleküls

A. Vereinfachte Darstellung der primären Immunglobulin (Ig)-Diversifizierungsmechanismen des Ig_H -Locus von *Mus (M.) musculus* (nach Schatz und Ji⁵). Die VDJ-Rekombination führt im Ig -Locus der schweren Kette zur zufälligen Verbindung je eines V-, D- und J-Segments. Die ungefähre Anzahl der vorhandenen Gensegmente ist jeweils in den Klammern angegeben.

B. Vereinfachte Darstellung der sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen des Ig_H -Locus von *M. musculus* (nach Di Noia und Neuberger⁶). Sowohl die somatische Hypermutation (SHM) als auch der Klassenwechsel werden durch AID (*activation-induced cytidine deaminase*) initiiert. Bei SHM entstehen durch fehlerbehaftete Reparaturmechanismen Punktmutationen. Der Austausch der C-Segmente beim Klassenwechsel erfolgt durch nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) der eingeführten Doppelstrangbrüche und durch intrachromosomale Deletion des dazwischenliegenden Bereichs. Das Diagramm in der Mitte illustriert die Verteilung und Häufigkeit der Mutationen.

C. Darstellung der Aminosäurevariabilität innerhalb der variablen Domäne der leichten Ig-Kette (nach Lodish *et al.*⁷). Die CDRs (*complementary determining regions*) sind intrinsische Mutations-Hotspots und weisen aus diesem Grund eine hohe Aminosäurevariabilität auf.

D. Struktur der variablen Domäne der leichten Ig-Kette eines Antikörpermoleküls (nach Murphy *et al.*¹). Die CDRs befinden sich in Schleifenstrukturen in unmittelbarer Nähe zueinander und bilden die Antigenbindestelle aus.

E. Aufbau eines Antikörpermoleküls (nach Peled *et al.*⁸). Ein Antikörpermolekül besteht aus zwei identischen leichten (hellgrün) und zwei identischen schweren Polypeptidketten (dunkelgrün). Die variable Region (gelb) wird aus VJ- bzw. VDJ-Segmenten und die konstante Region (blau) aus einem C-Segment ausgebildet. Die Antigenbindestellen (CDRs) sind rot gekennzeichnet.

Abkürzungen: V, D, J, C: *variable-, diversity-, joining-, constant*-Segment; S: *switch*-Region; E: intronischer Enhancer; 3'RR: 3' regulatorische Region

1.2 Struktur und Aufbau des Antikörpermoleküls

Die Grundstruktur eines Antikörpermoleküls besteht aus vier Polypeptidketten, zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten, die eine symmetrische, durch Disulfidbrückenbindungen verknüpfte, Y-förmige Struktur ausbilden⁹ (Abbildung 1.1 E). Die höchste Diversität weisen drei hypervariable Bereiche (*complementary determining regions, CDRs*) in der variablen Region auf, die sich am aminoterminalen Ende des Moleküls befinden¹⁰ und in direkten Kontakt mit dem Antigen treten⁹ (Abbildung 1.1 C-E). Das carboxyterminale Ende, das als konstante Region bezeichnet wird, ist für definierte Effektorfunktionen zuständig und besitzt eine geringe Vielfalt⁹. Diese asymmetrische Verteilung der Diversität spiegelt sich auch auf genetischer Ebene wider⁹.

Die Polypeptidketten des Antikörpermoleküls sind in drei separaten *Immunglobulin (Ig)*-Loci kodiert, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden: der κ - und λ -Locus der leichten Kette, sowie der Locus der schweren Kette⁹. Jeder *Ig*-Locus ist aus verschiedenen Gensegmenten, den *variable* (V)-, *diversity* (D)-, *joining* (J)- und *constant* (C)-Segmenten, aufgebaut, wobei die Loci der leichten Kette keine D-Segmente enthalten⁹. Die V-, D- und J-Segmente kommen in hoher Anzahl vor und bilden die variable Region des Antikörpermoleküls, wohingegen eines der 8 C-Segmente für die Ausbildung der konstanten Region benötigt wird⁹ (Abbildung 1.1 A).

1.3 Die primären und sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen während der B-Zellentwicklung

Die Vielfalt der Pathogene sowie deren Fähigkeit zur Veränderung setzen eine außerordentlich hohe Variabilität der *Ig*-Gene voraus¹. Aufgrund der begrenzten Genomkapazität haben sich deshalb Mechanismen basierend auf Genumordnungen und der Einführung von Mutationen entwickelt, die zur Ausbildung von weit mehr als 10^{11} verschiedenen Antigenrezeptoren führen¹¹.

1.3.1 Die primären Ig-Diversifizierungsmechanismen

Die Entstehung des primären Antikörper-Repertoires beginnt ohne vorherigen Antigenkontakt in der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark mit dem Mechanismus der V(D)J-Rekombination^{12,13} (Abbildung 1.1 A). Hierbei erfolgt die Verbindung eines zufällig ausgewählten V_L - und J_L -Segments in den Loci der leichten

Kette bzw. eines V_H-, D_H- und J_H-Segments im Locus der schweren Kette^{12,13}. Reguliert wird dieser Prozess durch die Expression des lymphozytenspezifischen Rekombinase-Komplexes RAG1/2 (*recombination activating gene 1/2*), der durch die sequenzspezifische Einführung von Doppelstrangbrüchen die Rekombination der Gensegmente initiiert¹⁴⁻¹⁶ und die Rekrutierung von zahlreichen Enzymen der nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous end joining*; NHEJ) induziert¹⁷.

Zudem wird die Antikörpervielfalt, insbesondere in der hypervariablen CDR3-Region (Abbildung 1.1 C), beim Zusammenfügen der Gensegmente durch die Modifikation der Verbindungsstellen erhöht¹⁸. Dies erfolgt z.B. durch die Bildung palindromer Sequenzabschnitte (Palindromische Nukleotide, P-Nukleotide), das matrizenunabhängige Hinzufügen von Nukleotiden durch die Terminale deoxynukleotid-Transferase (TdT; Nicht-matrizenkodierte Nukleotide, N-Nukleotide), sowie durch die Entfernung von Nukleotiden durch Exonukleasen^{19,20}.

Zusätzlich wird die Variabilität der Antigenbindestelle, die aus der variablen Region einer leichten und einer schweren Kette ausgebildet wird, durch die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der beiden Polypeptidketten gesteigert⁹.

Nach erfolgreicher Umlagerung der V(D)J-Segmente verlassen die unreifen B-Zellen mit ihrem spezifischen Antigenrezeptor das Knochenmark und zirkulieren im Blut sowie dem lymphatischen Gewebe^{21,22}.

1.3.2 Die sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen

Falls die naiven B-Zellen in der Peripherie auf ein für den Antigenrezeptor passendes Antigen treffen und dabei eine zusätzliche Kostimulation von T-Zellen erhalten, werden die B-Zellen aktiviert²³. Infolgedessen bilden sich Keimzentren, in denen die sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen stattfinden (Abschnitt 1.4.1). Dabei wird das primäre Antikörper-Repertoire erweitert, indem u.a. in das umgeordnete V(D)J-Segment gezielt Mutationen eingeführt werden⁶ (Abbildung 1.1 B). Dieser als somatische Hypermutation (*somatic hypermutation*, SHM) bezeichnete Mechanismus führt in den *Ig*-Genen zu ca. 1 Mutation pro 1000 Basenpaaren pro Zelle pro Generation – einer bis zu 10⁶-fach gesteigerten Mutationsrate im Vergleich zum restlichen Genom – und erhöht dadurch in Koordination mit positiven sowie negativen Selektionsmechanismen die Antikörperaffinität zum Antigen^{24,25}. Die Mutationen beginnen 100-200 Basenpaare nach der Transkriptionsinitiationsstelle des V-Segments, nehmen in ihrer Häufigkeit im V(D)J-Exon rapide zu und zeigen nach 1,5-2 Kilobasen vor den regulatorischen Regionen des C-Segments eine exponentielle Abnahme²⁶⁻²⁸. Darüber hinaus treten die Mutationen bevorzugt in definierten Motiven

auf, wie z.B. im WRCY/RGYW-Motiv (W = Adenin/Thymin, R = Adenin/Guanin, C = Cytosin, G = Guanin und Y = Cytosin/Thymin)^{29,30}. Um eine besonders hohe Variabilität in den Antigenbindestellen zu erzeugen, passte sich der Codon-Gebrauch im Verlauf der Evolution an, so dass sich ein Großteil dieser Sequenzmotive in den CDR-Regionen befindet^{31,32}.

Ein weiterer sekundärer Ig-Diversifizierungsmechanismus, als Klassenwechsel (*class switch recombination*, CSR) bezeichnet, findet in der konstanten Region der *Ig*-Gene statt (Abbildung 1.1 B). Diese enthält 5 Haupt-C-Segmente (C μ -, C δ -, C γ -, C ϵ - und C α), von denen jeweils nur eines genutzt wird, um die Antikörperklasse (IgM, IgD, IgG, IgE oder IgA) festzulegen³³. Die Antikörperklassen, die auch als Isotypen bezeichnet werden, weisen eine unterschiedliche Verteilung im Gewebe auf und sind auf die Eliminierung bestimmter Pathogene spezialisiert³³. Je nach Ort der Infektion sowie der Art des Krankheitserregers kann ein definierter Klassenwechsel hervorgerufen werden³³. Auf molekularer Ebene erfolgt dies durch die Einführung von Doppelstrangbrüchen³⁴ und führt durch intrachromosomale Deletion zum Austausch des genutzten C-Segments³⁵.

1.3.3 Der molekulare Hintergrund der sekundären Ig-Diversifizierungsmechanismen

Auch wenn die sekundären Diversifizierungsmechanismen Unterschiede sowohl in Bezug auf die Lokalisation innerhalb der *Ig*-Gene als auch auf den Mechanismus aufweisen, führt eine Defizienz in einem einzigen Enzym – der aktivierungsinduzierten Cytidin-Deaminase AID (*activation-induced cytidine deaminase*) – zur vollständigen Abschaltung beider Prozesse³⁶⁻³⁸. Die katalytische Aktivität von AID führt zu einer Basenmodifikation – der Deaminierung von Cytosin zu Uracil –, die trotz der Sequenzhomologie von AID zu einer RNA-editierenden Deaminase (APOBEC1) an einzelsträngiger DNA (*single-stranded DNA*, ssDNA) erfolgt³⁹.

Obwohl AID eine Cytosin-Deaminase ist, werden *in vivo* bei der somatischen Hypermutation sowohl Mutationen an C:G- als auch A:T-Basenpaaren im gleichen Ausmaß erzeugt⁶. Zudem geht der Klassenwechsel von AID-initiierten Doppelstrangbrüchen aus⁴⁰. Diese Mutationsvariabilität ist besonders erstaunlich angesichts der Tatsache, dass Uracil gewöhnlich fehlerfrei durch die Basenexzisionsreparatur und die *Mismatch*-Reparatur entfernt und durch Cytosin ersetzt wird⁴¹⁻⁴³. Studien zahlreicher *Knockout*-Mäuse zeigten jedoch, dass die Basenexzisionsreparatur und die *Mismatch*-Reparatur in den *Ig*-Genen durch nicht-kanonische Mechanismen zu einer fehlerbehafteten Reparatur führen⁶. Aufschluss

darüber gibt das Modell von Neuberger, das darlegt, wie in den *Ig*-Genen durch die unterschiedliche Prozessierung der U:G-Basenpaare ein weites Spektrum an Mutationen entsteht⁶.

Die fehlerbehafteten Prozessierungsmechanismen der somatischen Hypermutation werden anhand dieser Erkenntnisse in drei Phasen eingeteilt (Abbildung 1.2). In den Phasen 1 a und 1 b entstehen hauptsächlich Mutationen an C:G-Basenpaaren, wobei Phase 1 a durch Transitionsmutationen und Phase 1 b durch Transitions- und Transversionsmutationen gekennzeichnet ist. In Phase 2 treten insbesondere Transitions- und Transversionsmutationen an A:T-Basenpaaren auf. Der molekulare Hintergrund wird im Folgenden erläutert:

- I. In Phase 1 a erfolgt eine direkte Replikation über das U:G-Basenpaar. Dabei entsteht aufgrund der Fehlpaarung von Uracil mit Adenin, abhängig davon auf welchem Strang sich das Uracil befindet, eine C→T- oder G→A-Transitionsmutation⁴⁴.
- II. In Phase 1 b wird das Uracil vor der Replikation durch die Uracil-DNA-Glykosylase 2 (UNG2), eine Komponente der Basenexzisionsreparatur, entfernt⁴⁵. Bei der konventionellen *short-patch*-Basenexzisionsreparatur wird im Folgenden die apurinische/apyrimidinische Endonuklease (APE) rekrutiert, die einen Einzelstrangbruch setzt⁴⁶. Diese DNA-Läsion wird im Anschluss durch die fehlerfrei prozessierende Polymerase β und weitere Enzyme repariert⁴⁶. In Phase 1 b der somatischen Hypermutation kommen stattdessen Transläsionspolymerasen (*translesion synthesis*, TLS-Polymerasen) APE-unabhängig zum Einsatz, die ein weitaus flexibleres aktives Zentrum aufweisen, jedoch als Konsequenz Nukleotide mit einer höheren Fehlerwahrscheinlichkeit einfügen^{6,47}. Hierbei nehmen die TLS-Polymerasen Rev1 und Pol ζ eine vorherrschende Rolle ein und erzeugen bei Replikation über abasische Stellen Transversionsmutationen an C:G-Basenpaaren⁴⁸⁻⁵¹. Die Beteiligung weiterer TLS-Polymerasen, wie Pol θ und ι, ist noch nicht vollständig geklärt⁵²⁻⁵⁵, wohingegen die Mitwirkung von Pol κ an der somatischen Hypermutation nahezu ausgeschlossen wurde⁵⁶⁻⁵⁸.
- III. Die Phase 2 der somatischen Hypermutation, die durch das Auftreten von Mutationen an A:T-Basenpaaren gekennzeichnet ist, ist in *Mut S Homolog 2/6* (MSH2/6)-defizienten Mäusen blockiert, die einen Defekt in der *Mismatch*-Reparatur aufweisen⁵⁹. Man geht davon aus, dass das Heterodimer MSH2/6 das fehlgepaarte U:G-Basenpaar in den *Ig*-Genen erkennt, das Uracil sowie umgebende Nukleotide durch die Exonuklease I entfernt werden⁶⁰ und die Nukleotide durch die fehlerbehaftete DNA-Synthese der TLS-Polymerase η ersetzt werden⁶¹⁻⁶³. Die Erzeugung von Mutationen an A:T-Basenpaaren spiegelt die

biochemische Eigenschaft der Pol η wider, u.a. bevorzugt ein Guanin gegenüber einem Thymin einzubauen⁶⁴.

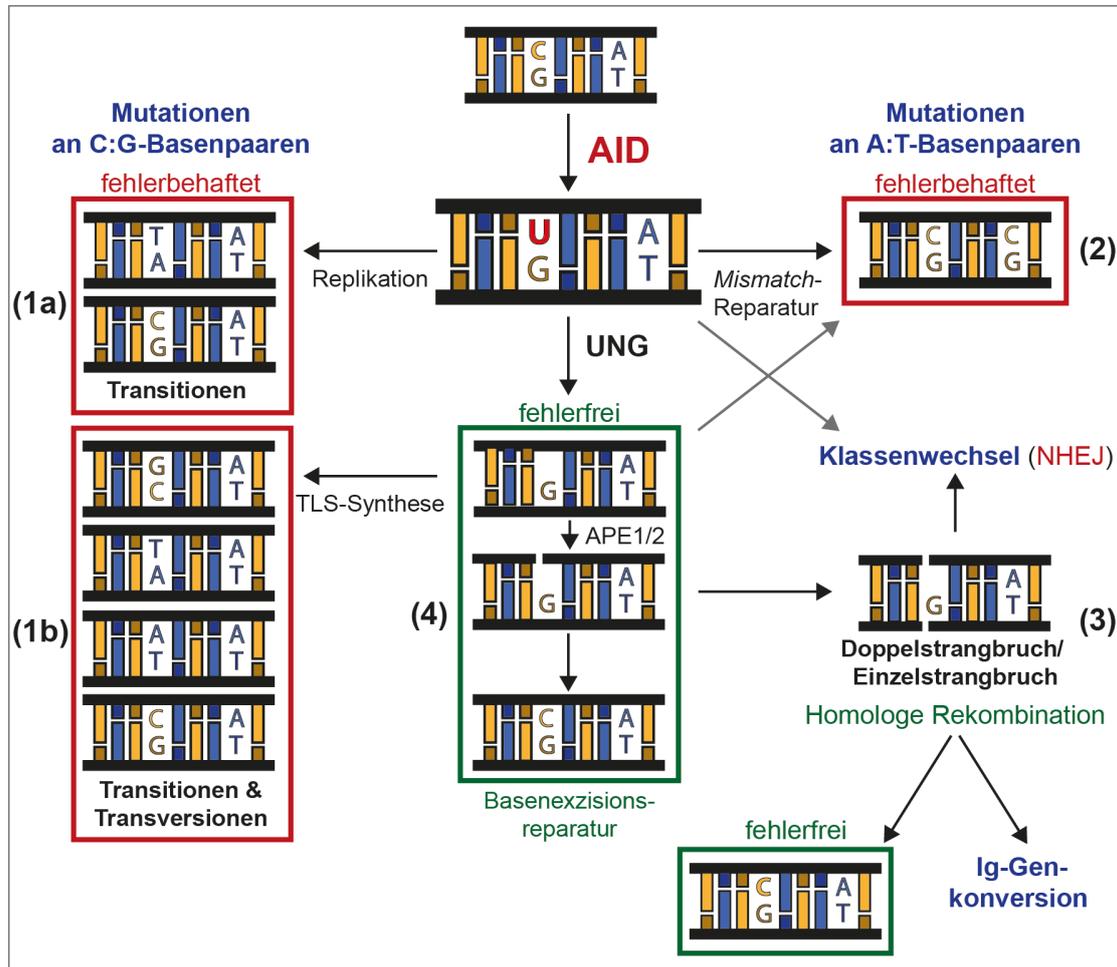


Abbildung 1.2: Das Neuberger-Modell der somatischen Hypermutation (nach Di Noia und Neuberger⁶)

Die Cytosin-Deaminase-Aktivität von AID führt zur Entstehung von Uracilen. Uracile werden gewöhnlich fehlerfrei durch die Basenexzisionsreparatur repariert (4). In den *Ig*-Genen entstehen jedoch durch fehlerbehaftete Reparaturmechanismen Mutationen: Durch die direkte Replikation über das Uracil (1a), die Entfernung des Uracils durch UNG und anschließende Translasionssynthese (TLS-Synthese) (1b) sowie durch die Prozessierung des Uracils durch Komponenten der *Mismatch*-Reparatur (2). (1a) und (1b) führen hauptsächlich zur Entstehung von Mutationen an C:G-Basenpaaren, wohingegen (2) durch Mutationen an A:T-Basenpaaren gekennzeichnet ist. Nach Inzision der abasischen Stelle durch APE1/2 entstehen Einzel- und Doppelstrangbrüche (3), die als initialer Ausgangspunkt für den Klassenwechsel (vermittelt durch die nicht-homologe Endverknüpfung; NHEJ) und die *Ig*-Genkonversion (vermittelt durch die homologe Rekombinationsreparatur; HR-Reparatur) dienen. Fehlerfreie Reparaturmechanismen sind grün gekennzeichnet, fehlerbehaftete rot.

Beim Klassenwechsel werden von UNG2 ebenfalls Uracile entfernt, die von AID vor den C-Segmenten in die sogenannten *Switch*-Regionen eingefügt wurden^{45,65}. Im Anschluss werden an den so erzeugten abasischen Stellen durch APE1/2 Einzelstrangbrüche eingeführt^{66,67}. Befinden sich die entstandenen Einzelstrangbrüche in räumlicher Nähe und auf gegenüberliegenden Strängen, kann es zur Ausbildung von Doppelstrangbrüchen kommen, die für die Einleitung der intrachromosomalen Deletion

benötigt werden³³. Es gibt aber auch Hinweise auf einen UNG-unabhängigen Weg über die *Mismatch-Reparatur*⁶⁸.

1.3.4 Besonderheiten der Ig-Diversifizierungsmechanismen in *Gallus gallus* (Haushuhn)

Die Ig-Diversifizierungsmechanismen V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation sind die Grundlage für die hohe Vielfalt der Antigenrezeptoren in Menschen und Mäusen. Andere Spezies wie z.B. Hühner, Hasen, Pferde, Schweine und Kühe weisen nur ein eingeschränktes V(D)J-Repertoire auf⁶⁹. In Hühner-B-Zellen enthalten die *Ig*-Loci der leichten und schweren Kette dementsprechend nur je ein funktionelles V- und J-Segment^{70,71} (Abbildung 1.3). Wenige Kilobasen stromaufwärts der funktionellen Segmente befinden sich jedoch 25 bzw. im Fall der schweren Kette 80 Pseudo-V-Segmente (Pseudogene, ΨV), die weder einen funktionellen Promotor noch V(D)J-Rekombinationssignalsequenzen aufweisen und deshalb von der V(D)J-Rekombination ausgeschlossen sind⁷¹⁻⁷³.

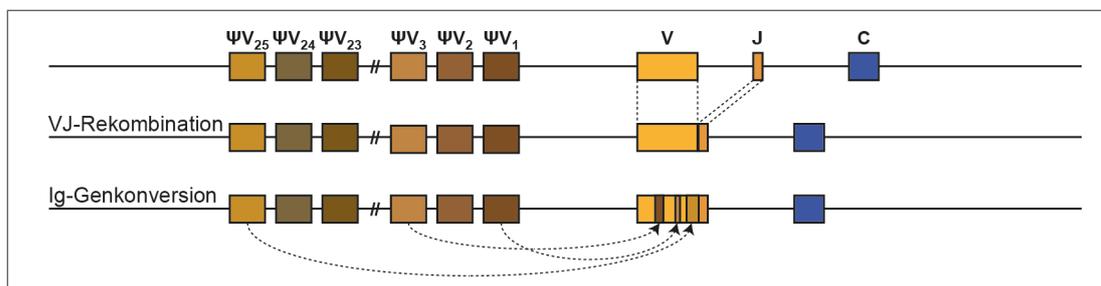


Abbildung 1.3: Immunglobulindiversifizierungsmechanismen in *G. gallus*, dargestellt am Beispiel des *Ig_L*-Locus (nach Reynaud *et al.*⁷²)

Der *Ig_L*-Locus der Hühner-B-Zellen weist nur jeweils 1 V- und J-Segment auf, die durch die VJ-Rekombination verbunden werden. 5' der VJ-Region befinden sich 25 V-Pseudogene (ΨV), deren Sequenzen durch unidirektionalen Gentransfer in die rearrangierte VJ-Region eingebracht werden können um eine höhere Immunglobulinvariabilität zu erreichen. Dieser Prozess wird als Ig-Genkonversion bezeichnet. Die somatische Hypermutation findet nur zu einem geringen Anteil statt.

Um eine hohe Variabilität in den Antigenbindestellen zu erzeugen, existiert in diesen Spezies ein weiterer, auf den Pseudogenen basierender Ig-Diversifizierungsmechanismus, die Ig-Genkonversion (*Ig gene conversion*, GC). Bei diesem Prozess erfolgen zahlreiche, aufeinanderfolgende Zyklen eines intrachromosomalen, unidirektionalen Gentransfers, die zur Übertragung von Sequenzabschnitten aus den Pseudogenen in das umgeordnete V(D)J-Segment führen, wobei die ursprünglichen Pseudogenesequenzen unverändert bleiben^{74,75}. Der Ausgangspunkt für diesen Mechanismus ist wie beim Klassenwechsel ein Doppelstrangbruch, der jedoch nicht in den Sequenzen vor den C-Segmenten,

sondern innerhalb des umgeordneten V(D)J-Segmentes durch die Zusammenarbeit von AID, UNG2 und vermutlich APE1/2 eingeführt wird⁷⁶⁻⁸¹. Faktoren der homologen Rekombinations (HR)-Reparatur, wie die Rad51-Paraloge und Rad54, sind an diesem Prozess maßgeblich beteiligt⁸²⁻⁸⁴.

Durch die Detektion von seltenen, genkonversionsähnlichen Ereignissen in den *Ig*-Genen von Mäusen und Menschen gewann der Mechanismus der *Ig*-Genkonversion erst in jüngster Zeit zunehmend an Bedeutung für die Forschung⁸⁵⁻⁸⁹.

1.4 Regulationsmechanismen der somatischen Hypermutation

Durch die *Ig*-Diversifizierungsprozesse kann das adaptive Immunsystem schnellstmöglich auf die Variabilität der Pathogene reagieren. Die damit verbundene Einführung von Punktmutationen und Doppelstrangbrüchen setzt allerdings strikte Regulationsmechanismen voraus. Wird ein *AID*-Transgen konstitutiv und ubiquitär in Mäusen exprimiert, entwickeln sich Tumore aus T-Lymphozyten und Epithelzellen des respiratorischen Trakts, nicht aber aus B-Lymphozyten^{90,91}. Diese und weitere Studien weisen auf B-zellspezifische Kontrollsysteme hin, die einer Tumorbildung entgegenwirken⁹⁰⁻⁹³.

In Bezug auf die somatische Hypermutation unterscheidet man mehrere Ebenen der Regulation: Einerseits wird die zeitliche Begrenzung der somatischen Hypermutation durch die Regulation der *AID*-Expression und -Aktivität festgelegt, andererseits muss die Zielleitung von *AID* zu den *Ig*-Loci sichergestellt werden, um die Entstehung von B-Zelllymphomen zu verhindern. Darüber hinaus existieren Regulationsmechanismen, die die Entscheidung zwischen fehlerfreier und fehlerbehafteter Reparatur steuern.

1.4.1 Zeitliche Begrenzung der somatischen Hypermutation während der Keimzentrumsreaktion

Die somatische Hypermutation findet während der T-zellabhängigen Immunantwort in einem sehr begrenzten Zeitraum der B-Zelldifferenzierung in Keimzentren (KZ) statt⁹⁴. Keimzentren wurden zum ersten Mal 1884 von Walther Flemming als distinkte, mikroanatomische Regionen in sekundären lymphoiden Organen beschrieben, die Zellen mit hoher mitotischer Aktivität enthalten⁹⁵. Weiterführende Studien definierten Keimzentren als Orte der klonalen B-Zellexpansion, der *Ig*-Diversifizierung, der schrittweisen Erhöhung der Antikörperaffinität zum Antigen - der sogenannten Affinitätsreifung - sowie der sekundären B-Zelldifferenzierung^{94,96-101}.

Histologisch betrachtet lässt sich das Keimzentrum in zwei Bereiche einteilen: die dunkle Zone mit dicht gepackten, stark proliferierenden B-Lymphozyten, den Zentroblasten, sowie die helle Zone, in der die als Zentrozyten bezeichneten B-Lymphozyten und folliculäre T-Helferzellen von einem Netzwerk aus antigenpräsentierenden folliculären dendritischen Zellen durchzogen sind^{101,102}. Nach neuesten Erkenntnissen können Zentroblasten (CXCR4⁺ CD86⁻ CD83⁻) und Zentrozyten (CXCR4⁻ CD86⁺ CD83⁺) u.a. anhand des Expressionslevels des Chemokinrezeptors CXCR4 charakterisiert werden und unterscheiden sich nicht, wie ursprünglich angenommen, in ihrer Größe und Morphologie¹⁰³⁻¹⁰⁶. *Microarray*-Analysen CXCR4-positiver und -negativer KZ-B-Zellen¹⁰⁴, *in vivo*-Bildgebungsverfahren¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ sowie die Technik der *in situ*-Photoaktivierung¹⁰³ führten zur Entwicklung eines erweiterten Keimzentrumsmodells, das einen neuen Einblick in die Regulation der somatischen Hypermutation eröffnet¹⁰¹:

Demnach ist die Keimzentrumsreaktion ein hochdynamischer Prozess, der sowohl durch interzonale Migration der KZ-B-Zellen, als auch durch iterative Selektionszyklen gekennzeichnet ist^{103,109,110}. Die KZ-B-Zellen der dunklen Zone weisen eine hohe Expression von AID, den Polymerasen η und θ sowie zahlreichen DNA-Reparaturfaktoren auf, die an der somatischen Hypermutation beteiligt sind^{103,104}. Führen die genetischen Veränderungen in den *Ig*-Loci zu einem Stopp-Codon oder einer Leserasterverschiebung, kann der B-Zellrezeptor nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert werden und die KZ-B-Zellen werden durch apoptotischen Zelltod entfernt¹¹¹. Die überlebenden KZ-B-Zellen regulieren die somatischen Hypermutationsfaktoren herunter und wandern nach einer oder mehreren Zellteilungen in die helle Zone des Keimzentrums, in der die negative Selektion derjenigen B-Zellen erfolgt, die einen niederaffinen oder autoreaktiven B-Zellrezeptor aufweisen^{99,112}. Haben die B-Zellen jedoch eine höhere Affinität zum Antigen erreicht, werden sie positiv selektiert und wandern entweder zurück in die dunkle Zone und durchlaufen weitere Zyklen von Proliferation, Mutation und Selektion^{103,109,110} oder sie differenzieren terminal in antikörpersezernierende Plasmazellen sowie langlebige Gedächtnis-B-Zellen und verlassen das Keimzentrum¹¹³.

Die bidirektionale Migration der KZ-B-Zellen zwischen der dunklen und hellen Zone impliziert eine alternierende An- und Abschaltung verschiedener Genexpressionsmuster. Die Grundlage hierfür bildet ein komplexes Netzwerk aus Schlüsseltranskriptionsfaktoren der Keimzentrumsreaktion sowie posttranskriptionellen Regulationsmechanismen.

1.4.2 Regulation der *AID*-Expression durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen

Die präzise abgestimmte Regulation der *AID*-Expression spiegelt sich im Aufbau des *AID*-Promotors wider, der konservierte Bindestellen für mindestens 19 Transkriptionsfaktoren aufweist¹¹⁴. Entscheidend für die Induktion der *AID*-Expression ist die T-zellabhängige Aktivierung der B-Zellen über die kostimulatorische CD154:CD40-Interaktion³⁶. Es konnte aber auch eine Beteiligung von Zytokinen wie IL-4, IFN- γ und TGF- β nachgewiesen werden^{36,115}. Diese Signale führen in Zentroblasten zur transkriptionellen und posttranskriptionellen Induktion von Transkriptionsfaktoren, die direkt - wie Pax5¹¹⁶, HoxC4¹¹⁷ und E2A¹¹⁸ - sowie vermutlich indirekt - wie Bcl6^{119,120} und Bach2^{121,122} - die Erhöhung der *AID*-Expression bewirken. Sowohl in sich differenzierenden Zentrozyten¹⁰⁴ als auch in Plasmazellen wirken hingegen andere Transkriptionsfaktoren wie Blimp1¹²³, Irf4¹²⁴ und Xbp1¹²⁵ der *AID*-Expression entgegen.

Die differenzielle Regulation der *AID*-Expression ist auch auf posttranskriptioneller Ebene vorhanden. Die lymphozytenspezifische miRNA-155 bindet an die 3' UTR (*untranslated region*) der *AID*-mRNA und reduziert dadurch die *AID*-Level auf Transkript- und Proteinebene^{126,127}. Diese Feinabstimmung der *AID*-Regulation erfolgt präferenziell in CXCR4⁻-KZ-B-Zellen (Zentrozyten), die eine hohe Expression des miR-155-Vorläufers *BIC* aufweisen¹⁰⁴.

1.4.3 Regulation der *AID*-Aktivität durch Kompartimentalisierung und Phosphorylierung

Die Kompartimentalisierung der Zelle bildet eine weitere Grundlage für die gezielte Einschränkung der *AID*-Aktivität. Trotz der geringen Größe des *AID*-Proteins von 24 kDa, die eine passive Diffusion durch die Kernporen ermöglichen würde, ist *AID* vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert¹²⁸. Neben der zytosolischen Retention konnte auch ein aktiver nukleärer Import- und Exportmechanismus des *AID*-Proteins nachgewiesen werden¹²⁹⁻¹³¹. Darüber hinaus steht die Stabilität des *AID*-Proteins in direktem Zusammenhang mit seiner subzellulären Verteilung¹³². Durch den schnellen proteasomalen Abbau im Zellkern wird dort die Halbwertszeit des *AID*-Proteins deutlich reduziert, wohingegen im Zytoplasma eine Hsp90-abhängige Stabilisierung des *AID*-Proteins erfolgt^{132,133}.

Eine zusätzliche Regulationsebene der *AID*-Aktivität stellt die Phosphorylierung dar, die im *AID*-Protein an bisher 7 identifizierten Positionen erfolgen kann (Ser3, Thr27,

Ser41, Ser43, Ser38, Thr140 und Tyr184)¹³⁴⁻¹³⁷. Die Kinasen und Phosphatasen, die den AID-Phosphorylierungsstatus aufrechterhalten, sind nur z.T. bekannt¹³⁸. Am detailliertesten untersucht ist die sich positiv auswirkende Phosphorylierung an Serin 38, die durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt wird^{134,139} und die AID-Bindung an das Replikationsprotein A (RPA) fördert^{140,141}.

1.4.3.1 Regulation der AID-Spezifität durch bevorzugte Rekrutierung an die *Ig*-Loci

Die Regulation der AID-Expression und -Aktivität ist essenziell für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität^{90,142}, sie bietet jedoch keine Erklärung für die bevorzugte Rekrutierung von AID an die *Ig*-Loci.

Es ist bekannt, dass die Transkriptionsrate der *Ig*-Loci direkt mit der Hypermutationsrate korreliert¹⁴³⁻¹⁴⁵. Zudem zeigen neueste Ergebnisse, dass AID während der Transkription mit pausierten RNA-Polymerase-II-Komplexen und dem Transkriptionselongationsfaktor Spt5 assoziiert¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Da bei der angehaltenen Transkriptionselongation einzelsträngige Regionen über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden, könnte dies erklären, wie AID Zugang zu seinem Substrat – ssDNA – erhält^{39,149}. Die bevorzugte Zielleitung zu den *Ig*-Loci könnte durch zusätzliche Interaktion von AID mit RPA^{150,151}, dem Spleißfaktor Ptbp2¹⁵² oder dem 14-3-3-Komplex¹⁵³ erfolgen.

1.4.4 B-Zelllymphome – eine mögliche Konsequenz fehlgeleiteter AID-Aktivität

In jüngster Zeit erweiterten genomweite Analysen das Verständnis der AID-Zielleitung in hohem Maße. Durch *ChIP-Seq*-Analysen (Chromatinimmunpräzipitationen gefolgt von Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungen) wurde nachgewiesen, dass AID in aktivierten B-Zellen mit fast 6000 Nicht-*Ig*-Genen assoziiert¹⁵⁰. Darüber hinaus wurde mit der *ChIP-Chip*-Methode (einer Kombination aus Chromatinimmunpräzipitationen und *Microarray-Chip*-Analyse) gezeigt, dass physiologische AID-Level über 300 Doppelstrangbrüche außerhalb der *Ig*-Loci hervorrufen¹⁵⁴. Locusspezifische Analysen bestätigten, dass AID in KZ-B-Zellen, aber auch in B-Zelllymphomen, Mutationen in Nicht-*Ig*-Genen wie *Bcl6*^{155,156}, *c-Myc*¹⁵⁷, *CD95*¹⁵⁸ und *Pax5* induziert¹⁵⁹.

Ein entscheidendes Charakteristikum von B-Zelllymphomen sind tumorfördernde chromosomale Translokationen. Dabei wird meist die kodierende Region eines Proto-Onkogens durch Fusion mit einem anderen Chromosom unter die Kontrolle einer

starken regulatorischen Region gebracht, die dadurch zu einer deregulierten Expression des Proto-Onkogens führt¹⁶⁰. Das Kennzeichen von Burkitt-B-Zelllymphomen ist z.B. eine *Ig_H/c-Myc*-Translokation, bei der das Proto-Onkogen *c-Myc* mit der regulatorischen Region des *Ig_H-Locus* fusioniert ist¹⁶¹⁻¹⁶³. Evidenzen häufen sich, dass AID direkt an der Erzeugung der *Ig_H/c-Myc*-Translokation beteiligt ist, indem es im *c-Myc*-Gen und im *Ig_H-Locus* zu Doppelstrangbrüchen führt^{157,164,165}. Darüber hinaus zeigen genomweite Studien, dass AID nicht nur in *c-Myc*, sondern in zahlreichen weiteren Genen Translokationen hervorruft^{166,167}.

1.4.5 Regulation der somatischen Hypermutation durch fehlerfreie und fehlerbehaftete Reparaturmechanismen

Angesichts des hohen mutagenen Potenzials von AID drängt sich die Frage auf, wie es möglich ist, eine adaptive Immunreaktion durchzuführen, ohne dass zusätzliche Mutationen in Nicht-*Ig*-Gene eingeführt werden. Eine mögliche Antwort bietet eine Studie von Liu *et al.*, die nachweist, dass in das Genom von UNG/MSH2-*Knockout*-Mäusen weitaus mehr AID-abhängige Mutationen eingeführt werden als in das Genom von Wildtypmäusen¹⁵⁹. Dieses Ergebnis impliziert, dass die durch AID eingeführten DNA-Läsionen auch fehlerfrei von der Basenexzisions- und der *Mismatch*-Reparatur prozessiert werden können. 25 % der untersuchten Gene weisen jedoch auch in Wildtypmäusen Mutationen auf und werden von denselben Reparaturwegen bevorzugt fehlerbehaftet repariert¹⁵⁹.

1.4.5.1 Der Rad6-Weg – ein Schaltbrett für Mechanismen der DNA-Schadensumgehung mit divergierender Fehlerrate

Es ist noch nicht bekannt, wie die unterschiedliche Reparaturfehlerrate während der somatischen Hypermutation locuspezifisch reguliert wird. Allerdings gibt es Hinweise für eine Beteiligung des Rad6-Wegs, der bei blockierten Replikationsgabeln die Entscheidung zwischen fehlerfreien und fehlerbehafteten Mechanismen der DNA-Schadensumgehung steuert¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Im Mittelpunkt des Rad6-Wegs steht der Modifikationsstatus des trimeren DNA-umschließenden *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA)-Moleküls, das als Bindeplattform für Faktoren der DNA-Replikation und -Reparatur dient¹⁷². Die Monoubiquitinierung des PCNA-Moleküls fördert den Austausch der replikativen Polymerasen gegen die fehlerbehafteten TLS-Polymerasen. Die PCNA-Polyubiquitinierung führt hingegen zu einem fehlerfreien DNA-

Reparaturmechanismus, der die genetischen Informationen des ungeschädigten DNA-Strangs als Matrize verwendet¹⁷³⁻¹⁷⁵.

In der DT40-B-Zelllinie, in der die Phase 1 der somatischen Hypermutation dominiert, konnten unsere Arbeitsgruppe und andere durch Inaktivierung essenzieller Komponenten des Rad6-Wegs eine Herabsetzung der Hypermutationsrate beobachten^{168,169}. In murinen B-Zellen führte jedoch der Einsatz eines PCNA-Moleküls, das eine Mutation in dem für die Ubiquitinierung benötigten Lysin aufweist (PCNA^{K164}), zu einer bis zu 10-fachen Reduktion der A:T-Mutationen, die hauptsächlich in der 2. Phase der somatischen Hypermutation erzeugt werden^{170,171}. Obwohl die resultierenden Mutationsmuster in den Modellorganismen divergieren, zeigen die Ergebnisse, dass der Rad6-Weg eine zentrale Rolle in der somatischen Hypermutation einnimmt.

1.4.5.2 Die homologe Rekombinationsreparatur – ein fehlerfreier Schutzmechanismus gegen AID-induzierte Doppelstrangbrüche

Die homologe Rekombination ist ein nahezu fehlerfreier DNA-Reparaturmechanismus zur Beseitigung von Doppelstrangbrüchen und ist somit in vielen Organismen essenziell für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität¹⁷⁶. Ein weiterer DNA-Reparaturmechanismus für Doppelstrangbrüche ist NHEJ, der jedoch eine höhere Fehlerrate aufweist¹⁷⁷. Die unterschiedliche Fehlerrate der beiden Reparaturmechanismen ist auf den jeweiligen Mechanismus zurückzuführen. Bei NHEJ erfolgt häufig eine Prozessierung der Doppelstrangbruch-Enden, damit diese direkt miteinander ligiert werden können, wodurch bisweilen Insertionen und Deletionen entstehen¹⁷⁷. Die homologe Rekombinationsreparatur verwendet hingegen das unbeschädigte Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom als Matrize und stellt auf diese Weise die fehlerfreie Originalsequenz wieder her¹⁷⁸.

Es gibt Hinweise, dass die homologe Rekombinationsreparatur als Schutzmechanismus gegen AID-initiierte Doppelstrangbrüche fungiert^{179,180}. XRCC2 gehört zur Rad51-Familie und ist an den initialen Schritten der homologen Rekombinationsreparatur beteiligt. Die Aktivierung XRCC2-defizienter B-Zellen ist zytotoxisch und hat eine erhöhte chromosomale Instabilität zur Folge¹⁷⁹. Die Ergebnisse zeigen, dass dies auf einen erhöhten Anteil an AID-induzierten Doppelstrangbrüchen in Nicht-*Ig*-Genen zurückzuführen ist¹⁷⁹.

Während des Klassenwechsels werden hingegen die durch AID-hervorgerufenen Doppelstrangbrüche hauptsächlich durch NHEJ prozessiert^{181,182}. Hasham *et al.* postulierten, dass die Doppelstrangbrüche sowohl in den *Ig_H*-Genen als auch in den

Nicht-*Ig*-Genen während der G1-Phase des Zellzyklus erzeugt werden¹⁸⁰. Anschließend werden diese in den *Ig_H*-Genen durch NHEJ repariert und führen zum Klassenwechsel, wohingegen die Doppelstrangbrüche in den Nicht-*Ig*-Genen und die noch verbliebenen Doppelstrangbrüche in den *Ig_H*-Genen bis zur S-Phase bestehen bleiben und erst dann durch die homologe Rekombinationsreparatur beseitigt werden¹⁸⁰. Die Frage, wie in diesem Fall die locuspezifische Entscheidung zwischen fehlerfreier (HR-Reparatur) und fehlerbehafteter Reparatur (NHEJ) erfolgt, ist jedoch weiterhin offen.

Es ist allerdings bekannt, dass die homologe Rekombinationsreparatur durch die entsprechend hohe Cyclin-abhängige-Kinase-Aktivität (*cyclin-dependent kinase*, CDK) auf die S- und G2-Phase beschränkt wird, da die CDK-Kinasen durch Förderung der Doppelstrangbruch-Resektion entscheidend zur Einleitung der homologen Rekombinationsreparatur beitragen¹⁸³⁻¹⁸⁵. Eine zusätzliche Regulation erfolgt zudem durch die DNA-schadensassoziierte Signalgebung der Zellzykluskontrollpunkte (*checkpoints*)¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ (Abschnitt 1.5.3.2).

1.5 Die *Checkpoint*-Kinase 1 – ein möglicher Regulator der somatischen Hypermutation?

Die *Checkpoints* werden während des Zellzyklus in der G1- und S-Phase sowie beim Übergang zur Mitose (G2/M) durch DNA-Schäden aktiviert und können je nach Schwere der DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest, die Hemmung der DNA-Replikation und auch die Einleitung des apoptotischen Zelltods zur Folge haben¹⁸⁹. Darüber hinaus führen die komplexen Wechselwirkungen mit DNA-Reparaturmechanismen zur effizienten Beseitigung der DNA-Schäden, damit der Zellzyklus unter Beibehaltung der genomischen Integrität fortgesetzt werden kann¹⁹⁰.

1.5.1 Einführung in die Funktionsweise der Zellzykluskontrollpunkte

Im Mittelpunkt der Zellzykluskontrollpunkte steht die DNA-schadensassoziierte Regulation der CDK/Cyclin-Komplexe, der treibenden Kräfte des Zellzyklus, deren Hemmung durch eine spezifische Phosphorylierung der ATP-Bindungsschleife erfolgt¹⁹¹⁻¹⁹³. Während des normalen Zellzyklus entfernen *cell division cycle 25* (CDC25)-Phosphatasen die inhibitorische Phosphorylierung und aktivieren dadurch die CDK/Cyclin-Komplexe^{194,195}. Bei DNA-Schäden binden jedoch die Sensorkinasen ATM und ATR an die DNA-Schadensstellen und induzieren in Zusammenarbeit mit

Mediatorproteinen die Aktivierung der Effektorinasen *Checkpoint kinase 1/2* (Chk1/2)^{185,196,197}. Diese führen zur Inaktivierung der CDK/Cyclin-Komplexe und folglich zu einem Zellzyklusarrest, indem sie die CDC25-Phosphatasen hemmen und/oder deren Abbau induzieren^{196,198-201}.

Neben der Einleitung des Zellzyklusarrests, hat die essenzielle Kinase Chk1¹⁹⁷ weitere, sehr vielfältige Funktionen, die entscheidend zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität beitragen^{202,203}.

1.5.2 Die multiplen Funktionen der *Checkpoint-Kinase 1* in den Zellzykluskontrollpunkten

Die multiplen Funktionen von Chk1 in den Zellzykluskontrollpunkten werden sowohl infolge von UV (Ultraviolett-Strahlung)-induzierten DNA-Läsionen und gehemmten Replikationsgabeln ATR-abhängig¹⁹⁷ als auch in Anwesenheit von IR (*ionising radiation*, ionisierende Strahlung)-induzierten Doppelstrangbrüchen ATM- und ATR-abhängig aktiviert^{185,204,205}. Der initiale Ausgangspunkt der Chk1-Aktivierung ist jedoch RPA-gebundene ssDNA, die sowohl bei UV-Bestrahlung, gehemmten Replikationsgabeln als auch bei der nukleolytischen Prozessierung der Doppelstrangbrüche entsteht^{185,206}. Diese führt zur Rekrutierung der ATR-ATRIP-, Rad17-RFC- sowie Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1)-Komplexe²⁰⁷⁻²¹⁰, die eine Plattform für die Bindung weiterer Mediatorproteine wie BRCA1^{211,212}, TopBP1²¹³, MDC1²¹⁴ und Claspin²¹⁵ bilden und für die ATR- und ATM-abhängige Chk1-Phosphorylierung benötigt werden^{197,216}.

Das chromatingebundene Chk1 wird infolge der Phosphorylierung vom Chromatin in das Nukleoplasma freigesetzt²¹⁷. Da Chk1 u.a. eine Histon-H3-Threonin-11-Kinase ist, erfolgt parallel zur Chromatindissoziation die Reduktion der entsprechenden Histon-Phosphorylierung, wodurch die Expression von Genen, die u.a. für die Progression des Zellzyklus benötigt werden, herabgesetzt wird²¹⁸. Zudem hemmt Chk1 durch Phosphorylierung der *Tousled-like-Kinase 1* den Chromatinaufbau²¹⁹.

Einige Chk1-Moleküle lokalisieren überdies in den Nucleoli und phosphorylieren dort die Cdc14B-Phosphatase, die indirekt den Abbau von Claspin verhindert und somit zur Aufrechterhaltung der Chk1-Aktivierung beiträgt^{220,221}. Darüber hinaus führt das nukleoplasmatische Chk1 zur Einleitung des Zellzyklusarrests in der S-Phase oder dem G2/M-Übergang, indem es CDC25A und CDC25C phosphoryliert und gemeinsam mit 14-3-3-Proteinen zur Hemmung der CDC25-Phosphatasen bzw. im Fall von CDC25A auch zum NEK11-abhängigen Abbau führt¹⁹⁸⁻²⁰¹. In *Xenopus* (Krallenfrosch) konnte zudem eine Chk1-abhängige Phosphorylierung von Wee1 beobachtet werden,

die ebenfalls zur Inaktivierung der CDK-Cyclin-Komplexe beiträgt²²². Während des Zellzyklusarrests fördert Chk1 zudem die Aktivierung der homologen Rekombinationsreparatur sowie des Rad6- und des Fanconi-Anämie-Signalwegs (Abschnitt 1.5.3.2).

Im weiteren Verlauf der Zellzykluskontrollpunkte wird Chk1 CRM1-abhängig aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert²²³. Dort assoziiert Chk1 in seiner ATM/ATR-phosphorylierten Form mit den Zentrosomen und kann zur Zentrosomenamplifizierung beitragen²²⁴⁻²²⁶. Diese kann in einer sogenannten mitotischen Katastrophe, einer Störung des mitotischen Teilungsapparats, resultieren^{227,228}. Es wurde postuliert, dass es sich hierbei um einen mitotischen Zellzykluskontrollpunkt handelt, der in Anwesenheit von schwerwiegenden DNA-Schäden sowie nicht vollständig replizierter DNA zur Eliminierung der betroffenen Zellen führt^{229,230}.

Darüber hinaus ist Chk1 am Spindelkontrollpunkt beteiligt²³¹. Dieser verhindert die Einleitung der Anaphase, wenn z.B. keine korrekte Anheftung der Schwesterchromatiden an die mitotische Spindel erfolgt²³². Bei Behandlung mit dem Spindeltoxin Taxol assoziiert Chk1 an die Kinetochoren und erhöht durch Phosphorylierung die katalytische Aktivität von AuroraB *in vitro*²³¹. Dies führt vermutlich zu einer verstärkten Signalgebung des Spindelkontrollpunkts und trägt zur Hemmung des Eintritts in die Anaphase bei²³¹.

Die Abschaltung der Chk1-Funktionen innerhalb der Zellzykluskontrollpunkte erfolgt durch die Phosphatase PPM1D, die neben Chk1 auch andere *Checkpoint*-Komponenten wie p53 dephosphoryliert und somit inaktiviert²³³. Darüber hinaus wird Chk1 im Zytoplasma durch Assoziation mit den E3-Ligase-Komplexen Cul4A/DDB1 und SCF/Fbx6 proteasomal abgebaut^{234,235}.

1.5.3 Verbindungspunkte zwischen der *Checkpoint*-Kinase 1 und der somatischen Hypermutation

Bisher wurde noch kein direkter Zusammenhang zwischen Chk1 und der somatischen Hypermutation gezeigt. Der folgende Abschnitt befasst sich mit Hinweisen, die jedoch eine mögliche Verbindung zwischen Chk1 und der somatischen Hypermutation implizieren. Des Weiteren werden spezifische Chk1-Funktionen, wie die Funktionen in der DNA-Reparatur, hervorgehoben, mit deren Ausübung Chk1 regulatorisch in die somatische Hypermutation eingreifen könnte.

1.5.3.1 Hinweise für eine Verbindung zwischen der *Checkpoint*-Kinase 1 und der somatischen Hypermuation

Für eine mögliche Beteiligung der *Checkpoint*-Proteine an der Keimzentrumsreaktion sprechen Resultate, die zeigen, dass in Zentroblasten die transkriptionelle Expression von *Chk1*, *ATR*, *p53* und *p21* unter der Kontrolle des Transkriptionsrepressors Bcl6 steht – eines Schlüsselregulators der Keimzentrumsreaktion, der für zahlreiche Eigenschaften der KZ-B-Zellen verantwortlich ist²³⁶⁻²⁴⁰. Es wurde postuliert, dass die daraus resultierende Abschwächung der DNA-Schadensantwort die starke Proliferation während eines mutagenen Prozesses wie der somatischen Hypermuation erst ermöglicht²³⁶. Wird jedoch eine definierte Menge an DNA-Schäden überschritten, wird Bcl6 ATM-abhängig abgebaut²⁴¹. Darüber hinaus führt die Signalgebung über CD40, die beim Eintritt der Zentroblasten in die helle Zone des Keimzentrums erfolgt, zur Herunterregulierung der Bcl6-mRNA-Expression²⁴². Die Reaktivierung der *ATR*-Expression – des direkten Aktivators von Chk1 – konnte in Zentrozyten nach Stimulation mit dem CD40-Liganden bereits nachgewiesen werden²³⁶.

Während Bcl6 die *Chk1*-Transkription in Zentroblasten negativ reguliert, führt Bcl6 durch Repression der miRNA-155 zur indirekten Aktivierung der AID-Expression^{119,120}. Diese inverse Regulation findet man auch bei der Phosphatase PP2A wieder, die Chk1 negativ reguliert, indem sie eine aktivierende Phosphorylierung entfernt, aber auf AID durch Entfernung einer hemmenden Phosphorylierung eine positive Wirkung ausübt^{135,243}. Einen direkten Zusammenhang zwischen AID und Chk1 konnten jedoch Gourzi und Kollegen zeigen, indem sie bei viral induzierter AID-Expression eine Chk1-Aktivierung detektierten²⁴⁴. Es ist nicht detailliert geklärt, welche Folgen die Chk1-Aktivierung in diesem Fall nach sich zieht²⁴⁴. Es wird allerdings eine eingeschränkte Proliferation der virus-infizierten Zellen und eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der NK (Natürliche Killerzellen)-vermittelten Zytotoxizität durch Hochregulation des NKG2D-Liganden, Rae-1, in Betracht gezogen²⁴⁴.

1.5.3.2 Die vielfältigen Funktionen der *Checkpoint*-Kinase 1 in der Regulation der DNA-Reparatur

Es ist zudem denkbar, dass die aktivierte *Checkpoint*-Kinase 1 in Reparaturprozesse eingreift, die an der somatischen Hypermuation beteiligt sind. Eine Studie von Bi *et al.* dokumentierte beispielsweise, dass der ATR-Chk1-Signalweg bei Benzo(a)pyren-induzierten DNA-Schäden die Ausbildung der PCNA-Monoubiquitinierung und die Assoziation von PCNA mit der TLS-Polymerase κ begünstigt²⁴⁵. Yang *et al.* bestätigten

und erweiterten diese Beobachtungen, indem sie nachwiesen, dass die Chk1-abhängige Stabilisierung von Claspin die Rekrutierung der E3-Ubiquitin-Ligase Rad18 an das Chromatin und folglich die PCNA-Monoubiquitinierung fördert²⁴⁶. Während die PCNA-Monoubiquitinierung die fehlerbehaftete Translänionssynthese induziert, führt die PCNA-Polyubiquitinierung zu einer nahezu fehlerfreien Reparatur basierend auf einem *Template-Switch*, an dem Komponenten der homologen Rekombinationsreparatur beteiligt sind^{247,248}.

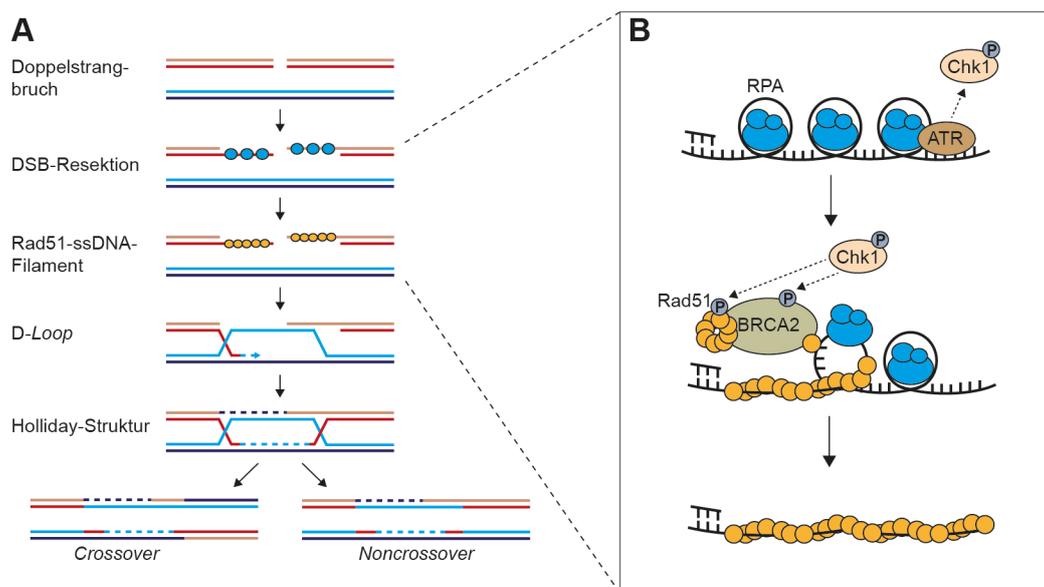


Abbildung 1.4: Die Funktionen von Chk1 in der homologen Rekombinationsreparatur

A. Schematische Darstellung des Mechanismus der homologen Rekombinationsreparatur (nach Heyer *et al.*¹⁷⁸). Doppelstrangbrüche (DSB), die in der S- oder G2-Phase auftreten führen zur ATM-Aktivierung. Die in diesen Zellzyklusphasen erhöhte CDK-Aktivität fördert die Resektion der Doppelstrangbrüche und setzt dadurch überhängende, einzelsträngige 3' Enden frei. RPA bindet an die ssDNA und führt zur Aktivierung des ATR-Chk1-Signalwegs. RPA wird durch Mediatorproteine wie z.B. Rad52 und BRCA2 entfernt und gegen Rad51 ausgetauscht. Dies führt zur Bildung von Rad51-Nukleoproteinfilamenten, die in den homologen Strang einwandern und die homologe Rekombinationsreparatur einleiten. Es wird eine Struktur in Form eines Ds (*D-Loop*) ausgebildet, an der die DNA-Synthese stattfindet. Folglich bilden sich sog. Holliday-Strukturen, die durch Endonukleasen gespalten werden und zu *Crossover* oder *Noncrossover*-Produkten führen.

B. Schematische Darstellung der Chk1-Funktionen in der Initiation der homologen Rekombinationsreparatur (nach San Filippo *et al.*²⁴⁹). Chk1 wird bei Doppelstrangbrüchen sowohl ATM- als auch ATR-abhängig aktiviert. Daraufhin phosphoryliert Chk1 Rad51 sowie BRCA2 und fördert dadurch die Assoziation von Rad51 an ssDNA, wodurch RPA dissoziiert. Chk1 fördert somit die Einleitung der homologen Rekombinationsreparatur. (Referenzen siehe Text).

Chk1 ist an der Initiation der homologen Rekombinationsreparatur beteiligt¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ (Abbildung 1.4 B). Bei diesem Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus werden durch nukleolytische Prozessierung der Doppelstrangbruch-Enden einzelsträngige Bereiche ausgebildet, die als Bindestellen für RPA dienen^{250,251} (Abbildung 1.4 A). Die RPA-Proteine verhindern die Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen – eine Voraussetzung für die Bindung der Rekombinase Rad51 an ssDNA, die jedoch in

Kompetition mit der RPA-Bindung steht und nur durch Kooperation mit Mediatorproteinen wie den Rad51-Paralogen (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3) und BRCA2 erfolgen kann^{249,251-255}. Die Polymerisierung zahlreicher Rad51-Proteine an ssDNA führt zur Ausbildung eines Nukleoproteinfilaments, das die Stranginvasion in das homologe Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom erleichtert^{256,257}. Die Folge ist die Ausbildung einer Heteroduplex-Struktur in Form eines D (*D-loop-structure*), die eine fehlerfreie Kopie für den Ersatz des fehlenden DNA-Bereiches ermöglicht¹⁷⁸. Chk1 phosphoryliert Rad51 an Threonin 309 und fördert dadurch die Assoziation von Rad51 mit ssDNA^{186,187}. Wird eine Rad51-Mutante exprimiert, die eine Mutation in dieser Phosphorylierungsstelle aufweist (Rad51^{T309A}), hat dies ein geringeres Überlebenspotenzial der Zellen nach Induktion von DNA-Schäden zur Folge¹⁸⁶. Darüber hinaus phosphorylieren Chk1 und Chk2 das Mediatorprotein BRCA2, begünstigen dadurch die Interaktion von BRCA2 mit Rad51 und fördern somit die Ausbildung des Nukleoproteinfilaments¹⁸⁸.

Die homologe Rekombinationsreparatur ist ebenfalls an der Beseitigung von Interstrang-Quervernetzungen (*interstrand-crosslinks*, ICLs) beteiligt, die durch die zahlreichen FANC-Proteine des Fanconi-Anämie Signalwegs koordiniert wird²⁵⁸. Auch in diesem Reparaturweg sind Verbindungen zum ATR-Chk1-Signalweg vorhanden. Einerseits werden FANCM und FAAP24 für die Aktivierung des ATR-Chk1-Signalwegs benötigt^{259,260}, andererseits ist Chk1 an der direkten Regulation des Fanconi-Anämie-Signalwegs beteiligt, indem es FANCE phosphoryliert²⁶¹. Ob diese Phosphorylierung die FANCD2-Monoubiquitinierung fördert – einen entscheidenden Schritt des Fanconi-Anämie-Signalwegs – wird kontrovers diskutiert^{261,262}.

Der Fanconi-Anämie-Signalweg aktiviert nicht nur die fehlerfreie homologe Rekombinationsreparatur, sondern hemmt gleichzeitig die fehlerbehaftete Doppelstrangbruch-Reparatur durch NHEJ^{263,264}. Ob Chk1 an der NHEJ-Reparatur beteiligt ist, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt^{186,265}. Während in zwei Studien die Beteiligung von Chk1 an NHEJ ausgeschlossen wurde, wiesen Godelock *et al.* nach, dass Chk1 die NHEJ-Reparatur *in vitro* stimulieren kann²⁶⁶.

Insgesamt betrachtet, deutet sowohl die präzise Regulation der *Chk1*-Expression in KZ-B-Zellen als auch die Chk1-Aktivierung nach induzierter *AID*-Expression auf eine Verbindung zwischen der *Checkpoint*-Kinase 1 und der somatischen Hypermutation hin. Auch die vielfältigen Funktionen von Chk1 in der DNA-Reparatur sind Hinweise auf eine Beteiligung an der Regulation dieses sekundären Ig-Diversifizierungsprozesses.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Zellzykluskontrollsystem bewahrt die genetische Integrität, indem es bei DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest hervorruft und DNA-Reparaturmechanismen aktiviert¹⁸⁹. Die hohe Antikörperdiversität basiert jedoch auf dem Mechanismus der somatischen Hypermutation, bei dem AID gezielt genetische Veränderungen in die *Ig*-Gene einführt und sogar weitreichende DNA-Schäden in Nicht-*Ig*-Genen hervorruft¹⁵⁴. Dies setzt vielfältige Regulationsmechanismen voraus, die einer B-Zelllymphomentstehung entgegenwirken.

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, ob die *Checkpoint*-Kinase 1 an der Regulation der somatischen Hypermutation beteiligt ist. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt: (I) Durch Anwendung von Chk1-Inhibitoren in der humanen B-Lymphomzelllinie Raji sollten erste Erkenntnisse bezüglich der Funktion von Chk1 in der somatischen Hypermutation gewonnen werden. (II) Darüber hinaus sollten die erhaltenen Erkenntnisse durch Generierung eines *Chk1-Knockouts* in der Hühner-B-Lymphomzelllinie DT40 erweitert werden, in der die somatische Hypermutationsrate sehr genau bestimmt werden kann. Hierbei sollte insbesondere untersucht werden, ob Chk1 entweder auf Ebene der AID-Regulation oder auf Ebene der Reparaturmechanismen in die somatische Hypermutation eingreift.

2 ERGEBNISSE

2.1 Einfluss von CHK1-Inhibitoren auf die somatische Hypermutation in einer humanen B-Lymphomzelllinie

Um zu untersuchen, ob CHK1 an der somatischen Hypermutation beteiligt ist, wurde ein von Bachl und Olsson entwickeltes Reportersystem verwendet, das eine *in vitro*-Messung der somatischen Hypermutation in humanen B-Lymphomzelllinien erlaubt²⁶⁷. Der Beitrag von CHK1 zur somatischen Hypermutation wurde durch Verwendung von zwei strukturell unterschiedlichen CHK1-Inhibitoren näher charakterisiert.

2.1.1 Inhibition der *Checkpoint*-Kinase 1 in der humanen B-Lymphomzelllinie Raji

Als zelluläres Modellsystem wurde die humane, Epstein-Barr-Virus (EBV)-positive Burkitt-B-Lymphomzelllinie Raji ausgewählt, in der die Anwendung des Reportersystems bereits erfolgreich etabliert und mehrmals bestätigt wurde²⁶⁸⁻²⁷¹. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Raji-Zelllinie eine hohe, konstitutive Hypermutationsaktivität aufweist und sich somit ideal für die *in vitro*-Analyse dieses Prozesses eignet^{269,272}.

Für die Hemmung der *Checkpoint*-Kinase 1 wurden zwei strukturell unterschiedliche CHK1-Inhibitoren eingesetzt: das Staurosporin-Derivat UCN-01 und das Indazol-Derivat TCS 2312. Beide Inhibitoren verbinden sich mit der katalytischen Domäne von CHK1 und blockieren auf diese Weise dessen Kinaseaktivität^{273,274}. Es wurde nachgewiesen, dass UCN-01 auch zur Hemmung anderer Kinasen, wie PDK1 und MK2, beiträgt^{275,276}. Bei TCS 2312 handelt es sich jedoch um eine Substanz, die synthetisch für die selektive Inhibition von CHK1 optimiert wurde²⁷⁴. Beide CHK1-Inhibitoren, insbesondere UCN-01, wurden bereits in zahlreichen Studien eingesetzt und erweiterten die Kenntnisse über die vielfältigen Funktionen der *Checkpoint*-Kinase erheblich^{186,203,277}.

K. Davari aus unserem Labor analysierte und bestätigte die Funktionalität der CHK1-Inhibitoren UCN-01 und TCS 2312 in der Raji-Zelllinie²⁷⁸. Um eine Beeinträchtigung der Vitalität und Proliferation während der somatischen Hypermutationsmessung auf ein Minimum herabzusetzen, wurden die CHK1-Inhibitoren in geringeren

Konzentrationen als üblich eingesetzt (UCN-01: 75 nM statt 300 nM; TCS 2312: 250 nM statt 500 nM).

2.1.2 Funktionsweise des Reportersystems zur Messung der somatischen Hypermutation

Das Reportersystem zur Messung der somatischen Hypermutation basiert auf einem Gen für das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein, GFP*), das ein vorzeitiges TAG-Stopp-Codon enthält (Abbildung 2.1 A). Das auf diese Weise modifizierte *GFP*-Gen wird zwar transkribiert, führt aber nicht zur Expression eines funktionellen fluoreszierenden Moleküls²⁶⁷. Erst die Reversion des Stopp-Codons ermöglicht die Detektion des GFP-Proteins mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting, FACS*)²⁶⁷.

Um sicherzustellen, dass das Reportersystem die somatische Hypermutationsaktivität des endogenen *Ig*-Locus widerspiegelt, wurde das Reporter-gen diesen Anforderungen entsprechend angepasst^{267,279} (Abbildung 2.1 B): (I) Das Stopp-Codon liegt innerhalb eines RGYW-Motivs, eines AID-*Hotspots*³⁰, und (II) ist des Weiteren ca. 400 bp von der Transkriptionsinitiationsstelle entfernt. Hierbei handelt es sich um einen optimalen Abstand, der im endogenen *Ig*-Locus mit einer hohen Mutationsfrequenz assoziiert ist^{27,28}. (III) Zusätzlich steht das *GFP*-Gen unter der Kontrolle der *Enhancer*-Elemente des humanen *Ig_κ*-Locus, die *in cis* eine hohe somatische Hypermutation in Transgenen hervorrufen^{29,280,281}, und (IV) wird ausgehend von dem starken, konstitutiven *Cytomegalovirus* (CMV)-Promotor exprimiert¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Unter den oben genannten Voraussetzungen unterliegt das *GFP*-Transgen dem Mechanismus der somatischen Hypermutation und die resultierenden Nukleotidsubstitutionen können das Stopp-Codon in ein kodierendes Codon umwandeln. Sequenzanalysen des Transgens bestätigten diese Annahme²⁶⁷.

Die experimentelle Vorgehensweise wird in Abbildung 2.1 C veranschaulicht. Die Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt transfiziert und wenige Tage später auf den episomalen Vektor selektiert. Als Indikator für die Transfektions- und Selektionseffizienz diente dasselbe Reporterkonstrukt, das in die Zellen in einer parallelen, aber unabhängigen Transfektion eingebracht wurde, jedoch ein funktionelles *GFP*-Gen enthält. Nach erfolgreicher Selektion wurde die Kultur geteilt und bis Tag 30 kontinuierlich mit CHK1-Inhibitoren bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle versetzt. Um Variationen bedingt durch die experimentelle Durchführung auszuschließen, wurden Duplikate der Versuchsansätze verwendet. Die

relative Anzahl an GFP-positiven Zellen wurde während des gesamten Zeitraums in Intervallen von 2-3 Tagen mit Durchflusszytometrie ermittelt.

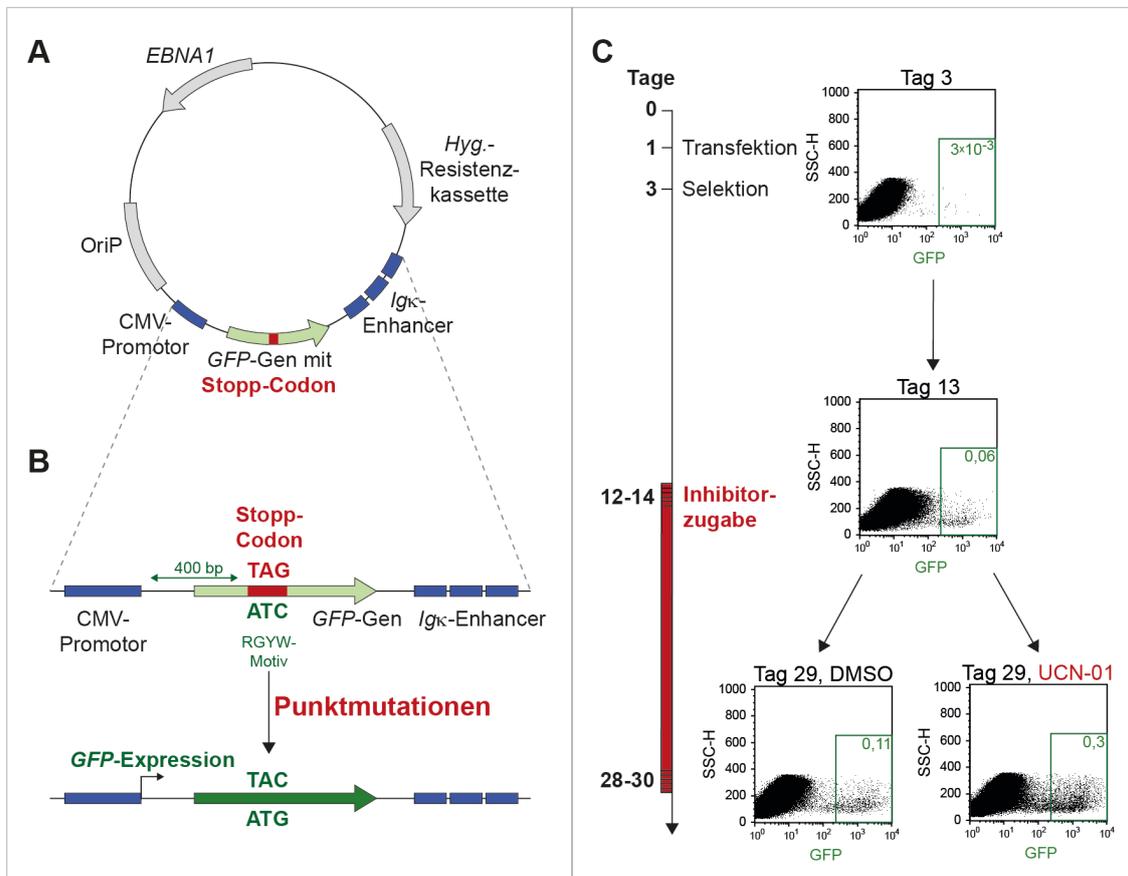


Abbildung 2.1: Messung der somatischen Hypermutionsaktivität in humanen B-Lymphomzelllinien

A. Schematische Darstellung des Vektors mit dem GFP-Reportersystem, das ein GFP-Gen mit einem Stopp-Codon enthält und zur Messung der somatischen Hypermution eingesetzt wurde.

B. Schematische Darstellung des GFP-Reportersystems zur Messung der somatischen Hypermution. Das Stopp-Codon im GFP-Gen wird durch die AID-induzierten Punktmutationen revertiert. Das System wurde für die Erkennung durch die Hypermutionsmaschinerie optimiert: das Stopp-Codon befindet sich in einem RGYW-Motiv, ist 400 bp von der Transkriptionsinitiationsstelle entfernt und 3' des GFP-Gens befinden sich *Igκ*-Enhancerelemente.

C. Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise. Drei Tage nach Transfektion mit dem GFP-Reportersystem wurden die Zellen mit Hygromycin selektiert. Nach Abschluss der Selektion erfolgte die Zugabe der Inhibitoren bzw. von DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Alle 2-3 Tage wurde die Anzahl an GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es sind repräsentative FACS-Bilder dargestellt. Die grün gefärbte Zahl gibt den prozentualen Anteil an GFP-positiven Zellen wieder.

Abkürzungen: CMV-Promotor: Cytomegalovirus-Promotor; DMSO: Dimethylsulfoxid; EBNA1: Epstein Barr nuclear antigen 1-Gen; GFP: green fluorescent protein; Hyg.: Hygromycin; *Igκ*-Enhancer: Immunglobulinκ-Enhancer; OriP: origin of DNA replication; SSC-H: Side Scatter-Height; UCN-01: CHK1-Inhibitor

2.1.3 CHK1-Inhibition führt zu einer erhöhten somatischen Hypermutationsaktivität

Über den gesamten experimentellen Verlauf war in der DMSO-Kontrolle eine stetige Zunahme an GFP-Revertanten zu beobachten, die bestätigte, dass die Raji-Zelllinie eine konstitutive Hypermutationsaktivität aufweist (Abbildung 2.2 A). Interessanterweise konnte bereits wenige Tage nach Zugabe der CHK1-Inhibitoren, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, ein erhöhter Anteil an GFP-Revertanten nachgewiesen werden, der im zeitlichen Verlauf des Experiments deutlich zunahm. Am Tag 29 des Experiments, 16 Tage nach Beginn der Inhibitorzugabe, wies die mit UCN-01 behandelte Kultur eine 2,5-fach höhere und die mit TCS 2312 behandelte Kultur eine 1,5-fach höhere Anzahl an GFP-positiven Zellen auf.

Die erhöhte Anzahl an GFP-Revertanten bei CHK1-Inhibition wies auf eine höhere somatische Hypermutationsrate bei herabgesetzter CHK1-Aktivität hin.

2.1.4 Die CHK1-Inhibitoren beeinflussen in den eingesetzten Konzentrationen die zelluläre Vitalität kaum

In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass CHK1-Inhibitoren, insbesondere in *P53*-defizienten Zelllinien, Apoptose induzieren^{275,282,283}. Die Raji-Zelllinie enthält auf beiden *P53*-Allelen Mutationen, von denen eine als *P53*-inaktivierend beschrieben wurde²⁸⁴⁻²⁸⁶. K. Braunschmidt aus unserem Labor wies darüber hinaus nach, dass die Raji-Zelllinie nach γ -Bestrahlung weder eine *P53*-Akkumulation noch eine Induktion des *P53*-Zielgens *P21* zeigt²⁷⁰.

Um auszuschließen, dass die Inhibitoren die somatische Hypermutation durch Beeinträchtigung der zellulären Vitalität beeinflussen, wurde parallel zur GFP-Fluoreszenzmessung eine Propidiumiodid (PI)-Färbung durchgeführt, durch die der Lebendanteil der Zellen (= PI-negativ) kontrolliert werden konnte.

Trotz mehrtägiger Behandlung der Zellen mit den CHK1-Inhibitoren wurde in den eingesetzten Konzentrationen (UCN-01: 75 nM; TCS 2312: 250 nM) keine bzw. nur eine geringfügige Herabsetzung der Vitalität durch TCS 2312 und UCN-01 festgestellt (Abbildung 2.2 B).

Eine Verfälschung des Resultats durch eine Vitalitätsbeeinträchtigung konnte somit bei den verwendeten Konzentrationen der CHK1-Inhibitoren ausgeschlossen werden.

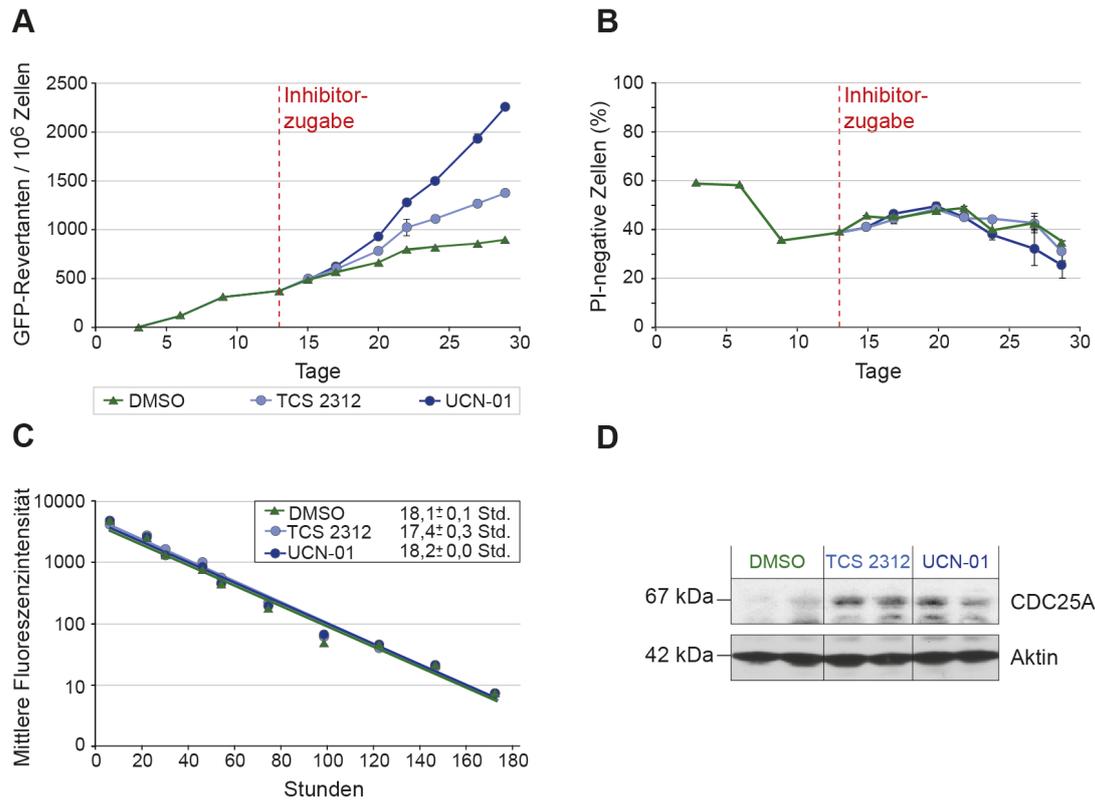


Abbildung 2.2: Erhöhte somatische Hypermutationsaktivität bei CHK1-Inhibition

A. Analyse der somatischen Hypermutationsaktivität bei CHK1-Inhibition in der humanen B-Lymphomzelllinie Raji unter Anwendung des in Abbildung 2.1 erläuterten *GFP*-Reportersystems. Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der GFP-Revertanten pro 10⁶ Zellen über einen Zeitraum von 29 Tagen. Am Tag 13 erfolgte die Zugabe der CHK1-Inhibitoren UCN-01 (75 nM) und TCS2312 (250 nM). Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (Dimethylsulfoxid).

B. Analyse der Vitalität während der somatischen Hypermutationsmessung (Abb. 2.2.A) unter Anwendung einer Propidiumiodid (PI)-Färbung.

C. Ermittlung der Proliferationsgeschwindigkeit bei CHK1-Inhibition mit einer CFSE-Färbung über einen Zeitraum von 7 Tagen. Darstellung der Exponentialfunktionen, die als Grundlage für die Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeiten dienten. Die Werte oben rechts geben die benötigten Stunden pro Zellteilung an.

D. Western-Blot-Analyse für den Nachweis der CDC25A-Expression am Tag 29 des in Abbildung 2.2 A dargestellten Experiments. Es wurden jeweils zwei separate Versuchsansätze analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

A.-C. Die Standardabweichung wurde aus Duplikaten (zwei separaten Versuchsansätzen) ermittelt. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Experimenten dargestellt.

2.1.5 Die CHK1-Inhibitoren beeinflussen in den eingesetzten Konzentrationen die Proliferation nicht

Begründet durch die z.T. replikationsassoziierte Mutationsentstehung wird angenommen, dass die somatische Hypermutationsfrequenz mit der Proliferationsrate korreliert, auch wenn dies kontrovers diskutiert wird^{287,288}. Aufgrund dessen wurde durch Anwendung des Reagenz Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester (CFDA-SE) untersucht, ob die eingesetzten Inhibitoren ein verändertes Proliferationsverhalten hervorrufen^{289,290}.

Das membrangängige, nicht-fluoreszierende Reagenz CFDA-SE wird schnell in die Zellen aufgenommen²⁹⁰. Durch Abspaltung der Acetatgruppen durch zelluläre Esterasen erlangt das resultierende Produkt CFSE eine hohe, sehr gut detektierbare Fluoreszenz, verliert seine Membranpermeabilität und verbindet sich u.a. kovalent mit intrazellulären Membranproteinen²⁹⁰. Mit jeder Zellteilung erfolgt so eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs auf die Tochterzellen, wodurch die Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensitätsabnahme ermöglicht wird²⁹⁰.

Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen gemessen (Abbildung 2.2 C). Weder die kontinuierliche Behandlung mit UCN-01 noch mit TCS 2312 zeigte in den eingesetzten Konzentrationen eine Veränderung der Fluoreszenzintensitätsabnahme. Unabhängig von der Behandlung benötigten die Zellen für eine Zellteilung 17-18 Stunden. Das Proliferationsverhalten war somit nicht durch die CHK1-Inhibitoren beeinflusst.

2.1.6 Die CHK1-Inhibitoren hemmen CHK1 während der somatischen Hypermutationsmessung

Da die CHK1-Inhibitoren während der *GFP*-Reporteranalyse zwar über einen längeren Zeitraum, aber in geringeren Konzentrationen als gewöhnlich eingesetzt wurden, war ein Nachweis der Funktionalität der CHK1-Inhibitoren erforderlich. In Anwesenheit von DNA-Schäden induziert CHK1 einen Zellzyklusarrest, indem es u.a. den Abbau von CDC25A hervorruft¹⁹⁸. Zur Analyse des CDC25A-Abbauverhaltens wurde 16 Tage nach Inhibitorzugabe eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 2.2 D). Auch ohne die Induktion von exogenen DNA-Schäden führten die CHK1-Inhibitoren UCN-01 und TCS 2312 zur CDC25A-Akkumulation, während in der DMSO-Kontrolle eine deutlich geringere CDC25A-Expression nachgewiesen wurde. Dieses Resultat bestätigte die Hemmung der *Checkpoint*-Kinase 1.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dem verwendeten Modellsystem wirksamen CHK1-Inhibitoren UCN-01 und TCS 2312 eine Erhöhung der somatischen Hypermutation hervorriefen, die nicht auf eine herabgesetzte Vitalität oder ein verändertes Proliferationsverhalten zurückzuführen war.

2.2 Analyse der *Chk1*- und *p53*-Expression in Keimzentrums-B-Zellen von *Mus musculus*

Das *GFP*-Reportersystem lieferte einen deutlichen Hinweis für die Beteiligung von *Chk1* an der somatischen Hypermuation. Die *in vivo*-Situation setzt hierfür jedoch die Expression in KZ-B-Zellen voraus, in denen die somatische Hypermuation erfolgt. Ob *Chk1* in KZ-B-Zellen exprimiert wird, ist jedoch umstritten. In humanen Tonsillen wurde sowohl in Zentroblasten als auch in Zentrozyten eine hohe *Chk1*-Expression auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen^{291,292}. Demgegenüber steht jedoch eine Studie, die in demselben zellulären System in Zentroblasten eine Repression der *Chk1*-Transkription durch *Bcl6* dokumentierte²³⁷. Um zur Klärung dieses scheinbaren Widerspruchs beizutragen, wurde die *Chk1*-mRNA-Expression in KZ-B-Zellen von *Mus musculus* (*M. musculus*, Hausmaus) untersucht.

Murine KZ-B-Zellen zeichnen sich durch die distinkte Expression von folgenden Oberflächenmarkern aus: (I) Eine hohe Expression des B-Zellmarkers B220, (II) ein hohes CD95-Level, das für aktivierte B-Zellen spezifisch ist^{293,294} und (III) zahlreiche Galactosyl-Strukturen, die von dem Erdnuss-Agglutinin PNA (*peanut agglutinin*) erkannt werden^{295,296}.

Kelsoe und Kollegen setzten einen Meilenstein, indem sie den zeitlichen Verlauf der Keimzentrumsreaktion nach Immunisierung mit dem T-zellabhängigem Antigen 4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl-Hühner(*chicken*)- γ -Globulin (NP-CGG) genauestens charakterisierten^{97,297}. Demnach beginnt am Tag 4 nach Injektion die Ausbildung der Keimzentren, die am Tag 12 ihren Höhenpunkt erreicht und deren Anzahl anschließend stetig abnimmt⁹⁷. Mutationen in der V(D)J-Region können hingegen erst ab Tag 8 nach Injektion detektiert werden, während bis Tag 14 eine gleichmäßige Zunahme zu erkennen ist²⁹⁷.

2.2.1 *Chk1* wird in Keimzentrums-B-Zellen von *M. musculus* hoch exprimiert

Die experimentelle Vorgehensweise ist in Abbildung 2.3 A veranschaulicht. Am Tag 14 nach Immunisierung mit NP-CGG wurde die Milz aus C57BL/6-Mäusen isoliert und die KZ-B-Population (B220⁺ CD95⁺ PNA⁺) mit einem Zellsortierer von der naiven B-Zellpopulation (B220⁺ CD95⁻ PNA⁻) separiert. Aus den so gewonnenen Fraktionen wurde RNA isoliert, diese nachfolgend in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer RT (*real time*)-PCR-Analyse untersucht (Abbildung 2.3 B-G). Die

Untersuchung der Chk1/p53-Expression auf Proteinebene war aufgrund der zu geringen Zellausbeute nicht möglich.

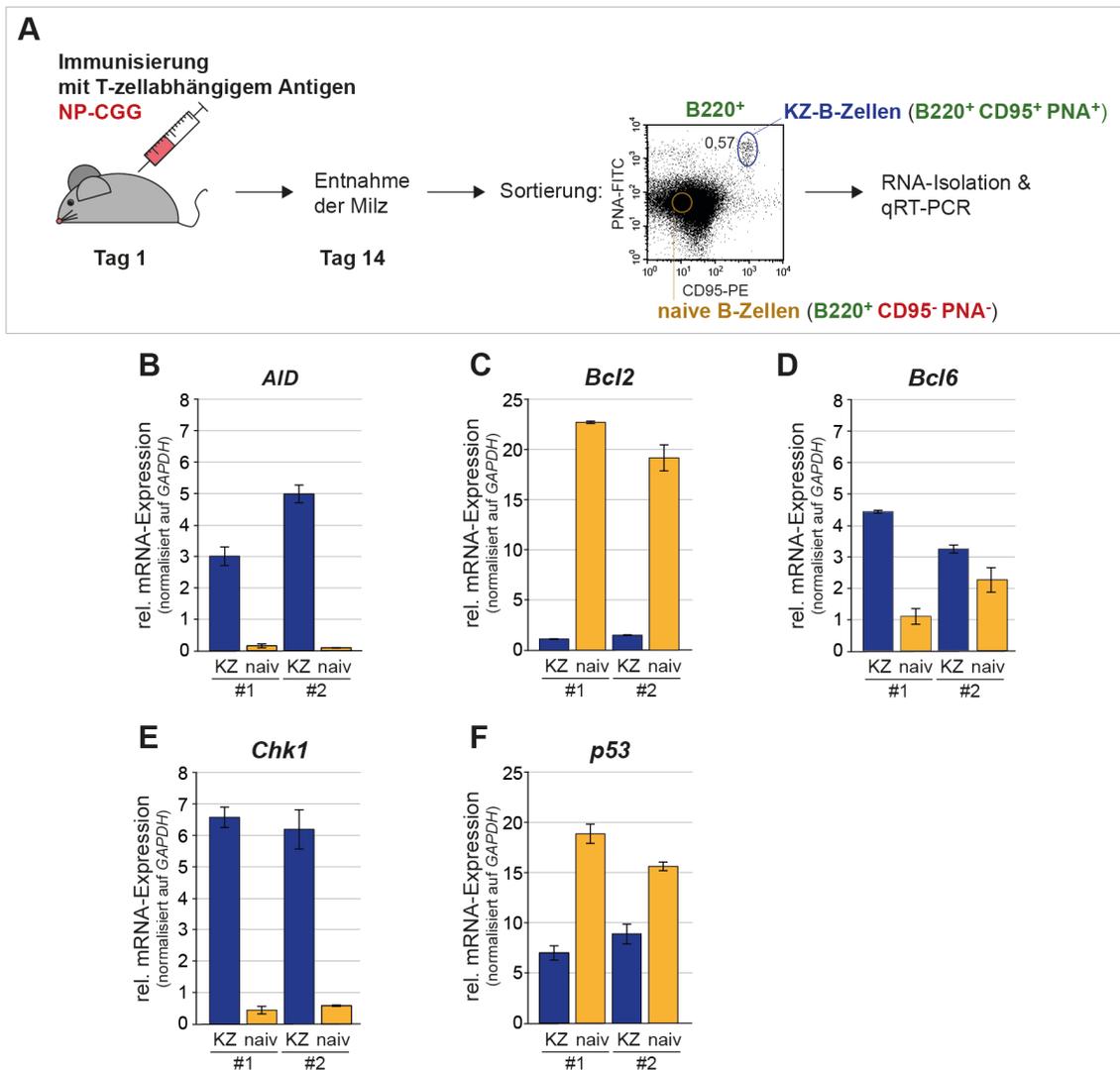


Abbildung 2.3: Hohe Chk1-Expression in murinen Keimzenters-B-Zellen

A. Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise. C57BL/6-Mäuse wurden mit NP-CGG immunisiert. Am Tag 14 wurde die Milz entnommen und anschließend erfolgte die Zellsortierung der KZ-B-Zellen (B220⁺ CD95⁺ PNA⁺) und naiven B-Zellen (B220⁺ CD95⁻ PNA⁻). Aus den erhaltenen Fraktionen wurde RNA isoliert und diese mittels qRT-PCR-Analysen untersucht.

B.-F. qRT-PCR-Analysen der naiven und KZ-B-Zellfraktionen von C57BL/6-Mäusen. Die Expressionswerte wurden auf *GAPDH* normalisiert. Zur besseren Veranschaulichung der Unterschiede zwischen der naiven und KZ-B-Zellfraktion wurde die y-Skala angepasst. Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von 2 aus 6 analysierten Mäusen (mit #1 und #2 bezeichnet). Die Standardabweichung wurde durch ein technisches Triplikat ermittelt.

Abkürzungen: KZ: KZ-B-Zellfraktion; naiv: naive B-Zellfraktion; qRT-PCR: quantitative *real-time*-PCR; rel.: relativ

Um die Reinheit der separierten Fraktionen zu überprüfen, wurde die mRNA-Expression von *AID* (Abbildung 2.3 B) und *Bcl2* untersucht (Abbildung 2.3 C). Wie erwartet, wies die KZ-B-Zellfraktion eine sehr hohe *AID*-Expression auf. Die mRNA-Expression des anti-apoptotisch wirkenden *Bcl2*-Gens war hingegen, wie in der Literatur bereits beschrieben, in der naiven B-Zellfraktion am höchsten und hob sich in der KZ-B-Zellfraktion nur geringfügig vom Hintergrund ab^{291,293}. Diese Resultate bestätigten die erfolgreiche Separierung der beiden Zellpopulationen und bildeten die Grundlage für die noch folgenden mRNA-Expressionsanalysen.

Interessanterweise war das Expressionsmuster von *Chk1* mit dem von *AID* nahezu identisch (vgl. Abbildung 2.3 E mit 2.3 B). Auch hier war eine hohe Expression in der KZ-B-Zellfraktion und eine sehr geringe Expression in der naiven B-Zellfraktion vorhanden. Die Expression des negativen Regulators der *Chk1*-Expression, *Bcl6*²³⁷, war auch in der KZ-B-Zellfraktion am höchsten, jedoch war der Expressionsunterschied zur naiven B-Zellpopulation nicht so drastisch (Abbildung 2.3 D). Dieses Resultat spiegelt aber vermutlich nicht das tatsächliche *Bcl6*-Level wider, da *Bcl6* vorwiegend auf Proteinebene reguliert wird²⁴¹.

2.2.2 *p53*-mRNA wird in Keimzentrums-B-Zellen von *M. musculus* trotz vorhandener *Bcl6*-mRNA-Expression gebildet

Der Transkriptionsfaktor *p53* ist ebenfalls eine sehr wichtige Komponente der Zellzykluskontrollpunkte und wird direkt von *Chk1* durch Phosphorylierung aktiviert^{298,299}. Auch die Expression von *p53* ist in KZ-B-Zellen umstritten. In der Burkitt-B-Lymphomzelllinie Ramos wurde eine direkte Repression durch *Bcl6* nachgewiesen²³⁸, wohingegen in primären Zentroblasten und diffus großzelligen B-Lymphomzellen (*diffuse large B cell lymphoma, DLBCL*) eine *p53*-Expression trotz vorhandener *Bcl6*-Expression beobachtet wurde²³⁶. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte bereits eine *p53*-Expression in KZ-B-Zellen von *M. musculus* dokumentieren²⁷⁰. Die hier vorgestellten Analysen bestätigten dieses Resultat und zeigten darüber hinaus, dass die *p53*-mRNA-Expression in KZ-B-Zellen trotz vorhandener *Bcl6*-mRNA-Expression nur geringfügig herabgesetzt wird (vgl. Abbildung 2.3 F mit 2.3 D).

Insgesamt betrachtet konnte eine deutliche Expression von *Chk1* und *p53* trotz vorhandener *Bcl6*-mRNA-Expression in KZ-B-Zellen von *M. musculus* nachgewiesen werden. Insbesondere die sehr hohe Expression von *Chk1* könnte auf eine wichtige Funktion dieser *Checkpoint*-Kinase in der Keimzentrumsreaktion hinweisen.

2.3 *Chk1*-Depletion in der Hühner-B-Lymphomzelllinie DT40

Um den Einfluss von *Chk1* auf die somatische Hypermutation näher zu charakterisieren, wurde die Generierung eines *Chk1-Knockouts* in Betracht gezogen. *Chk1*-deletierte Mausembryonen sterben jedoch bereits in einer sehr frühen Phase der Embryonalentwicklung (Embryonalstadium (E) 6,5)¹⁹⁷. Darüber hinaus ist die konditionelle *Chk1*-Inaktivierung in zahlreichen Zelltypen letal^{197,300-302}. *Chk1*-defiziente DT40-Zellen sind jedoch lebensfähig und zeigen nur eine geringfügig herabgesetzte Vitalität³⁰³. Da in diesem zellulären Modellsystem ebenfalls eine quantitative Messung der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion möglich ist, wurde ein *Chk1-Knockout* in dieser Zelllinie angestrebt.

2.3.1 Die DT40-Zelllinie als Modellsystem zur Untersuchung der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion

Die DT40-Zelllinie stammt von Hühner-B-Zellen eines bursalen Lymphoms ab, das durch den Aviären Leukose (AL)-Virus hervorgerufen wurde^{304,305} (Abbildung 2.4, links). Wie bei 70-90 % dieser klonalen Neoplasmen integrierte sich der AL-Virus in der DT40-Zelllinie in der Nähe des *c-Myc*-Proto-Onkogens und führte durch das virale, 3' gelegene Promotorelement (*long terminal repeat*, 3' LTR) zur *c-Myc*-Überexpression³⁰⁶⁻³⁰⁸. Da die Zelllinie im Entwicklungszustand einer bursalen B-Zelle arretiert ist, findet *in vitro* in dem rearrangierten *Ig_L*-Gen eine kontinuierliche Ig-Diversifizierung durch Ig-Genkonversion statt³⁰⁹⁻³¹¹. Matrizenunabhängige Nukleotidsubstitutionen, die vermutlich auf die somatische Hypermutation zurückzuführen sind, konnten ebenfalls detektiert werden, jedoch nur in einem sehr geringen Ausmaß^{310,311}.

Matrizenabhängige (Ig-Genkonversion) sowie matrizenunabhängige (somatische Hypermutation) Nukleotidsubstitutionen können durch Erzeugung von Leserasterverschiebungen oder Stopp-Codons in den rearrangierten *Ig*-Genen zum Verlust der Ig-Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche führen³¹². Die Entstehung von Ig-negativen Zellen ist jedoch aufgrund der nahezu fehlerfreien Integration der Pseudogensequenzen und der geringen somatischen Hypermutationsrate äußerst selten³¹² und deshalb in der ursprünglichen DT40-Zelllinie nur schwer quantifizierbar³¹⁰. Dieses Problem kann durch Verwendung der DT40CL18-Zelllinie umgangen werden (Abbildung 2.4, 2. Position von links). Hierbei handelt es sich um einen Subklon der ursprünglichen DT40-Zelllinie, der aufgrund einer Leserasterverschiebung IgM-negativ ist. Die Reversion der Leserasterverschiebung durch überlappende

Genkonversionsereignisse ist weitaus häufiger und kann durch Reexpression des Ig-Rezeptors gemessen werden³¹⁰.

Die DT40CL18-Zelllinie wurde von Arakawa und Kollegen mit einer induzierbaren Cre-Rekombinase ausgestattet, um die Generierung von Gen-*Knockouts* zu erleichtern³¹³. Darüber hinaus wurde ein *v-Myb*-Transgen in das Genom eingefügt und in einer der so generierten Subklone eine 5-fach höhere Ig-Genkonversionsaktivität festgestellt⁷⁶. Diese weiterentwickelte DT40-Zelllinie, die als DT40Cre1 bezeichnet wird, dient somit als Modellsystem zur Analyse der Ig-Genkonversion⁷⁶ (Abbildung 2.4, 2. Position von rechts).

Darauf folgend wurde bei der DT40Cre1-Zelllinie der endogene *AID*-Locus entfernt und anschließend eine *AID*-Überexpression durch ein genomisch-integriertes *AID-IRES-GFP*-Transgen erzeugt⁷⁷. Die Deletion des Pseudogen-Locus stromaufwärts des rearrangierten *Ig_L*-Gens hatte zudem eine vollständige Abschaltung der Ig-Genkonversion zur Folge⁷⁷. Parallel dazu ging diese genetische Veränderung mit einer stark erhöhten somatischen Hypermutationsaktivität einher⁷⁷. Ein pseudogen-deletierter, IgM-positiver Subklon mit *AID*-Überexpression, der als DT40ΨV⁻ bezeichnet wird, eignet sich somit ideal zur Untersuchung der somatischen Hypermutation⁷⁷ (Abbildung 2.4, rechts).

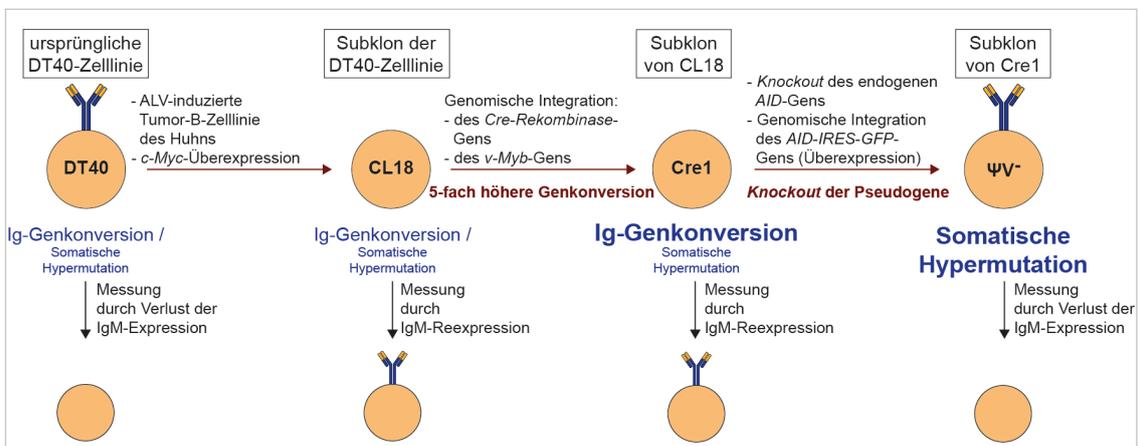


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des zellulären Hintergrunds der DT40Cre1- und DT40ΨV-Zelllinien

Die ursprüngliche DT40-Zelllinie ist eine ALV-induzierte B-Lymphomzelllinie des Huhns, die aufgrund der genomischen Integration des Virus eine *c-Myc*-Überexpression aufweist. CL18 ist ein IgM-negativer Subklon der ursprünglichen DT40-Zelllinie. Die Cre1-Zelllinie, ein Subklon der CL18-Zelllinie, enthält eine induzierbare Cre-Rekombinase sowie ein *v-Myb*-Transgen und zeigt eine 5-fach höhere Ig-Genkonversionsaktivität als die CL18-Zelllinie. Die ΨV⁻-Zelllinie wurde aus der Cre1-Zelllinie generiert: Der endogene *AID*-Locus und die Pseudogene, die als Grundlage für die Ig-Genkonversion dienen, wurden deletiert und ein *AID-IRES-GFP*-Transgen in das Genom integriert. Die Ig-Genkonversionsrate bzw. die somatische Hypermutationsrate wird abhängig vom IgM-Status durch Messung des IgM-Expressionsverlusts oder der IgM-Reexpression ermittelt. Die Schriftgröße von „Ig-Genkonversion“ und „Somatische Hypermutation“ dient zur Verdeutlichung, in welchem Ausmaß der entsprechende Ig-Diversifizierungsprozess in etwa stattfindet.

2.3.2 *Chk1*-Depletion in der DT40Cre1- und DT40ΨV-Zelllinie

Der *Chk1-Knockout* wurde von Zachos *et al.* (2003) in der ursprünglichen DT40-Zelllinie durchgeführt³⁰³. Um den Einfluss von Chk1 auf die Ig-Diversifizierung quantitativ bestimmen zu können, war jedoch in der vorliegenden Doktorarbeit die Generierung eines *Chk1-Knockouts* in den weiterentwickelten Zelllinien DT40Cre1 und DT40ΨV erforderlich. Hierfür wurden uns die *Targeting*-Vektoren von Zachos und Kollegen freundlicherweise zur Verfügung gestellt³⁰³.

Die DT40-Zelllinie ist durch eine hohe Rate der gezielten genomischen Integration eines *Knockout*-Konstrukts gekennzeichnet³¹⁴. So werden auf dem *Targeting*-Vektor lediglich zwei etwa 1,5 kb lange zum Zielgen homologe DNA-Bereiche (5' und 3' Arme) benötigt, die sich angrenzend an eine Resistenzkassette befinden³¹². Um eine höhere Flexibilität zu gewährleisten, wurden von uns die in den *Targeting*-Vektoren enthaltenen Resistenzkassetten durch loxP-flankierte Varianten³¹³ ersetzt. Die Größe des durch die Resistenzkassette deletierten Bereichs wird durch die Position der homologen Arme festgelegt³¹². Die *Chk1-Knockout*-Strategie von Zachos und Kollegen wurde so konzipiert, dass die Exons 7 bis 9 nahezu vollständig entfernt werden³⁰³ (Abbildung 2.5 A). Dieser Bereich des *Chk1*-Gens kodiert für eine essenzielle Region der Chk1-Kinasedomäne, so dass ein trunkiertes Polypeptid, das möglicherweise von den mutierten Allelen noch gebildet wird, nicht funktionell ist³⁰³.

2.3.2.1 Hinweise auf mehr als zwei *Chk1*-Allele in der DT40ΨV-Zelllinie

In Abbildung 2.5 B-D ist die Generierung des *Chk1-Knockouts* anhand von repräsentativen Subklonen der DT40ΨV-Zelllinie dargestellt. Um die gezielte Integration des Vektors in den *Chk1*-Locus zu überprüfen, wurde eine PCR durchgeführt, bei der sich eine Primerbindestelle innerhalb des eingeführten Resistenzgens und eine außerhalb des homologen 5' Arms im *Chk1*-Locus befand (Abbildung 2.5 A & B, Primer #1-3). Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Resistenzkassetten ermöglichte die Unterscheidung zwischen den beiden auf diese Weise mutierten Allelen. Die Produkte der PCR-Strategie bestätigten die erfolgreiche Integration der Resistenzkassetten in die beiden *Chk1*-Allele (Abbildung 2.5 B).

Für eine weiterführende Analyse der genomischen Integration wurde ein Southern-Blot durchgeführt (Abbildung 2.5 C). Die verwendete Sonde bindet im homologen 3' Arm und erkennt nach BamHI-Spaltung der genomischen DNA ein 6 kb großes DNA-Fragment für das *Chk1*-Wildtyp-Allel und ein 4,6 kb großes DNA-Fragment für das mutierte *Chk1*-Allel. Nach Deletion des 1. *Chk1*-Allels war eine schwache Bande auf der Höhe von 4,6 kb (das mutierte *Chk1*-Allel) und eine starke Bande auf der Höhe von

6 kb (das *Chk1*-Wildtyp-Allel) erkennbar. Erstaunlicherweise war jedoch in den Zellen mit zwei mutierten *Chk1*-Allelen immer noch die Bande des Wildtyp-Allels detektierbar. Die Bandenintensität des Wildtyp- und des mutierten Allels war in diesem Fall allerdings vergleichbar. Unter der Annahme, dass sich die *Targeting*-Vektoren korrekt in den *Chk1*-Locus integriert hatten, wies das Bandenmuster auf das Vorhandensein von zwei weiteren *Chk1*-Wildtyp-Allelen hin.

Die Verwendung einer PCR-Strategie (Abbildung 2.5 A & B, Primer #4 & #5), die nur ein Produkt bei noch vorhandenen *Chk1*-Wildtyp-Allelen erzeugt, bestätigte die Anwesenheit eines oder mehrerer *Chk1*-Wildtyp-Allele, obwohl bereits zwei *Chk1*-Allele mutiert wurden. Neben der Durchführung von RT-PCR-Analysen, die eine noch vorhandene *Chk1*-mRNA-Expression nachwiesen (Daten nicht gezeigt), wurden die generierten Subklone auch auf Proteinebene mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 2.5 D). Die *Chk1*-Proteinmenge war zwar in den Zellen mit zwei mutierten *Chk1*-Allelen substanziell herabgesetzt, es konnte jedoch immer noch mit einem monoklonalen Antikörper eine Bande auf der prognostizierten Höhe von 56 kDa nachgewiesen werden.

2.3.2.2 Hinweise auf mehr als zwei *Chk1*-Allele in der DT40Cre1-Zelllinie

Um auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen um einen zelllinienspezifischen Effekt handelte, der nur in der DT40 Ψ V-Zelllinie auftrat, wurde dieselbe *Chk1*-*Knockout*-Strategie in der DT40Cre1-Zelllinie angewendet. Mit der Intention die Integration der Resistenzkassetten in höherem Maße zu kontrollieren, wurden jedoch *Chk1*-*Targeting*-Vektoren mit einer unterschiedlichen Orientierung der Resistenzkassetten eingesetzt. Somit konnte mit einer PCR-Strategie die korrekte Integration beider Resistenzkassetten sowohl 5' als auch 3' erfolgreich bestätigt werden (Abbildung 2.6 A & B). Die Southern-Blot-Analyse (Abbildung 2.6 C) und die PCR für die Amplifikation des Wildtyp-Allels (Abbildung 2.6 B, Primer #4 & 5) zeigten aber, dass auch in der DT40Cre1-Zelllinie mehr als zwei *Chk1*-Allele vorhanden waren. Die Analyse der *Chk1*-Proteinexpression bekräftigte dieses Resultat (Abbildung 2.6 D). Wie bereits in der DT40 Ψ V-Zelllinie war nach Mutation von zwei *Chk1*-Allelen zwar eine graduelle Reduktion, aber keine vollständige Abschaltung der *Chk1*-Expression zu beobachten.

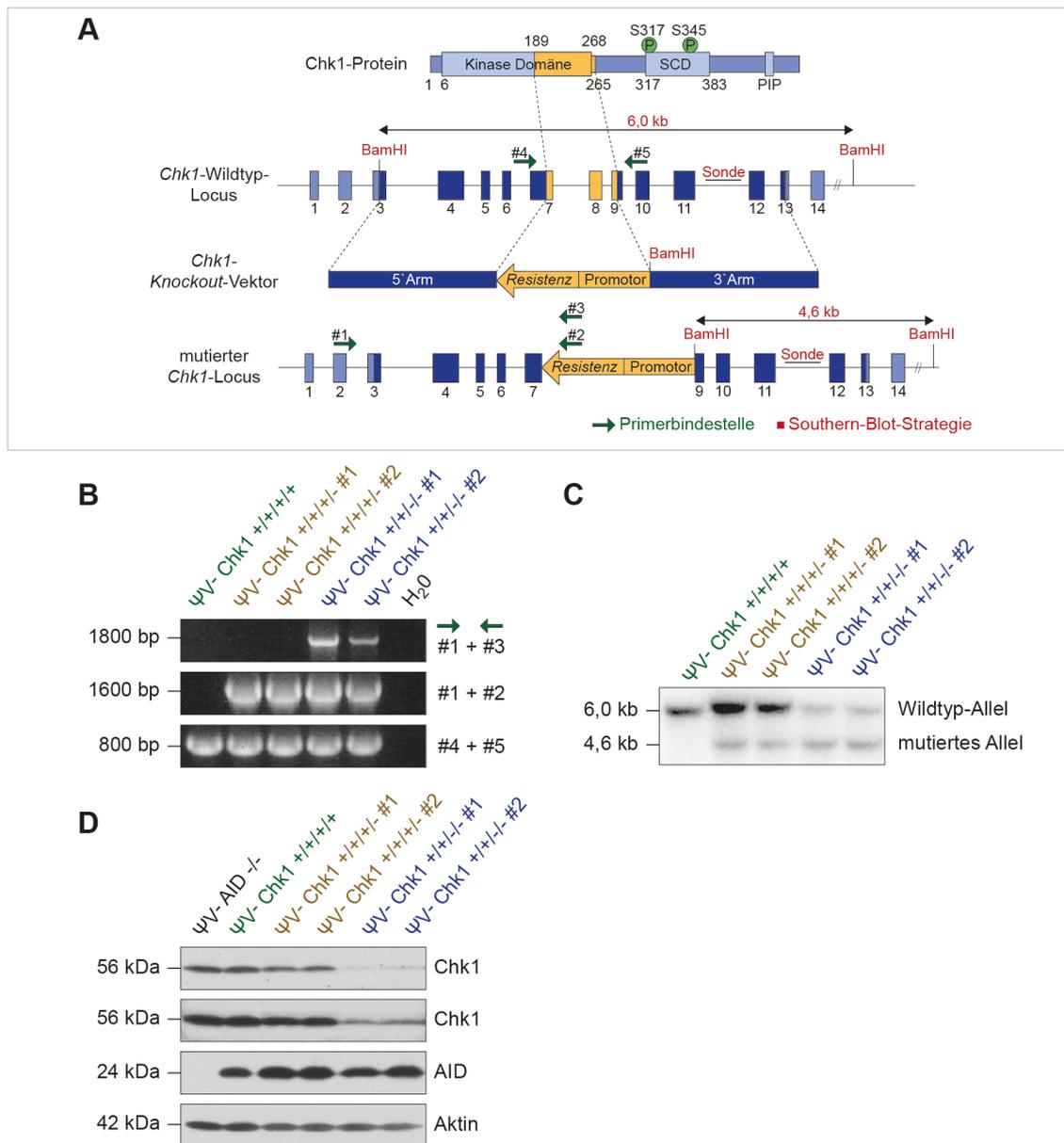


Abbildung 2.5: Nachweis der Inaktivierung des 1. und 2. *Chk1*-Allels in der DT40ΨV-Zelllinie
 A. Schematische Darstellung der *Chk1*-Knockout-Strategie. Die Position und die Anzahl der Exons wurden durch *Alignment* der *Chk1*-mRNA und z.T. unvollständigen Daten des *G. gallus*-Genoms ermittelt. Die Zahlen unterhalb der Loci kennzeichnen die *Chk1*-Exons und unter- sowie oberhalb des *Chk1*-Proteins die Aminosäurepositionen. Die grünen Pfeile stehen für die ungefähren Bindestellen der mit # gekennzeichneten Primer der in Abbildung 2.5 B. angewendeten PCR-Strategie. Die deletierte Region und die Resistenzkassetten sind gelb und die homologen Arme dunkelblau dargestellt. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.
 B. PCR-Strategie über den 5' Arm zum Nachweis der gerichteten Integration der Resistenzkassetten in die *Chk1*-Allele. Der Primer #1, der außerhalb des 5' Arms bindet, diente in Kombination mit Primer #2 bzw. #3 zum Nachweis der gerichteten Integration der *Blastizidin*- bzw. *GPT*-Resistenzkassette. Das Primerpaar #4 und #5 diente zur Amplifikation des *Chk1*-Wildtyp-Allels.
 C. Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der gerichteten Integration der Resistenzkassetten in die *Chk1*-Allele. Die Southern-Blot-Strategie ist in Abbildung 2.5 A rot dargestellt. Die Sonde bindet im 3' Arm und erkennt ein 6,0 kb großes Fragment des *Chk1*-Wildtyp-Allels und ein 4,6 kb großes Fragment des mutierten *Chk1*-Allels.
 D. Repräsentative Western-Blot-Analyse zum Nachweis des herabgesetzten *Chk1*-Proteinlevels nach Inaktivierung des 2. *Chk1*-Allels. Es sind zwei unterschiedliche *Chk1*-Expositionen dargestellt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.
 Abkürzungen: (P): Phosphorylierungsstellen an Serin 317 und Serin 345 durch ATM/ATR; PIP: PCNA-interagierendes Peptid; Promotor: β -Aktin-Promotor; *Resistenz*: Resistenzgen; SCD: SQ/TQ Cluster-Domäne

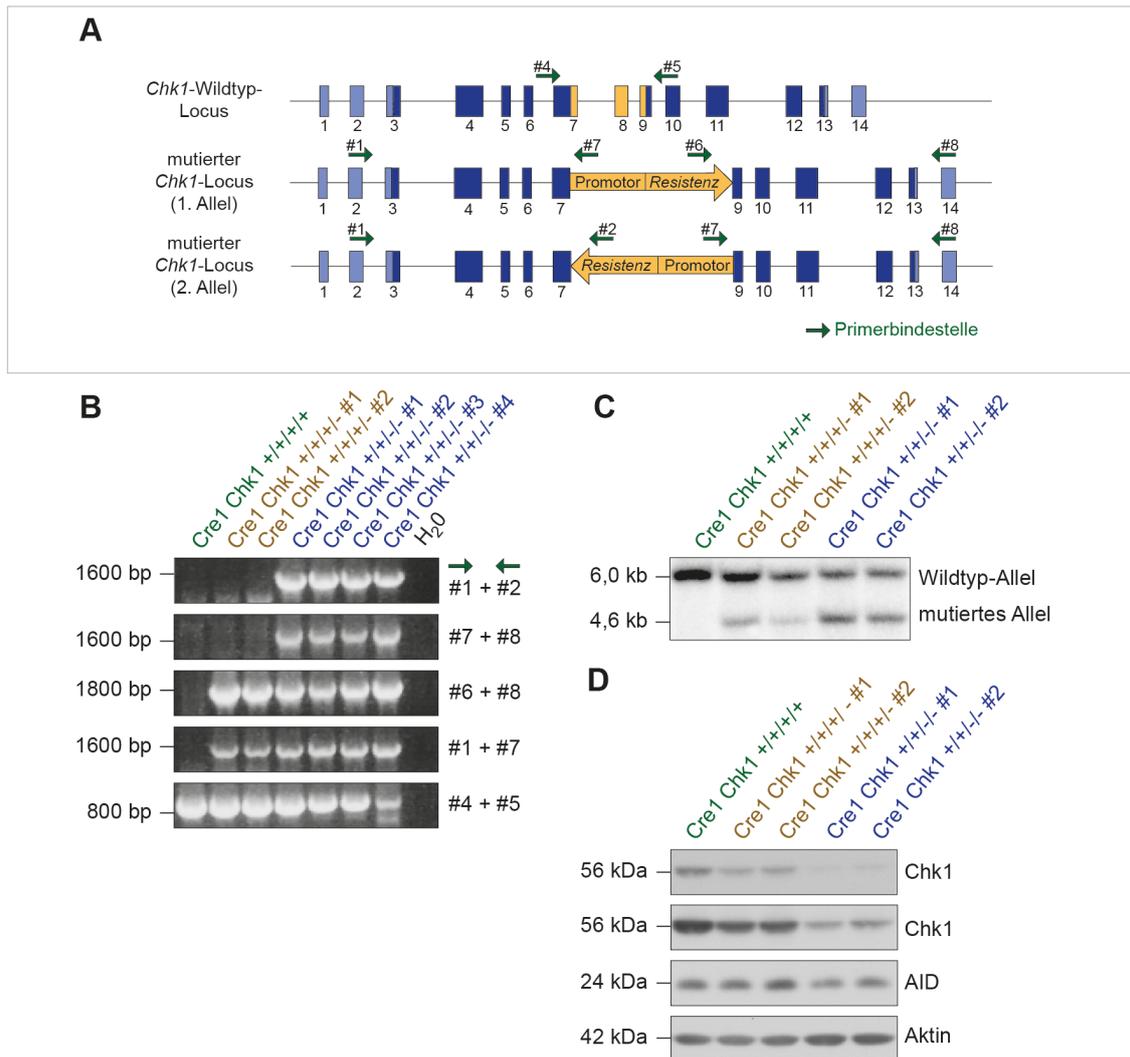


Abbildung 2.6: Nachweis der Inaktivierung des 1. und 2. *Chk1*-Allels in der DT40Cre1-Zelllinie

A. Schematische Darstellung der Primerbindestellen für die in Abbildung 2.6 B verwendete *Targeting*-PCR-Strategie. In der DT40Cre1-Zelllinie wurden in die *Chk1*-Allele eine *Puromycin*-Resistenzkassette in 3'-5'-Orientierung und eine *Blastizidin*-Resistenzkassette in 5'-3'-Orientierung eingebracht. Diese *Knockout*-Strategie ermöglichte den Nachweis der korrekten Integration der Resistenzkassetten. Die grünen Pfeile stehen für die ungefähren Bindestellen der mit # gekennzeichneten Primer. Die Zahlen kennzeichnen die *Chk1*-Exons. Die deletierte Region und die Resistenzkassetten sind gelb und die homologen Arme dunkelblau dargestellt.

B. PCR-Strategie über den 5' und 3' Arm zum Nachweis der gerichteten Integration der Resistenzkassetten in die *Chk1*-Allele. Der Primer #1, der außerhalb des 5' Arms bindet, diente in Kombination mit Primer #2 und #7 zum Nachweis der gerichteten Integration der Resistenzkassetten über den 5' Arm. Der Primer #8, der außerhalb des 3' Arms bindet, diente in Kombination mit Primer #6 und #7 zum Nachweis der gerichteten Integration der Resistenzkassetten über den 3' Arm. Das Primerpaar #4 und #5 diente zur Amplifikation des *Chk1*-Wildtyp-Allels.

C. Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der gerichteten Integration der Resistenzkassetten in die *Chk1*-Allele. Die Southern-Blot-Strategie ist in Abbildung 2.5 A rot dargestellt. Die Sonde bindet im 3' Arm und erkennt ein 6,0 kb großes Fragment des *Chk1*-Wildtyp-Allels und ein 4,6 kb großes Fragment des mutierten *Chk1*-Allels.

D. Repräsentative Western-Blot-Analyse zum Nachweis des herabgesetzten Chk1-Proteinlevels nach Inaktivierung des 2. *Chk1*-Allels. Es sind zwei unterschiedliche Chk1-Expositionen dargestellt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

2.3.2.3 Versuche zur vollständigen Inaktivierung der *Chk1*-Expression in den DT40ΨV- und DT40Cre1-Zelllinien

Der Karyotyp der Hühner-B-Zelllinie DT40 wird als stabil angesehen³¹⁵ und ist durch eine Trisomie des Chromosoms 2, eine Monosomie des Chromosoms 4 und ein zusätzliches Mikrochromosom gekennzeichnet^{315,316}. Erst kürzlich konnten Neiman und Kollegen mit Hilfe der *Microarray*-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, Array-CGH) das zusätzliche Mikrochromosom der DT40-Zelllinie dem Mikrochromosom 24 zuordnen³¹⁷. Auf diesem befindet sich in *G. gallus* laut Informationen des Nationalen Zentrums für Biotechnologieinformation (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) das *Chk1*-Gen. Die Bandenintensitäten der Southern-Blot-Analyse (Abbildungen 2.5 C & 2.6 C) deuten ebenfalls auf die Anwesenheit von mehr als zwei *Chk1*-Allelen in den DT40ΨV- und DT40Cre1-Zelllinien hin. Diese Informationen veranlassten uns, weitere *Chk1*-Allele in der DT40-Zelllinie zu mutieren, mit dem Ziel eine vollständige Inaktivierung von *Chk1* zu erreichen.

In der DT40ΨV-Zelllinie konnte das 1. und 2. *Chk1*-Allel mit einer durchschnittlichen *Targeting*-Effizienz von 28,4 % bzw. 31,3 % inaktiviert werden (Tabelle 2.1). Der *Knockout* des 3. *Chk1*-Allels wurde jedoch nur mit einer etwa 25-fach geringeren *Targeting*-Effizienz von durchschnittlich 1,2 % erzielt. In der DT40Cre1-Zelllinie konnte der *Knockout* des 3. *Chk1*-Allels hingegen in 23,9 % der generierten Subklone erreicht werden, während die Inaktivierung des 1. und 2. *Chk1*-Allels mit einer etwas höheren *Targeting*-Effizienz von 48,2 % bzw. 40,2 % möglich war.

Tabelle 2.1: *Chk1*-Targeting-Effizienzen der DT40Cre1- und DT40ΨV-Zelllinien

Zelllinie	<i>Chk1</i> - <i>Knockout</i>	Anzahl der selektions- resistenten Klone	Anzahl der PCR- positiven Klone	<i>Targeting</i> - Effizienz (%)
Cre1	1. Allel	83	40	48,2
ΨV-	1. Allel	67	19	28,4
Cre1	2. Allel	194	78	40,2
ΨV-	2. Allel	48	15	31,3
Cre1	3. Allel	46	11	23,9
ΨV-	3. Allel	248	3	1,2

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Exakter Test nach Fisher

Zur Verifizierung wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt, die auch noch nach dem *Knockout* von 3 *Chk1*-Allelen die Bande des Wildtyp-Allels zeigte, diese jedoch nun eine schwächere Intensität als die Bande des mutierten Allels aufwies (Abbildung 2.7). Dieses Resultat deutete auf das Vorhandensein von noch einem *Chk1*-Wildtyp-Allel, von insgesamt 4 *Chk1*-Allelen, hin. Die Inaktivierung des 4. *Chk1*-Allels wurde aufgrund der höheren *Chk1-Targeting*-Effizienz in der DT40Cre1-Zelllinie versucht, allerdings erfolglos.

Insgesamt betrachtet konnte das 3. *Chk1*-Allel, im Vergleich zum 1. und 2. *Chk1*-Allel, in beiden DT40-Zelllinien nur mit einer geringeren *Targeting*-Effizienz inaktiviert werden. Im Gegensatz zur DT40Cre1-Zelllinie war die *Targeting*-Effizienz des 3. *Chk1*-Allels jedoch bei der DT40ΨV-Zelllinie noch stärker reduziert (23,9 % vs. 1,2 %). Diese Diskrepanz spiegelte sich auch beim *Knockout* des 1. und 2. *Chk1*-Allels wider, allerdings war der Unterschied ausschließlich bei Inaktivierung des 3. *Chk1*-Allels hoch signifikant ($p < 0,001$).

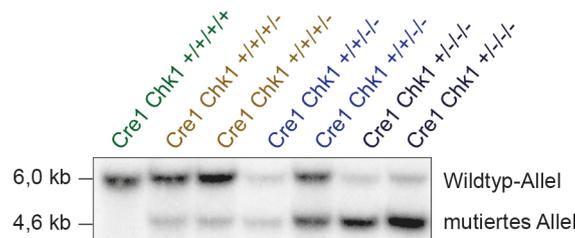


Abbildung 2.7: Nachweis der Inaktivierung des 3. *Chk1*-Allels in der DT40Cre1-Zelllinie
 Repräsentative Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der gerichteten Integration der Resistenzkassetten in die *Chk1*-Allele. Die Southern-Blot-Strategie ist in Abbildung 2.5 A rot dargestellt. Die Sonde bindet im 3' Arm und erkennt ein 6,0 kb großes Fragment des *Chk1*-Wildtyp-Allels und ein 4,6 kb großes Fragment des mutierten *Chk1*-Allels.

2.4 DT40-Zelllinien mit zwei mutierten *Chk1*-Allelen zeigen eine Beeinträchtigung der *Chk1*-Funktion

Die bisher erzielten Resultate wiesen in der DT40ΨV- und DT40Cre1-Zelllinie auf vier *Chk1*-Allele hin, von denen drei mutiert werden konnten. Insbesondere beim *Knockout* des 3. *Chk1*-Allels divergierten die *Targeting*-Effizienzen sehr stark. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde deshalb untersucht, ob bereits die Zellen mit zwei mutierten *Chk1*-Allelen eine funktionelle Beeinträchtigung zeigten und diese für die Analyse der Ig-Diversifizierung eingesetzt werden könnten.

In *Chk1*-heterozygotem Gewebe von Mäusen wurde bereits eine Haploinsuffizienz von *Chk1* bezüglich des CDC25A-Abbaus festgestellt³⁰⁰. Um die Funktionalität von *Chk1* in DT40-Zellen mit mutierten *Chk1*-Allelen zu untersuchen, wurden diese deshalb mit UV-Licht (15 J/m^2) bestrahlt und das CDC25A-Degradationsverhalten untersucht

(Abbildung 2.8 A & B). In der *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie war bereits 60 Minuten nach UV-Bestrahlung ein starker CDC25A-Abbau zu erkennen. Dieser war bei den DT40-Zellen mit zwei mutierten *Chk1*-Allelen deutlich beeinträchtigt, was auf eine herabgesetzte Chk1-Funktionalität in diesen Zellen schließen lässt. Es muss jedoch bemerkt werden, dass die differenzielle CDC25A-Degradation nicht immer in dieser Eindeutigkeit nachgewiesen werden konnte. Dies ist vermutlich auf die lediglich partielle *Chk1*-Inaktivierung zurückzuführen.

Neben der Regulation der CDC25-Phosphatasen ist Chk1 an Reparaturprozessen wie der homologen Rekombinationsreparatur, dem Fanconi-Anämie-Signalweg und der Transläsionssynthese beteiligt (Abschnitt 1.5.3.2). Um die Herabsetzung der Chk1-Funktionalität zu validieren, wurde das Überleben der DT40-Zellen mit mutierten *Chk1*-Allelen in Anwesenheit von DNA-schädigenden Substanzen mittels eines Kolonie-Überlebensexperimentes überprüft. Hierfür wurden die Zellen in definierter Zellzahl in Duplikaten auf Methylzellulose-Medium ausplattiert, das Cis-Diamin(dichloro)platin (Cisplatin) oder Methylmethansulfonat (MMS) enthielt, und anschließend die Kolonienanzahl nach mehrtägiger Inkubation bestimmt.

Cisplatin führt zur Bildung von DNA-Intrastrang- und DNA-Interstrangquervernetzungen³¹⁸, die durch den Fanconi-Anämie-Signalweg, die homologe Rekombinationsreparatur, die Transläsionssynthese und die Nukleotidexzisionsreparatur beseitigt werden³¹⁹.

MMS ist hingegen ein methylierendes Agens, das hauptsächlich zur Erzeugung von N⁷-Methylguanin führt³²⁰. An der Entfernung dieser DNA-Addukte und der dadurch entstandenen DNA-Schäden ist neben der Basenexzisionsreparatur auch die homologe Rekombinationsreparatur beteiligt^{321,322}.

Sowohl in Gegenwart von Cisplatin als auch MMS war im Vergleich zur *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie in den DT40-Zellen mit mutierten *Chk1*-Allelen eine erhebliche Dezimierung der relativen Kolonienanzahl zu beobachten (Abbildung 2.7 C & D). Dieser Effekt war in den DT40-Zelllinien mit zwei mutierten *Chk1*-Allelen am deutlichsten, interessanterweise zeigten aber auch die DT40-Zelllinien mit einem mutierten *Chk1*-Allel eine starke Reduktion der relativen Kolonienanzahl.

Insgesamt gesehen weisen die Untersuchungen der CDC25A-Degradation und des Überlebens nach Induktion von DNA-Schäden auf eine funktionelle Beeinträchtigung der Chk1-Funktion in DT40-Zellen mit zwei mutierten *Chk1*-Allelen hin. In Anbetracht der hohen genetischen Instabilität nach vollständiger Entfernung von *Chk1* in DT40-Zellen²³¹ und des Hinweises auf eine möglicherweise essenzielle Funktion von Chk1 in DT40-Zellen mit hoher Ig-Diversifizierungsaktivität wurden für die nachfolgenden funktionellen Analysen DT40-Zellen mit nur zwei mutierten *Chk1*-Allelen eingesetzt.

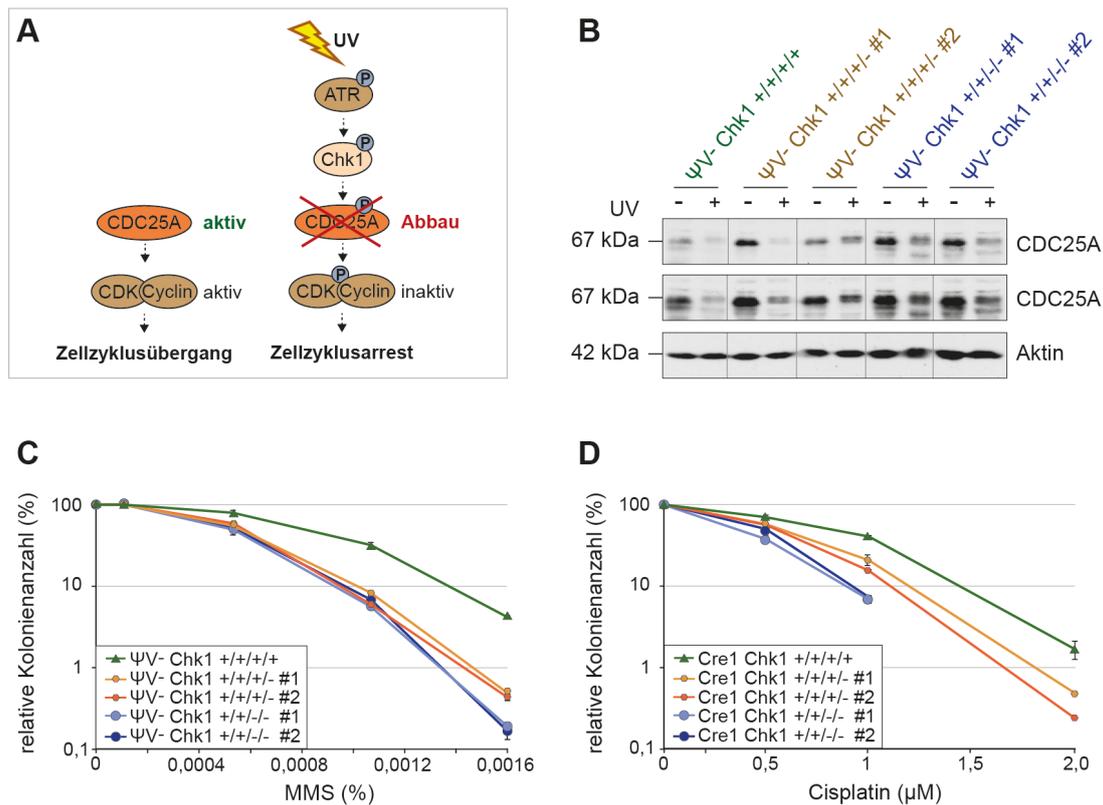


Abbildung 2.8: Beeinträchtigung der Chk1-Funktionalität nach Inaktivierung des 2. *Chk1*-Allels
 A. Vereinfachte Darstellung des CDC25A-Abbaus in der G2-Phase des Zellzyklus. Bei durch UV-Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schäden phosphoryliert ATR die Checkpoint-Kinase 1. Chk1 phosphoryliert daraufhin die Phosphatase CDC25A und induziert dadurch deren Abbau. Es erfolgt ein G2/M-Zellzyklusarrest, da die inhibitorische Phosphorylierung des CDK/Cyclin-Komplexes nicht entfernt wird.
 B. Untersuchung der Chk1-Funktionalität in der DT40ΨV-Zelllinie mit einer CDC25A-Western-Blot-Analyse. Die Zellen wurden mit 15 J/m² UV bestrahlt und nach 60 Minuten auf den CDC25A-Abbau untersucht. Es sind zwei CDC25A-Expositionen dargestellt. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.
 C. Untersuchung der Chk1-Funktionalität in der DT40ΨV-Zelllinie in Gegenwart von MMS mit einem Kolonie-Überlebensexperiment. Im Diagramm ist jeweils die relative Kolonienanzahl in Prozent in den untersuchten MMS-Konzentrationen unter Verwendung einer logarithmischen Skala dargestellt.
 D. Untersuchung der Chk1-Funktionalität in der DT40Cre1-Zelllinie in Gegenwart von Cisplatin mit einem Kolonie-Überlebensexperiment. Im Diagramm ist jeweils die relative Kolonienanzahl in Prozent in den untersuchten Cisplatin-Konzentrationen unter Verwendung einer logarithmischen Skala dargestellt.

2.5 Rekonstitution der DT40 *Chk1*^{+/-/-}-Zelllinien und Analyse der Proliferationsrate

Um die Spezifität eines Phänotyps verifizieren zu können, wurden die *Chk1*^{+/-/-}-Subklone der DT40ΨV- und der DT40Cre1-Zelllinie mit einem Hämagglutinin (HA)-modifizierten *Chk1*-Transgen rekonstituiert. In Abbildung 2.9 A und B ist eine Western-Blot-Analyse der generierten Zellsets dargestellt. In der DT40ΨV-Zelllinie wiesen die *Chk1*-rekonstituierten Subklone (*Chk1*^{Rek.}) im Vergleich zur *Chk1*^{+/+}-Zelllinie eine schwache *Chk1*-Überexpression auf (Abbildung 2.9 A). Im DT40Cre1-Zellset zeigten die *Chk1*-rekonstituierten Subklone hingegen eine mit der *Chk1*^{+/+}-Zelllinie vergleichbare *Chk1*-Expression (Abbildung 2.9 B).

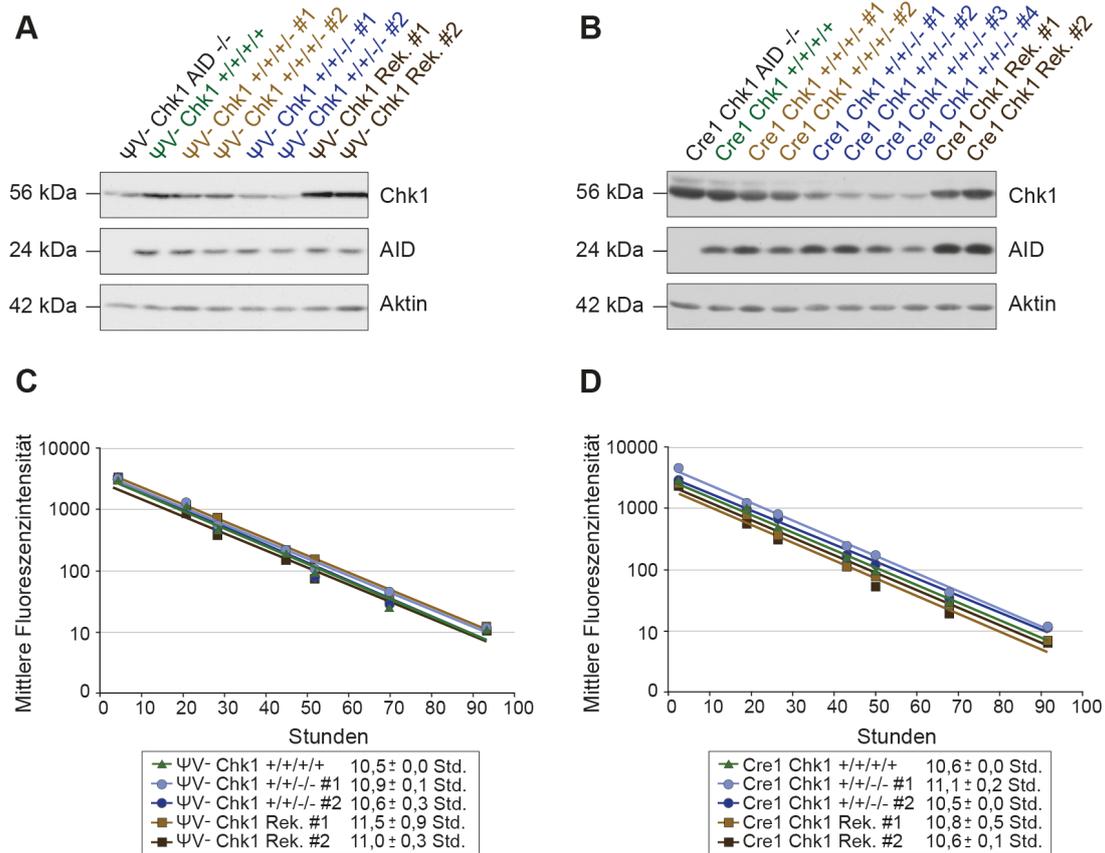


Abbildung 2.9: Vergleichbare AID-Expression und ähnliche Proliferationsgeschwindigkeiten in den generierten DT40-Zellsets

A. Repräsentative Western-Blot-Analyse des DT40ΨV-Zellsets zur Analyse der Chk1- und AID-Expression. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

B. Repräsentative Western-Blot-Analyse des DT40Cre1-Zellsets zur Analyse der Chk1- und AID-Expression. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

C. Ermittlung der Proliferationsgeschwindigkeiten der DT40ΨV-Zelllinien mittels CFSE-Färbung über einen Zeitraum von 4 Tagen. Darstellung der Exponentialfunktionen, die als Grundlage für die Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeiten dienen. Die Werte unterhalb der Diagramme geben die benötigten Stunden pro Zellteilung an. Die Standardabweichung wurde aus Duplikaten (zwei separaten Versuchsansätzen) ermittelt. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Experimenten dargestellt.

D. Ermittlung der Proliferationsgeschwindigkeiten der DT40Cre1-Zelllinien. Beschreibung siehe C.

Wie bereits bei der Inaktivierung der *Chk1*-Allele zu sehen, hatte die Herabsetzung des Chk1-Proteinlevels keine Auswirkung auf die AID-Expression (Abbildungen 2.5 D und 2.6 D). Auch in den *Chk1*-rekonstituierten DT40ΨV-Zelllinien waren mit der *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie vergleichbare AID-Proteinlevel vorhanden (Abbildung 2.9 A). Im DT40Cre1-Zellset wurden in dem dargestellten Western-Blot leichte, jedoch nicht konsistente Schwankungen im AID-Proteinlevel nachgewiesen, die keine Korrelation mit dem Chk1-Proteinlevel zeigten (vgl. Abbildung 2.9 B mit 2.6 D).

Um einen Einfluss auf die Ig-Diversifizierung durch ein verändertes Proliferationsverhalten auszuschließen, wurden das DT40ΨV- (Abbildung 2.9 C) und das DT40Cre1-Zellset (Abbildung 2.9 D) außerdem einer CFSE-Färbung unterzogen und so die Proliferationsrate bestimmt. In beiden Zellsets betrug die im Durchschnitt

benötigte Zeit pro Zellteilung 10-11 Stunden und wurde durch die *Chk1*-Depletion oder -Rekonstitution nicht beeinflusst.

2.6 Untersuchung der somatischen Hypermutation in *Chk1*-depletierten DT40ΨV-Zelllinien

In der humanen B-Lymphomzelllinie Raji konnte mit dem verwendeten Reportersystem bereits eine Erhöhung der somatischen Hypermutation bei *Chk1*-Inhibition nachgewiesen werden. Um dieses Resultat zu verifizieren und den Einfluss von *Chk1* auf die somatische Hypermutation näher zu charakterisieren, wurde die somatische Hypermutationsrate in *Chk1*-depletierten DT40ΨV-Zellen untersucht.

2.6.1 *Chk1*-depletierte DT40ΨV-Zelllinien weisen eine erhöhte somatische Hypermutationsrate auf

Wie bereits in Abschnitt 2.3.1 erwähnt, handelt es sich bei der DT40ΨV-Zelllinie um ein Modellsystem zur Messung der somatischen Hypermutation (Abbildung 2.10)⁷⁷. AID führt in die *Ig*-Loci der IgM-positiven DT40ΨV-Zelllinie DNA-Läsionen ein, die durch fehlerbehaftete Reparaturmechanismen zu Mutationen umgesetzt werden⁷⁷. Ein bestimmter Anteil dieser Mutationen resultiert jedoch in Stopp-Codons, Leserasterverschiebungen oder verhindert die Paarung der schweren und leichten Kette, wodurch die Expression des IgM-Rezeptors auf der Zelloberfläche unterbunden wird⁷⁷. Der Anteil an IgM-negativen Zellen zeigt somit eine direkte Korrelation mit der somatischen Hypermutationsrate⁷⁷.

Die quantitative somatische Hypermutationsmessung ging initial von der Vereinzelung der IgM-positiven DT40ΨV-Zelllinien aus (Abbildung 2.10, rechte Spalte). Um Variationen innerhalb des Experiments auszuschließen, wurden mindestens zwei Zelllinien von den Genotypen *Chk1*^{+/+/+/-}, *Chk1*^{+/+/-/-} und *Chk1*^{Rek.} eingesetzt. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass die *Chk1*^{+/+/-/-}- und *Chk1*^{Rek.}-Zelllinien jeweils von einem unterschiedlichen parental Ausgangsklon abstammen. Es wurden 30-50 Subklone pro zu untersuchender Zelllinie bis zu zwei Wochen kultiviert. Die Einzelzellklone wurden mit einem α-IgM-Antikörper gefärbt und anschließend mittels durchflusszytometrischer Analyse zweimal im Abstand von etwa 7 Tagen auf den prozentualen Anteil an IgM-negativen Zellen untersucht. Um das Ergebnis der IgM-Messung durch Sequenzierung des *Ig_L*-Locus verifizieren zu können, wurden repräsentative Subklone bis zu 12 Wochen in Kultur gehalten und von diesen wöchentlich Proben für die Präparation der genomischen DNA entnommen.

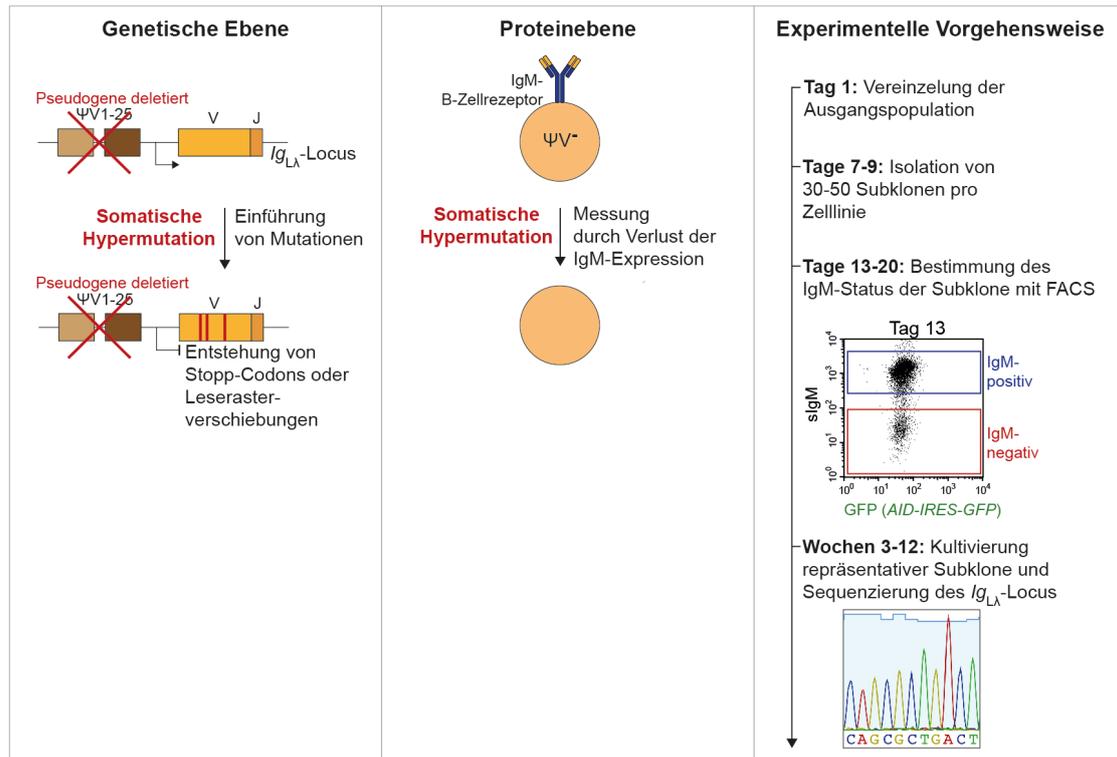


Abbildung 2.10: Die DT40ΨV-Zelllinie - Das Modellsystem zur Messung der somatischen Hypermutterationsrate

Die Deletion des Pseudogenlocus der leichten Ig-Kette resultierte in der Unterbindung der Ig-Genkonversionsaktivität. Zugleich führte diese genetische Veränderung zu einer stark erhöhten Anzahl an Punktmutationen im Ig_L -Locus durch die somatische Hypermutteration. Hierdurch können Stopp-Codons, Leserasterverschiebungen oder Mutationen entstehen, die eine Paarung der schweren und leichten Ig-Kette verhindern (linke Spalte, genetische Ebene). Dies hat den Verlust der IgM-Expression auf der Zelloberfläche zur Folge, der mit einer durchflusszytometrischen Messung bestimmt werden kann (mittlere Spalte, Proteinebene). In der DT40ΨV-Zelllinie korreliert somit der prozentuale Anteil an IgM-negativen Zellen mit der somatischen Hypermutterationsrate. Die experimentelle Vorgehensweise ist in der rechten Spalte dargestellt und wird im Text erläutert.

In Abbildung 2.11 A sind repräsentative FACS-Bilder der IgM-Messung am Tag 13 nach Vereinzeln dargestellt. Die Abbildung 2.11 B zeigt das Ergebnis der IgM-Messung aller Subklone eines repräsentativen Experiments, wobei die Abbildung 2.11 C das Resultat von bis zu 8 auf diese Weise durchgeführten Experimenten in einem Balkendiagramm, normalisiert auf die $Chk1^{+/+/+}$ -Zelllinie, veranschaulicht. Die Präzision der IgM-Messung wurde unter Verwendung einer DT40ΨV $AID^{-/-}$ -Zelllinie bestimmt, die in den Experimenten im Durchschnitt 0,4 % IgM-negative Zellen aufwies (Abbildung 2.11 B, hier 0,1 %). Die $Chk1^{+/+/-}$ -Zelllinien zeigten im Vergleich zur $Chk1^{+/+/+}$ -Zelllinie eine im Durchschnitt 1,1-1,3-fache Erhöhung des Anteils an IgM-negativen Zellen. Diese Erhöhung war nur in dem dargestellten Experiment in einer $Chk1^{+/+/-}$ -Zelllinie signifikant (Abbildung 2.11 B), jedoch nicht in der Zusammenfassung aller Experimente (Abbildung 2.11 C). Beachtenswert war der hoch signifikante, im Durchschnitt 1,7-2,1-fache Anstieg des Anteils an IgM-negativen Zellen in den $Chk1^{+/+/-}$ -Zelllinien, während der Anteil an IgM-negativen Zellen der $Chk1^{Rek.}$ -Zelllinien mit dem der $Chk1^{+/+/+}$ -Zelllinien vergleichbar war (durchschnittlich 1,0-1,2-

fach). Dieses Resultat impliziert eine höhere somatische Hypermutationsaktivität bei Herabsetzung der *Chk1*-Expression.

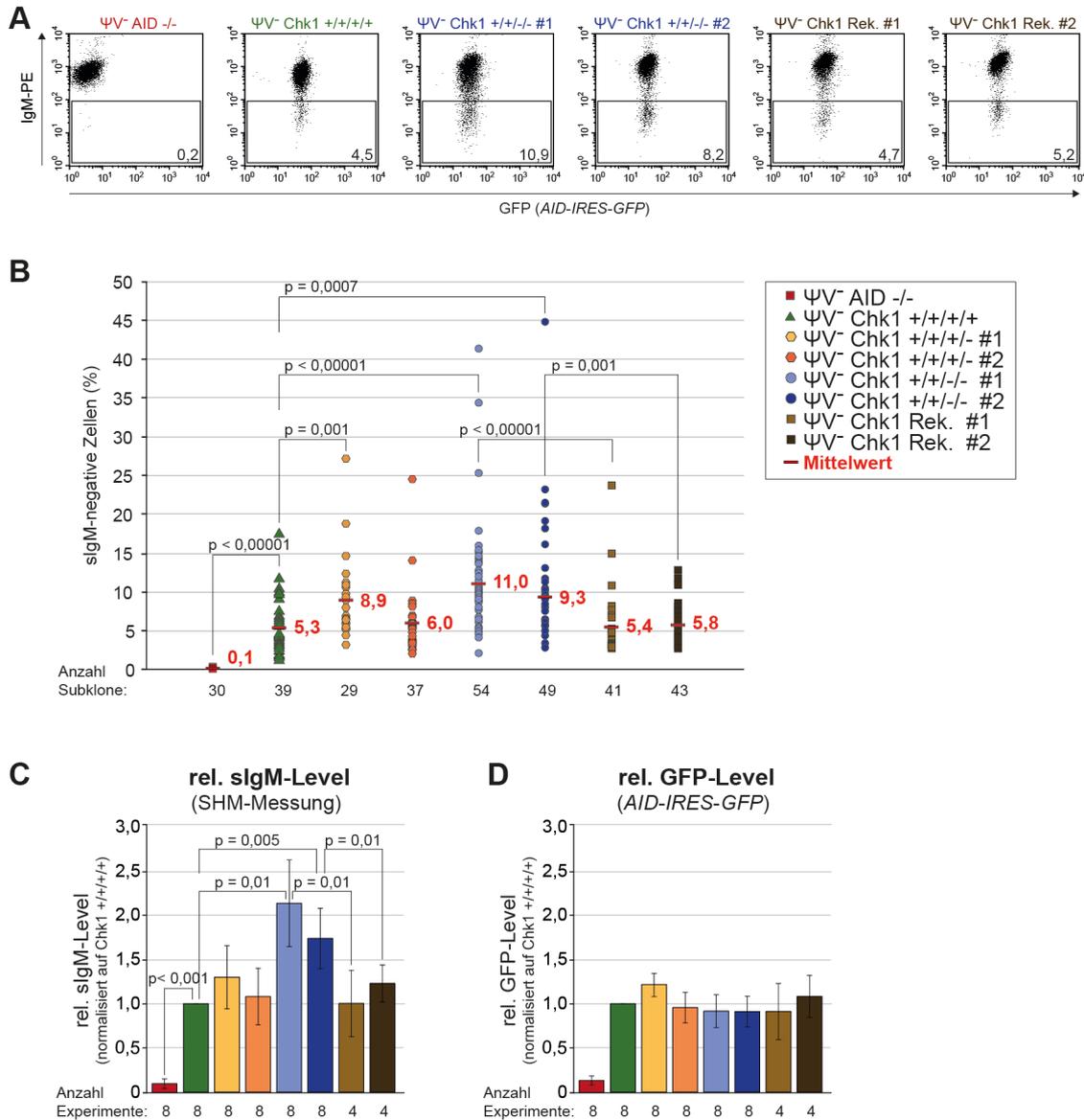


Abbildung 2.11: Erhöhte somatische Hypermutationsrate in den DT40ΨV⁻ Chk1^{+/+/-}-Zelllinien

A. Durchflusszytometrische Analyse des prozentualen Anteils IgM-negativer Zellen von repräsentativen Subklonen aus Abbildung 2.10 B. Der prozentuale Anteil IgM-negativer Zellen ist jeweils rechts unten angegeben. Die AID^{-/-}-Zelllinie diene als Negativkontrolle.

B. Repräsentative durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils IgM-negativer Zellen von 30-50 Subklonen pro Zelllinie. Jeder Datenpunkt stellt das Resultat der IgM-Bestimmung eines Subklons dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur der p-Wert bezogen auf die jeweilige Ursprungszelllinie angegeben. Die Signifikanzwerte (p) wurden unter Anwendung des zweiseitigen Student's-t-Tests ermittelt. n = 4.

C. Zusammenfassung aller durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung des Anteils an IgM-negativen Zellen. Es ist jeweils der Mittelwert aller erhaltenen Daten normalisiert auf die Chk1^{+/+/+}-Zelllinie dargestellt. Der Signifikanzwert (p) wurde anhand des zweiseitigen Student's-t-Tests ermittelt. n = 4-8.

D. Zusammenfassung aller durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung des GFP-Levels. Es ist jeweils der Mittelwert aller erhaltenen Daten normalisiert auf die Chk1^{+/+/+}-Zelllinie dargestellt. Die GFP-Fluoreszenzintensität diene als Anhaltspunkt für das AID-Expressionsniveau aufgrund der IRES-vermittelten Koexpression von *GFP* und *AID*. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Abkürzungen: rel: relativ, sigM: *surface IgM*; Oberflächen-IgM.

Die DT40ΨV-Zelllinie stammt von einer *AID-Knockout*-Zelllinie ab, die mit einem *AID-IRES-GFP*-Transgen rekonstituiert wurde. Die dadurch resultierende Koexpression von *AID* und *GFP* ermöglicht die Überprüfung der *AID*-Expression durch die durchflusszytometrische Messung der GFP-Fluoreszenzintensität simultan zur somatischen Hypermutationsbestimmung. Wie bereits in den Western-Blot-Analysen zum Nachweis des *AID*-Proteinlevels ersichtlich (Abbildungen 2.5 D, 2.6 D und 2.9 A), wies auch die GFP-Fluoreszenzintensitätsmessung auf eine vergleichbare *AID*-Expression in den generierten Subklonen hin (Abbildung 2.11 D). In einer *Chk1*^{+/+/-}- und einer *Chk1*-rekonstituierten Zelllinie war jedoch eine im Durchschnitt geringfügig höhere GFP-Fluoreszenzintensität zu beobachten, die mit dem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils an IgM-negativen Zellen zu korrelieren schien (Abbildung 2.11 C mit D; 3. und 8. Balken von links). Besonders bemerkenswert ist deshalb, dass mit dieser Herangehensweise der stark erhöhte Anteil der IgM-negativen Zellen in den *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien nicht auf ein fluktuierendes *AID*-Expressionslevel (indirekt gemessen anhand der GFP-Fluoreszenz) zurückgeführt werden konnte (vgl. Abbildung 2.11 C mit D, 5. und 6. Balken von links).

2.6.2 Die Erhöhung der somatischen Hypermutation in den DT40ΨV *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien wird nicht durch ein erhöhtes *AID*-Proteinlevel hervorgerufen

Die Messung der GFP-Fluoreszenzintensität ausgehend von dem *AID-IRES-GFP*-Transgen berücksichtigt nicht mögliche Expressionsunterschiede von *AID* und *GFP* auf posttranskriptioneller oder posttranslationeller Ebene. Dies ist insbesondere im Hinblick auf Studien von Bedeutung, die zeigten, dass *AID* bei Induktion von DNA-Schäden eine nukleäre Retention aufweist^{323,324}.

Um näher zu untersuchen, ob *Chk1* die somatische Hypermutation beeinflusst, indem es z.B. die *AID*-Proteinlokalisierung und/oder die damit verbundene *AID*-Proteinstabilität reguliert (Abschnitt 1.4.3), wurden *AID-GFP*-Transgene eingesetzt, die zur Bildung von *AID-GFP*-Fusionsproteinen führen. Dieses System bietet den Vorteil, die *AID*-Proteinlevel direkt durch Messung der GFP-Fluoreszenzintensität nachweisen und parallel eine somatische Hypermutationsmessung durch Bestimmung des IgM-Levels durchführen zu können.

Dabei kann nicht nur der Einfluss von *Chk1* auf *AID*-Wildtyp (WT)-Proteine, sondern auch auf mutierte Varianten wie z.B. die *AID*-ΔNES-Mutante untersucht werden, bei der die C-terminale nukleäre Exportsequenz (NES) entfernt und dadurch der CRM1-abhängige *AID*-Export aus dem Zellkern unterbunden wurde. Als Folge akkumuliert

AID im Zellkern und weist eine erhöhte Mutagenität an den *Ig*- und Nicht-*Ig*-Loci auf¹³². Da AID im Nukleus dem proteasomalen Abbau unterliegt, reduziert sich zudem die Halbwertszeit des AID- Δ NES-Proteins von 8 auf 2,5 Stunden¹³².

Die experimentelle Vorgehensweise wird in Abbildung 2.12 A veranschaulicht. Aus dem bereits generierten DT40 Ψ V-Zellset wurde das loxP-flankierte *AID-IRES-GFP*-Transgen durch Aktivierung der induzierbaren Cre-Rekombinase entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit den von J. Jeschke generierten Plasmiden, die unterschiedliche AID-Varianten enthielten, transfiziert. Die entstandenen Subklone wurden etwa 3 Wochen kultiviert und zweimal im Abstand von 7-10 Tagen auf den Anteil an IgM-negativen Zellen (= somatische Hypermutationsaktivität) und auf die GFP-Fluoreszenzintensität (= AID-Proteinlevel) untersucht.

Vergleichbar mit den Beobachtungen von Aoufouchi und Kollegen, die eine höhere somatische Hypermutationsrate nach Transfektion mit dem AID- Δ NES-GFP-Transgen nachwiesen¹³², war der Anteil an IgM-negativen Zellen der AID- Δ NES-GFP-Subklone etwa 10-mal so hoch wie in den AID-WT-GFP-Subklonen (vgl. Abbildung 2.12 C mit D, linkes Diagramm). Darüber hinaus war die AID-Expression der AID- Δ NES-GFP-Subklone, gemessen anhand der GFP-Fluoreszenz, um etwa 6-fach geringer als die AID-Expression der AID-WT-GFP-Subklone (vgl. Abbildung 2.12 C mit D, rechtes Diagramm).

Dieses Ergebnis spiegelt die Akkumulation des AID- Δ NES-GFP-Proteins im Kern wider, die in einer höheren AID-Mutagenität und gleichzeitig in einer geringeren AID-Proteinstabilität resultiert.

Interessanterweise konnte auch mit dieser experimentellen Herangehensweise eine 2-fache Erhöhung des Anteils an IgM-negativen Zellen in den *Chk1*^{+/-/-}-Subklonen im Vergleich zu den *Chk1*^{+/+/+}-Subklonen nachgewiesen werden (Abbildung 2.12 C, linkes Diagramm). Dies wurde sowohl bei den AID-WT-GFP-Subklonen als auch bei den AID- Δ NES-GFP-Subklonen beobachtet (vgl. Abbildung 2.12 C mit 2.12 D, linkes Diagramm). Die GFP-Fluoreszenzintensitätsmessung zeigte hingegen in beiden Fällen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 2.11 C und D, rechtes Diagramm). Diese Resultate implizieren, dass Chk1 die somatische Hypermutation nicht durch eine herabgesetzte AID-Proteinexpression reguliert.

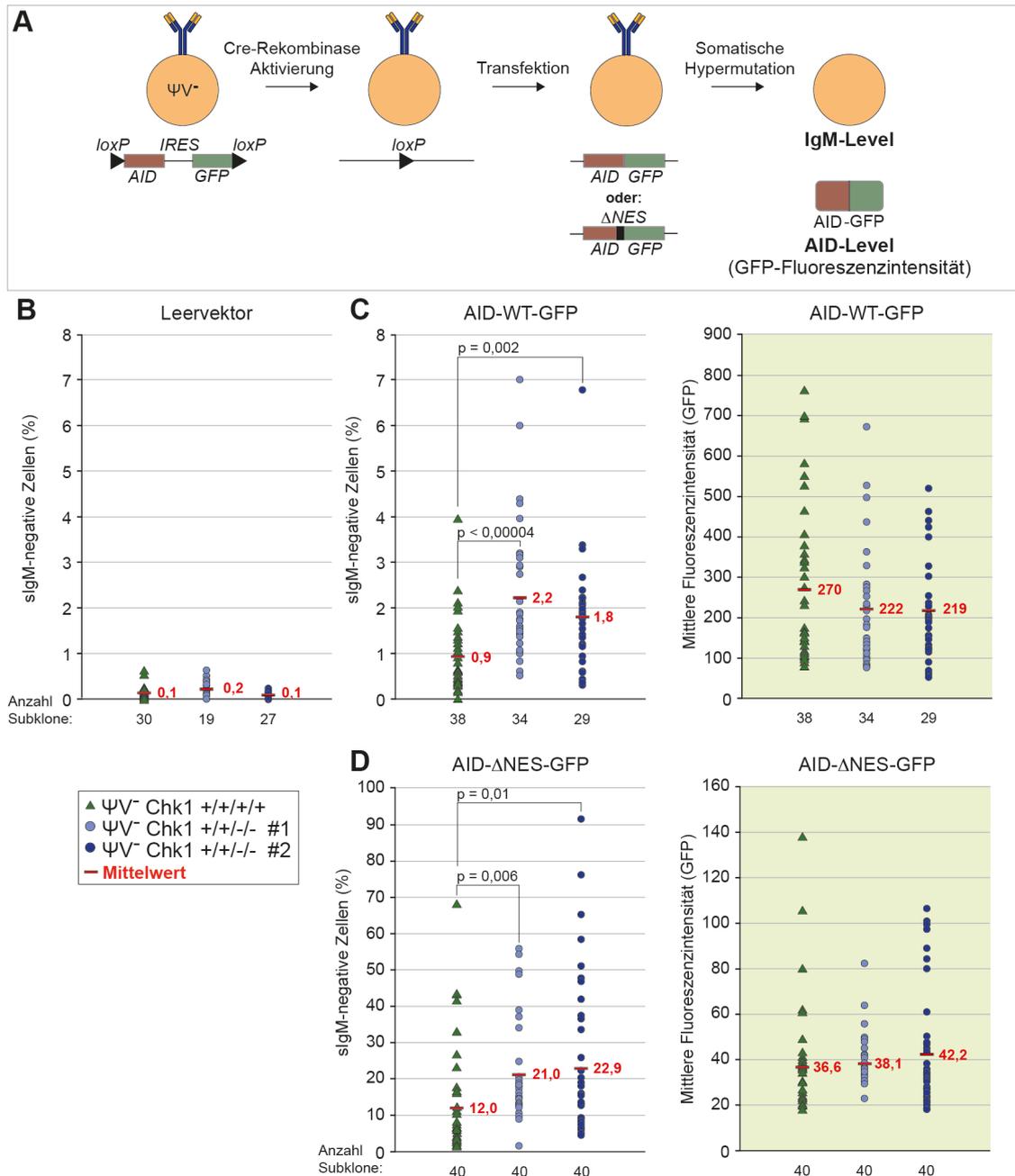


Abbildung 2.12: Die erhöhte somatische Hypermutationsrate der DT40 ΨV^- Chk1^{+/-}-Zelllinien ist nicht auf einen Anstieg des AID-Proteinlevels zurückzuführen

A. Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise. Durch Aktivierung der induzierbaren Cre-Rekombinase wurde das $AID-IRES-GFP$ -Transgen entfernt. Die Transfektion mit $AID-GFP$ -Transgenen ermöglichte die gleichzeitige Messung der somatischen Hypermutation (Oberflächen-IgM) und des AID-Proteinlevels (GFP-Fluoreszenzintensität) mittels Durchflusszytometrie.

B. Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils IgM-negativer Zellen nach Transfektion mit dem Leervektor. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

C. Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils IgM-negativer Zellen (linkes Diagramm) und der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität (rechtes Diagramm) nach Transfektion mit dem $AID-WT-GFP$ -Vektor.

D. Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils IgM-negativer Zellen (linkes Diagramm) und der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität (rechtes Diagramm) nach Transfektion mit dem $AID-\Delta NES-GFP$ -Vektor.

B.-D. Die y-Skala wurde zur besseren Darstellung der Streuung angepasst. Die Signifikanzwerte (p) wurden unter Anwendung des zweiseitigen Student's-t-Tests ermittelt. n = 2.

Abkürzung: sigM: *surface IgM*; Oberflächen-IgM.

2.6.3 Die Erhöhung des Anteils an IgM-negativen Zellen in den DT40ΨV⁻ *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien ist AID-abhängig

Die Bestimmung der somatischen Hypermutationsaktivität durch Messung der IgM-Oberflächenexpression birgt die Gefahr einer Missinterpretation von z.B. einem reduzierten IgM-Level durch eine herabgesetzte Expression von Komponenten des Ig-Rezeptors. Darüber hinaus besteht besonders bei der Untersuchung von DNA-Reparaturfaktoren die Möglichkeit, dass die gemessenen Mutationen in den *Ig*-Loci nicht durch die AID-abhängige somatische Hypermutation, sondern durch eine generell erhöhte genetische Instabilität entstehen.

Um diese Unsicherheitsfaktoren auf ein Minimum zu reduzieren, wurde das DT40ΨV⁻ *AID*^{-/-}-Zellset mit einem Leervektor transfiziert und, wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben, der Anteil an IgM-negativen Zellen bestimmt. Im Gegensatz zu den mit *AID-GFP*-Vektor-transfizierten *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien war keine Erhöhung des Anteils an IgM-negativen Zellen in den mit Leervektor-transfizierten *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien nachzuweisen (vgl. Abbildung 2.12 C & D mit B). Dieses Resultat bekräftigt, dass die vermehrte Entstehung der IgM-negativen Zellen bei *Chk1*-Depletion auf eine erhöhte AID-abhängige somatische Hypermutation zurückzuführen ist.

2.6.4 Sequenzanalyse des λ-Locus der leichten Ig-Kette

Die bisher erzielten Resultate weisen darauf hin, dass Chk1 die somatische Hypermutation negativ reguliert ohne die AID-Proteinstabilität zu beeinflussen. Chk1 könnte aber auch die AID-Aktivität hemmen oder aber in die fehlerfreien oder fehlerbehafteten Reparaturmechanismen eingreifen. Um die Funktion von Chk1 in der somatischen Hypermutation näher charakterisieren zu können, wurden deshalb die Häufigkeit der Mutationen im *Ig*-Locus und das entsprechende Mutationsmuster untersucht, das Aufschluss über die AID-Aktivität und die beteiligten Reparaturmechanismen gibt.

2.6.4.1 Die DT40 Ψ ⁻ *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie weist eine höhere Anzahl an Mutationen im *Ig*_λ-Locus auf

Wie bereits in Abschnitt 2.6.1 beschrieben, wurden nach der IgM-Messung repräsentative Subklone mehrere Wochen kultiviert und Proben für die DNA-Extraktion entnommen. Aus den so gewonnenen DNA-Proben wurde die VJ-Region des λ-Locus der leichten Ig-Kette mit der *Phusion*-Polymerase amplifiziert, die eine sehr geringe Fehlerrate aufweist ($4,4 \times 10^{-7}$ Mutationen pro Basenpaar (Mut./bp)). Das Produkt wurde zur Vereinzelung in den pGEMT-Vektor kloniert und in *E. coli* transformiert. Die Plasmide wurden im Anschluss aus den Bakterienkulturen präpariert und mit einem ABI-Kapillar-Sequenzierer analysiert (A. Brachmann, LMU, München).

Es wurde eine Sequenz von 690 bp auf Mutationen untersucht, die sich ausgehend vom Intron vor der VJ-Region über die VJ-Region bis in das Intron vor dem C-Segment erstreckte (Abbildung 2.13 A). Die Sequenzen wurden mit dem Programm *Geneious* verglichen und die Mutationen sowohl manuell als auch mit Hilfe des *SHM-Tools* (<http://scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1>)³²⁵ identifiziert. Anschließend wurden die Mutationen mit zwei unterschiedlichen Methoden ausgewertet: Zum einen wurde jede einzelne Mutation als solche gewertet (Abbildung 2.13 B-D), zum anderen wurden in einem Subklon öfters vorkommende, miteinander identische Mutationen nur einmal gewertet unter der Annahme, dass diese auf eine klonale Abstammung zurückzuführen sind (Abbildung im Anhang 4.1). Die Resultate beider Methoden unterschieden sich nur geringfügig, was die generelle Aussagekraft dieser Sequenzanalyse bestärkt. Zur Überprüfung des PCR- und Sequenzierungsfehlers wurden 30 Sequenzen der DT40 Ψ ⁻ *AID*^{-/-}-Zelllinie untersucht, von denen nur eine Sequenz, vermutlich aufgrund eines PCR-Fehlers, eine Mutation aufwies ($0,05 \times 10^{-3}$ Mut./bp; Abbildung 2.13 B).

In den 135 analysierten Sequenzen der DT40 Ψ ⁻ *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie wiesen 29 % bis zu 3 Mutationen auf (Abbildung 2.13 B). Im Gegensatz dazu konnten in den 140 analysierten Sequenzen der DT40 Ψ ⁻ *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie in 50 % bis zu 5 Mutationen nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit der IgM-Messung wurde somit in der *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie im Vergleich zur *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie eine doppelt so hohe Mutationsfrequenz festgestellt ($1,17 \times 10^{-3}$ Mut./bp vs. $0,54 \times 10^{-3}$ Mut./bp). Der hier beobachtete Phänotyp der *Chk1*-Depletion wurde darüber hinaus durch die wieder herabgesetzte Mutationsfrequenz der *Chk1*^{Rek.}-Zelllinie bestärkt ($0,57 \times 10^{-3}$ Mut./bp). Beachtenswert ist auch das anscheinend erhöhte Vorkommen von Deletionen und Insertionen in der *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie, im Vergleich zur *Chk1*^{+/+/+}- und *Chk1*^{Rek.}-Zelllinie.

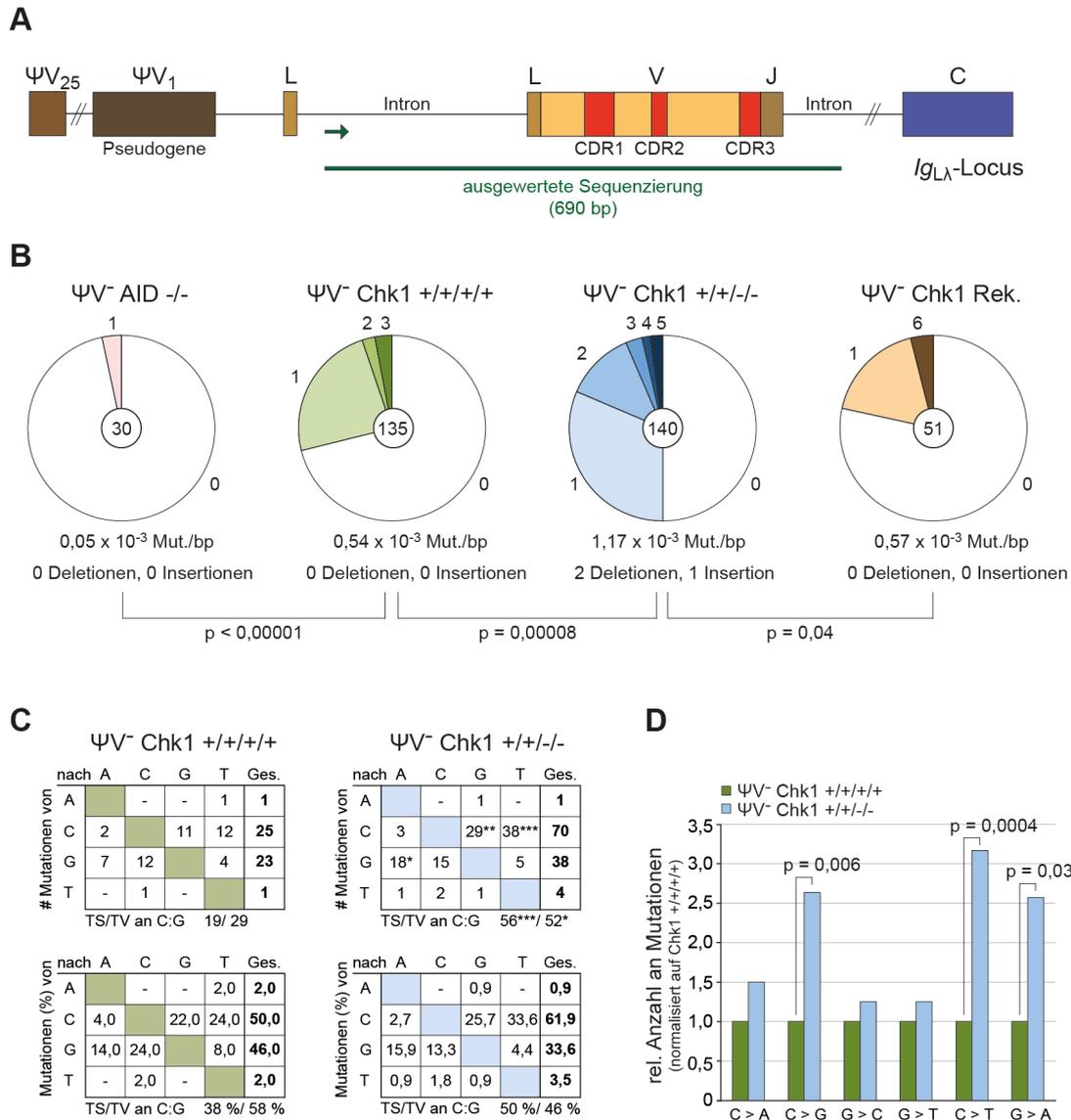


Abbildung 2.13: Erhöhte Mutationsfrequenz und verändertes Mutationsmuster im λ -Locus der leichten Ig-Kette der DT40 ΨV^- Chk1^{+/-/-}-Zelllinien

A. Schematische Darstellung der Sequenzierung des λ -Locus der leichten Ig-Kette (nach Reynaud *et al.*⁷²). Für die Sequenzierung wurden 690 bp (grüne Linie) ausgehend von dem grün dargestellten Primer ausgewertet. Die Sequenzierungsanalyse umfasste sowohl die VJ-Region als auch z.T. die angrenzenden Introns.

B. Darstellung des prozentualen Anteils der mutierten Sequenzen im λ -Locus der leichten Ig-Kette. Die Zahl innerhalb des Tortendiagramms steht für die Anzahl an analysierten Sequenzen. Die um die Diagramme herum angeordneten Zahlen (0-6) geben die Anzahl an Mutationen pro Sequenz an. Die Mutationsfrequenz sowie die Anzahl an Insertionen und Deletionen sind unterhalb der Diagramme angegeben. Die AID^{-/-}-Zelllinie diente als Negativkontrolle. Die Signifikanzwerte (p) wurden unter Anwendung des zweiseitigen Student's-t-Tests ermittelt.

C. Mutationsmuster des λ -Locus der leichten Ig-Kette. Die Zahlen in den Tabellen geben die absolute Anzahl (obere Tabellen) und den prozentualen Anteil (untere Tabellen) der Mutationsarten an. Die Signifikanzwerte wurden unter Anwendung des χ^2 -Tests ermittelt. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

D. Darstellung der relativen (rel.) Häufigkeiten der unterschiedlichen Mutationsarten normalisiert auf Chk1^{+/+ +/+}. Die Signifikanzwerte (p) wurden unter Anwendung des χ^2 -Tests ermittelt.

B.-D. Die Resultate von je zwei repräsentativen Subklonen wurden zusammengefasst.

Abkürzungen: #: Anzahl; CDR: *complementary determining region*; Ges.: Gesamt; L: *Leader-Region*; V, J, C: *variable-, joining-, constant-Segment*; Mut./bp: Mutationen pro Basenpaar; TS: Transversionen; TV: Transversionen

Die Mutationen der *Chk1*^{+/+/+/-}- und der *Chk1*^{+/+/-/-}-Zelllinie waren innerhalb der VJ-Region ähnlich verteilt und kumulierten in beiden Genotypen vor allem in den hypervariablen CDR-Regionen 1 und 3 (Abbildung 2.14). In der *Leader*-Region, dem J-Segment sowie den 5' und 3' gelegenen Introns der VJ-Region wurden hingegen sehr wenige Mutationen nachgewiesen.

Betrachtet man jedoch die Anhäufung der Mutationen in den *Hotspots* für die AID-Aktivität, den WRCY- und RGYW-Motiven, befanden sich innerhalb dieser jeweils etwa 20 % der Mutationen der *Chk1*^{+/+/+/-}-Zelllinie (Tabelle im Anhang 4.1). In der *Chk1*^{+/+/-/-}-Zelllinie waren ebenfalls etwa 20 % der Mutationen in den WRCY-Motiven vorzufinden, jedoch nur 10 % der Mutationen in den RGYW-Motiven. Dies könnte auf eine veränderte AID-Spezifität hindeuten, wie es bereits bei UNG-Inhibition nachgewiesen wurde³²⁶. Um dies zu verifizieren ist jedoch eine Analyse einer höheren Anzahl an Sequenzen z.B. über *Next Generation Sequencing* (NGS, Hochdurchsatz-Sequenzierung) notwendig³²⁶.

Das Resultat der Sequenzanalyse stützt die Annahme, dass *Chk1* an der somatischen Hypermutation beteiligt ist. Einen näheren Einblick in den mechanistischen Hintergrund ermöglicht die Untersuchung des Mutationsmusters.



Abbildung 2.14: Lokalisation der Mutationen im λ-Locus der leichten Ig-Kette der DT40ΨV-Zelllinien

Die Mutationen der DT40ΨV *Chk1*^{+/+/+/-}-Zelllinie sind grün unterhalb der Konsensus-Sequenz und die der DT40ΨV *Chk1*^{+/+/-/-}-Zelllinie blau oberhalb der Konsensus-Sequenz dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur eine Konsensus-Sequenz der analysierten Subklone dargestellt. Insertionen sind mit einem senkrechten Strich und Deletionen mit einem waagrechten Strich gekennzeichnet. Die *Leader*-Region, die CDR-Regionen (*complementary determining regions*) sowie das *Joining* (J)-Segment sind schematisch durch Rechtecke hervorgehoben. Die WRCY/RGYW-Motive, *Hotspots* für die AID-Aktivität, sind durch Fettschreibung markiert.

2.6.4.2 Die DT40 Ψ ⁻ *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie weist ein verändertes Mutationsmuster im *Ig_{LA}*-Locus auf

Auf die Mechanismen der Mutationsentstehung durch die fehlerbehafteten Reparaturmechanismen während der somatischen Hypermutation wurde bereits in Abschnitt 1.3.3 eingegangen. Alle zellulären Modellsysteme, die eine konstitutive oder induzierbare somatische Hypermutationsaktivität aufweisen, haben die Besonderheit, dass Mutationen bevorzugt an C:G-Basenpaaren entstehen³²⁷⁻³²⁹. Dies trifft auch auf die DT40-Zelllinie zu, bei der sich etwa 95 % der Mutationen an C:G-Basenpaaren befinden^{77,83}. Nach dem Modell von Neuberger⁶ impliziert dieses Mutationsmuster, dass in den *Ig*-Loci der DT40-Zellen nur zwei fehlerbehaftete Reparaturmechanismen vorherrschend sind: (I) Die direkte Replikation über die U:G-Basenpaare, die zu Transitionsmutationen an C:G-Basenpaaren führt und (II) die fehlerbehaftete Basenexzisionsreparatur, die durch Uracil-Exzision und Einsatz von Transläsionspolymerasen Transitions- und Transversionsmutationen an C:G-Basenpaaren hervorruft.

Dies wurde auch durch Analyse der Mutationsmuster der DT40 Ψ ⁻ *Chk1*^{+/+/+}- und *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie bestätigt, die an C:G-Basenpaaren etwa 95 % der Mutationen aufwiesen (Abbildung 2.13 C). Darüber hinaus wurde deutlich, dass die *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie, infolge einer Erhöhung bestimmter Mutationstypen, Veränderungen im Mutationsmuster aufwies: (I) Der stärkste Anstieg war bei den Transitionsmutationen an C:G-Basenpaaren (G→A und C→T), sowohl in den absoluten Zahlenwerten (Abbildung 2.13 C; obere Tabelle) als auch in den prozentualen Zahlenwerten, mit Ausnahme der G→A-Mutationen (Abbildung 2.13 C; untere Tabelle), zu verzeichnen. (II) Zusätzlich konnte eine Erhöhung der C→G-Transversionsmutationen festgestellt werden, jedoch vorwiegend in den absoluten Zahlenwerten und nur in abgeschwächter Form in den prozentualen Zahlenwerten. In Relation zur *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie handelte es sich in beiden Fällen um eine 2- bis 3-fache Erhöhung (Abbildung 2.13 D).

Dieses Mutationsmuster lässt folgende Rückschlüsse zu: (I) Zum einen scheint die AID-Aktivität nicht durch Chk1 beeinflusst zu sein, da in diesem Fall ein Anstieg aller Mutationsarten zu erwarten gewesen wäre. (II) Zum anderen impliziert die erhöhte Anzahl an Transitionsmutationen und C→G-Transversionsmutationen, dass Chk1 entweder mehrere fehlerbehaftete Reparaturmechanismen negativ reguliert oder aber zur Erhöhung eines fehlerfreien Reparaturwegs wie der homologen Rekombinationsreparatur beiträgt.

2.7 Die DT40 *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien zeigen geringfügig herabgesetzte *Targeting*-Effizienzen

Es gibt bereits mehrere Evidenzen, dass Chk1 an der Initiation der homologen Rekombinationsreparatur beteiligt ist (Abschnitt 1.5.3.2). Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob die Funktion von Chk1 in der homologen Rekombinationsreparatur eine Auswirkung auf die Ig-Diversifizierungsmechanismen hat.

Eine erste Herangehensweise für den Nachweis einer eingeschränkten Funktion der homologen Rekombinationsreparatur ist die Untersuchung der *Targeting*-Effizienz. Wirtsfremde DNA-Moleküle können entweder in definierte, homologe Loci durch die homologe Rekombinationsreparatur (HR; gerichtete Integration) oder an zufälligen Stellen durch die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ; ungerichtete Integration) eingefügt werden (Abschnitt 1.4.6.2). Zwischen den beiden Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen scheint eine Konkurrenz vorhanden zu sein, da NHEJ-defiziente Zellen eine höhere gerichtete Integrationsrate zeigen^{330,331} und HR-defiziente Zellen eine entsprechend herabgesetzte gerichtete Integrationsrate aufweisen^{82,255}. Dieser Hintergrund ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktionalität der homologen Rekombinationsreparatur bei einer veränderten gerichteten Integrationsrate.

Für die Analyse der gerichteten Integration wurden ein *Rad18*- und ein *RDM1-Targeting*-Vektor verwendet. Rad18 ist eine an dem Rad6-Weg beteiligte E3-Ubiquitin-Ligase, während RDM1 an der zellulären Antwort gegen Cisplatin beteiligt ist³³². Von beiden Zielgenen wurden bisher noch keine heterozygoten Effekte berichtet^{168,332,333}.

Die *Rad18-Targeting*-Effizienz der *Chk1*^{+/+/-}- sowie der *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien war mit der gerichteten Integrationsrate der *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie vergleichbar (Tabelle 2.2). Bei Verwendung des *RDM1-Targeting*-Vektors konnte indessen in den *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinien eine signifikant herabgesetzte gerichtete Integrationsrate nachgewiesen werden. Dieses Resultat deutet auf eine eingeschränkte Funktionsweise der homologen Rekombinationsreparatur in Zellen mit reduzierter *Chk1*-Expression hin.

Das Phänomen, dass sich die *Targeting*-Effizienzen locuspezifisch unterscheiden, wurde in DT40-Zellen bereits mehrmals beobachtet³³⁴⁻³³⁶ und könnte darauf hinweisen, dass die noch vorhandene *Chk1*-Expression in bestimmten Fällen noch ausreicht, um eine gerichtete Integration zu gewährleisten.

Tabelle 2.2: *Rad18*- und *RDM1*-Targeting-Effizienzen der *Chk1*^{+/+/+}, *Chk1*^{+/+/-} und *Chk1*^{+/-/-} DT40-Zelllinien

<i>Chk1</i> -Genotyp	<i>Rad18</i>			<i>RDM1</i>		
	Anzahl der selektions-resistenten Klone	Anzahl der PCR-positiven Klone	Targeting-Effizienz %	Anzahl der selektions-resistenten Klone	Anzahl der PCR-positiven Klone	Targeting-Effizienz %
<i>+/+/+</i>	82	16	19,5	69	45	65,2
<i>+/+/-</i>	73	17	23,3	72	46	63,9 *
<i>+/-/-</i>	111	23	20,7	121	59	48,8

* p = 0,03; Exakter Test nach Fisher

2.8 Untersuchung der Ig-Genkonversionsaktivität in DT40Cre1 *Chk1*^{+/-/-}-Zelllinien

Alle bisher untersuchten DT40-*Knockout*-Mutanten, die eine herabgesetzte *Targeting*-Effizienz aufwiesen, wie z.B. *Knockouts* der *Rad51*-Paraloge, zeigten auch eine funktionelle Beeinträchtigung der HR-abhängigen Ig-Genkonversion^{82-84,336,337}. Eine herabgesetzte Ig-Genkonversionsrate lässt somit ebenfalls Rückschlüsse auf die Effizienz der homologen Rekombinationsreparatur zu und gewährt darüber hinaus einen Einblick, inwiefern eine veränderte somatische Hypermutationsrate tatsächlich auf eine Beeinträchtigung der homologen Rekombinationsreparatur zurückzuführen ist³¹².

Arakawa und Kollegen beschrieben diese Wechselwirkungen im folgenden Modell³³⁸ (Abbildung 2.15): Falls Pseudogen-Donor-Sequenzen vorhanden sind und eine hohe homologe Rekombinationsaktivität vorherrscht, wie es für DT40Cre1-Zellen zutrifft, findet Ig-Genkonversion statt. Ist jedoch die homologe Rekombinationsreparatur gestört, ist eine Herabsetzung der Ig-Genkonversionsaktivität zu beobachten. Abhängig davon, in welchem Stadium die homologe Rekombinationsreparatur beeinträchtigt ist, sind folgende Auswirkungen zu erwarten: (1) Erfolgt die Beeinträchtigung **vor** dem *Rad51*-vermittelten Strangaustausch, ist eine Herabsetzung der Ig-Genkonversion und eine gleichzeitige Erhöhung der somatischen Hypermutation zu beobachten^{83,84,339}. (2) Ist jedoch die homologe Rekombinationsreparatur in einem Stadium **nach** dem Strangaustausch gestört, so ist die Ig-Genkonversionsaktivität zwar ebenfalls herabgesetzt, allerdings ist in diesem Fall nicht mehr ein Anstieg der somatischen Hypermutation nachweisbar^{82,336,337}.

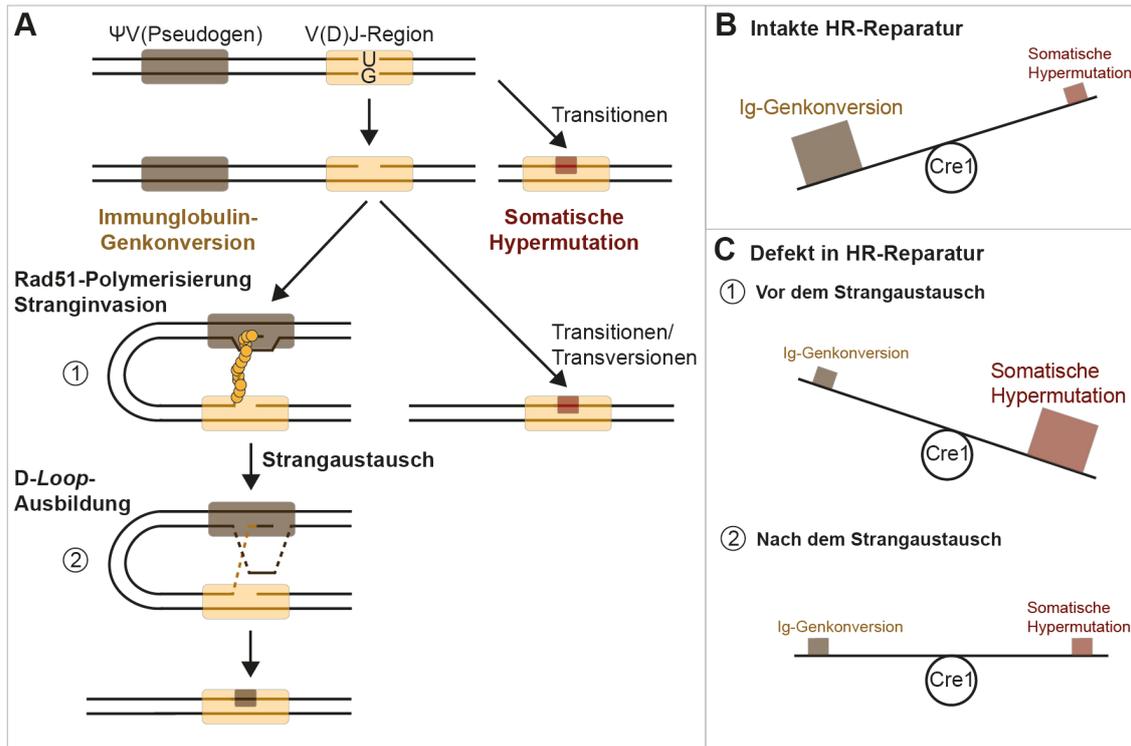


Abbildung 2.15: Stark vereinfachte Darstellung des Wettbewerbsmodells der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion

A. Schematische Darstellung der Konkurrenz zwischen der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion (nach Arakawa *et al.*³³⁸).

B. Schematische Darstellung der Ig-Genkonversions- und somatischen Hypermutationsaktivität in der DT40Cre1-Zelllinie bei intakter homologer Rekombinationsreparatur (HR-Reparatur).

C. (1) Ist die homologe Rekombinationsreparatur in einem sehr frühen Stadium vor dem Rad51-vermittelten Strangaustausch beeinträchtigt, ist eine Reduktion der Ig-Genkonversionsaktivität und eine Erhöhung der somatischen Hypermutationsaktivität zu beobachten. (2) Ist die homologe Rekombinationsreparatur in einem späten Stadium nach dem Rad51-vermittelten Strangaustausch gestört, ist die Ig-Genkonversionsaktivität ebenfalls herabgesetzt, es ist jedoch keine Erhöhung der somatischen Hypermutationsrate detektierbar.

B. und C. Es handelt sich lediglich um eine stark vereinfachte Darstellung, die nicht zwingend das tatsächliche Verhältnis wiedergibt.

2.8.1 DT40Cre1 *Chk1*^{+/-}-Zelllinien generieren einen geringeren Anteil an IgM-positiven Zellen

Um der Fragestellung nachzugehen, ob Chk1 die somatische Hypermutation durch Regulation der homologen Rekombinationsreparatur beeinflusst und in welchem Stadium Chk1 hierbei beteiligt sein könnte, wurde die Ig-Genkonversionsaktivität in dem generierten DT40Cre1-Zellset untersucht.

Die IgM-negative DT40Cre1-Zelllinie enthält eine Leserasterverschiebung im *Ig_L*-Locus³¹³ (Abbildung 2.16). Diese kann durch Ig-Genkonversionsereignisse revertieren und zur Reexpression des IgM-Rezeptors auf der zellulären Oberfläche führen³¹³. Der Anteil an IgM-positiven Zellen zeigt somit eine direkte Korrelation mit der Ig-Genkonversionsrate³¹³.

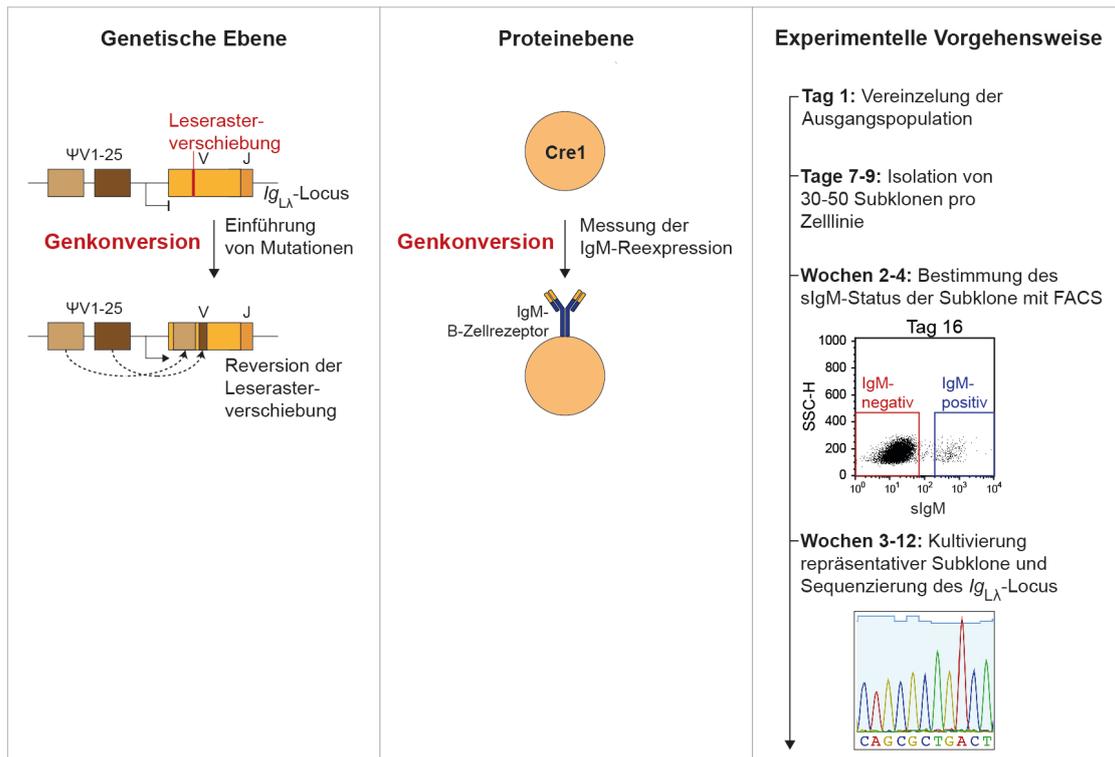


Abbildung 2.16: Die DT40Cre1-Zelllinie - Das Modellsystem zur Messung der Ig-Genkonversionsrate

Die DT40Cre1-Zelllinie weist eine Leserasterverschiebung im rearrangierten λ -Locus der leichten Ig-Kette auf (linke Spalte, genetische Ebene). Durch Reversion der Leserasterverschiebung infolge von Ig-Genkonversionsereignissen wird der IgM-Rezeptor erneut auf der Oberfläche exprimiert (mittlere Spalte, Proteinebene). In der DT40Cre1-Zelllinie korreliert somit der prozentuale Anteil an IgM-negativen Zellen mit der Ig-Genkonversionsrate. Die experimentelle Vorgehensweise ist in der rechten Spalte dargestellt und wird im Text erläutert.

Abkürzungen: sIgM: *surface IgM*; Oberflächen-IgM; SSC-H: *Side Scatter-Height*.

Die quantitative Ig-Genkonversionmessung wurde analog zur somatischen Hypermutationsmessung der DT40 Ψ V-Zelllinie durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die durchflusszytometrische IgM-Bestimmung bis Tag 30 nach Vereinzelung der Zellen erfolgte und der IgM-Status von vier $Chk1^{+/-}$ -Zelllinien parallel analysiert wurde.

Erstaunlicherweise generierten bereits die DT40Cre1 $Chk1^{+/-}$ -Zelllinien, im Vergleich zur $Chk1^{+/+/+}$ -Zelllinie, einen geringeren Anteil an IgM-positiven Zellen (Abbildung 2.17 B). Dieser war bei den $Chk1^{+/-}$ -Zelllinien noch stärker herabgesetzt, im Vergleich zur $Chk1^{+/+/+}$ -Zelllinie sogar durchschnittlich um die Hälfte. Die $Chk1^{Rek-}$ - und die $Chk1^{+/+/+}$ -Zelllinien wiesen hingegen einen vergleichbaren Anteil an IgM-positiven Zellen auf.

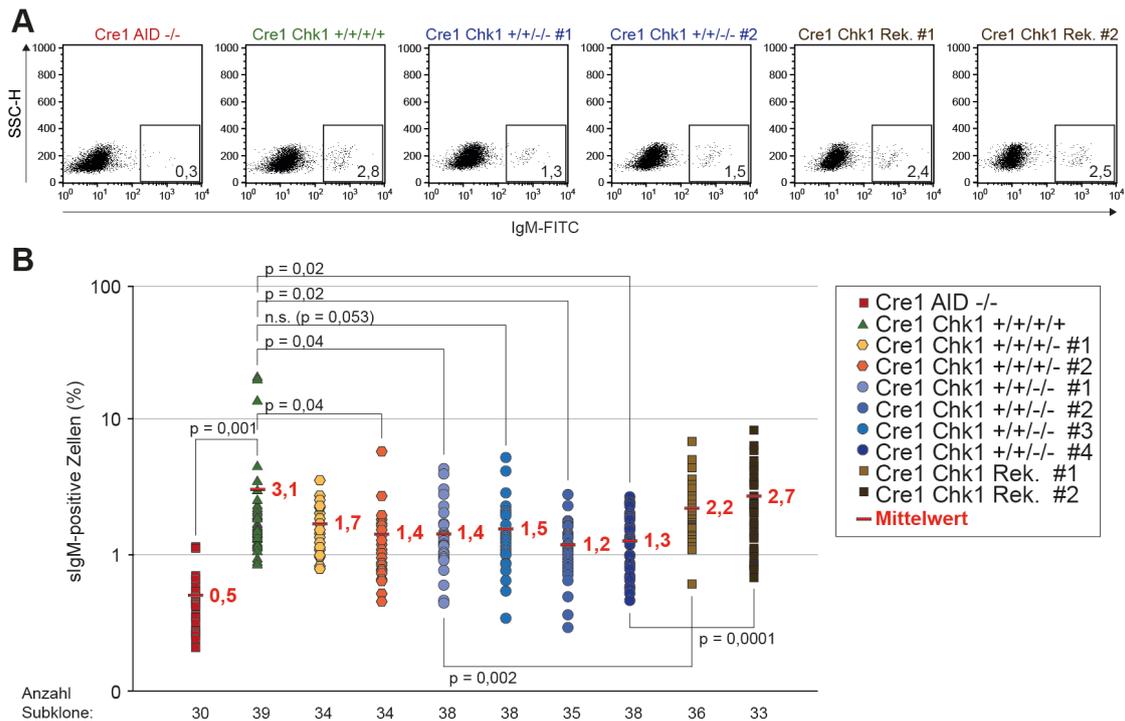


Abbildung 2.17: Reduzierte Ig-Genkonversionsaktivität in den DT40Cre1 Chk1^{+/-/-}-Zelllinien

A. Durchflusszytometrische Analyse des prozentualen Anteils IgM-positiver Zellen von repräsentativen Subklonen aus Abbildung 2.17 B. Der prozentuale Anteil IgM-positiver Zellen ist jeweils rechts unten angegeben. Die AID^{-/-}-Zelllinie diente als Negativkontrolle.

B. Repräsentative durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils IgM-positiver Zellen von 30-40 Subklonen pro Zelllinie. Jeder Datenpunkt stellt das Resultat der IgM-Bestimmung eines Subklons dar. Die AID^{-/-}-Zelllinie diente als Negativkontrolle. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur der p-Wert bezogen auf die jeweilige Ursprungszelllinie angegeben. Zur besseren Darstellung der Unterschiede wurde eine logarithmische Skala verwendet. Die Signifikanzwerte (p) wurden unter Anwendung des zweiseitigen Student's-t-Tests ermittelt. n = 2.

Abkürzungen: sigM: *surface IgM*, Oberflächen-IgM; SSC-H: *Side Scatter-Height*.

2.8.2 DT40Cre1 Chk1^{+/-/-}-Zelllinien weisen eine herabgesetzte Ig-Genkonversionsaktivität auf

Der herabgesetzte Anteil an IgM-positiven Zellen der DT40Cre1 Chk1^{+/-/-}-Zelllinien lässt auf eine geringere Anzahl an Ig-Genkonversionsereignissen schließen. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, wurde, wie bereits bei der DT40ΨV-Zelllinie (Abschnitt 2.6.4), die VJ-Region des λ-Locus der leichten Ig-Kette sequenziert. Auch hier wurde die Genauigkeit der Methode durch Analyse von 24 Sequenzen einer AID-negativen DT40Cre1-Zelllinie untersucht und durch die völlige Abwesenheit von Nukleotidveränderungen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die Einteilung der Nukleotidveränderungen in Ig-Genkonversionsereignisse und Punktmutationen erfolgte analog zu anderen Studien, in denen die Datenbank der Pseudogensequenzen von Reynaud *et al.*⁷² die Grundlage bildete^{83,310} (Abbildung 2.18 A): (1) Falls die Nukleotidveränderung nicht in einem Pseudogendonorfunden werden konnte bzw. nicht mehr als 9 bp Homologie vorhanden war, wurde

die Nukleotidveränderung als Punktmutation (PM) eingestuft und mit dem Mechanismus der somatischen Hypermutation gleichgesetzt. Die Punktmutationen wurden weiter in Transitionen (TS), Transversionen (TV) und Mutationen an A:T-Basenpaaren (AT) aufgeschlüsselt. (2) Falls hingegen zwei oder mehr Nukleotidveränderungen auf einen Pseudogendonor zurückgeführt werden konnten, wurden diese als Ig-Genkonversionsmutationen (GKM) gewertet und einem Ig-Genkonversionsereignis zugeordnet. (3) Wenn allerdings nur eine und nicht mindestens zwei Nukleotidveränderungen in einem Pseudogendonor detektiert wurden, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob es sich hierbei um eine Punktmutation oder eine Ig-Genkonversionsmutation handelte. Aus diesem Grund wurde diese Art von Nukleotidveränderung als zweideutige Mutation (ZM) eingestuft.

Bereits bei der absoluten Anzahl an Nukleotidveränderungen fiel bei der DT40Cre1 *Chk1*^{+/-/-}-Zelllinie im Vergleich zur *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie, analog zum Resultat der IgM-Messung, eine Reduktion der Nukleotidveränderungen um die Hälfte auf (Abbildung 2.18 B; linkes Diagramm). Nach Einteilung in die unterschiedlichen Arten der Nukleotidveränderungen war sowohl eine deutliche Herabsetzung der absoluten als auch der relativen Anzahl an Ig-Genkonversionsmutationen zu erkennen (Abbildung 2.18 B und C; mittleres Diagramm). Dies ging mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Punktmutationen einher, die sich besonders stark in den relativen Zahlen ausprägte. Bei den Punktmutationen handelte es sich bei der *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie hauptsächlich um Transitionsmutationen, während die *Chk1*^{+/-/-}-Zelllinien einen gleichen Anteil an Transitions- und Transversionsmutationen aufwiesen (Abbildung 2.18 B und C; rechtes Diagramm).

Die geringe Anzahl an Ig-Genkonversionsmutationen spiegelte sich auch in der herabgesetzten Mutationsfrequenz der DT40Cre1 *Chk1*^{+/-/-}-Zelllinie, im Vergleich zur *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie, wider ($0,76 \times 10^{-3}$ vs. $1,42 \times 10^{-3}$ Mut./bp; Tabelle im Anhang 4.2). Die Mutationsfrequenz unter Einbeziehung der Ig-Genkonversionsmutationen entspricht aber nicht zwingend der AID-Aktivität, da die durch AID hervorgerufenen Ig-Genkonversionsereignisse u.a. je nach Länge der übertragenen Sequenz zu einer unterschiedlichen Anzahl an Ig-Genkonversionsmutationen führen können. Berechnet man somit die Mutationsfrequenz unter Berücksichtigung der Ig-Genkonversionsereignisse und nicht der einzelnen Ig-Genkonversionsmutationen, war der Unterschied in der Mutationsfrequenz zwischen der DT40Cre1 *Chk1*^{+/-/-}- und der *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie nur noch geringfügig ($0,59 \times 10^{-3}$ vs. $0,77 \times 10^{-3}$ Mut./bp).

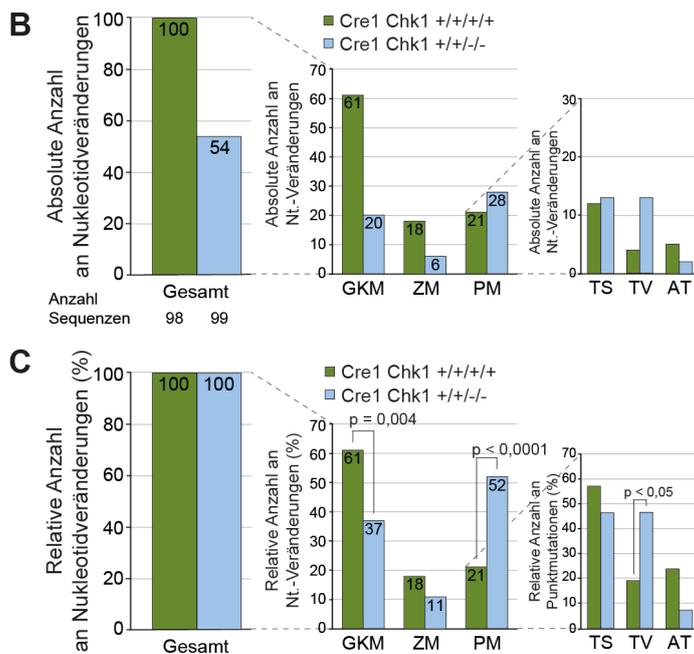
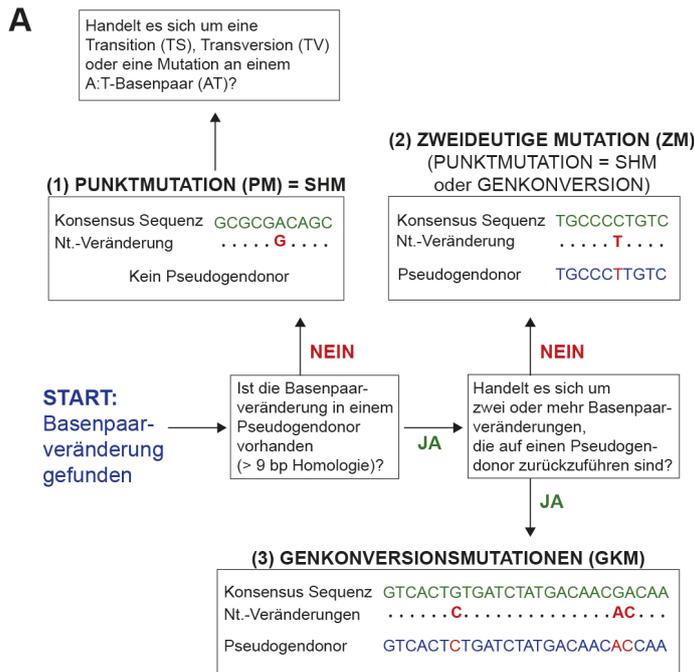


Abbildung 2.18: Geringere Anzahl an Ig-Genkonversionsmutationen und erhöhte Anzahl an Punktmutationen in den DT40Cre1 Chk1^{+/-}-Zelllinien

A. Einteilungsschemata der Nukleotid (Nt.)-Veränderungen. Eine repräsentative Konsensus-Sequenz ist jeweils grün, die identifizierten Nukleotidveränderungen sind jeweils rot und die Pseudogendonorsequenz ist jeweils blau dargestellt.

B. Absolute Anzahl an Nukleotidveränderungen im λ-Locus der leichten Ig-Kette. Die Signifikanzwerte wurden unter Anwendung des X²-Tests ermittelt. Es wurden die Resultate von je zwei repräsentativen Subklonen zusammengefasst.

C. Relative Anzahl an Nukleotidveränderungen im λ-Locus der leichten Ig-Kette. Im mittleren Diagramm ist die relative Anzahl der Mutationstypen bezogen auf die Gesamtanzahl der Nukleotidveränderungen dargestellt. Im rechten Diagramm ist die relative Anzahl der unterschiedlichen Punktmutationsarten bezogen auf die Gesamtanzahl der Punktmutationen dargestellt. Die Signifikanzwerte wurden unter Anwendung des X²-Tests ermittelt. Es wurden die Resultate von je zwei repräsentativen Subklonen zusammengefasst.

Abkürzungen: GKM: Genkonversionsmutation; ZM: zweideutige Mutation; PM: Punktmutation; TS: Transition; TV: Transversion; AT: Mutation an A:T-Basenpaar; SHM: somatische Hypermutation

Allgemein betrachtet wiesen die Nukleotidveränderungen keine Besonderheit in ihrer Lokalisation auf und waren wie erwartet präferenziell in den CDR-Regionen vorzufinden (Abbildung 2.19). Allerdings konnten in dem als #1 bezeichneten Subklon der *Chk1*^{+/+/-}-Zelllinie drei Ig-Genkonversionsereignisse an derselben Position identifiziert werden, an die sich unmittelbar danach drei identische Punktmutationen anschlossen. Darüber hinaus wurde in einer Sequenz eine ungewöhnlich große Insertion von 39 bp detektiert. Punktmutationen unmittelbar nach einem Ig-Genkonversionsereignis ebenso wie Insertionen können auf Fehler im Mechanismus der homologen Rekombination hindeuten¹⁷⁸.

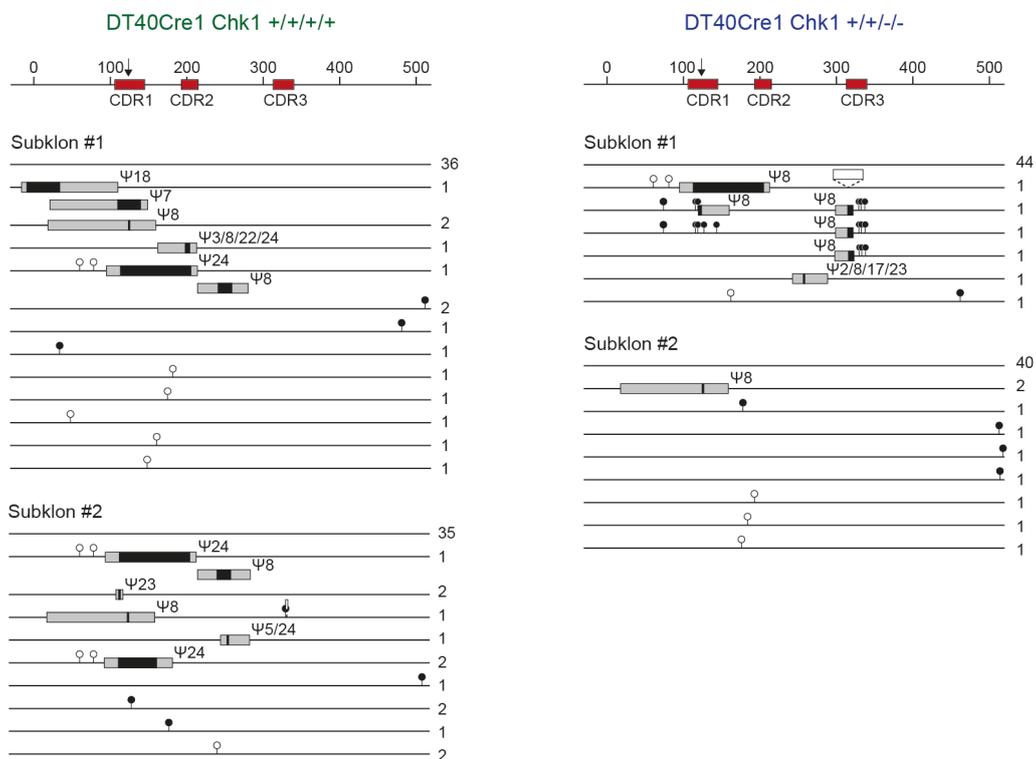


Abbildung 2.19: Darstellung der einzelnen Sequenzen des *Ig*_{LA}-Locus der DT40Cre1-Zelllinien
 Jede Linie repräsentiert eine analysierte Sequenz. Die Zahl neben den Linien gibt die Anzahl identischer Sequenzen wieder. Über den Linien ist die Position der CDR-Regionen (*complementary determining regions*) der VJ-Region in rot dargestellt. Die Nummerierung beginnt mit dem ersten Basenpaar der *Leader*-Region. Der Pfeil kennzeichnet die Position der Leserasterverschiebung in der DT40Cre1-Zelllinie. Die grauen Rechtecke stellen die maximale Länge und die schwarzen Rechtecke die minimale Länge der Genkonversionstrakte dar. Rechts neben den Genkonversionsereignissen sind die Pseudogene (Ψ) angegeben, mit denen eine Rekombination stattgefunden haben könnte. Überlappende Genkonversionsereignisse sind untereinander dargestellt. Weiße Rechtecke repräsentieren Insertionen. Die schwarzen Kreise kennzeichnen die Positionen der Punktmutationen, während die weißen Kreise die Positionen der zweideutigen Mutationen veranschaulichen. Die Abbildung ist maßstabsgetreu.

Ein weiterer Hinweis für eine eingeschränkte Funktionsweise der homologen Rekombination ist die Länge der jeweiligen Ig-Genkonversionstrakte, wobei kürzere Ig-Genkonversionstrakte mit einer beeinträchtigten homologen Rekombinationsreparatur einhergehen³⁴⁰ (Abbildung 2.20 A). Sowohl nach Ermittlung des Medians der

maximalen (Abbildung 2.20 B) als auch der minimalen Länge der Ig-Genkonversionstrakte (Abbildung 2.20 C), waren diese in den *Chk1*^{+/-/-}-Zelllinien im Vergleich zur *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie deutlich kürzer (vgl. auch Abbildung 2.19 mit 2.20). Bei der maximalen Länge der Ig-Genkonversionstrakte handelte es sich um eine Reduktion um etwa die Hälfte, während die minimale Länge sogar eine etwa 4-fache Herabsetzung zeigte. Ob es sich hierbei um einen signifikanten Effekt handelt, muss allerdings noch durch Analyse einer höheren Anzahl an Sequenzen überprüft werden.

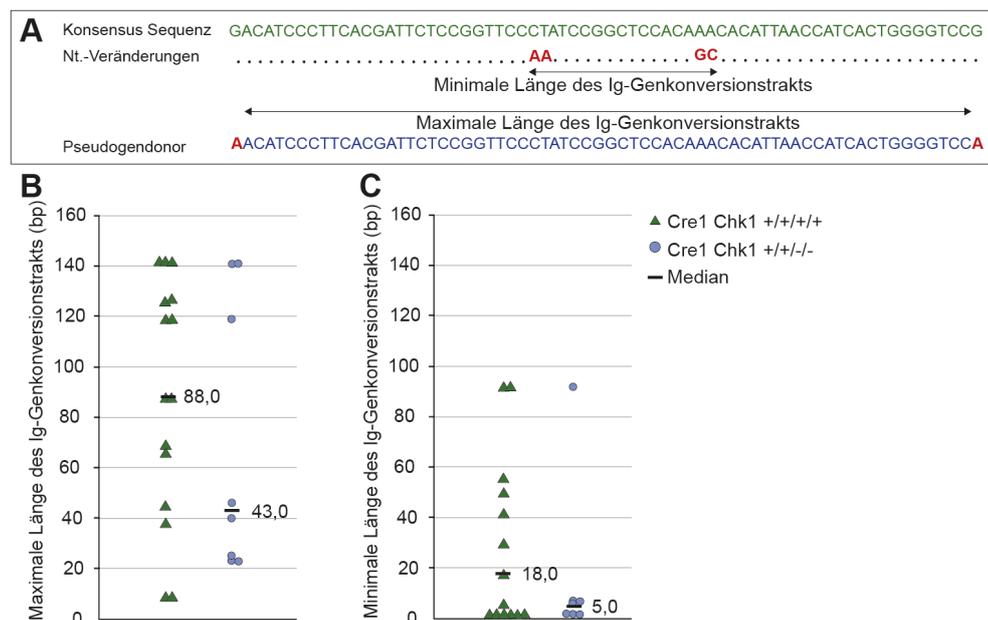


Abbildung 2.20: Tendenzuell kürzere Genkonversionstrakte in DT40Cre1 *Chk1*^{+/-/-}-Zelllinien
 A. Repräsentatives Beispiel zur Ermittlung der maximalen und minimalen Länge eines Genkonversionstrakts. Eine repräsentative Konsensus-Sequenz ist grün, die identifizierten Nukleotid (Nt.)-Veränderungen sind rot und die Pseudogendonorsequenz ist blau dargestellt.
 B. Darstellung der maximalen Länge der Genkonversionstrakte in Basenpaaren. Die schwarze Linie kennzeichnet den Median. Die Unterschiede sind nicht signifikant.
 C. Darstellung der minimalen Länge der Genkonversionstrakte in Basenpaaren. Die schwarze Linie kennzeichnet den Median. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Insgesamt betrachtet weisen die Sequenzanalysen der DT40Cre1-Zelllinie auf eine Beeinträchtigung der homologen Rekombinationsreparatur hin. Darüber hinaus sind die beobachtete Herabsetzung der Ig-Genkonversionsereignisse und der parallele Anstieg der Punktmutationen Indizien für eine Beeinträchtigung der homologen Rekombinationsreparatur in einem frühen Stadium, vor dem Rad51-vermittelten Strangaustausch. Bezieht man außerdem die Ergebnisse der DT40ΨV-Zelllinie mit ein, wird deutlich, dass *Chk1* anscheinend durch positive Regulation des fehlerfreien Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus, der homologen Rekombinationsreparatur, das Ausmaß der somatischen Hypermutation einschränkt.

3 DISKUSSION

Die aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase AID ist ein sehr mutagenes Enzym, das für die Generierung einer hohen Antikörperaffinität benötigt wird. Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass AID fast ausschließlich in den *Ig*-Loci DNA-Läsionen einführt³⁴¹. Mittlerweile wird aber durch die Ergebnisse genomweiter Untersuchungen deutlich, dass AID auch in zahlreichen Nicht-*Ig*-Genen DNA-Schäden hervorruft^{150,154,166,167}. Mehrere Studien belegen, dass die Mutationsentstehung durch die bevorzugte Rekrutierung von AID zu den *Ig*-Loci und den gezielten Einsatz von fehlerfreien und fehlerbehafteten Reparaturmechanismen kontrolliert wird (Abschnitte 1.4.4 und 1.4.6).

Checkpoint-Kinasen sind essenziell für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität, z.B. indem diese die DNA-Reparaturkapazität erhöhen¹⁸⁹. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob *Checkpoint*-Kinasen während der Keimzentrumsreaktion eine Rolle spielen und ob diese möglicherweise bei Überschreiten eines bestimmten Schwellenwerts an AID-induzierten DNA-Schäden die Aktivität von AID einschränken oder aber die Reparaturmechanismen entsprechend regulieren.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob die *Checkpoint*-Kinase 1 eine solche Funktion ausüben kann. Dabei wurde nachgewiesen, dass Chk1 zur Herabsetzung der somatischen Hypermutation führt. Darüber hinaus trägt Chk1 anscheinend zur Verstärkung der *Ig*-Genkonversionsaktivität bei, die durch Faktoren der homologen Rekombinationsreparatur vermittelt wird. Diese und weitere Resultate legen die Vermutung nahe, dass Chk1 die somatische Hypermutation durch Aktivierung dieses fehlerfreien DNA-Reparaturmechanismus einschränkt.

3.1 *Chk1*-Expression in Keimzentrums-B-Zellen

Eine Voraussetzung für eine Funktion von Chk1 in der Keimzentrumsreaktion ist die Expression in KZ-B-Zellen. Es wurde postuliert, dass die Expression von *Chk1* und weiteren Komponenten der DNA-Schadensantwort, wie *ATR*, *p53* und *p21*, in KZ-B-Zellen herunterreguliert ist, damit die B-Zellen auch in Gegenwart eines mutagenen Prozesses wie der somatischen Hypermutation stark proliferieren können²³⁶⁻²³⁹. Der Transkriptionsrepressor Bcl6, der sowohl für die Keimzentrumsausbildung als auch für die Eigenschaften der KZ-B-Zellen essenziell ist und folglich in diesen eine hohe

Expression aufweist²⁴⁰, reprimiert direkt die Expression der genannten Faktoren²³⁶⁻²³⁹. In dieser Dissertation wurde jedoch trotz *Bcl6*-mRNA-Bildung eine hohe Expression von *Chk1* und *p53* in einer Zentroblasten/Zentrozyten-Population ($B220^+ CD95^+ PNA^+$) von Mäusen nachgewiesen (Abbildung 2.3). Dieses Resultat wird durch die Studie von Wu und Kollegen bestätigt, die in humanen Tonsillen sowohl in Zentroblasten als auch in Zentrozyten eine hohe Expression von *Chk1* auf mRNA- und Proteinebene detektierten²⁹².

Eine umfassende Studie zur Expression des direkten *Chk1*-Aktivators *ATR* in KZ-B-Zellen, gibt Hinweise für die Aufklärung dieses scheinbaren Widerspruchs²³⁶. Demnach ist in Zentroblasten keine *ATR*-Expression nachzuweisen²³⁶. Wird jedoch die *Bcl6*-Expression artifiziell durch *Bcl6*-shRNAs herabgesetzt, wird die *ATR*-Expression sofort reaktiviert²³⁶. Darüber hinaus wurde in Zentrozyten ein starker Anstieg der *ATR*-Expression durch die von T-Zellen ausgehende CD40-Signalgebung dokumentiert²³⁶.

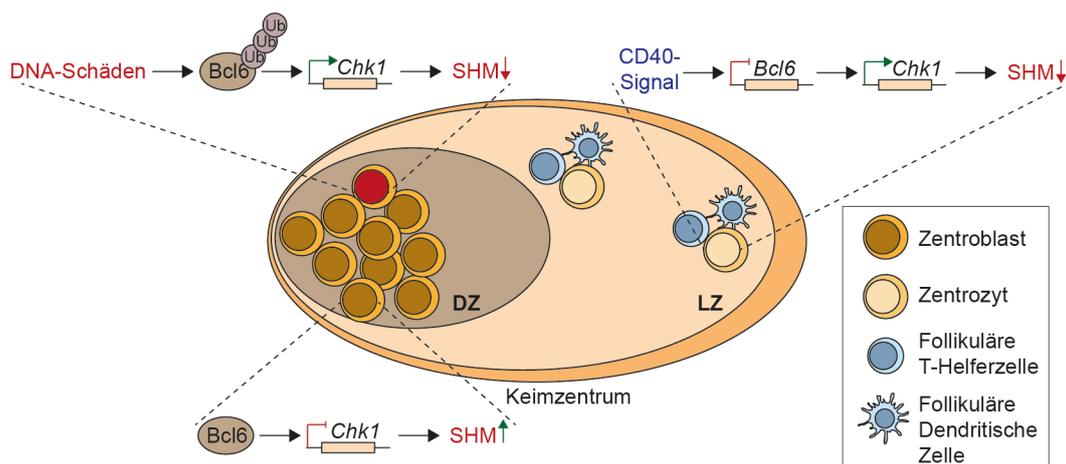


Abbildung 3.1: Modell der *Chk1*-Regulation in Keimzentrum-B-Zellen

In Zentroblasten wird die *Chk1*-Expression durch *Bcl6* herunterreguliert, während bei DNA-Schäden durch Induktion des *Bcl6*-Abbaus eine Reaktivierung der *Chk1*-Expression ermöglicht wird. In Zentrozyten wird die *Bcl6*-Expression durch die CD40-Signalgebung herabgesetzt. Auch hier könnte eine Aktivierung der *Chk1*-Expression erfolgen.

Abkürzungen: LZ: *light zone*, helle Zone; DZ: *dark zone*, dunkle Zone

Übereinstimmend mit Studien, die eine *Bcl6*-mRNA-Repression nach CD40-Signalgebung feststellten²⁴², ist eine differenzielle Regulation der DNA-Schadensantwort in Zentroblasten und Zentrozyten erkennbar. Unter Einbeziehung der Resultate von Phan und Kollegen, die in Zentroblasten einen ATM-abhängigen *Bcl6*-Abbau nach einem hohen Ausmaß an DNA-Schäden nachwiesen²⁴¹, kann folgendes Modell erstellt werden, das einen Einblick in die mögliche Regulation der *Chk1*-Expression im Keimzentrum gibt (Abbildung 3.1): Demzufolge wird in hypermutierenden Zentroblasten die Expression von *Chk1* und anderen Faktoren der

DNA-Schadensantwort durch Bcl6 herunterreguliert²³⁶⁻²³⁹. Wenn allerdings ein bestimmter Schwellenwert an DNA-Schäden überschritten wird, kann Bcl6 abgebaut werden, die *Chk1*-Expression kann zunehmen²⁴¹ und durch die parallel erfolgende *ATR*-Reexpression kann Chk1 aktiviert werden²³⁶. In den der Selektion unterliegenden Zentrozyten kann durch die CD40-vermittelte *Bcl6*-Repression ebenfalls eine *Chk1*-Expression erfolgen²⁴². Die *Chk1*-Expression könnte somit sowohl in Zentroblasten als auch in Zentrozyten aktiviert werden, um den negativen Folgen der somatischen Hypermutation entgegenzuwirken.

Das *c-Myc*-Gen, das für einen für das Zellwachstum und die Proliferation wichtigen Transkriptionsfaktor³⁴² kodiert, wird ebenfalls von Bcl6 in Zentroblasten reprimiert^{343,344}. In einer kleinen Zentrozytenpopulation, die sich kurz vor dem Wiedereintritt in die dunkle Zone befindet, ist jedoch eine Reaktivierung der *c-Myc*-Expression zu beobachten^{343,344}. Im Hinblick auf Resultate, die eine indirekte Aktivierung der *Chk1*-Expression durch *c-Myc* aufzeigen^{345,346}, könnte die erhöhte *c-Myc*-Expression in Zentrozyten die *Chk1*-Expression zusätzlich verstärken.

Erst kürzlich haben Victora und Kollegen neue Oberflächenmarker zur Separierung der Zentroblasten- und Zentrozytenpopulationen in Mäusen entdeckt¹⁰³. Die Verwendung dieser Oberflächenmarker eröffnet die Möglichkeit, das vorgestellte Modell der *Chk1*-Regulation im Keimzentrum zu verifizieren.

3.2 *Chk1*-Expression in B-Zelllymphomen

Bisher konnten keine *Chk1*-Genmutationen, wie Deletionen oder Punktmutationen, sowie Veränderungen des *Chk1*-Promotormethylierungsmusters in Proben von B-Zelllymphompatienten detektiert werden, die zu einer deregulierten *Chk1*-Expression führen könnten³⁴⁷. Jedoch wurde in 7 Proben aggressiver B-Zelllymphome, davon 4 DLBCL-Proben, eine herabgesetzte Chk1-Proteinbildung nachgewiesen³⁴⁷. In Burkitt-B-Lymphomzelllinien wurde hingegen eine hohe *Chk1*-Expression beschrieben³⁴⁵.

Dieser Expressionsunterschied könnte auf die charakteristischen Translokationen und Mutationen der B-Zelllymphomtypen zurückgeführt werden. In 40 % der DLBCL-Fälle ist eine Bcl6-Überexpression vorhanden³⁴⁸, die zur Herabsetzung der *Chk1*-Expression führen kann²³⁷. Burkitt-B-Lymphomzellen weisen hingegen meist eine *IgH/c-Myc*-Translokation auf^{162,163,349}, die eine hohe *c-Myc*-Expression hervorruft und mit einer zunehmenden *Chk1*-Expression assoziiert ist³⁴⁵.

3.3 *Chk1*-Expression in der DT40-B-Lymphomzelllinie

Die DT40-Zelllinie ist eine Hühner-B-Lymphomzelllinie mit ebenfalls hoher *c-Myc*-Expression. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde in den weiterentwickelten Varianten der DT40-Zelllinie Cre1 und ΨV , mit erhöhter Ig-Diversifizierungsaktivität, eine *Chk1*-Amplifikation nachgewiesen (Abbildungen 2.5 und 2.6). PCR- und Southern-Blot-Analysen deuteten sogar auf das Vorhandensein von 4 *Chk1*-Allelen hin (Abbildungen 2.5, 2.6 und 2.7). Dies wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben, jedoch wurde diesbezüglich nur die ursprüngliche DT40-Zelllinie indirekt untersucht³⁰³. Zudem gibt es in der DT40-Zelllinie Hinweise auf eine Amplifikation des Mikrochromosoms 24, auf dem das *Chk1*-Gen lokalisiert ist³¹⁷. Darüber hinaus konnten in der DT40Cre1-Zelllinie, im Gegensatz zur parentalen DT40CL18-Zelllinie, Aberrationen im Spindel-*Checkpoint* sowie in der Zentrosomenamplifikation nach Induktion von DNA-Schäden nachgewiesen werden, was für eine höhere *Chk1*-Aktivität in der DT40Cre1-Zelllinie spricht³⁵⁰. Dies impliziert, dass die *Chk1*-Amplifikation erst bei der Generierung der DT40Cre1-Zelllinie aus der DT40CL18-Zelllinie oder zu einem späteren Zeitpunkt entstanden ist.

Es stellt sich hierbei die Frage, ob es sich nur um eine „zufällige“ Begleiterscheinung der genetischen Instabilität einer Tumorzelllinie handelt, oder aber ob die weiterentwickelten DT40-Zelllinien mit erhöhter Ig-Diversifizierungsaktivität die *Chk1*-Amplifikation für das Überleben benötigen.

Obwohl die DT40-Zelllinie eine Trisomie des Chromosoms 2, eine Monosomie des Chromosoms 4 und ein zusätzliches Mikrochromosom aufweist, wird der Karyotyp als stabil angesehen^{315,316}. Chang und Delany beschrieben jedoch zytogenetische Variationen von DT40-Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs sowie eine karyotypische Instabilität bei längerer Kultivierungszeit³¹⁶. Auch Neiman und Kollegen berichteten von Veränderungen in der Kopienanzahl von Genen nach längerer Kultivierung der DT40-Zelllinie³¹⁷. Aufgrund dieser Beobachtungen kann eine „zufällige“ Amplifikation des *Chk1*-Gens als Folge der genetischen Instabilität der DT40-Zelllinie nicht ausgeschlossen werden.

Genetische Aberrationen bleiben jedoch selten ohne einen entsprechenden Selektionsdruck bestehen³⁵¹. Die Erhaltung der *Chk1*-Amplifikation in beiden DT40-Varianten, die zwar voneinander abstammen, aber für längere Zeit separat kultiviert wurden, weist auf einen Selektionsvorteil für die erhöhte *Chk1*-Expression hin.

Auch weitere Ergebnisse dieser Doktorarbeit deuten darauf hin, dass *Chk1* für das Überleben der DT40-Zellen mit hoher Ig-Diversifizierungsaktivität benötigt wird: Zum einen wurde eine signifikante Herabsetzung der *Chk1-Targeting*-Effizienz beim

Knockout des 3. *Chk1*-Allels sowohl in der DT40Cre1- als auch in der DT40ΨV-Zelllinie nachgewiesen (Tabelle 2.1), zum anderen war die Generierung eines vollständigen *Chk1-Knockouts* erfolglos. Beim Versuch, das 4. *Chk1*-Allel in der DT40Cre1-Zelllinie auszuschalten, konnten zwar die 4 unterschiedlichen Resistenzkassetten in den *Chk1*-Allelen mit einer PCR-Strategie nachgewiesen werden, Southern- und Western-Blot-Analysen wiesen allerdings weiterhin auf eine vorhandene Chk1-Expression hin. Diese Beobachtung impliziert eine Reduplikation des *Chk1*-Gens bei geringer *Chk1*-Expression. Diese Vermutung könnte durch eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)-Analyse bestätigt werden, die jedoch aus technischen Gründen nicht durchgeführt wurde. Das Phänomen einer Genreduplikation bei *Knockout* von essenziellen Genen ist in DT40-Zellen bereits bekannt und wurde bei der Inaktivierung des *BRCA2*-Gens ebenfalls beobachtet³⁵².

Die Fragestellung warum Chk1 für das Überleben von DT40-Zellen mit hoher Ig-Diversifizierungsaktivität benötigt werden könnte, wird im Folgenden und insbesondere in Abschnitt 3.8 näher erläutert.

3.4 Erhöhung der somatischen Hypermuation bei Chk1-Inhibition und -Depletion

Die hohe Expression von Chk1 in KZ-B-Zellen und bestimmten B-Zelllymphomtypen ist ein Hinweis auf eine mögliche Funktion von Chk1 in der Keimzentrumsreaktion. Um die Rolle von Chk1 in der somatischen Hypermuation zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei unterschiedliche Methoden gewählt: (I) Das *GFP*-Reportersystem in der Raji-Zelllinie, durch das die somatische Hypermuationsaktivität durch Reversion des Stopp-Codons im *GFP*-Gen gemessen werden kann, und (II) die DT40ΨV-Zelllinie, deren Anteil an IgM-negativen Zellen mit der somatischen Hypermuationsrate korreliert .

3.4.1 Erhöhung der somatischen Hypermuation bei CHK1-Inhibition

Interessanterweise war bei CHK1-Inhibition in der Raji-Zelllinie bereits ohne exogene Induktion von DNA-Schäden eine CDC25A-Akkumulation nachzuweisen (Abbildung 2.2 D). Diese Beobachtung deutet auf eine konstitutive CHK1-Aktivierung in diesen Zellen hin. In nicht-transformierten KZ-B-Zellen wurde ebenfalls eine sofortige CHK1-Aktivierung detektiert, die ausschließlich durch Bcl6-Repression hervorgerufen wurde²³⁶. Es scheint, dass das zelluläre Programm von KZ-B-Zellen darauf ausgelegt ist, sehr schnell auf DNA-Schäden zu reagieren²³⁶. Dies zeigten auch Gourzi und

Kollegen, die in ihrer Studie nach induzierter *AID*-Expression eine *CHK1*-Aktivierung nachwiesen²⁴⁴. Lediglich die Expressionsherabsetzung durch *Bcl6* scheint der DNA-Schadensantwort entgegenzuwirken²³⁶.

Die *CHK1*-Inhibitoren wurden bewusst in geringeren Konzentrationen als üblich eingesetzt, da sie in höheren Konzentrationen die Proliferationsrate und die zelluläre Vitalität der *C-MYC*-überexprimierenden Raji-Zelllinie deutlich herabsetzten²⁷⁸. Dieser Effekt könnte auf die möglicherweise unspezifische Wirkungsweise der Inhibitoren zurückgeführt werden^{275,276}. Allerdings wurde bereits auch in anderen *C-MYC*-überexprimierenden B-Lymphomzelllinien sowohl bei *CHK1*-Hemmung als auch bei *Chk1*-Depletion eine Caspase-abhängige Apoptose nachgewiesen^{345,346}. Andere Tumorzelllinien zeigen bei *CHK1*-Hemmung jedoch nur dann eine apoptotische Antwort, wenn gleichzeitig die Replikation blockiert wird oder DNA-Schäden induziert werden^{201,353,354}. Es wurde postuliert, dass die hohe *C-MYC*-Expression der B-Lymphomzelllinien DNA-Schäden hervorruft und dadurch die erhöhte Sensitivität gegenüber *CHK1*-Inhibitoren verursacht³⁴⁶. Die Verwendung der *CHK1*-Inhibitoren in geringeren Konzentrationen ermöglichte die Umgehung der apoptotischen Antwort (Abbildung 2.2 B) trotz nachgewiesener, aber vermutlich nicht vollständiger *CHK1*-Hemmung (Abbildung 2.2 D). So konnte die Rolle von *CHK1* in der somatischen Hypermutation untersucht werden, ohne dass die somatische Hypermutation durch eine veränderte Proliferationsrate (Abbildung 2.2 C) oder eine herabgesetzte Vitalität (Abbildung 2.2 B) gestört wurde.

Unter Anwendung des *GFP*-Reportersystems wurde bei *CHK1*-Inhibition ein bis zu doppelt so hoher Anstieg an *GFP*-Revertanten im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Das sich in dem *GFP*-Gen befindliche Stopp-Codon TAG ist im *AID-Hotspot*-Motiv RGYW integriert^{29,267}. Die erhöhte Anzahl an *GFP*-Revertanten korreliert somit mit der Anzahl an Mutationen, die das Stopp-Codon revertieren²⁶⁷. Theoretisch kann an der 3. Codonposition jede Punktmutation, außer einer Transition von G nach A, zur Reversion des Stopp-Codons führen, zum größten Teil erfolgt dies jedoch durch G→C-Transversionsmutationen²⁶⁷. Während der somatischen Hypermutation wird dieser Mutationstyp hauptsächlich durch die Rev1-abhängige Translesionssynthese über abasische Stellen erzeugt^{6,169,355}.

Ohne Sequenzanalyse des *GFP*-Gens ist es jedoch nicht möglich einen Rückschluss auf die genaue Funktionsweise von *CHK1* in der somatischen Hypermutation zu ziehen. Generell betrachtet weist das Ergebnis aber darauf hin, dass *CHK1* die somatische Hypermutation negativ reguliert.

3.4.2 Erhöhung der somatischen Hypermuation bei *Chk1*-Depletion

Mit dem Ziel den potenziellen Einfluss von Chk1 auf die somatische Hypermuation in einem genetisch eindeutigeren System zu charakterisieren und um Einblick in mechanistische Aspekte zu erhalten, wurde die DT40ΨV-Zelllinie als Modellsystem verwendet. In dieser Zelllinie kann die somatische Hypermuationsaktivität im endogenen *Ig_L*-Locus untersucht werden. Bei Herabsetzung der *Chk1*-Expression durch Gen-*Targeting* wurde so eine erhöhte somatische Hypermuationsaktivität durch einen erhöhten Anteil an IgM-negativen Zellen nachgewiesen (Abbildung 2.11). Detaillierte Sequenzanalysen bestätigten, dass bei *Chk1*-Depletion eine zweifach erhöhte Mutationsfrequenz im *Ig_L*-Locus auftrat, deren Anstieg durch *Chk1*-Rekonstitution wieder aufgehoben wurde (Abbildung 2.13 B). Bei genauerer Betrachtung des Mutationsmusters wurden außerdem in der *Chk1*-depletierten Zelllinie, im Vergleich zur *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie, zwei Unterschiede festgestellt (Abbildung 2.13 C und D): (I) Eine signifikante Erhöhung der Transitionsmutationen an C:G-Basenpaaren und (II) ein signifikanter Anstieg der C→G-Transversionsmutationen. Die Erhöhung der Mutationsfrequenz und die Veränderung des Mutationsmusters waren nicht auf eine generell erhöhte genetische Instabilität zurückzuführen, die man bei *Chk1*-Depletion erwarten würde^{202,203}, sondern auf eine Erhöhung der AID-abhängigen Mutagenese. Dies wurde gezeigt, indem *AID*^{-/-} *Chk1*-depletierte DT40ΨV-Zelllinien mit einem Leervektor und parallel mit einem *AID-GFP*-Transgen transfiziert wurden (Abbildung 2.12 B und C). In diesem experimentellen System wurde die Erhöhung der somatischen Hypermuation ausschließlich in Anwesenheit von AID nachgewiesen.

3.5 Ist die negative Regulation der somatischen Hypermuation eine generelle Eigenschaft der DNA-Schadensantwort?

Es stellt sich die Frage, ob es sich bei der potenziellen Rolle von Chk1 in der somatischen Hypermuation um eine Chk1-spezifische Funktion handelt, oder aber ob die gesamte DNA-Schadensantwort darauf abgestimmt ist, die somatische Hypermuation negativ zu regulieren.

Die DNA-Schadenssensorinase ATR wird indirekt über die ATRIP-RPA-Interaktion an ssDNA rekrutiert und führt anschließend zur Chk1-Aktivierung²⁰⁶. In humanen Proben von Patienten mit dem Seckel-Syndrom, die eine Mutation im *ATR*-Gen aufweisen, wurde jedoch keine erhöhte Hypermuationsfrequenz³⁵⁶ wie bei *Chk1*-depletierten DT40-Zelllinien nachgewiesen (Abbildung 2.13 C und D). Das Mutationsmuster ist

zwar verändert und zeigt den Verlust der Strangpräferenz an A:T-Basenpaaren, ist allerdings nicht mit dem Mutationsmuster der *Chk1*-depletierten DT40-Zelllinien vergleichbar³⁵⁶. Die Diskrepanz im Mutationsmuster könnte durch die unterschiedlichen Modellsysteme erklärt werden, da *in vivo* A:T- und C:G-Basenpaare mit einer vergleichbaren Frequenz mutiert werden, während *in vitro* eine stark herabgesetzte A:T-Mutagenese vorhanden ist^{267,327,328}. Es wäre aber auch denkbar, dass Chk1 in KZ-B-Zellen ATR-unabhängig, z.B. durch die DNA-Schadenssensor kinase ATM, aktiviert wird^{185,204,205}. ATM-defiziente Mäuse zeigen jedoch ebenfalls keine Erhöhung der Hypermutationsfrequenz und auch keine Veränderung des Mutationsmusters³⁵⁷. Dieses Resultat könnte ebenfalls durch die Redundanz zu ATR erklärt werden und schließt eine ATM-abhängige Chk1-Aktivierung in KZ-B-Zellen nicht aus.

Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass Chk1 durch Aktivierung von Faktoren der DNA-Schadensantwort, wie des Transkriptionsfaktors p53, die somatische Hypermutation indirekt reguliert. Die Studien zur p53-Funktion in der somatischen Hypermutation sind jedoch nicht ganz konsistent: Ratnam und Kollegen beschrieben in 8 Wochen alten *p53*^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Mutationsanzahl an Adeninen bei gleichbleibender Hypermutationsfrequenz³⁵⁸. Unsere Arbeitsgruppe konnte indessen, unter Einbeziehung einer größeren Anzahl an individuellen Mäusen, eine moderate Erhöhung der Hypermutationsfrequenz nachweisen, die mit einem Anstieg der Transversionsmutationen und Mutationen an A:T-Basenpaaren einherging²⁷⁰. Die erhöhte Hypermutationsfrequenz bei Chk1-Inhibition oder *Chk1*-Depletion ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf einen p53-abhängigen Effekt zurückzuführen, da die Raji-Zelllinie kein funktionelles p53 aufweist^{270,284-286} und in der DT40-Zelllinie der p53-Status ebenfalls kontrovers diskutiert wird^{334,359-361}.

Betrachtet man die Studien im Gesamten, scheint die negative Regulation der somatischen Hypermutation keine generelle Eigenschaft der DNA-Schadensantwort zu sein. Es könnte sich somit um eine Chk1-spezifische Funktion handeln.

3.6 Mögliche Funktionsweise von Chk1 in der somatischen Hypermutation

Chk1 könnte die somatische Hypermutation auf verschiedene Weise negativ regulieren: (I) Durch Herabsetzung der AID-Expression, (II) durch Beeinträchtigung der AID-Aktivität, (III) durch Reduzierung des AID-Substrat-Vorkommens, (IV) durch Beeinflussung des Zellzyklus oder (V) durch Eingriff in die DNA-Reparaturmechanismen.

Im Folgenden werden die oben aufgeführten Punkte unter Einbeziehung der eigenen Resultate und der aktuellen Literatur diskutiert.

3.6.1 AID-Expression

Die AID-Expression wird durch multiple Mechanismen sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert, wie z.B. durch miRNAs und alternatives Spleißen³⁶² (Abschnitt 1.4.2). Eine zusätzliche Ebene der Regulation bietet zudem die Stabilität des AID-Proteins, die direkt von der zellulären Lokalisation des AID-Proteins abhängt (Abschnitt 1.4.3).

Chk1 ist eine Histon-H3-Threonin-11-Kinase und reguliert die Expression von Genen in Abhängigkeit von DNA-Schäden²¹⁸ (Abschnitt 1.5.2). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Chk1 an der Regulation des alternativen Spleißens und des Pausierens der RNA-Polymerase II beteiligt ist^{363,364}.

Es wäre somit durchaus möglich, dass Chk1 die AID-Expression reguliert. DT40Cre1-Zelllinien mit unterschiedlichem Chk1-Status wiesen jedoch vergleichbare AID-Proteinlevel auf (Abbildung 2.6 D). Darüber hinaus zeigten DT40 Ψ ⁻ AID^{-/-}-Zelllinien, die mit einem AID-GFP-Transgen transfiziert wurden, ähnliche GFP-Fluoreszenzintensitäten trotz unterschiedlicher Chk1-Expression (Abbildung 2.12 C). Dasselbe Resultat wurde bei Transfektion mit einem AID- Δ NES-GFP-Transgen beobachtet, das zur Bildung eines sich hauptsächlich nukleär befindlichen AID-Proteins führt (Abbildung 2.12 D). Chk1 scheint auch in diesem Fall die AID-Expression nicht entscheidend zu beeinflussen. Es wäre jedoch interessant, dies mit der Immunfluoreszenzmethodik zu bestätigen, mit der die Auswirkung der Chk1-Depletion auf die zelluläre Lokalisation von AID-GFP-Fusionsproteinen direkt analysiert werden kann.

3.6.2 AID-Aktivität

Eine weitere, wichtige Regulationsebene stellt die Phosphorylierung des AID-Proteins dar, die sowohl eine hemmende¹³⁵ als auch eine aktivierende Wirkung^{134,139} ausüben kann (Abschnitt 1.4.3). Die Phosphorylierung an Serin 38 des AID-Proteins, die bekanntermaßen von PKA vermittelt wird, ist aktivierend^{134,139} und fördert die Assoziation von AID mit RPA^{134,140,141}. Interessanterweise ergaben *in silico*-Analysen (<http://www.hprd.org>)³⁶⁵, dass sich an Serin 38 des AID-Proteins (VKRRDS) ebenfalls ein Phosphorylierungsmotiv der Serin-Threonin-Kinase Chk1 [(M/I/L/V)X(R/K)XX(S/T)] befindet³⁶⁶.

AID^{-/-} Chk1-depletierte DT40ΨV-Zelllinien, die mit einem AID-ΔNES-GFP-Transgen transfiziert wurden, das eine zusätzliche Mutation an Serin 38 aufwies (S38A), zeigten jedoch ebenfalls eine erhöhte somatische Hypermutationsaktivität (Abbildung im Anhang 4.2). Auch weitere Resultate deuten indirekt darauf hin, dass Chk1 die AID-Aktivität nicht beeinflusst: Zum einen waren im *Ig_L*-Locus der Chk1-depletierten DT40ΨV-Zelllinien nur bestimmte Mutationstypen erhöht, aber nicht alle im gleichen Ausmaß (Abbildung 2.14 C und D), was man bei einer erhöhten AID-Aktivität erwarten würde, zum anderen wurde in Chk1-depletierten DT40Cre1-Zelllinien eine Herabsetzung und keine Erhöhung der AID-vermittelten Ig-Genkonversion festgestellt (Abbildungen 2.17 und 2.18).

Es handelt sich hierbei jedoch nur um Hinweise, die nahelegen, dass Chk1 die AID-Aktivität nicht beeinflusst. *In vitro*-Kinase-Experimente, mit denen direkt untersucht werden kann, ob Chk1 dazu in der Lage ist AID zu phosphorylieren, könnten einen weiteren Einblick in diese Thematik gewähren.

3.6.3 AID-Substrat-Vorkommen

Neben der Regulation der AID-Aktivität könnte Chk1 auch das Vorkommen des AID-Substrats, der ssDNA, begünstigen. Das ssDNA-bindende Protein RPA fördert die Assoziation von AID mit ssDNA und dadurch die DNA-Deaminierungsaktivität von AID¹⁴⁰. Chk1-Hemmung und -Depletion führen zu einer erhöhten RPA-Bindung an ssDNA sowie zur RPA-Hyperphosphorylierung^{203,367}. Zudem wurden in Chk1-depletierten Zellen abnorme Replikationsstrukturen mit langen einzelsträngigen Regionen beobachtet³⁶⁸. Der Anstieg der somatischen Hypermutation in Chk1-depletierten DT40ΨV-Zelllinien könnte somit durch dieses erhöhte AID-Substrat-Vorkommen erklärt werden.

Beckerman und Kollegen entdeckten darüber hinaus eine Funktion von Chk1 in der Transkriptionselongation der *p21*-mRNA³⁶⁴. Chk1-Inhibition führt nach

Hydroxyurea (HU)-Behandlung zur erhöhten Spt5-Rekrutierung an den *p21*-Locus³⁶⁴. Spt5 ist am Pausieren der RNA-Polymerase II während der frühen Transkriptionselongation beteiligt³⁶⁹. Erst kürzlich konnte eine direkte Assoziation von AID mit Spt5 und eine Korrelation der Spt5-Dichte mit der AID-induzierten Mutagenese nachgewiesen werden¹⁴⁷.

Dieser Zusammenhang könnte ebenfalls die erhöhte somatische Hypermutationsrate bei *Chk1*-Depletion begründen, jedoch würde man auch in diesem Fall eine Erhöhung und nicht die nachgewiesene Herabsetzung der AID-vermittelten Ig-Genkonversion erwarten (Abbildung 2.17 und 2.18). Vermutlich handelt es sich somit bei dem erhöhten AID-Substrat-Vorkommen nur um einen potenziell dazu beitragenden, aber nicht entscheidenden Faktor. Es wäre jedoch interessant, den Zusammenhang von Chk1, Spt5 und AID näher zu untersuchen.

3.6.4 Zellzyklus

Alternativ könnte die erhöhte somatische Hypermutationsrate bei *Chk1*-Depletion durch Veränderungen im Zellzyklus erklärt werden. Es wurde postuliert, dass abhängig von der Zellzyklusphase während der sekundären Ig-Diversifizierungsprozesse unterschiedliche Reparaturmechanismen zum Einsatz kommen, die z.T. eine divergierende Fehlerrate aufweisen^{179,180,370,371}. Reynaud und Kollegen erstellten z.B. ein Modell, bei dem Uracile in der G1-Phase durch die *Mismatch*-Reparatur prozessiert werden während UNG2 diese Aufgabe in der S-Phase übernimmt³⁷¹. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass AID vor allem in der G1-Phase DNA-Reparatur Foci³⁷²⁻³⁷⁴ bzw. Mutationen^{375,376} hervorruft.

Eine konditionelle *Chk1*-Heterozygotie in der Milchdrüse von Mäusen führt zu einer erhöhten Anzahl an Zellen in der S-Phase³⁰⁰. In *Chk1*^{-/-} DT40-Zellen wurde hingegen eine leichte Abnahme der in der S-Phase befindlichen Zellen beobachtet, die mit einem moderaten Anstieg an Zellen in der G1- und G2/M-Phase assoziiert war³⁰³. *Chk1*-siRNAs in HeLa Zellen beeinflussen den Zellzyklus wiederum nicht³⁷⁷. In Abwesenheit von DNA-Schäden scheint Chk1 somit nur einen abgeschwächten Effekt auf den Zellzyklus zu haben^{303,377}. Werden jedoch DNA-Schäden z.B. durch γ -Bestrahlung induziert, ist bei reduzierter *Chk1*-Expression in vielen Zelltypen der G2/M-Zellzyklusarrest außer Kraft gesetzt^{197,198,303}. Als Folge befindet sich eine erhöhte Anzahl an Zellen in der G1-Phase^{197,198,303}.

Die Erhöhung der somatischen Hypermutation durch eine erhöhte Prävalenz einer bestimmten Zellzyklusphase, wie z.B. der G1-Phase, ist somit bei *Chk1*-Depletion nicht auszuschließen. Für die Beantwortung dieser noch offenen Frage sind noch weitere

Experimente erforderlich, die aber die genaue Klärung der Zellzyklusabhängigkeit der somatischen Hypermutation zur Voraussetzung haben.

3.6.5 Reparaturmechanismen

Chk1 ist in zahlreiche Reparaturmechanismen involviert, die an der Mutagenese der *Ig*-Gene beteiligt sind (Abschnitt 1.5.3.2). Folglich liegt die Vermutung nahe, dass Chk1 durch seine Rolle in der DNA-Reparatur die somatische Hypermutation negativ reguliert. Anhand des Mutationsmusters der *Ig*-Gene ist häufig erkennbar, welcher Reparaturweg beeinflusst sein könnte (Abschnitt 1.3.3).

Die erhöhte Anzahl an C:G-Transitionsmutationen im *Ig_L*-Locus der *Chk1*-depletierten DT40ΨV-Zelllinien (Abbildung 2.13 C und D) könnte daher folgendermaßen erklärt werden: Zum einen (I) durch eine Verstärkung der direkten Replikation über das Uracil, zum anderen (II) durch einen Defekt in der Basenexzisionsreparatur, z.B. der Exzision des Uracils durch UNG2. Das erhöhte Vorkommen von C→G-Transversionsmutationen (Abbildung 2.13 C und D) könnte hingegen (III) auf einen Defekt in der Transläsionssynthese hinweisen. Dem Mutationsmuster zufolge könnte Chk1 somit in multiple Reparaturwege der somatischen Hypermutation involviert sein. Alternativ könnte Chk1 (IV) einen fehlerfreien Reparaturmechanismus, wie die homologe Rekombinationsreparatur, regulieren.

Im Folgenden wird die mögliche Beteiligung von Chk1 an den obengenannten Reparaturwegen der somatischen Hypermutation erläutert.

3.6.5.1 Direkte Replikation über das Uracil

Die direkte Replikation über die AID-induzierten Uracile führt durch die Paarung von Adenin mit Uracil hauptsächlich zur Entstehung von Transitionsmutationen (Phase 1a; Abbildung 1.2), die in hoher Anzahl in *Chk1*-depletierten DT40ΨV-Zelllinien nachgewiesen wurden (Abbildung 2.13 C und D).

Chk1 greift bei DNA-Schäden im Zuge des Intra-S-Phase-*Checkpoints* in die DNA-Replikation ein, indem es sowohl die Initiation („*Origin firing*“) ³⁷⁸⁻³⁸⁰ als auch die Elongation der Replikation ³⁸¹ hemmt.

Es wäre denkbar, dass Chk1 bei AID-induzierten DNA-Schäden das Fortschreiten der DNA-Replikation einschränkt und dadurch indirekt die Uracil-Exzision fördert. Der zugrundeliegende Mechanismus ist hierbei allerdings noch nicht geklärt.

3.6.5.2 Basenexzisionsreparatur

Alternativ könnte Chk1 die Aktivität der Basenexzisionsreparatur direkt erhöhen. Ausgehend vom Neuberger-Modell⁶ verhindert ein Defekt in UNG die Uracil-Exzision und demzufolge die Transläsionssynthese über die abasische Stelle, die hauptsächlich zu C:G-Transversionsmutationen führt (Phase 1b, Abbildung 1.2). Die in der G1-Phase eingeführten Uracile bleiben somit bis zur Replikation in der S-Phase bestehen und werden durch direkte Replikation in Transitionsmutationen umgewandelt (Phase 1a, Abbildung 1.2).

So führt sowohl die UNG-Defizienz in DT40-Zellen als auch in einem Mausmodell zu einem starken Anstieg dieser Mutationsart^{45,80}. Im Vergleich zur *Chk1*-Depletion in der DT40 Ψ V-Zelllinie mit bis zu 50 % an C:G-Transitionsmutationen (Abbildung 2.13 C und D), handelt sich bei UNG-Defizienz jedoch um eine weitaus drastischere Erhöhung mit bis zu 95 % an C:G-Transitionsmutationen^{45,80}.

Bisher wurde auch noch keine Funktion von Chk1 in der Basenexzisionsreparatur beschrieben. Die *Checkpoint*-Kinase 2, die z.T. redundante Funktionen zu Chk1 aufweist, phosphoryliert allerdings XRCC1 und unterstützt dadurch die Basenexzisionsreparatur³⁸². In *Chk1*-depletierten DT40-Zellen wäre somit ein Defekt in der Basenexzisionsreparatur durchaus denkbar. Untersuchungen des Mutationsmusters der *Chk1*-depletierten DT40Cre1-Zelllinien sprechen jedoch dagegen (Abbildung 2.18). Dies wird in Abschnitt 3.6.5.4 näher erläutert.

3.6.5.3 Transläsionssynthese

Neben dem starken Anstieg der Transitionsmutationen wurde bei *Chk1*-depletierten DT40 Ψ V-Zellen auch eine moderate Zunahme der C→G-Transversionsmutationen nachgewiesen (Abbildung 2.13 C und D). Genetische Manipulationen des Rad6-Wegs in DT40, wie der *Knockout* der E3-Ubiquitin Ligase Rad18 und die PCNA^{K164}-Mutante sowie der *Knockout* der Transläsionspolymerase Rev1, führen zu einer starken Herabsetzung der C:G-Transversionsmutationen und zu einer leichten Abnahme der C:G-Transitionsmutationen^{50,169}. Ein ähnliches Mutationsmuster wurde auch in *Rev1*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen^{49,355}. Der Anstieg der C→G-Transversionsmutationen in *Chk1*-depletierten DT40 Ψ V-Zellen könnte somit auf eine verstärkte Rev1-abhängige Transläsionssynthese über die abasische Stelle hindeuten (Phase 1b; Abbildung 1.2). Es wurde jedoch beschrieben, dass die Herabsetzung der *Chk1*-Expression die PCNA-Monoubiquitinierung und dadurch die Rekrutierung der Transläsionspolymerasen hemmt und nicht fördert^{245,246}. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass die Rekrutierung von Rev1 PCNA-ubiquitinierungsunabhängig erfolgen kann^{50,169}.

Ob Chk1 durch seine Funktion in der Transkriptionssynthese die somatische Hypermutation beeinflusst, bleibt demnach noch zu klären.

3.6.5.4 Homologe Rekombinationsreparatur

Eine alternative Möglichkeit für die Entstehung des Mutationsmusters der *Chk1*-depletierten DT40ΨV-Zellen ist die Beeinflussung der homologen Rekombinationsreparatur durch Chk1. Bei Herabsetzung der *Chk1*-Expression in DT40ΨV-Zellen weist insbesondere das erhöhte Vorkommen von Deletionen und Insertionen im *Ig_L*-Locus darauf hin (Abbildung 2.13 B), da diese durch einen Defekt in der Doppelstrangbruch-Reparatur entstehen können¹⁷⁶.

Hasham und Kollegen konnten erst kürzlich die Notwendigkeit der homologen Rekombination während der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels nachweisen^{179,180}. Ein Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur, in diesem Fall im Rad51-Paralog XRCC2, führt nicht nur zu einer erhöhten Anzahl an AID-induzierten Doppelstrangbrüchen in den *Ig_H*-Genen, sondern auch zusätzlich in den Nicht-*Ig*-Genen und ruft eine erhöhte genetische Instabilität hervor^{179,180}. Des Weiteren wurde während der somatischen Hypermutation die direkte Rekrutierung der HR-Faktoren Rad51 und Rad52 an die entstandenen Doppelstrangbrüche innerhalb des V(D)J-Segments nachgewiesen^{383,384}. Defizienzen in den HR-Faktoren Rad54 und Rad54B, die nach dem Strangaustausch benötigt werden, haben jedoch keine Auswirkung auf die somatische Hypermutation in *M. musculus*^{385,386}.

Ein ähnliches Phänomen wurde in der DT40CL18-Zelllinie beobachtet, in der wie bei der DT40Cre1-Zelllinie hauptsächlich Ig-Genkonversion und nur zu einem geringen Anteil somatische Hypermutation stattfindet^{82,83}. Auch hier hat der *Rad54-Knockout* keinen Einfluss auf die somatische Hypermutation, sondern führt ausschließlich zur Herabsetzung der HR-vermittelten Ig-Genkonversion⁸². Der *Knockout* der *Rad51-Paraloge* führt hingegen zu einer erhöhten somatischen Hypermutationsrate bei einer ebenfalls herabgesetzten Ig-Genkonversion⁸³. Diese Resultate implizieren, dass die Entscheidung zwischen der homologen Rekombinationsreparatur und der somatischen Hypermutation während oder kurz vor der Rad51-Polymerisierung getroffen wird³³⁸.

Diese Beobachtungen wurden in der vorliegenden Dissertation angewendet, um aufzuklären, ob Chk1 die somatische Hypermutation durch Aktivierung der homologen Rekombinationsreparatur negativ reguliert. Ähnlich wie beim *Knockout* der Rad51-Paraloge wurde in *Chk1*-depletierten DT40Cre1-Zelllinien eine erhöhte Anzahl an matrizenunabhängigen Nukleotidsubstitutionen und eine gleichzeitige Herabsetzung der Ig-Genkonversionsereignisse durch Sequenzierung des *Ig_L*-Locus nachgewiesen (Abbildung 2.18 B und C). Die erhöhte Anzahl an matrizenunabhängigen

Nukleotidsubstitutionen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem Anstieg der somatischen Hypermutationsrate gleichzusetzen. Wie bereits bei den *Knockouts* der Rad51-Paraloge festgestellt⁸³, befanden sich diese hauptsächlich an C:G-Basenpaaren (Abbildung 2.18 B und C) und waren vor allem in den CDR-Regionen vorzufinden (Abbildung 2.19). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass Chk1 zur Herabsetzung der somatischen Hypermutation führt, indem es die Einleitung der homologen Rekombinationsreparatur fördert. In der Tat wurde bereits nachgewiesen, dass Chk1 sowohl auf direkte als auch auf indirekte Weise die Assoziation von Rad51 mit einzelsträngiger DNA unterstützt¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ (Abschnitt 1.5.3.2).

Weitere Hinweise auf einen Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur der *Chk1*-depletierten DT40Cre1-Zelllinien sind die identifizierten Punktmutationen unmittelbar nach Ig-Genkonversionsereignissen (Abbildung 2.19), eine ungewöhnlich große Insertion (Abbildung 2.19) sowie eine tendenziell reduzierte Ig-Genkonversionstraktlänge (Abbildung 2.20). Darüber hinaus wurde eine moderate Herabsenkung der HR-abhängigen gerichteten Integration des *RDM1-Targeting*-Vektors beobachtet (Tabelle 2.2).

Eine weitere Bestätigung lieferte die nähere Untersuchung der matrizenunabhängigen Nukleotidsubstitutionen im *Ig_L*-Locus der DT40Cre1-Zelllinien. Durch das Verhältnis von Transitions- zu Transversionsmutationen kann ermittelt werden, ob es sich um einen Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur handelt oder um eine Störung in der Basenexzisionsreparatur.

DT40-Zelllinien mit einem Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur, wie die XRCC2/3-⁸³, BRCA1-³³⁹ sowie BRCA2-*Knockout*-Zelllinien⁸⁴, weisen etwa 60-80 % C:G-Transversionsmutationen auf. Ein Defekt in der Basenexzisionsreparatur der DT40-Zelllinie, wie eine UNG-Defizienz⁸⁰ oder -Hemmung⁷⁸, führt hingegen zur Entstehung von 70-95 % C:G-Transitionsmutationen.

Die *Chk1*-depletierte DT40Cre1-Zelllinie zeigte im Vergleich zur DT40Cre1 *Chk1*^{+/+/+}-Zelllinie eine signifikante Erhöhung der C:G-Transversionsmutationen (von 19 % auf 46 %) sowie eine moderate Herabsetzung der C:G-Transitionsmutationen (von 57 % auf 46 %; Abbildung 2.18 B und C). Die Tatsache, dass die C:G-Transitionsmutationen nicht angestiegen sind, spricht gegen eine Störung der Basenexzisionsreparatur. Der Anstieg der C:G-Transversionsmutationen indiziert hingegen einen Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur, jedoch ist die Zunahme nicht so deutlich wie z.B. bei der XRCC2/3-^{-/-} DT40-Zelllinie⁸³. Dies könnte auf die noch vorhandene Restaktivität der homologen Rekombinationsreparatur in der *Chk1*-depletierten Zelllinie zurückgeführt werden.

Insgesamt betrachtet, weisen die Resultate auf eine Funktion von Chk1 in der homologen Rekombinationsreparatur hin, die zur Einschränkung der somatischen Hypermutation führen kann^{179,180}.

3.7 Modell für die mechanistische Funktionsweise von Chk1 in der Regulation der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion

Aus den erhaltenen Resultaten und den bereits aufgeführten Studien lässt sich ein Modell erstellen, bei dem Chk1 durch Regulation der RPA- und Rad51-Abundanz an ssDNA das Ausmaß der somatischen Hypermutation reguliert.

Die RPA-Assoziation an ssDNA ist direkt proportional zur AID-Aktivität³⁸⁷. Darüber hinaus unterstützt RPA die somatische Hypermutation *in vitro*¹⁴⁰, während die Rad51-Polymerisierung für die Einleitung der homologen Rekombinationsreparatur benötigt wird^{256,257}, die die Ausbildung der AID-induzierten Doppelstrangbrüche einschränkt^{179,180} und in DT40-Zellen die Ig-Genkonversion fördert. Die *Chk1*-Depletion führt zu einer erhöhten RPA-Bindung an ssDNA^{187,203,353,367}, hemmt aber gleichzeitig die Assoziation von Rad51 und verhindert dadurch die Einleitung der homologen Rekombinationsreparatur¹⁸⁷.

Dies bildet die Grundlage für unser Modell (Abbildung 3.2), das im Folgenden erläutert wird: Das ssDNA-bindende Protein RPA fördert die Assoziation von AID an ssDNA und erhöht die AID-Aktivität¹⁴⁰. Die AID-induzierten DNA-Schäden können folglich zur Chk1-Aktivierung führen²⁴⁴. Chk1 kann daraufhin BRCA2 sowie Rad51 phosphorylieren und dadurch die Assoziation von Rad51 an ssDNA fördern, wodurch RPA verdrängt wird^{186,187}. Rad51 ist nun dazu in der Lage, die homologe Rekombinationsreparatur einzuleiten und kann somit zur Beseitigung der AID-induzierten DNA-Schäden beitragen. Alternativ könnte in DT40-Zellen die Ig-Genkonversionsaktivität zunehmen. Wird hingegen die *Chk1*-Expression z.B. durch Bcl6 reprimiert²³⁷, kann RPA akkumulieren^{203,367}, und es ist eine erhöhte somatische Hypermutationsrate sowie eine reduzierte Ig-Genkonversionsrate zu erwarten.

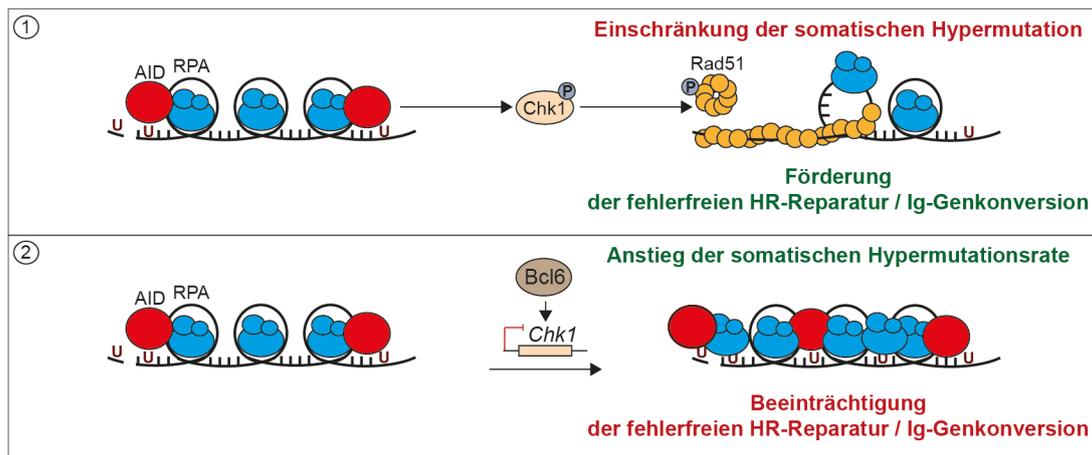


Abbildung 3.2: Modell für die Funktion von Chk1 in der Regulation der somatischen Hypermutation und Ig-Genkonversion

1. Die AID-induzierten DNA-Schäden können zur Chk1-Aktivierung führen. Chk1 phosphoryliert daraufhin BRCA2 sowie Rad51 und fördert die Rad51-Polymerisierung an ssDNA. RPA wird durch die Rad51-Bindung verdrängt. Die durch AID hervorgerufenen Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche können somit durch die homologe Rekombinationsreparatur (HR-Reparatur) in der S/G2-Phase repariert werden. In DT40-Zellen kann in diesem Fall darüber hinaus die Ig-Genkonversionsaktivität zunehmen.

2. Wird die *Chk1*-Expression z.B. durch Bcl6 reprimiert, findet die homologe Rekombinationsreparatur nur unzureichend statt und RPA akkumuliert. Die erhöhte somatische Hypermutationsaktivität sowie die herabgesetzte Ig-Genkonversionsaktivität bei *Chk1*-Depletion könnten durch eine RPA-Akkumulation und eine gleichzeitige Beeinträchtigung der Rad51-Funktion erklärt werden.

3.8 Bedeutung der Resultate für die Rolle von Chk1 in B-Zelllymphomen

Die potenzielle Funktion von Chk1 in der Herabsetzung der AID-induzierten DNA-Schäden durch Aktivierung der homologen Rekombinationsreparatur impliziert, dass Chk1 für das Überleben von B-Lymphomzelllinien mit hoher Ig-Diversifizierungsaktivität benötigt wird. Dies wird insbesondere in Anbetracht der Studie von Hasham und Kollegen ersichtlich, die eine direkte Korrelation zwischen einem Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur und der zellulären Toxizität von den durch AID hervorgerufenen DNA-Doppelstrangbrüchen zeigt^{179,180}. Es ist somit durchaus möglich, dass sich der *Chk1*-Locus erst in der DT40Cre1-Zelllinie amplifiziert hat, um die schädlichen Nebenwirkungen der AID-abhängigen Ig-Diversifizierung zu kompensieren.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass Chk1 bei hoher AID-Aktivität für das Überleben von B-Lymphomzelllinien benötigt wird, ist die unterschiedliche *Chk1-Targeting*-Effizienz in der DT40 Ψ V- und DT40Cre1-Zelllinie. Hierbei wurde in der DT40 Ψ V-Zelllinie, in der AID überexprimiert wird, bei *Knockout* des 3. *Chk1*-Allels eine nur 1,2 %-ige *Targeting*-Effizienz nachgewiesen, während das 3. *Chk1*-Allel in der DT40Cre1-Zelllinie mit endogener AID-Expression mit einer fast 20-fach höheren Effizienz mutiert werden konnte (Tabelle 2.1). Um dies jedoch gezielt auf die unterschiedlichen AID-

Expressionslevel zurückführen zu können, ist die vergleichende Analyse der *Chk1-Targeting*-Effizienzen in AID^{+/+} und AID^{-/-} DT40-Zelllinien erforderlich.

Interessant ist in dieser Hinsicht auch, dass Chk1 vor allem in B-Zelllymphomen mit *c-Myc*-Überexpression für das Überleben benötigt wird³⁴⁵. Unter Einbeziehung der Studie von Scheller *et al.*, die eine Erhöhung der AID-Expression und eine konstitutive somatische Hypermutation bei *c-Myc*-Überexpression zeigt²⁶⁹, wäre es denkbar, dass Chk1 zur Beseitigung der durch *c-Myc* erhöhten Anzahl an AID-induzierten DNA-Schäden beiträgt.

Darüber hinaus könnte die Funktion von Chk1 in der Begrenzung der AID-induzierten DNA-Schäden die aberrante somatische Hypermutation in diffus großzelligen B-Zelllymphomen mit hoher Bcl6-Expression erklären³⁸⁸. Es wäre möglich, dass Chk1 vor allem in diesen B-Zelllymphomtypen aufgrund der Repression durch Bcl6 gering exprimiert wird²³⁷ und so eine erhöhte, durch AID hervorgerufene genetische Instabilität erzeugt wird.

Chk1 könnte somit durch Einschränkung der somatischen Hypermutation zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität in B-Zellen beitragen und die Entstehung von B-Zelllymphomen verhindern. Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Dissertation bilden somit die Grundlage, um die Funktion von Chk1 in der B-Zelllymphomentstehung aufklären zu können.

3.9 Ausblick

Die Funktion von Chk1 in der negativen Regulation der somatischen Hypermutation wurde bisher nur *in vitro* nachgewiesen. Es wäre hoch interessant, diese neu entdeckte Chk1-Funktion *in vivo* näher zu charakterisieren. Da die *Chk1*-Inaktivierung eine embryonale Letalität nach sich zieht¹⁹⁷ und die konditionelle Inaktivierung mit der Proliferation interferieren kann³⁰¹, bietet sich die Analyse einer partiellen, konditionellen *Chk1*-Inaktivierung in Mäusen an. Ein Phänotyp ist trotz noch vorhandener *Chk1*-Expression zu erwarten, da sowohl in der vorliegenden als auch in anderen Studien bereits ein eindeutiger Gen-Dosis-Effekt der *Chk1*-Inaktivierung beobachtet wurde^{197,300,301,389}.

Die *in vivo*-Studien würden die Möglichkeit eröffnen, den Einfluss der *Chk1*-Depletion auf die AID-induzierte genetische Instabilität zu untersuchen. So könnte z.B. die Auswirkung der geringen *Chk1*-Expression auf die AID-abhängige Mutagenese von Nicht-*Ig*-Genen bestimmt werden^{159,179}. In XRCC2^{-/-}-Mäusen wurde bereits ein erhöhtes Vorkommen von AID-induzierten Doppelstrangbrüchen in Nicht-*Ig*-Genen

nachgewiesen¹⁷⁹. Wenn dies bei einer *Chk1*-Depletion *in vivo* ebenfalls gezeigt werden könnte, wäre dies ein Hinweis, dass *Chk1* auch in B-Zelllymphomen als haploinsuffizienter Tumorsuppressor fungieren kann³⁰⁰.

Es stellt sich darüber hinaus die Frage, ob die *Checkpoint*-Kinase 2, die zahlreiche, zu *Chk1* redundante Funktionen aufweist³⁹⁰, ebenfalls an der Einschränkung der somatischen Hypermutation beteiligt ist. *Chk2* ist allerdings auch in Reparaturwege, wie die Basenexzisionreparatur, involviert³⁸², an denen *Chk1* nicht beteiligt zu sein scheint. Es ist somit durchaus möglich, dass *Chk2* eine Rolle in der Regulation der somatischen Hypermutation übernimmt, die sich von der Funktion von *Chk1* unterscheidet. Es wäre deshalb überaus spannend, die potenziellen Wechselwirkungen der beiden *Checkpoint*-Kinasen während der Keimzentrumsreaktion aufzuklären.

4 ANHANG

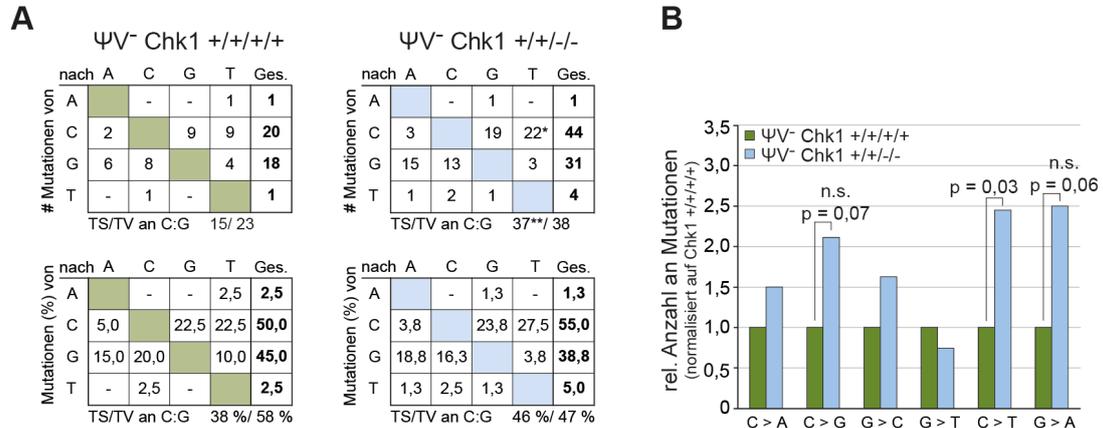


Abbildung 4.1: Auswertung der Sequenzen des λ -Locus der leichten Ig-Kette mit ausschließlich einmal vorkommenden Mutationen (DT40 ΨV^{-} -Zelllinie)

A. und B. Für diese Auswertung wurden in einem Subklon öfters vorkommende, miteinander identische Mutationen nur einmal gewertet unter der Annahme, dass diese auf eine klonale Abstammung zurückzuführen sind.

A. Mutationsmuster des λ -Locus der leichten Ig-Kette. Die Zahlen in den Tabellen geben die absolute Anzahl (obere Tabellen) und den prozentualen Anteil (untere Tabellen) der Mutationsarten an. Die Signifikanzwerte wurden unter Anwendung des χ^2 -Tests ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

B. Darstellung der relativen Häufigkeiten der unterschiedlichen Mutationsarten normalisiert auf Chk1^{+/+/+}. Die Signifikanzwerte (p) wurden unter Anwendung des χ^2 -Tests ermittelt.

Abkürzungen: #: Anzahl; n.s.: nicht signifikant; rel.: relativ

Tabelle 4.1: Lokalisation der Mutationen im *Ig_{LA}*-Locus

Zelllinie	Anzahl an Mutationen innerhalb des WRCY-Motivs	Anzahl an Mutationen außerhalb des WRCY-Motivs	Anzahl an Mutationen innerhalb des RGYW-Motivs	Anzahl an Mutationen außerhalb des RGYW-Motivs
DT40ΨV ⁻ Chk1 ^{+/+/+}	11 (22 %)	39 (78 %)	12 (24 %)	38 (76 %)
DT40ΨV ⁻ Chk1 ^{+/+/-}	21 (19 %)	92 (81 %)	11 (10 %)*	102 (90 %)

* = p < 0,05; Exakter Test nach Fisher

Tabelle 4.2: Mutationsfrequenzen im *Ig_{LA}*-Locus der DT40Cre1-Zelllinien

Zelllinie	Mutationsfrequenzen im <i>Ig_{LA}</i> -Locus der DT40Cre1-Zelllinien					Anzahl analysierte Basen (gesamt)	Mutationsfrequenz #1 ^a (Mut./bp)	Mutationsfrequenz #2 ^b (Mut./bp)
	Anzahl Genkonversions-mutationen (Genkonversions-ereignisse)	Anzahl Punktmutationen	Anzahl zweideutige Mutationen	Anzahl analysierte Basen (gesamt)	Mutationsfrequenz			
Chk1 ^{+/+/+/+}	61 (15)	21	18	70560	$0,77 \times 10^{-3}$	$1,42 \times 10^{-3}$		
Chk1 ^{+/+/+/-}	20 (8)	28	6	71280	$0,59 \times 10^{-3}$	$0,76 \times 10^{-3}$		

^a = Berechnung der Mutationsfrequenz #1 (Genkonversionsereignisse + Punktmutationen + zweideutige Mutationen)/Anzahl analysierte Basen

^b = Berechnung der Mutationsfrequenz #2 (Genkonversionsmutationen + Punktmutationen + zweideutige Mutationen)/Anzahl analysierte Basen

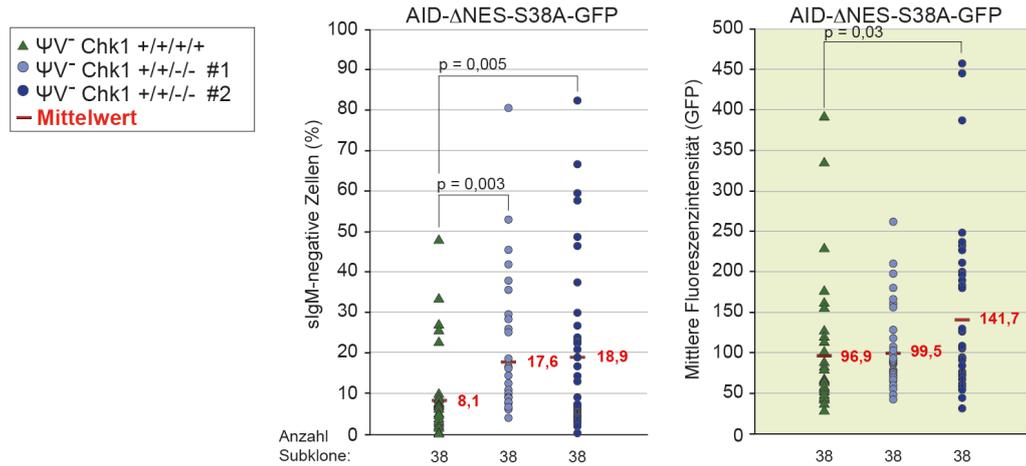


Abbildung 4.2: Messung der somatischen Hypermutation in DT40 ΨV^- -Zelllinien nach Transfektion mit einem NES-deletierten AID-GFP-Transgen mit zusätzlicher Mutation an Serin 38

Die experimentelle Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 2.12 A dargestellt. AID-negative DT40 ΨV^- -Zelllinien wurden mit einem NES-deletierten AID-GFP-Transgen mit zusätzlicher Mutation an Serin 38 (AID- Δ NES-S38A-GFP) transfiziert. Die Analyse der somatischen Hypermutationsrate erfolgte mit einer durchflusszytometrischen Messung der Oberflächen-IgM-Expression (linkes Diagramm), während die Bestimmung des AID-Proteinlevels mit durchflusszytometrischer Messung der GFP-Fluoreszenzintensität erfolgte (rechtes Diagramm). Die Signifikanzwerte (p) wurden unter Anwendung des zweiseitigen Student's-t-Tests ermittelt. n = 2.

Abkürzungen: NES: nukleäre Export Sequenz; slgM: *surface IgM*; Oberflächen-IgM.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 MATERIAL

5.1.1 Geräte

Tabelle 5.1: Geräte

Geräte	Modell	Bezugsquelle
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	<i>Subcell GT</i>	Bio-Rad Laboratories
Bestrahlungsanlage	<i>Gammacell 40</i>	MDS Nordion
CO ₂ -Inkubator	<i>CB210</i>	Binder
Durchflusszytometer	<i>FACSCalibur™ Flow Cytometer</i>	BD Biosciences
Elektroporator	<i>Gene Pulser® II</i>	Bio-Rad Laboratories
Feinwaage		Sartorius
Heizblock	<i>HBT130</i>	HLC
37°C-Inkubationsschrank	<i>B6030</i>	Heraeus Instruments
Light Cycler	<i>Light Cycler 2.0</i>	Roche Diagnostics
Magnetrührer	<i>MR3002</i>	Heidolph
Mikroskop	<i>TMS</i>	Nikon
Polyacrylamid-Gelelektrophorese Apparatur	<i>Mighty Small II</i>	Hofer
PCR-Maschine	<i>PTC100-96</i>	VHB
Photometer	<i>BioPhotometer</i>	Eppendorf
pH-Meter	<i>763 Multi Calimolic</i>	Knick
Pipetten	<i>Pipetman Classic™</i>	Gilson
Röntgenfilm-entwicklermaschine	<i>TYPON Optimax</i>	Protec
Schüttler	<i>Thermomixer Compact</i>	Eppendorf
Spannungsquelle	<i>Power Pac 3000</i>	Bio-Rad Laboratories
Tisch-Kühlzentrifuge	<i>5417R</i>	Eppendorf
Umluft-Sterilbank	<i>UVF</i>	Heraeus Instruments
UV-Stratalinker	<i>1800</i>	Lab Vista
UV-Transilluminator	<i>Transilluminator TL33</i>	HEROLAB GmbH
Western-Blot-Apparatur	<i>Blot-Tank, Mighty Small</i>	Hofer
Zählkammer	<i>Neubauer improved</i>	Marienfeld
Zellsortierer	<i>FACSAria™ III</i>	BD Biosciences
Zentrifuge	<i>Varifuge2.0RS</i>	Heraeus Instruments

5.1.2 Chemikalien, Inhibitoren und Enzyme

Tabelle 5.2: Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle	Chemikalien	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Hühnerserum	Sigma-Aldrich
Acrylamid	Roth	Isopropanol	Merck
Ampicillin	Roche Diagnostics	LE-Agarose	Biozym Scientific
APS	Merck	Methanol	Merck
Blastizidin S HCl	MobiTec GmbH	Methylmethansulfonat	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck	Methylzellulose	Sigma-Aldrich
BSA	ICN Biomedicals	Mycophenolsäure	Sigma-Aldrich
Cisplatin	Ribosepharm	Natriumchlorid	Merck
Complete E	Roche Diagnostics	Penicillin/Streptom.	Gibco BRL
D-MEM/F12	Invitrogen	PhosStop	Roche Diagnostics
DEPC	Sigma-Aldrich	Ponceau S	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck	Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
dNTPs	MBI Fermentas	Puromyzin	Sigma-Aldrich
DTT	Diagnostic chemicals	RPML-1640	Gibco BRL
ECL	GE Healthcare	SDS	Merck
EDTA	Merck	Sodium Pyruvat	Gibco BRL
EGTA	MP Biomedicals	Super ECL	GE Healthcare
Ethanol	Merck	TCS 2312	TOCRIS
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Tris	Sigma-Aldrich
FKS	PAA Laboratories	UCN-01	Sigma-Aldrich

5.1.2.1 DNA-schädigende Substanzen

5.1.2.1.1 Cisplatin

Cisplatin (*cis*-Diamin(dichloro)platin; Ribosepharm) wird als Chemotherapeutikum in der Krebsbehandlung eingesetzt³⁹¹. Das Platin-Atom des Cisplatins verbindet sich mit der N⁷-Position von Purin-Basen und führt dadurch zur Bildung von 1,2- oder 1,3-Intrastrang- und Interstrang-DNA-Quervernetzungen³¹⁸. Die Toxizität der DNA-Quervernetzungen ist auf deren Eigenschaft zurückzuführen, Transkriptions- und Replikationsblockaden auszulösen, die Einzel- und Doppelstrangbrüche zur Folge haben³¹⁹. An der Beseitigung der ICLs sind Reparaturwege wie der Fanconi-Anämie-Signalweg, die Nukleotidexzisionsreparatur, die homologe Rekombinationsreparatur und die Translänionssynthese beteiligt³¹⁹.

5.1.2.1.2 MMS

Methylierende Agenzien werden ebenfalls als Chemotherapeutikum eingesetzt³⁹². Bei MMS (Methylmethansulfonat; Sigma-Aldrich) handelt es sich um ein methylierendes Agens des S_N2-Typs, das DNA hauptsächlich an Stickstoffatomen modifiziert, die sich in einer Ringstruktur befinden³²⁰. So führt MMS zu 84 % zur Erzeugung von N⁷-Methylguanin, gefolgt von N³-Methyladenin (8,5 %), N³-Methylguanin (1,2 %) und O⁶-Methylguanin (0,3 %)^{320,393}. N⁷-Methylguanin ist toxisch, da es eine Depurinierung auslöst und so zur Entstehung von Mutationen führen kann³⁹⁴. Die Reparatur dieser DNA-Addukte erfolgt zum größten Teil durch Basenexzisionsreparatur³²². MMS kann aber auch zur Entstehung von replikationsabhängigen Doppelstrangbrüchen führen, die durch die homologe Rekombinationsreparatur beseitigt werden³²¹.

5.1.2.2 Inhibitoren

5.1.2.2.1 UCN-01 (Chk1-Inhibitor)

Das Staurosporin-Derivat UCN-01 (7-Hydroxystaurosporin; U6508, Sigma-Aldrich) setzt den G2/M-Zellzyklusarrest außer Kraft und induziert in p53-defizienten Tumorzellen Apoptose^{282,395}. Es wurde nachgewiesen, dass dieser Effekt z.T. auf die Hemmung der *Checkpoint*-Kinase 1 zurückzuführen ist^{273,396,397}. Im Vergleich zu Chk2 weist UCN-01 eine 100-fach höhere Sensitivität gegen Chk1 auf und wurde folglich in vielen Studien als spezifischer Chk1-Inhibitor eingesetzt^{186,203,397,398}. Es gibt jedoch Hinweise, die eine selektive Chk1-Hemmung in Frage stellen^{275,276,396}. Beispielsweise wurde gezeigt, dass UCN-01 neben Chk1 auch weitere Kinasen wie PDK1²⁷⁵ und MK2²⁷⁶ hemmt. Darüber hinaus kann UCN-01 eine Erhöhung der p21- und p27^{kip1}-Expression^{399,400} und eine Hemmung der Bcl-x_L-Expression hervorrufen²⁸³.

UCN-01 erhöht die Zytotoxizität zahlreicher Chemotherapeutika und der Strahlentherapie⁴⁰¹⁻⁴⁰³. Die Wirksamkeit von UCN-01 als Anti-Tumoragens wird zur Zeit in klinischen Studien untersucht⁴⁰⁴.

5.1.2.2.2 TCS 2312 (Chk1-Inhibitor)

TCS 2312 (4'-[5-[[3-[(Cyclopropylamino)methyl]phenyl]amino]-1H-pyrazol-3-yl]-[1,1'-biphenyl]-2,4-dioldihydrochlorid; TOC-3038) ist ein Indazol-Derivat, dessen Wirksamkeit hinsichtlich der Chk1-Inhibition synthetisch optimiert wurde²⁷⁴. TCS 2312 hemmt Chk1, in dem es sich über Wasserstoffbrückenbindungen an die ATP-Bindetasche von Chk1 anheftet²⁷⁴. TCS 2312 wurde bereits in mehreren Studien als selektiver Chk1-Inhibitor eingesetzt^{277,405}.

5.1.2.3 Enzyme

Tabelle 5.3: Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
AMV-Reverse-Transkriptase	Roche Diagnostics
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>	New England Biolabs
<i>Expand Long Template</i> -Polymerase	Roche Diagnostics
<i>High Fidelity</i> -Polymerase	Roche Diagnostics
<i>Phusion</i> -Polymerase	New England Biolabs
Proteinase K	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas und New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

5.1.3 Kits

Tabelle 5.4: Kits

Bezugsquelle	Produkt	Anwendung
Bio-Rad Laboratories	<i>DC Protein Assay</i>	Proteinquantifizierung
GE Healthcare	<i>ECL Western Blotting System RPN2106</i>	Western-Blot Detektion
Genomed	<i>Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit</i>	Plasmid-Isolierung
Invitrogen	<i>pGEMT Cloning Kit</i>	pGEMT-Klonierung
Peqlab	<i>peqGOLD TriFast™</i>	RNA-Isolation
QIAGEN	<i>Qiagen Gel Extraction Kit</i>	Gelextraktion
	<i>Qiagen PCR Purification Kit</i>	Reinigung von PCR-Fragmenten
	<i>RNeasy Kit</i>	RNA-Isolation
Roche Diagnostics	<i>1st strand cDNA synthesis Kit</i>	cDNA-Synthese
	<i>FastStart DNA Master SYBR Green I Kit</i>	qRT-PCR-Analyse

5.1.4 Längenmarker

DNA-Größenstandard

Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix (MBI Fermentas)

Protein-Größenstandard

Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen)

5.1.5 Antikörper

Tabelle 5.5: Antikörper für Western-Blot-Analysen

Bezeichnung	Bezugsquelle (Artikelnr.)	Herkunft	Verdünnung (*)	Verdünnungs- reagenz
α-Chk1	Santa Cruz (sc-8408)	Maus	1:1000 (1:10000)	5 % Milchpulver/ TBS-Tween
α-AID	E. Kremmer, HMGU München (5G9)	Ratte	1:5 (1:50)	5 % Milchpulver/ TBS-Tween
α-Aktin	Sigma-Aldrich (A-2066)	Kaninchen	1:5000	5 % Milchpulver/ TBS-Tween
α-CDC25A	Santa Cruz (sc-7389)	Maus	1:500 (1:1000)	5 % Milchpulver/ TBS-Tween

* = Die Antikörper wurden in geringeren, in Klammern angegebenen Konzentrationen eingesetzt, falls über Nacht bei 80 mA geblottet wurde

Tabelle 5.6: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen und Zellsortierung

Bezeichnung	Bezugsquelle (Artikelnr.)	Verdünnung	Verdünnungs- reagenz
α-Huhn-IgM-FITC	Bethyl (A130-102F)	1:40	PBS/FKS(0,5 %)
α-Huhn-IgM-PE	Southern Biotech (8310-09)	1:40	PBS/FKS(0,5 %)
α-CD95-PE	BD Biosciences (554258)	1:200	PBS/BSA(0,5 %)
α-B220-FITC	BD Biosciences (553087)	1:200	PBS/BSA(0,5 %)
α-B220-PE	BD Biosciences (553090)	1:200	PBS/BSA(0,5 %)
α-B220-APC	BD Biosciences (553092)	1:200	PBS/BSA(0,5 %)
α-PNA-FITC	BD Biosciences (FL-1071)	1:500	PBS/BSA(0,5 %)

5.1.6 Oligonukleotide

Sämtliche aufgeführte Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

Tabelle 5.7: Oligonukleotide für quantitative RT-PCR-Reaktionen

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz 5' → 3'	Bedingungen	Produktgröße
GAPDH_Fw	TCG TCC CGT AGA CAA AAT G	Anlagerung: 60 °C	375 bp
GAPDH_Rev	GAG ATG ATG ACC CTT TTG G	Elongation: 15 sec	
Bcl-2_Fw	CCC TGT GGA TGA CTG AGT ACC	Anlagerung: 60 °C	125 bp
Bcl-2_Rev	CAG CCA GGA GAA ATC AAA CAG	Elongation: 6 sec	
Chk1_Fw	CCA ACT CAT GGC AGG GGT GGT TT	Anlagerung: 60 °C	298 bp
Chk1_Rev	GGG CTG GTC CCA CGG CAA TT	Elongation: 12 sec	
AID_Fw	CAA CAG CAC TGA AGC AGC CTT GC	Anlagerung: 63 °C	260 bp
AID_Rev	TCC ACG TGG CAG CCA GAC TTG TTG	Elongation: 12 sec	
Bcl6_Fw	CAG GTT TGT TCA GGT GGC CCA C	Anlagerung: 63 °C	259 bp
Bcl6_Rev	GGC CGA CAC GCG GTA TTG CA	Elongation: 12 sec	
P53_Fw	CAG CCA AGT CTG TTA TGT GC	Anlagerung: 60 °C	143 bp
P53_Rev	CTT CTT GTA GAT GGC CAT GG	Elongation: 6 sec	

Tabelle 5.8: Oligonukleotide für die Amplifikation der homologen Arme des *Chk1-Targeting*-Vektors

Bezeichnung des Oligonukleotids	Für die Amplifikation des:	Sequenz 5' → 3'
LA_A	homologen 3' Arms	GACCTGGTGCAGACCCTG
LA_D	homologen 3' Arms	GGGCTCCGCACGGAAGCTCGGG
RA_L	homologen 5' Arms	CACCATCCCCGACATCAAGAAG
RA_P	homologen 5' Arms	CACCTTCTGGGTGCTGACCA

Tabelle 5.9: Oligonukleotide für die Sequenzierung des *Chk1-Targeting*-Vektors/*Chk1*-Locus

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz 5' → 3'
Seq1	TGTGGCACACTGCCCTAC
Seq2	CGGAGGAACAACAAGCTGAT
Seq3	TAGGCAGGAGATGCACACAC
Seq4	GCTTCTTCACCAAGCTGGAC
Seq5	CCATTCATAAGTGCAGGAGGA
Seq6	GTTTGGGGGATGCTCTTTTT

Tabelle 5.10: Oligonukleotide für den Nachweis der gerichteten Integration des *Chk1*-Targeting-Vektors

Bezeichnung des Oligonukleotids	Bindestelle (Gen)	Sequenz 5' → 3'
RA_GI1 (#1)	5' außerhalb des homologen 5' Arms (<i>Chk1</i>)	CCACGCTTTATTGAACCCATA
UGI1	Im homologen 5' Arm (<i>Chk1</i>)	CACCTTGAAGATCAGCTTGTTG
LA_GI1 (#8)	3' außerhalb des homologen 3' Arms (<i>Chk1</i>)	GTGCCCTTCGTGGAGGACT
Fw_Seq1 (#4)	Im homologen 5' Arm (<i>Chk1</i>)	TGTGGCACACTGCCCTAC
RA_Ori (#5)	Im homologen 3' Arm (<i>Chk1</i>)	GACTCGGTGACACCACCTG
Bs1 (#3)	Im <i>Blastizidin</i> -Resistenzgen	CGATTGAAGAACTCATTCCACTCAAATAT ATACCC
Pu4 (#6)	Im <i>Puromyzin</i> -Resistenzgen	CAGCGCCCGACCGAAAGGAGCGCA
GPT (#2)	Im <i>GPT</i> -Gen	TCGTATTCGTCCCGCCAATCTCCGGTCCG CT
Bleo3	Im <i>Bleomyzin</i> -Resistenzgen	GTCGTGTCCACGAACTTCC
Bleo4	Im <i>Bleomyzin</i> -Resistenzgen	ACGACGTGACCCTGTTTCATC
CAG1 (#7)	Im β -Aktin-Promotor	ATGGGGAGAGTGAAGCAGAA

Tabelle 5.11: Oligonukleotide für die Herstellung der Southern-Blot-Sonde

Bezeichnung des Oligonukleotids	Bindestelle (Gen)	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße
SB_LA_Fw1	Im homologen 3' Arm (<i>Chk1</i>)	CAAGATGCTGAACCACGAGA	
SB_LA_Rv1	Im homologen 3' Arm (<i>Chk1</i>)	CGAAATCGGAGATCTTCAGG	521 bp

Tabelle 5.12: Oligonukleotide für die Herstellung des *Chk1*-Rekonstitutionsvektors

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz 5' → 3'
Chk1Rek_pExpFw2	GGGAAGCTTGCCGCCACCATGGCGGTGCCCTTCGTGGAG
Chk1Rek_pExpRev	GGGCCATGGTCAATGCATAGTCCGGGACGTCATAGGGATAGGGTG GGGGCAGCCACACT

hellblau: HindIII-Schnittstelle; dunkelblau: NcoI-Schnittstelle; grün: Start/Stopp-Codon
orange: Kozak-Sequenz; violett: HA-Tag; rot: *Chk1*-mRNA-Sequenz

Tabelle 5.13: Oligonukleotide für den Nachweis der gerichteten Integration des *Rad18/RDM1*-Targeting-Vektors

Bezeichnung des Oligonukleotids	Targeting-Vektor:	Sequenz 5' → 3'
RH45	<i>RDM1</i>	GGGGCTAGCGCCACCATGGCGGAGGTGTTGGAGTT
18Rad6	<i>Rad18</i>	GAGGCCGGCTGTCACTCGGGCCGGTC

Tabelle 5.14: Oligonukleotide für die Analyse des λ -Locus der leichten Ig-Kette

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz 5' → 3'
λ 1	TGGGAAATACTGGTGATAGGTGGAT
λ 2	GAGCGCAGGGAGTTATTTGCATAG
C2	CCTCCATTTTTTGACAGCACTTACCTGGACAGCTG

5.1.7 Plasmide

5.1.7.1 pSHM-SV

Bei dem Vektor, pSHM-SV, handelt es sich um ein *GFP*-Reportersystem, das für die *in vitro*-Messung der somatischen Hypermutation in humanen B-Lymphomzelllinien entwickelt wurde^{267,268,406}. Der Vektor enthält neben dem *GFP*-Gen mit Stopp-Codon noch weitere Elemente, wie das *Hygromycin*-Resistenzgen, für die Selektion auf plasmidtragende Zellen. Der Promotor des Resistenzgens wurde von unserer Arbeitsgruppe gegen den stärkeren Simian Virus (SV)-40-Promotor ausgetauscht²⁶⁹. Diese Veränderung erhöhte den Lebendanteil der Zellen während der Selektion erheblich⁴⁰⁶. Darüber hinaus enthält der Vektor zur Erhaltung und episomalen Replikation die EBV-Elemente OriP und *EBNA1*.

5.1.7.2 pAK6

Der pAK6-Vektor ist mit dem pSHM-SV Vektor identisch, jedoch mit der Ausnahme, dass in dem *GFP*-Gen kein Stopp-Codon enthalten ist^{268,269}. Der Vektor diente als Kontrolle für die Transfektions- und Selektionseffizienz.

5.1.7.3 *Chk1*-Targeting-Vektoren

Die *Chk1*-Targeting-Vektoren wurden freundlicherweise von Zachos und Kollegen zur Verfügung gestellt³⁰³. Um eine höhere Flexibilität zu gewährleisten, wurden die Resistenzkassetten durch BamHI-Spaltung mit loxP-flankierten Resistenzkassetten aus den entsprechenden plox-Vektoren³¹³ ausgetauscht. Folgende, hier eingesetzte *Chk1*-Targeting-Vektoren wurden auf diese Weise generiert:

- (1) mit *Puromycin*-Resistenzkassette in 3'-5'-Orientierung (SP156-60)
- (2) mit *Blastizidin*-Resistenzkassette in 3'-5'-Orientierung (SP156-29)
- (3) mit *GPT*-Expressionskassette in 3'-5'-Orientierung (SP156-41)
- (4) mit *GPT*-Expressionskassette in 5'-3' Orientierung (SP156-40)
- (5) mit *Bleomycin*-Resistenzkassette in 3'-5'-Orientierung (SP259-3)

(Anmerkung: In der 3'-5'-Orientierung befindet sich der Promotor der Resistenzkassette in der entgegengesetzten Richtung zum *Chk1*-Gen.)

5.1.7.4 *Chk1*-Rekonstitutionsvektor

Der *Chk1*-Rekonstitutionsvektor (SP209-23) wurde mit dem von Arakawa *et al.* entwickelten pExpress/plox-System³¹³ hergestellt. Hierfür wurde die kodierende Region der *Chk1*-mRNA mit der *Phusion*-Polymerase aus DT40 cDNA amplifiziert. Es wurden Primer verwendet (Tabelle 5.11), die eine Kozak-Sequenz enthielten und *Chk1* am C-Terminus mit einem HA-Tag modifizierten. Darüber hinaus wiesen sie eine HindIII- und eine NcoI-Schnittstelle für die Integration in die multiple Klonierungsstelle des pExpress-Vektors auf. Die Klonierung in den pExpress-Vektor setzt die integrierte cDNA unter die Kontrolle eines β -Aktin-Promotors und eines SV40-PolyA-Signals. Die so hergestellte Expressionskassette wurde mit einer SpeI-Spaltung aus dem pExpress-Vektor herausgeschnitten und in den mit NheI linearisierten ploxGPT-Vektor eingefügt. Der auf diese Weise hergestellte *Chk1*-Rekonstitutionsvektor enthält somit zusätzlich eine GPT-Expressionskassette, auf deren genomische Integration die Zellen selektiert werden können. Darüber hinaus sind die GPT- und die *Chk1*-Expressionskassette gemeinsam von loxP-Stellen flankiert.

5.1.7.5 *AID*-Rekonstitutionsvektoren

Die hier verwendeten *AID*-Rekonstitutionsvektoren (*AID-Wildtyp-GFP*, *AID- Δ NES-GFP*, *AID- Δ NES-S38A-GFP*) wurden von J. Jeschke im Rahmen ihrer Doktorarbeit hergestellt³²⁴. Als Ausgangsvektor wurde das pCAGGs-Expressionsplasmid verwendet, in dem die Promotorelemente *Cytomegalovirus immediate early* (CMV IE)-*Enhancer* und der *Chicken β -actin* (CAG)-Promotor kombiniert vorliegen, um eine hohe Expression des Transgens zu gewährleisten. Das *AID*-Transgen wurde mit einem HA-Tag am N-Terminus und mit *GFP* am C-Terminus modifiziert.

5.1.7.6 *RDM1*-Targeting-Vektor

Der *RDM1*-Targeting-Vektor, der für die Selektion ein *Blastizidin*-Resistenzgen enthält, wurde für die Bestimmung der *Targeting*-Effizienz in *Chk1*-depletierten DT40-Zellen verwendet. Der Vektor wurde von H. Arakawa generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt³³².

5.1.7.7 *Rad18-Targeting-Vektor*

Der *Rad18-Targeting-Vektor*, der für die Selektion ein *Blastizidin*-Resistenzgen enthält, wurde ebenfalls für die Bestimmung der *Targeting*-Effizienz in *Chk1*-depletierten DT40-Zellen verwendet. Der Vektor wurde von B. Jungnickel generiert¹⁶⁸.

5.1.8 Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α benutzt. Genotyp: F⁻, Φ lacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (rk⁻, mk⁻), supE44, Thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF) U169, λ ⁻

5.1.9 Zelllinien

5.1.9.1 Raji-Zelllinie

Die Raji-Zelllinie ist eine humane, EBV-transformierte Burkitt-Lymphomzelllinie, die aus einem nigerianischen Patienten vor 50 Jahren isoliert wurde^{271,407}. Die Zelllinie enthält die für Burkitt-Lymphome charakteristische *Ig_H/c-Myc*-Translokation (t(8;14)(q24;q32))⁴⁰⁸. Darüber hinaus weist die Zelllinie in beiden *p53*-Allelen Mutationen auf, von denen eine als *p53*-inaktivierend beschrieben wurde²⁸⁴⁻²⁸⁶. Die *p53*-Defizienz wurde außerdem von K. Braunschmidt mit Hilfe funktioneller Analysen bestätigt²⁷⁰. Die Raji-Zelllinie ist zudem durch eine konstitutive Hypermutationsaktivität charakterisiert²⁷².

5.1.9.2 DT40-Zelllinie

Die DT40-Zelllinie ist eine ALV-induzierte Hühner-B-Lymphomzelllinie^{305,307}. Wie in 70-90 % dieser klonalen Neoplasmen integrierte sich der AL-Virus in der DT40-Zelllinie in der Nähe des *c-Myc*-Proto-Onkogens^{306,307}. Die Promotorelemente des viralen 3' LTRs führen zu einer deregulierten *c-Myc*-Expression³⁰⁸. Diese genetische Modifikation hat vermutlich eine kontinuierliche Proliferation und eine stetige Immunglobulin-Diversifizierung des rearrangierten *Ig_L*-Gens *in vitro* zur Folge³⁰⁹⁻³¹¹. Die DT40-Zelllinie ist auf den Hühner-SC-Stamm zurückzuführen, bei dem es sich um eine F1-Kreuzung zwischen zwei durch Inzucht erzeugten Stämmen, G4 und S3, handelt⁸³. Dieser zelluläre Hintergrund ermöglicht die Unterscheidung der beiden parentalen *Ig_L*-Allele anhand von Polymorphismen⁷⁵.

Der Karyotyp der DT40-Zelllinie wurde als stabil beschrieben und ist durch eine Trisomie des Chromosoms 2 und eine Trisomie des Mikrochromosoms 24 gekennzeichnet³¹⁵. Es gibt jedoch Hinweise, die eine höhere genetische Instabilität dieser Zelllinie implizieren^{316,317,409}. Der p53-Status der Zelllinie wird ebenfalls kontrovers diskutiert^{334,359-361}.

Ein weiteres Charakteristikum dieser Zelllinie ist die hohe Rate der gezielten Integration eines *Knockout*-Konstrukts, die mit bis zu 80 % um mehrere Größenordnungen über den *Targeting*-Effizienzen von vielen Säugetierzellen liegt^{314,361}.

5.1.10 Mausstamm

Es wurden Mäuse des C57BL/6-Stamms (Jackson Laboratories) verwendet. C57BL/6-Mäuse sind Abkömmlinge des C57BL-Stamms, der von C.C. Little 1920 gezüchtet wurde und seitdem weltweit für die Generierung von *Knockouts* eingesetzt wird⁴¹⁰. Die Mäuse wurden unter spezifisch-pathogenfreien (*specific pathogen free*, SPF) Bedingungen gehalten. Für Analysen wurden Tiere im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet.

5.1.11 Datenverarbeitung

Tabelle 5.15: Datenverarbeitung

Software	Anwendung
<i>4Peaks 1.7.2</i>	Analyse von DNA-Sequenzen
<i>Adobe Photoshop CS5</i>	Bildverarbeitung
<i>Adobe Illustrator CS5</i>	Vektorzeichenprogramm
<i>BD FACSDiva Software</i>	Datenaquisition und -auswertung von Zellsortierungen
<i>Bookends 11.3.5, SonnySoftware</i>	Bibliographie
<i>Cell Quest Becton Dickinson</i>	FACS-Datenakquisition und -auswertung
<i>FlowJo, Tree Star Inc.</i>	FACS-Datenakquisition und -auswertung
<i>Geneious Pro 5.5.8, Biomatters Ltd.</i>	Analyse von DNA- und Proteinsequenzen
<i>Microsoft Excel</i>	Tabellenkalkulation
<i>Microsoft Word</i>	Textverarbeitung
<i>Papers 2.0</i>	Literaturverwaltung
<i>Primer3</i>	Primer-Design
„SHM Tool“ (http:// scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1)	Mutationsanalyse von <i>Ig</i> -Sequenzen

5.2 METHODEN

5.2.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden in einer Umluft-Sterilbank (Heraeus Christ Instruments) mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten durchgeführt. Die DT40-Zelllinie wurde in einem Inkubator (Binder) bei 41 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung der Raji-Zelllinie erfolgte in einem Inkubator (Binder) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zentrifugation der Zelllinien fand, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C und 1200 rpm (ca. 200xg) für 5 min in einer Varifuge (Heraeus Instruments) statt.

Die DT40-Zellen wurden 3-mal pro Woche grob auf eine optimale Zelldichte von $<1 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Am Tag vor Durchführung eines Experiments wurde die Zelldichte bestimmt und diese exakt auf 3×10^5 Zellen/ml abgestimmt. Bei der Raji-Zelllinie wurde die Zelldichte ebenfalls alle 2-3 Tage eingestellt, allerdings aufgrund einer langsameren Teilungsrate auf $3-5 \times 10^5$ Zellen/ml.

Zellkulturmedium	
500 ml	RPMI 1640 Medium (Gibco BRL)
10 %	FKS (Biochrom KG)
100 µg/µl	Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco BRL)
2 mM	Glutamin (200 mM) (Gibco BRL)
1 mM	Natriumpyruvat (100 mM) (Gibco BRL)
Zur Kultivierung der DT40-Zellen erfolgte zusätzlich die Zugabe von:	
1 %	Hühnerserum (Sigma-Aldrich)
0,1 µM	2-Mercaptoethanol (1 M) (Sigma-Aldrich)

5.2.1.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer. Diese besteht aus einer Glasplatte, in deren Mitte sich 4x16 Kleinquadrate befinden, die als Hilfestellung zum Auszählen der Zellen dienen. Es wurden 2 bzw. 4 Eckquadrate ausgezählt und der erhaltene Wert durch 2 bzw. 4 geteilt, um einen Mittelwert pro Großquadrat zu erhalten. Dieser Wert wurde mit 10000 multipliziert um die Zellzahl/ml zu erhalten.

5.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren der Zelllinien

Zur Aufbewahrung der Zellen wurden $3\text{-}5 \times 10^7$ der DT40-Zelllinien bzw. 1×10^7 der Raji-Zelllinien zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfrier-Gefäße (NUNC, Cryotube) überführt. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für kurze Zeiträume (2 Monate) sowie für eine längere Zeitperiode (6 Monate und länger) in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium: 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid; Merck)/FKS (PAA Laboratories)

Auftauen der Zelllinien

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und rasch in 10 ml Zellkulturmedium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet abhängig von der Zellzahl in 10-20 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche transferiert. Im Anschluss wurden die Kulturflaschen bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $41\text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 inkubiert.

5.2.1.3 Transfektion von Zelllinien

5.2.1.3.1 Transfektion der Raji-Zelllinie

Für die Transfektion der Raji-Zelllinie wurden 2×10^7 Zellen verwendet und diese mit PBS gewaschen (5 min, 1200 rpm). Die Zellen wurden in 400 μl PBS aufgenommen und in vorgekühlte Küvetten mit 0,4 cm Elektrodenabstand transferiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 μg Plasmid-DNA und eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Die Transfektion wurde mittels Elektroporation (*Gene Pulser II*, Bio-Rad Laboratories) bei 850 μF und 250 V durchgeführt. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in 10 ml Kulturmedium überführt.

5.2.1.3.2 Transfektion der DT40-Zelllinie

Um eine stabile Integration der DNA in das Genom von DT40-Zellen zu gewährleisten, wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA am Vortag des Experiments linearisiert. Hierfür wurden 50 μg der Plasmid-DNA mit 50 U des entsprechenden Restriktionsenzym (z.B. NotI) für bis zu 2 Stunden gespalten. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 100 % EtOH bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 15000 rpm wurde der Überstand verworfen und 200 μl 70 % EtOH hinzugegeben. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 15000 rpm wurde der Überstand vollständig entfernt und die Plasmid-DNA für 30 min unter der Sterilbank getrocknet.

Für die nachfolgende Transfektion wurde die Plasmid-DNA in 300 µl sterilem PBS aufgenommen und in vorgekühlte Küvetten transferiert. 1×10^7 Zellen wurden zentrifugiert, in 500 µl PBS aufgenommen und mit der Plasmid-DNA vermischt.

Zur Anlagerung der DNA an die Zellmembran wurde die DNA-Zell-Suspension 10-15 min auf Eis gekühlt. Mit einem elektrischen Puls von 800 V und 50 µF wurde die DNA in die Zellen eingebracht (*Gene Pulser II*, Bio-Rad Laboratories). Anschließend wurden sie in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und jeweils 100 µl pro Vertiefung in eine 96-Loch-Platte zur Generierung von Einzelzellklonen übertragen. Etwa 24 Stunden später wurden die Zellen mit den Selektionssubstanzen behandelt, indem diese in doppelter Konzentration in 100 µl Medium pro Vertiefung hinzugefügt wurden (Tabelle 5.16). Falls die Zellen von vorhergehenden Transfektionen bereits Selektionsresistenzen enthielten, wurden die entsprechenden Selektionsreagenzien ebenfalls hinzugefügt.

Bei Transfektion mit einem Vektor, der ein *Bleomycin*-Resistenzgen enthielt, wurde die Zellsuspension direkt nach der Elektroporation in 20 ml Kulturmedium aufgenommen. Am nächsten Tag wurde das Volumen auf 85 ml erhöht, Bleomycin hinzugegeben und jeweils 200 µl der Zellsuspension pro Vertiefung in 96-Loch-Platten überführt.

Nach einer 7- bis 14-tägigen Inkubationsdauer bei 41 °C und 5 % CO₂, abhängig von der entsprechenden Selektionssubstanz, wurden die 96-Loch-Platten auf die Anwesenheit von Kolonien untersucht. Nachdem mikroskopisch sichergestellt wurde, dass es sich um eine einzige Kolonie pro Vertiefung handelte, wurde der Inhalt der entsprechenden Vertiefung zuerst in eine 24-Loch-Platte mit der entsprechenden Selektionssubstanz und anschließend nach 2-5 Tagen in eine Zellkulturflasche überführt.

Tabelle 5.16: Konzentrationen der Selektionsreagenzien

Selektionsreagenz	Bezugsquelle	Zelllinie	Endkonzentration (µg/ml)
Hygromycin	Invitrogen	Raji	200
Puromycin	Sigma-Aldrich	DT40	0,8
Blastizidin	Mobitec GmbH	DT40	5
Mycophenolsäure (für die Selektion auf das <i>GPT</i> -Gen)	VWR	DT40	30
Bleomycin (Zeocin)	Invitrogen	DT40	150-300

5.2.1.4 Durchflusszytometrische Messung mit dem FACS-Gerät

Für die durchflusszytometrische Messung wurden etwa 1×10^5 - 3×10^6 Zellen abgenommen und diese mit PBS/BSA(0,5 %) oder PBS/FKS(0,5 %) gewaschen. Die Antikörperfärbung erfolgte meist auf Eis für 15 min. Die verwendeten Konzentrationen der Antikörper sind in Tabelle 5.6 aufgeführt. Anschließend wurde erneut mit dem Verdünnungsreagenz gewaschen und die Zellen in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen PBS aufgenommen. Die Zelleigenschaften wurden mit einem *FACSCalibur™ Flow Cytometer* (BD Biosciences) bestimmt. Die Analyse der aufgezeichneten Daten erfolgte mit der *Cell-Quest*-Software (BD Biosciences).

5.2.1.5 Bestimmung der Hypermutationsaktivität in humanen B-Lymphomzelllinien

Zur Bestimmung der Hypermutationsaktivität in der Raji-Zelllinie wurden die Zellen mit einem *GFP*-Reportersystem transfiziert (pSHM-SV, Abschnitt 5.1.7.1), das ein *GFP*-Gen mit einem Stopp-Codon enthält und durch die somatische Hypermutationsaktivität revertiert werden kann^{268,269}. Um die Transfektions- und Selektionseffizienz überprüfen zu können, wurde in die Zellen in einer parallelen, aber unabhängigen Transfektion dasselbe Reporterkonstrukt eingebracht, das jedoch ein funktionelles *GFP*-Gen aufweist (pAK6, Abschnitt 5.1.7.2). Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen auf das *Hygromycin*-Resistenzgen des Vektors selektiert (Invitrogen; 200 µg/ml). In Intervallen von 2-3 Tagen wurde der relative Anteil an *GFP*-positiven Zellen von nach Möglichkeit 10^6 lebenden Zellen mit einer FACS-Analyse bestimmt. Die Vitalität wurde hierfür mit einer Propidiumiodid-Färbung (1 µg/ml) untersucht. Nach etwa 12-14 Tagen, wenn in der Regel über 80 % der Zellen der Kontrollkultur das funktionelle *GFP*-Gen exprimierten, wurde die mit dem *GFP*-Reportersystem transfizierte Kultur aufgeteilt und mit den Inhibitoren (TCS 2312 (Tocris): 250 nM; UCN-01 (Sigma-Aldrich): 75 nM) bzw. mit DMSO (Sigma-Aldrich) als Lösungsmittelkontrolle versetzt. Die Zelldichte wurde alle 2-3 Tage durch Zellzählung bestimmt und auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Dabei wurde die Konzentration der Inhibitoren bis zum Abschluss des Experiments, gewöhnlich bis Tag 30, konstant gehalten.

5.2.1.6 Bestimmung der Ig-Diversifizierungsaktivität der DT40-Zelllinie

5.2.1.6.1 Messung der somatischen Hypermutationsaktivität und Ig-Genkonversionsaktivität

Die somatische Hypermutationsaktivität der DT40 Ψ V-Zelllinien wurde durch Bestimmung des Anteils an IgM-negativen Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt⁷⁷. Hierfür wurden Zelllinien verwendet, die nicht mehr als 10 % IgM-negative Zellen aufwiesen.

Die Ig-Genkonversionsaktivität der DT40Cre1-Zelllinien wurde hingegen durch Bestimmung des Anteils an IgM-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt⁷⁶. Hierfür wurden Zelllinien verwendet, die keinen höheren Anteil an IgM-positiven Zellen als 10 % zeigten.

Falls der Anteil an IgM-negativen bzw. IgM-positiven Zellen die 10 %-Grenze überstieg, wurden die IgM-positiven bzw. IgM-negativen Zellen mit der MACS-Technologie (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierfür wurden die Zellen mit einem α -IgM-Antikörper (α -IgM-FITC, Southern Biotech) gefärbt und α -FITC-*microbeads* (Miltenyi Biotec) verwendet.

Nach der MACS-Separation wurden die Zellen mehrere Tage kultiviert, und erst dann wurde das Experiment zur Messung der somatischen Hypermutation oder Ig-Genkonversion durchgeführt.

Hierfür wurden die Zellen am Vortag des Experiments auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Am darauffolgenden Tag wurden etwa bis zu 3 Zellen in 100 μ l pro Vertiefung in eine 96-Loch-Platte überführt. Nach 7-10-tägiger Inkubation bei 41°C und 5 % CO₂ wurden 30-50 Subklone pro Zelllinie in eine mit 1 ml Medium befüllte Vertiefung einer 24-Loch-Platte übertragen. Während des gesamten Experiments wurden die Einzelzellklone alle 2-3 Tage grob auf eine optimale Zelldichte eingestellt.

Für die Messung der Hypermutationsaktivität bzw. der Ig-Genkonversionsaktivität wurden alle kultivierten Subklone unter Verwendung von 96-Loch-Platten mit einem α -IgM-Antikörper (α -IgM-PE von Bethyl für DT40 Ψ V; α -IgM-FITC von Southern Biotech für DT40Cre1) gefärbt (Tabelle 5.6). Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass trotz der hohen Probenanzahl identische Färbebedingungen gewährleistet waren. Für die IgM-Messung wurden 10^4 Zellen mit einem *FACS-CaliburTM Flow Cytometer* (BD Biosciences) aufgenommen. Die FACS-Messung erfolgte gewöhnlich 11-13 Tage nach der Einzelzellklon-Generierung und zusätzlich 18-21 Tage danach. Die Ig-Genkonversionsmessung wurde zudem auch am Tag 28 durchgeführt.

5.2.1.6.2 Vorbereitung der DT40ΨV-Zelllinien für die Sequenzierung

Nach Bestimmung der somatischen Hypermutationsaktivität mit Durchflusszytometrie wurden je 6 repräsentative Subklone pro Genotyp bis zu 12 Wochen kultiviert. Es wurden wöchentlich Proben (ca. 5×10^6 - 1×10^7 Zellen) für die DNA-Präparation sowie die Bestimmung des IgM-Status mit einer FACS-Analyse entnommen. Von den 6 repräsentativen Subklonen pro Genotyp wurden je 2 für die Sequenzierung des Ig_L-Locus anhand des Mittelwerts der IgM-Messung ausgewählt. Es wurden die Zellproben von Woche 6 verwendet, da zu diesem Zeitpunkt, wie anhand des IgM-Status ermittelt wurde, eine ausreichende Anzahl an Mutationen aufgetreten waren. Die DNA wurde unter Anwendung des *QIAamp DNA Mini-Kits* (QIAGEN) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µl des Puffers AE eluiert. Für die Amplifikation des Ig_L-Locus wurden die Primer λ1 und C2 verwendet. Hierfür wurde die *Phusion*-Polymerase (New England BioLabs) eingesetzt, die eine sehr geringe Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$ Mut./bp) aufweist. Die DNA-Proben wurden für die PCR 1:5 vorverdünnt. (PCR-Ansatz: 2 µl dNTPs (250 µM); 1 µl Primer λ1 (0,625 µM); 1 µl Primer C2 (0,625 µM); 0,2 µl *Phusion*-Polymerase (0,02 U/µl); 4 µl 5x *High-Fidelity*-Puffer (1x); 1 µl *Template*; ad 20 µl H₂O). Hierfür wurde folgendes PCR-Programm mit 35 Zyklen verwendet:

Tabelle 5.17: PCR-Programm zur Amplifikation des Ig-Locus mit der *Phusion*-Polymerase

Programm	Temperatur	Dauer
Denaturierung der DNA	98°C	2 min
Zyklische Denaturierung	98°C	30 sec
Zyklische Anlagerung	65°C	30 sec
Zyklische Verlängerung	72°C	3 min
Finale Verlängerung	72°C	10 min

Die PCR-Proben wurden mit dem *QIAquick PCR-Purification-Kit* (QIAGEN) aufgereinigt, um anschließend an die Amplifikate A-Überhänge mit der Taq-Polymerase (Invitrogen) anfügen zu können. Hierfür wurde der nach Herstellerangaben zusammengesetzte Ansatz für 30 min bei 68 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen, das 1,5 kb große Produkt wurde ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel-Extraction-Kit* (QIAGEN) aufgereinigt. Danach wurden die PCR-Produkte in den pGEMT-Vektor (*pGEMT-Cloning-Kit*, Promega) nach Herstellerangaben kloniert. Die so erhaltenen Vektoren wurden in *E.coli* mittels Hitzeschock-Transformation eingebracht (Abschnitt 5.2.3.4). Die Detektion derjenigen Bakterienkolonien, die ein Plasmid mit dem korrekt integrierten *Insert* enthielten, erfolgte unter Anwendung der Blau-Weiß-Selektion (Abschnitt 5.2.3.4). Nach der anschließenden Mini-Plasmid-Präparation (Abschnitt 5.2.3.5)

wurden die Plasmide mittels Restriktionsspaltung (Restriktionsenzym: Eco521) überprüft (Abschnitt 5.2.3.7). Die Plasmide mit dem zu erwartenden Bandenmuster wurden zur Sequenzierung bei dem Sequenzierungsservice der LMU (*Sequencing Service*, A. Brachmann) abgegeben (Ansatz: 4,5 µl 10 mM Tris pH 8,5; 1,5 µl λ2-Primer; 1 µl DNA). Dort erfolgte die Sequenzierung mit einem Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems) anhand einer Abwandlung der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger⁴¹¹ (*ABI BigDye Kit Version 3.1*).

5.2.1.6.3 Auswertung der Sequenzierung des *Ig_L*-Locus der DT40ΨV-Zelllinie

Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte in mehreren Schritten: Zuerst wurden die Chromatogramme auf deren Qualität überprüft und manuell verifiziert. Es wurden ausschließlich Sequenzierungen ausgewertet, die einen durchschnittlichen Qualitätswert über 50 % aufwiesen, der mit dem Programm *Geneious* ermittelt wurde. Falls die Qualität zu gering war oder Doppel-Peaks auftraten, wurde die DNA-Probe erneut sequenziert. Im Anschluss wurden diejenigen DNA-Sequenzen, die von einem Subklon abstammten, untereinander angeordnet (*alignment*). Es wurde eine Sequenz von 690 bp analysiert, die sich vom 5' gelegenen Intron bis zum 3' gelegenen Intron der VJ-Region erstreckte. Die Mutationen wurden sowohl manuell als auch zur Kontrolle unter Verwendung des bioinformatischen Hypermutations-Auswertungsprogramms „*SHM Tool*“ (<http://scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1>)³²⁵ bestimmt. Es wurden zwei unterschiedliche Auswertungsmethoden verwendet: Zum einen wurde jede einzelne Mutation als solche gewertet, zum anderen wurden in einem Subklon öfters vorkommende, miteinander identische Mutationen nur einmal gewertet. Mit der zuletzt genannten Methode wurde versucht, diejenigen Mutationen, die auf eine klonale Abstammung zurückzuführen sind, auszuschließen. Mutationen, die allerdings aufgrund eines Mutations-*Hotspots* an derselben Position vorkamen, wurden mit dieser Herangehensweise unterbewertet.

Die DT40-Zelllinie ist auf eine F1-Kreuzung von zwei Hühnerstämmen, G4 und S3, zurückzuführen⁸³. Aus diesem Grund unterscheiden sich die beiden *Ig_L*-Allele durch zahlreiche Polymorphismen⁷⁵. Bei dem hier untersuchten rearrangierten *Ig_L*-Allel handelt es sich um das G4-Allel. In 6 von insgesamt 585 Sequenzen (inklusive der Sequenzen der DT40Cre1-Zelllinie) wurde jedoch das S3-Allel amplifiziert⁷². Da hier keine Vergleichbarkeit gewährleistet war, wurden diese Sequenzen von der Analyse ausgeschlossen.

5.2.1.6.4 Vorbereitung der DT40Cre1-Zelllinien für die Sequenzierung

Nach Bestimmung der Ig-Genkonversionsaktivität mit Durchflusszytometrie wurden wie bei der DT40 Ψ V-Zelllinie je 6 repräsentative Subklone pro Genotyp bis zu 10 Wochen kultiviert und von diesen je 2 für die Sequenzierung des *Ig_L*-Locus anhand des Mittelwerts der IgM-Messung ausgewählt. Die Zellproben von Woche 4 wurden wie unter 5.2.1.6.2 beschrieben präpariert und für die Sequenzierung vorbereitet.

5.2.1.6.5 Auswertung der Sequenzierung des *Ig_L*-Locus der DT40Cre1-Zelllinie

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte wie bei der DT40 Ψ V-Zelllinie (Abschnitt 5.2.1.6.3). Es wurde eine Sequenz von 720 bp analysiert, vom 5' gelegenen Intron der VJ-Region ausgehend bis zum 3' gelegenen Intron der VJ-Region. Die Nukleotidveränderungen wurden durch *Alignment* der von einem Subklon abstammenden Sequenzen manuell identifiziert. Im Anschluss wurden diejenigen Sequenzen, die Nukleotidveränderungen aufwiesen, mit den 25 Pseudogensequenzen⁷² verglichen und so ermittelt, welche Nukleotidveränderungen auf ein Ig-Genkonversionsereignis zurückzuführen waren⁸³. (I) Falls die Nukleotidveränderung nicht in einem Pseudogendonator detektiert wurde bzw. nicht mehr als 9 bp Homologie auftrat, wurde die Nukleotidveränderung als Punktmutation eingestuft. (II) Falls hingegen zwei Nukleotidveränderungen oder mehr auf einen Pseudogendonator zurückgeführt werden konnten, wurden diese als Ig-Genkonversionsmutationen gewertet. (III) Wenn allerdings nur eine einzelne Nukleotidveränderung auf ein Ig-Genkonversionsereignis zurückgeführt wurde, wurde diese Art von Nukleotidveränderung als zweideutige Mutation eingestuft, da es sich hierbei sowohl um eine Punktmutation als auch um eine Ig-Genkonversionsmutation handeln könnte.

5.2.1.7 Aktivierung der Cre-Rekombinase in DT40-Zellen

Die Cre-Rekombinase rekombiniert loxP-flankierte DNA-Sequenzen miteinander und deletiert die dazwischenliegende DNA-Sequenz, falls sich die loxP-Stellen in derselben Orientierung befinden. Die induzierbare Form der Cre-Rekombinase in DT40-Zellen wird durch Zugabe des Liganden 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aktiv^{313,412}. Im Rahmen der Doktorarbeit erfolgte die Aktivierung der Cre-Rekombinase zur selektiven Entfernung der in den Zelllinien enthaltenen Resistenzkassetten.

Hierfür wurde 1 ml der DT40-Zellen mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml in eine 24-Loch-Platte überführt. Nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ 4-OHT wurde die Suspension gut gemischt und über Nacht bei 41°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am darauffolgenden Tag (etwa 15 Stunden später) erfolgte die Generierung der Einzelzellklone durch

Herstellung unterschiedlicher Verdünnungsstufen ($3,3 \times 10^2$ Zellen/ml, 33 Zellen/ml und 3,3 Zellen/ml). Die Verdünnungen wurden in eine 96-Loch-Platte mit 100 μ l pro Vertiefung ausplattiert. Zur selektiven Entfernung einer Resistenzkassette wurden die Zellen 24 Stunden danach mit den entsprechenden Selektionssubstanzen für die Resistenzen behandelt, die in den Zelllinien erhalten bleiben sollten. Nach einer 7- bis 14-tägigen Inkubation bei 41 °C und 5 % CO₂ wurden die 96-Loch-Platten auf die Anwesenheit von Kolonien untersucht. Nachdem mikroskopisch sichergestellt wurde, dass es sich um eine einzige Kolonie handelte, wurde der Inhalt der entsprechenden Vertiefung in eine 24-Loch-Platte mit Medium überführt. Um den Resistenzkassettenstatus zu überprüfen, wurde eine entsprechende *Targeting*-PCR (Abschnitt 5.2.3.2.1) durchgeführt. Die Entfernung der *AID-IRES-GFP*-Kassette wurde mit einer durchflusszytometrischen GFP-Fluoreszenzmessung und einer Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der AID-Expression bestätigt.

5.2.1.8 Bestimmung der Proliferationsrate

Es wurden je 4×10^6 Zellen für die CFSE-Färbung und die ungefärbte Kontrolle verwendet und die Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 37 °C warmes PBS hinzugefügt und erneut bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstands wurde das Zellpellet in 2 ml CFDA-SE-PBS-Lösung (Vybrant™ CFDA-SE Cell Tracer, V-12883, Invitrogen), mit einer finalen CFDA-SE-Konzentration von 0,5 μ M, resuspendiert. Die Färbung der Zellen erfolgte während einer 5-minütigen Inkubation im 37°C-Inkubator und wurde anschließend durch Zugabe von 10 ml kaltem Kulturmedium gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 10 ml warmem Kulturmedium aufgenommen und bis zu 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einer Zelldichte von 4×10^5 /ml (Raji-Zelllinie) bzw. 3×10^5 /ml (DT40-Zelllinie) in 10 ml warmem Kulturmedium aufgenommen. Wurde der Einfluss von Inhibitoren auf die Proliferation gemessen, erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Zugabe dieser Substanzen und von DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Für jede experimentelle Bedingung bzw. Zelllinie wurden Duplikate angesetzt. Während des experimentellen Verlaufs, der sich meist über 7 Tage erstreckte, wurden die Zellen alle 3 (Raji-Zelllinie) bzw. 2 Tage (DT40-Zelllinie) mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und der optimalen Zelldichte ($3-4 \times 10^5$ /ml) angepasst. Falls es sich um ein Experiment mit Inhibitoren handelte, wurde die entsprechende Menge des Inhibitors bei Einstellung der Zelldichte hinzugefügt. Die durchflusszytometrische Messung der CFSE-Fluoreszenzintensität erfolgte am ersten Tag des Experiments frühestens 6 Stunden nach der Färbung und an den folgenden Tagen täglich 1- bis 2-mal.

Die so erhaltenen, mittleren Fluoreszenzintensitäten wurden in einem Excel-Diagramm in Relation zur Zeit aufgetragen und daraus eine exponentielle Interpolation erstellt. Für die Berechnung der Proliferationsgeschwindigkeit (v_p) wurde der Exponent dieser Funktion als Konstante k in folgende Gleichung eingesetzt, die auf der Annahme basiert, dass die Halbierung der Fluoreszenzintensität einer Zellteilung entspricht⁴¹³:

$$v_p = -\frac{1}{2} \cdot \ln\left(\frac{1}{2}\right)$$

5.2.1.9 Induktion und Analyse der CDC25A-Degradation

Zur Analyse der CDC25A-Degradation in DT40-Zellen wurden die Zellen am Vortag des Experiments auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Am folgenden Tag wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen pro Bedingung abgenommen, bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Danach wurden die Zellen in Zellkulturplatten ohne Deckel mit 15 J/m^2 in einem UV-Stratalinker (Lab Vista) bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in Medium resuspendiert und in Zellkulturgefäße überführt. Nach 1-stündiger Inkubation bei $41 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 wurden die Zellen zentrifugiert und für die Western-Blot-Analyse vorbereitet (Abschnitte 5.2.5.1-5).

5.2.1.10 Methylzellulose-Überlebensexperiment

Methylzellulose-Überlebensexperimente dienen dazu, die Sensitivität der Zellen nach Zugabe von DNA-schädigenden Substanzen zu bestimmen, um z.B. einen Rückschluss auf deren Reparaturkapazität ziehen zu können⁴¹⁴. Im Methylzellulose-Medium bilden sich distinkte Kolonien aus. Die relative Kolonienanzahl, die der Überlebensfähigkeit entspricht, kann so durch Auszählung der Kolonien ermittelt werden⁴¹⁴.

Am Tag vor Durchführung des Experiments wurden die DT40-Zellen auf die optimale Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Am darauffolgenden Tag wurde die benötigte Anzahl an 6-Loch Platten (eine 6-Loch-Platte pro Zelllinie pro Dosis) mit je 5 ml 1,5 % Methylzellulose mit zugesetzten DNA-schädigenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen (Herstellung siehe am Ende dieses Abschnitts) pro Vertiefung befüllt. Um einem Austrocknen vorzubeugen, wurden je 2 ml steriles Wasser in die Zwischenräume der 6-Loch-Platten überführt. Die Zellen wurden exakt auf eine Zelldichte von $1,8\text{-}2,2 \times 10^5$ Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 10 ml eingestellt. Dies wurde durch eine erneute Zellzählung überprüft und wenn notwendig korrigiert. Die so hergestellte Zellsuspension wurde jeweils in Duplikaten unverdünnt,

in einer 1:10 sowie einer 1:100 Verdünnung auf die Methylzellulose in eine Vertiefung der 6-Loch-Platten übertragen. Die Platten wurden anschließend für 10-14 Tage im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Die Auszählung der Kolonien erfolgte in einer Verdünnungsstufe mit etwa 20-100 Kolonien.

Herstellung der 1,5 %-igen Methylzellulose

15 g autoklavierte Methylzellulose (Sigma-Aldrich) wurde in 220 ml 55 °C-65 °C warmem, ebenfalls autoklaviertem H₂O gelöst. 11,9 g D-MEM (Invitrogen) und 2,44 g Natrium-Hydrogen-Carbonat (Merck) wurden in 500 ml H₂O gelöst und die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm). Im Anschluss wurde zur D-MEM/NaHCO₃-Lösung die Methylzellulose-Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C gerührt und am folgenden Tag mit 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/µl Penicillin/Streptomycin, 1 % Hühnerserum, 10 % FKS, 0,1 µM 2-Mercaptoethanol sowie 140 ml sterilem H₂O versetzt. Die Lösung wurde erneut über Nacht bei 4 °C gerührt. Danach wurden die DNA-schädigenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben und es erfolgte ein weiteres Rühren über Nacht bei 4 °C.

5.2.2 Analyse von Mäusen

5.2.2.1 Zellsortierung von Keimzentrums-B-Zellen und Nicht-Keimzentrums-B-Zellen der Maus

5.2.2.1.1 Immunisierung von Mäusen

Die Mäuse wurden im Alter von 8 bis 12 Wochen mit 100 µg des T-zellabhängigen Antigens NP-CGG (4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyliertes Hapten konjugiert mit Hühner-γ-Globulin; Biosearch Technologies) intraperitoneal (i.p.) von A. Geishauser oder G. Marschall-Schröter immunisiert.

Vor Verabreichung wurde das Antigen unter sterilen Bedingungen mit dem gleichen Volumen an 10%-iger KAl(SO₄)₂-Lösung gefällt und mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgten je drei Zentrifugationschritte (10 min bei 5000 rpm) mit einem anschließenden Waschschritt mit sterilem PBS. Zuletzt wurde das Antigen in 200 µl sterilem PBS aufgenommen und der Maus i.p. injiziert.

5.2.2.1.2 Präparation der Milz-Zellen

Am Tag 14 nach Immunisierung mit NP-CGG wurden die Mäuse durch 2-minütige CO₂-Begasung und durch anschließenden Genickbruch getötet. Anschließend wurde die Milz als ganzes Organ entnommen und in Medium (RPMI 1640, 5 % FKS, 1 % Natriumpyruvat, 1 % Glutamin) überführt. Zur Vereinzlung wurde das Gewebe durch ein feines Sieb gedrückt. Danach wurden die Erythrozyten lysiert und entfernt. Hierfür wurden die Zellen bei 1200 rpm, 4 °C für 5 min zentrifugiert und in 1 ml Lysepuffer (155 mM NH₄Cl; 170 mM Tris pH 7,65 im Verhältnis 9:1) resuspendiert. Nach 3 min wurde die Reaktion mit 9 ml Medium gestoppt und die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in 1 ml Medium aufgenommen.

5.2.2.1.3 Durchflusszytometrische Messung (FACS)

Bevor die Zellsortierung durchgeführt wurde, wurde mit einer durchflusszytometrischen Messung überprüft, ob die Immunisierung zur Bildung von Keimzentrumszellen geführt hatte. Hierfür wurden 1x10⁶ präparierte Milzzellen entnommen, diese zentrifugiert und in 200 µl PBS/BSA(0,5 %) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 30 µl des Antikörper-Mixes (B220-APC, CD95-PE, PNA-FITC) (Tabelle 5.6) aufgenommen und wurden für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS/BSA(0,5 %) wurden die Zellen in 100 µl des Verdünnungsreagenz resuspendiert und mit einem *FACS-CaliburTM Flow Cytometer* (BD Biosciences) analysiert (1x10⁵ Zellen pro Ansatz).

5.2.2.1.4 Zellsortierung

Für die Zellsortierung wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml PBS/BSA(0,5 %) aufgenommen, das zuvor mit den Antikörpern PNA-FITC, CD95-PE und B220-APC in denselben Konzentrationen wie für die FACS-Färbung versetzt wurde (Tabelle 5.6). Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit PBS/BSA(0,5 %) gewaschen und in 800 µl PBS/BSA (0,5 %) aufgenommen. Anschließend erfolgte mit einem *FACSAriaTM III*-Gerät (BD Biosciences) die Zellsortierung der Keimzentrums (B220⁺ CD95⁺ PNA⁺)- und naiven B-Zellpopulation (B220⁺ CD95⁻ PNA⁻) in zwei separate mit Medium gefüllte Gefäße. Es wurden je 1x10⁵ naive B-Zellen sowie die höchstmögliche Anzahl an KZ-B-Zellen (meist zwischen 3-7x10⁴ Zellen) einer Milz isoliert. Direkt nach der Zellsortierung wurden die Proben zentrifugiert und in 1 ml (naive B-Zellen) bzw. 0,5 ml (KZ-B-Zellen) *peqGOLDTriFastTM* (peqlab) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die erfolgte RNA-Isolation, die cDNA-Synthese sowie die qRT-PCR-Analyse werden in den Abschnitten 5.2.4.1, 5.2.4.2 und 5.2.4.3 beschrieben.

5.2.3 Techniken der DNA-Analyse

Molekularbiologische Standardmethoden, die im Folgenden nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei Sambrook & Russel⁴¹⁵ beschrieben durchgeführt.

5.2.3.1 Isolierung von DNA

Die DNA wurde durch zwei unterschiedliche Methoden präpariert. Für eine hohe DNA-Qualität wurde das *QIA amp DNA Mini-Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet. Falls jedoch DNA aus einer geringen Anzahl an kultivierten Zellen benötigt wurde, wurde diese durch direkte Inkubation der Zellen mit der Proteinase K (MBI Fermentas) hergestellt. Hierfür wurden etwa 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen mit 50 μ l Lysepuffer (10 mM Tris, 0,5 μ g/ μ l Proteinase K) für 2,5 Stunden bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95 °C.

5.2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

5.2.3.2.1 Targeting-PCR

Die PCR-Reaktionen^{416,417} zum Nachweis der gerichteten Integration in den genomischen Locus werden als *Targeting-PCRs* bezeichnet⁴¹⁸. Die Primer der *Chk1-Targeting-PCRs* sowie der *Rad18-* und *RDM1-Targeting-PCR* sind in Tabelle 5.10 und Tabelle 5.13 aufgeführt.

Die PCRs wurden unter Verwendung der *Expand-Long-Template-Polymerase* (Roche Diagnostics) durchgeführt.

Der PCR-Ansatz für die *Targeting-PCRs* setzte sich wie folgt zusammen:

2 μ l *Expand Long Template*-Puffer mit 17,5 mM MgCl₂ (1x), 2,5 μ l dNTPs (312 μ M), 1,25 μ l *Forward-Primer* (0,781 μ M), 1,25 μ l *Reverse-Primer* (0,781 μ M), 1 μ l DNA (DNA aus direkter Proteinase K-Inkubation; unverdünnt); 0,25 μ l *Expand Long Template-Polymerase* (1,25 U), ad 20 μ l H₂O.

Hierfür wurde folgendes PCR-Programm mit 49 Zyklen verwendet:

Tabelle 5.18: PCR-Programm für den Nachweis der gerichteten Integration eines Targeting-Vektors

Programm	Temperatur	Dauer
Denaturierung der DNA	95 °C	5 min
Zyklische Denaturierung	95 °C	50 sec
Zyklische Anlagerung	60 °C (<i>Chk1</i> , <i>RDM1</i>) bzw. 62 °C (<i>Rad18</i>)	50 sec
Zyklische Verlängerung	72 °C	7 min
Finale Verlängerung	72 °C	10 min

5.2.3.2.2 PCR für die Herstellung des *Chk1*-Rekonstitutionsvektors

Für die Herstellung des *Chk1*-Rekonstitutionsvektors wurde die kodierende *Chk1*-Sequenz aus DT40-cDNA unter Verwendung der *Phusion*-Polymerase (New England Biolabs) mit den in Tabelle 5.11 aufgeführten Primern amplifiziert.

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4 µl 5x *High-Fidelity*-Puffer (1x), 0,4 µl dNTPs aus *Phusion*-Kit (200 µM), 0,4 µl *Forward*-Primer (0,5 µM), 0,4 µl *Reverse*-Primer (0,5 µM), 1 µl DNA (DNA aus *QIA Amp DNA Mini*-Präparation; 300 ng); 0,9 µl DMSO (4,5 %), 0,2 µl *Phusion*-Polymerase, ad 20 µl H₂O.

Hierfür wurde folgendes PCR-Programm mit 40 Zyklen verwendet:

Tabelle 5.19: PCR-Programm zur Amplifikation der kodierenden *Chk1*-Sequenz

Programm	Temperatur	Dauer
Denaturierung der DNA	98 °C	30 sec
Zyklische Denaturierung	98 °C	10 sec
Zyklische Anlagerung	66 °C	30 sec
Zyklische Verlängerung	72 °C	30 sec
Finale Verlängerung	72 °C	10 min

5.2.3.3 Southern-Blot

Durchführung des Kapillar-Southern-Blots

Für die Southern-Blot-Analyse^{419,420} zur Bestätigung des *Chk1-Knockouts* wurde die genomische DNA aus 1x10⁷ DT40-Zellen mit dem *QIA Amp DNA Mini*-Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert. Die in 50 µl eluierte DNA wurde vermessen und hiervon 15-30 µg mit 50 U des Restriktionsenzym BamHI über Nacht gespalten (siehe Abbildung 2.5 A für die *Chk1*-Southern-Blot-Strategie). Am darauffolgenden Tag wurden die DNA-Fragmente bei 80 V für 4 Stunden auf einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in 0,25 M HCl für 20 min unter Schwenken inkubiert, mit Transferpuffer gewaschen und danach für 60 min mit dem Transferpuffer ebenfalls unter Schwenken äquilibriert. Danach wurde die DNA mit einem Kapillar-Southern-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran (INYC00010, Millipore) 1-2 Tage übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran unter Schwenken mit 2x SSC-Puffer 3-mal für 10 min neutralisiert. Anschließend wurde die DNA durch 1-stündige Inkubation bei 78 °C auf der Membran fixiert. Diese wurde danach mit 30 ml vorgewärmten Prähybridisierungspuffer, zu dem zuvor einzelsträngige DNA (D9156, Sigma-Aldrich) hinzugefügt wurde, für etwa 6 Stunden oder über Nacht bei 62 °C versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (siehe

unten) und eine weitere Inkubation bei 65 °C über Nacht bzw. 1-2 Tage. Im Folgenden wurde die Membran mit Waschpuffer (0,5xSSC/0,5 % SDS) 3-mal für 10 min bei 65°C geschwenkt. Für die Entwicklung (TYPON Optimax) wurde die Membran bei -80°C mit Hyperfilm™ MP-Filmen (Amersham) für wenige Stunden bis mehrere Tage in Kontakt gebracht.

Prähybridisierungspuffer		20x SSC	
NaCl	1 M	NaCl	3 M
Tris pH 7,5	50 mM	Natriumcitrat	0,3 M
Dextransulfat	10 %	Transferpuffer	
SDS	1 %	NaOH	0,4 M
ssDNA (D9156, Sigma)	250 µg/ml	NaCl	0,6 M

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Die Sequenzen der Primer für die Herstellung der Sonde sind in Tabelle 5.11 angegeben. 25 ng der Sonden-DNA wurden in 45 µl H₂O gelöst, diese für 5 min bei 95 °C erhitzt, danach auf Eis abgekühlt und anschließend mit einem Aliquot *rediPrime*™ (Amersham) gemischt. Für die radioaktive Markierung wurden 5 µl ³²P dCTP hinzugegeben und der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Sonde unter Verwendung einer Sephadex-Säule (Microspin S-200 HR, Amersham) gereinigt. Pro Membran wurden etwa 3x10⁷ dpm der Sonde eingesetzt und diese vor Zugabe für 3 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

5.2.3.4 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Für die Hitzeschock-Transformation wurden pro Ansatz 100 µl kompetente *DH5α E.coli*-Bakterien eingesetzt und diese mit 1 ng DNA bzw. dem gesamten Ligationsansatz gemischt. Danach wurde die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 45 sec bei 42 °C erhitzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 5 min erfolgte die Zugabe von 500 µl LB-Medium. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die gesamte Suspension auf Ampicillin-enthaltenden Agarplatten ausplattiert und diese wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden auf die Agarplatten zusätzlich 20 µl einer 100 mM Stock-Lösung Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 40 µl einer 25 mg/ml Stock-Lösung 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) ausgestrichen.

5.2.3.5 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung der Puffer des *Jetstar 2.0 Plasmid Purification-Kits*. Am Tag bevor die Mini-Plasmid-Präparation durchgeführt wurde, erfolgte das Animpfen der Bakterienkulturen in 2 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin. Am darauffolgenden Tag wurde die Kultur bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 100 µl Jetstar-E1-Lösung resuspendiert. Danach wurden 100 µl der Jetstar-E2-Lösung zugegeben. Nach 3- bis 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl Jetstar-E3-Lösung. Anschließend wurde das Präzipitat durch 20-minütige Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 ml 100 %-igen Ethanol durchgeführt, gefolgt von einer 20-minütigen Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 200 µl 70 %-igen Ethanol resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 15000 rpm und 4 °C für 5 min wurde das DNA-Pellet getrocknet. Die Resuspension der DNA erfolgte mit 50 µl H₂O.

5.2.3.6 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurde diese mit einer Hitzeschock-Transformation in Bakterien eingebracht (Abschnitt 5.2.3.4). Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das *Jetstar 2.0 Plasmid Purification-Kit* (Genomed) nach Herstellerangaben verwendet.

5.2.3.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurden diese von den Firmen MBI Fermentas und New England Biolabs bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

5.2.3.8 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Vor der Ligation des Vektors mit dem einzufügenden DNA-Fragment (= *Insert*) wurde meist eine Dephosphorylierung des Vektors durchgeführt. Hierfür wurde die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (New England Biolabs) nach Herstellerangaben eingesetzt.

5.2.3.9 Ligation der DNA

Für die Ligationsreaktion wurde die T4-DNA Ligase der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben verwendet. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

5.2.3.10 Reinigung der DNA

Die Aufreinigung von PCR-Ansätzen erfolgte mit dem *QIA quick PCR purification*-Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels des *QIA quick Gel Extraction*-Kits (QIAGEN) erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben.

5.2.4 Techniken der RNA-Analyse

5.2.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation der naiven und Keimzentrums-B-Zellen der Maus erfolgte unter Verwendung des *peqGOLD TriFast*TM-Kits (peqlab) nach Herstellerangaben entsprechend der eingesetzten Menge des *peqGOLDTriFast*TM-Reagenz. Die RNA wurde in 10 µl mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem H₂O aufgenommen und für 10 min bei 55-60°C erhitzt.

Die RNA-Isolation der DT40-Zellen erfolgte unter Anwendung des *RNeasy*-Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben.

5.2.4.2 Erststrang cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das *1st strand cDNA synthesis*-Kit (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben eingesetzt. Hierfür wurden, wenn möglich, 1 µg RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese der RNA der naiven und Keimzentrums-B-Zellfraktionen von Mäusen erfolgte mit der gesamten Menge an isolierter RNA, da es sich hier um sehr geringe RNA-Konzentrationen handelte.

5.2.4.3 Quantitative *Realtime*-PCR

Die quantitative *Realtime* (*qRT*)-PCR wurde in einem *LightCycler 2.0* (Roche Diagnostics) unter Anwendung des *FastStart DNA Master SYBR Green I*-Kits (Roche Diagnostics) in Glaskapillaren (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben

durchgeführt⁴²¹. Für die *LightCycler*-Reaktion wurden 0,5 µl pro Primer (0,5 µM), 0,8 µl 25 mM MgCl₂ (2 mM), 1 µl des *DNA Master SYBR Green I*-Reagenz, 6,2 µl H₂O und 1 µl cDNA gemischt. Je nach Expressionsstärke der Ziel-mRNA wurde die cDNA bis zu 1:10 verdünnt eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare waren exonübergreifend oder befanden sich auf zwei unterschiedlichen Exons um Amplifikationsprodukte durch eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA zu vermeiden. Für die Ermittlung der Standardabweichung wurden technische Triplikate verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden mit folgendem Programm mit je 45 Zyklen durchgeführt:

Tabelle 5.20: Programm für die qRT-PCR-Analyse mit einem *LightCycler*

Programm	Temperatur	Dauer
Denaturierung der DNA	95 °C	10 min
Zyklische Denaturierung	95 °C	5 sec
Zyklische Anlagerung	58-63 °C	10 sec
Zyklische Verlängerung	72 °C	1 min (pro 1,5 kb)
Aufschmelzen	70 °C bis 97 °C	10 sec
Abkühlen	40 °C	15 sec

Die Effizienz der PCR-Reaktion wurde durch Erstellung einer Eichgerade ermittelt. Hierfür wurde der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Cp-Wert aufgetragen (*Crossing-point*, entspricht der Anzahl an Zyklen, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Fluoreszenz des Hintergrunds steigt⁴²²).

Die Effizienz (E) der Reaktion wurde aus der Steigung der Eichgerade (m) mit folgender Formel ermittelt:

$$E = 10^{-1/m} \quad 423$$

Zur Ermittlung der relativen Ausgangskonzentration der Probe (T_0) wurde folgende Formel verwendet:

$$T_0 = 100 \times \frac{E_{\text{Referenzgen}}^{Cp_{\text{Referenzgen}}}}{E_{\text{Zielgen}}^{Cp_{\text{Zielgen}}}} \quad 424$$

Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *GAPDH* herangezogen.

5.2.5 Proteinbiochemische Methoden

5.2.5.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Präparation von Proteinen aus DT40-Hühner-B-Zellen wurden ca. 1×10^7 Zellen und aus humanen Zellen ca. 5×10^6 Zellen verwendet. Die entsprechende Menge der Zellsuspension wurde abgenommen, 2-mal mit PBS gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C) und in Lysepuffer resuspendiert (D. Krappmann, Helmholtz Zentrum München; Zusammensetzung siehe Tabelle am Ende dieses Abschnitts). Hierfür wurden die Zellen durch Resuspension mit dem Lysepuffer und anschließende 15-minütige Inkubation auf Eis aufgeschlossen. In der Inkubationszeit wurden die Proben mehrere Male mit einem Vortexer gemischt. Zelltrümmer und DNA wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C entfernt. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit dem DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) bestimmt (Abschnitt 5.2.5.2).

Lysepuffer	
Hepes (pH 7,9)	20 mM
NaCl	350 mM
Glycerin	20 %
MgCl ₂	1 mM
EDTA	0,5 mM
EGTA	0,1 mM
NP-40	1 %
Zusatz von:	
Protease-Inhibitor	Complete E, Roche Diagnostics
Phosphatase-Inhibitor	PhosStop, Roche Diagnostics

5.2.5.2 Proteinquantifizierung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein abgewandelter Lowry-Assay⁴²⁵ verwendet (*DC-Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories). Hierfür wurden die Proteinproben 1:10 in einem 20 µl Ansatz mit H₂O_{bidest} verdünnt. Für die Erstellung einer Eichgerade wurden vier Proteinstandards von bekannter Proteinkonzentration (0,1; 0,2; 0,4 und 0,8 mg/ml BSA, *bovine serum albumin*) analog zu den zu untersuchenden Proteinproben mitgeführt. Zu jedem 20 µl Ansatz erfolgte die Zugabe von 50 µl Reagenz A, das zuvor zu 2 % mit dem Reagenz S – für die Detergenzverträglichkeit der Methode – versetzt wurde. Anschließend wurden die Ansätze gemischt und 400 µl Reagenz B hinzugefügt. Sofort nach Zugabe dieses

Reagenz wurden die Proben gemischt und nach 15-minütiger Inkubation unter Ausschluss von Licht die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt.

5.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli⁴²⁶ angewendet. Für die größenabhängige Auftrennung wurde ein Gelsystem aus Polyacrylamid verwendet⁴²⁷. Durch Variation der Acrylamidkonzentration und des Quervernetzers N,N'-Methylenbisacrylamid kann die Porengröße und dadurch auch der optimale Trennbereich der Proteine verändert werden. Es wurden Acrylamidkonzentrationen von 10-15 % eingesetzt.

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden diese mit 1/10 des Volumens an DTT versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Hälfte des Volumens an 2xLaemmli-Probenpuffer und ein 5-minütiges Aufkochen bei 95 °C für 5 min. Je nach Anwendung und Detektionsgrenze der verwendeten Antikörper wurden 20-60 µg Protein aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 90-110 V bei Raumtemperatur durchgeführt.

2x Laemmli-Probenpuffer		10x Laemmli Laufpuffer	
SDS	4 %	Tris	250 mM
Glycerin	20 %	Glycin	1,92 M
Tris pH 6,8	0,12 M	SDS	1 %
Bromphenolblau	0,01 %	H ₂ O	ad 1 l
H ₂ O	ad 10 ml		

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	ad 15 ml	ad 5 ml
Acrylamid	10-15%	5 %
Tris pH 8,8	350 mM	125 mM
SDS	0,1 %	0,1 %
APS (<u>A</u> mmonium <u>p</u> eroxodisulfat)	0,1 %	0,1 %
TEMED (<u>T</u> etramethylethylendiamin)	0,004 %	0,006 %

5.2.5.4 Western-Blot-Analyse

Die Bezeichnung Western-Blot⁴²⁸ umfasst u.a. den Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Membran, auf der die Proteine einer spezifischen Nachweisreaktion unterzogen werden. Es wurde das sogenannte Elektroblothing angewendet, bei dem die Proteine durch ein elektrisches Feld senkrecht zur vorherigen Trennrichtung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Hybond-P, Amersham Pharmacia) übertragen wurden.

Hierfür wurde das Acrylamidgel für 5 min in *Blotting*-Puffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde kurz mit Methanol angefeuchtet, in Wasser gewaschen und im Anschluss für 5 min in *Blotting*-Puffer äquilibriert. Auf die Blotvorrichtung wurden drei in *Blotting*-Puffer getränkte Filterpapiere, dann das Gel und im Anschluss die PVDF-Membran sowie drei weitere Filterpapiere gelegt. Es wurde ein Nass-Blot in einem *Blotting*-Tank der Firma Hoefer durchgeführt. Je nach Applikation wurde der Transfer bei 200 mA und 4°C für 2 Stunden oder bei 80 mA und 4°C für 12-16 Stunden durchgeführt.

Im Anschluss wurde der Transfer der Proteine auf die Membran durch Verwendung des reversiblen Azofarbstoffs Ponceau S (Sigma-Aldrich) überprüft. Danach erfolgte die Detektion bestimmter Proteine mit Antikörpern (Abschnitt 5.2.5.5).

10x <i>Blotting</i> -Puffer		1x <i>Blotting</i> -Puffer	
Tris	250 mM	10x <i>Blotting</i> -Puffer	100 ml
Glycin	1,92 M	Methanol	200 ml
		H ₂ O	ad 1 l

5.2.5.5 Immundetektion von Proteinen

Der Nachweis der auf die PVDF-Membran transferierten Proteine (Abschnitt 5.2.5.4) erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Diese und die entsprechenden Verdünnungsstufen sind in Tabelle 5.5 aufgeführt. Bevor die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte, wurde die Membran für 30-60 min unter Schütteln mit einer Blockierungslösung (1x PBS, 0,4 % Tween20, 5 % Trockenmilchpulver (Roth)) inkubiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu minimieren. Anschließend wurde der Erstantikörper in einer 1%-igen Milchpulverlösung hinzugegeben und mit der Membran bei 4 °C über Nacht unter rotierendem Schwenken inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3-mal für jeweils 10 min mit 1x TBS/0,4 % Tween20 bzw. 1xPBS gewaschen und für 1-5 Stunden mit dem entsprechenden Zweitantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 1x TBS/0,4 %

Tween20 bzw. 1x PBS wurde die Chemilumineszenz-Reaktion unter Anwendung des ECL-Detektionsreagenz nach Herstellerangaben (GE Healthcare) angeregt. Anschließend wurde in eine lichtdichten Kassette ein Film (*Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive*, CEA) auf die Membran für 15 sec bis zu 60 min gelegt und dieser danach in einer Röntgenfilmentwicklermaschine (TYPON Optimax, Raymed Imaging AG) entwickelt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008) *Janeway's Immunobiology* (Garland Science, New York).
2. Swain, S.L. (1983) T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 74:129–142.
3. Zhang, N. & Bevan, M.J. (2011) CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35(2):161–168.
4. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W.E. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445–489.
5. Schatz, D.G. & Ji, Y. (2011) Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 11(4):251–263.
6. Di Noia, J.M. & Neuberger, M.S. (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76:1–22.
7. Lodish, B., Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh, Matsudaira (2008) *Molecular Cell Biology* (Freeman, New York).
8. Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F. & Scharff, M.D. (2008) The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 26:481–511.
9. Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302(5909):575–581.
10. Wu, T.T. & Kabat, E.A. (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132(2):211–250.
11. Glanville, J., Zhai, W., Berka, J., Telman, D., Huerta, G., Mehta, G.R., Ni, I., Mei, L., Sundar, P.D., Day, G.M. *et al.* (2009) Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(48):20216–20221.
12. Brack, C., Hiram, M., Lenhard-Schuller, R. & Tonegawa, S. (1978) A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15(1):1–14.
13. Schatz, D.G. & Swanson, P.C. (2011) V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu Rev Genet* 45:167–202.
14. Schatz, D.G., Oettinger, M.A. & Baltimore, D. (1989) The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59(6):1035–1048.
15. Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. & Baltimore, D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248(4962):1517–1523.
16. McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M. & Oettinger, M.A. (1995) Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83(3):387–395.
17. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9):817–826.
18. Xu, J.L. & Davis, M.M. (2000) Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13(1):37–45.
19. Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J. & Hood, L. (1980) The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* 283(5746):497–499.

20. Lu, H., Shimazaki, N., Raval, P., Gu, J., Watanabe, G., Schwarz, K., Swanson, P.C. & Lieber, M.R. (2008) A biochemically defined system for coding joint formation in V(D)J recombination. *Mol Cell* 31(4):485–497.
21. Allman, D. M., Ferguson, S. & Cancro, M. P. (1992) Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *J Immunol* 149(8):2533–2540.
22. Allman, D.M., Ferguson, S.E., Lentz, V.M. & Cancro, M.P. (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(9):4431–4444.
23. Parker, D.C. (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11(1):331–360.
24. McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W. & Weigert, M. (1984) Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(10):3180–3184.
25. Berek, C. & Milstein, C. (1987) Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* 96:23–41.
26. Lebecque, S.G. & Gearhart, P.J. (1990) Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 172(6):1717–1727.
27. Rada, C., Yelamos, J., Dean, W. & Milstein, C. (1997) The 5' hypermutation boundary of kappa chains is independent of local and neighbouring sequences and related to the distance from the initiation of transcription. *Eur J Immunol* 27(12):3115–3120.
28. Rada, C. & Milstein, C. (2001) The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J* 20(16):4570–4576.
29. Betz, A.G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C. & Neuberger, M.S. (1993) Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(6):2385–2388.
30. Rogozin, I.B. & Diaz, M. (2004) Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol* 172(6):3382–3384.
31. Wagner, S.D., Milstein, C. & Neuberger, M.S. (1995) Codon bias targets mutation. *Nature* 376(6543):732.
32. Kepler, T.B. (1997) Codon bias and plasticity in immunoglobulins. *Mol Biol Evol* 14(6):637–643.
33. Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T. & Casali, P. (2012) Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 12(7):517–531.
34. Wuerffel, R.A., Du, J., Thompson, R.J. & Kenter, A.L. (1997) Ig Sgamma3 DNA-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J Immunol* 159(9):4139–4144.
35. Iwasato, T., Shimizu, A., Honjo, T. & Yamagishi, H. (1990) Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 62(1):143–149.
36. Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O. & Honjo, T. (1999) Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274(26):18470–18476.
37. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. & Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102(5):553–563.
38. Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeau, R., Gennery, A. *et al.* (2000) Activation-

- induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102(5):565–575.
39. Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D. & Goodman, M.F. (2003) Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(7):4102–4107.
 40. Rush, J.S., Fugmann, S.D. & Schatz, D.G. (2004) Staggered AID-dependent DNA double strand breaks are the predominant DNA lesions targeted to S mu in Ig class switch recombination. *Int Immunol* 16(4):549–557.
 41. Barnes, D.E. & Lindahl, T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38:445–476.
 42. Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G. & Krokan, H.E. (2007) Uracil in DNA-general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)* 6(4):505–516.
 43. Li, G.M. (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18(1):85–98.
 44. Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S. & Neuberger, M.S. (2002) AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418(6893):99–103.
 45. Rada, C., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T. & Neuberger, M.S. (2002) Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* 12(20):1748–1755.
 46. Fortini, P. & Dogliotti, E. (2007) Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6(4):398–409.
 47. Ling, H., Boudsocq, F., Woodgate, R. & Yang, W. (2001) Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell* 107(1):91–102.
 48. Daly, J., Bebenek, K., Watt, D.L., Richter, K., Jiang, C., Zhao, M.L., Ray, M., McGregor, W.G., Kunkel, T.A. & Diaz, M. (2012) Altered Ig hypermutation pattern and frequency in complementary mouse models of DNA polymerase zeta activity. *J Immunol* 188(11):5528–5537.
 49. Jansen, J.G., Langerak, P., Tsaalbi-Shtylik, A., van den Berk, P., Jacobs, H. & de Wind, N. (2006) Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med* 203(2):319–323.
 50. Ross, A.L. & Sale, J.E. (2006) The catalytic activity of REV1 is employed during immunoglobulin gene diversification in DT40. *Mol Immunol* 43(10):1587–1594.
 51. Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M.F., Diaz, M. & Casali, P. (2001) The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity* 14(5):643–653.
 52. Martomo, S.A., Saribasak, H., Yokoi, M., Hanaoka, F. & Gearhart, P.J. (2008) Reevaluation of the role of DNA polymerase theta in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *DNA Repair (Amst)* 7(9):1603–1608.
 53. Martomo, S.A., Yang, W.W., Vaisman, A., Maas, A., Yokoi, M., Hoeijmakers, J.H., Hanaoka, F., Woodgate, R. & Gearhart, P.J. (2006) Normal hypermutation in antibody genes from congenic mice defective for DNA polymerase iota. *DNA Repair (Amst)* 5(3):392–398.
 54. Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Gueranger, Q., Reynaud, C.A. & Weill, J.C. (2002) Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature* 419(6910):944–947.
 55. Masuda, K., Ouchida, R., Hikida, M., Nakayama, M., Ohara, O., Kurosaki, T. & O-Wang, J. (2006) Absence of DNA polymerase theta results in decreased somatic hypermutation frequency and altered mutation patterns in Ig genes. *DNA Repair (Amst)* 5(11):1384–1391.
 56. Faili, A., Stary, A., Delbos, F., Weller, S., Aoufouchi, S., Sarasin, A., Weill, J.C. & Reynaud, C.A. (2009) A backup role of DNA polymerase kappa in Ig gene

- hypermutation only takes place in the complete absence of DNA polymerase eta. *J Immunol* 182(10):6353–6359.
57. Shimizu, T., Azuma, T., Ishiguro, M., Kanjo, N., Yamada, S. & Ohmori, H. (2005) Normal immunoglobulin gene somatic hypermutation in Pol kappa-Pol iota double-deficient mice. *Immunol Lett* 98(2):259–264.
 58. Schenten, D., Gerlach, V.L., Guo, C., Velasco-Miguel, S., Hladik, C.L., White, C.L., Friedberg, E.C., Rajewsky, K. & Esposito, G. (2002) DNA polymerase kappa deficiency does not affect somatic hypermutation in mice. *Eur J Immunol* 32(11):3152–3160.
 59. Roa, S., Li, Z., Peled, J.U., Zhao, C., Edelmann, W. & Scharff, M.D. (2010) MSH2/MSH6 complex promotes error-free repair of AID-induced dU:G mispairs as well as error-prone hypermutation of A:T sites. *PLoS One* 5(6):e11182.
 60. Bardwell, P.D., Woo, C.J., Wei, K., Li, Z., Martin, A., Sack, S.Z., Parris, T., Edelmann, W. & Scharff, M.D. (2004) Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. *Nat Immunol* 5(2):224–229.
 61. Zeng, X., Winter, D.B., Kasmer, C., Kraemer, K.H., Lehmann, A.R. & Gearhart, P.J. (2001) DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol* 2(6):537–541.
 62. Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.C. & Reynaud, C.A. (2007) DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* 204(1):17–23.
 63. Wilson, T.M., Vaisman, A., Martomo, S.A., Sullivan, P., Lan, L., Hanaoka, F., Yasui, A., Woodgate, R. & Gearhart, P.J. (2005) MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase eta, suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J Exp Med* 201(4):637–645.
 64. Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Rogozin, I.B., Hanaoka, F. & Kunkel, T.A. (2001) Error rate and specificity of human and murine DNA polymerase eta. *J Mol Biol* 312(2):335–346.
 65. Imai, K., Slupphaug, G., Lee, W.I., Revy, P., Nonoyama, S., Catalan, N., Yel, L., Forveille, M., Kavli, B., Krokan, H.E. *et al.* (2003) Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 4(10):1023–1028.
 66. Guikema, J.E., Linehan, E.K., Tsuchimoto, D., Nakabeppu, Y., Strauss, P.R., Stavnezer, J. & Schrader, C.E. (2007) APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 204(12):3017–3026.
 67. Masani, S., Han, L. & Yu, K. (2013) Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 is the essential nuclease during immunoglobulin class switch recombination. *Mol Cell Biol*
 68. Rada, C., Di Noia, J.M. & Neuberger, M.S. (2004) Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* 16(2):163–171.
 69. Butler, J.E. (1998) Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev Sci Tech* 17(1):43–70.
 70. Reynaud, C.A., Anquez, V., Dahan, A. & Weill, J.C. (1985) A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 40(2):283–291.
 71. Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V. & Weill, J.C. (1989) Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59(1):171–183.
 72. Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H. & Weill, J.C. (1987) A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48(3):379–388.
 73. McCormack, W.T., Hurley, E.A. & Thompson, C.B. (1993) Germ line maintenance of the pseudogene donor pool for somatic immunoglobulin gene conversion in chickens. *Mol Cell Biol* 13(2):821–830.

74. Thompson, C.B. & Neiman, P.E. (1987) Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell* 48(3):369–378.
75. Carlson, L.M., McCormack, W.T., Postema, C.E., Humphries, E.H. & Thompson, C.B. (1990) Templated insertions in the rearranged chicken IgL V gene segment arise by intrachromosomal gene conversion. *Genes Dev* 4(4):536–547.
76. Arakawa, H., Hauschild, J. & Buerstedde, J.M. (2002) Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* 295(5558):1301–1306.
77. Arakawa, H., Saribasak, H. & Buerstedde, J.M. (2004) Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol* 2(7):E179.
78. Di Noia, J. & Neuberger, M.S. (2002) Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature* 419(6902):43–48.
79. Di Noia, J.M. & Neuberger, M.S. (2004) Immunoglobulin gene conversion in chicken DT40 cells largely proceeds through an abasic site intermediate generated by excision of the uracil produced by AID-mediated deoxycytidine deamination. *Eur J Immunol* 34(2):504–508.
80. Saribasak, H., Saribasak, N.N., Ipek, F.M., Ellwart, J.W., Arakawa, H. & Buerstedde, J.M. (2006) Uracil DNA glycosylase disruption blocks Ig gene conversion and induces transition mutations. *J Immunol* 176(1):365–371.
81. Tang, E.S. & Martin, A. (2006) NHEJ-deficient DT40 cells have increased levels of immunoglobulin gene conversion: evidence for a double strand break intermediate. *Nucleic Acids Res* 34(21):6345–6351.
82. Bezzubova, O., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S. & Buerstedde, J.M. (1997) Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54^{-/-} mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell* 89(2):185–193.
83. Sale, J.E., Calandrini, D.M., Takata, M., Takeda, S. & Neuberger, M.S. (2001) Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation. *Nature* 412(6850):921–926.
84. Hatanaka, A., Yamazoe, M., Sale, J.E., Takata, M., Yamamoto, K., Kitao, H., Sonoda, E., Kikuchi, K., Yonetani, Y. & Takeda, S. (2005) Similar effects of Brca2 truncation and Rad51 paralog deficiency on immunoglobulin V gene diversification in DT40 cells support an early role for Rad51 paralogs in homologous recombination. *Mol Cell Biol* 25(3):1124–1134.
85. D'Avirro, N., Truong, D., Luong, M., Kanaar, R. & Selsing, E. (2002) Gene conversion-like sequence transfers between transgenic antibody V genes are independent of RAD54. *J Immunol* 169(6):3069–3075.
86. D'Avirro, N., Truong, D., Xu, B. & Selsing, E. (2005) Sequence transfers between variable regions in a mouse antibody transgene can occur by gene conversion. *J Immunol* 175(12):8133–8137.
87. Darlow, J.M. & Stott, D.I. (2006) Gene conversion in human rearranged immunoglobulin genes. *Immunogenetics* 58(7):511–522.
88. Tsai, H.F., D'Avirro, N. & Selsing, E. (2002) Gene conversion-like sequence transfers in a mouse antibody transgene: antigen selection allows sensitive detection of V region interactions based on homology. *Int Immunol* 14(1):55–64.
89. Duvvuri, B. & Wu, G.E. (2012) Gene Conversion-Like Events in the Diversification of Human Rearranged IGHV3-23*01 Gene Sequences. *Front Immunol* 3:158.
90. Okazaki, I.M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K. & Honjo, T. (2003) Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* 197(9):1173–1181.
91. Rucci, F., Cattaneo, L., Marrella, V., Sacco, M.G., Sobacchi, C., Lucchini, F., Nicola, S., Della Bella, S., Villa, M.L., Imberti, L. *et al.* (2006) Tissue-specific sensitivity to AID expression in transgenic mouse models. *Gene* 377:150–158.

92. Muto, T., Okazaki, I.M., Yamada, S., Tanaka, Y., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H. & Honjo, T. (2006) Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(8):2752–2757.
93. Shen, H.M., Bozek, G., Pinkert, C.A., McBride, K., Wang, L., Kenter, A. & Storb, U. (2008) Expression of AID transgene is regulated in activated B cells but not in resting B cells and kidney. *Mol Immunol* 45(7):1883–1892.
94. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. (1991) Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354(6352):389–392.
95. Nieuwenhuis, P. & Opstelten, D. (1984) Functional anatomy of germinal centers. *Am J Anat* 170(3):421–435.
96. Kroese, F.G., Wubbena, A.S., Seijen, H.G. & Nieuwenhuis, P. (1987) Germinal centers develop oligoclonally. *Eur J Immunol* 17(7):1069–1072.
97. 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(3):679–687.
98. Berek, C., Berger, A. & Apel, M. (1991) Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67(6):1121–1129.
99. Liu, Y.J., Joshua, D.E., Williams, G.T., Smith, C.A., Gordon, J. & MacLennan, I.C. (1989) Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342(6252):929–931.
100. Coico, R.F., Bhogal, B.S. & Thorbecke, G.J. (1983) Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol* 131(5):2254–2257.
101. Victora, G.D. & Nussenzweig, M.C. (2012) Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30:429–457.
102. Röhlich, K. (1930) Beitrag zur Cytologie der Keimzentren der Lymphknoten. *Z Mikrosk Anat Forsch* 20:287–297.
103. Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L. & Nussenzweig, M.C. (2010) Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143(4):592–605.
104. Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Tarte, K. & Fest, T. (2009) CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J Immunol* 182(12):7595–7602.
105. Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N. & Cyster, J.G. (2004) Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5(9):943–952.
106. Hauser, A.E., Junt, T., Mempel, T.R., Sneddon, M.W., Kleinstein, S.H., Henrickson, S.E., von Andrian, U.H., Shlomchik, M.J. & Haberman, A.M. (2007) Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26(5):655–667.
107. Schwickert, T.A., Lindquist, R.L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M.H., Dustin, M.L. & Nussenzweig, M.C. (2007) In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446(7131):83–87.
108. Allen, C.D., Okada, T., Tang, H.L. & Cyster, J.G. (2007) Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315(5811):528–531.
109. Kepler, T.B. & Perelson, A.S. (1993) Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol Today* 14(8):412–415.
110. Oprea, M. & Perelson, A.S. (1997) Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J Immunol* 158(11):5155–5162.
111. Allen, C.D., Okada, T. & Cyster, J.G. (2007) Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27(2):190–202.

112. Shokat, K.M. & Goodnow, C.C. (1995) Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 375(6529):334–338.
113. Tarlinton, D.M. (2008) Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunol Cell Biol* 86(2):133–138.
114. Tran, T.H., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N.A., Shinkura, R., Fagarasan, S., Honjo, T. & Nagaoka, H. (2010) B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Nat Immunol* 11(2):148–154.
115. Gao, N., Dang, T. & Yuan, D. (2001) IFN-gamma-dependent and -independent initiation of switch recombination by NK cells. *J Immunol* 167(4):2011–2018.
116. Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y. & Shimizu, A. (2003) The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med* 198(9):1427–1437.
117. Park, S.R., Zan, H., Pal, Z., Zhang, J., Al-Qahtani, A., Pone, E.J., Xu, Z., Mai, T. & Casali, P. (2009) HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat Immunol* 10(5):540–550.
118. Sayegh, C.E., Quong, M.W., Agata, Y. & Murre, C. (2003) E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol* 4(6):586–593.
119. Alinikula, J., Nera, K.P., Junttila, S. & Lassila, O. (2011) Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation. *Eur J Immunol* 41(8):2404–2413.
120. Basso, K., Schneider, C., Shen, Q., Holmes, A.B., Setty, M., Leslie, C. & Dalla-Favera, R. (2012) BCL6 positively regulates AID and germinal center gene expression via repression of miR-155. *J Exp Med* 209(13):2455–2465.
121. Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M. & Igarashi, K. (2004) The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 429(6991):566–571.
122. Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K.L., Ikebe, D., Tashiro, S. & Igarashi, K. (2010) Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *EMBO J* 29(23):4048–4061.
123. Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G. & Calame, K. (2003) Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19(4):607–620.
124. Mittrucker, H.W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kundig, T.M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P.S. & Mak, T.W. (1997) Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275(5299):540–543.
125. Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallese, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F. & Glimcher, L.H. (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412(6844):300–307.
126. Dorsett, Y., McBride, K.M., Jankovic, M., Gazumyan, A., Thai, T.H., Robbiani, D.F., Di Virgilio, M., Reina San-Martin, B., Heidkamp, G., Schwickert, T.A. *et al.* (2008) MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 28(5):630–638.
127. Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R. & Papavasiliou, F.N. (2008) MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* 28(5):621–629.
128. Rada, C., Jarvis, J.M. & Milstein, C. (2002) AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(10):7003–7008.

129. Patenaude, A.M., Orthwein, A., Hu, Y., Campo, V.A., Kavli, B., Buschiazzi, A. & Di Noia, J.M. (2009) Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nat Struct Mol Biol* 16(5):517–527.
130. Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M. & Honjo, T. (2004) Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(7):1975–1980.
131. McBride, K.M., Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P. & Nussenzweig, M.C. (2004) Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med* 199(9):1235–1244.
132. Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.C. & Reynaud, C.A. (2008) Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J Exp Med* 205(6):1357–1368.
133. Orthwein, A., Patenaude, A.M., Affar el, B., Lamarre, A., Young, J.C. & Di Noia, J.M. (2010) Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *J Exp Med* 207(12):2751–2765.
134. Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P. & Alt, F.W. (2005) The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438(7067):508–511.
135. Gazumyan, A., Timachova, K., Yuen, G., Siden, E., Di Virgilio, M., Woo, E.M., Chait, B.T., Reina San-Martin, B., Nussenzweig, M.C. & McBride, K.M. (2011) Amino-terminal phosphorylation of activation-induced cytidine deaminase suppresses c-myc/IgH translocation. *Mol Cell Biol* 31(3):442–449.
136. McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Schwickert, T.A., Chait, B.T. & Nussenzweig, M.C. (2008) Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J Exp Med* 205(11):2585–2594.
137. Pham, P., Smolka, M.B., Calabrese, P., Landolph, A., Zhang, K., Zhou, H. & Goodman, M.F. (2008) Impact of phosphorylation and phosphorylation-null mutants on the activity and deamination specificity of activation-induced cytidine deaminase. *J Biol Chem* 283(25):17428–17439.
138. Gazumyan, A., Bothmer, A., Klein, I.A., Nussenzweig, M.C. & McBride, K.M. (2012) Activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification and chromosome translocation. *Adv Cancer Res* 113:167–190.
139. Pasqualucci, L., Kitaura, Y., Gu, H. & Dalla-Favera, R. (2006) PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(2):395–400.
140. Chaudhuri, J., Khuong, C. & Alt, F.W. (2004) Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 430(7003):992–998.
141. Cheng, H.L., Vuong, B.Q., Basu, U., Franklin, A., Schwer, B., Astarita, J., Phan, R.T., Datta, A., Manis, J., Alt, F.W. *et al.* (2009) Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(8):2717–2722.
142. Takizawa, M., Tolarova, H., Li, Z., Dubois, W., Lim, S., Callen, E., Franco, S., Mosaico, M., Feigenbaum, L., Alt, F.W. *et al.* (2008) AID expression levels determine the extent of cMyc oncogenic translocations and the incidence of B cell tumor development. *J Exp Med* 205(9):1949–1957.
143. Peters, A. & Storb, U. (1996) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 4(1):57–65.
144. Fukita, Y., Jacobs, H. & Rajewsky, K. (1998) Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 9(1):105–114.
145. Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M. & Olsson, C. (2001) Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol* 166(8):5051–5057.
146. Rajagopal, D., Maul, R.W., Ghosh, A., Chakraborty, T., Khamlichi, A.A., Sen, R. & Gearhart, P.J. (2009) Immunoglobulin switch mu sequence causes RNA

- polymerase II accumulation and reduces dA hypermutation. *J Exp Med* 206(6):1237–1244.
147. Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V. *et al.* (2010) Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 143(1):122–133.
 148. Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y. & Shimizu, A. (2003) Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302(5653):2137–2140.
 149. Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E. & Alt, F.W. (2003) Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422(6933):726–730.
 150. Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H.W., Robbiani, D.F., McBride, K., Nussenzweig, M.C. & Casellas, R. (2011) Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nat Immunol* 12(1):62–69.
 151. Vuong, B.Q., Lee, M., Kabir, S., Irimia, C., Macchiarulo, S., McKnight, G.S. & Chaudhuri, J. (2009) Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination. *Nat Immunol* 10(4):420–426.
 152. Nowak, U., Matthews, A.J., Zheng, S. & Chaudhuri, J. (2011) The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat Immunol* 12(2):160–166.
 153. Xu, Z., Fulop, Z., Wu, G., Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., Thomas, L.M., Al-Qahtani, A., White, C.A., Park, S.R. *et al.* (2010) 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination. *Nat Struct Mol Biol* 17(9):1124–1135.
 154. Staszewski, O., Baker, R.E., Ucher, A.J., Martier, R., Stavnezer, J. & Guikema, J.E. (2011) Activation-induced cytidine deaminase induces reproducible DNA breaks at many non-Ig Loci in activated B cells. *Mol Cell* 41(2):232–242.
 155. Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X. & Storb, U. (1998) Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280(5370):1750–1752.
 156. Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K. *et al.* (1998) BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(20):11816–11821.
 157. Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A. *et al.* (2008) AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135(6):1028–1038.
 158. Muschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K. & Kuppers, R. (2000) Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med* 192(12):1833–1840.
 159. Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H. & Schatz, D.G. (2008) Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451(7180):841–845.
 160. Robbiani, D.F. & Nussenzweig, M.C. (2012) Chromosome Translocation, B Cell Lymphoma, and Activation-induced Cytidine Deaminase. *Annu Rev Pathol*
 161. Schmitz, R., Young, R.M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Buras, E. *et al.* (2012) Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490(7418):116–120.
 162. Dalla-Favera, R., Martinotti, S., Gallo, R.C., Erikson, J. & Croce, C.M. (1983) Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science* 219(4587):963–967.

163. Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. & Leder, P. (1982) Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(24):7837–7841.
164. Dorsett, Y., Robbiani, D.F., Jankovic, M., Reina-San-Martin, B., Eisenreich, T.R. & Nussenzweig, M.C. (2007) A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* 204(9):2225–2232.
165. Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M.C. (2004) AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118(4):431–438.
166. Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R.L., Lewis, S.M., Molinie, B., Ho, Y.J., Myers, D.R., Choi, V.W., Compagno, M., Malkin, D.J. *et al.* (2011) Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell* 147(1):107–119.
167. Klein, I.A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., Nakahashi, H., Di Virgilio, M., Bothmer, A., Nussenzweig, A., Robbiani, D.F. *et al.* (2011) Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* 147(1):95–106.
168. Bachl, J., Ertongur, I. & Jungnickel, B. (2006) Involvement of Rad18 in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(32):12081–12086.
169. Arakawa, H., Moldovan, G.L., Saribasak, H., Saribasak, N.N., Jentsch, S. & Buerstedde, J.M. (2006) A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* 4(11):e366.
170. Langerak, P., Nygren, A.O., Krijger, P.H., van den Berk, P.C. & Jacobs, H. (2007) A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J Exp Med* 204(8):1989–1998.
171. Roa, S., Avdievich, E., Peled, J.U., Maccarthy, T., Werling, U., Kuang, F.L., Kan, R., Zhao, C., Bergman, A., Cohen, P.E. *et al.* (2008) Ubiquitylated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class-switch recombination and is required for meiotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(42):16248–16253.
172. Moldovan, G.L., Pfander, B. & Jentsch, S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129(4):665–679.
173. Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419(6903):135–141.
174. Stelter, P. & Ulrich, H.D. (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425(6954):188–191.
175. Zhang, H. & Lawrence, C.W. (2005) The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(44):15954–15959.
176. Thompson, L.H. & Schild, D. (2001) Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* 477(1-2):131–153.
177. Pfeiffer, P., Goedecke, W. & Obe, G. (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15(4):289–302.
178. Heyer, W.D., Ehmsen, K.T. & Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 44:113–139.
179. Hasham, M.G., Donghia, N.M., Coffey, E., Maynard, J., Snow, K.J., Ames, J., Wilpan, R.Y., He, Y., King, B.L. & Mills, K.D. (2010) Widespread genomic breaks generated by activation-induced cytidine deaminase are prevented by homologous recombination. *Nat Immunol* 11(9):820–826.
180. Hasham, M.G., Snow, K.J., Donghia, N.M., Branca, J.A., Lessard, M.D., Stavnezer, J., Shopland, L.S. & Mills, K.D. (2012) Activation-induced cytidine deaminase-initiated off-target DNA breaks are detected and resolved during S phase. *J Immunol* 189(5):2374–2382.

181. Manis, J.P., Dudley, D., Kaylor, L. & Alt, F.W. (2002) IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity* 16(4):607–617.
182. Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K. *et al.* (1998) Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J* 17(8):2404–2411.
183. Ira, G., Pellicioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M. *et al.* (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431(7011):1011–1017.
184. Aylon, Y., Liefshitz, B. & Kupiec, M. (2004) The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* 23(24):4868–4875.
185. Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J. & Jackson, S.P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8(1):37–45.
186. Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewska, J., Syljuasen, R.G., Lundin, C., Bartek, J. & Helleday, T. (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 7(2):195–201.
187. Sleeth, K.M., Sorensen, C.S., Issaeva, N., Dziegielewska, J., Bartek, J. & Helleday, T. (2007) RPA mediates recombination repair during replication stress and is displaced from DNA by checkpoint signalling in human cells. *J Mol Biol* 373(1):38–47.
188. Bahassi, E.M., Ovesen, J.L., Riesenberger, A.L., Bernstein, W.Z., Hasty, P.E. & Stambrook, P.J. (2008) The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* 27(28):3977–3985.
189. Lazzaro, F., Giannattasio, M., Puddu, F., Granata, M., Pellicioli, A., Plevani, P. & Muzi-Falconi, M. (2009) Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst)* 8(9):1055–1067.
190. Warmerdam, D.O. & Kanaar, R. (2010) Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704(1):2–11.
191. Gould, K.L. & Nurse, P. (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342(6245):39–45.
192. McGowan, C.H. & Russell, P. (1993) Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J* 12(1):75–85.
193. Nurse, P. (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100(1):71–78.
194. Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P. & Doree, M. (1991) Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351(6323):242–245.
195. Boutros, R., Dozier, C. & Ducommun, B. (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current opinion in cell biology* 18(2):185–191.
196. Matsuoka, S., Huang, M. & Elledge, S.J. (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282(5395):1893–1897.
197. Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A. *et al.* (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14(12):1448–1459.
198. Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A.H., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., Fesik, S. & Zhang, H. (2003) Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 278(24):21767–21773.
199. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H. & Elledge, S.J. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals:

- linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277(5331):1497–1501.
200. Melixetian, M., Klein, D.K., Sorensen, C.S. & Helin, K. (2009) NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol* 11(10):1247–1253.
 201. Chen, Z., Xiao, Z., Chen, J., Ng, S.C., Sowin, T., Sham, H., Rosenberg, S., Fesik, S. & Zhang, H. (2003) Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *Mol Cancer Ther* 2(6):543–548.
 202. Durkin, S.G., Arlt, M.F., Howlett, N.G. & Glover, T.W. (2006) Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. *Oncogene* 25(32):4381–4388.
 203. Syljuasen, R.G., Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J. & Bartek, J. (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 25(9):3553–3562.
 204. Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J. *et al.* (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278(17):14806–14811.
 205. Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J. & Lukas, J. (2003) Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3(3):247–258.
 206. Choi, J.H., Lindsey-Boltz, L.A., Kemp, M., Mason, A.C., Wold, M.S. & Sancar, A. (2010) Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(31):13660–13665.
 207. Wang, X., Zou, L., Zheng, H., Wei, Q., Elledge, S.J. & Li, L. (2003) Genomic instability and endoreduplication triggered by RAD17 deletion. *Genes Dev* 17(8):965–970.
 208. Zou, L., Cortez, D. & Elledge, S.J. (2002) Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* 16(2):198–208.
 209. Zou, L., Liu, D. & Elledge, S.J. (2003) Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(24):13827–13832.
 210. Weiss, R.S., Matsuoka, S., Elledge, S.J. & Leder, P. (2002) Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway. *Curr Biol* 12(1):73–77.
 211. Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H. & Brody, L.C. (2002) BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30(3):285–289.
 212. Yarden, R.I., Metsuyanin, S., Pickholtz, I., Shabbeer, S., Tellio, H. & Papa, M.Z. (2012) BRCA1-dependent Chk1 phosphorylation triggers partial chromatin disassociation of phosphorylated Chk1 and facilitates S-phase cell cycle arrest. *Int J Biochem Cell Biol* 44(11):1761–1769.
 213. Yamane, K., Chen, J. & Kinsella, T.J. (2003) Both DNA topoisomerase II-binding protein 1 and BRCA1 regulate the G2-M cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 63(12):3049–3053.
 214. Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M. & Elledge, S.J. (2003) MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421(6926):961–966.
 215. Chini, C.C. & Chen, J. (2003) Human claspin is required for replication checkpoint control. *J Biol Chem* 278(32):30057–30062.
 216. Zhao, H. & Piwnicka-Worms, H. (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 21(13):4129–4139.

217. Smits, V.A., Reaper, P.M. & Jackson, S.P. (2006) Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol* 16(2):150–159.
218. Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H. & Nakanishi, M. (2008) Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* 132(2):221–232.
219. Groth, A., Lukas, J., Nigg, E.A., Sillje, H.H., Wernstedt, C., Bartek, J. & Hansen, K. (2003) Human Toslled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J* 22(7):1676–1687.
220. Peddibhotla, S., Wei, Z., Papineni, R., Lam, M.H., Rosen, J.M. & Zhang, P. (2011) The DNA damage effector Chk1 kinase regulates Cdc14B nucleolar shuttling during cell cycle progression. *Cell Cycle* 10(4):671–679.
221. Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A. & Pagano, M. (2008) The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* 134(2):256–267.
222. Lee, J., Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (2001) Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell* 12(3):551–563.
223. Wang, J., Han, X., Feng, X., Wang, Z. & Zhang, Y. (2012) Coupling cellular localization and function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in checkpoints and cell viability. *J Biol Chem* 287(30):25501–25509.
224. Bourke, E., Dodson, H., Merdes, A., Cuffe, L., Zachos, G., Walker, M., Gillespie, D. & Morrison, C.G. (2007) DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep* 8(6):603–609.
225. Loffler, H., Bochtler, T., Fritz, B., Tews, B., Ho, A.D., Lukas, J., Bartek, J. & Kramer, A. (2007) DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function. *Cell Cycle* 6(20):2541–2548.
226. Loffler, H., Fechter, A., Liu, F.Y., Poppelreuther, S. & Kramer, A. (2012) DNA damage-induced centrosome amplification occurs via excessive formation of centriolar satellites. *Oncogene*
227. Loffler, H., Lukas, J., Bartek, J. & Kramer, A. (2006) Structure meets function—centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. *Exp Cell Res* 312(14):2633–2640.
228. Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. & Kroemer, G. (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(6):385–392.
229. Hut, H.M., Lemstra, W., Blaauw, E.H., Van Cappellen, G.W., Kampinga, H.H. & Sibon, O.C. (2003) Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol Biol Cell* 14(5):1993–2004.
230. Sibon, O.C., Kelkar, A., Lemstra, W. & Theurkauf, W.E. (2000) DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in Drosophila embryos. *Nat Cell Biol* 2(2):90–95.
231. Zachos, G., Black, E.J., Walker, M., Scott, M.T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C. & Gillespie, D.A. (2007) Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* 12(2):247–260.
232. Bharadwaj, R. & Yu, H. (2004) The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 23(11):2016–2027.
233. Lu, X., Nannenga, B. & Donehower, L.A. (2005) PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev* 19(10):1162–1174.
234. Leung-Pineda, V., Huh, J. & Piwnicka-Worms, H. (2009) DDB1 targets Chk1 to the Cul4 E3 ligase complex in normal cycling cells and in cells experiencing replication stress. *Cancer Res* 69(6):2630–2637.
235. Zhang, Y.W., Brognard, J., Coughlin, C., You, Z., Dolled-Filhart, M., Aslanian, A., Manning, G., Abraham, R.T. & Hunter, T. (2009) The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress. *Mol Cell* 35(4):442–453.
236. Ranuncolo, S.M., Polo, J.M., Dierov, J., Singer, M., Kuo, T., Grealley, J., Green, R., Carroll, M. & Melnick, A. (2007) Bcl-6 mediates the germinal center B cell

- phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 8(7):705–714.
237. Ranuncolo, S.M., Polo, J.M. & Melnick, A. (2008) BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Mol Dis* 41(1):95–99.
 238. Phan, R.T. & Dalla-Favera, R. (2004) The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432(7017):635–639.
 239. Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H. & Dalla-Favera, R. (2005) BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 6(10):1054–1060.
 240. Basso, K. & Dalla-Favera, R. (2010) BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* 105:193–210.
 241. Phan, R.T., Saito, M., Kitagawa, Y., Means, A.R. & Dalla-Favera, R. (2007) Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells. *Nat Immunol* 8(10):1132–1139.
 242. Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L. & Dalla-Favera, R. (2007) A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* 12(3):280–292.
 243. Leung-Pineda, V., Ryan, C.E. & Piwnicka-Worms, H. (2006) Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol Cell Biol* 26(20):7529–7538.
 244. Gourzi, P., Leonova, T. & Papavasiliou, F.N. (2006) A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity* 24(6):779–786.
 245. Bi, X., Barkley, L.R., Slater, D.M., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Ohmori, H. & Vaziri, C. (2006) Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Mol Cell Biol* 26(9):3527–3540.
 246. Yang, X.H., Shiotani, B., Classon, M. & Zou, L. (2008) Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev* 22(9):1147–1152.
 247. Lambert, S., Mizuno, K., Blaisonneau, J., Martineau, S., Chanet, R., Fréon, K., Murray, J.M., Carr, A.M. & Baldacci, G. (2010) Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Molecular cell* 39(3):346–359.
 248. Vanoli, F., Fumasoni, M., Szakal, B., Maloisel, L. & Branzei, D. (2010) Replication and recombination factors contributing to recombination-dependent bypass of DNA lesions by template switch. *PLoS Genet* 6(11):e1001205.
 249. San Filippo, J., Chi, P., Sehorn, M.G., Etchin, J., Krejci, L. & Sung, P. (2006) Recombination mediator and Rad51 targeting activities of a human BRCA2 polypeptide. *J Biol Chem* 281(17):11649–11657.
 250. Mimitou, E.P. & Symington, L.S. (2009) DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* 8(9):983–995.
 251. Sugiyama, T., Zaitseva, E.M. & Kowalczykowski, S.C. (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem* 272(12):7940–7945.
 252. Shinohara, A. & Ogawa, T. (1998) Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* 391(6665):404–407.
 253. Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S. & Ogawa, T. (1998) Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells* 3(3):145–156.
 254. Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Fukushima, T., Morrison, C., Albala, J.S., Swagemakers, S.M., Kanaar, R., Thompson, L.H. & Takeda, S. (2000) The

- Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 20(17):6476–6482.
255. Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H. & Takeda, S. (2001) Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* 21(8):2858–2866.
256. Sung, P. (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 265(5176):1241–1243.
257. Sung, P. & Robberson, D.L. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* 82(3):453–461.
258. Kim, H. & D'Andrea, A.D. (2012) Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev* 26(13):1393–1408.
259. Schwab, R.A., Blackford, A.N. & Niedzwiedz, W. (2010) ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. *EMBO J* 29(4):806–818.
260. Collis, S.J., Ciccia, A., Deans, A.J., Horejsi, Z., Martin, J.S., Maslen, S.L., Skehel, J.M., Elledge, S.J., West, S.C. & Boulton, S.J. (2008) FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Mol Cell* 32(3):313–324.
261. Wang, X., Kennedy, R.D., Ray, K., Stuckert, P., Ellenberger, T. & D'Andrea, A.D. (2007) Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol* 27(8):3098–3108.
262. Guervilly, J.H., Mace-Aime, G. & Rosselli, F. (2008) Loss of CHK1 function impedes DNA damage-induced FANCD2 monoubiquitination but normalizes the abnormal G2 arrest in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet* 17(5):679–689.
263. Adamo, A., Collis, S.J., Adelman, C.A., Silva, N., Horejsi, Z., Ward, J.D., Martinez-Perez, E., Boulton, S.J. & La Volpe, A. (2010) Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. *Mol Cell* 39(1):25–35.
264. Pace, P., Mosedale, G., Hodskinson, M.R., Rosado, I.V., Sivasubramaniam, M. & Patel, K.J. (2010) Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science* 329(5988):219–223.
265. Wang, H., Hu, B., Liu, R. & Wang, Y. (2005) CHK1 affecting cell radiosensitivity is independent of non-homologous end joining. *Cell Cycle* 4(2):300–303.
266. Goudelock, D.M., Jiang, K., Pereira, E., Russell, B. & Sanchez, Y. (2003) Regulatory interactions between the checkpoint kinase Chk1 and the proteins of the DNA-dependent protein kinase complex. *J Biol Chem* 278(32):29940–29947.
267. Bachl, J. & Olsson, C. (1999) Hypermutation targets a green fluorescent protein-encoding transgene in the presence of immunoglobulin enhancers. *Eur J Immunol* 29(4):1383–1389.
268. Ruckerl, F., Busse, B. & Bachl, J. (2006) Episomal vectors to monitor and induce somatic hypermutation in human Burkitt-Lymphoma cell lines. *Mol Immunol* 43(10):1645–1652.
269. Scheller, H., Tobollik, S., Kutzera, A., Eder, M., Unterlehberg, J., Pfeil, I. & Jungnickel, B. (2010) c-Myc overexpression promotes a germinal center-like program in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 29(6):888–897.
270. Braunschmidt, K. (2010) Die Rolle von p53 während der Keimzentrumsreaktion. *Doktorarbeit*
271. Epstein, M.A., Achong, B.G. & Barr, Y.M. (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1(7335):702–703.
272. Gabay, C., Ben-Bassat, H., Schlesinger, M. & Laskov, R. (1999) Somatic mutations and intraclonal variations in the rearranged V κ genes of B-non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Eur J Haematol* 63(3):180–191.

273. Zhao, B., Bower, M.J., McDevitt, P.J., Zhao, H., Davis, S.T., Johanson, K.O., Green, S.M., Concha, N.O. & Zhou, B.B. (2002) Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *J Biol Chem* 277(48):46609–46615.
274. Teng, M., Zhu, J., Johnson, M.D., Chen, P., Kornmann, J., Chen, E., Blasina, A., Register, J., Anderes, K., Rogers, C. *et al.* (2007) Structure-based design and synthesis of (5-arylamino-2H-pyrazol-3-yl)-biphenyl-2',4'-diols as novel and potent human CHK1 inhibitors. *J Med Chem* 50(22):5253–5256.
275. Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T. (2002) Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). *Oncogene* 21(11):1727–1738.
276. Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A. & Yaffe, M.B. (2007) p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 11(2):175–189.
277. Cole, K.A., Huggins, J., Laquaglia, M., Hulderman, C.E., Russell, M.R., Bosse, K., Diskin, S.J., Attiyeh, E.F., Sennett, R., Norris, G. *et al.* (2011) RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(8):3336–3341.
278. Davari, K. (2011) Untersuchungen zur Rolle der Checkpointkinasen 1 und 2 in der Immunglobulindiversifizierung. *Diplomarbeit*
279. Ruckerl, F. (2005) Funktionelle Analyse der Induktion von somatischer Hypermutation durch die aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID). *Doktorarbeit*
280. Goyenechea, B., Klix, N., Yelamos, J., Williams, G.T., Riddell, A., Neuberger, M.S. & Milstein, C. (1997) Cells strongly expressing Ig(kappa) transgenes show clonal recruitment of hypermutation: a role for both MAR and the enhancers. *EMBO J* 16(13):3987–3994.
281. Klix, N., Jolly, C.J., Davies, S.L., Bruggemann, M., Williams, G.T. & Neuberger, M.S. (1998) Multiple sequences from downstream of the J kappa cluster can combine to recruit somatic hypermutation to a heterologous, upstream mutation domain. *Eur J Immunol* 28(1):317–326.
282. Koniaras, K., Cuddihy, A.R., Christopoulos, H., Hogg, A. & O'Connell, M.J. (2001) Inhibition of Chk1-dependent G2 DNA damage checkpoint radiosensitizes p53 mutant human cells. *Oncogene* 20(51):7453–7463.
283. Bhonde, M.R., Hanski, M.L., Magrini, R., Moorthy, D., Muller, A., Sausville, E.A., Kohno, K., Wiegand, P., Daniel, P.T., Zeitz, M. *et al.* (2005) The broad-range cyclin-dependent kinase inhibitor UCN-01 induces apoptosis in colon carcinoma cells through transcriptional suppression of the Bcl-x(L) protein. *Oncogene* 24(1):148–156.
284. Farrell, P.J., Allan, G.J., Shanahan, F., Vousden, K.H. & Crook, T. (1991) p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J* 10(10):2879–2887.
285. Duthu, A., Debuire, B., Romano, J., Ehrhart, J.C., Fiscella, M., May, E., Appella, E. & May, P. (1992) p53 mutations in Raji cells: characterization and localization relative to other Burkitt's lymphomas. *Oncogene* 7(11):2161–2167.
286. Pan, Y. & Haines, D.S. (2000) Identification of a tumor-derived p53 mutant with novel transactivating selectivity. *Oncogene* 19(27):3095–3100.
287. Allen, D., Cumano, A., Dildrop, R., Kocks, C., Rajewsky, K., Rajewsky, N., Roes, J., Sablitzky, F. & Siekevitz, M. (1987) Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development. *Immunol Rev* 96:5–22.
288. Wang, C.L. & Wabl, M. (2005) Hypermutation rate normalized by chronological time. *J Immunol* 174(9):5650–5654.
289. Lyons, A.B. & Parish, C.R. (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171(1):131–137.

290. Quah, B.J., Warren, H.S. & Parish, C.R. (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2(9):2049–2056.
291. Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J.J., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A. & Dalla-Favera, R. (2003) Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(5):2639–2644.
292. Wu, X., Tschumper, R.C., Gutierrez, A.J., Mihalcik, S.A., Nowakowski, G.S. & Jelinek, D.F. (2010) Selective induction of DNA repair pathways in human B cells activated by CD4+ T cells. *PLoS One* 5(12):e15549.
293. Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J. & Liu, Y.J. (1996) Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med* 183(3):971–977.
294. Schattner, E.J., Elkon, K.B., Yoo, D.H., Tumang, J., Krammer, P.H., Crow, M.K. & Friedman, S.M. (1995) CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med* 182(5):1557–1565.
295. Kraal, G., Weissman, I.L. & Butcher, E.C. (1982) Germinal centre B cells: antigen specificity and changes in heavy chain class expression. *Nature* 298(5872):377–379.
296. Butcher, E.C., Rouse, R.V., Coffman, R.L., Nottenburg, C.N., Hardy, R.R. & Weissman, I.L. (1982) Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J Immunol* 129(6):2698–2707.
297. Jacob, J., Przylepa, J., Miller, C. & Kelsoe, G. (1993) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp Med* 178(4):1293–1307.
298. Menendez, D., Inga, A. & Resnick, M.A. (2009) The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* 9(10):724–737.
299. Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14(3):289–300.
300. Lam, M.H., Liu, Q., Elledge, S.J. & Rosen, J.M. (2004) Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* 6(1):45–59.
301. Zaugg, K., Su, Y.W., Reilly, P.T., Moolani, Y., Cheung, C.C., Hakem, R., Hirao, A., Liu, Q., Elledge, S.J. & Mak, T.W. (2007) Cross-talk between Chk1 and Chk2 in double-mutant thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(10):3805–3810.
302. Greenow, K.R., Clarke, A.R. & Jones, R.H. (2009) Chk1 deficiency in the mouse small intestine results in p53-independent crypt death and subsequent intestinal compensation. *Oncogene* 28(11):1443–1453.
303. Zachos, G., Rainey, M.D. & Gillespie, D.A. (2003) Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J* 22(3):713–723.
304. Baba, T.W. & Humphries, E.H. (1985) Formation of a transformed follicle is necessary but not sufficient for development of an avian leukosis virus-induced lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(1):213–216.
305. Cooper, M.D., Payne, L.N., Dent, P.B., Burmester, B.R. & Good, R.A. (1968) Pathogenesis of avian lymphoid leukosis. I. Histogenesis. *J Natl Cancer Inst* 41(2):373–378.
306. Schubach, W. & Groudine, M. (1984) Alteration of c-myc chromatin structure by avian leukosis virus integration. *Nature* 307(5953):702–708.
307. Baba, T.W., Giroir, B.P. & Humphries, E.H. (1985) Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144(1):139–151.
308. Hayward, W.S., Neel, B.G. & Astrin, S.M. (1981) Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290(5806):475–480.

309. Thompson, C.B., Humphries, E.H., Carlson, L.M., Chen, C.L. & Neiman, P.E. (1987) The effect of alterations in myc gene expression on B cell development in the bursa of Fabricius. *Cell* 51(3):371–381.
310. Buerstedde, J.M., Reynaud, C.A., Humphries, E.H., Olson, W., Ewert, D.L. & Weill, J.C. (1990) Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *EMBO J* 9(3):921–927.
311. Kim, S., Humphries, E.H., Tjoelker, L., Carlson, L. & Thompson, C.B. (1990) Ongoing diversification of the rearranged immunoglobulin light-chain gene in a bursal lymphoma cell line. *Mol Cell Biol* 10(6):3224–3231.
312. Buerstedde, J.M. & Arakawa, H. (2006) Immunoglobulin gene conversion or hypermutation: that's the question. *Subcell Biochem* 40:11–24.
313. Arakawa, H., Lodygin, D. & Buerstedde, J.M. (2001) Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnol* 1:7.
314. Buerstedde, J.M. & Takeda, S. (1991) Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67(1):179–188.
315. Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y. & Takeda, S. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 17(2):598–608.
316. Chang, H. & Delany, M.E. (2004) Karyotype stability of the DT40 chicken B cell line: macrochromosome variation and cytogenetic mosaicism. *Chromosome Res* 12(3):299–307.
317. Neiman, P.E., Burnside, J., Elsaesser, K., Hwang, H., Clurman, B.E., Kimmel, R. & Delrow, J. (2006) Analysis of gene expression, copy number and palindrome formation with a Dt40 enriched cDNA microarray. *Subcell Biochem* 40:245–256.
318. Fichtinger-Schepman, A.M., van der Veer, J.L., den Hartog, J.H., Lohman, P.H. & Reedijk, J. (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24(3):707–713.
319. Deans, A.J. & West, S.C. (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 11(7):467–480.
320. Beranek, D.T., Weis, C.C. & Swenson, D.H. (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis* 1(7):595–606.
321. Nikolova, T., Ensminger, M., Lobrich, M. & Kaina, B. (2010) Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst)* 9(10):1050–1063.
322. Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. & Slupphaug, G. (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476(1-2):73–77.
323. Brar, S.S., Watson, M. & Diaz, M. (2004) Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J Biol Chem* 279(25):26395–26401.
324. Jeschke, J. (2011) DNA-Schädigung beeinflusst die Regulation der Aktivierungsinduzierten Cytidin-Deaminase. *Doktorarbeit*
325. Mac Carthy, T., Roa, S., Scharff, M.D. & Bergman, A. (2009) SHMTool: a webserver for comparative analysis of somatic hypermutation datasets. *DNA Repair (Amst)* 8(1):137–141.
326. Pérez-Durán, P., Belver, L., de Yébenes, V.G., Delgado, P., Pisano, D.G. & Ramiro, A.R. (2012) UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *J Exp Med* 209(7):1379–1389.
327. Denepoux, S., Razanajaona, D., Blanchard, D., Meffre, G., Capra, J.D., Banchereau, J. & Lebecque, S. (1997) Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity* 6(1):35–46.
328. Sale, J.E. & Neuberger, M.S. (1998) TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity* 9(6):859–869.

329. Harris, R.S., Sale, J.E., Petersen-Mahrt, S.K. & Neuberger, M.S. (2002) AID is essential for immunoglobulin V gene conversion in a cultured B cell line. *Curr Biol* 12(5):435–438.
330. Bertolini, L.R., Bertolini, M., Maga, E.A., Madden, K.R. & Murray, J.D. (2009) Increased gene targeting in Ku70 and Xrcc4 transiently deficient human somatic cells. *Mol Biotechnol* 41(2):106–114.
331. Iizumi, S., Kurosawa, A., So, S., Ishii, Y., Chikaraishi, Y., Ishii, A., Koyama, H. & Adachi, N. (2008) Impact of non-homologous end-joining deficiency on random and targeted DNA integration: implications for gene targeting. *Nucleic Acids Res* 36(19):6333–6342.
332. Hamimes, S., Arakawa, H., Stasiak, A.Z., Kierzek, A.M., Hirano, S., Yang, Y.G., Takata, M., Stasiak, A., Buerstedde, J.M. & Van Dyck, E. (2005) RDM1, a novel RNA recognition motif (RRM)-containing protein involved in the cell response to cisplatin in vertebrates. *J Biol Chem* 280(10):9225–9235.
333. Fabre, F., Magana-Schwencke, N. & Chanet, R. (1989) Isolation of the RAD18 gene of *Saccharomyces cerevisiae* and construction of rad18 deletion mutants. *Mol Gen Genet* 215(3):425–430.
334. Takao, N., Kato, H., Mori, R., Morrison, C., Sonada, E., Sun, X., Shimizu, H., Yoshioka, K., Takeda, S. & Yamamoto, K. (1999) Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 18(50):7002–7009.
335. Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M. & Enomoto, T. (2004) The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochim Biophys Acta* 1688(2):137–144.
336. Yamamoto, K., Ishiai, M., Matsushita, N., Arakawa, H., Lamerdin, J.E., Buerstedde, J.M., Tanimoto, M., Harada, M., Thompson, L.H. & Takata, M. (2003) Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 23(15):5421–5430.
337. Niedzwiedz, W., Mosedale, G., Johnson, M., Ong, C.Y., Pace, P. & Patel, K.J. (2004) The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol Cell* 15(4):607–620.
338. Arakawa, H. & Buerstedde, J.M. (2009) Activation-induced cytidine deaminase-mediated hypermutation in the DT40 cell line. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1517):639–644.
339. Longerich, S., Orelli, B.J., Martin, R.W., Bishop, D.K. & Storb, U. (2008) Brca1 in immunoglobulin gene conversion and somatic hypermutation. *DNA Repair (Amst)* 7(2):253–266.
340. Szuts, D., Simpson, L.J., Kabani, S., Yamazoe, M. & Sale, J.E. (2006) Role for RAD18 in homologous recombination in DT40 cells. *Mol Cell Biol* 26(21):8032–8041.
341. Odegard, V.H. & Schatz, D.G. (2006) Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 6(8):573–583.
342. Adhikary, S. & Eilers, M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):635–645.
343. Dominguez-Sola, D., Victoria, G.D., Ying, C.Y., Phan, R.T., Saito, M., Nussenzweig, M.C. & Dalla-Favera, R. (2012) The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol* 13(11):1083–1091.
344. Calado, D.P., Sasaki, Y., Godinho, S.A., Pellerin, A., Kochert, K., Sleckman, B.P., de Alboran, I.M., Janz, M., Rodig, S. & Rajewsky, K. (2012) The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol* 13(11):1092–1100.
345. Høglund, A., Nilsson, L.M., Muralidharan, S.V., Hasvold, L.A., Merta, P., Rudelius, M., Nikolova, V., Keller, U. & Nilsson, J.A. (2011) Therapeutic

- implications for the induced levels of Chk1 in Myc-expressing cancer cells. *Clin Cancer Res* 17(22):7067–7079.
346. Ferrao, P.T., Bukczynska, E.P., Johnstone, R.W. & McArthur, G.A. (2012) Efficacy of CHK inhibitors as single agents in MYC-driven lymphoma cells. *Oncogene* 31(13):1661–1672.
347. Tort, F., Hernandez, S., Bea, S., Camacho, E., Fernandez, V., Esteller, M., Fraga, M.F., Burek, C., Rosenwald, A., Hernandez, L. *et al.* (2005) Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* 19(1):112–117.
348. Cattoretti, G., Pasqualucci, L., Ballon, G., Tam, W., Nandula, S.V., Shen, Q., Mo, T., Murty, V.V. & Dalla-Favera, R. (2005) Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* 7(5):445–455.
349. Shaffer, A.L.r., Young, R.M. & Staudt, L.M. (2012) Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* 30:565–610.
350. Bree, R.T., Lai, X.Y., Canavan, L.E. & Lowndes, N.F. (2007) Comparisons between DT40 wildtype and DT40-Cre1 cells as suitable model systems for studying the DNA damage response. *Cell Cycle* 6(18):2310–2313.
351. Chiba, S., Okuda, M., Mussman, J.G. & Fukasawa, K. (2000) Genomic convergence and suppression of centrosome hyperamplification in primary p53-/- cells in prolonged culture. *Exp Cell Res* 258(2):310–321.
352. Warren, M., Lord, C.J., Masabanda, J., Griffin, D. & Ashworth, A. (2003) Phenotypic effects of heterozygosity for a BRCA2 mutation. *Hum Mol Genet* 12(20):2645–2656.
353. Rodriguez, R. & Meuth, M. (2006) Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol Biol Cell* 17(1):402–412.
354. Cho, S.H., Toouli, C.D., Fujii, G.H., Crain, C. & Parry, D. (2005) Chk1 is essential for tumor cell viability following activation of the replication checkpoint. *Cell Cycle* 4(1):131–139.
355. Masuda, K., Ouchida, R., Li, Y., Gao, X., Mori, H. & Wang, J.Y. (2009) A critical role for REV1 in regulating the induction of C:G transitions and A:T mutations during Ig gene hypermutation. *J Immunol* 183(3):1846–1850.
356. Pan-Hammarström, Q., Dai, S., Zhao, Y., van Dijk-Härd, I.F., Gatti, R.A., Børresen-Dale, A.L. & Hammarström, L. (2003) ATM is not required in somatic hypermutation of VH, but is involved in the introduction of mutations in the switch μ region. *J Immunol* 170(7):3707–3716.
357. Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M.C. (2004) ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J Exp Med* 200(9):1103–1110.
358. Ratnam, S., Bozek, G., Nicolae, D. & Storb, U. (2010) The pattern of somatic hypermutation of Ig genes is altered when p53 is inactivated. *Mol Immunol* 47(16):2611–2618.
359. Sui, G., Affar el, B., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N.R., Yin, P., Donohoe, M., Luke, M.P., Calvo, D., Grossman, S.R. *et al.* (2004) Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* 117(7):859–872.
360. Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., Kanei-Ishii, C., Nakai, A., Matsuzawa, S., Reed, J.C. & Ishii, S. (2000) p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* 275(20):15578–15585.
361. Yamazoe, M., Sonoda, E., Hochegger, H. & Takeda, S. (2004) Reverse genetic studies of the DNA damage response in the chicken B lymphocyte line DT40. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9):1175–1185.
362. Wu, X., Darce, J.R., Chang, S.K., Nowakowski, G.S. & Jelinek, D.F. (2008) Alternative splicing regulates activation-induced cytidine deaminase (AID): implications for suppression of AID mutagenic activity in normal and malignant B cells. *Blood* 112(12):4675–4682.

363. Katzenberger, R.J., Marengo, M.S. & Wassarman, D.A. (2006) ATM and ATR pathways signal alternative splicing of *Drosophila* TAF1 pre-mRNA in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 26(24):9256–9267.
364. Beckerman, R., Donner, A.J., Mattia, M., Peart, M.J., Manley, J.L., Espinosa, J.M. & Prives, C. (2009) A role for Chk1 in blocking transcriptional elongation of p21 RNA during the S-phase checkpoint. *Genes Dev* 23(11):1364–1377.
365. Amanchy, R., Periaswamy, B., Mathivanan, S., Reddy, R., Tattikota, S.G. & Pandey, A. (2007) A curated compendium of phosphorylation motifs. *Nat Biotechnol* 25(3):285–286.
366. Hutchins, J.R., Hughes, M. & Clarke, P.R. (2000) Substrate specificity determinants of the checkpoint protein kinase Chk1. *FEBS Lett* 466(1):91–95.
367. Rodriguez, R., Gagou, M.E. & Meuth, M. (2008) Apoptosis induced by replication inhibitors in Chk1-depleted cells is dependent upon the helicase cofactor Cdc45. *Cell Death & Differentiation* 15(5):889–898.
368. Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D.A., Jackson, D.A. & Caldecott, K.W. (2006) Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* 26(8):3319–3326.
369. Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F. *et al.* (1998) DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12(3):343–356.
370. Sale, J.E., Batters, C., Edmunds, C.E., Phillips, L.G., Simpson, L.J. & Szuts, D. (2009) Timing matters: error-prone gap filling and translesion synthesis in immunoglobulin gene hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1517):595–603.
371. Reynaud, C.A., Delbos, F., Faili, A., Gueranger, Q., Aoufouchi, S. & Weill, J.C. (2009) Competitive repair pathways in immunoglobulin gene hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1517):613–619.
372. Ordinario, E.C., Yabuki, M., Larson, R.P. & Maizels, N. (2009) Temporal regulation of Ig gene diversification revealed by single-cell imaging. *J Immunol* 183(7):4545–4553.
373. Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Difilippantonio, M.J., Wilson, P.C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D.R. *et al.* (2001) AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 414(6864):660–665.
374. Schrader, C.E., Guikema, J.E., Linehan, E.K., Selsing, E. & Stavnezer, J. (2007) Activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA breaks in class switch recombination occur during G1 phase of the cell cycle and depend upon mismatch repair. *J Immunol* 179(9):6064–6071.
375. Faili, A., Aoufouchi, S., Gueranger, Q., Zober, C., Leon, A., Bertocci, B., Weill, J.C. & Reynaud, C.A. (2002) AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat Immunol* 3(9):815–821.
376. Sharbeen, G., Yee, C.W., Smith, A.L. & Jolly, C.J. (2012) Ectopic restriction of DNA repair reveals that UNG2 excises AID-induced uracils predominantly or exclusively during G1 phase. *J Exp Med* 209(5):965–974.
377. Chini, C.C., Wood, J. & Chen, J. (2006) Chk1 is required to maintain claspin stability. *Oncogene* 25(30):4165–4171.
378. Zhao, H., Watkins, J.L. & Piwnica-Worms, H. (2002) Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(23):14795–14800.
379. Heffernan, T.P., Unsal-Kacmaz, K., Heinloth, A.N., Simpson, D.A., Paules, R.S., Sancar, A., Cordeiro-Stone, M. & Kaufmann, W.K. (2007) Cdc7-Dbf4 and the human S checkpoint response to UVC. *J Biol Chem* 282(13):9458–9468.
380. Ge, X.Q. & Blow, J.J. (2010) Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J Cell Biol* 191(7):1285–1297.

381. Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I. & Pommier, Y. (2007) The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol* 27(16):5806–5818.
382. Chou, W.C., Wang, H.C., Wong, F.H., Ding, S.L., Wu, P.E., Shieh, S.Y. & Shen, C.Y. (2008) Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. *EMBO J* 27(23):3140–3150.
383. Zan, H., Wu, X., Komori, A., Holloman, W.K. & Casali, P. (2003) AID-dependent generation of resected double-strand DNA breaks and recruitment of Rad52/Rad51 in somatic hypermutation. *Immunity* 18(6):727–738.
384. Yamane, A., Robbiani, D.F., Resch, W., Bothmer, A., Nakahashi, H., Oliveira, T., Rommel, P.C., Brown, E.J., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C. *et al.* (2013) RPA Accumulation during Class Switch Recombination Represents 5'-3' DNA-End Resection during the S-G2/M Phase of the Cell Cycle. *Cell Rep*
385. Bross, L., Wesoly, J., Buerstedde, J., Kanaar, R. & Jacobs, H. (2003) Somatic hypermutation does not require Rad54 and Rad54B-mediated homologous recombination. *Eur J Immunol* 33(2):352–357.
386. Jacobs, H., Fukita, Y., van der Horst, G.T.J., de Boer, J., Weeda, G., Essers, J., de Wind, N., Engelward, B.P., Samson, L. & Verbeek, S. (1998) Hypermutation of immunoglobulin genes in memory B cells of DNA repair-deficient mice. *The J Exp Med* 187(11):1735–1743.
387. Hakim, O., Resch, W., Yamane, A., Klein, I., Kieffer-Kwon, K.R., Jankovic, M., Oliveira, T., Bothmer, A., Voss, T.C., Ansarah-Sobrinho, C. *et al.* (2012) DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature* 484(7392):69–74.
388. Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Kuppers, R. & Dalla-Favera, R. (2001) Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412(6844):341–346.
389. López-Contreras, A.J., Gutierrez-Martinez, P., Specks, J., Rodrigo-Perez, S. & Fernandez-Capetillo, O. (2012) An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation. *J Exp Med* 209(3):455–461.
390. Stracker, T.H., Usui, T. & Petrini, J.H.J. (2009) Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA repair* 8(9):1047–1054.
391. Silver, D.P., Richardson, A.L., Eklund, A.C., Wang, Z.C., Szallasi, Z., Li, Q., Juul, N., Leong, C.O., Calogrias, D., Buraimoh, A. *et al.* (2010) Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 28(7):1145–1153.
392. Villano, J.L., Seery, T.E. & Bressler, L.R. (2009) Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 64(4):647–655.
393. Wyatt, M.D. & Pittman, D.L. (2006) Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical research in toxicology* 19(12):1580–1594.
394. Hemminki, K., Peltonen, K. & Vodicka, P. (1989) Depurination from DNA of 7-methylguanine, 7-(2-aminoethyl)-guanine and ring-opened 7-methylguanines. *Chem Biol Interact* 70(3-4):289–303.
395. Monks, A., Harris, E.D., Vaigro-Wolff, A., Hose, C.D., Connelly, J.W. & Sausville, E.A. (2000) UCN-01 enhances the in vitro toxicity of clinical agents in human tumor cell lines. *Invest New Drugs* 18(2):95–107.
396. Busby, E.C., Leistriz, D.F., Abraham, R.T., Karnitz, L.M. & Sarkaria, J.N. (2000) The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hChk1. *Cancer Res* 60(8):2108–2112.
397. Graves, P.R., Yu, L., Schwarz, J.K., Gales, J., Sausville, E.A., O'Connor, P.M. & Piwnicka-Worms, H. (2000) The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* 275(8):5600–5605.

398. Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D.M. & Smythe, C. (2001) Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J Cell Biol* 154(5):913–923.
399. Patel, V., Lahusen, T., Leethanakul, C., Igishi, T., Kremer, M., Quintanilla-Martinez, L., Ensley, J.F., Sausville, E.A., Gutkind, J.S. & Senderowicz, A.M. (2002) Antitumor activity of UCN-01 in carcinomas of the head and neck is associated with altered expression of cyclin D3 and p27(KIP1). *Clin Cancer Res* 8(11):3549–3560.
400. Akiyama, T., Yoshida, T., Tsujita, T., Shimizu, M., Mizukami, T., Okabe, M. & Akinaga, S. (1997) G1 phase accumulation induced by UCN-01 is associated with dephosphorylation of Rb and CDK2 proteins as well as induction of CDK inhibitor p21/Cip1/WAF1/Sdi1 in p53-mutated human epidermoid carcinoma A431 cells. *Cancer Res* 57(8):1495–1501.
401. Mack, P.C., Jones, A.A., Gustafsson, M.H., Gandara, D.R., Gumerlock, P.H. & Goldberg, Z. (2004) Enhancement of radiation cytotoxicity by UCN-01 in non-small cell lung carcinoma cells. *Radiation research* 162(6):623–634.
402. Shao, R.-G., Cao, C.-X. & Pommier, Y. (2004) Abrogation of Chk1-mediated S/G2 checkpoint by UCN-01 enhances area-C-induced cytotoxicity in human colon cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 25:756–762.
403. Archie, N.T. & Schwartz, G.K. (2004) Potentiation of cytotoxicity of topoisomerase I poison by concurrent and sequential treatment with the checkpoint inhibitor UCN-01 involves disparate mechanisms resulting in either p53-independent clonogenic suppression or p53-dependent mitotic catastrophe. *Cancer research* 64(18):6635–6644.
404. Li, T., Christensen, S.D., Frankel, P.H., Margolin, K.A., Agarwala, S.S., Luu, T., Mack, P.C., Lara, P.N.J. & Gandara, D.R. (2012) A phase II study of cell cycle inhibitor UCN-01 in patients with metastatic melanoma: a California Cancer Consortium trial. *Invest New Drugs* 30(2):741–748.
405. Zuco, V., Benedetti, V. & Zunino, F. (2010) ATM- and ATR-mediated response to DNA damage induced by a novel camptothecin, ST1968. *Cancer Lett* 292(2):186–196.
406. Scheller, H. (2008) Untersuchungen zur Modulation der somatischen Hypermutation durch Transkriptionsfaktoren. *Doktorarbeit*
407. Pulvertaft, J.V. (1964) Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 1(7327):238–240.
408. Hamlyn, P.H. & Rabbitts, T.H. (1983) Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* 304(5922):135–139.
409. Nawaz, H.M., Blomberg, K.E., Lindvall, J.M., Kurosaki, T. & Smith, C.I. (2008) Expression profiling of chicken DT40 lymphoma cells indicates clonal selection of knockout and gene reconstituted cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377(2):584–588.
410. Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y. & Yoshiki, A. (2009) Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* 58(2):141–149.
411. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Slocombe, P.M. & Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage (D X174 DNA). *Nature* 265:687–695.
412. Arakawa, H. (2006) Excision of floxed-DNA sequences by transient induction of Mer-Cre-Mer. *Subcell Biochem* 40:347–349.
413. Unterlehberg, J. (2008) Untersuchungen zur Proliferation und Hypermutation humaner B-Zelllymphomlinien. *Diplomarbeit*
414. Simpson, L.J. & Sale, J.E. (2006) Colony survival assay. *Subcell Biochem* 40:387–391.

415. Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* (CSHL press)
416. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487–491.
417. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1992) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24:476–480.
418. Arakawa, H. (2006) Target screening by PCR. *Subcell Biochem* 40:353–354.
419. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3):503–517.
420. Southern, E.M., Milner, N. & Mir, K.U. (2008) Discovering antisense reagents by hybridization of RNA. *Oligonucleotides as therapeutic agents* 789:38.
421. Morrison, T.B., Weis, J.J. & Wittwer, C.T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6):954.
422. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. & Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* 10(4):413–417.
423. Rasmussen, R. (2001) Quantification on the LightCycler. *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications Springer Press, Heidelberg* 21–34.
424. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9):e45–e45.
425. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem* 193(1):265–275.
426. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.
427. Raymond, S. & Weintraub, L. (1959) Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130(3377):711.
428. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9):4350–4.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
ALV	Aviäres Leukose Virus
APE	apurinische/apyrimidinische Endonuklease
APOBEC1	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Array-CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> , komparative genomische Hybridisierung
AT	Mutation an A:T-Basenpaar
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>

B

Bach2	<i>BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl6	<i>B-cell CLL/lymphoma 6</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BIC	<i>B-cell integration cluster</i>
Blimp1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein</i>
bp	Basenpaar(e)
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2, early onset</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserum-Albumin

C

C	Cytosin
c-Myc	<i>avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
C-Segment	<i>constant</i> -Segment
ca.	circa
CAG	<i>chicken β-actin</i>
CD	<i>cluster of differentiation antigen</i>
Cdc14B	<i>cell division cycle 14 homolog B</i>
CDC25	<i>cell division cycle 25</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CDR	<i>complementary determining region</i>
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
ChIP	<i>Chromatin Immunprecipitation</i>

Chk1/2	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
CIP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
Cisplatin	<i>Cis-Diamindichloroplatin</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CMV-IE-Enhancer	<i>cytomegalovirus immediate early-Enhancer</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	<i>cyclization recombination</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1 (exportin 1)</i>
CSR	<i>class switch recombination</i>
Cul4A	<i>cullin 4A</i>
CXCR4	CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
D-Segment	<i>diversity-Segment</i>
DDB1	<i>damage-specific DNA binding protein 1</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLBCL	<i>diffuse large B cell lymphoma</i> , diffus großzelliges B-Zelllymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat
DSB	<i>double-strand break</i> , Doppelstrangbruch
DTT	Dithiotreitol
DZ	dunkle Zone des Keimzentrums

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E6,5	Embryonalstadium Tag 6,5
EBV	Epstein Barr Virus
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alterae</i> , und andere
Exo1	<i>exonuclease 1</i>
Exon	<i>expressed region</i>

F

F	Farad
FAAP24	<i>Fanconi anemia-associated protein, 24 kDa</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FANC	<i>Fanconi anemia, complementation group</i>
FANCD2/E/M	<i>Fanconi anemia, complementation group D2/E/M</i>
Fbx6	<i>F-box protein 6</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FKS	fötales Kälberserum

G

G	Guanin
g	Gramm

g	<i>gravitation force</i>
G. Gallus	<i>Gallus gallus</i> (Haushuhn)
G1/2-Phase	<i>gap1/2-Phase</i>
GC	<i>gene conversion</i> , Genkonversion
GKM	Genkonversionsmutationen
GPT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase aus <i>E.coli</i>

H

H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HA-Tag	Haemagglutinin-Tag
HeLa-Zelllinie	Gebärmutterhalskrebszelllinie von Henrietta Lacks
HoxC4	<i>homeobox C4</i>
HR	<i>homologous recombination</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90 kDa</i>
HU	<i>hydroxyurea</i> , Hydroxyharnstoff
Hus1	<i>Hus1 checkpoint homolog</i>

I

i.p.	intraperitoneal
ICL	<i>interstrand crosslinks</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
Intron	<i>intervening sequence</i>
IR	<i>ionising radiation</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
Irf4	<i>interferon regulatory factor 4</i>

J

J-Segment	<i>joining-Segment</i>
-----------	------------------------

K

K	Lysin
K164	Lysin an Position 164
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KZ	Keimzentrum

L

l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth-Medium</i>
loxP	<i>locus of X-over of P1-sites</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LZ	<i>light zone</i> , helle Zone des Keimzentrums

M

M	Molar
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i> (Hausmaus)
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
min	Minute(n)
miRNA	<i>microRNA</i>
MK2	<i>mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>
mM	Millimolar
MMR	<i>mismatch repair</i>
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSH2/6	<i>mutS homolog 2</i>
Mut./bp	Mutationen pro Basenpaar

N

N-Nukleotide	nicht-matrizenkodierte Nukleotide
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
NEK11	<i>NIMA-related kinase 11</i>
NES	nukleäre Exportsequenz
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i>
NKG2D	<i>natural killer group 2, member D</i>
nM	Nanomolar
NP-CGG	4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyliertes Hapten konjugiert mit Hühner- γ -Globulin

O

O ₂	Sauerstoff
OriP	<i>origin of replication</i>

P

P	Phosphorylierung
P-Nukleotide	palindromische Nukleotide
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
p53	<i>tumor suppressor protein p53</i>
Pax5	<i>paired box 5</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDK1	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> , Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
PI	Propidiumiodid
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PM	Punktmutation
PNA	<i>peanut agglutinin</i> , Erdnuss-Agglutinin

Pol	Polymerase
PPM1D	<i>Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform</i>
Ptbp2	<i>polypyrimidine tract binding protein 2</i>

Q

qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
---------	---

R

R	Purin (Adenin oder Guanin)
Rae-1	<i>retinoic acid early inducible-1</i>
RAG1/2	<i>recombination activating gene 1/2</i>
RDM1	<i>Rad52 motif 1</i>
Rek.	rekonstituiert
RFC	<i>replication factor c</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

S

S-Phase	<i>synthesis-Phase</i>
S38A	Serin 38 wurde gegen Asparagin ausgetauscht
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Ser	Serin
SHM	somatische Hypermutation
Spt5	<i>Suppressor of Ty's</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV40	Simian Virus 40

T

T	Thymin
T309A	Threonin an Position 309 wurde gegen Alanin ausgetauscht
Tag	Markierung
TdT	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor, beta</i>
Thr	Threonin
Tlk1	<i>tousled-like kinase 1</i>
TLS	<i>translesion synthesis</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TS	Transitionsmutationen
TV	Transversionsmutationen
Tyr	Tyrosin

U

U	<i>Unit</i>
u.a.	unter anderem
UNG2	<i>uracil DNA glycosylase</i>

UTR *untranslated region*
 UV *ultraviolet radiation*

V

V Volt
 V-Segment *variable*-Segment
 V_H V-Segment der schweren Ig-Kette
 VKRRDS Valin, Lysin, Arginin, Arginin, Asparaginsäure, Serin
 V_L V-Segment der leichten Ig-Kette
 W Adenin oder Thymin

W

WT Wildtyp

X

Xbp1 *x-box binding protein 1*
 XRCC1 *x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*
 XRCC2/3 *x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2/3*

Y

Y Pyrimidin (Cytosin oder Thymin)

Z

z.B. zum Beispiel
 z.T. zum Teil
 ZM zweideutige Mutation
 (M/I/L/V)X(R/K)X (Methionin/Isoleucin/Leucin/Valin) beliebig (Arginin/Lysin) 2x beliebig
 X(S/T) (Serin/Threonin)
 % Prozent
 °C Grad Celsius
 µg Mikrogramm
 µl Mikroliter
 µM Mikromolar
 Ψ Pseudogen

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich allen Personen herzlich, die mir diese Arbeit ermöglicht und zu deren Gelingen beigetragen haben.

Vor allem möchte ich mich bei Prof. Dr. Berit Jungnickel für die Bereitstellung dieses spannenden, fordernden und vielseitigen Themas sowie für ihre sehr gute Betreuung während der gesamten Dissertation herzlich bedanken. Ich bin ihr insbesondere dankbar, dass sie mir eine vollkommen selbstständige Arbeitsweise ermöglicht hat und mir bei experimentellen Schwierigkeiten trotz der räumlichen Entfernung immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppenbesprechungen und die sehr konstruktiven Anregungen zur Weiterentwicklung meines Projekts - auch als Mitglied meines *Thesis Committees*. Des Weiteren möchte ich Dr. Lothar Strobl für die Hilfestellungen bei *in silico*-Analysen bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei PD Dr. Daniel Krappmann und Prof. Dr. Dirk Eick für die überaus nützlichen experimentellen Ratschläge bedanken.

Insbesondere möchte ich Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Angelika Böttger, Prof. Dr. Heinrich Jung, Prof. Dr. Michael Schleicher und PD Dr. Anna Friedl für die Übernahme der Begutachtung herzlich danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. George Zachos für die Bereitstellung der *Chk1-Targeting*-Vektoren sowie bei Dr. Hiroshi Arakawa für die Bereitstellung der plox-Vektoren bedanken.

Ein großer Dank geht an Sabine Fischer-Burkart sowie Katrin Böttcher für die exzellente experimentelle Unterstützung. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Kerstin Braunschmidt für die Einarbeitung in Mausanalysen und die Zellsortierung bedanken. Ich möchte zudem Gabriele Marschall-Schröter und Albert Geishauer für die Immunisierungen der Mäuse danken.

Besonders möchte ich mich bei meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen und Kolleginnen meiner Arbeitsgruppe, der Arbeitsgruppe Strobl sowie der KMOLBI bedanken - vor allem Kathrin Davari und Nils Tomi für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Insbesondere möchte ich mich bei Tanja Seifer und Anne Draeseke bedanken, die mir immer zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Vor allem möchte ich meiner Mutter danken, die mich nicht nur beim Korrekturlesen der Dissertation sondern auch während meines gesamten Studiums fortwährend unterstützt und motiviert hat. Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Mann für seine Unterstützung in jeder Hinsicht während der letzten Jahre bedanken.

Diese Dissertation wurde von April 2009 bis Februar 2013 am Helmholtz Zentrum München im Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

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

München, den 28.02.2013

Samantha Frankenberger

Erklärung

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

München, den 28.02.2013

Samantha Frankenberger