

**Funktion von BOB.1/OBF.1 für  
oktamerabhängige und Immunglobulin-Transkription  
in B-Zellen und Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen**

**und**

**Identifizierung von BOB.1/OBF.1-regulierten Genen**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Helmut Laumen**

aus

Immerath

Würzburg 2004

Eingereicht am: 22.12.2004

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Scheer

Gutachter: Prof. Dr. T. Wirth

Gutachter: Prof. Dr. T. Raabe

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Zusammenfassung

BOB.1/OBF.1 ist ein Lymphozyten-spezifischer transkriptioneller Koaktivator. Er bindet an die Oct1 und Oct2 Transkriptionsfaktoren und verstärkt deren transkriptionelles Potential. Die Untersuchung BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse ergab, dass BOB.1/OBF.1 eine entscheidende Funktion hat in verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien. Überraschenderweise zeigte die Analyse BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse eine weitgehend normale Expression von Genen, welche ein Oktamer-Motiv in ihren regulatorischen Regionen enthalten wie z. B. die Immunglobulingene. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von BOB.1/OBF.1 für oktamerabhängige Transkription in einer aus BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen etablierten B-Zelllinie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Promotoren, die von einem funktionellen Oktamer-Motiv abhängen, gänzlich inaktiv sind in BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen. Mittels eines in diesen Zellen stabil exprimierten, regulierbaren BOB.1/OBF.1-Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass dieser transkriptionelle Defekt eine direkte Folge des Fehlens des Koaktivators BOB.1/OBF.1 ist. Dies gilt für einen synthetischen Oktamer-Promotor-regulierten Reporter ebenso wie für einen Immunglobulin- $\kappa$ -Promoter-regulierten Reporter. Diese Ergebnisse zeigten, dass BOB.1/OBF.1 selbst ein nicht-redundantes Protein in B-Zellen ist und absolut notwendig ist für oktamerabhängige transkriptionelle Aktivität.

Zahlreiche in B-Zellen exprimierte Gene enthalten ein Oktamer-Motiv in ihrer regulatorischen Region, jedoch wurden erst wenige beschrieben, deren Expression von BOB.1/OBF.1 reguliert wird. Um die molekulare Basis der Funktion von BOB.1/OBF.1 für die B-Zellentwicklung zu verstehen, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Methoden nach BOB.1/OBF.1-regulierten Zielgenen gesucht. Mit der cDNA-RDA-Methode konnte MLC1A als ein in präB-Zellen durch BOB.1/OBF.1 indirekt reguliertes Gen identifiziert werden. Affymetrix-Genchip-Experimente identifizierten sowohl durch BOB.1/OBF.1 heraufregulierte Gene, wie Ahd2like, Rbp1, Creg als auch herabregulierte Gene, wie Id3. Eine Klassifizierung der potentiellen Zielgene nach ihrer Funktion legt eine Funktion von BOB.1/OBF.1 nahe für verschiedenen Aspekte der B-Zellphysiologie wie Zellmetabolismus, Zelladhäsion und Zelldifferenzierung. BOB.1/OBF.1 hat also sehr wahrscheinlich eine sehr weitgefächerte Funktion in verschiedenen regulatorischen Mechanismen von B-Zellentwicklung und -funktion.

Das Fehlen von Immunglobulin-Expression in Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) des klassischen Hodgkin-Lymphoms wurde ursprünglich erklärt durch inaktivierende Mutationen im Promotor oder in kodierenden Sequenzen des Gens. Im dritten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HRS-Zellen weder BOB.1/OBF.1 noch Oct2 exprimierte werden. Durch Transfektion von Reportern, die durch Oktamer-Motive oder durch einen Immunglobulin-Promotor reguliert werden, in HRS-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass das Fehlen dieser Proteine sehr wahrscheinlich maßgeblich am Defekt der Immunglobulin-Transkription in HRS-Zellen beteiligt ist.

## Summary

BOB.1/OBF.1 is a lymphocyte-restricted transcriptional coactivator. It binds to the Oct1 and Oct2 transcription factors and increases their transactivation potential. Targeted gene disruption experiments revealed that BOB.1/OBF.1 is critical at different stages of B cell development. Surprisingly, animals deficient for BOB.1/OBF.1 showed virtually normal expression of genes that contain octamer motifs in their regulatory regions, like immunoglobulin genes. In the first part of this work the role of BOB.1/OBF.1 for octamer-dependent transcription in a B cell line established from BOB.1/OBF.1-deficient mice was addressed. We show that promoters exclusively dependent on functional octamer motifs are completely inactive in BOB.1/OBF.1-deficient B cells. To demonstrate directly that the lack of activity is a consequence of lack of the coactivator, we constructed a hormone regulated conditional allele of BOB.1/OBF.1, which was introduced into the BOB.1/OBF.1-deficient B cells. This resulted in the hormone-dependent transcriptional activity of octamer-dependent reporters in these cells. The BOB.1/OBF.1 requirement for octamer promoter function was also observed when an authentic immunoglobulin  $\kappa$ -promoter was assayed. Thus, these results demonstrate that BOB.1/OBF.1 itself is a non-redundant protein in B cells and absolutely required for octamer-dependent transcriptional activity.

A large number of genes expressed in B cells contain octamer motifs in their regulatory regions. However, only few genes have been described so far whose expression is dependent on BOB.1/OBF.1. To understand the molecular basis of BOB.1/OBF.1 function in B cell development we searched for BOB.1/OBF.1 target genes by different screening methods, in the second part of this work. Using the cDNA-RDA method MLC1A could be identified as a gene indirectly regulated by BOB.1/OBF.1 in preB cells. Genechip experiments identified genes induced by BOB.1/OBF.1, like *Ahd2like*, *Rbp1*, *Creg*, and genes repressed by BOB.1/OBF.1, like *Id3*. Classification of BOB.1/OBF.1 target genes by function suggests that they affect various aspects of B cell physiology such as cellular metabolism, cell adhesion and differentiation. Our observations suggest that by regulating genes in different functional pathways, BOB.1/OBF.1 has a widespread effect on B cell development and function.

The absence of immunoglobulin expression in Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) cells of classical Hodgkin lymphoma was initially suggested to be caused by inactivating mutations in the immunoglobulin promoter or coding region. In the third part of this work it was shown, that HRS cells express no BOB.1/OBF.1 and Oct2. By transfection experiments in HRS cell lines, using octamer-motif dependent and immunoglobulin regulated reporters, it was shown that the lack of this proteins is likely to be critically involved in the observed defect of immunoglobulin transcription in HRS cells.

## Veröffentlichungen

Laumen, H., Brunner, C., Greiner, A. and Wirth, T. (2004). Myosin light chain 1 atrial isoform (MLC1A) is expressed in pre-B cells under control of the BOB.1/OBF.1 coactivator. *Nucleic Acids Res* 32, 1577-1583.

Laumen, H., Nielsen, P. J. and Wirth, T. (2000). The BOB.1 / OBF.1 co-activator is essential for octamer-dependent transcription in B cells. *Eur J Immunol* 30, 458-469.

Brunner, C., Laumen, H., Nielsen, P. J., Kraut, N. and Wirth, T. (2003). Expression of the aldehyde dehydrogenase 2-like gene is controlled by BOB.1/OBF.1 in B lymphocytes. *J Biol Chem* 278, 45231-45239.

Theil, J., Laumen, H., Marafioti, T., Hummel, M., Lenz, G., Wirth, T. and Stein, H. (2001). Defective octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells. *Blood* 97, 3191-3196.

Stein, H., Marafioti, T., Foss, H. D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G. and Falini, B. (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood* 97, 496-501.

Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H. D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T. and Stein, H. (2000). Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 95, 1443-1450.

Hess, J., Laumen, H., Muller, K. B. and Wirth, T. (1998). Molecular genetics of the germinal center reaction. *J Cell Physiol* 177, 525-534. *Review*

Hess, J., Laumen, H. and Wirth, T. (1998). Application of differential cDNA screening techniques to the identification of unique gene expression in tumours and lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 10, 125-130. *Review*

## **Danksagung**

Prof. Thomas Wirth gilt mein Dank für die interessante Aufgabenstellung und die gute Betreuung. Bei Prof. Thomas Raabe möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Dr. N. Kraut, Dr. P. Nielsen und Dr. M. Hummel möchte ich danken für die Kooperation beim Affymetrix-Screen sowie die Bereitstellung von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen und Hodgkin-Lymphom Zellen.

Allen Mitgliedern des Labors Wirth danke ich sowohl für die freundschaftliche und kooperative Zusammenarbeit als auch für die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft. Conny möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit danken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die B-Zellentwicklung</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der B-Zellentwicklung</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Das Oktamer-Motiv</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Die Transkriptionsfaktoren Oct1 und Oct2</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Der B-Zell-spezifische Koaktivator BOB.1/OBF.1</b>	<b>12</b>
<b>1.6 Der Phänotyp BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Das klassische Hodgkin-Lymphom</b>	<b>20</b>
<b>1.8 Ziele und Motivation der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>2. ERGEBNISSE</b>	<b>26</b>
<b>2.1 BOB.1/OBF.1 ist essentiell für oktamerabhängige und Immunglobulin-Reporter-gen-Transkription in B-Zellen</b>	<b>26</b>
2.1.1 Bei fehlender BOB.1/OBF.1-Expression ist in präB-Zellen keine oktamerabhängige Transkription zu detektieren	27
2.1.2 Ein BobER-Fusionsprotein vermittelt oktamerabhängige Transkription in BOB.1/OBF.1 <sup>-/-</sup> -B-Zellen	29
2.1.3 Auch ein Immunglobulin-Promotor-regulierter Reporter ist abhängig von BOB.1/OBF.1-Expression	35
2.1.4 Oct2 ist nicht an der Transaktivierung der Immunglobulin-Reporter beteiligt	39
<b>2.2 Identifizierung BOB.1/OBF.1-regulierter Zielgenen</b>	<b>43</b>
2.2.1 Identifizierung von MLC1A („myosin light chain 1 atrial isoform“) als indirektes BOB.1/OBF.1-Zielgen mittels cDNA-RDA-Methode	44
2.2.1.1 Etablierung der cDNA-RDA-Methode mit dem Oct2ER-System	44
2.2.1.2 cDNA-RDA-Experiment zur Identifizierung BOB.1/OBF.1-regulierter Gene	46
2.2.1.3 MLC1A wird durch BobER reguliert und ist in frühen B-Zellen exprimiert	49
2.2.1.4 Verwendung einer alternativen MLC1A-5'UTR in B-Zellen	53
2.2.2 Zielgensuche mittels Atlas-Protokoll - keines der 500 erfassten Gene wird durch BobER reguliert	56
2.2.3 Zielgensuche mittels Affymetrix-Genchip-Technologie - Identifizierung potentieller BOB.1/OBF.1-Zielgene	57
<b>2.3 Rolle von BOB.1/OBF.1 für die Expression von Immunglobulinen in Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen</b>	<b>61</b>
2.3.1 HRS-Zelllinien zeigen keine oktamerabhängige sowie keine Immunglobulin-Reporter-gen-Transkription	61
2.3.2 HRS-Zellen exprimieren kein Oct2 und BOB.1/OBF.1	65

2.3.3	Transiente, jedoch nicht stabile Expression von BOB.1/OBF.1 ist ausreichend oktamerabhängige und Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription in HRS-Zellen wiederherzustellen	67
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Rolle von BOB.1/OBF.1 für oktamerabhängige und Immunglobulin-Transkription</b>	<b>72</b>
3.1.1	BOB.1/OBF.1 ist essentiell und nicht redundant für oktamerabhängige und Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription	73
3.1.2	Unterschied der Aktivität von BOB.1/OBF.1 auf Immunglobulin-Reporter und endogene Immunglobulingene	75
3.1.3	Oct2 induziert partiell oktamerabhängige Transkription, jedoch nicht Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription	79
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung von BOB.1/OBF.1-Zielgenen</b>	<b>80</b>
3.2.1	MLC1A wird indirekt durch BOB.1/OBF.1 in präB-Zellen reguliert	81
3.2.2	Identifizierung potentieller BOB.1/OBF.1-regulierter Gene durch Affymetrix-Genchips	86
<b>3.3</b>	<b>Das Fehlen von BOB.1/OBF.1 und Oct2 ist beteiligt am Defekt der Immunglobulin-Expression in HRS-Zellen</b>	<b>92</b>
<b>4.</b>	<b>METHODEN UND MATERIAL</b>	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>Standardmethoden</b>	<b>102</b>
4.1.1	Zentrifugation	102
4.1.2	Präzipitation von DNA	102
4.1.3	Präzipitation von RNA	102
4.1.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	102
4.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	102
4.1.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	102
4.1.7	Gelelektrophoresen	103
<b>4.2</b>	<b>Klonierung von DNA-Fragmenten</b>	<b>103</b>
4.2.1	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	103
4.2.2	Partialverdau von Plasmid-DNA	103
4.2.3	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	103
4.2.4	Die Klenow-Reaktion	104
4.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	104
4.2.5.1	Phenol-Extraktionsmethode	104
4.2.5.2	Aufreinigung durch DEAE-Papier	104
4.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren	104
4.2.7	Transformation kompetenter Bakterien mit DNA	105
4.2.7.1	Chemokompetente Bakterien	105

4.2.7.2	Elektrokompetente Bakterien	105
4.2.8	Klonierung des 5'-Endes der MLC1A-cDNA aus B-Zellen der Maus (RACE-Protokoll)	105
<b>4.3</b>	<b>Isolation von DNA</b>	<b>105</b>
4.3.1	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab („Minipräparation“)	105
4.3.2	Plasmidpräparation im großen Maßstab („Maxipräparation“)	106
4.3.3	Präparation von genomischer DNA	106
<b>4.4</b>	<b>Isolation von RNA</b>	<b>107</b>
4.4.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben und Gewebekulturzellen	107
4.4.2	Präparation von polyA <sup>+</sup> -RNA aus Gewebekulturzellen	107
<b>4.5</b>	<b>Hybridisierung von Nukleinsäuren</b>	<b>108</b>
4.5.1	Koloniehybridisierung	108
4.5.2	Southernblot-Analyse	108
4.5.3	Northernblot-Analyse	109
<b>4.6</b>	<b>Radioaktive Markierung von DNA-Proben</b>	<b>109</b>
4.6.1	Markierung von DNA-Fragmenten durch „Random Priming“	109
4.6.2	Markierung von Oligonukleotiden mit Klenow-Polymerase	109
4.6.3	Aufreinigung der radioaktiv markierten DNA-Proben	109
<b>4.7</b>	<b>Sequenzierung von DNA</b>	<b>110</b>
<b>4.8</b>	<b>Methoden zur Analyse der differentiellen Genexpression in zwei RNA-Populationen</b>	<b>110</b>
4.8.1	Die cDNA-RDA-Methode	110
4.8.2	Atlas-cDNA-Mikroarray-Protokoll (Clontech)	110
4.8.3	Affymetrix-Genchip-Protokoll	110
<b>4.9</b>	<b>Nachweis der Genexpression durch RT-PCR</b>	<b>111</b>
<b>4.10</b>	<b>Herstellung von Proteinextrakten</b>	<b>111</b>
4.10.1	Proteinextrakte aus Geweben	111
4.10.2	Proteinextrakte aus Zelllinien	111
<b>4.11</b>	<b>Analyse von Proteinen</b>	<b>112</b>
4.11.1	Protein-Immunblot	112
4.11.2	Gelretardations-Analysen	113
<b>4.12</b>	<b>Zellkulturtechniken</b>	<b>113</b>
4.12.1	Zentrifugation von Zellen	113
4.12.2	Bestimmung der Zellzahl	113
4.12.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	114
4.12.4	Kultivieren von transformierten Zelllinien	114
4.12.5	Herstellung und Kultivierung von primären präB-Zellen	115
4.12.5.1	Gewinnung von IL-7-haltigem Kulturüberstand	115
4.12.5.2	Kultivieren der ST2-Stromazellen	115
4.12.5.3	Etablierung und Kultivierung von primären präB-Zellen	115
<b>4.13</b>	<b>Transfektionen und Infektion von Zelllinien</b>	<b>115</b>
4.13.1	DEAE-Dextran-Transfektion von MB10-präB-Zelllinien	115

4.13.2	Kalziumphosphat-Transfektion von NIH/3T3-Zellen	116
4.13.3	Elektroporation verschiedener B-Zelllinien	116
4.13.4	Stabile Transfektion von Phoenix-Zellen	117
4.13.5	Infektion von B-Zelllinien	117
4.13.6	Etablierung stabiler Zelllinien	117
4.13.7	Messung der Luziferase- und $\beta$ -Galaktosidaseaktivität	117
<b>4.14</b>	<b>Allgemein verwendete Materialien</b>	<b>118</b>
4.14.1	Chemikalien	118
4.14.2	Puffer und Lösungen	119
4.14.3	Medium für Bakterien- und Zellkultur	119
4.14.4	Reagenzien	120
4.14.5	Antikörper für Protein-Immunblot und Gelretardations-Supershift	121
4.14.6	Enzyme	121
4.14.7	Gebrauchsfertige Kits	121
4.14.8	Primer	121
4.14.9	Vektoren und Plasmide	123
4.14.10	Biologische Materialien	123
4.14.11	Verbrauchsmaterialien	125
4.14.12	Membranen und Filter	125
4.14.13	Geräte	126
4.14.14	Datenverarbeitung	127
<b>5.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>128</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>130</b>
<b>7.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>143</b>
<b>8.</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>144</b>

# 1. EINLEITUNG

Ein Charakteristikum vielzelliger Organismen im Gegensatz zu einzelligen ist die Ausbildung von spezialisierten Zellen. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel für eine solche Zellspezialisierung stellen die Zellen des Blutes mit ihren vielfältigen Funktionen dar. Im Laufe der Hämatopoese entstehen die verschiedenen Zellen des Blutes aus einer gemeinsamen, sich selbst erneuernden, pluripotenten Stammzelle. In der pränatalen Entwicklung sind die hämatopoetischen Stammzellen zuerst in Dottersack, Aorta, Gonadenanlagen und der Region des Mesonephros zu finden, später in der fötalen Leber und schließlich im adulten Tier im Knochenmark (Dzierzak and Medvinsky, 1995). Erste Einblicke in die molekularen Differenzierungsmechanismen wurden mit Hilfe natürlicher Mausmutanten (z. B. c-kit oder c-kit-Ligand) gewonnen (Russell, 1979). Später konnten mittels gezielter Gendelektionen oder Genmutationen in Mäusen die Einflüsse von Rezeptoren, Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren weiter aufgeklärt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass an der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen maßgeblich eine entwicklungspezifische Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren beteiligt ist.

Eine in der Vergangenheit besonders gut untersuchte hämatopoetische Zellpopulation sind die B-Zellen. B-Zellen zeigen eine sehr koordinierte Entwicklung, an deren Ende vereinfacht dargestellt zwei Zelltypen stehen: Plasmazellen und Gedächtniszellen. Plasmazellen zeichnen sich durch Produktion und Sekretion hochaffiner Antikörper/Immunglobuline aus, wohingegen Gedächtniszellen einen Teil des so genannten immunologischen Gedächtnisses darstellen. Die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung, von der Stammzelle zu den beiden terminal differenzierten Zellpopulationen, kann sowohl mit Hilfe der Expression verschiedener Oberflächenmarker bzw. funktioneller Gene als auch über den Rekombinationsstatus der schweren und leichten Immunglobulin-Ketten nachvollzogen werden (Osmond et al., 1998; Hardy and Hayakawa, 2001). Seit vielen Jahren gilt die B-Zellentwicklung als ein gutes Modellsystem für die Untersuchung eukaryontischer

Differenzierung von der Stammzelle hin zur hochspezialisierten reifen Zelle. In den nächsten Kapiteln wird zunächst die B-Zellentwicklung eingeführt und die Rolle verschiedener Mechanismen der Transkriptionsregulation in der B-Zellentwicklung erläutert, wobei das Oct2- und BOB.1/OBF.1-Transkriptionssystem detaillierter beschrieben wird.

### 1.1 Die B-Zellentwicklung

Die B-Zellentwicklung wird in verschiedene Stadien unterteilt, für die der Rekombinations- und Expressionsstatus der Immunglobulingene bzw. das Expressionsmuster typischer B-Zellgene als Marker verwendet werden. Die *frühe B-Zellentwicklung* findet im adulten Organismus im Knochenmark statt, wobei die frühesten Differenzierungsstadien noch Antigen-unabhängig verlaufen. Ausgehend von der pluripotenten *hämatopoetischen Stammzelle* entwickelt sich zunächst eine *lymphoide Stammzelle* und schließlich die *proB-Zelle*, eine Vorläuferzelle, in welcher die Immunglobulingene noch in der Keimbahnkonfiguration vorliegen. Keimbahnkonfiguration bedeutet, dass die Immunglobulingene noch nicht rearrangiert sind, d. h. die V-(„variable“), D-(„diversity“; welche nur in der schweren Immunglobulin-Kette vorliegen) und die J-(„joining“) Segmente sind noch voneinander getrennt. ProB-Zellen differenzieren dann zu *präB-Zellen* ( $B220^{\text{low}}\text{IgM}^{\text{neg}}$ ), wobei zwei aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien unterschieden werden: präBI- und präBII-Zellen. PräBI-Zellen zeigen eine partielle Rekombination der D- und J-Segmente der schweren Immunglobulin-Kette. Im Gegensatz dazu haben die präBII-Zellen die schweren (große präBII-Zellen) bzw. zusätzlich noch die leichten (kleine präBII-Zellen) Immunglobulingene komplett rearrangiert (Osmond et al., 1998). PräB-Zellen exprimieren zwar die komplett rearrangierte schwere Immunglobulin-Kette ( $\mu$ -Kette), jedoch noch kein membranständiges IgM. Der präB-Zellrezeptor setzt sich aus der  $\mu$ -Kette und den leichten Ersatz-Immunglobulin-Ketten  $V_{\text{preB}}$  und  $\lambda 5$  zusammen. Der präB-Zellrezeptor ist beteiligt an der Regulation von Proliferation und Differenzierung der Vorläufer-B-Zellen sowie an der alleinigen Expression von nur einem Allel der schweren Immunglobulin-Kette

## Einleitung

---

(„allelic exclusion“; Hardy et al., 1996; Osmond et al., 1998; ten Boekel et al., 1998; Martensson et al., 2002). Im nächsten Schritt der B-Zelldifferenzierung im Knochenmark werden die rearrangierten leichten und schweren Immunglobulin-Ketten als IgM auf der Oberfläche der Zellen exprimiert. Die resultierenden *unreifen B-Zellen* ( $B220^{\text{low}}\text{IgM}^{\text{med}}$ ) sind das erste Entwicklungsstadium, in dem der reife B-Zellrezeptor (BCR = „B-cell receptor“, IgM) exprimiert wird. Sie entwickeln sich weiter zu *transitionellen B-Zellen* ( $B220^{\text{low/high}}\text{IgM}^{\text{high}}$ ) des Knochenmarks, den B-Zellen, die bereit sind in die Peripherie auszuwandern. In diesen beiden Entwicklungsstadien werden über den funktionellen BCR autoreaktive B-Zellen durch Negativselektion ausgesiebt. Diese transitionellen B-Zellen wandern nun vom Knochenmark über die Blutbahn in die peripheren lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, Peyers-Patches), wo die letzten Schritte der B-Zellentwicklung stattfinden.

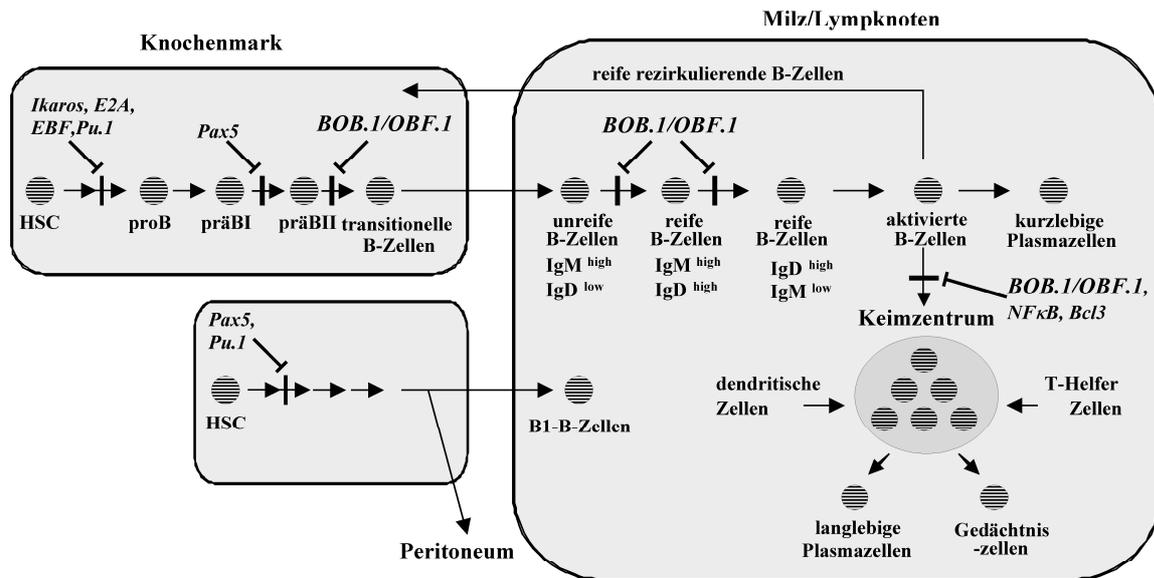
In der Milz differenzieren die *transitionellen B-Zellen* ( $\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{neg}}$ ) über verschiedene Zwischenstadien ( $\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}$ ) schließlich zu *reifen B-Zellen* ( $\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{high}}$ ) (Chung et al., 2003). Ein wichtiger Unterschied zwischen unreifen/transitionellen B-Zellen und reifen B-Zellen ist, dass Erstere auf BCR-Stimulation mit einem Stopp des Wachstums oder mit Apoptose (z. B. im Fall autoreaktiver B-Zellen) reagieren, wohingegen reife B-Zellen typischerweise mit einem aktivierten Status und Proliferation reagieren. Ein Teil der reifen B-Zellen wandert wieder zurück ins Knochenmark, und werden dann als *reife, rezirkulierende B-Zellen* ( $B220^{\text{high}}\text{IgM}^{\text{low}}$ ) bezeichnet.

Der periphere Pool reifer B-Zellen setzt sich aus den bisher beschriebenen konventionellen *B2-B-Zellen* (welche im weiteren Text vereinfacht nur als B-Zellen bezeichnet werden) und den so genannten *B1-B-Zellen* zusammen (Stall et al., 1996; Hardy et al., 1996; Martin and Kearney, 2001). Die konventionellen B-Zellen entstammen wie oben beschrieben der Lymphopoese im Knochenmark und bilden den größten Teil der B-Zellen in Milz und Lymphknoten. Sie sind maßgeblich an der Produktion sekundärer, hochaffiner Antikörper sowie an der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt. Für die zweite

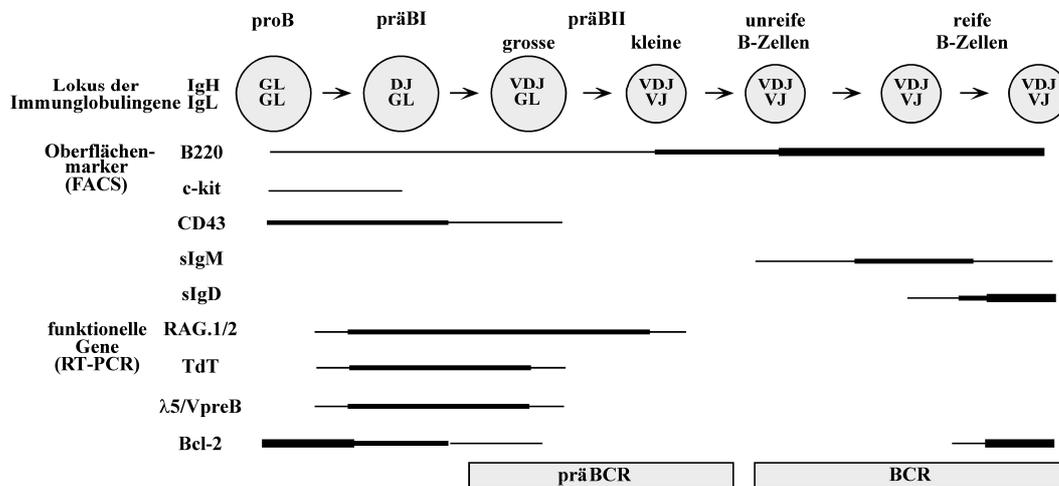
## Einleitung

Population von B-Zellen, die B1-B-Zellen ( $CD5^+$ ,  $CD43^+$ ,  $MHCII^+$ ), die überwiegend im Peritoneum gefunden werden, gibt es verschiedene Modelle ihrer Herkunft und Funktion (Hardy et al., 1996; Stall et al., 1996; Martin and Kearney, 2000; Hardy and Hayakawa, 2001; Martin and Kearney, 2001).

(A)



(B)



**Abbildung 1: Modell der B-Lymphopoese und Expressionsmuster von Markergenen.**

(A) Schematische Abbildung der Antigen-unabhängigen B-Zellentwicklung nach Matthias 1998 (detaillierte Beschreibung siehe Text). Eine tendenzielle Hierarchie der B-Lymphopoese wurde anhand der Defekte in Mäusen, in denen verschiedene Transkriptionsfaktoren durch homologe Rekombination inaktiviert wurden, abgeleitet. Die einzelnen Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die jeweils angegebenen Entwicklungsstadien. Die Untersuchungen sind in folgenden Referenzen beschrieben: Ikaros (Wang et al., 1996), E2A (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994), EBF (Lin and Grosschedl, 1995), BOB.1/OBF.1 (Schubart et al., 1996a; Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996), NFκB (Sha et al., 1995), Bcl-3 (Schwarz et al., 1997; Franzoso et al., 1997), Pax5 (Urbanek et al., 1994) und Pu.1 (Scott et al., 1994; McKercher et al., 1996). (B) Zusammenfassung der Oberflächenmarker (FACS-Analyse), Rekombinationsstatus der Immunglobulingene und Genexpression (RT-PCR-Analyse) in der B-Lymphopoese im Knochenmark von adulten Mäusen (Hardy et al., 1996; Osmond et al., 1998). Die Balkendicke gibt die Stärke der Expression in den verschiedenen Phasen der Differenzierung wieder.

## Einleitung

---

Die reifen, neu formierten B-Zellen in der Milz entwickeln sich zu zwei Populationen, den Marginalzonen-B-Zellen und den folliculären B-Zellen. *Marginalzonen-B-Zellen* (MZB-Zellen,  $\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}$ ) repräsentieren eine eigenständige Untereinheit von B-Zellen. Typischerweise in einem voraktivierten Zustand, reagieren sie mit als erste auf neue im Blut vorhandene korpuskuläre Antigene und differenzieren innerhalb weniger Stunden in IgM-sezernierende Plasmazellen. Ähnlich wie MZB-Zellen reagieren auch B1-B-Zellen in der frühen Immunantwort auf T-unabhängige Antigene mit einer Differenzierung zu IgM-sezernierenden Plasmazellen (Martin et al., 2001). *Folliculäre B-Zellen* ( $\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{high}}$ ) hingegen reagieren auf Antigene mit der Ausbildung so genannter Keimzentren („germinal center“). Im Keimzentrum finden verschiedene wesentliche Prozesse statt. Neben der erhöhten Proliferation Antigen-spezifischer B-Zellen, erfolgt eine somatische Diversifikation durch Hypermutation der Immunglobulingene sowie die Rekombination der schweren Immunglobulin-Ketten von IgM zu IgG, IgA oder IgE Isotypen („class switch“). Durch die Interaktion mit Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen erfolgt eine Selektion derjenigen hypermutierten Klone, die eine hohe Antigen-Affinität aufweisen. Dabei werden die Zellen mit geringer Antigen-Affinität oder einem nicht-funktionellen BCR durch Apoptose ausselektiert. Das Ergebnis der Keimzentrumsreaktion sind zwei verschiedene B-Zellpopulationen. Die langlebigen *Plasmazellen* sezernieren hochaffine Antikörper, wohingegen die *Gedächtniszellen* das immunologische Gedächtnis darstellen, das heißt nach erneutem Kontakt mit demselben Antigen erfolgt eine verstärkte sekundäre Antikörperantwort (Hess et al., 1998; Przylepa et al., 1998; Tarlinton, 1998; Guzman-Rojas et al., 2002).

## 1.2 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der B-Zellentwicklung

Die Kontrolle der B-Zellentwicklung und -funktion setzt eine zeitlich genau definierte Expression von Genen voraus. Hierbei sind die Regulation der Chromatinstruktur, Rekombinationsereignisse, Transkription, Regulation von RNA-Stabilität, Translation und posttranslationelle Modifikation zu nennen. Ein in den letzten Jahren besonders intensiv

## Einleitung

---

untersuchter Mechanismus ist die Transkriptionsregulation. Dabei zeigte die Analyse von mutanten Mäusen, dass zahlreiche Transkriptionsfaktoren maßgeblich an der Differenzierung von der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle zur reifen B-Zelle beteiligt sind. Im Folgenden werden einige Beispiele dazu beschrieben, um die Relevanz des Mechanismus zu verdeutlichen.

In der frühen hämatopoetischen Stammzelle bestimmt die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-1 die Differenzierung in die erythroide Linie mit (Weiss et al., 1994; Zon et al., 1991). Wird GATA-1 nicht exprimiert, scheint eine starke Expression des Transkriptionsfaktors Pu.1 die Zellen zu einer Weiterdifferenzierung zur myeloiden Linie, eine schwache Pu.1-Expression zu einer Differenzierung zur lymphoiden Linie zu definieren (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994; Scott et al., 1997; Warren and Rothenberg, 2003). Pu.1 (Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren) wird überwiegend in monozytischen, granulozytischen sowie lymphoiden Zellen exprimiert. Zahlreiche in B-Zellen exprimierte Gene werden von Pu.1 reguliert, wie z. B. leichte und schwere Immunglobulin-Ketten, RAG.1, Ig $\alpha$ , Ig $\beta$ , VpreB,  $\lambda$ 5, BTK, Bcl-2, TdT, CD19 und Immunglobulin-J-Kette.

Das Ikarosgen kodiert für eine Reihe von Genen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die Proteine der Ikaros-Familie (Ikaros, Aiolos, Helios) formen hetero- oder homo-Dimere, was für die DNA-Bindungsaktivität und die transkriptionelle Aktivität entscheidend ist. Ikaros wird während der gesamten B-Zellentwicklung exprimiert, Ikaros<sup>-/-</sup>-Mäuse (Wang et al., 1996) zeigen einen sehr frühen Block der B-Zellentwicklung noch vor dem proB-Zellstadium. Das Gen ist an der Regulation von RAG.1, IL-2-Rezeptor, Ig $\alpha$ , VpreB,  $\lambda$ 5 und TdT beteiligt (Georgopoulos, 2002). Neben seiner direkten Funktion als Transkriptionsfaktor kann Ikaros auch als Teil des NURD-Komplexes („nucleosome remodelling and deacetylation complex“) vorliegen und ist damit direkt an der Regulation der Histondeacetylierung beteiligt. Die Regulation der Chromatinstruktur über Modifikation der DNA (Methylierung) oder der Histonproteine (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung) stellt sich, neben der hier ausführlicher beschriebenen Regulation über Transkriptionsfaktoren, zunehmend als

## Einleitung

---

wesentlicher Mechanismus der Transkriptionsregulation heraus (Feinberg, 2001; Rice and Allis, 2001; Georgopoulos, 2002).

Bei der weiteren Entwicklung der lymphoiden Vorläuferzellen zu B-, T- oder NK-Zellen spielen der Transkriptionsfaktor Notch1 sowie das Gleichgewicht zwischen E-Box-bindenden Transkriptionsfaktoren und Id-Proteinen („inhibitor of DNA binding“) eine entscheidende Rolle. So ist durch zahlreiche Experimente mit defizienten und transgenen Mäusen gezeigt worden, dass Expression und Aktivität von Notch1 in lymphoiden Zellen zur Entwicklung der Vorläuferzelle in eine T-Zelle führen (Borowski et al., 2002; Allman et al., 2001; de Smedt et al., 2002; Pui et al., 1999). Dabei inhibiert Notch1 möglicherweise die Aktivität des E-Box-Transkriptionsfaktors E2A, eines Proteins das absolut nötig ist für die Entwicklung von B-Zellen. Die Expression von Id2 hingegen führt zu einer Weiterdifferenzierung der Vorläuferzelle zur NK-Linie, wobei ebenfalls eine Inhibierung von E2A stattfindet. Insgesamt ist die lymphoide Vorläuferzelle an sich auf die Entwicklung zur B-Zelle ausgerichtet. Dieses Entwicklungsprogramm wird blockiert durch die Expression von Notch1 oder Id2, was E2A inhibiert, wodurch die Entwicklung der Zellen in eine andere Richtung ermöglicht wird (Schebesta et al., 2002b).

E2A ist ein E-Box-bindendes Protein aus der Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren. Durch alternatives Spleißen entstehen E47, E12 und E2-5. E2A wird ubiquitär exprimiert, jedoch können sich infolge eines speziellen Phosphorylierungsmusters nur in B-Zellen E47-Homodimere bilden (Sloan et al., 1996), wohingegen in allen anderen Zelltypen E47 als Heterodimer mit anderen E-Box-Faktoren vorliegt. E2A reguliert u. a. die Expression von RAG-Proteinen,  $\lambda 5$ , VpreB und ist am Immunglobulin-Rearrangement beteiligt. E2A-Defizienz führt zu einem Entwicklungsblock im proB-Zellstadium (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994). E2A-Proteine werden negativ reguliert durch Id-Proteine, welche über ihre HLH-Domäne mit den E2A-Proteinen interagieren können, jedoch keine Transaktivierungsdomäne aufweisen (Sun et al., 1991; Quong et al., 2002; Rivera and Murre, 2001). Id1<sup>tg</sup>-Mäuse zeigen einen Block der B-Zellentwicklung im selben Stadium, wie es für

## Einleitung

---

E2A beobachtet wurde (Sun et al., 1994). Id3<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen Block in der frühen T-Zellentwicklung sowie eine normale frühe B-Zellentwicklung. In der späten B-Zellentwicklung zeigt sich jedoch ein Defekt der Aktivierung der B-Zellen sowie der B-Zellproliferation (Pan et al., 99; Quong et al., 2002).

Die beiden Transkriptionsfaktoren EBF und Pax5 (BSAP) spielen eine entscheidende Rolle beim Zustandekommen des B-Zell-spezifischen Transkriptionsprogramms. Dabei induzieren EBF und das beschriebene E2A/E47 die Expression von Pax5. In EBF<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die B-Zellentwicklung im proB-Zellstadium blockiert (Lin and Grosschedl, 1995). EBF reguliert die Expression zahlreicher B-Zell-spezifischer Gene wie Iga, Igβ, RAG.1 und RAG.2 sowie die Immunglobulin-Rekombination, wobei es selbst durch das bereits oben erwähnte E2A/E47-Protein reguliert wird. Pax5, ein „paired-box-homeodomain“-Transkriptionsfaktor, reguliert neben CD19 auch Iga, N-myc und LEF (Kozmik et al., 1992; Nutt et al., 1998; Nutt et al., 1997). In Pax5<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die B-Zellentwicklung im präB-Zellstadium blockiert. Pax5<sup>-/-</sup>-präB-Zellen können noch in andere hämatopoetische Linien differenziert werden, das heißt Pax5 ist notwendig für die Expression eines B-Zell-spezifischen Programms (Nutt et al., 1998; Thevenin et al., 1998; Morisson et al., 1998; Rolink et al., 2000).

Nachdem die transitionellen B-Zellen in die peripheren lymphoiden Organe gewandert sind, differenzieren sie wie beschrieben zu reifen, ruhenden B-Zellen. Nach Antigenkontakt kann es zu einer Ausbildung von Keimzentren und der damit verbundenen terminalen Reifung kommen. Auch hier sind verschiedene Transkriptionsfaktoren beteiligt. Bcl-6 ist ein Zink-Finger-Protein, welches als transkriptioneller Repressor fungiert (Chang et al., 1996; Seyfert et al., 1996). Es wurde als häufig in B-Zellen transloziert vorliegendes Gen kloniert (Liang et al., 1996), was es auch zu einem Marker für transformierte Zellen machte, deren Ursprung Keimzentrums-B-Zellen sind (Allman et al., 1996). Bcl-6<sup>-/-</sup>-Mäuse haben keine Keimzentren und somit keine Immunglobuline, die einer Affinitätsreifung unterzogen wurden (Dent et al., 1997; Ye et al., 1997). Einen teilweise ähnlichen Phänotyp zeigen Mäuse, denen die Faktoren

Oct2 und BOB.1/OBF.1 fehlen. Im Folgenden werden diese beiden Faktoren genauer beschrieben.

### 1.3 Das Oktamer-Motiv

Die B-Zellentwicklung kann, wie in den vorigen Kapiteln beschrieben, durch Rekombination und Expression der Immunglobulingene beschrieben werden. Die Expression der Immunglobulingene wird durch eine komplexe Interaktion spezifischer Promotor- und Enhancerelemente kontrolliert (Staudt and Lenardo, 1991; Ernst and Smale, 1995). Vor ca. 16 Jahren wurde das so genannte Oktamer-Motiv (- ATGCAAAT -) entdeckt, welches entscheidend zur Funktion dieser regulatorischen Elemente beiträgt. Es ist in nahezu allen Promotoren und einem Teil der Enhancerelemente der schweren und leichten Immunglobulingene konserviert (Staudt and Lenardo, 1991). Darüber hinaus wurden funktionelle Oktamer-Motive in Promotoren weiterer B-Zell-spezifisch exprimierter Gene wie z. B. B29 und CD20 charakterisiert (Hermanson et al., 1989; Thevenin et al., 1992). Durch transiente Transfektionsstudien, in *in vitro* Transkriptions-Experimenten und durch die Analyse von transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Oktamer-Motiv für die Aktivität und B-Zell-Spezifität von Promotoren der Immunglobulingene eine zentrale Rolle spielt (Bergman et al., 1984; Mason et al., 1985; Dreyfus et al., 1987; Wirth et al., 1987; Mizushima-Sugano and Roeder, 1986; LeBowitz et al., 1988; Scheidereit et al., 1987; Jenuwein et al., 1991; Annweiler et al., 1992a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Oktamer-Motiv auch zur spezifischen Aktivität der Enhancerelemente beiträgt (Lenardo et al., 1987; Gerster et al., 1987). Funktionelle Oktamer-Motive wurden auch in T-Zellen beschrieben, so ist die induzierbare Expression von T-Zell-Zytokinen wie IL-2 unter anderem von diesem Motiv abhängig (Durand et al., 1988; Ullmann et al., 1991; Pfeuffer et al., 1994). Neben der Funktion bei der transkriptionellen Regulation zahlreicher B-Zell-spezifischer Gene zeigte sich das Oktamer-Motiv auch als wichtiges regulatorisches Element in einer Reihe von ubiquitär exprimierten Genen wie z. B. Histon H2B, snRNA-U2 und -U6 (Carbon

et al., 1987; LaBella et al., 1988; Lobo et al., 1990; Sive and Roeder, 1986; Tanaka et al., 1988). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Oktamer-Motiv nicht allein für die Transkription lymphoid-spezifischer Gene, die dieses Motiv enthalten, verantwortlich sein kann. Stattdessen wurde die Existenz verschiedener Oktamer-Motiv-bindender Transkriptionsfaktoren vorgeschlagen, die im Promotor-Kontext unterschiedliche Eigenschaften besitzen sollten. Dadurch kann es zu einer differentiellen Genexpression in lymphoiden Zellen kommen, im Vergleich zu nicht-lymphoiden Zellen (Schaffner, 1989).

### 1.4 Die Transkriptionsfaktoren Oct1 und Oct2

In B-Zellen konnten zwei DNA-bindende Proteine identifiziert werden, die spezifisch an das Oktamer-Motiv binden. Beide Faktoren wurden mit Hilfe des in Immunglobulin-Promotoren vorkommenden Oktamer-Motivs identifiziert (Singh et al., 1986; Staudt et al., 1986).

Der Transkriptionsfaktor Oct1 wird ubiquitär exprimiert und ist für die Expression ubiquitärer Gene wie Histon H2B verantwortlich. Neben der Expression ubiquitär exprimierter Gene kann Oct1 aber auch die Expression von B-Zell-spezifischen Genen wie IgM, im Kontext mit anderen Transkriptionsfaktoren, vermitteln (Schubart et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor Oct2 wird im Gegensatz zu Oct1 nur in lymphoiden Zellen und einigen Zellen des Zentralnervensystems exprimiert. Oct2 bildet infolge alternativen Spleißens eine Familie von Isoformen (Gerster et al., 1987; He et al., 1989; Schreiber et al., 1988; Staudt et al., 1988; Wirth et al., 1991). Neben Oct1 und Oct2 wurden weitere Oktamer-bindende Transkriptionsfaktoren identifiziert, die alle eine signifikante Homologie in der DNA-bindenden Domäne, der 150-160 Aminosäuren langen POU-Domäne (POU: Pit-1, Oct1/2, Unc-86), aufweisen (Herr et al., 1988; Sturm and Herr, 1988; Rosenfeld, 1991; Schöler, 1991; Wegner et al., 1993; Ryan and Rosenfeld, 1997). Die POU-Domäne kann in eine 75-80 Aminosäuren lange amino-terminale POU-spezifische-Domäne und eine 60 Aminosäuren lange carboxy-terminale POU-Homeo-Domäne unterteilt werden, die durch eine flexible

## Einleitung

---

Linkerregion miteinander verbunden sind. Die POU-spezifische- und die POU-Homeo-Domäne enthalten so genannte „Helix-Turn-Helix“-Motive, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind (Sturm and Herr, 1988; Verrijzer et al., 1992; Ryan and Rosenfeld 1997). Daneben vermittelt die POU-Domäne spezifische und funktionelle Protein-Protein-Interaktionen, u. a. mit TBP („TATA binding protein“), HMG2 („high mobility group protein 2“) und VP16 (Zwilling et al., 1994; Zwilling et al., 1995; Walker et al., 1994).

Um die Bedeutung von Oct2 für die B-Zell-spezifische Transkription und somit für die B-Zellentwicklung zu untersuchen, wurden Oct2-defiziente Mäuse (Oct2<sup>-/-</sup>) generiert (Corcoran et al., 1993). Die Oct2<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten sich embryonal normal, starben jedoch aus bislang ungeklärter Ursache innerhalb weniger Stunden nach der Geburt. Während die frühe B-Zellentwicklung unbeeinflusst war, weisen Oct2<sup>-/-</sup>-B-Zellen nach mitogener Stimulation mit LPS einen starken Defekt auf. In Abelsonvirus-transformierten präB-Zellen konnte kein Unterschied in der Expression von putativen Zielgenen (z. B. den schweren und leichten Immunglobulin-Ketten sowie B29) zwischen Kontroll- und Oct2<sup>-/-</sup>-Zellen festgestellt werden, was auf eine Kompensation der Funktion von Oct2 durch andere Transkriptionsfaktoren hinweist. Rekonstitutions-Experimente mit SCID- bzw. RAG.1<sup>-/-</sup>-Mäusen und fötale Oct2<sup>-/-</sup>-Leberzellen ermöglichten *in vivo* die weitere Aufklärung der Defekte innerhalb der B-Zellentwicklung (Corcoran and Karvelas, 1994; Humbert and Corcoran, 1997). In den chimären Mäusen entwickelten sich die B- und T-Zellkompartimente weitgehend normal, während die Serumspiegel der Immunglobuline teilweise reduziert waren (Corcoran and Karvelas, 1994). Die Oct2<sup>-/-</sup>-B-Zellen aus der Milz chimärer Mäuse zeigten einen deutlichen Defekt in der Reaktion auf T-Zell-unabhängige Signale, die durch LPS oder Rezeptorstimulation mit anti-IgM vermittelt wurden. Dieser Defekt war auf einen Block des Zellzyklus in der G1-Phase zurückzuführen (Corcoran and Karvelas, 1994). Des Weiteren zeigten Immunisierungen chimärer Mäuse einen Defekt in der T-Zell-unabhängigen und T-Zell-abhängigen Immunantwort (Humbert and Corcoran, 1997). Mittlerweile wurden Oct2-abhängige Zielgene, wie z. B. CD36 und CRISP-3, identifiziert (Konig et al., 1995; Pfisterer et al., 1996; Pfisterer et al., 1997), wobei das Fehlen dieser Proteine vermutlich nicht

ausreicht, um die charakteristischen Defekte in Oct2<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erklären, so dass weitere Zielgene für Oct2 postuliert wurden. Zusammenfassend folgt aus diesen Daten, dass Oct2 für die frühe B-Zellentwicklung und die initiale Transkription der Immunglobulingene weder notwendig noch ausreichend ist. Vielmehr ergaben die Untersuchungen der Mäuse eine essentielle Funktion bei der B-Zellentwicklung und späteren Stadien der Immunantwort.

Aus verschiedenen Experimenten mit Oct2<sup>-/-</sup>-Zelllinien (Pfisterer et al., 1994; Feldhaus et al., 1993) wurde gefolgert, dass ein bis dahin unbekannter zusätzlicher Faktor in B-Zellen existieren muss, welcher der oktamerabhängigen Transkription in B-Zellen ihre Spezifität verleiht. Dieser Faktor konnte nicht nur mit Oct2, sondern auch mit Oct1 einen funktionellen Komplex bilden. Die Existenz eines derartigen Kofaktors wurde schon zuvor, ausgehend von *in vitro* Transkriptions-Experimenten, postuliert (Pierani et al., 1990). Es wurde weiterhin gezeigt, dass Oct2 für die Aktivität von Oktamer-Motiven distaler Enhancer essentiell ist (Annweiler et al., 1992b; Annweiler et al., 1994; Friedl and Matthias, 1995). Die Anwesenheit von Oct2 reicht jedoch nicht aus, ein oktamerabhängiges Enhancer-Element in Nicht-B-Zellen zu aktivieren, woraus die Existenz eines weiteren Kofaktors oder einer spezifischen Modifikation von Oct2 in B-Zellen abgeleitet wurde (Annweiler et al., 1992b; Wirth et al., 1995; Matthias, 1998).

### 1.5 Der B-Zell-spezifische Koaktivator BOB.1/OBF.1

Einer der oben postulierten transkriptionellen Koaktivatoren konnte aufgrund der spezifischen Interaktion mit Oct1 und Oct2 kloniert werden und wurde mit BOB.1 („B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors“), OBF.1 („Oct binding factor“) bzw. OCA-B („oct coactivator from B cells“) bezeichnet (Gstaiger et al., 1995; Strubin et al., 1995; Luo and Roeder, 1995; Pfisterer et al., 1995). BOB.1/OBF.1 ist ein 256 Aminosäuren langes, Prolinreiches Protein. Es zeigt bislang keine Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen, jedoch existieren

## Einleitung

---

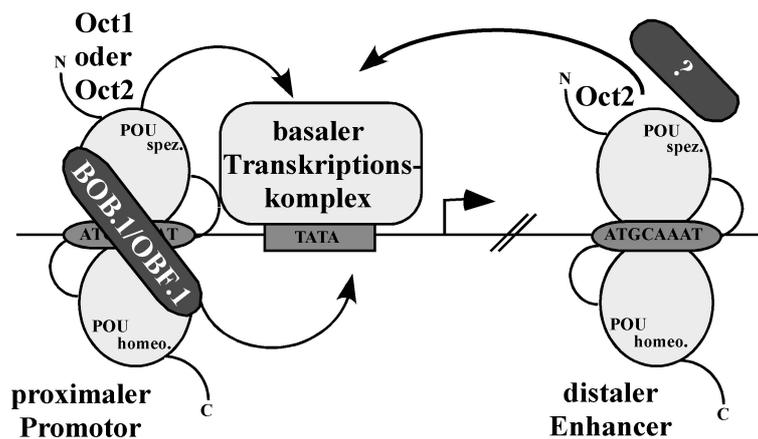
kurze Sequenzen, die eine geringe Homologie zu anderen Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren haben (Ford et al., 1998; Gstaiger et al., 1995; Luo and Roeder, 1995).

BOB.1/OBF.1 kann in zwei funktionelle Untereinheiten aufgeteilt werden. Der Aminoterminus interagiert mit den Proteinen Oct1 und Oct2, jedoch nicht mit den anderen Vertretern der Oct-Transkriptionsfaktoren-Familie (Pfisterer et al., 1995; Strubin et al., 1995), was BOB.1/OBF.1 deutlich von zahlreichen anderen bekannten Koaktivatoren (wie z. B. p300/CBP, N-CoA) unterscheidet, die mit zahlreichen verschiedenen Transaktivatoren interagieren und auch nicht zelltypisch exprimiert werden. Die Interaktion findet hierbei mit den beiden POU-Subdomänen statt (Babb et al., 1997; Gstaiger et al., 1996). Dabei wirkt BOB.1/OBF.1 als molekulare Klammer, welche die beiden Subdomänen an der DNA zusammenhält (Babb et al., 1997; Sauter and Matthias, 1998). Mittlerweile wurde durch Kokristallisation die Struktur des ternären Komplexes (BOB.1/OBF.1-Oct1-Oktamer-Motiv) gezeigt. Dabei stellte sich heraus, dass BOB.1/OBF.1 in der großen Furche („major groove“) der DNA, nahe der Mitte des Oktamer-Motivs, bindet und dabei eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Adenin an Position +5 des Oktamer-Motivs eingeht (Chasman et al., 1999).

Der carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 enthält eine starke transkriptionelle Transaktivierungsdomäne, die proximale Promotoren aktivieren kann (Gstaiger et al., 1995; Luo and Roeder, 1995; Pfisterer et al., 1995; Strubin et al., 1995). Die Ausbildung des ternären Komplexes ist abhängig von der Sequenz des Oktamer-Motivs, wobei die Position +5 eine entscheidende Rolle spielt (Gstaiger et al., 1996; Cepek et al., 1996). Dabei hat BOB.1/OBF.1 allein nur eine geringe Affinität zum Oktamer-Motiv, jedoch erhöht BOB.1/OBF.1 die Selektivität des ternären Komplexes gegenüber einzelnen Oktamer-Motiven (Cepek et al., 1996; Babb et al., 1997). Oct1 und Oct2 binden auch als Dimere an bestimmte Oktamer-Motive, wobei sie in verschiedenen Konfigurationen an die so genannten PORE („palindromic octamer recognition element“) oder MORE („more PORE“) Oktamer-Motive binden. Oct1-BOB.1/OBF.1-Komplexe werden bevorzugt an PORE-Motive rekrutiert

## Einleitung

(Tomilin et al., 2000). Da alle PORE-Daten aus *in vitro* Experimenten resultieren oder auf der ektopischen Expression in Nicht-B-Zellen basieren, ist unklar, ob das Modell generell haltbar ist. Es wäre denkbar, dass eine signifikante Interaktion von Oktamer-Proteinen und BOB.1/OBF.1 mit monomeren Oktamer-Motiven und mit MORE-Motiven in B-Zellen *in vivo* stattfinden könnte.



**Abbildung 2: Modell der oktamerabhängigen Transkription in B-Zellen.** BOB.1/OBF.1 vermittelt gemeinsam mit Oct1 oder Oct2 die B-Zell-spezifische Aktivität des Oktamer-Motivs ausgehend von einem proximalen Promotor. Dabei interagiert der Koaktivator mit der POU-spezifischen und der POU-Homeodomäne und wirkt als molekulare Klammer, die beide Untereinheiten an der DNA zusammenhält. Für die B-Zell-spezifische Aktivierung des Oktamer-Motivs in einem distalen Enhancer wird Oct2 und ein bisher noch nicht identifizierter Kofaktor (?) benötigt (verändert nach Wirth et al., 1995; Matthias, 1998).

Neben der Wechselwirkung mit Oct1 und Oct2 wurde eine funktionelle Interaktion zwischen BOB.1/OBF.1 und Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie (z. B. TBP, TF<sub>II</sub>B, TAF<sub>II</sub>105), mit weiteren allgemeinen Kofaktoren, z. B. PC4, (Luo and Roeder, 1995; Luo et al., 1998; Schubart et al., 1996a; Wolstein et al., 2000) und mit SIAH („seven in absentia homolog“) nachgewiesen (Boehm et al., 2001; Tiedt et al., 2001).

Das BOB.1/OBF.1-Gen kodiert ein einzelnes mRNA-Transkript, aus welchem durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Translations-Initiations-Kodons zwei Proteine von 34 und 40 kDa entstehen. Das 40 kDa große Protein ist ein Vorläuferprotein, welches posttranslational in ein 35 kDa Protein prozessiert wird. Diese 35 kDa Isoform wird weiter modifiziert durch eine Myristylierung des N-Terminus, wodurch eine Lokalisierung des

## Einleitung

---

Proteins an die Zellmembran erreicht wird. Die Funktion dieser Lokalisierung ist bislang unbekannt. Beide Isoformen werden auch im Zellkern gefunden und können dort, wie oben beschrieben, oktamerabhängige Transkription stimulieren (Yu et al., 2001).

Die Expression von BOB.1/OBF.1 ist weitgehend B-Zell-spezifisch und konnte in allen Stadien der B-Zellentwicklung sowohl in B1- als auch in B2-B-Zellen nachgewiesen werden (Strubin et al., 1995; Luo and Roeder, 1995; Gstaiger et al., 1995; Schubart et al., 1996a; Qin et al., 1998; Andersson et al., 2000) und kann in T-Zellen induziert werden (Zwilling et al., 1997; Sauter and Matthias, 1997). Die Menge an BOB.1/OBF.1-Protein variiert jedoch im Verlauf der Differenzierung und in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der B-Zellen der Milz. So zeigt die Expression ein Maximum in proliferierenden „low-density“ B-Zellen (das heißt in Keimzentrums-Zentroblasten). Sie kann zudem stark induziert werden durch eine Stimulation, die eine T-Zell-Hilfe initiiert (anti-IgM, CD40-Ligand und IL-4) sowie durch bakterielle TLR4-Stimulation mittels LPS (Qin et al., 1998; Greiner et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist das BOB.1/OBF.1-Protein nahezu nicht nachzuweisen in ruhenden, „high-density“ B-Zellen der Milz (das heißt naive B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und Keimzentrums-Zentrozyten). Zusätzlich kann BOB.1/OBF.1-Expression durch Phorbol ester und Ionomycin bzw. durch anti-CD3/CD28 in T-Zelllinien und primären Thymozyten induziert werden (Zwilling et al., 1997; Sauter and Matthias, 1997).

Der BOB.1/OBF.1-Promotor enthält ein cAMP-Response-Element, welches an der Regulation des Proteins auf transkriptioneller Ebene beteiligt ist (Stevens et al., 2000a). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass BOB.1/OBF.1 auf mRNA-Ebene deutlich und auf vergleichbarem Niveau in proliferierenden „low-density“ und ruhenden „high-density“ B-Zellen detektierbar ist (Tiedt et al., 2001). Das lässt vermuten, dass BOB.1/OBF.1 auf transkriptioneller und auf translationeller Ebene reguliert wird. In der Tat wurde gezeigt, dass die BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität durch die bereits erwähnte Interaktion mit SIAH reguliert wird, wodurch eine Ubiquitin-Proteasom-vermittelte Degradierung des Proteins zustande kommt (Boehm et al., 2001; Tiedt et al., 2001).

Die Entdeckung von BOB.1/OBF.1 stellte eine mögliche Erklärung für die oben beschriebene Expression von Immunglobulinen in Oct2<sup>-/-</sup>-B-Zellen dar. Da BOB.1/OBF.1 mit beiden Oct-Proteinen interagieren kann, scheint es für die Expression der Immunglobuline irrelevant zu sein, ob sich der ternäre Komplex unter der Beteiligung von Oct1 oder Oct2 formiert.

### 1.6 Der Phänotyp BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse

*BOB.1/OBF.1 in der frühen B-Zellentwicklung.* Die ursprünglichen Untersuchungen von Mäusen, in denen BOB.1/OBF.1 durch homologe Rekombination inaktiviert wurde (BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>), deuteten darauf hin, dass die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark nicht beeinflusst war (Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a). Jedoch zeigte sich eine zwei- bis dreifache Reduktion der B220<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz (Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a). Genauere Nachuntersuchungen konnten zeigen, dass ein Teil dieser Defizienz an Milz-B-Zellen auf eine Reduktion von transitionellen Knochenmarks-B-Zellen zurückzuführen ist, verursacht durch eine erhöhte Apoptoserate der transitionellen B-Zellen im Knochenmark. Dies führt zu einer verminderten Besiedlung der Milz (Hess et al., 2001; Schubart et al., 2000). Dieser partielle Entwicklungsblock zeigte sich am ersten Regulationspunkt für die negative Selektion von autoreaktiven B-Zellen (Carsetti et al., 1995). Bcl-2-Expression ist in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen, nicht jedoch in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen der Milz reduziert (Brunner et al., 2003a). Die Kreuzung von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>- und Bcl-2<sup>tg</sup>- Mäusen reduzierte die beobachtete Apoptose von B-Zellen, und die Anzahl der B-Zellen in der Milz entsprach der in Bcl-2<sup>tg</sup>-Mäusen. Andere Defekte der BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse, wie das Fehlen der Keimzentren, die reduzierten die Produktion sekundärer Immunglobulin-Isotypen, und der Defekt der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung wurde nicht durch das Bcl-2<sup>tg</sup> beeinflusst.

## Einleitung

---

In unabhängigen Studien zeigte sich, dass die Expression von CD22 auf der Oberfläche von präB-Zellen und unreifen/transitionellen B-Zellen in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen erhöht ist (Samardzic et al., 2002a). CD22 ist ein B-Zell-spezifisches Adhäsions-Molekül, das ab dem präB-Zellstadium exprimiert wird. Die Signaltransduktion durch den B-Zellrezeptor (BCR) in reifen B-Zellen wird durch CD22 negativ beeinflusst, was sich durch eine erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach BCR-Induktion in CD22<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigt (Nitschke et al., 1997). Interessanterweise ist in doppeldefizienten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>CD22<sup>-/-</sup>-Mäusen die Reduktion transitioneller Knochenmarks-B-Zellen des im Vergleich zu BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen weitgehend wiederhergestellt. Die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach BCR-Stimulation ist defekt in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen, und diese Mobilisierung ist in den doppeldefizienten Mäusen ebenfalls korrigiert. Da spätere Defekte in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen, die im Folgenden genauer erläutert werden, auch noch in den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>CD22<sup>-/-</sup>-Mäusen zu beobachten waren, ist ein indirekter Effekt der Negativregulation von CD22 durch BOB.1/OBF.1 auf transitionelle B-Zellen des Knochenmarks wahrscheinlich.

*Die Rolle von BOB.1/OBF.1 für die B1- und Marginalzonen-B-Zellentwicklung.* B1-B-Zellen exprimieren BOB.1/OBF.1, und in verschiedenen BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde, vermutlich aufgrund des unterschiedlichen Mauslinien-Hintergrundes, entweder kein Einfluss, eine Reduktion, eine generelle Erhöhung oder eine Erhöhung der B1a- sowie Reduktion der B1b-B-Zellen gefunden (Andersson et al., 2000; Nielsen et al., 1996; Samardzic et al., 2002a; Kim et al., 2000). NFκB1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen wie BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse einen, wenn auch eindeutig unterschiedlichen, Defekt in der B1-B-Zellpopulation (Ghosh et al., 1998). In doppeldefizienten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>NFκB1<sup>-/-</sup>-Mäusen wiederum zeigen B1a- und B1b-B-Zellen einen deutlicheren Defekt als die Einzeldefizienten, was darauf hinweist, dass die beiden Faktoren nicht-überlappende, komplementäre Funktionen in der B1-B-Zellentwicklung haben (Kim et al., 2000).

Marginalzonen-B-Zellen (MZB-Zellen) schienen in den ursprünglichen Untersuchungen von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen unbeeinflusst (Qin et al., 1998; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a; Kim et al., 1996). Eine spätere detaillierte Untersuchung zeigte, dass MZB-Zellen um

## Einleitung

---

80 % reduziert waren (Samardzic et al., 2002a). Wie in B1-B-Zellen scheint der Defekt abhängig von der untersuchten Mauslinie zu sein. Adaptive Knochenmarktransferstudien ergaben, dass der MZB-Defekt B-Zell-autonom ist. Auch die MZB-Funktion ist gestört, die Zellen reagieren nicht auf das MZB-Zell-spezifische Antigen TNP-Ficoll, und die chemotaktische Zellmigration ist gestört. Dabei könnte die schon zuvor beschriebene Reduktion des BLR1-Rezeptors zum Teil für den Migrations-Defekt verantwortlich sein (Schubart et al., 2001; Samardzic et al., 2002a; Wolf et al., 1998). Reduzierte MZB-Zellzahlen wurden ebenfalls in BAFF<sup>-/-</sup>-Mäusen (B-Zell-Aktivierungsfaktor, Familie der TNF-Faktoren) sowie in Mäusen, die defizient für verschiedene BAFF-Rezeptoren sind, beobachtet (Schiemann et al., 2001). Die mRNA-Expression von zwei BAFF-Rezeptoren, BAFFR und BCMA ist in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert (Samardzic et al., 2002a). Des Weiteren zeigte sich, dass in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen die BCR-Signaltransduktion nach IgM-Stimulation gestört ist (Samardzic et al., 2002b). MZB-Zellentwicklung und Funktion sind also abhängig von BOB.1/OBF.1, womöglich über Antigen-BCR, BLC-BLR1, BAFF-BAFFR und/oder BAFF-BCMA Signaltransduktions-Kaskaden und durch eine gestörte Zellmigration und Sub-Kompartimentalisierung.

*BOB.1/OBF.1 ist notwendig für T-Zell-abhängige Keimzentrumbildung.* Die deutlichsten Defekte in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen sind eine von der Mauslinie unabhängige Reduktion der Zahl reifer Milzzellen und rezirkulierender B-Zellen sowie ein Defekt in primären folliculären B-Zellen, der dazu führt, dass diese keine Keimzentren ausbilden (Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a). Zudem werden nur deutlich reduzierte Mengen Immunglobuline IgG1/2a/2b/3, IgA und IgE nach dem „class-switch“ exprimiert, wobei das „class-switching“ selbst nicht beeinflusst ist (Kim et al., 1996). Der letzt genannte Defekt scheint darauf zurückführbar zu sein, dass die Funktion des 3'-Immunglobulin-Enhancers abhängig von BOB.1/OBF.1 ist (Tang et al., 1999; Stevens et al., 2000b). Außerdem zeigte sich eine Reduktion der Proliferation von reifen B-Zellen nach BCR-Stimulation (Kim et al., 1996). Mäuse, die kein Aiolos exprimieren (ein Transkriptionsfaktor der Ikaros-Familie, welcher eine Rolle in Chromatinremodelling und Histondeacetylierung spielt), zeigen B-

## Einleitung

---

Zellhyperproliferation, eine spontane Antigen-unabhängige Keimzentrumsbildung sowie einen Autoimmunphänotyp, welcher der humanen „systemic lupus erythematosus“-Erkrankung ähnelt. In BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>Aiolos<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlen der SLE-Phänotyp sowie die spontane Keimzentrumsbildung, wahrscheinlich aufgrund der Änderung der B-Zellfunktion, insbesondere des Immunglobulin-Repertoires mit einem daraus resultierenden Verlust der Produktion autoreaktiver Antikörper (Sun et al., 2003).

*BOB.1/OBF.1-regulierte Gene in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen.* Die bisher beschriebenen Defekte in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen lassen vermuten, dass verschiedene Nicht-Immunglobulin-Zielgene für den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Phänotyp verantwortlich sind. Von den bisher erwähnten Kandidatengenen wie Bcl-2 in präB-Zellen, BLR1, BAFFR und BCMA zeigten jedoch alle eine normale Keimzentrumsbildung sowie eine normale T-abhängige Immunantwort. Weitere in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen nicht exprimierte Gene konnten identifiziert werden wie Cdc37, Kcnn4, Lck, Ccylind3, S100a10 (nach BCR Stimulation), B4galt1 und Ms4a11 (nach CD40L-, IL-4-Stimulation). Zumindest für zwei dieser Gene, Kcnn4 und Lck, wurde gezeigt, dass BOB.1/OBF.1 direkt an den jeweiligen Promotor bindet, was eine direkte Regulation vermuten lässt (Kim et al., 2003). Auch wenn sie an Prozessen wie B-Zellproliferation und B-Zelldifferenzierung beteiligt sind, kann keines dieser Gene das Fehlen der Keimzentrumsbildung erklären, im Gegensatz zu BOB.1/OBF.1 selbst sowie auch CD40, CD40L, Bcl-3 oder Bcl-6, eine Reihe von Proteinen welche alle notwendig sind für die Keimzentrumsbildung. Dabei sind Bcl-3 und Bcl-6 nicht dereguliert in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen (Qin et al., 1998), Bcl-2 wird im Keimzentrum bereits herunter reguliert.

*Immunglobulin-Expressionsregulation und -Rekombination in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen.* Neben der bereits erwähnten reduzierten Expression sekundärer Isotypen der Immunglobulingene konnte in neueren Experimenten gezeigt werden, dass spezifische leichte Immunglobulin-κ-Ketten Keimbahntranskripte in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert exprimiert werden. Damit einher geht eine selektive Verminderung der Immunglobulin-κ-V(D)J-Rekombination und somit auch einer Veränderung der Expression von rearrangierten

leichten Immunglobulin-Ketten-Transkripten (Casellas et al., 2002). Demgegenüber scheinen Rearrangement und Transkription der schweren Immunglobulin-Kette nicht beeinflusst zu sein (Schubart et al., 2000). Diese Ergebnisse legen nahe, dass BOB.1/OBF.1-regulierte Immunglobulin-Expression abhängig ist von anderen Sequenzen in der Nähe des Oktamer-Motivs sowie von Unterschieden des konservierten Oktamer-Motivs in spezifischen  $V\kappa$ -Promotoren.

*BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>Oct2<sup>-/-</sup>-doppeltdefiziente Mäuse.* Der Phänotyp von Oct2<sup>-/-</sup>- und BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde bereits beschrieben. In beiden Mäusen ist die Expression der Immunglobulingene nur teilweise beeinflusst, in doppeltdefizienten Mäusen zeigt sich ein ähnlicher Phänotyp wie in den einzeldefizienten Mäusen. Neben der reduzierten Expression sekundärer Immunglobulingene in allen drei Mausmutanten ist kein deutlicher Defekt in der Immunglobulin-Transkription zu beobachten. Das heißt die initiale oktamerabhängige Immunglobulin-Transkription scheint von anderen Faktoren wie Oct1 und weiteren potentiellen Kofaktoren reguliert zu werden (Schubart et al., 2001).

### 1.7 Das klassische Hodgkin-Lymphom

In den letzten Jahren hat das Wissen über die Hodgkin-Lymphome rasch zugenommen. Molekularpathologische Analysen haben ergeben, dass nahezu alle Fälle dieser Erkrankung klonale B-Zellneoplasien darstellen, weshalb mittlerweile die Bezeichnung „Hodgkin-Lymphom“ (HL) anstelle von „Morbus-Hodgkin“ bzw. „hodgkins disease“ verwendet wird. Dabei lassen sich verschiedene Gruppen von Hodgkin-Lymphomen aufstellen. Lymphozyten-prädominante HL (LPHL) unterscheiden sich morphologisch, immunphänotypisch und klinisch von den anderen Formen des HL. Dabei ist neben den typischen morphologischen Befunden (Nodularität) der Immunphänotyp der Tumorzellen (CD20<sup>+</sup>, J-Kette<sup>-</sup>, CD30<sup>-</sup>, CD15<sup>-</sup>, EBV<sup>-</sup>) entscheidend für die Diagnose von LPHL, insbesondere gegenüber anderen Formen des HL. Im Gegensatz dazu weisen die übrigen Formen des HL (noduläre Sklerose,

## Einleitung

---

gemischte Zellularität, lymphozytäre Depletion) einen weitgehend übereinstimmenden Phänotyp auf (CD30<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, EBV<sup>+/-</sup>, CD20<sup>+/-</sup>, J-Kette<sup>-</sup>) und werden daher unter dem Oberbegriff klassischer HL (cHL, „classical Hogkin lymphome“) zusammengefasst. Darüber hinaus fand man Unterschiede im molekularen Verhalten von LPHL und cHL. So zeigt das LPHL oft Zeichen so genannter „ongoing mutations“ innerhalb der Immunglobulingene sowie meist auch Expression von Immunglobulinprotein und RNA (Marafioti et al., 1997; Marafioti et al., 2000), wohingegen diese Merkmale beim cHL regelmäßig fehlen. Da periphere B-Zellen, die keine Immunglobuline exprimieren, physiologischerweise durch Apoptose ausgesiebt werden, dürfte beim cHL der zugrunde liegende Apoptosemechanismus dereguliert sein (Foss et al., 2000).

Über den zellulären Ursprung und die Klonalität von Zellen des cHL-Typs bestand lange Zeit Unklarheit. Die neoplastischen Zellen des cHL, die Hogkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen), welche nur ca. 1 % des cHL-Infiltrats ausmachen, zeigen, wie beschrieben, einen Phänotyp, der dafür spricht, dass sie von B-Zellen abgeleitet sind. Typische B-Zell-spezifische Marker werden jedoch nicht exprimiert, weshalb es lange Zeit unklar war, ob HRS-Zellen tatsächlich von B-Zellen abstammen. Einzelzell-PCR-Studien zeigten jedoch, dass in der Mehrheit der HRS-Zellen ein klonales Rearrangement der schweren und leichten Immunglobulin-Kette vorliegt (Kuppers et al., 1994; Kanzler et al., 1996; Marafioti et al., 1997). Außerdem zeigten die klonalen Immunglobulingene somatische Mutationen, was für einen Keimzentrums-B-Zellursprung der Zellen spricht (Kuppers et al., 1994; Kanzler et al., 1996; Marafioti et al., 1997; Brauninger et al., 1999; Marafioti et al., 1999; Kuppers et al., 2001). HRS-Zellen sind also klonale B-Zell-Lymphome, die vermutlich aus B-Zellen des Keimzentrums entstanden sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HRS-Zellen keine Zellfusionen darstellen (Kuppers et al., 2001). In der Zwischenzeit wurde nachgewiesen, dass bei ca. 1 - 2 % aller HRS-Zellen ein Rearrangement des T-Zellrezeptor- $\gamma$ -Lokus zu finden ist, also eine geringe Anzahl von HRS-Zellen von T-Zellen abstammt (Muschen et al., 2000).

## Einleitung

---

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Studien das Expressionsmuster B-Zell-spezifischer Gene in HRS-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass den HRS-Zellen eine Reihe B-Zell-spezifischer Marker (z. B. CD19, CD79 $\alpha$ , CD20) ebenso wie zahlreiche B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren fehlen (z. B. Pu.1, E47/E12, EBF) (Jundt et al., 2002b; Hertel et al., 2002). Pax5 wird in HRS-Zellen exprimiert (Hertel et al., 2002; Foss et al., 1999), jedoch teilweise auf sehr niedrigem Niveau. Pax5<sup>-/-</sup>-proB-Zellen exprimieren, ebenso wie HRS-Zellen, CD15, c-fms und Perforin (Schebesta et al., 2002a; Mikkola et al., 2002). Wie oben beschrieben, sind diese fehlenden Faktoren entscheidend an der B-Zellentwicklung beteiligt. Genexpressions-Analysen mit Affymetrix-Genchips (Kuppers et al., 2003; Schwering et al., 2003a) sowie SAGE-Analysen („serial analysis of gene expression“) (Schwering et al., 2003a; Schwering et al., 2003b) zwischen normalen B-Zellen und HRS-Zelllinien untermauerten die Beobachtung, dass in HRS-Zellen das normale B-Zell-Expressionsprogramm generell dereguliert ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch aktives Notch1 in HRS-Zellen exprimiert wird (Jundt et al., 2002a), was für eine Herunterregulierung von E2A verantwortlich sein kann, womit die Deregulierung des B-Zell-Programms erklärt werden könnte (Pui et al., 1999).

HRS-Zellen vom cHL-Typ exprimieren, wie bereits erwähnt, keine funktionelle Immunglobulin-mRNA. Ein mögliches Erklärungsmodell dafür beruht auf der Beobachtung, dass in zahlreichen Fällen durch inaktivierende Mutationen (z. B. Einfügen eines Stop-Codons) ein nicht-funktionelles Immunglobulin vorliegt (Kuppers et al., 1994; Kanzler et al., 1996). Für ein verlängertes Überleben von Keimzentrums-B-Zellen ist die Selektion über einen funktionellen B-Zellrezeptor notwendig. Dabei entgehen die Zellen der Apoptose durch die Expression anti-apoptotischer Gene wie Bcl-x<sub>L</sub>, mcl1 und evtl. Bcl-2, um dann zu Gedächtnis- oder Plasmazellen zu differenzieren. In HRS-Zellen könnten andere Mechanismen oder eine alternative Aktivierung der BCR-Signalwege zu einer Induktion der Proliferation führen. Es wurde gezeigt, dass HRS-Zelllinien eine konstitutiv hohe Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B aufweisen (Bargou et al., 1996). Dieser Effekt ist zumindest in einigen Fällen durch die Expression eines mutierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins zu erklären, welches

nicht mehr in der Lage ist, die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zu inhibieren (Jungnickel et al., 2000). Die konstitutive NF $\kappa$ B-Aktivität ist beteiligt an Zellproliferation und Inhibierung der Apoptose in HRS-Zellen (Bargou et al., 1997; Emmerich et al., 1999; Krappmann et al., 1999). Dabei gibt es Hinweise, dass TRAFs die NF $\kappa$ B-Aktivität in HRS-Zellen auf verschiedene Weise beeinflussen könnten (Krappmann et al., 1999; Kilger et al., 1998; Horie et al., 2002a; Horie et al., 2002b): (i) CD40-Signale verhindern Apoptose in BCR-negativen HRS-Zellen, aktiviert durch CD40L auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (ii) CD30-Aktivierung in HRS-Zellen oder (iii) TNF- $\alpha$ , Lymphotoxin- $\alpha$  und RANK, exprimiert von HRS-Zellen, könnten autokrin durch eine Bindung an ihren eigenen Rezeptor wirken. TRAF1 und A20, zwei anti-apoptotischer Faktoren der TRAF-Familie, sind stark in HRS-Zellen exprimiert, was vermuten lässt, dass sie eine Rolle bei der cHL-Pathogenese spielen (Durkop et al., 2003). Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass IL13 als autokriner Wachstums- und Überlebens-Faktor in HRS-Zellen wirken könnte (Skinnider et al., 2001; Skinnider and Mak, 2002; Skinnider et al., 2002).

### 1.8 Ziele und Motivation der Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben, sind eine Reihe verschiedener Faktoren an der Vermittlung transkriptioneller Aktivität vom Oktamer-Motiv in B-Zellen beteiligt. Dabei zeigte sich zunächst, dass die in B-Zellen exprimierten Oktamer-Motiv-bindenden Transkriptionsfaktoren Oct1 und Oct2 nicht allein für die Vermittlung von transkriptioneller Aktivität ausreichen. Es wurden daher zusätzliche Koaktivatoren postuliert. BOB.1/OBF.1 wurde als ein solcher Koaktivator identifiziert, der B-Zell-spezifisch exprimiert wird und in der Lage ist, über eine Interaktion mit Oct1 oder Oct2 oktamerabhängige Transkription zu vermitteln. Des Weiteren wurde ein zweiter Koaktivator postuliert, der für die Vermittlung transkriptioneller Aktivität aus distaler Enhancer-Position verantwortlich ist, da BOB.1/OBF.1 nur die transkriptionelle Aktivität von proximalen Promotoren reguliert. Ein solcher Faktor konnte bislang nicht identifiziert werden. Zwar war bekannt, dass

## Einleitung

---

BOB.1/OBF.1 in der Lage ist, transkriptionelle Aktivität zu vermitteln, jedoch war unklar, ob BOB.1/OBF.1 allein dafür verantwortlich ist, oder ob es eventuell andere Faktoren gibt, die beim Fehlen von BOB.1/OBF.1 dessen Funktion übernehmen können. Diese Frage stellte sich umso mehr, da BOB.1/OBF.1-Expression zwar in allen B-Zellentwicklungsstadien zu finden ist und die BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse dabei einen starken Defekt in der späten B-Zellentwicklung zeigen, jedoch nur einen wesentlich schwächeren Defekt in der frühen B-Zellentwicklung. Dies lässt vermuten, dass die Funktion von BOB.1/OBF.1 durch einen anderen Koaktivator übernommen werden könnte.

Neben dieser noch ungeklärten Relevanz/Redundanz von BOB.1/OBF.1 für oktamerabhängige Transkription sollte des Weiteren in dieser Arbeit untersucht werden, welche Gene von BOB.1/OBF.1 reguliert werden. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigen BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse einen deutlichen Defekt in der späten B-Zellentwicklung. BOB.1/OBF.1-Expression kann in Keimzentrumzellen durch verschiedene Stimuli induziert werden. BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine Reduktion der transitionellen sowie der MZB-Zellen, keine Keimzentren sowie eine reduzierte Expression verschiedener Immunglobulin-Isotypen. BOB.1/OBF.1 ist ein transkriptioneller Koaktivator, wahrscheinlich ist also eine reduzierte Expression von BOB.1/OBF.1-Zielgenen verantwortlich für den beobachteten Phänotyp in den defizienten Mäusen. Um BOB.1/OBF.1-Gene zu identifizieren, ist es nötig, zwei Zellpopulationen auf differentielle Genexpression zu untersuchen, die sich nur in der BOB.1/OBF.1-Expression unterscheiden. Da die BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Keimzentrum-B-Zellen mehr besitzen, ist es nicht möglich, Zellen dieses Entwicklungsstadiums zu untersuchen. Daher sollten präB-Zellen aus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Abelsonvirus-Infektion immortalisiert werden. In diesen Zellen soll eine konditionale Version des Proteins eingeführt werden, um BOB.1/OBF.1-regulierte Zielgene zu identifizieren. Des Weiteren sollen diese BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen mit induzierbarer BOB.1/OBF.1-Aktivität verwendet werden, um die oben beschriebene Frage nach der Redundanz des BOB.1/OBF.1-Koaktivators für die Vermittlung oktamerabhängiger Transkription zu untersuchen. In der Vergangenheit wurden mehrere konditionale Systeme

## Einleitung

---

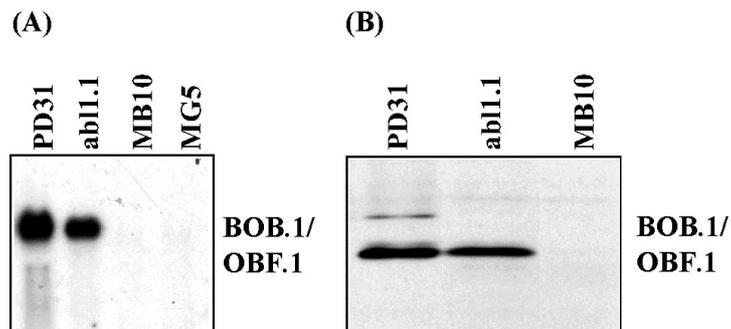
beschrieben, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen (Spencer, 1996; Porter, 1998). Ein vielfach verwendeter Ansatz war die Herstellung von chimären Proteinen, die eine Fusion der Liganden-Bindungsdomäne von Steroidrezeptoren mit dem zu untersuchenden Protein darstellten (Mattioni et al., 1994). Die Hormon-regulierbaren, chimären Proteine (z. B. Myc-ER und Oct2-ER) wurden in einer Vielzahl von Zellkultursystemen erfolgreich verwendet, unter anderem zur Identifizierung von Zielgenen verschiedener Transkriptionsfaktoren (Eilers et al., 1989; Pfisterer et al., 1994).

Wie in der Einleitung beschrieben, exprimieren HRS-Zellen keine Immunglobulin-mRNA, was im Widerspruch zu ihrer B-Zellherkunft steht. Ein von Rajewsky vorgeschlagenes Modell geht davon aus, dass in HRS-Zellen keine Immunglobulingene exprimiert werden, da die Gene durch inaktivierende Mutationen so verändert sind (zum Beispiel durch die Einführung eines Stopcodons), dass Immunglobulingene nicht exprimiert werden können. Dem widerspricht, dass im Rahmen einer Kooperation mit Prof. H. Stein (Berlin) gezeigt werden konnte, dass es HRS-Zellen gibt, die einen Immunglobulin-Lokus besitzen, der funktionell rearrangiert ist und exprimiert werden könnte; jedoch auch diese Zellen zeigen keine Immunglobulin-Expression. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Transkription von Immunglobulingenen defekt ist. In Transfektions-Experimenten in HRS-Zelllinien soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob tatsächlich die Transkription von Immunglobulin-Promotor-regulierten Reportern defekt ist und welche Transkriptionsfaktoren dafür verantwortlich sein könnten.

## 2. ERGEBNISSE

### 2.1 BOB.1/OBF.1 ist essentiell für oktamerabhängige und Immunglobulin-Reporter-gen-Transkription in B-Zellen

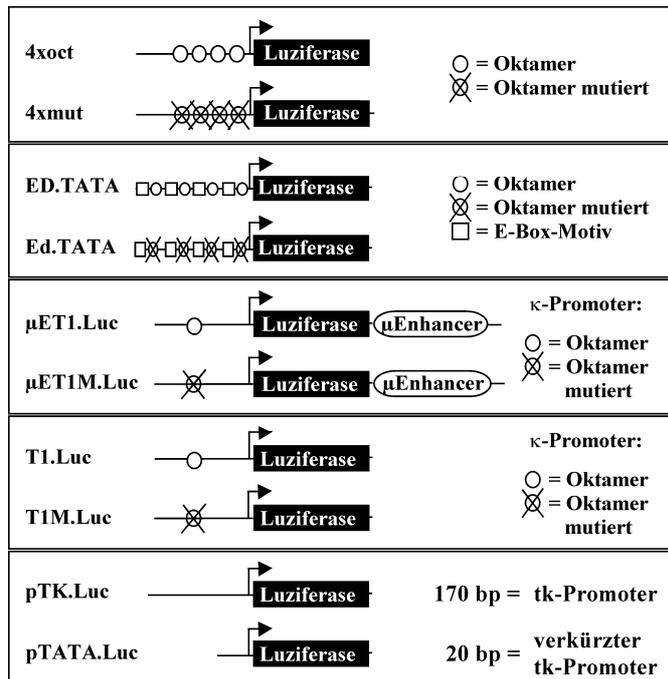
Das Oktamer-Motiv ist in Promotoren zahlreicher Gene zu finden. So spielt es zum Beispiel im Immunglobulin-Promotor eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Expression von Immunglobulinen. Es sind drei Faktoren bekannt, die in B-Zellen an der Regulation der oktamerabhängigen Transkription beteiligt sind: (I) der Transkriptionsfaktor Oct1 (ubiquitär exprimiert und zeigt keine starke transkriptionelle Aktivität), (II) der Transkriptionsfaktor Oct2 (B-Zell-spezifisch exprimiert und zeigt transkriptionelle Aktivität) sowie (III) der transkriptionelle Koaktivator BOB.1/OBF.1 (B-Zell-spezifisch exprimiert, transkriptionell aktiv nach Bildung eines ternären Komplexes mit Oct1 oder Oct2 an der DNA). Bislang konnte nur indirekt im zellfreien System gezeigt werden, dass BOB.1/OBF.1 ein entscheidender Faktor bei der Transaktivierung vom Oktamer-Motiv ist (Luo et al., 1992). Aus diesem Grund wurde hier die Aktivität von BOB.1/OBF.1 in einem Zellsystem untersucht, in dem BOB.1/OBF.1 natürlicherweise exprimiert wird, sowie die Rolle von BOB.1/OBF.1 durch die vergleichende Analyse von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen gegen Wildtyp-Zellen ermittelt.



**Abbildung 3: BOB.1/OBF.1-Expression in wildtypischen, Oct2<sup>-/-</sup>- und BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zelllinien.** Northernblot-Analyse mit einer BOB.1/OBF.1-spezifischen Probe und 10 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien. (B) Protein-Immunblot-Analyse mit 100 µg Gesamtzellproteinextrakt der jeweiligen Zelllinien (PD31 = Abelsonvirus-transformierte präB-Zellen; ab11.1 = Abelsonvirus-transformierte Oct2<sup>-/-</sup>-präB-Zellen; MB10 und MG5 = Abelsonvirus-transformierte BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen).

### 2.1.1 Bei fehlender BOB.1/OBF.1-Expression ist in präB-Zellen keine oktamerabhängige Transkription zu detektieren

PräB-Zelllinien aus dem Knochenmark von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen (Nielsen et al., 1996) wurden von Dr. P. Nielsen (Freiburg) mit Abelsonvirus transformiert und für die weiteren Experimente zur Verfügung gestellt. Als Einzelklone kultivierte Zellen wurden auf die Expression der präB-Zell-spezifischen Gene RAG.1, RAG.2, λ5 und Ikaros getestet (Dr. P. Nielsen), um sicherzustellen, dass die Zellen präB-Zellen entsprechen. Northernblot-Analysen und Protein-Immunblot-Analysen zeigten, dass in den Zelllinien aus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen (MB10, MG5), im Vergleich zu wildtypischen präB-Zellen (PD31) und Oct2<sup>-/-</sup>-präB-Zellen, (abl1.1) kein BOB.1/OBF.1 exprimiert wird (Abb.3).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Immunglobulin-Promotor/Enhancer-Reporter.** Die Expression des Luziferasegens wird durch ein vierfach multimerisiertes Oktamer-Motiv (4xmut), durch 130 bp des Immunglobulin-κT1-Promotors (T1.Luc), durch eine Kombination des Immunglobulin-κT1-Promotors mit 1000 bp des intronischen Enhancers (μ-Enhancers) der schweren Immunglobulin-Kette (μET1.Luc), durch 170 bp des Thymidinkinase-Promotors (pTK.Luc) reguliert oder durch die entsprechenden hier dargestellten mutierten Promotoren.

Zur Analyse des Effekts von BOB.1/OBF.1-Defizienz auf die oktamerabhängige Promotoraktivität wurden zwei verschiedene synthetische Promotorkonstrukte verwendet. Einer dieser Reporter besteht aus einem Luziferasegen unter der Kontrolle von vier hintereinander geschalteten Oktamer-Motiven vor einer TATA-Box (als 4xoct bezeichnet,

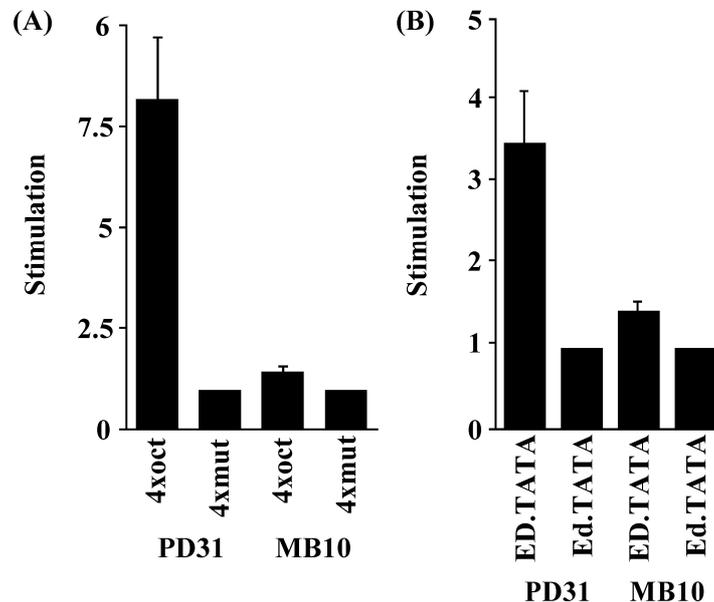
## Ergebnisse

---

Abb.4). Beim zweiten Reporter ist das Luziferasegen unter der Kontrolle von vier hintereinander geschalteten kurzen DNA-Sequenzen, die jeweils ein Oktamer-Motiv und ein E-Box-Motiv aus dem intronischen Enhancer der schweren Immunglobulin-Kette ( $\mu$ Enhancer) enthalten (als ED.TATA bezeichnet, Abb.4). Für beide Reporter gibt es einen entsprechenden Reporter, bei dem die Oktamer-Motive so mutiert wurden, dass die Oct-Transkriptionsfaktoren nicht mehr an das Motiv binden können (4xmut und Ed.TATA, Abb.4). Die Aktivität dieser beiden Reporterpaare ist nahezu vollständig abhängig von dem multimerisierten Oktamer-Motiv. Dies wurde durch Transfektion der wildtypischen präB-Zelllinie PD31 mit diesen Reportern bestätigt. In diesen Zellen zeigen die synthetischen oktamerabhängigen Promotoren (4xoct bzw. ED.TATA) eine signifikant höhere Aktivität als die entsprechenden Promotoren mit den mutierten Oktamer-Motiven (4xmut bzw. Ed.TATA) (Abb.5). In diesem Experiment wurden die für die Reporter mit mutiertem Oktamer-Motiv gemessenen Werte für jedes Reporterpaar jeweils gleich eins gesetzt. Wurden jedoch die gleichen Promotorkonstrukte in die BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zelllinien transfiziert, zeigte der Promotor mit Oktamer-Motiven nur eine sehr geringe Aktivität. Die Aktivität der Promotoren mit den mutierten Oktamer-Motiven war im Vergleich zu den jeweiligen wildtypischen Promotoren nicht wesentlich durch die Mutationen verringert (Abb.5, nur die Daten für die MB10-Zelllinie sind dargestellt, die gleichen Ergebnisse wurden mit der MG5-Zelllinie erzielt). Das heißt, in den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen liegt ein Defekt in der oktamerabhängigen Transkription vor.

Zunächst stellte sich die Frage, ob dies ein spezifischer Effekt war, das heißt, ob nur die oktamerabhängige Transkription in den Zellen defekt ist oder ob eventuell ein genereller Transkriptionsdefekt vorliegt. Um dies zu klären, wurden die Zellen zur Kontrolle mit den Promotorkonstrukten pTK.Luc und pTATA.Luc transfiziert, die nicht oktamerabhängig reguliert sind (pTK.Luc = 109 bp des Herpes-Simplex Thymidinkinase-Promotors; pTATA.Luc = TATA-Box des pTK.Luc Reporters; Abb.4). Der pTK.Luc-Reporter zeigte dabei eine deutlich höhere Aktivität als der pTATA.Luc-Reporter, wobei kein Unterschied in der transkriptionellen Aktivität zwischen wildtypischen und BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen

festzustellen war (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass kein genereller Transkriptionsdefekt vorliegt, sondern tatsächlich spezifisch die Aktivität oktamerabhängiger Promotoren in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen gestört ist.



**Abbildung 5: BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen haben keine oktamerabhängige Promotoraktivität.** (A + B) Transiente Transfektion von PD31- und MB10-Zellen mit oktamerabhängigen Reporterplasmiden. Die Zellen wurden mit jeweils 15 µg der angegebenen DNAs transfiziert. Die PD31-Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 0,5 µg CMV-lacZ, MB10-Transfektionen durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. Für jede Zelllinie wurde der Wert für den jeweiligen mutierten Reporter gleich eins gesetzt (4xmut oder Ed.TATA). Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar. (PD31 = Abelsonvirus-transformierte präB-Zellen; MB10 = Abelsonvirus-transformierte BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen).

### 2.1.2 Ein BobER-Fusionsprotein vermittelt oktamerabhängige Transkription in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen

Der Defekt in der oktamerabhängigen Transkription könnte eine direkte Folge der Abwesenheit von BOB.1/OBF.1 sein. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Zelllinien zusätzliche sekundäre Mutationen oder andere epigenetische Veränderungen erworben haben, die für den beobachteten Effekt verantwortlich sind. Um diese Frage direkt zu beantworten, wurde ein regulierbares BOB.1/OBF.1-Allel in die BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen wieder eingeführt. Das komplette offene Leseraster des BOB.1/OBF.1-Koaktivators wurde mit einer

## Ergebnisse

---

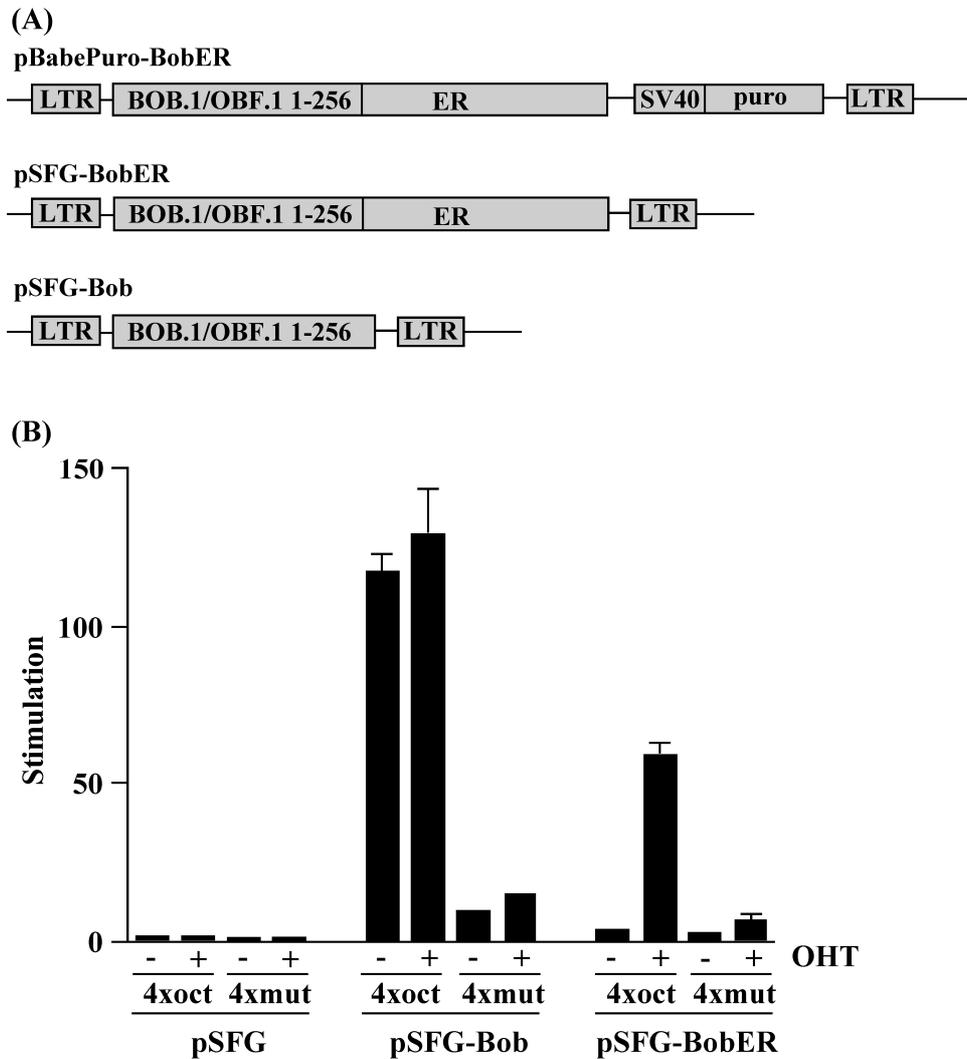
Punktmutante der Hormonbindungsdomäne des Maus-Östrogenrezeptors fusioniert, welche nicht mit dem natürlichen Hormon, sondern nur mit dem synthetischen Hormon Hydroxytamoxifen (OHT) interagiert (Abb.6A). Dieses BobER-Fusionsprotein wurde zunächst in transienten Transfektionen in NIH/3T3-Fibroblastenzellen getestet, die nur Oct1 exprimieren, jedoch kein endogenes BOB.1/OBF.1. Dementsprechend sind die transfizierten oktamerabhängigen Reporter nicht aktiv (Abb.6B).

Eine Kotransfektion des basalen Expressionsvektors (pSFG) zusammen mit dem oktamerabhängigen Promotor zeigte keine Stimulation dieses Promotors, wohingegen die Kotransfektion eines wildtypischen BOB.1/OBF.1-Expressionsvektors (pSFG-Bob.1) zu einer starken Induktion oktamerabhängiger Aktivität führte. Dabei war diese Aktivität hormonunabhängig. Bei einer Kotransfektion dieser Zellen mit dem Vektor pSFG-BobER konnte nur eine geringe basale Aktivität des oktamerabhängigen Promotors festgestellt werden (Abb.6B). Wurden diese Zellen jedoch mit Hydroxytamoxifen stimuliert, konnte die transkriptionelle Aktivität signifikant induziert werden. Dies zeigt, dass das BobER-Fusionsprotein eine hormonregulierte BOB.1/OBF.1-Aktivität vermitteln kann.

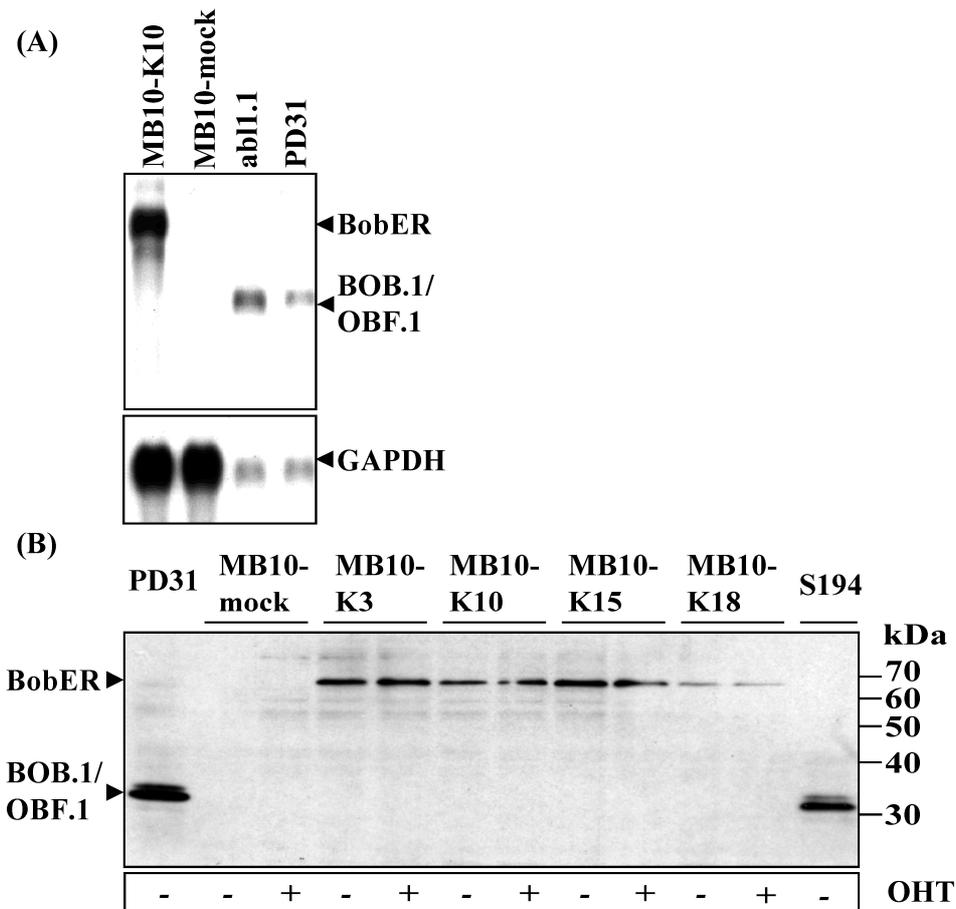
Für die weiteren Analysen der Transkriptionsmechanismen in den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen sollte das beschriebene BobER-Fusionsprotein stabil in die MB10-Zelllinie eingeführt werden. Da die Zellen sich nur mit einer sehr geringen Effizienz transfizieren ließen, war die Herstellung von BobER-stabilen Zelllinien durch Transfektion nicht möglich. Aus diesem Grund sollten die Zellen mit einem Retrovirus, welches das BobER-Allel trägt, infiziert werden. Die in den NIH/3T3-Experimenten für die transienten Transfektionen verwendeten proviralen Plasmid-DNAs wurden in eine geeignete Verpackungszelllinie (Phoenix-Ampho) zur Herstellung von Viren, die das BobER-Gen enthalten, transfiziert. Der retrovirale Überstand wurde verwendet zur Infektion der BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen parallel mit einem Virusüberstand infiziert, der nur den basalen Ausgangsvektor enthielt. Durch Puromycinselektion in Softagar wurden verschiedene Einzelklone etabliert. Um herauszufinden, ob die Puromycin-resistenten Zellen auch das

## Ergebnisse

BobER-Fusionsprotein exprimieren, wurden alle etablierten Einzelklone durch Protein-Immunblot-Analyse und Northernblot-Analyse auf BobER-RNA- und -Protein-Expression getestet.



**Abbildung 6: Herstellung und Charakterisierung eines konditionalen BOB.1/OBF.1-Proteins.** (A) Schematische Darstellung der Expressionsvektoren des konditionalen BobER-Fusionsproteins (Aminosäuren 1-256 des BOB.1/OBF.1-Proteins fusioniert mit einer mutierter Östrogenrezeptor-Hormonbindungsdomäne (ER) die nur noch das synthetische Hormon Hydroxytamoxifen (OHT) bindet). Der pSFG-BobER-Vektor wurde für transiente Transfektionen, der pBabePuro-BobER-Vektor für die Herstellung von Zellklonen, die stabil BobER exprimieren, verwendet. (B) Transiente Kotransfektion von NIH/3T3-Fibroblastenzellen mit 10 µg pSFG-Bob oder pSFG-BobER zusammen mit je 10 µg 4xoct oder 4xmut oktamerabhängigen Reportervektoren. Je 0.5 µg CMV-lacZ wurde zum Normalisieren der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit 200 nM OHT, wie angezeigt, stimuliert und weitere 24 h später zur Luziferasemessung geerntet. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

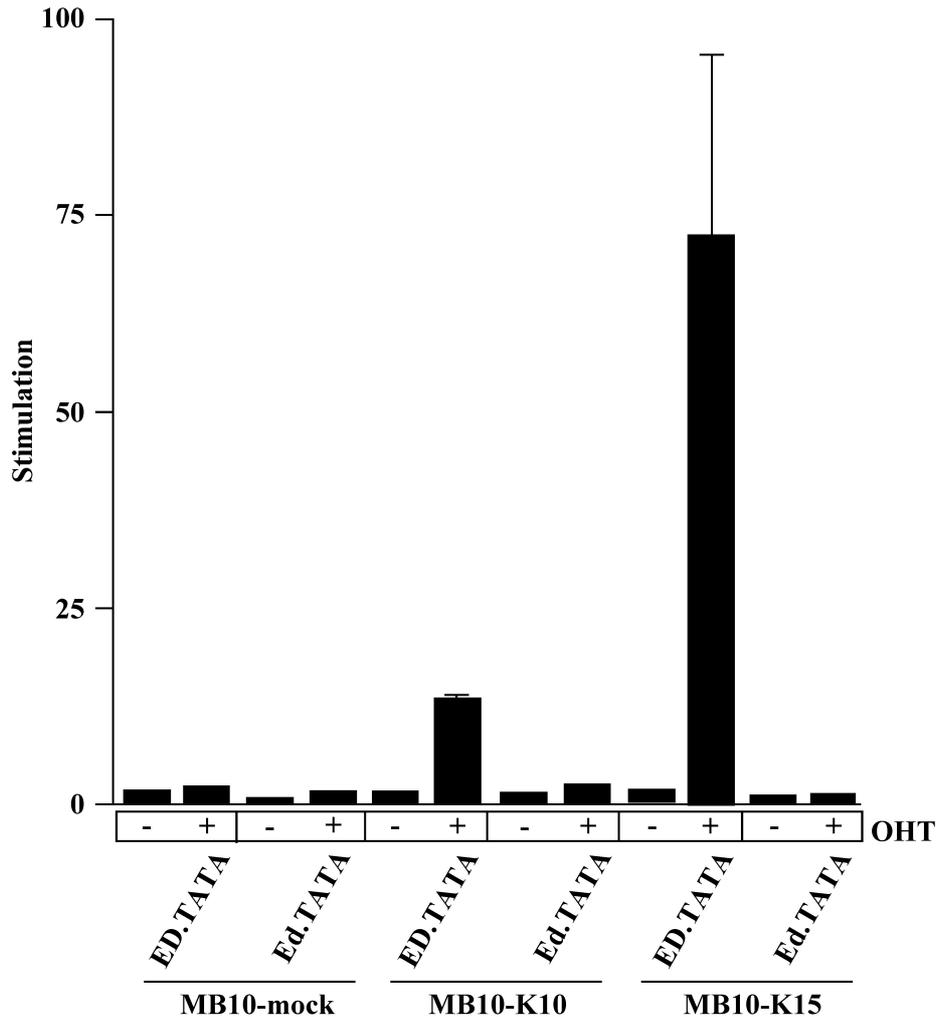


**Abbildung 7: Stabile Expression des konditionalen BobER-Fusionsproteins in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen.** (A) Northernblot-Analyse mit einer BOB.1/OBF.1-spezifischen Probe und 10 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien. (B) Protein-Immunblot-Analyse mit 100 µg Gesamtzellproteinextrakt der jeweiligen Zelllinien. (PD31 = Abelsonvirus-transformierte präB-Zellen; abl1.1 = Abelsonvirus-transformierte Oct2<sup>-/-</sup>-präB-Zellen; MB10 = Abelsonvirus-transformierte BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen; MB10-mock = MB10-Zellen infiziert mit Leervektor; MB10-K3, -K10, -K15, -K18 = MB10-Zelleinzelklone infiziert mit BobER; S194 = Plasmazytomazelllinie).

Tatsächlich zeigten die mit dem BobER-Virus infizierten Zellklone MB10-K3, MB10-K10, MB10-K15 und MB10-K18 sowohl eine BobER-RNA der erwarteten Größe (Abb.7A) als auch ein BobER-Protein von ca. 70 kDa Größe (Abb.7B), welches weder in den parentalen MB10-Zellen noch in den MB10-mock-Zellen (die mit dem basalen Vektor infiziert wurden) zu finden war. Der Größenunterschied zum wildtypischen BOB.1/OBF.1-Protein erklärt sich durch die Fusion der Hormonbindungsdomäne. Wurden diese BobER-Zellen mit dem Hormon Hydroxytamoxifen stimuliert, so änderte sich die Menge des Proteins nicht. Die Expression des Fusionsproteins wird also nicht vom Hormon reguliert. Vielmehr ist das Fusionsprotein immer in der Zelle exprimiert. Dabei sollte jedoch seine Aktivität durch eine

## Ergebnisse

Interaktion der Hormonbindungsdomäne mit einem Proteinkomplex, der das Hsp90-Protein enthält, in Abwesenheit des Hormons inhibiert werden. Bei Zugabe von Hydroxytamoxifen bindet das Hormon an die Hormonbindungsdomäne, verhindert damit die Bindung an den Hsp90-Proteinkomplex, und das an die Hormonbindungsdomäne fusionierte BOB.1/OBF.1 sollte transkriptionell aktiv werden.



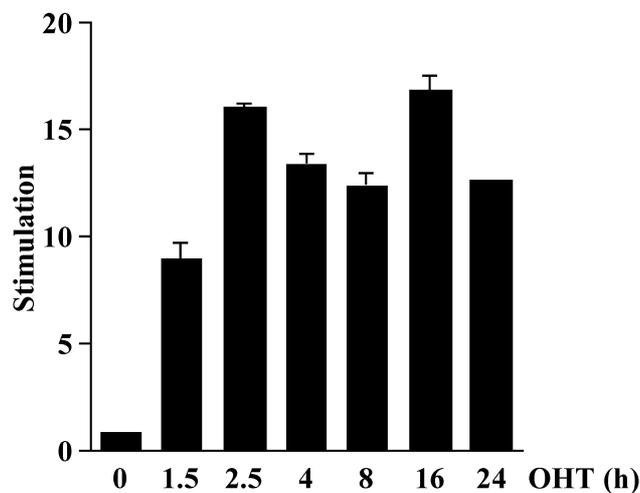
**Abbildung 8: Konditional-regulierbare Rekonstitution der oktamerabhängigen Promotoraktivität in B-Zellen.** Transiente Transfektion von BobER-infizierten (MB10-K10, MB10-K15) und mit Leervektor infizierten (MB10-mock) Abelsonvirus-transformierten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklonen mit oktamerabhängigen Reporterkonstrukten. Die Zellen wurden mit jeweils 15 µg des angegebenen Reporterplasmids transfiziert und entweder mit 200 nM OHT induziert oder nicht. Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität des uninduzierten Ed.TATA-Vektors (Oktamer-Motiv mutiert) wurde für jede Zelllinie gleich eins gesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

Um zu testen, ob in Abwesenheit von Hydroxytamoxifen das BobER-Fusionsprotein tatsächlich nicht transkriptionell aktiv ist, wurden die BobER-präB-Zellen (MB10-K10,

## Ergebnisse

---

MB10-K15) mit den oben beschriebenen oktamerabhängigen bzw. im Oktamer-Motiv mutierten Reportern transfiziert. Dabei konnte kein Unterschied in der Promotoraktivität festgestellt werden (Abb.8). Zudem war die Aktivität identisch mit derjenigen in Zellen, die mit dem basalen Expressionsvektor infiziert wurden (MB10-mock). Das heißt, die geringe basale transkriptionelle Aktivität des BobER-Konstrukts, die in transienten Transfektionen in NIH/3T3-Fibroblastenzellen beobachtet wurde, war in den stabil mit BobER infizierten präB-Zellen nicht vorhanden. Durch Zugabe des Hormons Hydroxytamoxifen sollte nun das transkriptionell inaktive BobER-Fusionsprotein aktiviert werden. Wurden die Zellklone mit den oktamerabhängigen Reportern transfiziert und dabei zusätzlich mit Hydroxytamoxifen stimuliert, wurde spezifisch die Aktivität eines wildtypischen oktamerabhängigen Promotors in den BobER-präB-Zellen induziert (Abb.8). Diese Induktion des oktamerabhängigen Reporters erfolgt höchstwahrscheinlich durch eine direkte Bindung von BobER an Oct1 und/oder Oct2.



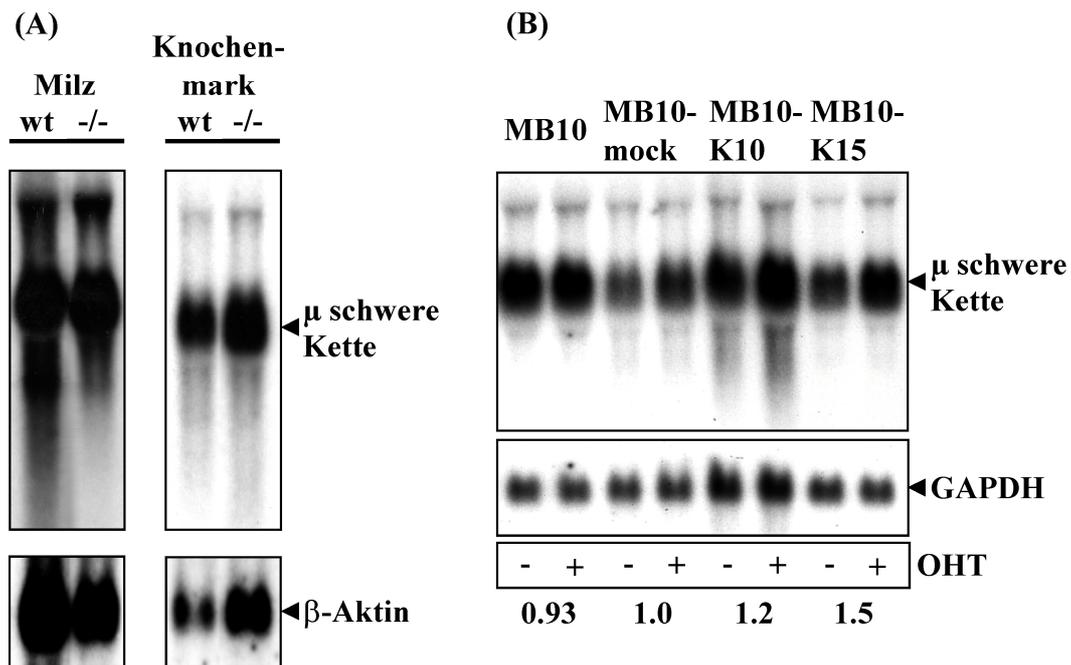
**Abbildung 9: Zeitkinetik der Induktion oktamerabhängiger Promotoraktivität durch BobER.** Sieben transiente Transfektionen von MB10-K10-Zellen (Abelsonvirus-transformierter BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER) mit je 15 µg ED.TATA-Vektor und 50 ng pRL-TK wurden gepoolt und danach auf sieben Gewebekulturschalen verteilt und wie angegeben mit 200 nM OHT induziert sowie nach den beschriebenen Zeitpunkten zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

Um zu zeigen, ob der beobachtete Effekt direkt oder indirekt durch BobER-reguliert wird, wurde eine Induktionskinetik mit den MB10-K10-BobER-präB-Zellen durchgeführt, wobei die Luziferaseaktivität des Reporters zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation durch

das Hormon Hydroxytamoxifen gemessen wurde. Dabei zeigte sich, dass die oktamerabhängige Aktivität schon nach 1,5 h zu 50 % und nach 3 h Aktivierung von BobER durch das Hormon maximal aktiviert werden konnte (Abb.9). Da das Reporter-gen-Experiment neu gebildete Luziferaseproteine misst, kann man aufgrund der schnellen Induktion davon ausgehen, dass die Induktion des oktamerabhängigen Reporters direkt durch eine Bindung von BobER an Oct1 bzw. Oct2 am Oktamer-Motiv der Reporter erfolgt und nicht durch die Induktion eines weiteren Faktors. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von oktamerabhängiger Promotoraktivität in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen eine direkte Konsequenz des Fehlens von BOB.1/OBF.1 ist.

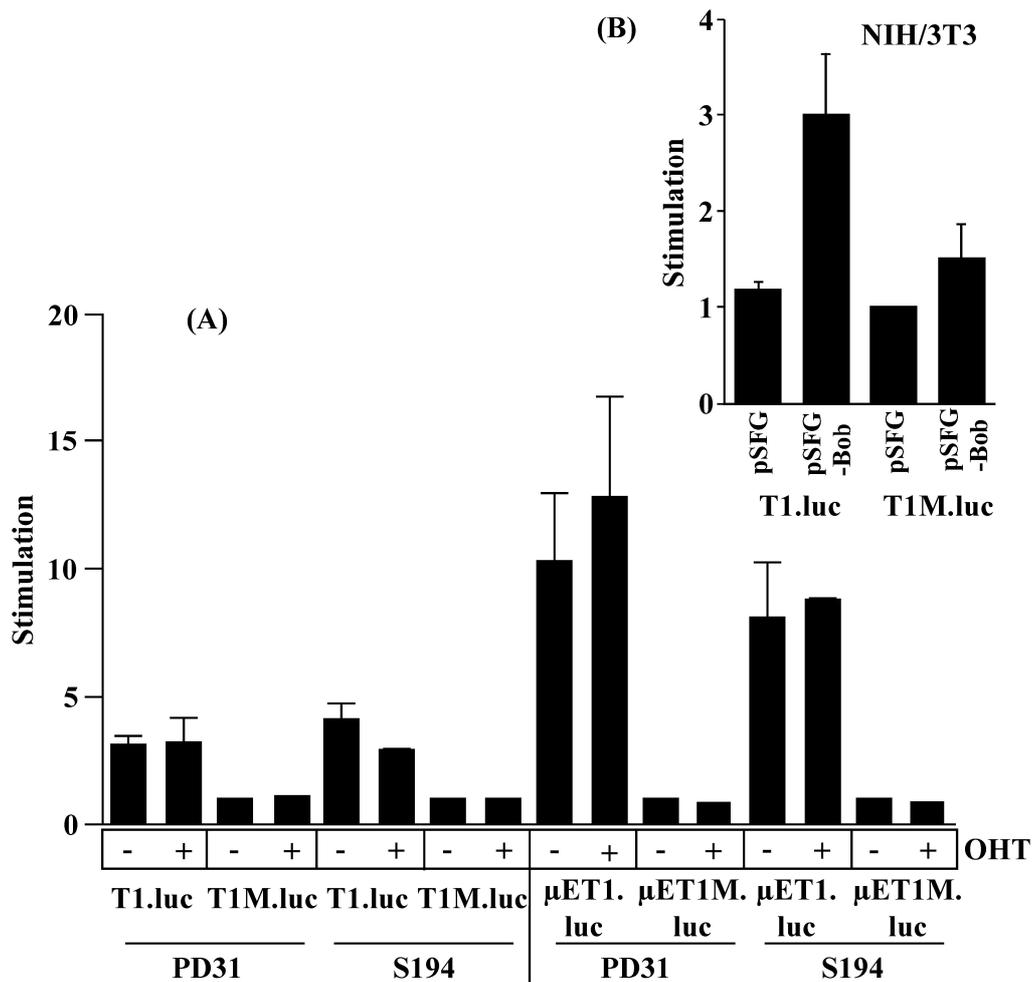
### **2.1.3 Auch ein Immunglobulin-Promotor-regulierter Reporter ist abhängig von BOB.1/OBF.1-Expression**

In primären BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen ist die Expression endogener Immunglobulingenen nicht wesentlich reduziert (Kim et al., 1996). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich im Northernblot-Experiment, dass die Expression der schweren Immunglobulin- $\mu$ -Kette in der Milz und im Knochenmark von wildtypischen, verglichen mit BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen, auf RNA-Ebene nicht reduziert ist (Abb.10A). Die im vorigen Kapitel beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass BOB.1/OBF.1 essentiell ist für die oktamerabhängige Reporter-gen-Transkription. Weiterhin ist bekannt, dass das Oktamer-Motiv im Promotor der Immunglobulingene eines der entscheidenden regulatorischen Elemente ist. Es stellte sich also die Frage, warum die Expression von endogenen Immunglobulingenen in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen, wie oben gezeigt, nicht deutlich verändert wird. Auch wenn das Oktamer-Motiv im Immunglobulin-Promotor ein wesentliches Element ist, so ist es doch nicht das einzige regulatorische Element in den Promotoren und Enhancern der Immunglobulingene. Es wurde daher spekuliert, dass die komplexe Struktur der regulatorischen Immunglobulin-Elemente genügend redundante Elemente enthält, um das Fehlen von BOB.1/OBF.1 zu kompensieren.



**Abbildung 10: Expression der endogenen schweren Immunglobulin-Kette in Milz, Knochenmark und Zelllinien aus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Northernblot-Analyse mit einer Probe, welche die schwere Immunglobulin-Kette ( $\mu$ ) erkennt und zur Ladekontrolle nachträglich mit einer  $\beta$ -Aktin- oder GAPDH-Probe hybridisiert wurde. (A) Jeweils 15  $\mu$ g Gesamtzell-RNA aus Knochenmark und Milz von wildtypischen Mäusen und aus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen. (B) Je 10  $\mu$ g Gesamtzell-RNA der jeweiligen Zelllinien. Wie angegeben für 20 h mit 200 nM OHT induziert. Zusätzlich angegeben, um welchen Faktor die OHT-Stimulation die  $\mu$ -Expression in Relation zur GAPDH-Expression induziert hat (MB10 = Abelsonvirus-transformierte BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen; MB10-mock = MB10-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K10, -K15 = MB10-Zelleinzelklone infiziert mit BobER).

Um diese Problematik näher in einem klar definierten System zu analysieren, wurden verschiedene Reporterkonstrukte, die von Immunglobulin-regulatorischen Elementen kontrolliert werden, in den BobER-präB-Zellen untersucht. Die verwendeten Immunglobulin-Reporter enthielten den Promotor einer variablen Region (Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor) der leichten Immunglobulin-Kette allein (T1.Luc, Abb.4) oder zusätzlich den Enhancer aus dem Intron ( $\mu$ Enhancer) der schweren Immunglobulin-Kette ( $\mu$ ET1.Luc, Abb.4). Um eine spezifische Promotoraktivität zu detektieren, wurden als Kontrolle entsprechende Konstrukte verwendet, die durch eine Mutation des Oktamer-Motivs im Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotors inaktiviert wurden (T1M.Luc und  $\mu$ ET1M.Luc, Abb.4).

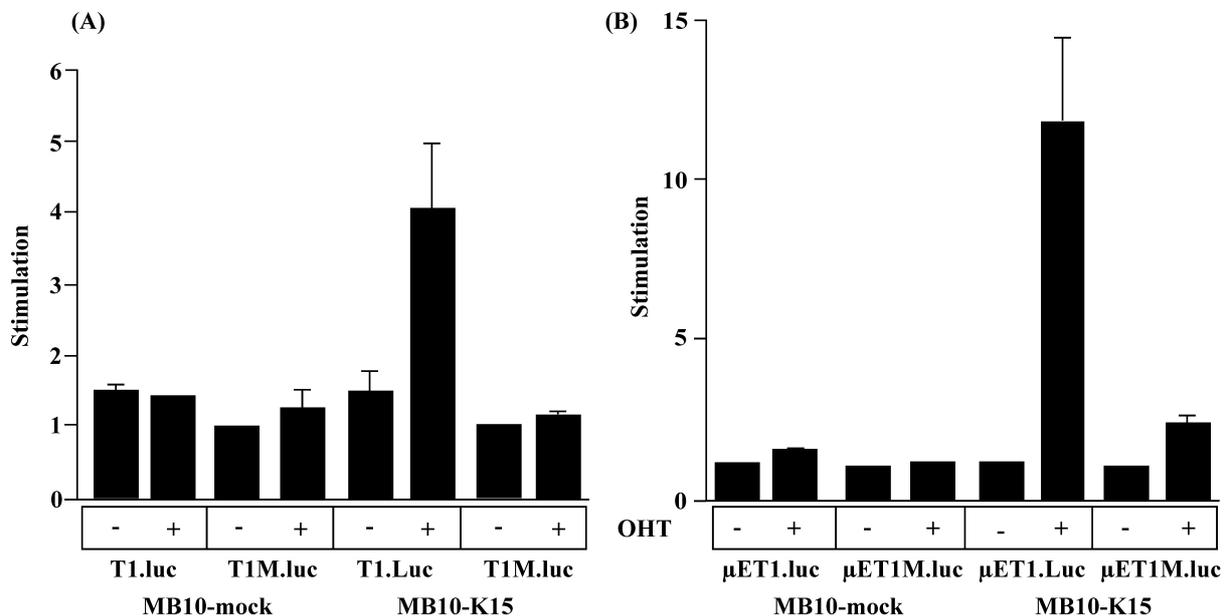


**Abbildung 11: Aktivität von Immunglobulin-Promotor-regulierten Reportern in B-Zellen und Fibroblasten.** (A) Transiente Transfektion von wildtypischen B-Zelllinien (PD31 = Abelsonvirus-transformierte präB-Zellen; S194 = Plasmazytomazelllinie) mit den angegebenen Reporterkonstrukten. Die Zellen wurden mit 15  $\mu$ g Reporter und 0.5  $\mu$ g CMV-lacZ zum Abgleich der Transfektionseffizienz transfiziert, mit 200 nM OHT induziert und 20 h später zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Für jede Zelllinie wurde der Wert für die uninduzierten, Oktamer-Motiv-mutierten Reporter gleich eins gesetzt. (B) Transiente Kotransfektion von NIH/3T3-Fibroblasten mit 15  $\mu$ g des pT1.Luc- bzw. pT1M.Luc-Vektors zusammen mit dem angegebenen Leervektor bzw. Expressionsvektor für BOB.1/OBF.1. 0.5  $\mu$ g CMV-lacZ wurden zur Normalisierung der Transfektionseffizienz kotransfiziert und die Zellen nach 20 h zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

Zunächst wurden diese Reporter in wildtypische B-Zelllinien, also BOB.1/OBF.1-exprimierende Zelllinien, transfiziert, um festzustellen, ob die Mutation des Oktamer-Motivs auch tatsächlich die Aktivität der Reporter beeinflusst. Transiente Transfektionen der Reporter, die nur den Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor enthielten, in die präB-Zelllinie PD31 oder die Plasmazytomazelllinie S194, ergaben einen 2.5- bis 3.5-fachen Aktivitätsunterschied, abhängig von der Mutation des Oktamer-Motivs (Abb.11A). Der Effekt der Oktamer-

## Ergebnisse

Mutation war in den Reportern, die zusätzlich zum Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor den  $\mu$ Enhancer enthielten, deutlich verstärkt. Mit diesen Konstrukten zeigte sich ein 7.5- bis 10-facher Aktivitätsunterschied zwischen wildtypischem und mutiertem Reporter. Die Aktivität eines Immunglobulin-Promotor-Reporters ist also entscheidend abhängig von einem intakten Oktamer-Motiv im Promotor. Die Gesamtaktivität der verwendeten Enhancer-Konstrukte war 50-fach stärker als die Aktivität der nur vom Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor regulierten Konstrukte, was nicht aus Abb.11A hervorgeht, da hier alle Transfektionen mit einem Oktamer-Motiv-mutierten Promotor gleich eins gesetzt wurden.



**Abbildung 12: Immunglobulin-Promotor-regulierte Reporter sind von BOB.1/OBF.1 abhängig.** Transiente Transfektion von MB10-K15- und MB10-mock-Zellen (MB10-mock = Abelsonvirus-transformierter BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K15 = Abelsonvirus-transformierter BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER) mit Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor (A) und Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor plus  $\mu$ Enhancer (B) regulierten Reporterkonstrukten. Die Zellen wurden mit jeweils 15  $\mu$ g des Reporterplasmids transfiziert und wie angegeben mit 200 nM OHT induziert. Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität des uninduzierten Oktamer-Motiv-mutierten Vektors (T1M.Luc bzw.  $\mu$ ET1M.Luc) wurde für jede Zelllinie gleich eins gesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

Um festzustellen ob die durch die Mutation des Oktamer-Motivs verursachten Unterschiede der Promotoraktivität durch BOB.1/OBF.1 beeinflusst werden können, wurde der Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor-Reporter zunächst in NIH/3T3-Fibroblastenzellen mit einem BOB.1/OBF.1-Expressionsvektor kotransfiziert. Dabei zeigte sich eine dreifache Stimulation

des wildtypischen Reporters, wohingegen der oktamer-mutierte Reporter nicht signifikant durch das kotransfizierte BOB.1/OBF.1 induziert wurde (Abb.11B). BOB.1/OBF.1 scheint also ein Faktor zu sein, der in dem artifiziellen System der NIH/3T3-Fibroblastenzellen notwendig ist für die Vermittlung transkriptioneller Aktivität vom Oktamer-Motiv des Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotors. Um zu überprüfen, ob dies auch in einem natürlicheren Zellsystem gilt, in dem auch *in vivo* BOB.1/OBF.1 exprimiert wird, wurden die beschriebenen Immunglobulin-Reporter in die konditionalen BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-BobER-präB-Zellen transfiziert. Ohne das induzierende Hormon Hydroxytamoxifen zeigten die Immunglobulin-Reporter, die ein wildtypisches Oktamer-Motiv im Promotor enthielten, die gleiche Aktivität wie die Reporter, bei denen das Oktamer-Motiv im Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor mutiert war (Abb.12A+B).

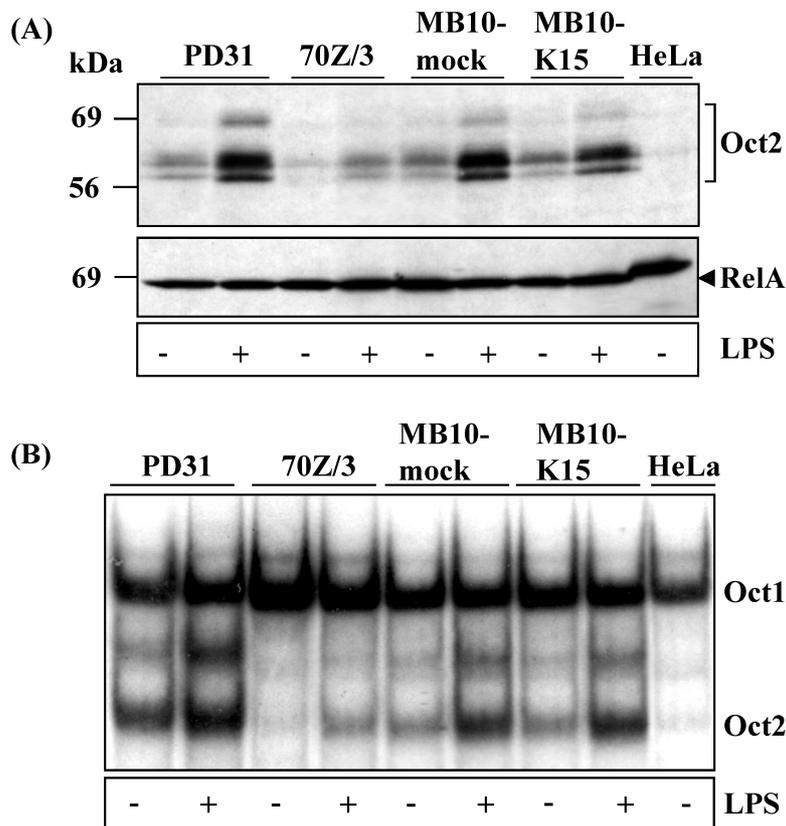
In diesem nicht induzierten Zustand ist in diesen Zellen also keine transkriptionelle Aktivität eines transfizierten Immunglobulin-Promotors festzustellen. Dasselbe Resultat wurde in der mit Leervektor infizierten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zelllinie MB10-mock beobachtet. Durch Stimulation mit Hydroxytamoxifen konnte belegt werden, dass BOB.1/OBF.1 eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotors spielt. Die Zugabe des Hormons stimulierte selektiv nur den Promotor, der das nicht-mutierte Oktamer-Motiv im Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor enthält, in MB10-K15-Zellen, in denen BobER durch Hydroxytamoxifen induziert wurde (Abb.12). Die hier beschriebenen Experimente zeigen, dass ein bona fide Immunglobulin-Promotor erstens in B-Zellen durch BOB.1/OBF.1-reguliert wird, und zweitens, dass die Abhängigkeit von BOB.1/OBF.1 nicht durch Hinzufügung eines starken Enhancer-Elements ersetzt werden kann.

### **2.1.4 Oct2 ist nicht an der Transaktivierung der Immunglobulin-Reporter beteiligt**

Der Koaktivator BOB.1/OBF.1 interagiert mit den Oct1- und Oct2-Transkriptionsfaktoren und induziert deren transkriptionelle Aktivität. Für Oct2 wurde bereits beschrieben, dass

## Ergebnisse

große Mengen an Oct2-Protein ausreichen, um die transkriptionelle Aktivität von einem synthetischen Promotor zu vermitteln, auch in der Abwesenheit des Koaktivators. Die Ergebnisse des vorigen Kapitels zeigten jedoch, dass BOB.1/OBF.1 nicht redundant, sondern essentiell für die Vermittlung Oktamer- und Immunglobulin-abhängiger Reporter-gen-Transkription in B-Zellen ist. Es stellte sich also die Frage, ob auch bei einer erhöhten Oct2-Expression BOB.1/OBF.1 bzw. BobER immer noch der essentielle Faktor für die hier beschriebene Regulation transkriptioneller Reporter-gen-Aktivität ist. Es ist bekannt, dass Oct2-Expression in präB-Zellen durch LPS induziert werden kann (Miller et al., 1991). Zunächst wurde getestet, ob in den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen Oct2 durch LPS induziert werden kann.



**Abbildung 13: LPS induziert Oct2-Expression in verschiedenen B-Zelllinien.** (A) Protein-Immunblot-Analyse mit 50 µg Gesamtzellproteinextrakt der angegebenen Zelllinien, die entweder nicht behandelt wurden oder für 72 h mit 50 µg/ml LPS induziert wurden. Die Membran wurde mit einem Oct2- und RelA-(Santa Cruz Biotechnology)Antiserum inkubiert. (B) Gelretardations-Analyse mit 5 µg der in (A) verwendeten Extrakte und einer radioaktiv markierten Oktamer-Motiv-Oligonukleotidprobe. Der schwache Komplex der auf der Höhe des Oct2-Signals in HeLa-Zellen läuft interagiert nicht mit dem Oct2-spezifischen Antikörper und stellt höchstwahrscheinlich ein Oct1-Abbauprodukt dar (PD31 = Abelsonvirus-transformierte präB-Zellen; 70Z/3 = Maus-präB-Lymphomazelllinie; ab1.1 = Abelsonvirus-transformierte Oct2<sup>-/-</sup>-präB-Zellen; MB10-mock = Abelsonvirus-transformierter BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K15 = Abelsonvirus-transformierter BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER; HeLa = humane Cervixcarzinomazelllinie).

## Ergebnisse

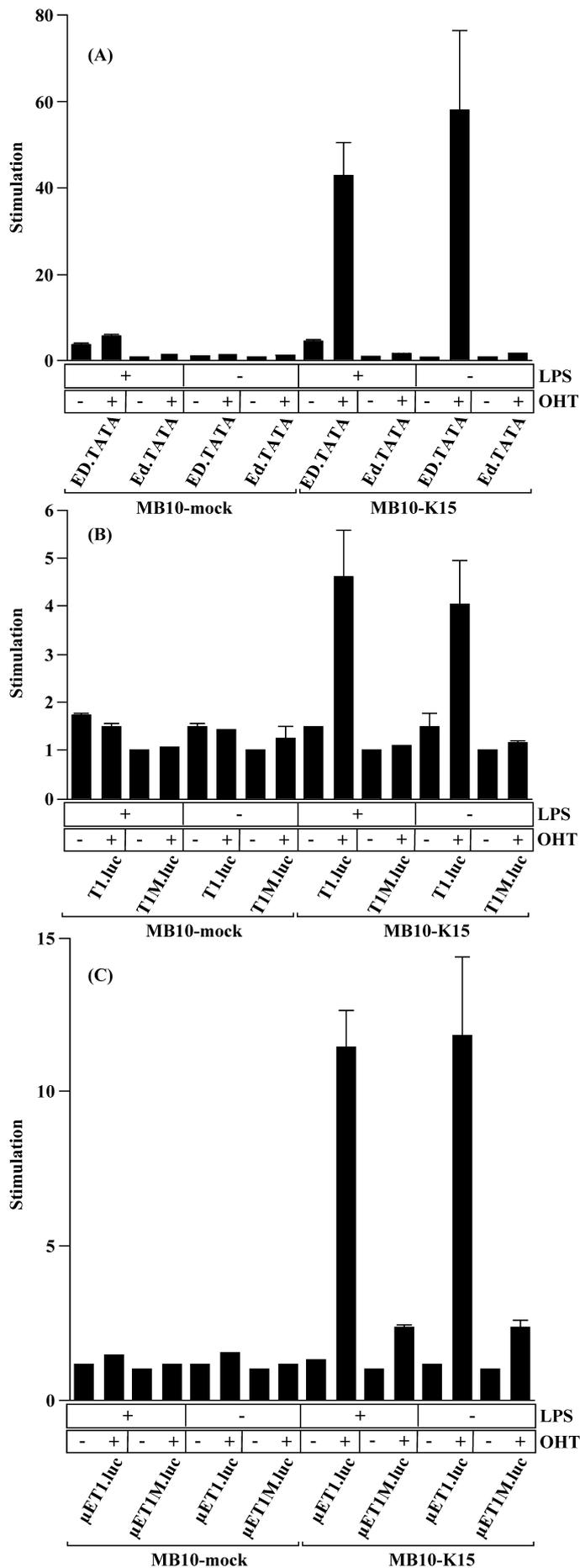
---

LPS-Stimulation von wildtypischen präB-Zelllinien (70Z/3 und PD31), von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen (MB10-mock) und von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-BobER-präB-Zellen (MB10-K15) führte zu einer deutlichen Induktion von Oct2-Expression, was sowohl im Protein-Immunblot (Abb.13A) als auch in einer Gelretardations-Analyse mit einer Oktamer-Probe (Abb.13B) nachgewiesen wurde.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression des ektopisch exprimierten BobER-Fusionsproteins nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Um den Effekt der erhöhten Oct2-Expression auf die oktamerabhängige Transkription zu untersuchen, wurden die verwendeten Zellen 48 h vor der Transfektion mit LPS stimuliert und nach der Transfektion für weitere 24 h in Gegenwart von LPS kultiviert, um dann zur Luziferasemessung geerntet zu werden. Diese Transfektionen wurden verglichen mit parallel durchgeführten Transfektionen, bei denen keine LPS-Induktion durchgeführt wurde. Die synthetischen Reporter, die von den multimerisierten Oktamer-Motiven reguliert sind, wurden nur leicht, aber reproduzierbar durch LPS induziert (Abb.14A). Die vom Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor regulierten Reporter hingegen zeigten keine Induktion durch LPS (Abb.14B), auch nicht in der Gegenwart des  $\mu$ Enhancers (Abb.14C). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine hoher Oct2-Level wahrscheinlich nicht in der Lage ist, das Fehlen von BOB.1/OBF.1 bei der Regulation des natürlichen Immunglobulin-Promotors zu kompensieren.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Expression der endogene schweren Immunglobulin- $\mu$ -Kette in den BobER-präB-Zellen durch Hydroxytamoxifen reguliert werden kann. Dabei zeigte sich in verschiedenen BobER-präB-Zelllinien, dass Hydroxytamoxifen keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der endogenen schweren Immunglobulin- $\mu$ -Kette hat (Abb.10B). Dieses Ergebnis war insofern nicht verwunderlich, da die Zellen keine vollständigen V-DJ-Rearrangements auf dem Locus der schweren Immunglobulin-Kette enthalten. Dementsprechend stellen die detektierten RNAs Transkripte dar, die nicht vom oktamerabhängigen Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Promotor reguliert werden.

## Ergebnisse



### Abbildung 14: LPS-induzierte Oct2-Expression kann das Fehlen des Koaktivators BOB.1/OBF.1 nicht effizient ausgleichen.

(A-C) Transiente Transfektion der MB10-K15- und MB10-mock-Zellen (MB10-mock = Abelsonvirus-transformierter BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K15 = Abelsonvirus-transformierter BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER) mit einem oktamerabhängigen (A), einem Immunglobulin-κT1-Promotor (B) bzw. Immunglobulin-κT1-Promotor/μEnhancer (C) regulierten Reporterkonstrukt. Die Zellen wurden mit jeweils 15 μg des angegebenen Reporterplasmids transfiziert. Wenn angegeben, wurden die Zellen vor der Transfektion für 48 h mit 50 μg/ml LPS induziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen wie angegeben mit 200 nM OHT induziert oder nicht. Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität des uninduzierten Vektors mit wildtypischem Promotor (ED.TATA, T1.Luc bzw. μET1.Luc) wurde für jede Zelllinie gleich eins gesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

### 2.2. Identifizierung BOB.1/OBF.1-regulierter Zielgene

Durch die Etablierung von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der BOB.1/OBF.1-Koaktivator eine wichtige Rolle sowohl in der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark als auch in der späten B-Zellentwicklung in sekundären lymphatischen Organen spielt. Für den beobachteten Phänotyp dürfte eine Fehlregulation der Expression von BOB.1/OBF.1-Zielgenen verantwortlich sein, jedoch war lange Zeit kein direkt von BOB.1/OBF.1-reguliertes Gen bekannt. Auch wenn die soeben beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass BOB.1/OBF.1 essentiell ist für oktamerabhängige Reporter-gen-Transkription und dass Immunglobulin-transregulatorische Elemente durch BOB.1/OBF.1 reguliert sind, werden die endogenen Immunglobulingene doch normal in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen exprimiert. Zur Identifizierung bislang unbekannter BOB.1/OBF.1-Zielgene stellen die hier etablierten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelllinien mit dem induzierbaren BobER-Allel ein ideal geeignetes Zellsystem dar. Zu diesem Zweck wurden die BobER-präB-Zellen (MB10-K15) sowie die mit dem parental Vektor infizierten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen (MB10-mock) für 20 h mit Hydroxytamoxifen induziert. Durch diesen Vergleich kann ausgeschlossen werden, dass Hydroxytamoxifen-regulierte Gene detektiert werden. Aus den induzierten Zellen wurde RNA präpariert und diese durch reverse Transkription in cDNA übersetzt, welche für die verschiedenen hier eingesetzten Methoden zur Analyse differentieller Genexpression verwendet wurde.

Zur Detektion von unterschiedlichen Genexpressionsmustern in zwei verschiedenen RNA- bzw. cDNA-Populationen gibt es verschiedene Methoden (Hess et al., 1998). In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden verwendet, um die oben beschriebenen RNAs aus BobER-stabilen- und Kontroll-Zelllinien auf Unterschiede in der Genexpression zu untersuchen. Dies sind die cDNA-RDA-Methode („representational difference analysis“; Hubank and Schatz, 1994), das Atlas-cDNA-Mikroarray-Protokoll (Clontech) sowie die Affymetrix-Genchip-Technologie (Affymetrix). Die cDNA-RDA-Methode wurde zunächst

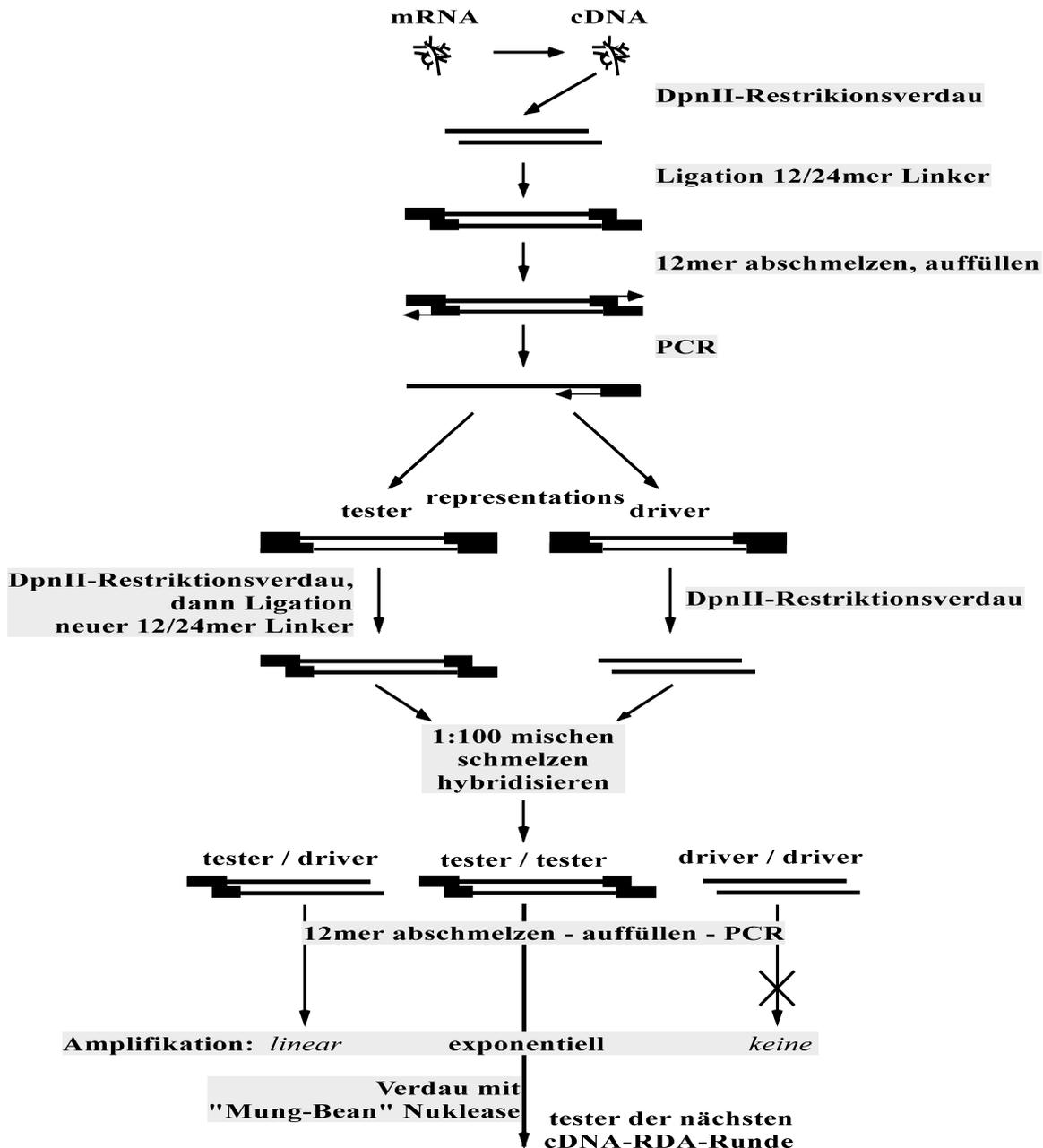
mit einem Zellsystem etabliert, mit welchem bereits die Oct2-Zielgene CD36 und CRISP-3 identifiziert werden konnten (König et al., 1995; Pfisterer et al., 1996; Pfisterer et al., 1997).

### **2.2.1 Identifizierung von MLC1A („myosin light chain 1 atrial isoform“) als indirektes BOB.1/OBF.1-Zielgen mittels cDNA-RDA-Methode**

#### **2.2.1.1 Etablierung der cDNA-RDA-Methode mit dem Oct2ER-System**

Durch die cDNA-RDA-Methode können cDNAs spezifisch amplifiziert werden, welche hauptsächlich in einer so genannten „tester“-DNA, verglichen mit einer so genannten „driver“-DNA, vorhanden sind (schematische Darstellung und Erläuterung der Methode in Abb.15). RNA/cDNA aus Östrogen-induzierten Oct2<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zellen (König et al., 1995) wurde als „driver“-DNA, RNA/cDNA aus Östrogen-induzierten Oct2<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zellen mit einem stabil integrierten Oct2ER-Fusionsprotein als „tester“-DNA verwendet. Von den induzierten Zellen wurde RNA präpariert und im Northernblot-Experiment die induzierte Expression der bekannten Oct2-Zielgene CRISP-3 und CD36 nachgewiesen (Daten hier nicht gezeigt). Mit diesen mRNAs wurde das cDNA-RDA-Protokoll wie beschrieben durchgeführt (Hubank and Schatz, 1994). Drei Runden der Amplifikation / Hybridisierung wurden durchgeführt. Die dabei entstandenen so genannten „difference products“ (DP-I, DP-II und DP-III) sowie die eingesetzten Ausgangs-cDNAs („tester“ und „driver“) wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dann in einer Southernblot-Hybridisierung auf die Anreicherung einiger bekannter Gene getestet (Abb.16). Gene, die nur in der „tester“-cDNA enthalten sind, sollten angereichert werden (das sind CD36, CRISP-3, Oct2), was im Falle von Oct2 bis zum DP-III und CD36 im DP-I auch zutrifft. Gene, die in beiden Ausgangs-cDNAs enthalten sind (wie das „housekeeping“-Gen GAPDH) werden, wie erwartet, nur in den Ausgangs-cDNAs detektiert, jedoch nicht in den angereicherten cDNAs DP-I bis DP-III. Mit dieser Methode ist es also möglich, die differentiell exprimierten Gene Oct2 und CD36 anzureichern, wobei ein bekannter Nachteil dieser Methode zu beobachten ist.

## Ergebnisse

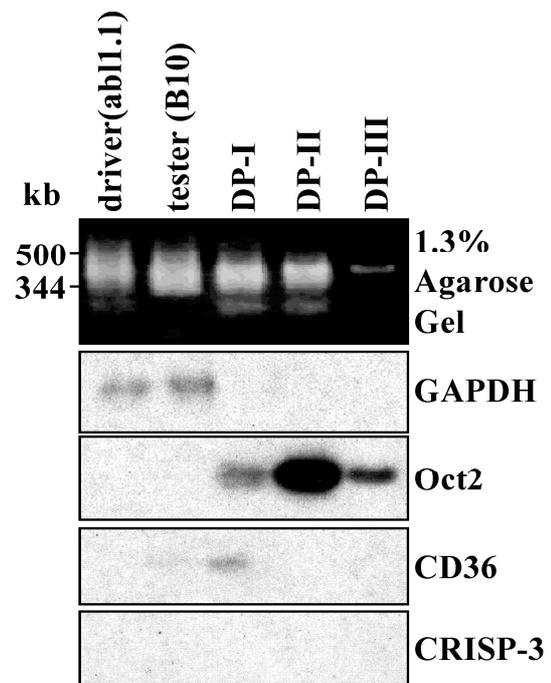


**Abbildung 15: Schema der cDNA-RDA-Methode („representational difference analysis“).** Schwarze Boxen stellen beim ersten Hybridisierungsschritt R-Oligonukleotide dar, die für die Herstellung der „representations“ verwendet wurden. Beim zweiten Hybridisieren der 12/24mer Oligonukleotide wurden die J-(oder N-)Oligonukleotide verwendet um die „difference products“ zu erzeugen. Zick-Zack Pfeile markieren cDNA-Synthesereaktionen. cDNA wird aus RNA der zu vergleichenden zwei RNA-Populationen hergestellt, der „tester“ ist die Probe, in der die Gene detektiert werden können, die im Vergleich zum „driver“ heraufreguliert sind. Diese cDNA wird mit DpnII geschnitten. Durch das Ligieren der Oligonukleotid-Linker an die cDNAs kann diese durch PCR amplifiziert werden. Die Linker werden durch Restriktionsverdau entfernt, und nur an die „tester“-cDNA werden neue Linker ligiert, so dass nur diese cDNAs weiter amplifiziert werden können. Die zwei DNA-Populationen werden gemischt und hybridisiert. Die „driver“-DNA besitzt keine Linker, wird also auch nicht amplifiziert in der folgenden PCR. Da die „driver“-DNA im Überschuss eingesetzt wird, werden alle DNA-Sequenzen, die in beiden cDNAs vorhanden sind, nur linear amplifiziert. Nur solche DNA-Sequenzen die nur oder überwiegend in der „tester“-DNA enthalten sind, werden exponentiell amplifiziert. Dieser Prozess wird in der Abbildung bis zum ersten „difference product“ aufgezeigt. Um das zweite und dritte „difference product“ (DP-II und DP-III) herzustellen, werden die Produkte in das gleiche Schema wiedeingesetzt als neuer "tester" in immer stärkerer Verdünnung (modifiziert nach Hubank and Schatz, 1994).

## Ergebnisse

Oct2 wird bis zum DP-III angereichert, CD36 jedoch nur im DP-I, nicht mehr im DP-II und DP-III, CRISP-3 wird überhaupt nicht angereichert. Es wurden also nicht alle differentiell exprimierten Gene durch die Methode angereichert, somit können auch nicht alle Oct2-regulierten Gene identifiziert werden. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die zahlreichen PCR-Schritte zurückzuführen, wobei manche cDNAs besser, manche schlechter amplifiziert werden. Gleichzeitig ist die differentielle Hybridisierung, abhängig von dem Verhältnis der eingesetzten „tester“- und „driver“-cDNA Mengen, unterschiedlich stringent. Das heißt, bei einem hoch stringenten Ansatz werden Gene, die in einer Zelllinie nicht exprimiert werden wie z. B. Oct2, weiter amplifiziert, wohingegen Gene, die nur unterschiedlich stark exprimiert werden wie zum Beispiel CRISP-3 oder CD36, nicht weiter amplifiziert werden.

**Abbildung 16: Durch die cDNA-RDA-Methode konnten aus Oct2ER-Zell-RNA Oct2 und CD36, nicht jedoch CRISP-3 angereichert werden.** Die „difference products“ DP-I, DP-II, DP-III sowie die Ausgangs-cDNAs („tester“ und „driver“) des cDNA-RDA-Experiments mit den abl1.1-(Oct2<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zellen) und den B10-(abl1.1 die stabil Oct2ER enthalten)Zellen, die beide für 12 h mit Östrogen behandelt wurden, wurden auf einem 1.3 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Diese wurde nacheinander mit verschiedenen radioaktiv markierten cDNA-Proben für das Kontrollgen GAPDH sowie für Oct2, CD36 und CRISP-3 hybridisiert.



### 2.2.1.2 cDNA-RDA-Experiment zur Identifizierung BOB.1/OBF.1-regulierter Gene

Zur Identifizierung von BOB.1/OBF.1-Zielgenen wurde die cDNA-RDA-Methode durchgeführt mit mRNA/cDNA aus den im Kapitel 1 beschriebenen BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-BobER-präB-Zellen (MB10-K10) als „tester“-cDNA und den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen, die stabil

## Ergebnisse

---

mit dem Leervektor infiziert sind (MB10-Mock), als „driver“-cDNAs. Die verwendeten mRNAs wurden im Northernblot-Experiment auf BobER und GAPDH Expression getestet (Abb.7). Da kein BOB.1/OBF.1-reguliertes Gen bekannt ist, konnte keine Testhybridisierung für die Hydroxytamoxifen-Induktion durchgeführt werden. Stattdessen wurden, parallel zur Induktion der Zellen für die RNA-Präparation, Zellen mit einem oktamerabhängigen Reporter transfiziert, in zwei Zellkulturschalen verteilt und eine davon mit Hydroxytamoxifen induziert, um sicherzustellen, dass die OHT-Induktion in diesem Ansatz das BobER-Protein aktiviert. Das Experiment wurde durchgeführt wie von Hubank (Hubank and Schatz, 1994) beschrieben. Dabei wurden „tester“- und „driver“-cDNAs in drei aufeinanderfolgenden Hybridisierungsschritten im Verhältnis 1:100, 1:800 und 1:500.000 eingesetzt. Die resultierende, angereicherte cDNA des DP-III wurde mit dem Restriktionsenzym DpnII geschnitten und in einen DpnII-geschnittenen pBluescript-Vektor kloniert. Diese Ligation wurde in Bakterien transformiert und auf Ampicilin-LB-Agaroseplatten ausplattiert. 160 Bakterieneinzelklone wurden auf neue Platten umgestrichen und parallel in einer PCR mit T3/T7-Primern, welche die klonierten Sequenzen im Vektor flankieren, amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Hälfte der sequenzierten Klone war ein Fragment des Östrogenrezeptors, was zeigte, dass durch die cDNA-RDA-Methode in diesem Experiment differentiell exprimierte RNAs amplifiziert werden konnten. Die restlichen sequenzierten Klone waren überwiegend Einzelklone, nur sieben Klone wurden mehr als einmal sequenziert. Diese am häufigsten gefundenen DNA-Sequenzen, die also am stärksten im Laufe des cDNA-RDA-Protokolls angereichert wurden, sind in Abb.17 aufgelistet.

In den meisten Fällen sollte durch die cDNA-RDA-Methode eine sehr spezifische Anreicherung von differentiell exprimierten Genen erreicht werden. Im letzten „difference product“ sollten nur einige wenige hoch angereicherte Sequenzen auftreten, die in einem Agarosegel als Banden zu erkennen sind. Im hier durchgeführten Experiment waren im DP-III-Endprodukt keine deutlichen Banden zu finden, sondern ein DNA-Schmier. Dementsprechend ist auch die Mehrzahl der gefundenen Sequenzen nur einmal in den 160 sequenzierten cDNAs

## Ergebnisse

vorhanden. Die große Mehrzahl ist wahrscheinlich Hintergrund, der unspezifisch amplifiziert wurde.

Genbank Nr.	Beschreibung des Gens / ESTs	n=	Northernblot RT-PCR
AH002040	MLC1A („myosin light chain 1 A, atrial isoform“)	12	+
-	verschiedene. Sequenzen mit hoher Homologie zu unterschiedlichen Dehydrogenase-Motiven	7	-
109828	Komplementprotein C7	5	+
NM007917	eIF-4E („translation initiation factor 4E“)	5	-
X75312	QM mRNA, „Wilms tumor related protein“	4	-
U21718	hohe Homologie zu C426 („intestinal epithelial proliferation cell-associated mRNA“)	2	-
NM023119	Alpha-Enolase	2	-

**Abbildung 17: Tabellarische Auflistung der durch die cDNA-RDA-Methode angereicherten cDNAs beim Vergleich von MB10-mock- und MB10-K10-Zellen.**

Aufgelistet sind alle cDNA-Klone, die mehr als einmal in 160 sequenzierten cDNAs gefunden wurden. Von den angegebenen Klonen wurden DNA-Proben für Northernblot-Analysen hergestellt bzw. RT-PCRs etabliert, um die Expression der Gene in den Ausgangs-RNAs zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass nur MLC1A und C7 in den RNAs differentiell exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse weiterer BobER-stabiler Zelllinien ergab, dass C7 nur in den MB10-K10-Zellen exprimiert wird, also ein Klonartefakt darstellt (MB10-mock = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K15 = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER).

(+) = in den Ausgangs-RNAs durch Northernblot oder RT-PCR Unterschied in Expression bestätigt

(-) = in den Ausgangs-RNAs durch Northernblot oder RT-PCR kein Unterschied in Expression

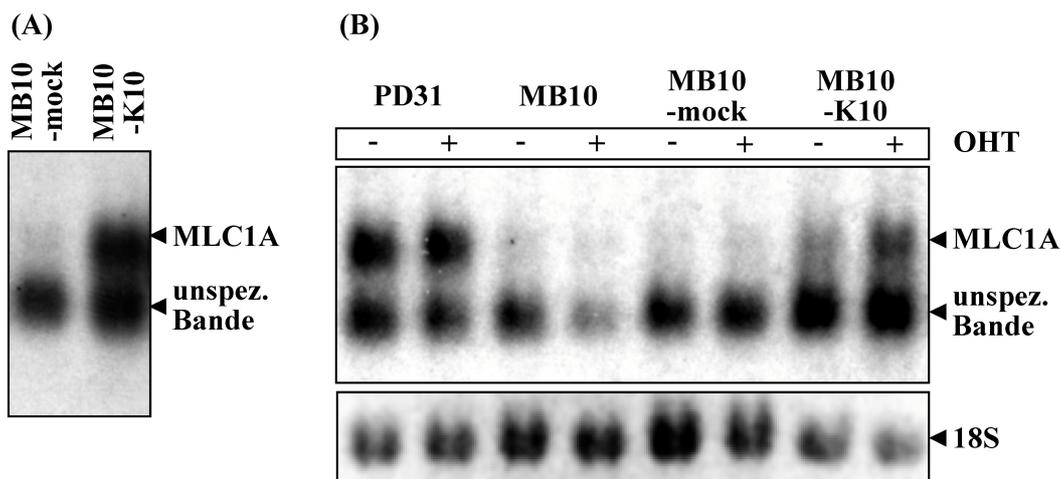
Für die mehr als einmal sequenzierten Klone wurde in Northernblot- bzw. RT-PCR-Experimenten untersucht, ob sie in den Ausgangs-RNAs differentiell exprimiert waren (Daten zusammengefasst in Abb.17). Dabei stellte sich heraus, dass nur zwei Klone tatsächlich differentiell exprimiert waren, das C7-Komplementprotein und MLC1A. Das C7-Komplementprotein stellte sich jedoch als Artefakt des BobER-präB-Zelleinzelklons MB10-K10 heraus. Das heißt, es war nur in dieser einen Zelllinie exprimiert, nicht jedoch in anderen BobER-stabilen Einzelklonen, noch war es durch Hydroxytamoxifen regulierbar (Daten nicht gezeigt). Vermutlich wurde die C7-Expression durch die in die genomische DNA integrierten regulatorischen Elemente des Retrovirus-Vektors, mit dem BobER in die Zellen eingeschleust wurde, induziert. Es ist also ein Integrationsartefakt und nicht durch BobER-reguliert.

## Ergebnisse

MLC1A („myosin light chain 1 atrial“-Isoform) stellte sich als tatsächlich in den beiden untersuchten RNAs differentiell exprimiert heraus (Abb.18A). Da das MLC1A-Gen zudem am stärksten in der DP-III-cDNA angereichert war, wurde dieses Gen weiter analysiert.

### 2.2.1.3 MLC1A wird durch BobER reguliert und ist in frühen B-Zellen exprimiert

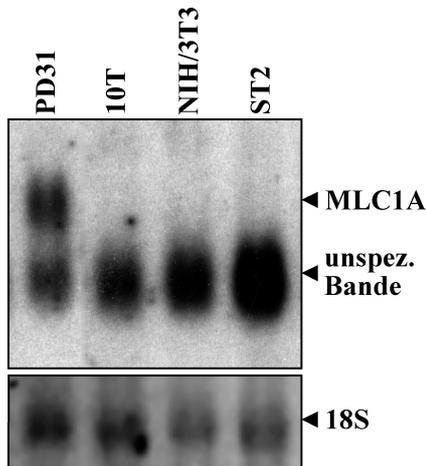
Zunächst wurde untersucht, ob MLC1A in der MB10-K10-Zelllinie durch Zugabe von Hydroxytamoxifen reguliert wird. Zu diesem Zweck wurde ein 400 bp großes cDNA-Fragment von MLC1A aus MB10-K10-cDNA amplifiziert und radioaktiv markiert. In einem Northernblot-Experiment mit dieser Probe zeigten die nicht Hydroxytamoxifen-induzierten MB10-K10-Zellen eine einzelne Bande. Durch Behandlung der Zellen mit Hydroxytamoxifen konnte eine zweite Bande induziert werden, welche auf einer höheren Position im Northernblot-Gel läuft als die erste. In den Zelllinien MB10 und MB10-mock, die beide kein BOB.1/OBF.1 oder BobER exprimieren, konnte nur die untere hormonunabhängige Bande detektiert werden, nicht jedoch die obere Bande, die in den MB10-K10-Zellen induziert werden konnte (Abb.18B).



**Abbildung 18: MLC1A-Expression wird BobER-abhängig in präB-Zellen reguliert.** (A) Northernblot-Analyse mit einer MLC1A-spezifischen Probe und 5 µg polyA<sup>+</sup>-mRNA der jeweiligen Zelllinien. (B) Northernblot-Analyse mit einer MLC1A-spezifischen Probe und 10 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien. (PD31 = Abelson-präB-Zellen; MB10 = Abelson-BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen; MB10-mock = MB10-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K10 = MB10-Zelleinzelklone infiziert mit BobER).

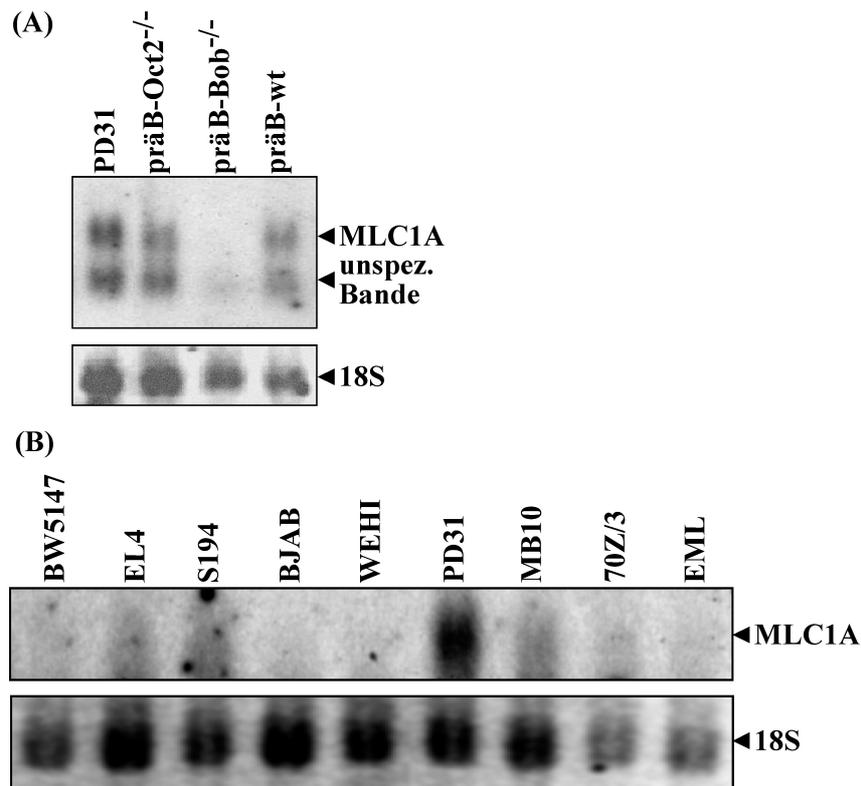
## Ergebnisse

Des Weiteren exprimiert die wildtypische, Abelsonvirus-transformierte präB-Zelllinie PD31 beide Banden. In allen Zellen also, die ein aktives BOB.1/OBF.1- oder BobER-Protein exprimieren, ist ein MLC1A-Transkript detektierbar, das nicht in Zellen auftritt, die kein BOB.1/OBF.1 enthalten.



**Abbildung 19: MLC1A-Expression in präB-Zellen, Fibroblastenzellen und Stromazellen.**

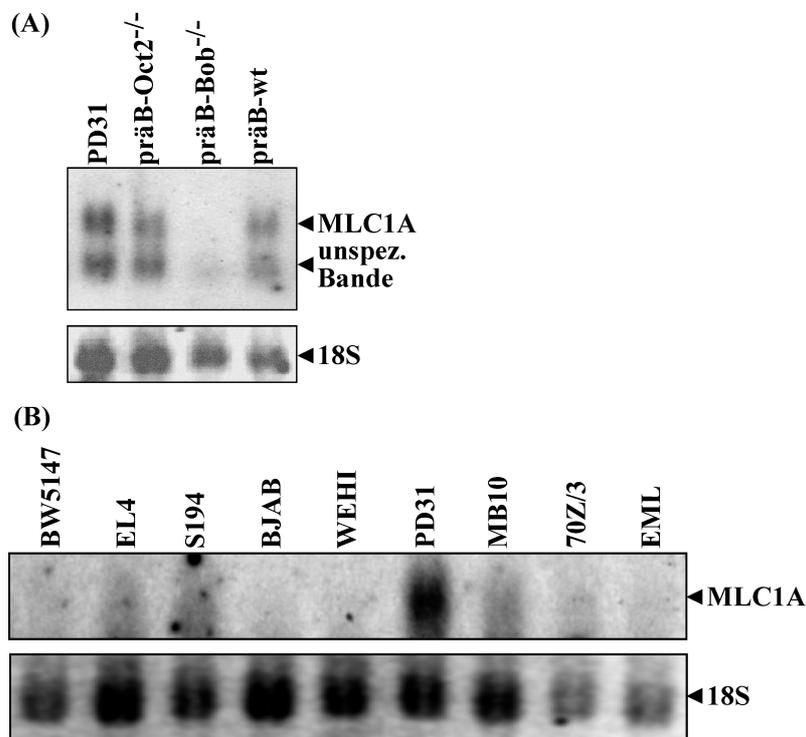
Northernblot-Analyse mit einer MLC1A-spezifischen Probe und 10 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien. (PD31 = Abelson präB-Zellen; 10T und NIH3T3 = Maus-Fibroblastenzelllinien; ST2 = Maus-Stromazelllinie).



**Abbildung 20: Expression verschiedener MLC1A-Spleißvarianten.** (A) Schematische Darstellung des genomischen MLC1A-Lokus, der im RACE-Experiment gefundenen alternativen MLC1A-Spleißvarianten (proximale und distale 5'UTR) sowie Lokalisierung der in Abb.20B verwendeten MLC1A-Primer (5'Primer = MLC1A5.1 bis 5.5; 3'Primer = MLC1A3.1). (B) RNA aus MB10-mock-, MB10-K10- und NIH/3T3-Zellen wurden in cDNA translatiert und in RT-PCR-Reaktionen auf die Expression von MLC1A mit den angegebenen Primern untersucht. (MB10-mock = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K10 = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER; NIH3T3 = Maus-Fibroblastenzelllinien).

## Ergebnisse

Da zwei Banden im Northernblot-Experiment mit der MLC1A-Probe in den BOB.1/OBF.1-exprimierenden Zellen detektiert werden, wurde zunächst untersucht, ob beide Banden MLC1A-spezifisch sind. Es ist bekannt, dass MLC1A in adulten Mäusen im Herzatrium exprimiert wird, jedoch nicht in anderen Geweben und in Fibroblasten. Bei der Analyse der MLC1A-RNA-Expression in NIH/3T3- und 10/T-Fibroblasten sowie in ST2-Stromazellen zeigte sich, dass in diesen Zellen nur die untere Bande, nicht jedoch die obere Bande detektiert werden kann (Abb19). Dies bedeutet, dass die untere Bande eine unspezifische Hybridisierung und keine MLC1A-spezifische Bande darstellt. Weiterhin konnte in RT-PCR-Experimenten mit verschiedenen MLC1A-spezifischen Primern gezeigt werden, dass MLC1A nur in den MB10-K10-Zellen deutlich exprimiert wird, und in geringerem Maß in den MB10-mock-Zellen (Abb.20). In NIH/3T3-Fibroblasten konnte kein MLC1A-Transkript detektiert werden. Das heißt, die untere Bande im Northernblot stellt tatsächlich eine unspezifische Hybridisierung dar, wohingegen die obere Bande MLC1A-spezifisch ist.



**Abbildung 21: MLC1A-Expression in verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien.** (A+B) Northernblot-Analyse mit einer MLC1A-spezifischen Probe und 10 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien. (PD31 = Abelson-präB-Zellen; präB-Oct2<sup>-/-</sup>, präB-Bob<sup>-/-</sup> und präB-wt = IL7- und Stromazell-abhängige primäre präB-Zellen; BW5147 und EL4 = Maus-T-Zell- Lymphomazelllinien; S194 = Maus-Plasmazytomazelllinie; MB10 = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zelllinie; WEHI = reife Maus-B-Zelllinie; BJA-B = humane Burkitt-Lymphoma-B-Zelllinie; 70Z/3 = Maus-präB-Lymphomazelllinie; EML = lymphoide Maus-Vorläuferzelllinie).

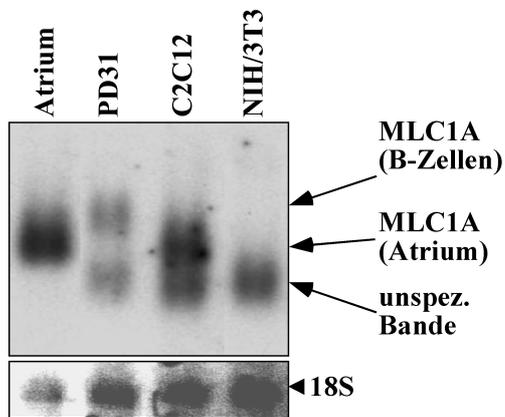
## Ergebnisse

---

Die Expressionsanalyse von MLC1A in verschiedenen Zelllinien sollte Aufschluss geben über die Expression in verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien. Wie bereits beschrieben, exprimiert die Abelsonvirus-transformierte präB-Zelllinie PD31 MLC1A, nicht jedoch die Abelsonvirus-transformierten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelllinien (Abb.18). Primäre, nicht immortalisierte präB-Zellen, die einem ähnlichen Differenzierungsstadium entsprechen wie Abelsonvirus-transformierte präB-Zellen, können in der Gegenwart von IL7 auf Stromazellen kultiviert werden. Solche primäre präB-Zellen aus wildtypischen und aus Oct2<sup>-/-</sup>-Mäusen exprimieren MLC1A, wohingegen primäre präB-Zellen aus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen kein MLC1A exprimieren (Abb.21A). MLC1A wird also in präB-Zellen BOB.1/OBF.1-abhängig exprimiert, wobei die Regulation nicht von der Transformation der Zellen abhängig ist. Außerdem ist die Regulation nur von BOB.1/OBF.1 abhängig und nicht von Oct2, wohingegen einige der bekannten BOB.1/OBF.1-regulierten Gene CCR-5 und BLR1 sowohl von BOB.1/OBF.1 als auch von Oct2 abhängig sind. Eine noch deutlichere Regulation von MLC1A kann in den primären präB-Zelllinien Bcl5 und Bcl7 beobachtet werden. Diese Zelllinien exprimieren beide ein transgenes Bcl-2. Die BOB.1/OBF.1-defiziente Bcl7-Zelllinie zeigt wiederum keine MLC1A-Expression, wohingegen die wildtypischen Bcl5-Zellen MLC1A exprimieren, wobei in diesen Zellen ein wesentlich stärkeres Signal für MLC1A detektiert werden kann als in allen anderen analysierten Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für diese verstärkte MLC1A-Expression in Abhängigkeit von Bcl-2 ist nicht bekannt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle IL7-abhängigen, primären präB-Zelllinien das gleiche MLC1A-Expressionsmuster zeigen wie die Abelsonvirus-transformierten präB-Zellen. Also exprimieren nur die präB-Zellen MLC1A, in welchen ein transkriptionell aktives BOB.1/OBF.1-Protein exprimiert wird. Als nächstes wurden verschiedene B-Zelllinien, die unterschiedlichen Differenzierungsstadien entsprechen, sowie T-Zelllinien auf die Expression von MLC1A untersucht. Dabei zeigte sich, dass MLC1A nur in präB-Zellen exprimiert wird, jedoch nicht in B-Zellen eines anderen Differenzierungsstadiums und auch nicht in der T-Zelllinie EL4, die BOB.1/OBF.1 exprimiert (Abb.21 B). MLC1A wird also in präB-Zellen exprimiert und diese Expression ist abhängig von BOB.1/OBF.1.

### 2.2.1.4 Verwendung einer alternativen MLC1A-5'UTR in B-Zellen

Da bekannt ist, dass MLC1A im Mausatrium und in der Muskelzelllinie C2C12 exprimiert wird, wurde diese Expression mit der in PD31-Zellen verglichen. Im Mausatrium sowie in C2C12-Zellen wurde ein MLC1A-Signal geringerer Größe, verglichen mit dem in PD31-präB-Zellen, gefunden (Abb.22). Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass MLC1A in Maus-präB-Zellen alternativ gespleißt wird.



**Abbildung 22: MLC1A-Expression in B-Zellen im Vergleich zur Expression in Muskelzellen.** Northernblot-Analyse mit einer MLC1A-spezifischen Probe und 10 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien/Gewebe (PD31 = Abelson präB-Zellen; NIH3T3 = Maus-Fibroblastenzelllinien; C2C12 = Maus-Skelettmuskelzelllinie; Atrium = Maus-Herzatrium).

Es ist bekannt, dass in humanen Skelettmuskelzellen verschiedene 5'UTRs und 3'UTRs („untranslated region“ = nicht translatierte Region) exprimiert werden (Zimmermann et al., 1990; Rotter et al., 1991), wohingegen im Mausatrium nur eine 5'UTR exprimiert wird. Um zu analysieren, ob in Maus-präB-Zellen unterschiedliche 5'UTRs exprimiert werden, wurde ein 5'RACE-Experiment mit RNA von der Hydroxytamoxifen-stimulierten MB10-K10-Zelllinie durchgeführt. Dabei konnte eine 5'UTR in präB-Zellen identifiziert werden, die im Weiteren als proximale 5'UTR bezeichnet wird. Dieses Transkript resultiert aus einem alternativen Spleißvorgang im MLC1A-Promotor. Die im Mausatrium gefundene 5'UTR wird weiterhin als distale 5'UTR bezeichnet (die Sequenzen der proximalen und distalen 5'UTRs sind in Abb.23 dargestellt). Ähnliche proximale und distale 5'UTRs wurden in humanen Skelettmuskeln beschrieben (Zimmermann et al., 1990; Rotter et al., 1991).

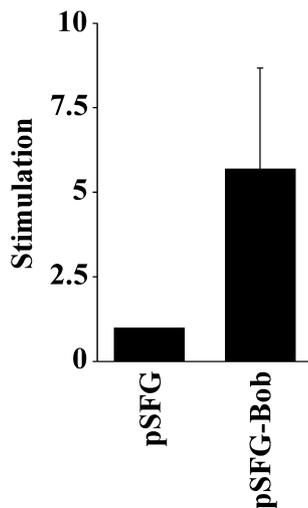
## Ergebnisse

-407 TGCTCAGGAGGGACTAAAAAAGCCTCAACCTCCCCTGGGCTTTGTGTGAGGGTTAT -----GGGTTAT -----	(I) (II) (III)
-350 CAACGGCTCAAGTCGGCTCATCCCTCTCTGGCTGCTCTGGCCCTTGGAGAGGGGCTC CAACGGCTCAAGTCGGCTCATCCCTCTCTGGCTGCTCTGGCCCTTGGAGAGGGGCTC -----	(I) (II) (III)
-292 TTTTCCCACCCCTCTCTGGGT TTCCACCAATTGGCAGGAAAGGACCAATCTGTCCCAG TTTTCCCACCCCTCTCTGGGTTTCCACCAATTGGCAGGAAAGGACCAATCTGTCCCAG -----	(I) (II) (III)
-234 AGGTGCAAGCCTTGAGATGAGTGAGGTGTGTGCATGGGGGGTGGGGGTGGGCTGGG AGGTGCAAGCCTTGAGATGAGTGAG----- -----	(I) (II) (III)
-178 CTGGGGTGGGGGAGGATGGATTGGTGGCTCAAACCTGGTGATAATACTGAGATGTCA ----- -----	(I) (II) (III)
-121 GCTGCACCCGGCTGGTGTCTCTTCCTTTTATAGTCAGCAGCAGTTGCTGCTGCCCTCCC ----- -----	(I) (II) (III)
-62 CAGCCCCTCTGTGGGGGCTCCTACCCAGAATAAAAGCAGGGGCAGGCCTTCCAGTCTC ----- -----	(I) (II) (III)
-4 CCATCTTCTCTCTCAGGACCCACCTCTCCTCCTTTGGTTCCTTTCTAGGTCCCACCTCCA -----GTCCCACCTCCA -----CTTCTCTCTCAGGACCCACCTCTCCTCCTTTGGTTCCTTTCTAGGTCCCACCTCCA	(I) (II) (III)
+57 CTGGAGAGCCTAAAGCAACATGCCTCCCAAGAAACCCGAGCCT - (I) MLC1A genomische Sequenz CTGGAGAGCCTAAAGCAACA <b>T</b> GCCTCCCAAGAAACCCGAGCCT - (II) MLC1A proximale 5' UTR CTGGAGAGCCTAAAGCAACATGCCTCCCAAGAAACCCGAGCCT - (III) MLC1A distale 5' UTR	

ATG = start codon / (+1) = transkriptioneller Start der distalen 5' UTR

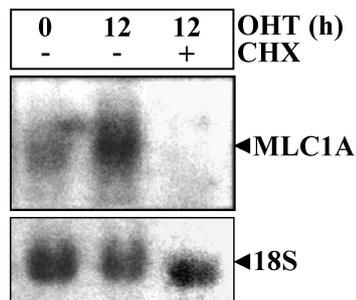
**Abbildung 23: Proximale und distale MLC1A-5'UTR-Sequenz.** Die aus der cDNA von MB10-K10-Zellen durch 5'-RACE identifizierte proximale 5'UTR-Sequenz wird verglichen mit der bekannten distalen 5'UTR und dem genomischen Locus.

Die Frage, ob beide 5'UTRs in Maus-präB-Zellen exprimiert werden, wurden mit Hilfe verschiedener Primerpaare in RT-PCRs untersucht, womit die verschiedenen Transkripte zu unterscheiden sind (Abb.20A). Diese RT-PCRs zeigten, dass beide Transkripte in Maus-präB-Zellen exprimiert werden (Abb.20). Da im Vergleich zum Herzatrium in Maus-präB-Zellen ein anderer Promotor verwendet wird, ist vermutlich auch eine andere Promotorregion verantwortlich für die Regulation von MLC1A in präB-Zellen. Um die Regulation von MLC1A durch BOB.1/OBF.1 weiter zu analysieren, wurde ein Luziferase-Reporter unter der Kontrolle von -3000 Basenpaaren des MLC1A-Promotors kloniert.



### Abbildung 24: BOB.1/OBF.1 kann einen MLC1A-Promoter-Reporter induzieren.

Transiente Transfektion von 293T-Zellen mit 10 µg eines Reporters in dem ein Luziferasegen von -3000 bp des MLC1A-Promotors kontrolliert wird, wobei wie angegeben je 10 µg pSFG oder pSFG-Bob.1 kotransfiziert wurden. Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität der pSFG Kotransfektion wurde gleich 1 gesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens vier unabhängigen Transfektionen dar.



### Abbildung 25.: Cycloheximid inhibiert die Induktion von MLC1A durch BobER.

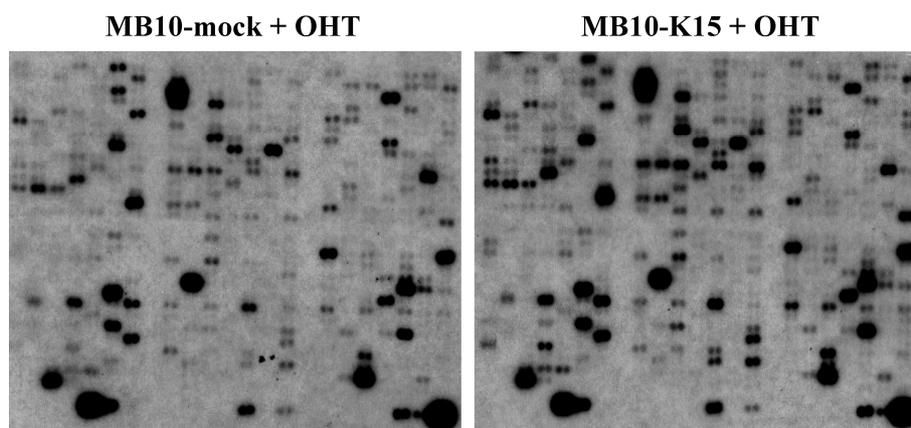
Northernblot-Analyse mit einer MLC1A-spezifischen Probe und 10 µg Gesamt-RNA von MB10-K15-Zellen (BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER) die wie angegeben unbehandelt blieben, mit Hydroxytamoxifen (OHT) induziert wurden oder mit OHT induziert wurden und zusätzlich 30 min vor der OHT-Induktion mit Cycloheximid (CHX) vorinduziert wurden.

Die transiente Transfektion dieses Reporters in die MB10-K10-Zelllinie resultierte in einer signifikanten basalen Luziferaseaktivität, die jedoch nicht durch das Hormon Hydroxytamoxifen reguliert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wurde dieser Reporter in NIH/3T3-Fibroblastenzellen mit einem BOB.1/OBF.1-Expressionsvektor kotransfiziert, so konnte einen Tag nach der Transfektion keine Aktivierung des Reportergens Luziferase festgestellt werden. Zwei Tage nach der Transfektion war die Luziferaseaktivität um den Faktor fünf erhöht (Abb.24). Dieses Experiment deutet darauf hin, dass zwar MLC1A von BOB.1/OBF.1 reguliert wird, dies jedoch keine direkte Regulation ist. Vermutlich reguliert also BOB.1/OBF.1 einen anderen Faktor, der wiederum für die Induktion von MLC1A verantwortlich ist. Um die Frage, ob MLC1A ein direkt oder indirekt von BOB.1/OBF.1-reguliertes Gen ist, wurden MB10-K15-Zellen mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid vorinduziert und für weitere 12 h mit Hydroxytamoxifen induziert. In einem solchen Experiment stellte sich heraus, dass in den mit Cycloheximid vorbehandelten Zellen

MLC1A nicht induziert werden konnte, im Gegensatz zu den Zellen, die nur mit dem Hormon behandelt wurden (Abb.25). Das heißt, BOB.1/OBF.1 reguliert die Synthese eines anderen Proteins, welches wiederum für die Regulation von MLC1A notwendig ist.

### 2.2.2 Zielgensuche mittels Atlas-Protokoll - keines der 500 erfassten Gene wird durch BobER reguliert

Das Atlas-cDNA-Mikroarray-Protokoll (Clontech) ist eine Methode zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen, bei der auf eine Membran verschiedene cDNAs in Punktform aufgetragen werden, die spezifisch für eine Reihe verschiedener Gene sind. Somit kann die Expression von circa 500 Genen gleichzeitig analysiert werden. Die zwei zu vergleichenden RNAs werden mittels Reverse-Transkriptase in cDNA transkribiert, radioaktiv markiert und die beiden verschiedenen cDNAs dann mit zwei gleichen Membranen parallel hybridisiert. Verschiedene „housekeeping“-Gene werden zum Abgleich der beiden Hybridisierungen herangezogen.



**Abbildung 26: Atlas-cDNA-Mikroarray, hybridisiert mit MB10-mock- und MB10-K15-cDNA.** Die dargestellten Atlas-cDNA-Mikroarray-Membranen (Clontech) wurden mit radioaktiv markierten cDNAs der angegebenen Zelllinien (MB10-mock = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K10 = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER; beide für 20 h mit OHT induziert) hybridisiert. Die Markierung der cDNAs und die Hybridisierung erfolgte wie vom Hersteller (Clontech) empfohlen.

Nach diesem Abgleich können, falls von den auf der Membran vorhandenen Genen eins oder mehrere tatsächlich in den RNAs differentiell exprimiert sind, unterschiedlich starke Signale zwischen den beiden Membranen gefunden werden. Dieses Protokoll wurde mit den beschriebenen cDNAs aus MB10-K10- und MB10-mock-Zellen durchgeführt. Die Auswertung und Qualifizierung der Signale auf den Membranen erfolgt durch einen Phosphorimager. Keines der auf dem verwendeten Filter vorhandenen Gene zeigte eine signifikant unterschiedliche Expression (Abb.26).

### **2.2.3 Zielsuche mittels Affymetrix-Genchip-Technologie - Identifizierung potentieller BOB.1/OBF.1-Zielgene**

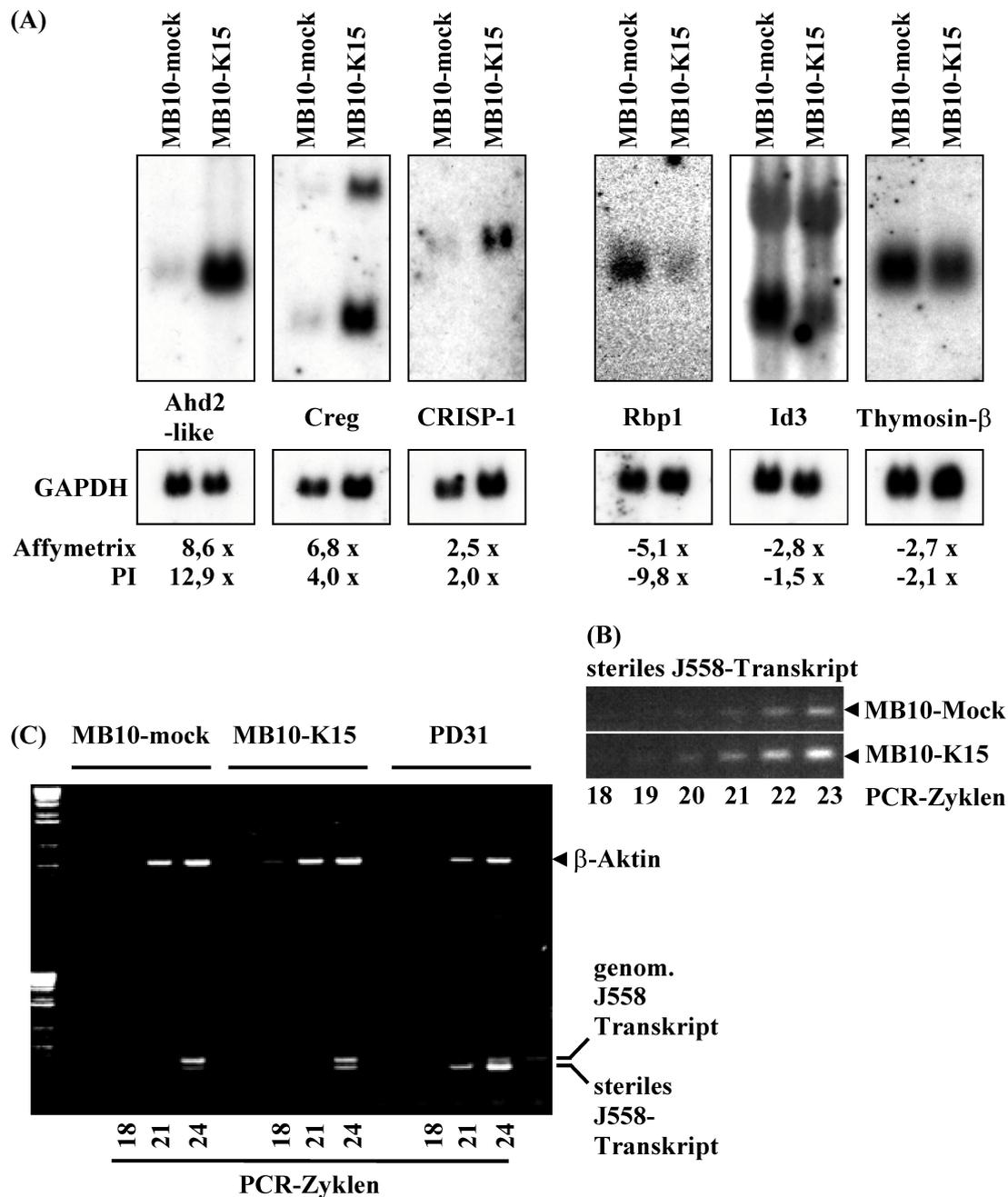
Die Affymetrix-Genchip-Technologie stellt eine Miniaturisierung der Mikroarray-Methode dar. Auf den verwendeten DNA-Chips waren insgesamt 11.000 verschiedene Mausgene bzw. Maus-ESTs („expressed sequence tags“) in Form von Oligonukleotiden aufgetragen. Für die Hybridisierung wurde in drei unabhängigen Experimenten aus den MB10-mock- und MB10-K15-Zellen (beide 12 h mit Hydroxytamoxifen stimuliert) RNA hergestellt. Die Fluoreszenz-Markierung der RNA und die Hybridisierung mit den Mu11KsubA und Mu11KsubB DNA-Chips (Affymetrix) sowie die Auswertung der Ergebnisse mittels der Affymetrix-Software wurden in Kooperation mit Dr. N. Kraut (Boehringer Ingelheim, Biberach a. d. Riss) durchgeführt. Aus den Daten, die aus den Hybridisierungen mittels der Affymetrix-Software ermittelt wurden, wurden die Gene/ESTs ausgewählt, die zum einen besonders signifikant und zum anderen um einen Faktor von mindestens zwei positiv bzw. negativ von BOB.1/OBF.1 reguliert waren. Nach diesen Kriterien konnte die Zahl der regulierten Gene auf 12 hochregulierte Gene (in drei von drei Experimenten), 39 hochregulierte Gene (in zwei von drei Experimenten), 10 herunterregulierte Gene (in drei von drei Experimenten) und 30 herunterregulierte Gene (in zwei von drei Experimenten) eingeschränkt werden. Eine Liste der in allen drei Experimenten differentiell regulierten Gene ist in Abb.27 in tabellarischer Form zusammengestellt.

## Ergebnisse

	Accession Nr.	BobER1	BobER2	BobER2
<b>Induziertes Gen</b>				
Ahd2-like, Aldehyd-Dehydrogenase-Familie 1, Subfamilie A7	U96401	8,9	10,1	7,0
Creg, „cellular repressor of E1A-stimulated genes“	AF084524	5,8	8,8	5,9
MMTV, „mouse endog. mammary tumor virus, env“	M11024	3,2	2,2	2,5
AKR1C13, Aldo-keto-Reduktase-Familie, Mitglied C13	AB027125	2,5	2,6	2,6
schwere Immunglobulin-Kette (J558-Region)	P01747	2,5	2,4	2,7
CRISP-1, „cystein-rich secretory protein 1“	M928498	2,5	2,0	2,9
EST, ähnlich zu „virus-like“ (VL30) LTR	C77421	2,4	2,6	2,2
schwere Immunglobulin-Kette (J558-Region)	U88672	2,1	4,7	7,9
EST, ähnlich zu Adenosine A1 Rezeptor	W61841	2,1	2,4	6,0
schwere Immunglobulin-Kette (J558-Region)	PH0984	2,0	4,4	9,2
schwere Immunglobulin-Kette (J558-Region)	U88670	2,0	3,7	7,4
schwere Immunglobulin-Kette (J558-Region)	PH0978	2,0	2,3	2,3
<b>Inhibiertes Gen</b>				
EST, hohe Ähnlichkeit zu Protocadherin- $\gamma$ A1	AA039197	-9,3	-4,1	-4,9
Catenin $\alpha$ 1	D90362	-6,2	-7,0	-5,4
Rbp1, „cellular retinol binding protein 1“	X60367	-6,2	-4,8	-4,3
Sdh, „sorbitole dehydrogenase“	U27014	-4,5	-5,7	-6,8
Ptprs, Protein-Tyrosin Phosphatase, Rezeptor Typ S	D28530	-4,0	-2,4	-3,7
Idh2, Isocitrat-Dehydrogenase (NADP+), mitochondrial	U51167	-3,3	-4,5	-4,1
EST, hohe Ähnlichkeit zu tmsb10, Thymosin $\beta$ 10	AA537404	-3,1	-2,4	-2,7
EST, ähnlich zu Phosphoribosylpyrophosphat	AA590086	-2,8	-4,4	-2,1
Id3, „inhibitor of DNA binding 3“	M60523	-2,3	-2,7	-3,3
T-Zellrezeptor- $\gamma$ -Kette	M54996	-2,2	-2,2	-2,2

**Abbildung 27: Zusammenfassung der im Affymetrix-Genchip-Experiment durch BobER-regulierten Gene.** Die Gene, welche im Affymetrix-Genchip-Experiment als durch BobER-reguliert identifiziert wurden, sind aufgelistet in der Reihenfolge der Stärke ihrer Regulation in Experiment 1 (BobER1). In jedem unabhängigen Experiment wurde der Expressionslevel zwischen BobER-infizierten, OHT-stimulierten Zellen und mit Leervektor infizierten, OHT-stimulierten Zellen als Kontrolle, verglichen. Aufgelistet sind alle Gene, die in allen drei Experimenten eine Regulation von mindestens dem Faktor zwei zeigten (nach Brunner et al., 2003b).

Für einige der im Affymetrix-Genchip-Experiment identifizierten Gene sollte die differentielle Expression in den Ausgangs-cDNAs durch andere Methoden bestätigt werden. Dies wurde nur für einige der interessantesten Gene durchgeführt (nach den Kriterien (I) Stärke der Regulation sowie (II) sinnvolle Funktion in B-Zellen im Kontext des bekannten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Phänotyps). Von diesen Genen wurden cDNA-Proben mittels RT-PCR aus MB10-K15-RNA hergestellt und sequenziert, um sicherzustellen, dass sie tatsächlich das jeweilige Gen repräsentieren, und für eine Northernblot-Analyse radioaktiv markiert.



**Abbildung 28: Die differentielle Expression einiger im Affymetrix-Genchip-Experiment regulierter Gene konnte bestätigt werden.** (A) Northernblot-Analyse mit je 15 µg der für die Affymetrix-Hybridisierungen verwendeten RNAs mit radioaktiv markierten Oligonukleotidproben für die jeweiligen Gene. (B+C) Die im Affymetrix-Experiment verwendeten RNAs wurden in cDNA translatiert und in RT-PCR-Reaktionen auf die Expression von Immunglobulin-Sequenzen der J558-V<sub>H</sub>-Familie untersucht. Die verwendeten Primer und Bedingungen für die PCR-Reaktionen wurden in Anlehnung an Buchanan et al. (1997) verwendet (PD31 = Abelson präB-Zellen; MB10-mock = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zelleinzelklon infiziert mit Leervektor; MB10-K15 = BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Abelson-präB-Zelleinzelklon infiziert mit BobER).

Im Northernblot-Experiment zeigte sich, dass die Ahd2like-, Creg- und CRISP-1-RNAs (Hybridisierungen Abb.28A) tatsächlich in den BobER-präB-Zellen stärker exprimiert sind

## Ergebnisse

---

als in den mock-präB-Zellen. Auch für einige der negativ-regulierten Gene wie Rbp, Id3 und Thymosin- $\beta$  (Abb.28A) konnte im Northernblot-Experiment gezeigt werden, dass sie in den BobER-präB-Zellen weniger stark exprimiert sind. Die Ergebnisse der Northernblot-Analyse entsprechen den Ergebnissen der Affymetrix-Genchip-Hybridisierungen, wobei für beide Experimente mit den selben RNAs gearbeitet wurde.

Eine weitere Gruppe von Genen, die durch BOB.1/OBF.1 heraufreguliert wurden, waren 20 verschiedene Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Gen-Sequenzen. Alle diese Sequenzen waren Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Gene, die zur J558-Familie der Immunglobulingene gehören. Da die Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Genen der Immunglobuline so hoch sind, dass eine Northernblot-Analyse nicht möglich ist, wurde eine RT-PCR etabliert, um zu untersuchen, ob diese tatsächlich differentiell exprimiert werden. Dazu wurde ein RT-PCR-Protokoll verwendet, welches spezifisch sterile Transkripte der J558-Gene erkennt. cDNAs der Abelsonvirus-transformierten präB-Zelllinien MB10-mock (BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup> + OHT), MB10-K15 (BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>BobER<sup>+</sup> + OHT) und PD31 (BOB.1/OBF.1<sup>+</sup> + OHT) wurden durch eine  $\beta$ -Aktin-PCR abgeglichen, so dass für die J558-PCR vergleichbare Mengen cDNA eingesetzt werden konnten. Es zeigte sich, dass die PD31-Zellen (BOB.1/OBF.1<sup>+/+</sup>) deutlich mehr sterile J558-RNA exprimieren als die beiden BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zelllinien (Abb.28C). In Zellen, die wildtypisches BOB.1/OBF.1 exprimieren, fand sich also mehr J558-RNA als in solchen, die kein BOB.1/OBF.1 exprimieren. Darüber hinaus exprimieren auch die MB10-K15-Zellen (mit induziertem BobER) mehr sterile J558-RNA als die MB10-mock-Zellen (Abb.28B+C), das heißt, in den Zellen, die sich nur durch BobER-Aktivität unterscheiden (die Zellen stammen von derselben Ausgangslinie MB10 ab im Gegensatz zu den PD31-Zellen), ist J558-Expression ebenfalls BOB.1/OBF.1-abhängig reguliert.

### **2.3 Rolle von BOB.1/OBF.1 für die Expression von Immunglobulinen in Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen**

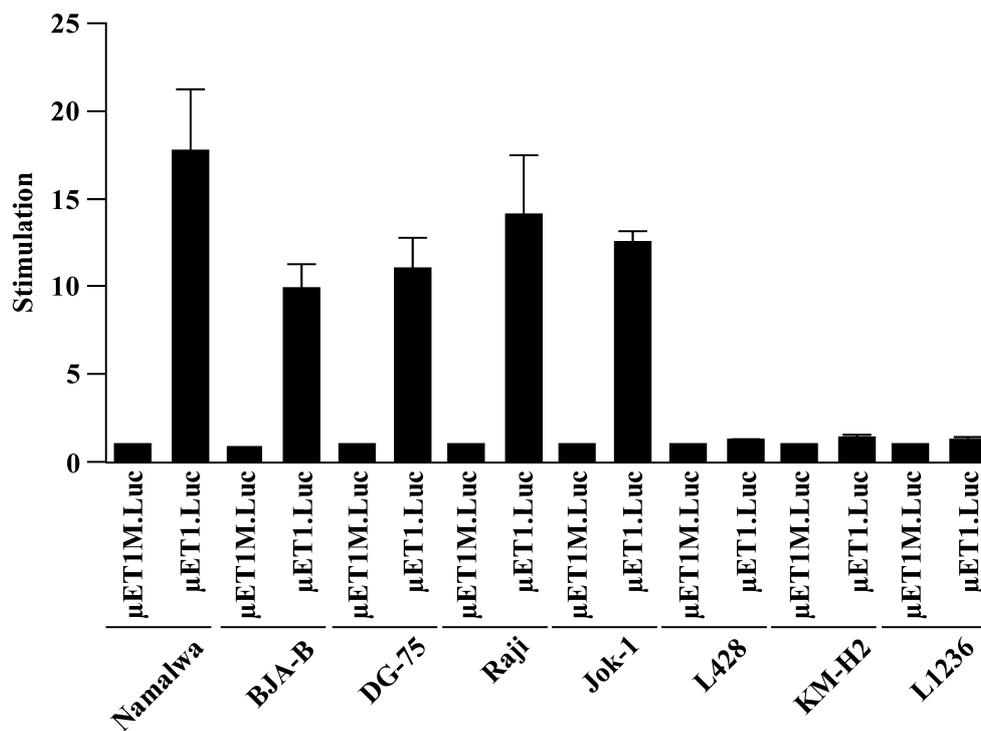
Obwohl zahlreiche Hinweise dafür sprechen, dass die neoplastischen Zellen des Hodgkin-Lymphoms, die HRS-Zellen (Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen), B-lymphoiden Ursprungs sind, steht das Fehlen von Immunglobulin-Expression dazu im Widerspruch. Es wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass HRS-Zellen inaktivierende Mutationen des Immunglobulin-Lokus aufweisen, welche typischerweise im Verlauf der Reifung von B-Zellen in Keimzentren der Milz auftreten. In HRS-Zellen wurden Mutationen gefunden, die zu einem nicht-funktionellen Immunglobulin führen bzw. in zwei Fällen zu einer Punktmutation des Oktamer-Motivs im Immunglobulin-Promotor. Diese Mutationen wurden für das Fehlen von Immunglobulin-Expression in HRS-Zellen verantwortlich gemacht. In Zusammenarbeit mit Prof. H. Stein (Berlin) konnte jedoch gezeigt werden, dass zahlreiche HRS-Zellen funktional rearrangierte Immunglobulingene ohne Mutation im Promotorbereich oder in der kodierenden Region aufweisen, so dass das beschriebene Erklärungsmodell nicht mehr schlüssig ist. Des Weiteren zeigten sich im Rahmen dieser Kooperation Hinweise darauf, dass primäre HRS-Zellen keine Expression von Oct2 und BOB.1/OBF.1 zeigen, was im Widerspruch stand zu älteren Befunden, dass HRS-Zelllinien konstitutiv Oct2 und NFκB exprimieren (Bargou et al., 1996). Die im Rahmen der Kooperation erhaltenen Daten deuteten alle darauf hin, dass womöglich ein transkriptioneller Defekt für das Fehlen von Immunglobulinen in HRS-Zellen verantwortlich ist.

#### **2.3.1 HRS-Zelllinien zeigen keine oktamerabhängige sowie keine Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription**

Eine mögliche Erklärung für den in HRS-Zellen beobachteten Defekt der Immunglobulin-Expression könnte ein Defekt der Immunglobulin-Transkription sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Aktivität von Immunglobulin-Reportern in den HRS-Zelllinien L428,

## Ergebnisse

KM-H2 und L1236 untersucht. Die verwendeten Immunglobulin-Reporter enthielten ein Luziferasegen unter der Kontrolle eines Promotors einer variablen Region (Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor) der leichten Immunglobulin-Kette allein (T1.Luc, Abb.4) oder zusätzlich den Enhancer aus dem Intron ( $\mu$ Enhancer) der schweren Immunglobulin-Kette ( $\mu$ ET1.Luc, Abb.4). Um eine spezifische Promotoraktivität zu detektieren, wurde als Kontrolle ein entsprechendes Konstrukt transfiziert, das durch eine Mutation des Oktamer-Motivs im Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor inaktiviert wurde (Abb.5D). Wurden diese Reporter in fünf verschiedene humane B-Zelllinien (Namalwa, Raji, Jok-1, DG-75 und BJA-B) transfiziert, war die Aktivität des wildtypischen Promotors jeweils signifikant höher als die des Oktamer-mutierten Reporters (Abb.29).

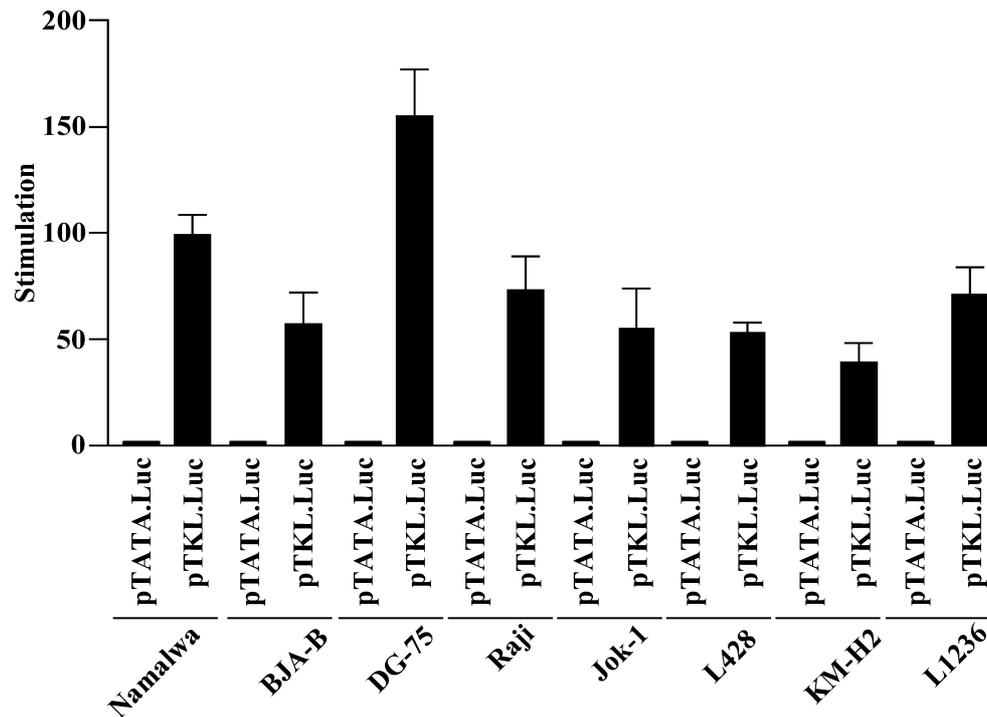


**Abbildung 29: Ein Immunglobulin-Promotor zeigt keine transkriptionelle Aktivität in HRS-Zelllinien.** Transiente Transfektion von verschiedenen B-Zelllinien (Namalwa, BJA-B, DG-75, Raji, Jok-1) und HRS-Zelllinien (L428, KM-H2 und L1236) mit Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor/ $\mu$ -Enhancer reguliertem Reporterkonstrukt ( $\mu$ ET1.Luc). Die Zellen wurden mit jeweils 15  $\mu$ g des Reporterplasmids transfiziert. Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität des Vektors mit der Mutation des Oktamer-Motivs im Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor ( $\mu$ ET1M.Luc) wurde für jede Zelllinie gleich eins gesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar

Wurden jedoch die gleichen Konstrukte in die HRS-Zelllinien transfiziert, zeigten sowohl die wildtypischen als auch die Oktamer-mutierten Promotorkonstrukte die gleiche niedrige

## Ergebnisse

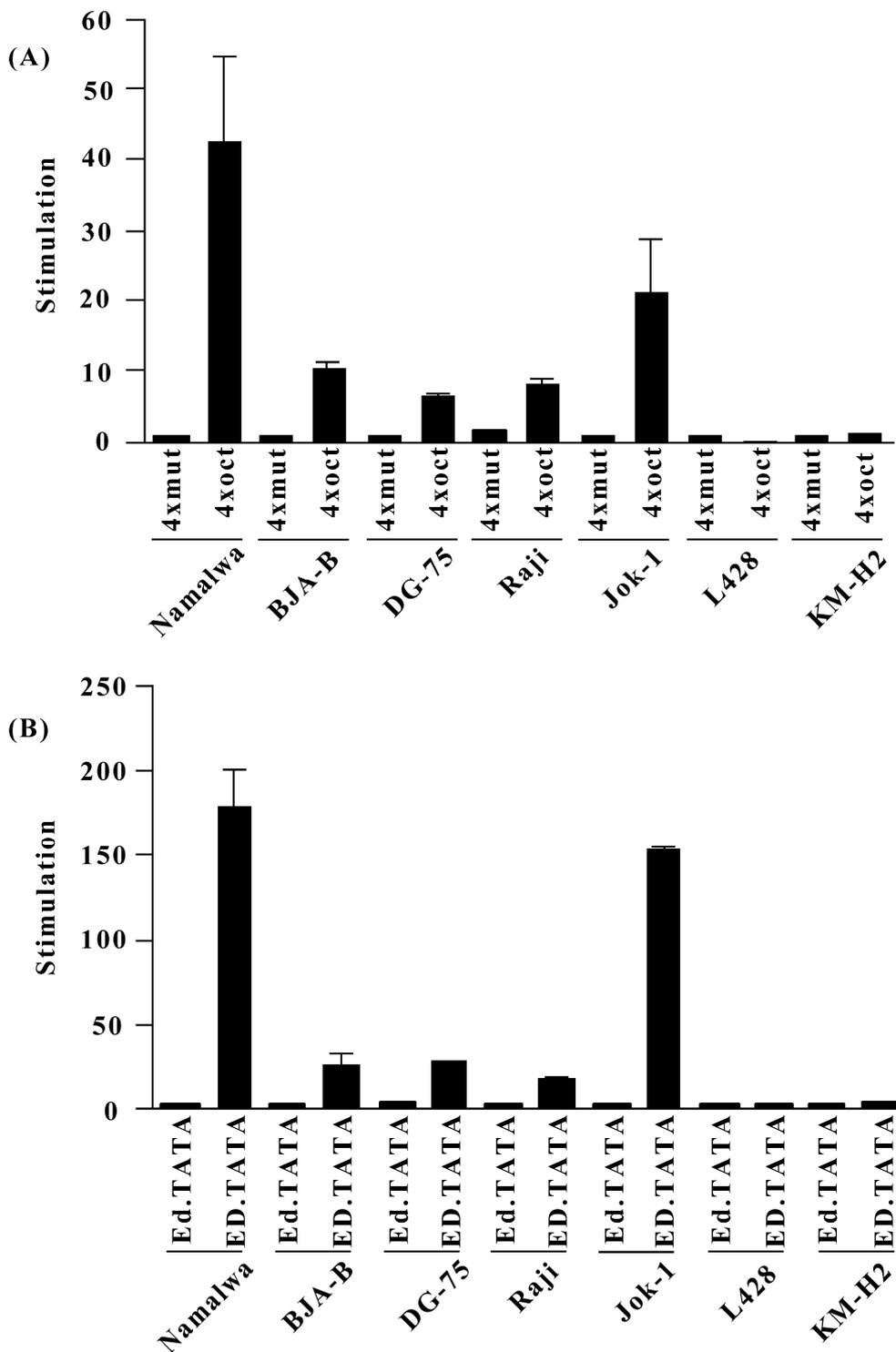
Aktivität (Abb.29). Dieser Defekt in Immunglobulin-spezifischer transkriptioneller Aktivität war nicht auf einen generellen transkriptionellen Defekt in den HRS-Zelllinien zurückzuführen, da die Aktivität eines tk-Promotor-regulierten Reporters (Thymidin-Kinase-Promotor, siehe auch. Abb.4E) in den B-Zelllinien und in den HRS-Zelllinien vergleichbar war (Abb.30).



### Abbildung 30: HRS-Zelllinien zeigen keinen generellen transkriptionellen Defekt.

Transiente Transfektion von verschiedenen B-Zelllinien (Namalwa, BJA-B, DG-75, Raji, Jok-1) und HRS-Zelllinien (L428 und KM-H2) mit einem Thymidinkinase-Promotor-Reporterkonstrukt (pTK.Luc). Die Zellen wurden mit jeweils 15 µg des angegebenen Reporterplasmids transfiziert und entweder mit 200 nM OHT induziert oder nicht. Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität des verkürzten Thymidinkinase-Minimalpromotor-Vektors (pTATA.Luc) wurde für jede Zelllinie gleich eingesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

In den HRS-Zellen ist also in der Tat ein Defekt der Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription festzustellen. Das Oktamer-Motiv ist eines der kritischen regulatorischen Elemente für die Regulation von Immunglobulinen. Auf den hier verwendeten Immunglobulin-κT1-Promotor/μEnhancer-Reporterkonstrukten sind jedoch auch zahlreiche andere regulatorische Sequenzen vorhanden.



**Abbildung 31: Defekte oktamerabhängige Transkription in HRS-Zelllinien.** Transiente Transfektion von verschiedenen B-Zelllinien (Namalwa, BJA-B, DG-75, Raji, Jok-1) und HRS-Zelllinien (L428 und KM-H2) mit oktamerabhängigen Reporterkonstrukten. Die Zellen wurden mit jeweils 15 µg des angegebenen Reporterplasmids transfiziert und entweder mit 200 nM OHT induziert oder nicht. Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität des nicht Oktamer-Motivmutierten Vektors (Ed.TATA und 4xmut) wurde für jede Zelllinie gleich eins gesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

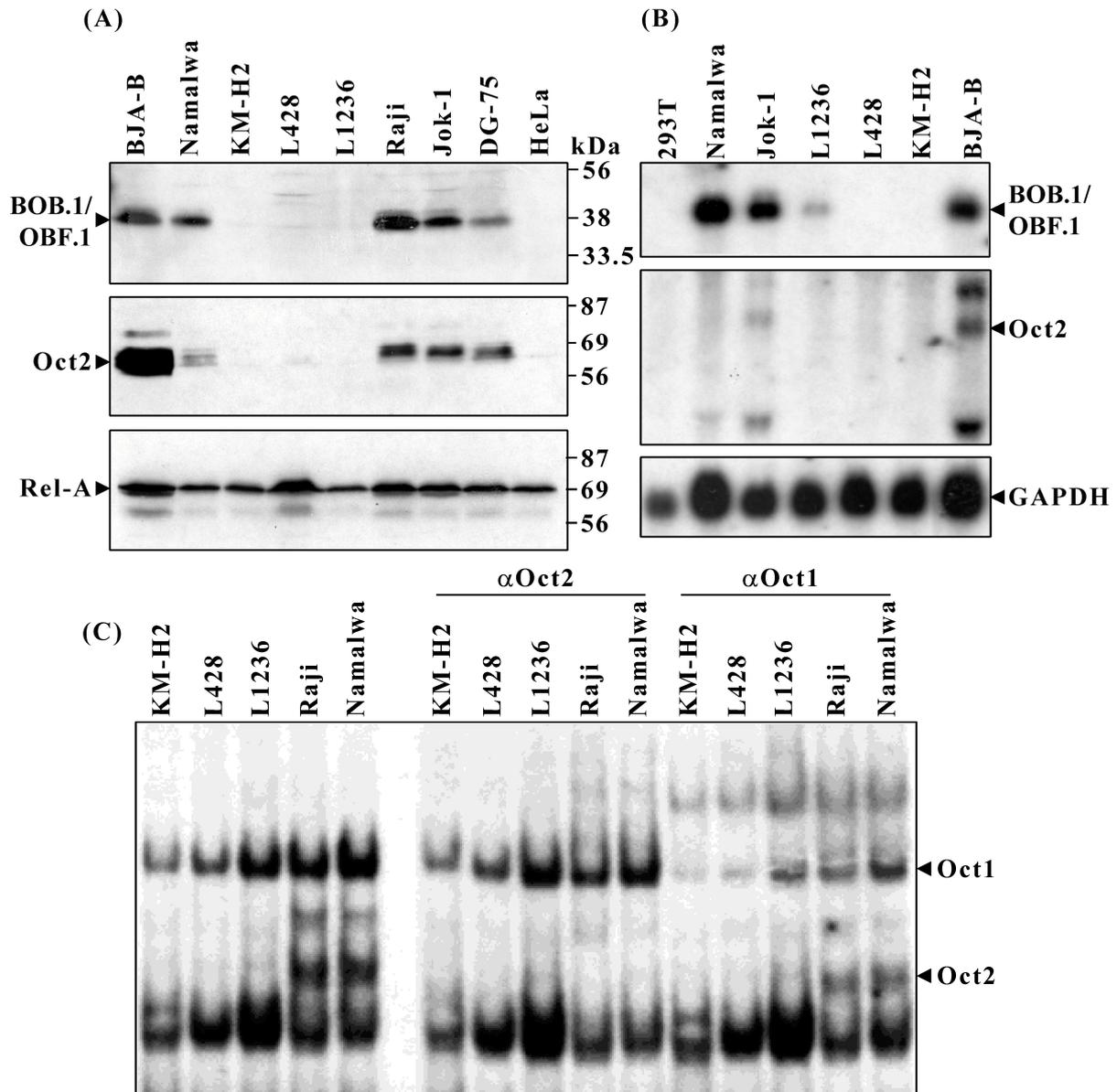
Um festzustellen, ob der Defekt in der Immunglobulin-Expression auf einen Defekt der oktamerabhängigen Transkription zurückzuführen ist, wurden in die verschiedenen humanen B-Zelllinien sowie in die HRS-Zelllinien L428 und KM-H2 synthetische Promotorkonstrukte transfiziert, die ein vierfach multimerisiertes Oktamer-Motiv bzw. ein mutiertes Oktamer-Motiv enthalten (siehe auch Abb.4 und Beschreibung der Reporter im ersten Teil dieser Arbeit). Diese synthetischen Oktamer-Reporter zeigen die gleiche geringe transkriptionelle Aktivität wie die Immunglobulin-Promotor-Reporter in den HRS-Zellen. In den wildtypischen B-Zellen ist ein signifikanter Unterschied zwischen wildtypischem und mutiertem Promotor zu detektieren, wohingegen in den HRS-Zelllinien wildtypischer und mutierter Promotor gleich aktiv sind (Abb.31A+B). Das heißt, sowohl die Immunglobulin- als auch die oktamerabhängige Reporter-Gen-Transkription sind defekt in HRS-Zellen.

### **2.3.2 HRS-Zellen exprimieren kein Oct2 und BOB.1/OBF.1**

Die B-Zell-spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren/Koaktivatoren Oct2 und BOB.1/OBF.1 spielen eine entscheidende Rolle bei der Expression von Immunglobulinen. Ein Fehlen dieser Faktoren könnte also eine Erklärung des beobachteten transkriptionellen Defektes in HRS-Zellen sein. Daher wurde die Expression von Oct2 und BOB.1/OBF.1 in HRS-Zelllinien im Vergleich zu einigen B-Zelllinien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die HRS-Zelllinien KM-H2, L428 und L1236 im Vergleich zu fünf verschiedenen B-Zelllinien (Namalwa, BJA-B, DG-75, Raji und Jok-1) kein BOB.1/OBF.1- und kein Oct2-Protein exprimieren (Abb.32A). Das Gleiche gilt für die Expression dieser Gene auf RNA-Ebene, mit der Ausnahme, dass L1236-Zellen eine geringe Menge BOB.1/OBF.1-RNA exprimieren (Abb.32B). Das in den L1236-Zellen detektierte BOB.1/OBF.1-RNA-Signal war deutlich schwächer als in B-Zellen, trotzdem ist es erstaunlich, dass in den L1236-Zellen kein BOB.1/OBF.1-Protein zu detektieren ist. In einem Gelretardations-Experiment mit einer spezifischen Oktamer-Probe konnte durch Antikörper-Supershift-Experimente gezeigt werden, dass in beiden, B- und HRS-Zelllinien, eine Bindung des ubiquitär exprimierten Faktors Oct1 zu detektieren ist, Oct2-Bindungsaktivität jedoch nur in den B-Zelllinien, nicht

## Ergebnisse

in den HRS-Zelllinien (Abb.32C). Die hier gemachten Beobachtungen bezüglich der Oct2-Expression widersprechen den Experimenten von Bargou et al. (1996), der zeigte, dass HRS-Zelllinien große Mengen Oct2 exprimieren.



**Abbildung 32: BOB.1/OBF.1- und Oct2-Expression in HRS-Zelllinien im Vergleich zu verschiedenen B-Zelllinien.** (A) Protein-Immunblot-Analyse mit 100  $\mu$ g Gesamtzellproteinextrakt der jeweiligen Zelllinien und den angegebenen BOB.1/OBF.1, Oct2 und zum Abgleich Rel-A-Antikörpern. (B) Northernblot-Analyse mit einer BOB.1/OBF.1, Oct2 und zum Abgleich mit einer GAPDH-spezifischen Probe und 10  $\mu$ g Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien. (C) Gelretardations-Analysen mit Gesamtzellproteinextrakt der jeweils angegebenen Zelllinien und einer radioaktiv markierten Oktamer-Motiv-Oligonukleotidprobe. Die spezifischen Oktamer-Protein-DNA-Komplexe sind mit Oct1/Oct2 markiert. Wie angegeben, wurden für Supershift-Experimente anti-Oct2 bzw. anti-Oct1 Antikörper verwendet (Namalwa, BJA-B, DG-75, Raji, Jok-1 = B-Zelllinien; L428, KM-H2, L1236 = HRS-Zelllinien; 293T = humane embryonale Nierenepithelzelllinie; HeLa = humane Cervixcarzinomazelllinie).

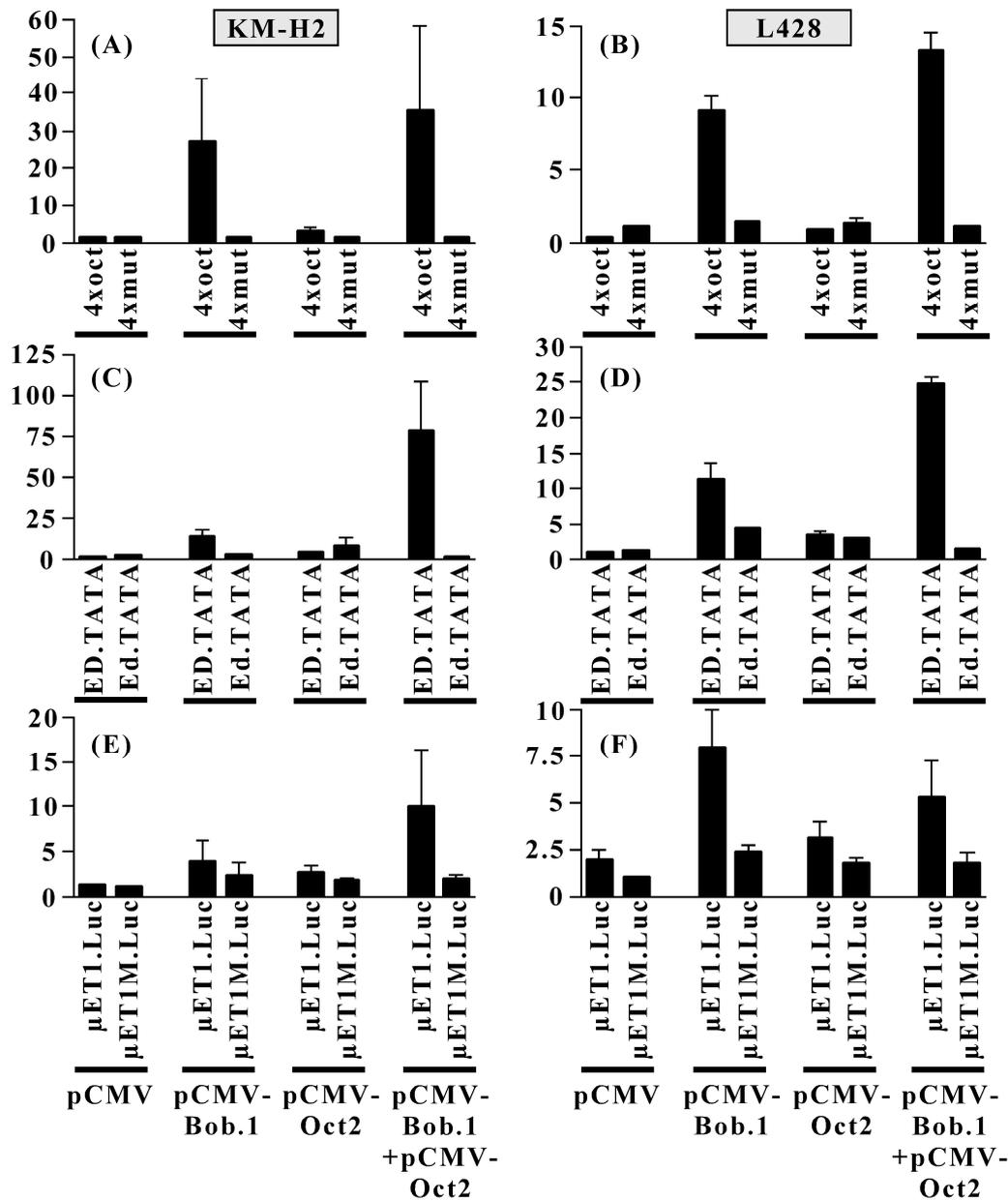
### **2.3.3 Transiente, jedoch nicht stabile Expression von BOB.1/OBF.1 ist ausreichend oktamerabhängige und Immunglobulin-Reporter-gentranskription in HRS-Zellen wiederherzustellen**

Das Fehlen von BOB.1/OBF.1- und Oct2-Expression in HRS-Zellen könnte eine Erklärung für den beobachteten Defekt in der Immunglobulin-Transkription sein. Um zu klären, ob tatsächlich das Fehlen von BOB.1/OBF.1 und Oct2 direkt verantwortlich für den Transkriptionsdefekt ist, wurden die HRS-Zelllinie KM-H2 und L428 mit den beschriebenen Immunglobulin-Reportern und Oktamer-Reportern transient transfiziert. Bei diesen Transfektionen wurden zusätzlich Expressionsvektoren für BOB.1/OBF.1, Oct2, Leervektor oder BOB.1/OBF.1 zusammen mit Oct2 kotransfiziert (Abb.33). Dabei zeigte sich, dass BOB.1/OBF.1-Kotransfektion allein in der Lage ist, sowohl den Immunglobulin-Promotor-Reporter in den KM-H2-Zellen zu induzieren als auch die beiden Oktamer-Reporter in beiden Zelllinien zu aktivieren. Oct2 allein zeigte keinen signifikanten Effekt. Die Kotransfektion von BOB.1/OBF.1 und Oct2 zeigte in den meisten Transfektionen keinen stärkeren Effekt als die Kotransfektion von BOB.1/OBF.1 allein, jedoch wurde der Immunglobulin-Promotor in den L428-Zellen durch Oct2 plus BOB.1/OBF.1 deutlich besser induziert als durch BOB.1/OBF.1 allein. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der BOB.1/OBF.1-Koaktivator, der nicht in HRS-Zellen exprimiert wird, in transienten Transfektionen der entscheidende Faktor zur Behebung des transkriptionellen Defekts in HRS-Zelllinien ist. Das Fehlen von BOB.1/OBF.1 in HRS-Zellen ist also eine mögliche Erklärung für das Fehlen der Immunglobulin-Expression in HRS-Zellen.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und um zu untersuchen, ob BOB.1/OBF.1 auch die Expression von endogenen Immunglobulinen induzieren kann, wurden KM-H2-Zellen stabil mit einem BOB.1/OBF.1-Expressionsvektor transfiziert. Dabei wurde ein Vektor kotransfiziert, der das Puromycin-Resistenzgen enthält und die Zellen auf Puromycin resistente Einzelklone selektioniert. Außerdem wurden die KM-H2- und L428-Zelllinien mit einem BobER-Virus infiziert, um so ein regulierbares BOB.1/OBF.1-Protein in die Zellen zu

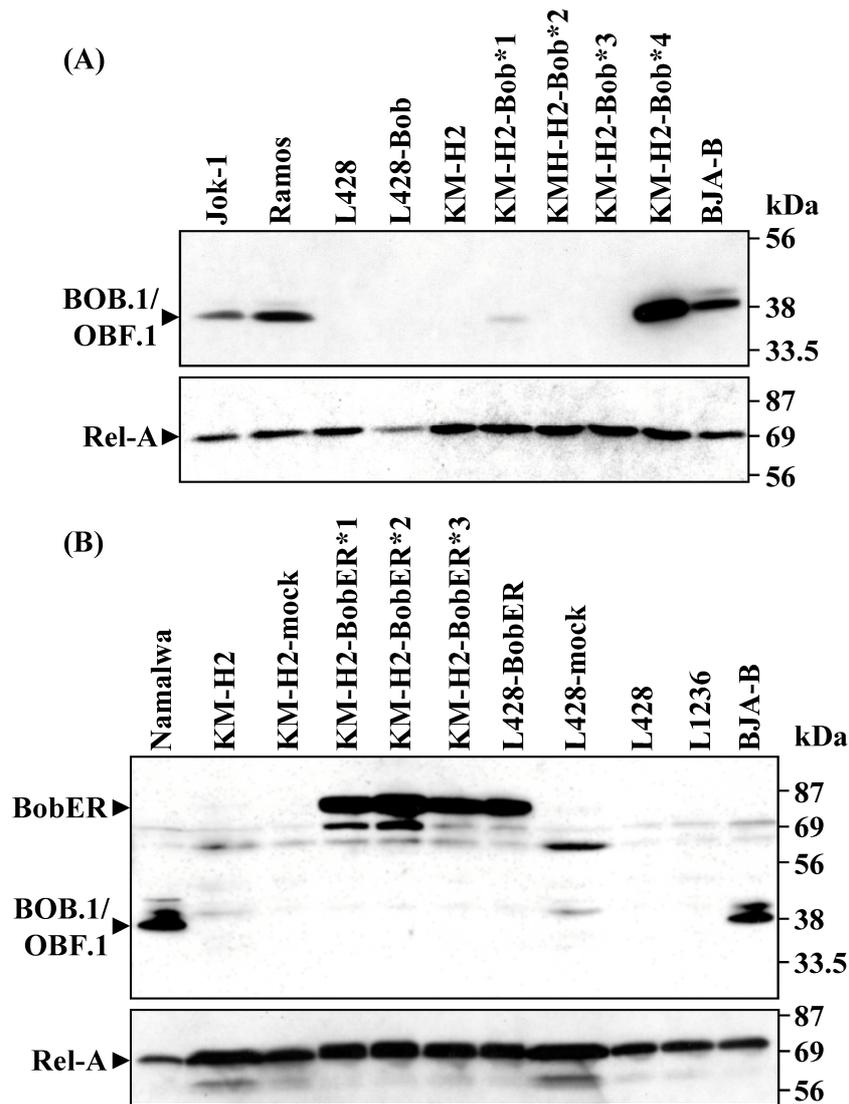
## Ergebnisse

integrieren. In einigen Einzelklonen und Massenkulturen konnte BOB.1/OBF.1- bzw. BobER-Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb.34).



**Abbildung 33: Der Defekt der oktamerabhängigen und Immunglobulin-Promotor-Transkription in HRS-Zelllinien kann durch Kotransfektion von BOB.1/OBF.1 behoben werden.** Die HRS-Zelllinien L428 und KM-H2 wurden wie angegeben transient mit je 10 µg der oktamerabhängigen und Immunglobulin-κT1-Promotor/µEnhancer-Reporterkonstrukte transfiziert (ED.TATA und µET1). Zusätzlich wurde wie angegeben entweder ein Leervektor, BOB.1/OBF.1-Expressionsvektor, Oct2-Expressionsvektor oder BOB.1/OBF.1 + Oct2-Expressionsvektor kotransfiziert (pCMV, pCMV-Bob.1, pCMV-Oct2). Die Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Die Aktivität des Oktamer-Motiv-mutierten Vektors (Ed.TATA und µET1M) kotransfiziert mit Leervektor pCMV wurde für jede Zelllinie gleich eins gesetzt. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar.

## Ergebnisse



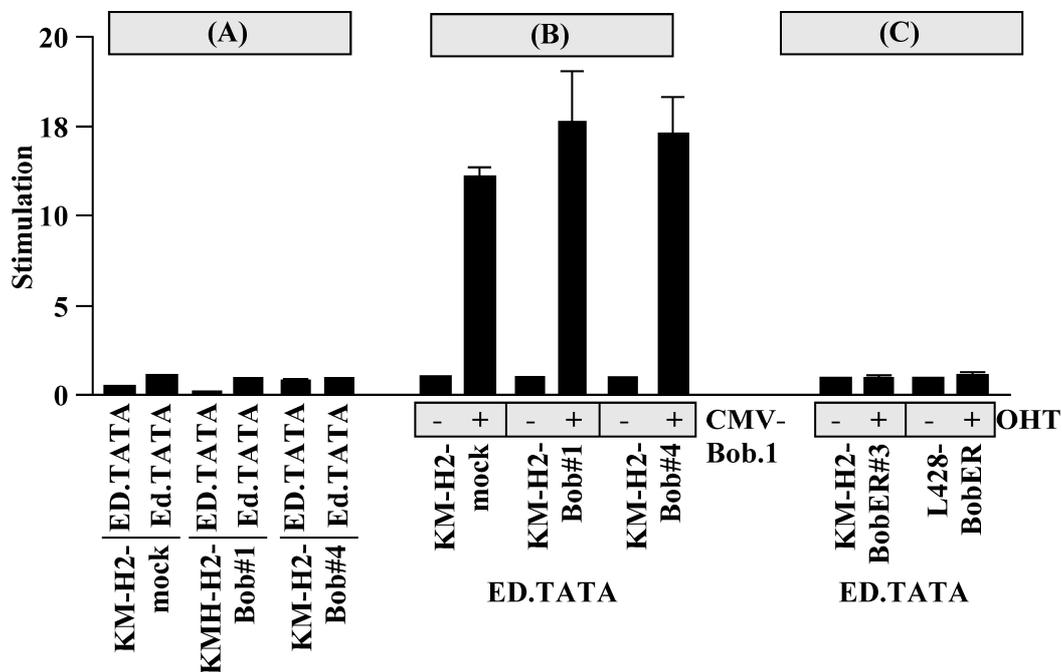
### Abbildung 34: Stabile Expression von BOB.1/OBF.1 oder BobER in HRS-Zelllinien.

(A+B) Protein-Immunblot-Analyse mit 100 µg Gesamtzellproteinextrakt der jeweiligen Zelllinien und den angegebenen BOB.1/OBF.1 und zum Abgleich Rel-A Antikörpern. (Namalwa, BJA-B, DG-75, Ramos, Jok-1 = B-Zelllinien; L428, KM-H2, L1236 = HRS-Zelllinien; KM-H2mock = stabil mit Leervektor infizierter KM-H2-Zelleinzelklon; L428mock = stabil mit Leervektor infizierte Zellmassenkultur; L428-Bob = stabil mit BOB.1/OBF.1 infizierte L428-Zellmassenkultur; KM-H2-Bob\*1-4 = stabil mit BOB.1/OBF.1 infizierte KM-H2-Zelleinzelklone; KM-H2-BobER\*1-3 und L428-BobER = stabil mit BobER infizierte KM-H2- und L428-Zelleinzelklone).

Diese Zellen wurden nunmehr mit den beschriebenen synthetischen Oktamer-Reportern (wildtypisch und Oktamer-Motiv-mutiert) transient transfiziert. Dabei zeigte sich, dass das stabil exprimierte BOB.1/OBF.1 und BobER nicht in der Lage waren, die oktamerabhängige Transkription wiederherzustellen (Abb.35), so wie es in transienten Transfektionen möglich war (entsprechende Ergebnisse mit den Immunglobulin-Reportern, Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die stabile BOB.1/OBF.1-Expression die Zellen so verändert

## Ergebnisse

hat, dass BOB.1/OBF.1 nicht mehr transkriptionell aktiv ist oder die verwendeten Oktamer-Reporter inhibiert werden. Wurden diese stabilen Zelllinien jedoch wie beschrieben mit Reporterkonstrukten und BOB.1/OBF.1-Expressionsvektoren transient kotransfiziert, so war es wiederum möglich, die Aktivität der Reporterkonstrukte zu induzieren (Abb.35). Das heißt, nur das stabil exprimierte Protein ist nicht aktiv. Entweder ist das stabil exprimierte Protein modifiziert und daher nicht funktionsfähig, oder im stabilen System ist, im Gegensatz zu den transienten Transfektionen, bei denen die transfizierten Proteine stark überexprimiert werden, neben der BOB.1/OBF.1-Expression eine zusätzliche stabile Oct2-Expression nötig.



**Abbildung 35: Der Defekt der oktamerabhängigen und Immunglobulin-Promotor-Transkription in HRS-Zelllinien kann nicht durch stabil exprimiertes BOB.1/OBF.1 oder BobER behoben werden.** Alle Transfektionen wurden durch Kotransfektion von 50 ng pRL-TK normalisiert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Luziferaseaktivität geerntet. Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen dar. Genauere Beschreibung der Zellen siehe auch Abb.35. (A) Die HRS-Zelllinien KM-H2-mock, KM-H2-Bob\*1 und KM-H2-Bob\*4 wurden wie angegeben transient mit je 15 µg des oktamerabhängigen Reporterkonstruktes ED.TATA sowie dem Oktamer-mutierten Ed.TATA transfiziert. Die Aktivität des Oktamer-mutierten Vektors wurde jeweils gleich eins gesetzt. (B) Die selben Zelllinien wie in Abb.36A wurden mit 10 µg ED.TATA transfiziert, wobei zusätzlich, wie angegeben, je 10 µg Leervektor (- = pCMV) oder 10 µg eines BOB.1/OBF.1-Expressionsvektors kotransfiziert wurden (+ = pCMV-Bob.1). Für jede Zelllinie wurde die Kotransfektion mit Leervektor gleich eins gesetzt. (C) Die Zelllinien KM-H2-BobER\*3 und L428-BobER wurden transient mit dem oktamerabhängigen ED.TATA-Vektor transfiziert, danach wurde die Hälfte der Zellen mit Hydroxytamoxifen behandelt, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Für jede Zelllinie wurden die Luziferasewerte der nicht OHT behandelten Zellen gleich eins gesetzt.

### 3. DISKUSSION

Als einer der wenigen zelltypisch exprimierten transkriptionellen Koaktivatoren ist BOB.1/OBF.1 ein besonders interessantes Modell. BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen Phänotyp mit einem Defekt der frühen B-Zellentwicklung, einen deutlicheren Defekt späterer Entwicklungsstadien im Keimzentrum sowie eine deregulierte humorale Immunantwort und eine defekte T-abhängige und T-unabhängige Immunantwort.

Ursprünglich wurde angenommen, dass BOB.1/OBF.1 eine entscheidende Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle der Immunglobulingene spielt. In den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Immunglobulin-Transkription jedoch nur leicht beeinflusst. Daher stellte sich die Frage nach der Redundanz von BOB.1/OBF.1. In dieser Arbeit konnte durch Transfektions-Experimente in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen gezeigt werden, dass BOB.1/OBF.1 nicht redundant ist für Immunglobulin-Transkription. Zusätzlich stellte sich in einem Affymetrix-Experiment heraus, dass BOB.1/OBF.1 wahrscheinlich die J558-Immunglobulingenfamilie reguliert. Diese Ergebnisse werden im ersten Abschnitt diskutiert.

Um den Phänotyp der BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse zu erklären, ist die Identifizierung der von BOB.1/OBF.1-regulierten Zielgene entscheidend. Die zu Beginn dieser Arbeit bekannten, durch BOB.1/OBF.1 regulierten Gene können den Phänotyp der Mäuse nicht erklären und sind zudem nicht eindeutig direkte BOB.1/OBF.1-Zielgene. Im zweiten Teils dieser Arbeit sollten daher bislang unbekannter BOB.1/OBF.1-Zielgene mittels verschiedener Methoden identifiziert werden.

In Kooperation mit der Gruppe von Prof. H. Stein (Berlin) wurde gezeigt, dass die malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms (HL), die Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen), kein BOB.1/OBF.1 und Oct2 exprimieren. Des Weiteren stellte sich heraus, dass BOB.1/OBF.1 in den Zellen notwendig ist zur Regulation eines Immunglobulin-Reporters,

wohingegen BOB.1/OBF.1 nicht ausreicht, um die endogene Immunglobulin-Expression zu reaktivieren. Im dritten Teil der Diskussion werden diese Ergebnisse vor dem Hintergrund der Deregulation des B-Zell-Expressionsmusters in HRS-Zellen und im Hinblick auf die Relevanz des Fehlens von BOB.1/OBF.1 in HRS-Zellen für die bekannte fehlende Immunglobulin-Expression in Zellen dieses Typs diskutiert.

### **3.1 Die Rolle von BOB.1/OBF.1 für oktamerabhängige und Immunglobulin-Transkription**

In zahlreichen Experimenten zeigte sich, dass das Oktamer-Motiv des Immunglobulin-Promotors eine entscheidende Funktion bei der Regulation der Immunglobulingene übernimmt. Die Transkriptionsfaktoren Oct1, Oct2 und ihr Koaktivator BOB.1/OBF.1 sind in B-Zellen an der Vermittlung oktamerabhängiger Transkription beteiligt. Ob neben BOB.1/OBF.1 weitere, unbekannte Koaktivatoren in B-Zellen existieren, welche die BOB.1/OBF.1-Funktion übernehmen können, ist nach wie vor eine offene Frage. Außerdem zeigte sich, dass BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse, auch wenn das Oktamer-Motiv essentiell für die Immunglobulin-Transkription ist, überraschenderweise eine normale Expression von IgM-Immunglobulingenen zeigen, wohingegen einige „switched“-Isotypen reduziert exprimiert werden. Ein ähnlicher Phänotyp bezüglich der Immunglobulin-Transkription wurde in Oct2<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet, und überraschenderweise zeigen auch Mäuse, die weder BOB.1/OBF.1 noch Oct2 exprimieren, dasselbe Immunglobulin-Expressionsmuster wie die einzeldefizienten Mäuse (Schubart et al., 2001). Ursprünglich wurde angenommen, dass Immunglobulin-Promotoren die Hauptziele des BOB.1/OBF.1-Proteins sind. Die Analyse von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte jedoch weitestgehend normale Transkriptionsraten von schweren und leichten Immunglobulin-Ketten. In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen die Oktamer-Motiv-vermittelte transkriptionelle Aktivität defekt ist. Sowohl im Falle synthetischer Oktamer-Motiv-Promotor-Reporter als auch bei

einem Immunglobulin-Promotor-Reporter war in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen keine transkriptionelle Aktivität zu detektieren. Durch Komplementation dieser Zellen mit einem konditionalen BOB.1/OBF.1-Protein konnte eine hormoninduzierte oktamerabhängige Aktivität in den Zellen erzeugt werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass BOB.1/OBF.1 in präB-Zellen nicht redundant, sondern essentiell ist für die Vermittlung einer spezifisch oktamerabhängigen Transkription. Jedoch war in denselben Zellen die Expression der endogenen Keimbahn-Transkripte der schweren Immunglobulin-Ketten nicht beeinflusst (Laumen et al., 2000). Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass der Regulationsmechanismus der endogenen Gene wesentlich komplexer ist als der untersuchte Teilmechanismus mit einem transient transfizierten Reporter mit Immunglobulin-Promotor/ $\mu$ Enhancer. Darüber hinaus konnte hier interessanterweise in einem Affymetrix-Genchip-Experiment gezeigt werden, dass spezifisch die Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Gene der J558-Familie in den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen herunterreguliert werden (Brunner et al., 2003b). Das heißt, womöglich werden nur einige endogene Immunglobulin-Promotoren von BOB.1/OBF.1 reguliert, was erklären würde, weshalb mit den hier durchgeführten Northernblot-Analysen der Keimbahn-Transkripte kein Expressionsunterschied zu detektieren war.

### **3.1.1 BOB.1/OBF.1 ist essentiell und nicht redundant für oktamerabhängige und Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription**

Die entscheidende Funktion des Oktamer-Motivs bei der Regulation der Immunglobulin-Promotoren konnte in verschiedenen Experimenten nachgewiesen werden (Falkner and Zachau, 1984; Wirth et al., 1987). Zwar sind sowohl im Promotor als auch in den Enhancerelementen der Immunglobulingene Oktamer-Motive vorhanden, jedoch deuteten Mutations-Experimente immer wieder darauf hin, dass das Oktamer-Motiv des proximalen Promotors eine deutlich wichtigere Rolle spielt (Lenardo et al., 1987; Jenuwein and Grosschedl, 1991; Annweiler et al., 1992a). Der deutlichste Hinweis auf die essentielle Funktion des Oktamer-Motivs im Immunglobulin-Promotor war die Analyse von

## Diskussion

---

Promotor/Enhancer regulierten Konstrukten in transgenen Mausmodellen, wobei wildtypische und Oktamer-Motiv-mutierte Konstrukte untersucht wurden (Jenuwein and Grosschedl, 1991). Während sich zeigte, dass das Oktamer-Motiv im  $\mu$ Enhancer (intronischer Enhancer der schweren Immunglobulin-Kette) eine untergeordnete Rolle spielt, war die transkriptionelle Aktivität durch die Mutation des Oktamer-Motivs im Promotor deutlich reduziert.

Die meisten Faktoren, die für die Vermittlung oktamerabhängiger Transkription verantwortlich sind, wurden mittlerweile identifiziert. B-Zellen exprimieren zwei Transkriptionsfaktoren, die an das Oktamer-Motiv binden können, Oct1 und Oct2. Diese Transkriptionsfaktoren sind nicht in der Lage, allein oktamerabhängige Transkription zu vermitteln, sondern benötigen dazu vielmehr eine Interaktion mit B-Zell-spezifischen Kofaktoren (Pierani et al., 1990; Luo et al., 1992; Pfisterer et al., 1994; Annweiler et al., 1992b). Zwei solcher Faktoren wurden postuliert. Einer dieser Faktoren sollte mit Oct1 und Oct2 interagieren und für die Vermittlung oktamerabhängiger Promotoraktivität verantwortlich sein, der andere Faktor sollte nur mit Oct2 interagieren und für die Vermittlung von Enhancer-spezifischer Aktivität verantwortlich sein (Wirth et al., 1995; Annweiler et al., 1994). Bislang konnte nur einer dieser vorhergesagten Koaktivatoren kloniert werden, BOB.1/OBF.1. Dieser interagiert in der Tat spezifisch mit Oct1 und Oct2 und vermittelt oktamerabhängige Promotoraktivität (Pfisterer et al., 1995; Schubart et al., 1996b). Der hypothetische zweite, Oct2-spezifische Koaktivator konnte bislang nicht identifiziert werden. Aus den hier beschriebenen Ergebnissen wird jedoch deutlich, dass ein zweiter Koaktivator nicht die Funktion von BOB.1/OBF.1 übernehmen kann. BOB.1/OBF.1 ist also nicht redundant, sondern vielmehr essentiell für die Vermittlung von oktamerabhängiger Transkription. Die hier gezeigten Resultate erweitern Beobachtungen, die in *in vitro* Transkriptions-Experimenten gemacht wurden. Dabei wurde BOB.1/OBF.1 aus B-Zellkernextrakten mittels polyklonaler Antikörper entfernt. Die *in vitro* Transkription eines Immunglobulin-Promotors war in diesen Extrakten deutlich reduziert und konnte durch Zugabe von rekombinantem BOB.1/OBF.1-Protein wiederhergestellt werden (Luo and

Roeder, 1995). Anhand dieser Experimente wurde deutlich, dass BOB.1/OBF.1 eine wesentliche Rolle bei der Immunglobulin-Transkription spielt. Jedoch ist nicht klar, ob BOB.1/OBF.1 der einzige relevante Faktor ist, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ein potentieller zweiter Koaktivator auch von den verwendeten Antikörpern kopräzipitiert wurde. Die hier beschriebenen Ergebnisse in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen zeigen hingegen eindeutig, dass BOB.1/OBF.1 eine essentielle, nicht redundante Komponente für Immunglobulin-Transkription und oktamerabhängige Transkription ist, da sie in einem vollständig intakten Zellsystem durchgeführt wurden.

### **3.1.2 Unterschied der Aktivität von BOB.1/OBF.1 auf Immunglobulin-Reporter und endogene Immunglobulingene**

In den hier durchgeführten Transfektions-Experimenten ist BOB.1/OBF.1 eindeutig notwendig für die Regulation eines Luziferase-Reporters unter der Kontrolle eines Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotors und des Immunglobulin- $\mu$ Enhancers. Dies gilt sowohl für den Vergleich von wildtypischen und BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zelllinien als auch für BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem induzierbaren BOB.1/OBF.1-Allel. In beiden Zellsystemen stellte sich heraus, dass BOB.1/OBF.1 wesentlich beteiligt ist an der Regulation der verwendeten Reporterstrukture über das bekannte essentielle Oktamer-Motiv im Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor. Die Expression von endogenen Immunglobulingenen in Knochenmarks- und Milzzellen scheint jedoch nahezu unbeeinflusst zu sein von BOB.1/OBF.1. Was könnte für diesen Unterschied verantwortlich sein?

Die Regulation von Immunglobulingenen erfolgt durch die Interaktion von verschiedenen zelltypischen Promotoren und mindestens zwei verschiedene Enhancerelementen. Die schwere Immunglobulin-Kette wird in präB-Zellen vom V<sub>H</sub>-Promotor und vom  $\mu$ Enhancer (intronischer Enhancer der schweren Immunglobulin-Ketten) reguliert. In reifen B-Zellen spielt der 3'Immunglobulin-Enhancer (3'Immunglobulin-Enhancer: HS1,2 / HS3a / HS3b / HS4; alle Teil der 35 kb großen LCR „locus control region“, 3' vom Immunglobulin-Lokus

## Diskussion

---

gelegen) eine wichtige Rolle (Guglielmi et al., 2003; Khamlichi et al., 2000). Die Immunglobulin-Transkription wird also von zahlreichen Elementen reguliert. Es gibt verschiedene Promotoren und verschiedene Enhancer, welche darüber hinaus im Laufe der B-Zellentwicklung durch Rekombinationsprozesse unterschiedlich kombiniert werden können und eine variierende Funktion bei der Regulation der Immunglobulingene übernehmen (Khamlichi et al., 2000; Magor et al., 1999; Staudt and Lenardo, 1991). BOB.1/OBF.1 könnte also in diesem komplexen Kontext durch andere Faktoren ganz oder teilweise ersetzt werden. Andererseits ist bekannt, dass ein funktioneller Promotor essentiell ist für die Funktion eines komplexen Transkriptionssystems, und tatsächlich war der positive BOB.1/OBF.1-Effekt auf die Aktivität eines Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotors in den Transfektions-Experimenten deutlicher, in denen zusätzlich der  $\mu$ Enhancer anwesend war. Das heißt, in dem komplexeren Transfektionssystem war die Abhängigkeit von BOB.1/OBF.1 sogar größer als in dem vereinfachten System. Neuere Untersuchungen ergaben tatsächlich, dass BOB.1/OBF.1 eine wichtige Rolle spielt bei der Regulation von Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Promotoren kombiniert mit 3'Immunglobulin-Enhancerelementen in Transfektions-Experimenten in primären Zellen (Stevens et al., 2000b) sowie in transgenen Mäusen (Andersson et al., 2000) und in Kombination mit verschiedenen anderen Faktoren wie z. B. NF $\kappa$ B und Oct2 (Sepulveda et al., 2004; Tang et al., 1999).

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse für endogene Expression und für die Transfektionsstudien könnte sein, dass nur ein kurzes Stück von 100 bp des Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotors verwendet wurde. In Transfektions-Experimenten ist dieses Promotorstück ausreichend, um eine zelltypspezifische Regulation zu vermitteln. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass *in vivo* weitere regulatorische Elemente (5' oder 3' vom verwendeten Promotorfragment) das Fehlen einer intakten Oktamer-Funktion kompensieren können. Dazu passt auch die bereits erwähnte Tatsache, dass ein intaktes Oktamer-Motiv absolut nötig ist für die Immunglobulin-Expression. Selbst wenn BOB.1/OBF.1 fehlt, können Oct1 und Oct2 sehr wahrscheinlich noch an das Oktamer-Motiv binden. Dabei könnten die Oct1- und Oct2-Proteine z. B. eine Ankerfunktion erfüllen und damit die Bindung weiterer

## Diskussion

---

Transkriptionsfaktoren ermöglichen, welche sonst nicht an den Promotor binden könnten. Solch eine Ankerfunktion für Oktamer-Proteine wurde bereits für die Regulation zahlreicher Zytokingene postuliert. Für IL-2, IL-3 und IL-4 wurden Bindungsstellen der NF-AT bzw. AP-1-Transkriptionsfaktoren beschrieben, welche kombiniert sind mit einer Oktamer-Bindungsstelle, wobei die Bindung von Oct1 notwendig ist für die Funktion des gesamten Elements (Ullmann et al., 1991; Pfeuffer et al., 1994; Chuvpilo et al., 1993). In diesen Fällen sind die Oktamer-Motive und andere Bindungsstellen direkt benachbart. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine solche Ankerfunktion auch über weiter entfernte Bindungsstellen stattfinden könnte. So wird auch die Regulation von Enhancerelementen über solche Interaktionen weit entfernter Regulationselemente erklärt, sowohl auf dem Level von Bindungs-Synergismus als auch auf dem Level synergistischer Interaktion von Kofaktoren mit dem basalen Transkriptionskomplex (Ptashne and Gann, 1997; Blackwood and Kadonaga, 1998). Tatsächlich ist bekannt, dass ein Oktamer-Motiv in einem Promotor die Funktion eines Enhancers aus größerer Distanz ermöglichen kann (Bertolino and Singh, 2002).

Bei der hier beschriebenen Northernblot-Analyse der Expression von schwerer Immunglobulin-Kette wurden Keimbahn-Transkripte von Gesamtknochenmark- und Gesamtmilz-RNA erfasst, und somit nicht die Aktivität einzelner Promotoren sondern die Aktivität aller von den Zellen verwendeten Promotoren. In dem im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Affymetrix-Genchip-Experiment zur Identifizierung von BOB.1/OBF.1-Zielgenen wurden 20 Immunglobulinen-Sequenzen identifiziert, die mehr als zweifach heraufreguliert waren durch BOB.1/OBF.1. All diese Sequenzen gehören der J558-Familie von Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Genen an. Dieses Ergebnis wird deutlich unterstützt durch eine frühere Beobachtung (Schubart et al., 2000), wobei eine 2-fach reduzierte Verwendung von Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Genen der J558-Familie in Hybridomazellen aus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen gefunden wurde. Die Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Gene der Maus können basierend auf Sequenzähnlichkeiten in 15 Familien eingeteilt werden. Es wurde gezeigt, dass die Oktamer-Motive verschiedener V<sub>H</sub>-Genfamilien in unterschiedlichem Maße zur gesamten Promotoraktivität beitragen und im Verlauf der B-Zellentwicklung unterschiedlich reguliert

## Diskussion

---

werden (Buchanan et al., 1995; Buchanan et al., 1997; Webb et al., 1997). Die Ursache für diese unterschiedliche Relevanz des Oktamer-Motivs für die Aktivität der verschiedenen Promotoren ist nicht genau bekannt. Die der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse lassen vermuten, dass BOB.1/OBF.1 nur an der Regulation einer bestimmten Familie von Immunglobulin- $V_H$ -Genen, der J558-Familie, beteiligt ist. Dies würde eine ähnliche Situation darstellen, wie sie in einer kürzlich beschriebenen Studie für leichte Immunglobulinen- $\kappa$ -Ketten beobachtet wurde. Dabei wurde nachgewiesen, dass zumindest einige Immunglobulin- $\kappa$ -Genfamilien durch BOB.1/OBF.1 reguliert werden (Casellas et al., 2002; Jankovic and Nussenzweig, 2003). In dieser Studie wird argumentiert, dass einige  $\kappa$ -Promotoren ein zusätzliches regulatorisches Element enthalten, welches beim Fehlen von BOB.1/OBF.1 ausreicht, um eine hohe transkriptionelle Aktivität aufrechtzuerhalten, wohingegen dieses zusätzliche Element in BOB.1/OBF.1-abhängigen  $\kappa$ -Promotoren fehlt. In den hier durchgeführten Transfektions-Experimenten wurde ein anderer leichte Immunglobulin-Ketten- $\kappa T1$ -Promotor verwendet als in der beschriebenen Veröffentlichung, von welchem bereits früher gezeigt wurde (Pelletier et al., 1997), dass er im selben Bereich eine Initiator-Sequenz enthält, die für eine effiziente Transkription notwendig ist. Eindeutig ist, dass in den hier durchgeführten Experimenten der verwendete Immunglobulin- $\kappa T1$ -Promotor BOB.1/OBF.1-abhängig reguliert wird.

Die PORE/MORE-Hypothese (Tomilin et al., 2000; Casellas et al., 2002) nimmt an, dass Oktamer-Motive einer spezifischen Konfiguration das so genannte PORE-Motiv („palindromic octamer recognition element“) BOB.1/OBF.1 rekrutieren, wohingegen das MORE-Motiv (MORE = „more PORE“) BOB.1/OBF.1 nicht rekrutieren kann.  $\kappa$ -Promotoren enthalten PORE-Motive und rekrutieren somit auch BOB.1/OBF.1. Der in den hier durchgeführten Transfektions-Experimenten verwendete  $\kappa T1$ -Promotor enthält tatsächlich ein PORE-Motiv. MORE-Motive, die in Promotoren der schweren Immunglobulin-Kette wie den  $V_H$ -Promotoren zu finden sind, sollten nicht reguliert sein. Dem widersprechend sind die im hier durchgeführten Affymetrix-Genchip-Experiment identifizierten Immunglobulin- $V_H$ -Gene der J558-Familie BOB.1/OBF.1-abhängig reguliert, obwohl sie ein MORE-Motiv enthalten.

Da alle PORE-Daten aus *in vitro* Experimenten resultieren oder auf der ektopischen Expression von BOB.1/OBF.1 in Nicht-B-Zellen basieren, kann angenommen werden, dass das Modell nicht generell haltbar ist und dass eine stärkere Interaktion von Oktamer-Proteinen und BOB.1/OBF.1-Protein mit MORE-Sequenzen in B-Zellen *in vivo* stattfindet.

Neben der Komplexität des Transkriptionsmechanismus der Immunglobulingene mit verschiedenen beteiligten Promotoren und Enhancern ist bekannt, dass für die Regulation endogener Gene der Zustand des Chromatins von großer Bedeutung ist. Dabei ist entscheidend, ob die regulatorischen Promotor- und Enhancerregionen durch die Bindung von Histonen für die Aktivität von Transkriptionsfaktoren unzugänglich sind oder ob diese Regionen durch zusätzliche Regulationsmechanismen, wozu u. a. der Acetylierungszustand der Histone und der Methylierungszustand eines Gens/Regulons gehört, für die Transkriptionsfaktoren zugänglich gemacht werden (Feinberg, 2001; Georgopoulos, 2002; Rice and Allis, 2001). So ist für den Immunglobulin-Lokus nachgewiesen, dass die Methylierung des Lokus reguliert wird (Jenuwein et al., 1997; Kirillov et al., 1996). Weitere Studien haben gezeigt, dass verschiedene epigenetische Mechanismen entscheidend an der Regulation von Immunglobulin-Expression und Rekombination beteiligt sind (Ciccione and Oettinger, 2004; Osipovich et al., 2004, Bergman et al., 2003). Diese Effekte können in den transienten Transfektions-Experimenten, die hier verwendet wurden, nicht erfasst werden.

### **3.1.3 Oct2 induziert partiell oktamerabhängige, jedoch nicht Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription**

Eine interessante zusätzliche Beobachtung bei den hier durchgeführten Experimenten war, dass eine Erhöhung des Oct2-Expressionslevels zu einer leichten Aktivierung eines Reporters führte, der von einem synthetischen Oktamer-Motiv reguliert wird, jedoch keinen Einfluss hatte auf die Aktivierung eines durch Immunglobulin-Promotor/Enhancer-regulierten Reporters. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien, in denen sich zeigte, dass Oct2 allein in der Lage ist, einen synthetischen Promotor zu regulieren (Pfisterer et al., 1994;

Gerster et al., 1990; Muller-Immergluck et al., 1990). Des Weiteren wurde in Oct2<sup>-/-</sup>-B-Zelllinien gezeigt, dass Oct2 eine entscheidende Rolle für die Regulation von multimerisierten synthetischen Promotoren spielt (Feldhaus et al., 1993). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier durchgeführte Stimulation mit LPS neben der Oct2-Expression auch andere Faktoren stimuliert, welche die synthetischen Promotoren aktivieren könnten. Die transfizierten Immunglobulin-Reporter werden jedoch nicht induziert. Dies bestätigt, dass auch Oct2 nicht in der Lage ist, das Fehlen von BOB.1/OBF.1 vollständig zu kompensieren. BOB.1/OBF.1 ist also tatsächlich eine essentielle Komponente für die Vermittlung oktamerabhängiger Transkription in einem System aus Immunglobulin-Promotor und  $\mu$ Enhancer in präB-Zellen.

### 3.2 Identifizierung von BOB.1/OBF.1-Zielgenen

BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen verschiedene Defekte in der frühen sowie späten B-Zellentwicklung. So bilden sie keine Keimzentren mehr aus und zeigen eine reduzierte Expression verschiedener sekundärer Immunglobulin-Isotypen. Da BOB.1/OBF.1 ein transkriptioneller Koaktivator ist, ist es wahrscheinlich, dass eine reduzierte Expression von BOB.1/OBF.1-Zielgenen verantwortlich ist für den beobachteten Phänotyp der BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse. Experimente mit transgenen Mausmodellen und Transfektionsstudien ergaben, dass das Oktamer-Motiv des Immunglobulin-Promotors essentiell für die Regulierung des Gens ist (Falkner and Zachau, 1984; Bergman et al., 1984; Wirth et al., 1987; Lenardo et al., 1987; Jenuwein and Grosschedl, 1991). Weiterhin konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass der transkriptionelle Koaktivator BOB.1/OBF.1, zumindest in Transfektions-Experimenten, essentiell und nicht redundant ist für die Vermittlung von oktamerabhängiger Transkription sowie von Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription (Laumen et al., 2000). Andererseits ist in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen die Expression von IgM nicht beeinflusst, wohingegen die Expression von „switched“-Immunglobulin-Isotypen

reduziert ist (Schubart et al., 1996a; Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996). Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass BOB.1/OBF.1 und das Oktamer-Motiv wahrscheinlich nicht die einzigen kritischen regulatorischen Elemente sind, die an der Regulation der Immunglobulin-Transkription beteiligt sind.

Neben den Immunglobulinen wurde der Promotor des Chemokinrezeptors BLR1 als zumindest teilweise durch BOB.1/OBF.1 reguliert beschrieben (Wolf et al., 1998), wobei gleichzeitig NF $\kappa$ B und Oct2 eine entscheidende Rolle für die Regulation spielen. In BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Milzzellen war BLR1 dementsprechend nur teilweise herunterreguliert. Ein weiterer Chemokinrezeptor, CCR-5, wurde ebenfalls als durch BOB.1/OBF.1 und Oct2 in T-Zellen reguliert identifiziert (Moriuchi and Moriuchi, 2001). Da jedoch BLR1 nicht vollständig in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen herunterreguliert wird und CCR-5 nur in Granulozyten sowie T-Zellen exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete Regulierung dieser Gene durch BOB.1/OBF.1 nicht ausreicht, um den BOB.1/OBF.1-Phänotyp in B-Zellen vollständig zu verstehen. In der Zwischenzeit konnten weitere BOB.1/OBF.1-regulierte Gene wie Lck, Kcnn4, Cdc37 und Cyclin D3 identifiziert werden (Kim et al., 2003), welche für den in den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachteten Proliferationsdefekt (Kim et al., 1996) eine Rolle spielen könnten. Auch diese BOB.1/OBF.1-regulierten Gene können jedoch nicht die wesentlichen phänotypischen Effekte in den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen erklären.

### **3.2.1 MLC1A wird indirekt durch BOB.1/OBF.1 in präB-Zellen reguliert**

Zur Identifizierung von Genen, die durch BOB.1/OBF.1 reguliert werden, und zum Verständnis des BOB.1/OBF.1-Phänotyps sollten zwei Zellpopulationen auf differentielle Genexpression untersucht werden, die sich nur in der BOB.1/OBF.1-Expression unterscheiden. Da die BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Keimzentrums-B-Zellen mehr besitzen, war es nicht möglich, Zellen dieses Entwicklungsstadiums zu untersuchen. Des Weiteren stellt die Aufreinigung primärer Zellen aus wildtypischen und BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen stets

## Diskussion

---

ein Problem dar, da nie eine hundertprozentige Aufreinigung zu erreichen ist, noch ist auszuschließen, dass in den verschiedenen Mäusen die Zellen z. B. unterschiedlich differenzierte Subpopulationen darstellen. Somit wäre eine Identifizierung direkt von BOB.1/OBF.1 regulierter Gene erschwert. Eine Alternative wäre, ein B-Zellentwicklungsstadium zu untersuchen, das kurz vor dem Entwicklungsstadium liegt, in dem der BOB.1/OBF.1-Phänotyp beobachtet wird, z. B. unreife B-Zellen. Doch auch dies ist problematisch, da eine Aufreinigung von primären Zellen zu 100 % nicht möglich ist. Eine Kontamination mit anderen Zellen könnte jedoch zur Identifizierung nicht BOB.1/OBF.1-abhängiger Gene führen. Des Weiteren ist problematisch, dass immer Zellen aus verschiedenen Mäusen untersucht würden, wobei nicht auszuschließen ist, dass andere Faktoren wie Infektionen in den verschiedenen Tieren für ein unterschiedliches Genexpressionsmuster sorgen sowie die Entwicklung der B-Zellen beeinflussen. Daher erschien es sinnvoller, mit Zelllinien aus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen zu arbeiten, um die beschriebenen Probleme auszuschließen. Da die einzige Möglichkeit zur Immortalisierung von Maus-B-Zellen die Transformation von präB-Zellen mit Abelsonvirus ist, wurden diese Zellen für die Suche nach BOB.1/OBF.1-Zielgenen verwendet. Ursprünglich wurde ein Defekt in der späten B-Zellentwicklung in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen beschrieben. Neuere Untersuchungen zeigten, dass darüber hinaus BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits im Knochenmark eine Reduktion unreifer, transitioneller B-Zellen aufweisen (Hess et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass BOB.1/OBF.1 während des Übergangs vom PräBI- ins PräBII-Stadium auf RNA-Ebene induziert wird (Dr. T. Winkler, Erlangen, persönliche Mitteilung). BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen also bereits in früheren B-Zellentwicklungsstadien einen Phänotyp, das heißt BOB.1/OBF.1 ist wohl auch an der Regulation von Zielgenen in frühen B-Zellen beteiligt. Daher wurden die im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zelllinien mit einem integrierten BobER-Fusionsprotein (Laumen et al., 2000) für die Suche nach Zielgenen verwendet. Durch die Induktion von BOB.1/OBF.1-Aktivität durch das Hormon Hydroxytamoxifen wird erreicht, dass nur direkt BOB.1/OBF.1-regulierte Gene identifiziert werden. Des Weiteren wurden durch den Vergleich mit nicht

## Diskussion

---

BobER-stabilen Zellen (Vektorkontrolle), die auch mit Hydroxytamoxifen stimuliert wurden, erreicht, dass keine hormonregulierten Gene identifiziert werden.

Um den Phänotyp der BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse zu verstehen und um eine tiefere Einsicht in die molekulare Funktion dieses transkriptionellen Koaktivators zu erlangen, wurde mittels cDNA-RDA-Analyse nach BOB.1/OBF.1-Zielgenen gesucht. In diesem Experiment konnte MLC1A als ein von BOB.1/OBF.1-reguliertes Gen identifiziert werden. Das MLC1A-Gen wurde ursprünglich als essentielle Myosin leichte Kette identifiziert, welche spezifisch im Maus-Herzatrium exprimiert wird (MLC1A, „atrial“ Isoform). Darüber hinaus wurde MLC1A als die Myosin leichte Kette beschrieben, welche als erste während der frühen embryonalen Entwicklung exprimiert wird und daher auch als MLC1emb bezeichnet wurde (Barton and Buckingham, 1985; Barton et al., 1985; Barton et al., 1988; Lyons et al., 1990a; Lyons et al., 1990b).

In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass MLC1A in immortalisierten und primären Maus-präB-Zellen exprimiert wird. In den Zellen, die kein BOB.1/OBF.1 exprimieren, ist kein endogenes MLC1A zu detektieren, die Expression kann durch ein konditionales BOB.1/OBF.1 jedoch induziert werden. Oct2-Defizienz beeinflusste die Expression von MLC1A nicht. Weitere Experimente zeigten, dass MLC1A indirekt durch BOB.1/OBF.1 reguliert wird (Laumen et al., 2004).

Bislang wurde MLC1A, wie bereits erwähnt, als spezifisch im Herzatrium der Maus exprimiert beschrieben. Es stellte sich also die Frage, ob MLC1A in allen Stadien der B-Zellentwicklung oder auch in anderen hämatopoetischen Linien exprimiert wird. Die Analyse von B-Zelllinien verschiedener B-Zellentwicklungsstadien sowie von verschiedenen T-Zelllinien zeigte, dass MLC1A nur in präB-Zellen exprimiert wird. Weitergehende Experimente von Dr. C. Brunner zeigten, dass MLC1A auch nicht in Maus-Milzextrakten, in Keimzentrums-B-Zellen (in welchen bekanntermaßen BOB.1/OBF.1 am stärksten exprimiert wird) oder anderen reifen B-Zellen exprimiert wird (Laumen et al., 2004). Das heißt, die

## Diskussion

---

MLC1A-Expression scheint auf das präB-Zellstadium beschränkt zu sein. Diese Beobachtung ist insofern nicht verwunderlich, da bereits gezeigt wurde, dass BOB.1/OBF.1 in verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien eine wichtige Funktion erfüllt, einschließlich dem präB-Zellstadium (Hess et al., 2001; Schubart et al., 2000; Brunner et al., 2003a; Samardzic et al., 2002a). Zudem wurde die cDNA-RDA-Analyse mit präB-Zellen durchgeführt, so dass die hier gefundenen Gene nur in diesem Entwicklungsstadium reguliert sein könnten. Diese Beobachtung ist ähnlich zum Oct2-Zielgen CRISP-3, welches nur in präB-Zellen exprimiert wird und nicht in späteren B-Zellentwicklungsstadien gefunden wurde (Pfisterer et al., 1996).

MLC1A wird im Herzatrium und in der humanen Skelettmuskelzelllinie C2C12 exprimiert, wobei gezeigt wurde, dass in Skelettmuskelzellen verschiedene 5'UTRs und 3'UTRs („untranslated region“) exprimiert werden (Zimmermann et al., 1990; Rotter et al., 1991). Die Funktion dieser verschiedenen Transkripte ist bislang unbekannt. In Maus-B-Zellen konnte in den hier durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass unterschiedlich gespleißte 5'UTRs exprimiert werden. Diese wurden als distale und proximale 5'UTRs bezeichnet, da die distale 5'UTR von einem alternativen, „upstream“ gelegenen Promotor stammt. In präB-Zellen werden überwiegend Transkripte, die vom distalen Promotor stammen, exprimiert. Die Tatsache, dass der in präB-Zellen beschriebene distale Promotor ein anderes Spleißmuster aufweist als die bereits beschriebenen unterschiedlichen 5'UTRs in humanen Skelettmuskelzellen, legt die Vermutung nahe, dass auch unterschiedliche Promotorregionen für die MLC1A-Regulation in Skelettmuskelzellen im Vergleich zu B-Zellen verwendet werden.

Welche Promotorregion für die MLC1A-Induktion durch BOB.1/OBF.1 verantwortlich ist, bleibt bislang eine offene Frage. Wie hier gezeigt, konnte ein –3000 bp MLC1A-Promotor-Luziferasekonstrukt zwar in 293T-Fibroblastenzellen induziert werden, eine Induktion des Promotors in BobER-präB-Zellen war jedoch nicht möglich. Dieses Ergebnis und ein Cycloheximid-Experiment für die Induktion des endogenen MLC1A zeigten deutlich, dass BOB.1/OBF.1 die Expression von MLC1A indirekt reguliert. Ein wichtiger Aspekt ist dabei,

## Diskussion

---

dass die bekannte MLC1A-Promotor-Sequenz keine erkennbaren Oktamer-Motive enthält. Dabei ist zu erwähnen, dass eine andere Arbeit zeigte, dass zwei E-Box-Motive, die MyoD/E12 und Myogenin/E12 binden, wesentlich an der Regulation von MLC1A in humanen Zellen beteiligt sind (Catala et al., 1995; Cohen et al., 1988).

Der Aktin-Myosin-Komplex ist die hauptsächliche kontraktile Komponente der Muskelsarkomere. Darüber hinaus ist bekannt, dass als Antwort auf verschiedene zelluläre Signale in Nicht-Muskel-Zellkulturen während verschiedener Bewegungsprozesse eine Reorganisation von Aktin und Myosin stattfindet, so z. B. bei Chemotaxis, Phagozytose, „capping“ von Oberflächenrezeptoren, Vesikeltransport und Zytokinese (Goode et al., 2000; Kamal and Goldstein, 2000; DePina and Langford, 1999; Mansfield et al., 2000; Naqvi et al., 2000; Mermall et al., 1998). Die Myosine stellen eine große Superfamilie von Molekülen dar (Sellers, 2000). Ein Myosin besteht aus sechs Untereinheiten, zwei Myosin schweren Ketten (MHC, „myosin heavy chain“), zwei essentiellen leichten Ketten (MLC, „myosin light chain“) und zwei regulatorischen leichten Ketten (RLC, „regulatory light chain“). Während die MHCs und MLCs eine Rolle bei der Vermittlung kontraktiler Effekte spielen, wurde gezeigt, dass die RLCs, durch eine regulierte Phosphorylierung durch MLCK („myosin light chain kinase“, z. B. Poperechnaya et al., 2000; Komatsu et al., 2000), verantwortlich sind für die Regulation der Myosin-Aktin-Motorfunktion. Die regulierte Expression einer essentiellen leichten Kette in präB-Zellen könnte ein weiterer Mechanismus sein, um potentielle Funktionen des Aktin-Myosin-Komplexes in präB-Zellen zu modulieren.

Zahlreiche Funktionen von Myosin in Nicht-Muskel-Zellen wurden beschrieben, so z. B. eine Rolle bei der Zytoskelettdynamik, welche wiederum essentiell für Zellmigration und Zellbewegung ist. Ein Charakteristikum von Immunzellen ist ihre Bewegung zwischen verschiedenen Kompartimenten. Unreife, transitionelle B-Zellen wandern aus dem Knochenmark zur Peripherie und schließlich in spezifische Mikro-Umgebungen der peripheren sekundären lymphoiden Gewebe wie Milz und Lymphknoten. Obwohl die genauen physischen Orte der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellvorläufern im

Knochenmark noch kaum bekannt sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Aktin-Myosin-Komplex auch essentiell ist für B-Zell-Bewegungsprozesse früherer Entwicklungsstadien, wie z. B. beim Herstellen von Kontakten zu Stromazellen, welche entscheidend sind für Vorläufer-B-Zellen. Diese Hypothese wird unterstützt durch einige neuere Untersuchungen bezüglich der essentiellen Rolle der Zytoskelettorganisation für hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen. Diese Prozesse beeinflussen Adhäsion und Mobilisierung der Zellen ausgehend von der Peripherie und die Wanderung der Zellen in die Lymphknoten oder zu den Orten akuter Entzündungen (Gu et al., 2003; Hart et al., 2003). Des Weiteren zeigte sich, dass die Zytoskelett-Organisation beteiligt ist an der Gestaltung der Form hämatopoetischer Zellen, wobei die Transduktion von Wachstumssignalen durch eine Reihe externer, aktivierender Signaltransduktions-Kaskaden beeinflusst wird (Romanova et al., 1999). BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen zeigen zahlreiche Defekte in der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark und können sich nur eingeschränkt zu transitionellen B-Zellen entwickeln (Hess et al., 2001). Somit lässt sich vermuten, dass die BOB.1/OBF.1-abhängige Expression einer essentiellen Myosin leichten Kette in präB-Zellen ein neuer Mechanismus zur Regulation potentieller Funktionen der Aktin-Myosin-Bewegung in präB-Zellen ist, welche essentiell für Bewegung und Funktion der Zellen ist.

### **3.2.2 Identifizierung potentieller BOB.1/OBF.1-regulierter Gene durch Affymetrix-Genchips**

Mit der cDNA-RDA-Methode konnte, wie beschrieben, MLC1A als Gen identifiziert werden, welches durch BOB.1/OBF.1 indirekt reguliert wird. Da MLC1A sich jedoch als nicht direkt von BOB.1/OBF.1 reguliertes Gen herausstellte, wurden weitere Methoden verwendet, um andere BOB.1/OBF.1-regulierte Gene zu identifizieren. Mit den oben verwendeten BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen, die BobER stabil exprimieren, und den BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen wurde zunächst die Atlas-cDNA-Mikroarray-Methode durchgeführt. Von den 500 Genen, die auf diesem System aufgetragen waren, war keines reguliert. Danach wurde mittels der Affymetrix-Genchip-Methode nach BOB.1/OBF.1-Zielgenen gesucht, womit das

## Diskussion

---

Expressionsmuster von 11.000 Genen/ESTs erfasst werden konnte. In diesem Experiment konnte eine große Anzahl BOB.1/OBF.1-regulierter Gene identifiziert werden. Diese Gene sind bei zahlreichen physiologischen Prozessen in B-Zellen involviert: Zellmetabolismus, Zelladhäsion und Zelldifferenzierung. Dies legt die Vermutung nahe, dass BOB.1/OBF.1 ein wichtiges Protein ist für B-Zellphysiologie und -funktion. Interessanterweise wurden keine anderen Transkriptionsfaktoren identifiziert, was vermuten lässt, dass BOB.1/OBF.1-regulierte Gene am Endpunkt eines zellulären Differenzierungs-/Regulierungs-Programms liegen. In dieser Arbeit wurde für sechs dieser Gene im Northernblot-Experiment bestätigt, dass sie differentiell reguliert sind. Im Folgenden wird eine Auswahl von Genen diskutiert, die entweder besonders stark reguliert waren oder deren Funktion bekannt ist und mögliche, sinnvolle Verbindungen zum Phänotyp von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen haben.

Überraschenderweise wurden ungefähr gleich viele aktivierte wie inhibierte Gene identifiziert. Dieses Ergebnis war unerwartet, da BOB.1/OBF.1 typischerweise als transkriptioneller Koaktivator beschrieben wurde. Eine Funktion von BOB.1/OBF.1 bei Prozessen transkriptioneller Repression wurde bereits in einer anderen Studie beschrieben: Es ist bekannt, dass die Aktivierung von B-Zellen mit einem anti-Immunglobulin-Antikörper („surface immunglobulin crosslinking“) die Transkription der schweren Immunglobulin-Kette und die Aktivität eines  $\mu$ Enhancers inhibieren kann (Johansson et al., 1994; Chen et al., 1991; Leanderson and Hsu, 1985). Stevens et al. (2000b) konnte zeigen, dass diese durch Immunglobulin-„Crosslinking“ stattfindende Inhibierung des Immunglobulin- $\mu$ Enhancers in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht stattfindet. Der exakte Mechanismus und die Rolle von BOB.1/OBF.1 in diesem Prozess der transkriptionellen Repression sind nicht bekannt. Beim aktuellen Untersuchungsstand ist nicht klar, ob die transkriptionelle Inhibierung durch BOB.1/OBF.1 ein direkter Effekt ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass BOB.1/OBF.1 einen transkriptionellen Repressor induziert, welcher wiederum die Transkription bestimmter Gene inhibiert. In diesem Fall wären die in dieser Arbeit beschriebenen von BOB.1/OBF.1 inhibierten Gene indirekte BOB.1/OBF.1-Zielgene.

## Diskussion

---

Für die Vermutung, dass BOB.1/OBF.1 an Prozessen transkriptioneller Repression beteiligt ist, spricht das Ergebnis, dass unter den durch BOB.1/OBF.1 heraufregulierten Genen mit Creg („cellular repressor of E1A regulated genes“) ein potentielles Repressorprotein identifiziert wurde. Ursprünglich wurde Creg als ein Protein identifiziert, welches beteiligt ist an der transkriptionellen Kontrolle des Zellwachstums durch die Inhibierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie E2F (Veal et al., 1998). Es ist bekannt, dass E2F eine wichtige Rolle spielt bei der Regulation von Genen, deren Produkte involviert sind in Zellzykluskontrolle und DNA-Replikation (DeGregori, 2002) sowie bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen, u. a. auch hämatopoetischer Zellen (Yamasaki, 1999; Lissy et al., 2000; Rempel et al., 2000). Nachfolgende Untersuchungen zeigten dann, dass Creg ein sekretiertes Glykoprotein ist, welches die Funktion von E1A-Proteinen indirekt beeinflusst (Veal et al., 2000), also selbst kein transkriptioneller Repressor ist. Creg inhibiert das Zellwachstum über eine Bindung an den Tumorsuppressor IGF2R („insulin-like growth factor“-Rezeptor II; Di Bacco and Gill, 2003), was eine Funktion von Creg als IGF2R-Ligand mit einer potentiellen Funktion für die Regulation von Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelllinien möglich erscheinen lässt.

Die Promotor-Sequenzen von zwei der hier identifizierten Gene, welche durch BOB.1/OBF.1 herunterreguliert werden, sind publiziert: Der Promotor von Rbp („cellular retinol binding protein“; Smith et al., 1991) und von Id3 („inhibitor of DNA binding 3“; Yeh and Lim, 2000). Beide Promotoren beinhalten keine eindeutigen Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren Oct1/2, E1A oder E2F. Diese Beobachtungen unterstützen ein Modell, in welchem BOB.1/OBF.1 indirekt für die Inhibierung von Genen verantwortlich ist.

Eines der beiden herunterregulierten Gene, Id3, zeigt, wenn es durch homologe Rekombination in einer Maus inaktiviert wird (Pan et al., 1999), einen Phänotyp, der teilweise vergleichbar ist mit dem Phänotyp von BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen. In beiden Mäusen ist die humorale Immunantwort gestört, und es liegen Defekte in der T-Zell-abhängigen und -unabhängigen Immunantwort sowie eine reduzierte Expression sekundärer Immunglobulin-

## Diskussion

---

Isotypen vor.  $Id3^{-/-}$ -Mäuse zeigen einen Proliferationsdefekt bei der Stimulation durch IgM, was zumindest von einer Gruppe auch für  $BOB.1/OBF.1^{-/-}$ -Mäuse gezeigt werden konnte (Kim et al., 1996). Darüber hinaus zeigen beide Mäuse eine reduzierte Zahl an MZB-Zellen im Vergleich zu follikulären B-Zellen (Quong et al., 2004, Samardzic et al., 2002a). Im Gegensatz zu den  $BOB.1/OBF.1^{-/-}$ -Mäusen zeigen  $Id3^{-/-}$ -Mäuse weitergehende Defekte, so einen Defekt im Immunglobulin-Isotypen-„switching“ sowie einen Defekt in der T-Zellentwicklung (Rivera et al., 2000; Engel et al., 2001). Zwar kann  $BOB.1/OBF.1$ -Expression in T-Zellen induziert werden (Zwilling et al., 1997), die Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen in  $BOB.1/OBF.1^{-/-}$ -Mäusen ist jedoch normal.  $Id3$ -Expression wird durch  $TGF-\beta$  in B-Zellen induziert. In  $Id3^{-/-}$ -B-Zellen sind die das Wachstum und Überleben der Zellen inhibierenden Wirkungen von  $TGF-\beta$  geblockt (Kee et al., 2001). Wenn  $BOB.1/OBF.1$   $Id3$  herunterreguliert, würde man erwarten, dass  $BOB.1/OBF.1^{-/-}$ -Mäuse nicht den gleichen Phänotyp wie die  $Id3^{-/-}$ -Mäuse zeigen, sondern eher einen entgegengesetzten. Es ist also verwunderlich, dass der Phänotyp beider Mäuse sich so stark ähnelt.

Ein weiteres durch  $BOB.1/OBF.1$  herunterreguliertes Gen ist die mitochondriale Isocitrat-Dehydrogenase ( $Idh$ ).  $Idh$ -Expression kann, im Gegensatz zur cytosolischen  $Idh$ , in ruhenden B-Zellen durch mitogene Stimulation induziert werden und spielt womöglich eine Rolle für eine optimierte Proliferation in aktivierten Lymphozyten (Yang et al., 1996; Luo et al., 1996). Um zu klären, ob die durch  $BOB.1/OBF.1$  herunterregulierten Gene tatsächlich indirekt-regulierte Gene sind, ist ein weiteres Hormoninduktions-Experiment mit den BobER-stabilen Zellen unter Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid sinnvoll.

Das am stärksten im Affymetrix-Genchip-Experiment regulierte Gen war das  $Ahd2$ -like-Gen („aldehyd dehydrogenase 2 like“), was sich im Northernblot-Experiment bestätigte. Der Promotor dieses Gens wurde bislang nicht veröffentlicht. Aldehyd-Dehydrogenasen gehören zu einer Superfamilie von Proteinen, welche an der Bildung von Retinsäure aus Retinol und Retinal beteiligt sind (Duester, 1996; Duester, 2000). Die Promotor-Sequenz des mit dem  $Ahd2$ -like-Gen verwandten Gen  $Ahd2$  enthält ein klassisches Oktamer-Motiv. Diese beiden

## Diskussion

---

Tatsachen lassen das Ahd2-like-Gen unter den gefunden Genen als das interessanteste potentielle BOB.1/OBF.1-Zielgen erscheinen. Spätere Untersuchungen von C. Brunner et al. (2003b), welche nach dieser Arbeit stattfanden, zeigten tatsächlich, dass der Ahd2-like-Promotor ein Konsensus-Oktamer-Motiv enthält, welches *in vivo* und *in vitro* (in Gelretardations- und Chromatinimmunpräzipitations-Experimenten) mit BOB.1/OBF.1 interagiert. Tatsächlich scheint Ahd2-like also ein direktes BOB.1/OBF.1-Zielgen zu sein. Darüber hinaus wurde auch hier gezeigt, dass BOB.1/OBF.1 zu einem Promotor rekrutiert wird, welcher kein PORE-Motiv aufweist, sondern vielmehr ein klassisches monomeres Oktamer-Motiv ist, ähnlich wie es bereits im ersten Teil dieser Arbeit bei der Rolle von BOB.1/OBF.1 für die Regulation von J558-Immunglobulingenen diskutiert wurde. In jedem Fall passen die Oktamer-Motive von sowohl Ahd2-like-Promotor als auch J558-Promotoren nicht in das PORE/MORE Modell. Da alle PORE-Daten aus *in vitro* Experimenten resultieren, ist anzunehmen, dass eine stärkere Interaktion von Oktamer-Proteinen und BOB.1/OBF.1-Protein mit MORE-Motiven in B-Zellen *in vivo* stattfindet.

Wie bereits erwähnt, spielen Aldehyd-Dehydrogenasen eine wichtige Rolle bei der Oxidierung von Retinal. Das bereits diskutierte Rbp-Protein ist ein zytoplasmatisches Retinol-bindendes Protein, von welchem angenommen wird, dass es eine wichtige Rolle spielt bei der Versorgung von Geweben mit Vitamin A, für eine regulierte Retinsäure-induzierte Genexpression, bei der Retinolspeicherung und beim Retinolmetabolismus (Quadro et al., 1999). Es sind also zwei BOB.1/OBF.1-regulierte Gene, Rbp und Ahd2-like, beteiligt an der Regulation von Retinol/Retinsäure in der Zelle. Retinsäure („retinoic acid“, RA) ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt, wie z. B. an der normalen Embryogenese und Gewebeerhaltung (Zile, 2001). Zusätzlich gibt es zahlreiche Hinweise für eine Funktion von RA bei der Hämatopoese. Ein Fehlen von Retinolen beeinflusst die Knochenmarks-Hämatopoese der Maus, wobei eine Expansion der myeloiden Zellen beobachtet wurde (Kuwata et al., 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass RA die primitive Hämatopoese im Dottersack reguliert (Ghatpande et al., 2002). In verschiedenen *in vitro* Studien wurde der Effekt von RA auf hämatopoetische Vorläuferzellen und deren Differenzierung untersucht,

## Diskussion

---

wobei in einigen Fällen ein positiver Effekt von RA auf die klonale Proliferation von Vorläuferzellen gezeigt werden konnte (Douer and Koeffler, 1982). RA scheint eine komplexe Reaktion von Zellproliferation und/oder Festlegung einer Zelle zu einem mehr differenzierten Zellstadium auszulösen, abhängig vom Entwicklungsstadium der Zelle, welche das Signal erhält (Purton et al., 1999; Purton et al., 2000). Des Weiteren haben verschiedene Studien die wichtige Rolle von RA für Wachstum und Funktion von aktivierten B-Zellen belegt (Buck et al., 1990; Buck et al., 1991; Buck et al., 1993; Worm et al., 1998; Kinoshita et al., 2003). Es scheint also möglich, dass die Entwicklungsdefekte, die in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet wurden, zumindest zum Teil, verursacht werden durch einen gestörten Ahd2-like und Rbp-abhängigen Retinolmetabolismus.

RA induziert darüber hinaus die Expression von PLC $\gamma$ 2 („phospho lipase C- $\gamma$ 2“) in B-Zellen, ein Gen, welches weitgehend B-Zell-spezifisch exprimiert wird und eine wichtige Rolle für die Funktion des B-Zellrezeptors spielt (Wang et al., 2000; Wang et al., 2001). Im hier durchgeführten Affymetrix-Experiment wurde das ubiquitär exprimierte Gen PLC $\gamma$ 1 als durch BOB.1/OBF.1 hochreguliert identifiziert. Der PLC $\gamma$ 2-Promotor ist bekannt (Kang et al., 1996; Lee et al., 1997) und enthält kein Oktamer-Motiv, der PLC $\gamma$ 1-Promotor der Maus ist nicht untersucht. Ein PLC $\gamma$ 1-Promotor-Sequenzvergleich verschiedener anderer Spezies zeigte, dass der Promotor hoch konserviert ist und dabei kein Oktamer-Motiv aufweist. Die verschiedenen PLC $\gamma$ -Isoformen spielen in B-Zellen eine Rolle für die Ca<sup>2+</sup>-Regulation (Patterson et al., 2002; Muthusamy et al., 2003). Die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach BCR-Stimulation ist defekt in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen (Samardzic et al., 2002a). Vor dem Hintergrund der hier beschriebenen Ergebnisse erscheint eine weitere Analyse der PLC $\gamma$ 1- und PLC $\gamma$ 2-Expression und ihrer Regulation in B-Zellen durch BOB.1/OBF.1 oder auch durch Retinsäure als interessant.

Die in dieser Arbeit identifizierten BOB.1/OBF.1-regulierten Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Gene der J558-Familie wurden im ersten Teil der Diskussion bereits beschrieben. Neben den hier exemplarisch diskutierten Genen aus dem Mikroarrayscreen wurden noch zahlreiche andere

Gene identifiziert. Die potentielle Funktion dieser Gene wird hier nicht weiter diskutiert, da die Mehrzahl dieser Gene weder sehr stark reguliert war (Faktor 2-3) noch spezifisch in B-Zellen exprimiert ist oder weil, z. B. für die ESTs, noch völlig unklar ist, welche Funktion diese Gene haben könnten und ob sie dementsprechend den BOB.1/OBF.1-Phänotyp erklären könnten.

### **3.3 Das Fehlen von BOB.1/OBF.1 und Oct2 ist beteiligt am Defekt der Immunglobulin-Expression in HRS-Zellen**

Es gilt als allgemein akzeptiert, dass die neoplastischen Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms, die HRS-Zellen (Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen), von Keimzentrums-B-Zellen und zu einem geringen Teil (1-2 %) von T-Zellen abstammen (Muschen et al., 2000; Seitz et al., 2000). Lange Zeit jedoch war die Abstammung der HRS-Zellen von B-Zellen in Frage gestellt worden, da eine Reihe typischer B-Zellmarker (wie z. B. CD20, CD45, CD79 $\alpha$ , J-Kette und Immunglobulin-Transkripte) in den meisten Fällen nicht exprimiert wird (Hell et al., 1993a; Hell et al., 1993b; Stein and Hummel, 99; Kuppers and Rajewsky, 1998; Anagnostopoulos et al., 2000). Aus dem für B-Zellen atypischen Fehlen von Immunglobulinen/B-Zellrezeptoren ergab sich die Frage, weshalb HRS-Zellen keine Immunglobulingene exprimieren, wenn sie von B-Zellen abstammen. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dieser Frage. Welche Mechanismen führen dazu, dass in den HRS-Zellen keine Immunglobulingene exprimiert werden?

Den wesentlichen Hinweis für die Abstammung der HRS-Zellen von Keimzentrums-B-Zellen lieferten die Tatsache, dass die Immunglobulingene in einer für reife B-Zellen typischen rearrangierten Form vorliegen, sowie das Auftreten von inaktivierenden Mutationen, Mutationen des genomischen Immunglobulin-Lokus, die typischerweise in Keimzentrums-B-Zellen auftreten (Jox et al., 1999; Kuppers et al., 1999). Die Gruppe von K. Rajewsky (Köln) stellte bei der Analyse des Rearrangementstatus primärer HRS-Zellen fest, dass die Zellen

## Diskussion

---

zwar VDJ-Rekombinationen aufweisen, jedoch war in keinem der untersuchten Fälle ein funktionelles Immunglobulingen vorhanden. Entweder stellten alle untersuchten Immunglobulingene durch inaktivierenden Mutationen der kodierenden Sequenz des Immunglobulin-Lokus (z. B. durch Einfügen eines Stopcodons oder einer „nonsense“-Mutation) ein nicht-funktionelles Gen dar (Kanzler et al., 1996; Kuppers et al., 1999), oder es war ein Oktamer-Motiv im Immunglobulin-Promotor mutiert (Jox et al., 1999). Nach einem aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Modell könnten diese Mutationen verantwortlich sein für das Fehlen von Immunglobulin-Expression in HRS-Zellen. Die Arbeitsgruppe von Prof. H. Stein (Berlin) konnte jedoch zeigen, dass in den von ihr untersuchten Fällen primärer HRS-Zellen diese (1) zwar in einigen Fällen, wie zuvor angenommen, durch Mutationen die Kapazität, Immunglobulin-Transkripte zu kodieren verlieren, in den meisten Fällen jedoch einen funktionellen Immunglobulin-Lokus aufweisen (Marafioti et al., 2000). Das heißt, die vorhandenen inaktivierenden Mutationen beeinflussen nicht die Kapazität, funktionelle Immunglobulin-Transkripte zu kodieren. Des Weiteren stellte sich heraus (2), dass eine Mutation des Oktamer-Motivs oder anderer regulatorischer Elemente im Immunglobulin-Promotor ebenfalls sehr selten auftritt (Theil et al., 2001). Somit besitzen die HRS-Zellen ein Immunglobulingen, das exprimiert werden könnte und auch ein funktionelles Immunglobulinprotein kodiert. In den meisten der untersuchten Fälle wurde jedoch kein Immunglobulin-Transkript detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass in HRS-Zellen die Transkription von Immunglobulingenen defekt ist. Des Weiteren konnte von der Gruppe um Prof. H. Stein gezeigt werden, dass die untersuchten primären cHL-Zellen die Transkriptionsfaktoren Oct2 und BOB.1/OBF.1 nicht exprimieren, welche bekanntermaßen wesentlich an der Expression von sekundären Immunglobulin-Isotypen beteiligt sind.

Ob HRS-Zellen, wie postuliert, einen Defekt in der Immunglobulin-Transkription aufweisen, wurde in dieser Arbeit untersucht, indem verschiedene HRS-Zelllinien in einer Reihe von Transfektions-Experimenten analysiert wurden. Ein Reporter, der von einem Immunglobulin- $\kappa$ T1-Promotor zusammen mit dem Immunglobulin- $\mu$ Enhancer reguliert wird, zeigte die gleiche geringe Aktivität in den HRS-Zelllinien wie ein entsprechender Reporter, in dem das

## Diskussion

---

Oktamer-Motiv im Promotor mutiert war. Als Kontrolle wurden fünf humane B-Zelllinien mit den gleichen Reportern transfiziert, wobei der nicht mutierte gegenüber dem mutierten Reporter eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität zeigte. Das heißt, in den untersuchten HRS-Zellen ist in der Tat die Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription defekt. Um zu zeigen, dass kein genereller Transkriptions-Defekt in den Zellen vorliegt, wurden dieselben HRS-Zelllinien und die B-Zelllinien mit Reportern transfiziert, die von einem Thymidinkinase-Promotor bzw. einem verkürzten Thymidinkinase-Promotor reguliert wurden. In allen Zelllinien zeigten sich vergleichbare Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität dieser beiden Reporterkonstrukte. Das heißt, in den HRS-Zellen liegt kein genereller transkriptioneller Defekt vor. Wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, spielt das Oktamer-Motiv im Immunglobulin-Promotor eine wichtige Rolle für die Regulation von Immunglobulinen. Ein Defekt in der oktamerabhängigen Transkription könnte also eine Erklärung für den beobachteten Defekt in der Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription sein. Wurden synthetische oktamerabhängige Reporter und parallel entsprechende Reporter mit einem mutierten Oktamer-Motiv in die humanen B-Zellen transfiziert, war, wie zu erwarten, ein signifikanter Unterschied in der Aktivität dieser Reporter zu detektieren. In den HRS-Zelllinien jedoch zeigten die wildtypischen und Oktamer-Motiv-mutierten Reporter die gleiche niedrige Aktivität. Das heißt, in der Tat ist die oktamerabhängige Transkription in den HRS-Zellen defekt.

Dies entspricht dem Ergebnis des ersten Teils dieser Arbeit mit BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen, wo gezeigt werden konnte, dass das Fehlen von BOB.1/OBF.1 verantwortlich ist für einen Defekt in Immunglobulin- sowie oktamerabhängiger Reporter-Gen-Transkription. Tatsächlich konnte hier in Northernblot-, Immunblot- und Gelretardations-Analysen gezeigt werden, dass in den HRS-Zelllinien kein BOB.1/OBF.1 und darüber hinaus kein Oct2 exprimiert wird. In einer früheren Arbeit (Bargou et al., 1996) wurde berichtet, dass einige HRS-Zelllinien eine starke Oct2-Expression zeigen. Diese Daten widersprechen den hier gezeigten Ergebnissen sowie den Ergebnissen aus der Analyse primärer HRS-Zellen (Arbeitsgruppe Prof. H. Stein, Berlin), in denen weder BOB.1/OBF.1- noch Oct2-Transkripte gefunden werden konnten

## Diskussion

---

(Stein et al., 2001; Theil et al., 2001). Mittlerweile wurden diese Ergebnisse auch von anderen Gruppen bestätigt (Re et al., 2001; Saez et al., 2002; Hertel et al., 2002; Schwering et al., 2003a; Schwering et al., 2003b; Kuppers et al., 2003; Steimle-Grauer et al., 2003; Browne et al., 2003): HRS-Zellen exprimieren in den meisten Fällen kein BOB.1/OBF.1 oder Oct2 und in keinem der untersuchten Fälle BOB.1/OBF.1 und Oct2 zusammen.

Wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, kann der in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen beobachtete transkriptionelle Defekt durch ein stabil integriertes BobER-Fusionsprotein behoben werden. Durch dieses stabil exprimierte, induzierbare BOB.1/OBF.1-Protein ist es möglich, sowohl oktamerabhängige Reporter-Gen-Transkription als auch Immunglobulin-Promotor-Reporter-Gen-Transkription in den Zellen wieder herzustellen. Wurden die HRS-Zelllinien mit einem BOB.1/OBF.1-Expressionsvektor und den verschiedenen Reporterkonstrukten transient kotransfiziert, war es tatsächlich möglich, wieder oktamerabhängige und Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription in HRS-Zellen zu detektieren. Die Überexpression von Oct2 in den Zellen hat im Vergleich zur Expression von BOB.1/OBF.1 keinen bzw. einen deutlich geringeren Effekt. Das Fehlen von BOB.1/OBF.1 in HRS-Zellen ist also verantwortlich für den beobachteten Defekt der Immunglobulin-Reporter-Gen-Transkription.

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob auch die Expression von endogenen Immunglobulinen durch eine BOB.1/OBF.1-Überexpression induziert werden kann. Um zu untersuchen, ob die Expression von endogenen Immunglobulinen durch eine transiente BOB.1/OBF.1-Überexpression induziert werden kann, wurden im Rahmen einer Kooperation (Dr. M. Hummel, Berlin, unveröffentlichte Daten) HRS-Zelllinien mit BOB.1/OBF.1 transfiziert und mit anti-Immunglobulin-Antikörpern in immunhistochemischen Experimenten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass in diesen Experimenten weder BOB.1/OBF.1, Oct2 noch beide Proteine zusammen ausreichen, um die Expression endogener Immunglobuline zu induzieren. Da bei einer transienten Transfektion nur ein geringer Prozentsatz der Zellen transfiziert wird, wurden Zelllinien etabliert, die

## Diskussion

---

BOB.1/OBF.1 bzw. das beschriebene konditionale BobER-Fusionsprotein stabil exprimieren. Diese stabilen Zelllinien wurden zunächst in Transfektions-Experimenten mit den beschriebenen Immunglobulin-Promotor- und oktamerabhängigen Reportern getestet. Dabei zeigte sich, dass das stabil integrierte BOB.1/OBF.1 und das BobER-Fusionsprotein nicht in der Lage waren, die Reporterkonstrukte so zu induzieren, wie es in den parentalen Zellen durch eine transiente Kotransfektion von Reportervektor und Expressionsvektor möglich war. Wurden jedoch diese BOB.1/OBF.1-stabilen Zellen mit Reporter- und Expressionsvektor für BOB.1/OBF.1 kotransfiziert, so war der oben beschriebene Effekt wieder festzustellen. Das heißt, dass das kotransfizierte BOB.1/OBF.1 oktamerabhängige Transkription in diesen BOB.1/OBF.1-stabilen Zellen vermitteln konnte, wohingegen das stabil exprimierte BOB.1/OBF.1- bzw. BobER-Fusionsprotein dazu nicht in der Lage war. Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass bei einer transienten Expression häufig ein stärkerer Expressionslevel erreicht werden kann als bei einer stabilen Expression. Weiterhin wäre es möglich, dass das stabil exprimierte BOB.1/OBF.1 im Gegensatz zum transient transfizierten BOB.1/OBF.1 in den HRS-Zellen posttranskriptionell oder posttranslationell modifiziert und dabei inaktiviert wird. In der Tat ist bekannt, dass BOB.1/OBF.1, um transkriptionell aktiv zu sein, phosphoryliert werden muss (Zwilling et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BOB.1/OBF.1-Protein zu einem großen Teil im Zytoplasma zu finden ist und es dort mit Proteinen wie SIAH („seven in absentia homologe“) und abp280 („actin binding protein 280“) interagiert (Boehm et al., 2001; Tiedt et al., 2001). Durch die Interaktion mit SIAH wird die BOB.1/OBF.1 durch den Proteasom-Signalweg abgebaut, was einen zusätzlichen BOB.1/OBF.1-Regulationsmechanismus in B-Zellen darstellt. Die Funktion weiterer Interaktionen ist noch unklar. Ein weiterer BOB.1/OBF.1-Regulationsmechanismus ist die Myristylierung einer 35 kDa BOB.1/OBF.1-Isoform, wodurch eine Lokalisierung des Proteins an die Zellmembran erreicht wird; allerdings ist die Funktion dieser Lokalisierung bislang unbekannt (Yu et al., 2001). Es ist vorstellbar, dass das stabil exprimierte BOB.1/OBF.1-Protein in HRS-Zellen modifiziert und inaktiviert wird. So könnte das stabil exprimierte BOB.1/OBF.1 in den HRS-Zellen im Zytoplasma zurückgehalten werden, wodurch es transkriptionell inaktiv wird. Im Falle einer starken Überexpression während einer

## Diskussion

---

transienten Transfektion könnte trotzdem genügend BOB.1/OBF.1-Protein in den Kern gelangen und transkriptionell aktiv werden.

BOB.1/OBF.1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Promotoren in Kombination mit 3'Immunglobulin-Enhancern bei Transfektionen in primäre Zellen (Stevens et al., 2000b) sowie in transgenen Mäusen (Andersson et al., 2000), ebenso wie auch NFκB (Sepulveda et al., 2004) und Oct2 (Tang et al., 1999). Wie in dieser Arbeit gezeigt, werden in den HRS-Zellen zwei Faktoren, BOB.1/OBF.1 und Oct2, nicht exprimiert. Womöglich sind beide gemeinsam nötig für eine effiziente Transkription von einem Oktamer-Motiv. Durch die transiente, starke Überexpression von BOB.1/OBF.1 könnte diese Notwendigkeit durch eine alternative Interaktion mit Oct1 ersetzt werden. Die Etablierung und Analyse von Zellen, die beide Proteine, BOB.1/OBF.1 und Oct2, stabil exprimieren, ist notwendig, um diese Fragen zu klären.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden Reporter transfiziert, die von einem Immunglobulin-κ-Promotor/Immunglobulin-μEnhancer reguliert werden. Es ist bekannt, dass ein solches Konstrukt für eine spezifische Aktivität in präB-Zellen ausreicht. In späteren B-Zellentwicklungsstadien ist ein solches Konstrukt zwar ebenfalls aktiv, jedoch ist ein Reporter aus einem Immunglobulin-Promotor mit einem 3'Immunglobulin-Enhancer deutlich stärker reguliert (Stevens et al., 2000b). In Keimzentrums-B-Zellen sollten sekundäre Immunglobulingene exprimiert werden, welche unter der Kontrolle eben dieser 3'Immunglobulin-Enhancer sind. In der gleichen Arbeit (Stevens et al., 2000b) wurde gezeigt, dass ein 3'Immunglobulin-Enhancer-Reporter in primären B-Zellen durch IL-4/antiCD40 induziert werden kann, in BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen jedoch nicht. Ein μEnhancer-Reporter hingegen war in Wildtyp und BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Zellen durch IL-4/antiCD40 induzierbar, wobei jedoch die gezeigten Effekte bei der Induktion des μEnhancers nur sehr schwach, beim 3'Immunglobulin-Enhancer hingegen wesentlich deutlicher waren. Die Induktion des Reporters beruhte wahrscheinlich auf der bekannten Induktion von BOB.1/OBF.1-Expression durch die Stimulation mit IL-4/antiCD40 (Qin et al., 1998; Greiner et al., 2000). Diese

## Diskussion

---

Experimente belegen, dass in späten B-Zellen der 3'Immunglobulin-Enhancer ein wesentliches Element für die Regulation von Immunglobulinen ist und dass vermutlich BOB.1/OBF.1 oder von BOB.1/OBF.1-regulierte Faktoren an dieser Regulation beteiligt sind. In HRS-Zellen, die von Keimzentrums-B-Zellen abstammen, ist ein Reporterkonstrukt unter der Kontrolle des 3'Immunglobulin-Enhancers also ein sinnvolles zusätzliches System zur Analyse der Transkriptionskontrolle.

Wie bereits im zweiten Teil der Diskussion beschrieben, ist die Regulation der Immunglobulingene ein komplexer Mechanismus, an dem, neben den bereits erwähnten verschiedenen Promotoren und Enhancern, auch eine Reihe verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist das Fehlen der Transkriptionsfaktoren BOB.1/OBF.1 und Oct2 mitbeteiligt am Transkriptionsdefekt in den HRS-Zellen. Diese Beobachtung ist sinnvoll vor dem Hintergrund, dass auch neue Hybridoma-Experimente (Salas and Eckhardt, 2003) eine wichtige Rolle der Kombination von Oct2 und BOB.1/OBF.1 für die Immunglobulin-Expression in Plasmazellen belegen. Mäuse, die weder BOB.1/OBF.1 noch Oct2 exprimieren, zeigen eine verringerte Expression sekundärer Immunglobulingene wie auch die BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-Mäuse (Schubart et al., 2001). Die initiale Immunglobulin-Transkription ist jedoch nicht beeinflusst. Die das Oktamer-Motiv bindenden Faktoren Oct2 und BOB.1/OBF.1 sind also wichtige Faktoren für die Immunglobulin-Transkription, jedoch nicht die einzigen. In der Tat konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch der an der Regulation der Immunglobulin-Transkription beteiligte Transkriptionsfaktor Pu.1 nicht in HRS-Zellen exprimiert wird (Jundt et al., 2002b; Hertel et al., 2002). Das Fehlen dieses Faktors führt in Transfektions-Experimenten mit Immunglobulin-Promotor/Enhancer-Reportern, ähnlich wie hier für BOB.1/OBF.1 gezeigt, zu einem Immunglobulin-Transkriptionsdefekt in HRS-Zellen (Jundt et al., 2002b; Hertel et al., 2002; Loddenkemper et al., 2004). Es ist durchaus möglich, dass neben dem Fehlen von BOB.1/OBF.1, Oct2 und Pu.1 noch weitere Faktoren, die an der Regulation der Immunglobulin-Transkription beteiligt sind, in HRS-Zellen dereguliert sind. Tatsächlich zeigten verschiedene Expressionsstudien, dass in HRS-Zellen weitere B-Zell-spezifische

## Diskussion

---

Transkriptionsfaktoren wie E47/E12, EBF (Hertel et al., 2002) und Pax5 (Hertel et al., 2002; Foss et al., 1999) fehlen oder vermindert exprimiert werden. Die Expression von aktiviertem Notch1 in HRS-Zellen unterstützt Proliferation und Überleben der HRS-Tumorzellen (Jundt et al., 2002a), darüber hinaus lassen andere Experimente es möglich erscheinen, dass Notch1 auch an der Herunterregulation der Immunglobulingene beteiligt ist (Morimura et al., 2001).

Genexpressions-Profiling-Experimente mittels Affymetrix-Genchips, die wildtypische B-Zellen und HRS-Zelllinien verglichen, zeigten, dass in HRS-Zellen das normale B-Zell-Expressionsprogramm generell dereguliert ist (Schwering et al., 2003; Kuppers et al., 2003). HRS-Zellen stellen ein eigenständiges Subset von Zellen dar, im Vergleich mit anderen B-Zellentwicklungsstadien. Das Genexpressionsmuster von HRS-Zellen weist dabei eher Ähnlichkeiten mit aktivierten B-Zellen auf und entspricht nicht dem Keimzentrums-B-Zellphänotyp. BOB.1/OBF.1 wird typischerweise stark in Keimzentrums-B-Zellen exprimiert (Qin et al., 1998; Greiner et al., 2000). Die Deregulation des ursprünglichen B-Zell-Programms in HRS-Zellen führt möglicherweise dazu, dass diese Zellen nicht mehr einer Keimzentrums-B-Zelle entsprechen, was auch das Fehlen von BOB.1/OBF.1 dieser Zellen erklären würde. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass zahlreiche in HRS-Zelllinien herunterregulierte Gene an der Zytoskelettregulation oder Zellmigration beteiligt sind (Kuppers et al., 2003; Garcia et al., 2003). Für BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-B-Zellen wurde nachgewiesen, dass sie einen Migrations-Defekt aufweisen (Samardzic et al., 2002a). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist BOB.1/OBF.1 beteiligt an der Regulation von MLC1A, wobei die mögliche Verbindung von MLC1A, BOB.1/OBF.1 und Zellmigration bereits im zweiten Teil diskutiert wurde. Das Fehlen von BOB.1/OBF.1 in den HRS-Zellen passt in diesem Fall also in das beobachtete Genexpressionsmuster. Vor dem Hintergrund der generellen Deregulation des typischen B-Zell-Programms erscheint es wahrscheinlich, dass nicht nur das Fehlen von BOB.1/OBF.1 und Oct2 allein die fehlende Expression von Immunglobulinen verursacht, sondern auch das Fehlen weiterer an der Regulation beteiligter Faktoren. Deshalb ist womöglich die Rekonstitution der Immunglobulin-

## Diskussion

---

Expression in HRS-Zelllinien nur teilweise durch eine Expression von BOB.1/OBF.1 und Oct2 möglich.

Weiterhin ist die Funktion epigenetischer Modifikationen als wesentlicher Mechanismus der Transkriptionsregulation von Bedeutung. Daran sind zum einen Histon-Acetylase-Komplexe (HAT) und Histon-Deacetylase-Komplexe (HDAC) beteiligt, durch welche die Acetylierung von vier Histonen erfolgt (Jenuwein, 2001; Jenuwein and Allis, 2001) sowie zum anderen die regulierte Methylierung regulatorischer DNA-Sequenzen. ATP-abhängige Chromatin-„Remodelling“-Komplexe regulieren die Chromatinstruktur durch eine Veränderung der Lokalisation oder Konformation der Nukleosomen (Kingston and Narlikar, 1999; Klochendler-Yeivin and Yaniv, 2001). Zahlreiche neuere Untersuchungen zeigten, dass epigenetische Modifikationen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunglobulin-Transkription und Rekombination spielen (Ciccione and Oettinger, 2004, Osipovich et al., 2004; Bergman et al., 2003).

Die in den beiden letzten Abschnitten beschriebenen Tatsachen lassen weitere Experimente mit den hier etablierten stabil BOB.1/OBF.1-exprimierenden Zellen also sinnvoll erscheinen. So sind zum Beispiel die zusätzliche Expression weiterer fehlender Faktoren wie z. B. Pu.1 sowie die Untersuchung des Effekts von Inhibitoren der Histon-Deacetylasen und der Methyltransferasen auf die Immunglobulingen-Expression in den HRS-Zellen, insbesondere auch auf die Expression der endogenen Immunglobulingene, vorstellbar. Tatsächlich konnte mittlerweile gezeigt werden (Ushmorov et al., 2004), dass eine epigenetische Inhibierung ein zusätzlicher Mechanismus ist, welcher für die fehlende Expression von Immunglobulingenen in HRS-Zellen verantwortlich ist. HRS-Zellen rekrutieren kein Oct2-Protein und zeigen einen Methylierungszustand des Promotors, der typisch ist für inaktives Heterochromatin. Immunglobulin-Expression in HRS-Zelllinien kann teilweise wiederhergestellt werden durch eine Inhibierung der Methylierung sowie Überexpression von Oct2 und BOB.1/OBF.1.

## Diskussion

---

Wenn auch das B-Zell-Expressionsprogramm in den HRS-Zellen dereguliert ist, so steht doch ihre B-Zellherkunft heute nicht mehr in Frage, welche im Wesentlichen durch den für Keimzentrums-B-Zellen typischen Rearrangements- und Hypermutationsstatus der Immunglobulingene der HRS-Zellen belegt ist. Insgesamt zeigen die hier durchgeführten Experimente sowie die Ergebnisse der kooperierenden Gruppe um Prof. H. Stein, dass das Modell, wonach inaktivierende Mutationen die entscheidende Ursache für den Immunglobulin-Expressionsdefekt in HRS-Zellen sind, nicht haltbar ist. Vielmehr ist das Fehlen von Immunglobulin-Expression in HRS-Zellen wahrscheinlich auf einen Defekt in der Immunglobulin-Transkription zurückzuführen. Dabei spielt ein Defekt in der oktamerabhängigen Transkription eine wesentliche Rolle. Für diesen Defekt sind, unter anderem, vermutlich das Fehlen des transkriptionellen Koaktivators BOB.1/OBF.1 sowie teilweise das Fehlen des Transkriptionsfaktors Oct2 verantwortlich.

# 4. METHODEN UND MATERIAL

## 4.1 Standardmethoden

### 4.1.1 Zentrifugation

Alle im Folgenden nicht näher erläuterten Zentrifugationsschritte in Eppendorfgefäßen wurden in einer Biofuge A der Firma Heraeus bei RT und 13.000 rpm durchgeführt.

### 4.1.2 Präzipitation von DNA

Die DNA wurde aus einer wässrigen Lösung durch Zugabe von 0,3 M Natriumacetat pH 5,2 (Endkonzentration) und 2,5 Volumen Ethanol oder 0,6 Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation pelletiert, mit 75 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Falls nicht anders vermerkt, wurde die DNA entweder in Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

### 4.1.3 Präzipitation von RNA

Die RNA wurde aus einer wässrigen Lösung durch Zugabe von 0,3 M Natriumacetat pH 5,2 (Endkonzentration) und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde analog zu der DNA weiter behandelt und anschließend in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 4.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt, kräftig durchmischt und für 5-10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA-Lösung wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben präzipitiert.

### 4.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht 1 OD einer Konzentration von 50 µg DNA/ml und 40 µg RNA/ml.

### 4.1.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Aliquots der Proteinextrakte wurden mit einer 0,15 M Natriumchlorid-Lösung auf ein Endvolumen von 100µl gebracht und 1 ml Bradford-Lösung (100 mg Coomassie G250; 50 ml Ethanol; 100 ml 85 % Phosphorsäure; 850 ml Wasser) zugegeben. Nach kurzem Mischen und 2 min Inkubation bei RT wurde die optische Dichte der Lösung bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve abgeschätzt, die durch mehrere Ansätze einer BSA-Eichlösung mit Proteinkonzentrationen zwischen 1-20 µg hergestellt wurde.

### 4.1.7 Gelelektrophoresen

Alle Gelelektrophoresen die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Maniatis et al. 1989 „Molecular Cloning. A laboratory manual“ beschrieben. Die verwendeten Farbmarker und Lösungen sind im Kapitel 4.14.2 aufgeführt.

## 4.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 4.2.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Bedingungen für den Restriktionsverdau sowie die Enzymmenge und der entsprechende Puffer entsprachen den Angaben der Hersteller (Fa. Amersham; Fa. Biolabs; Fa. Boehringer Mannheim). Bei DNA aus Miniextraktionen wurden 5 µg RNaseA zugesetzt. Der Restriktionsverdau wurde 1-2 h bei 37°C inkubiert und anschließend ein Aliquot auf einem Agarosegel (1 % Agarose; 1xTAE; 3-5 µg Ethidiumbromid) analysiert. Der Gellauf betrug 1-2 h bei 80-100 V. Die DNA-Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Bei einem analytischen Restriktionsverdau, z. B. zur Identifizierung positiver Bakterienklone, wurden geringe (0,5-2 µg) Mengen DNA eingesetzt, wohingegen für präparative Restriktionsansätze, z. B. zur Herstellung von DNA-Fragmenten zur Klonierung, zwischen 20-100 µg DNA eingesetzt wurden.

### 4.2.2 Partialverdau von Plasmid-DNA

Für die Klonierung der BobER Expressionsvektoren wurde ein partieller Restriktionsverdau des Plasmids pBS-BobER durchgeführt. Nach dem Austesten der optimalen Enzymkonzentration wurden 10 µg des Plasmids mit 3 U EcoRI für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend der Reaktionsansatz auf einem präparativen Agarosegel aufgetragen (1 % Agarose; 1xTAE; 3-5 µg Ethidiumbromid).

### 4.2.3 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Die Abspaltung terminaler Phosphatgruppen mit einer Alkalischen Phosphatase (CIP=„calf intestine phosphatase“; Fa. Boehringer Mannheim) wurde durchgeführt, um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern.

Pipettierschema:

1-10 µg linearisierter Vektor

2 µl 10xCIP-Puffer

1 µl CIP (20U/µl)

ad. 20 µl H<sub>2</sub>O

Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 56°C. Danach wurde erneut 1 µl CIP (20 U/µl) zugegeben und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert.

### 4.2.4 Die Klenow-Reaktion

Die Klenow-Reaktion dient zum Auffüllen von DNA-Enden mit einem 5'-Überhang und wird durch die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli* katalysiert. Die Reaktion wurde nach vorheriger Inaktivierung des Restriktionsenzym durchgeföhrt, indem 2 µl dNTPs (2,5 mM) und 1 µl Klenow-Polymerase (10 U/µl) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation inaktiviert.

### 4.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

#### 4.2.5.1 Phenol-Extraktionsmethode

Die Region, die das gewünschte DNA-Fragment bzw. den linearisierten Vektor enthielt, wurde aus dem präparativen Agarosegel (1 % Agarose; 1xTAE; 3-5 µg/ml EtBr) ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem kleinen Loch im Boden überföhrt. Die Agarose wurde zerkleinert, indem sie durch das kleine Loch in ein zweites Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert wurde (1 min; 13000 rpm; Eppendorfsentrifuge). Die zerkleinerte Agarose wurde mit gleichem Volumen Phenol versetzt, gemischt und auf Trockeneis eingefroren. Nach 10-15 min Zentrifugation bei RT wurde der wässrige Überstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform zweimal extrahiert (1 min; 13000 rpm; Eppendorfsentrifuge). Anschließend wurde die DNA durch Ethanolpräzipitation pelletiert und in Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

#### 4.2.5.2 Aufreinigung durch DEAE-Papier

Die DNA-Fragmente bzw. linearisierten Vektoren wurden über ein präparatives Agarosegel (1 % Agarose; 1xTAE; 3-5 µg EtBr/ml) aufgetrennt und anschließend unterhalb der gewünschten DNA-Bande mit einer Rasierklinge ein Schnitt eingeföhgt. In diesen wurde ein DEAE-Streifen der entsprechenden Größe eingesetzt und die Elektrophorese solange fortgesetzt, bis die DNA vollständig am DEAE-Papier haftete. Anschließend wurde das DEAE-Papier in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überföhrt und mit einem Nidrigsalz-Puffer (50m M Tris/HCl pH 8,0; 0,15 M NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0) gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit einem Hochsalz-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 M NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0) für 30 min bei 65°C. Die eluierte DNA wurde durch eine Ethanolpräzipitation pelletiert und in Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

### 4.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren

Die DNA-Fragmente wurden gegenüber den linearisierten Vektoren in einem zwei- bis fünffachen Überschuß eingesetzt und die Ligation durch eine T4-DNA-Ligase (Fa. Amersham) katalysiert.

## Methoden und Material

---

Pipettierschema:

2	µl	linearisierter Vektor (10-100 ng)
2	µl	DNA-Fragment
2	µl	10xLigase-Puffer
1	µl	T4-DNA-Ligase (1-4 U/µl)
ad. 20	µl	H <sub>2</sub> O

Die Inkubation wurde für 3-4 h bei RT oder über Nacht bei 16°C durchgeführt.

### 4.2.7 Transformation kompetenter Bakterien mit DNA

#### 4.2.7.1 Chemokompetente Bakterien

100-150 µl der chemokompetenten Bakterien (*E. coli* Stämme DH5α und GM33; beide im Labor vorhanden) wurden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 10-20 µl des Ligationsansatzes oder 50-100 ng der zu retransformierenden Plasmid-DNA erfolgte für 20-30 min eine Inkubation auf Eis und anschließend ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zu den Bakterien gegeben, der Ansatz für 1 h bei 37°C geschüttelt und 10 % bzw. 90 % der Transformation auf Antibiotika enthaltende Agarplatten (Ampicillin 50 µg/ml oder Kanamycin 25 µg/ml; je nach verwendetem Vektor) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.2.7.2 Elektrokompetente Bakterien

Der Transformationsansatz wurde durch Ethanolpräzipitation pelletiert und in 20 µl Wasser aufgenommen. Davon wurden 2-4 µl zu 40 µl elektrokompetente Bakterien (*E. coli* Stamm DH5α; im Labor vorrätig), die zuvor auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben. Die Elektroporation erfolgte in einer 0,1 cm Küvette bei 25 µF und 1,8 kV (Gene Pulser; Fa. BIORAD). Nach der Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium zu den Bakterien gegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte analog zu den chemokompetenten Bakterien (Kapitel 4.2.7.1).

### 4.2.8 Klonierung des 5'-Endes der MLC1A-cDNA aus B-Zellen der Maus (RACE-Protokoll)

Für die Klonierung des MLC1A 5'-Endes wurde polyA<sup>+</sup>-RNA aus einer Abelsonvirus-transformierten präB-Zelllinie sowie das 5'-RACE-System (Fa. GibcoBRL) verwendet. Das Protokoll wurde nach den Angaben der Hersteller durchgeführt, wobei die verwendeten Primer in Kapitel 4.14.8 aufgeführt sind. Die amplifizierten Fragmente aus dem 5'-Ende der MLC1A-cDNA wurden über das pMos(T)-cloning kit (Fa. Amersham) kloniert und sequenziert.

## 4.3 Isolation von DNA

### 4.3.1 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab („Minipräparation“)

Einzelkolonien von Bakterien, die ein gewünschtes Plasmid enthielten, wurden bei 37°C in 2 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin) kultiviert. 1,5 ml der Übernachtskultur

## Methoden und Material

---

wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 13000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) gelöst und anschließend 200 µl Lösung 2 (0,2 N Natriumhydroxid; 1 % SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und 5-10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 (5 M Kaliumacetat; 11,5 % Essigsäure) und vorsichtigem Mischen wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 400 µl Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) überführt und sorgfältig gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurde der wässrige Überstand entnommen und die DNA durch Ethanol-fällung pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 20-50 µl Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

### 4.3.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab („Maxipräparation“)

250 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin) wurde mit einer Einzelkolonie der Bakterien angeimpft und über Nacht unter Schütteln inkubiert (37°C; 200 rpm; Schüttelinkubator). Die Bakterienkultur wurde in einem 250 ml Zentrifugenbecher pelletiert (5000 rpm; 10 min, 4°C; GSA-Rotor; Fa. Sorvall) und das Pellet in 10 ml Lösung 1 (siehe 4.3.1) suspendiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde 20 ml Lösung 2 (siehe 4.3.1) zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 15 ml Lösung 3 (siehe 4.3.1), 10 min Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation (10 min; 10000 rpm; 4°C; GSA-Rotor; Fa. Sorvall). Der Überstand wurde über einen Faltenfilter filtriert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) gesammelt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt, pelletiert (5000 rpm; 10 min; Heraeus-Zentrifuge) und in 4,5 ml 1xTE-Puffer gelöst. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte über einen Cäsiumchlorid-Gradienten. Zunächst wurden 4,8 g Cäsiumchlorid und 200-400 µl einer EtBr-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt und durch vortexen gründlich gemischt. Die entstandenen Präzipitate wurden durch Zentrifugation (5000 rpm; 5-10 min; Heraeus-Zentrifuge) entfernt und der Überstand in ein Polycarbonat-Röhrchen (Quickseal; Fa. Beckmann) überführt. Nach einer Zentrifugation von 4-12 h (VTi65-Rotor; 55-60000 rpm, 20°C; Ultrazentrifuge) war die Plasmid-DNA deutlich als Bande sichtbar und konnte mit Hilfe einer 2 ml Spritze mit Kanüle abgezogen werden. Die Plasmid-Lösung wurde in ein frisches Polycarbon-Röhrchen (Quickseal; Fa. Beckmann) überführt, mit einer Cäsiumchlorid-Lösung (0,85 g/ml) aufgefüllt und die Zentrifugation (siehe oben) wiederholt. Die Plasmid-Bande wurde erneut abgezogen und das Ethidiumbromid mit wassergesättigtem Butanol (ca. 4-5 Durchgänge) ausgeschüttelt. Nach Verdünnung der DNA-Lösung (1:4 mit 1xTE-Puffer) wurde die DNA wie beschrieben (siehe 4.1.2) gefällt und in 1xTE-Puffer gelöst.

### 4.3.3 Präparation von genomischer DNA

Für die Präparation von genomischer DNA aus Gewebekulturzellen wurden diese zunächst pelletiert (5 min; 900-1000 rpm; Heraeus-Zentrifuge) und mit 1 ml 1xPBS gewaschen. Dann wurden die Proben in 500 µl TNES-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 % SDS) zusammen mit 400 µg Proteinase K für 4-12 h bei 56°C lysiert. Zu dem Lysat wurden 500 µl Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) zugegeben, gut gemischt und für 5-10 min bei 13000 rpm

zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge). Die genomische DNA im wässrigen Überstand wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt und pelletiert (10 min; 13000 rpm; Eppendorffzentrifuge). Das Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen.

### 4.4 Isolation von RNA

#### 4.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe und Gewebekulturzellen

Die jeweiligen Gewebe/Gewebekulturzellen wurden in einem 12,5 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) in 4 ml Solubilisierungspuffer (4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Natriumacetat; 100 mM β-Mercaptoethanol; 0,5 % Natriumlauroylsarcosine) homogenisiert (20500 rpm; 20-30 sec; Ultra-Turrax T25). Anschließend wurden 4 ml Phenol (wassergesättigt, pH 4,0), 800 µl Chloroform und 400 µl 3 M Natriumacetat pH 4,2 zugegeben und gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (10000 rpm; 15 min; 4°C; SS34- oder SA600-Rotor; Fa. Sorvall) wurde die wässrige Phase in ein neues 12,5 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) überführt und die RNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt (30-60 min; -20°C). Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, in 500 µl Solubilisierungspuffer (siehe oben.) aufgenommen und in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte erneut eine Präzipitation der RNA mit 500 µl Isopropanol (30-60 min; -20°C). Die gefällte RNA wurde pelletiert (10 min; 13000 rpm; Eppendorffzentrifuge), zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und in 200 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte unter Ethanol (2,5 Volumen Ethanol; 0,3 M Natriumacetat pH 5,2) bei -20°C.

#### 4.4.2 Präparation von polyA<sup>+</sup>-RNA aus Gewebekulturzellen

Zunächst wurde Gesamt-RNA nach der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Methode aus 5 bis 10 Gewebekulturschalen (145 mm; Fa. Greiner) isoliert und davon ca. 2 mg in 10 ml STE-Puffer (100 mM Natriumchlorid; 20 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,5 % SDS) gelöst. Anschließend wurde 1 ml 5 M Natriumchlorid zugegeben, die RNA-Lösung mit 300-500 µg Oligo-dT-Zellulose (zuvor nach den Angaben des Herstellers vorbereitet; Fa. Stratagene) gemischt und geschüttelt (4 bis 12 h; RT; Überkopfschüttler). Danach wurde das Gemisch zentrifugiert und drei- bis fünfmal mit HSB-Puffer (300 mM Natriumchlorid; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,1 % SDS) gewaschen (2000 rpm; 2-5 min; Heraeus-Zentrifuge). Die Elution der polyA<sup>+</sup>-RNA erfolgte durch dreimaliges Waschen der Oligo-dT-Zellulose mit 2,5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O (2000 rpm; 2-5 min; Heraeus-Zentrifuge), wobei die einzelnen Überstände in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) vereinigt wurden. Die polyA<sup>+</sup>-RNA wurde unter Ethanol (2,5 Volumen Ethanol; 0,3 M Natriumacetat pH 5,2) bei -20°C gelagert.

### 4.5 Hybridisierung von Nukleinsäuren

#### 4.5.1 Koloniehybridisierung

Um Bakterien mit dem gewünschten Plasmid nachweisen zu können, wurden die Kolonien von der Agarplatte auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Fa. Amersham) übertragen. Für die spätere Zuordnung der positiven Signale wurde die Nylonmembran in einem asymmetrischen Muster mit einer tintegetränkten Kanüle durchstoßen, wodurch gleichzeitig die Membran und die Agarplatte markiert wurden. Die Bakterien auf den Nylonmembranen wurden nach dem Transfer mit der Denaturierungslösung (0,5 M Natriumhydroxid; 5 M Natriumchlorid) lysiert, die gleichzeitig zu einer Denaturierung der DNA führte. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit einer Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,5; 1,5 M Natriumchlorid) behandelt und einmal mit 4xSSC gewaschen. Die Nylonmembranen wurden zwischen 3MM Whatman-Papier gelegt und durch Faustschläge die Flüssigkeits- und Bakterienreste entfernt. Die DNA wurde durch eine UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker; Fa. Amersham) irreversibel an die Nylonmembranen gebunden und danach in der Hybridisierungslösung (0,5 M Phosphatpuffer pH 7,2; 7 % SDS; 1 mM EDTA) prähybridisiert (1 h; 65°C; Hybridisierungssofen; Fa. Hybaid). Anschließend wurde die <sup>32</sup>P-markierte DNA-Probe zugegeben und über Nacht hybridisiert (65°C; Hybridisierungssofen; Fa. Hybaid). Am nächsten Tag wurden die Membranen einmal mit Waschlösung 1 (40 mM Phosphatpuffer pH 7,2; 5 % SDS; 1 mM EDTA pH 8,0) und dreimal mit Waschlösung 2 (40 mM Phosphatpuffer pH 7,2; 1 % SDS; 1 mM EDTA pH 8,0) gewaschen. Die Waschschrte erfolgten jeweils für 15 min bei 65°C in dem Hybridisierungssofen (Fa. Hybaid). Nach einem kurzen Schwenken der Nylonmembranen in 4xSSC wurden sie in Frischhaltefolie eingepackt und auf einem Röntgenfilm exponiert (-80°C; Verstärkerscreen).

#### 4.5.2 Southernblot-Analyse

Für die Southernblot-Analyse wurden 10 µg genomische DNA bzw. Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und die DNA-Fragmente zusammen mit einem Längenstandard über ein Agarosegel (1 % Agarose; 1xTAE; 3-5 µg EtBr) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel fotografiert (UV-Videosystem; Fa. Sony) und die DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Fa. Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte über Vakuum (Vakuum-Blotter; Fa. Appligene) mit 10xSSC, wobei die DNA zunächst mit einer Denaturierungslösung (0,5 M Natriumhydroxid; 5 M Natriumchlorid) und anschließend einer Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,5; 1,5 M Natriumchlorid) behandelt wurde. Nach dem Transfer wurden zunächst die Lage der einzelnen Taschen des Agarosegels mit Bleistift auf die Nylonmembran übertragen und dann die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker; Fa. Amersham) irreversibel an die Membran gebunden. Die Bedingungen für die Hybridisierung und die Exposition entsprachen der Beschreibung in Kapitel 4.5.1.

### 4.5.3 Northernblot-Analyse

Für die Northernblot-Analyse wurden 10-20 µg Gesamt-RNA bzw. 2-5 µg Oligo-dT-RNA in 20 µl Probenpuffer (pro Ansatz 10 µl Formamid; 3,5 µl Formaldehyd; 1 µl 20xMOPS; 5,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O) gelöst und nach Hitzedenaturierung (15 min; 56°C) durch ein Formaldehydgel (1 % Agarose; 18 ml Formaldehyd/100 ml; 1xMOPS) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) gefärbt und fotografiert (UV-Videosystem; Fa. Sony). Die RNA wurde durch Vakuum (Vakuum-Blotter; Fa. Appligene) mit 10xSSC auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Fa. Amersham) übertragen und danach die Lage der einzelnen Taschen des Formaldehydgels mit Bleistift auf der Nylonmembran markiert. Durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker; Fa. Amersham) wurde die RNA irreversibel an die Membran gebunden. Alle folgenden Schritte wurden analog zu der Koloniehybridisierung (4.5.1) durchgeführt.

## 4.6 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

### 4.6.1 Markierung von DNA-Fragmenten durch „Random Priming“

Die radioaktiven DNA-Proben für die Koloniehybridisierungen bzw. Southern- und Northernblot-Analysen wurden durch Anwendung der „Prime it II“- (Fa. Stratagene) oder „rediprime II“-Kits (Fa. Amersham) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

### 4.6.2 Markierung von Oligonukleotiden mit Klenow-Polymerase

DNA-Fragmente für die Gelretardations-Analysen wurden durch eine Hybridisierung der Primer EMSA-ED1 und EMSA-ED2 hergestellt. Die Markierung erfolgte über das Auffüllen überhängender Enden mit der Klenow-Polymerase.

Pipettierschema für Oktamer-Probe:

2	µl	Oktamer-Fragment
5	µl	10xReaktionspuffer
2,5	µl	0,5 mM dGTP-,dATP-,dTTP-Mix
5	µl	<sup>32</sup> Pα-dCTP (10 µCi/µl)
2	µl	Klenow-Polymerase
ad. 50	µl	H <sub>2</sub> O

Der Reaktionsansatz wird für 1 h bei RT inkubiert und anschließend aufgereinigt (s. 4.6.3).

### 4.6.3 Aufreinigung der radioaktiv markierten DNA-Proben

Gebrauchsfertige Säulen („push columns“; Fa. Stratagene) wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet, um überschüssige Nukleotide von den markierten DNA-Proben zu trennen. Die spezifische Aktivität der Proben nach der Aufreinigung wird über die Cerenkov-Zählung bestimmt.

### 4.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA sowie amplifizierter Fragmente aus PCR-Reaktionen erfolgte entweder als Serviceleistung von R. Krug (MSZ Würzburg) oder nach dem Protokoll der Firma Perkin Elmer. Ansatz der PCR:

400 ng	Plasmid DNA
5 pmol	Primer
4 µl	Sequenzier-Mix
ad 10 µl	HPLC-Wasser

Die Analyse erfolgte im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer durch Dr. C. Brunner (Physiologische Chemie, Ulm).

### 4.8 Methoden zur Analyse der differentiellen Genexpression in zwei RNA Populationen

#### 4.8.1 Die cDNA-RDA-Methode

Alle verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet. PolyA<sup>+</sup>-RNA aus MB10-mock- und MB10-K15-Zellen wurde wie in 4.4.2 beschrieben hergestellt und in Doppelstrang cDNA transkribiert (Boehringer cDNA Synthese Kit, Fa. Boehringer Mannheim). Diese cDNA wurde mit dem Restriktionsenzym DpnII verdaut und das cDNA-RDA-Protokoll wie beschrieben durchgeführt (Hubank and Schatz, 1994). Dabei wurden im Fall des Experiments mit den Oct2ER-Zellen die drei aufeinanderfolgenden Hybridisierungen in einem „tester“ / „driver“-Verhältnis von 1:100, 1:800 und 1:400.000 durchgeführt, im Fall des Experiments mit den BobER-Zellen in einem Verhältnis von 1:100, 1:800 und 1: 500.000. Die angereicherten cDNAs des letzten „difference products“ DP-III aus dem Oct2ER-Experiment wurden in einem Southernblot-Experiment auf die Expression verschiedener bekannter Oct2-regulierter Gene untersucht. Das DP-III aus dem BobER-Experiment wurde mit DpnII verdaut und in einen BamHI-verdauten und CIP-behandelten pBluescript-Vektor kloniert. Die in den pBluescript klonierten DNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung mit T3- oder T7-Primer weiter analysiert.

#### 4.8.2 Atlas-cDNA-Mikroarray-Protokoll (Clontech)

PolyA<sup>+</sup>-RNA aus MB10-mock- und MB10-K15-Zellen wurde wie in 4.4.2 beschrieben hergestellt. Die RNA wurde wie vom Hersteller (Fa. Clontech) empfohlen in cDNA transkribiert und für die Hybridisierung die Atlas-cDNA-Mikroarray-Membranen verwendet.

#### 4.8.3 Affymetrix-Genchip-Protokoll

Für dieses Protokoll wurde Gesamtzell-RNA aus den MB10-mock und MB10-K15-Zellen mit dem Trizol-Reagenz hergestellt (nach Angaben des Herstellers, Fa. GibcoBRL). Die

Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung der RNAs mit den Affymetrix-Genchips erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch Dr. N. Kraut (Boehringer Ingelheim, Biberach a. d. Riss).

### 4.9 Nachweis der Genexpression durch RT-PCR

Für die Herstellung einzelsträngiger cDNA wurden 50-500 ng polyA<sup>+</sup>-RNA oder 1-5 µg Gesamzell-RNA eingesetzt. Die Reverse-Transkription der RNA erfolgte mittels der MMLV-RT und nach dem zugehörigen Protokoll (Fa. GibcoBRL). Die Einzelstrang-cDNA wurde anschließend für eine PCR-Reaktion verwendet, um die Expression verschiedener Gene nachzuweisen. Pipettierschema:

3        µl Einzelstrang cDNA  
3        µl 10xPCR-Puffer  
3        µl 2 mM dNTPs  
3        µl Primer-#-5' (10 pmol)  
3        µl Primer-#-3' (10 pmol)  
1        µl Taq-Polymerase (1 U/µl)  
ad. 30   µl H<sub>2</sub>O

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Kapitel 4.14.8 angegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (Fa. MWG) nach folgendem Schema:

1x	94°C	2 min	30-40x	94°C	40 sec	1x	55°C	1 min
				62°C	60 sec		72°C	10 min
				72°C	1-2 min			

Nach der Amplifikation wurden die Ansätze über ein Agarosegel (1-2 % Agarose; 1xTAE; 3-5 µg EtBr) aufgetrennt und analysiert.

### 4.10 Herstellung von Proteinextrakten

#### 4.10.1 Proteinextrakte aus Geweben

Die jeweiligen Mausegewebe wurden präpariert und in 500 µl Extraktionspuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4; 2 mM EDTA; 10 % Glycerin; 1 % Triton-X-100; 2 mM DTT) homogenisiert (20-30 sec; 4°C; Ultra Turrax T25). Nach einer Inkubation für 5-10 min auf Eis wurden die Extrakte zentrifugiert (10 min; 13000 rpm; 4°C; Eppendorffzentrifuge), die Überstände aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 4.10.2 Proteinextrakte aus Zelllinien

Bei adhärennten Zellen (z. B. NIH/3T3) wurde das Medium von der Zellkulturschale abgenommen und die Zellen auf der Schale einmal mit PBS gewaschen, bevor sie in 1 ml PBS mit einem Gummischaber abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurden. Suspensionszellen wurden in ein Falconröhrchen überführt und pelletiert (5 min; 900 rpm; Heraeus-Zentrifuge). Anschließend wurden sie in 1 ml PBS gewaschen und dabei in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter

## Methoden und Material

---

Zentrifugation (15 sec; 13000 rpm; Eppendorf-Zentrifuge) wurden die Zellen je nach experimentellem Ansatz mit unterschiedlichen Extraktionspuffern lysiert:

a) Für die Bestimmung der Luziferaseaktivität nach transienten Transfektionen wurden die Zellen bei Kotransfektion eines CMV-Renilla-Luziferase- bzw. TKL-Renilla-Luziferase-Vektors in 100µl 1 x Lysis Puffer („Dual Luziferase Assay Kit“, Fa. Clontech) lysiert und anschließend die Proteinextrakte zentrifugiert (10 min; 13000 rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge). Der Überstand wurde direkt für die Bestimmung der Firefly- und Renilla-Luziferase Werte verwendet (nach Angaben des Herstellers, Fa. Clontech). Bei Kotransfektion eines CMV-β-Galaktosidase-Vektors wurden die Zellen in 100 µl Triton-X-100 Extraktionspuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4; 0,2 % Triton-X-100; 1 mM DTT) lysiert, 5-10 min aus Eis inkubiert und anschließend die Proteinextrakte zentrifugiert (10 min; 13000 rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge). Der Überstand wurde direkt für die Bestimmung der Luziferase- und β-Galaktosidaseaktivität verwendet.

b) In Experimenten, in denen die Proteinextrakte ausschließlich in Protein-Immunblot- oder Gelretardations-Analysen eingesetzt wurden, erfolgte der Zellaufschluss in einem dreifachen Volumen DigC-Puffer (Dignam-C-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,9; 0,42 M NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 25 % (v/v) Glycerol; 1 mM DTT; 1 mM PMSF und Proteaseinhibitormischung, nach Angabe des Herstellers). Nach dreimaligem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff mit anschließendem Auftauen auf Eis wurden die Extrakte zentrifugiert (10 min; 13000 rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde nach der Bradford-Methode (wie beschrieben bei Maniatis et al., 1989, „Molecular Cloning. A laboratory manual“) bestimmt und die Proteinextrakte entweder direkt für Protein-Immunblot- oder Gelretardations-Analysen verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

## 4.11 Analyse von Proteinen

### 4.11.1 Protein-Immunblot

Beim Protein-Immunblot werden Proteine zunächst durch ein SDS-Polyacrylamidgel ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt, dann auf eine Membran übertragen und immobilisiert, auf welcher es möglich ist, durch spezifische Antikörper die zu untersuchenden Proteinen nachzuweisen.

Proteinextrakte wurden in 2xLaemmli-Puffer (12,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8; 10 ml 20 % SDS; 11,25 ml Glycerin; 0,01 % Bromphenolblau; 1-2 % β-Mercaptoethanol; ad 50 ml H<sub>2</sub>O) aufgekocht (15 min; 96°C), parallel zu einem Größenstandard („low range“; Fa. BIO RAD) über ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und danach auf eine PVDF-Membran (Fa. Millipore), die zuvor nach den Angaben des Herstellers aktiviert wurde, transferiert. Der Transfer erfolgte in einer „Semidry“-Apparatur (Fa. BIORAD) nach den Angaben des Herstellers. Nach dem Transfer erfolgte für 1 h bei RT die Behandlung der Membran mit Blockmilch (1xPBS; 7.5 % Magermilchpulver; 0,5 % Tween-20) und anschließend die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blockmilch (1-2 h; RT; Horizontalschüttler) in geeigneter Verdünnung (1:750 - 1:1000). Die verwendeten Antikörper und

## Methoden und Material

---

Verdünnungen sind in Kapitel 4.14.5 angegeben. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal 15 min in Waschpuffer (1xPBS; 0,5 % Tween-20) geschüttelt und anschließend der Peroxidasegekoppelte, zweite Antikörper (Fa. Sigma) in Blockmilch (Verdünnung 1:5000) zugegeben. Nach der Inkubation für 30-60 min auf dem Horizontalschüttler wurde die Membran dreimal 15 min gewaschen (siehe oben), nach den Angaben der Hersteller entwickelt („ECL-System“ Fa. Amersham) und auf einen Röntgenfilm exponiert.

### 4.11.2 Gelretardations-Analysen

Gelretardations-Analysen dienen dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Dazu wird eine radioaktiv markierte Sonde, die ein bestimmtes Bindungsmotiv (hier Oktamer-Motiv) aufweist, mit einem Proteinextrakt inkubiert. Anschließend werden die Protein-DNA-Komplexe in einem Gel von der ungebundenen DNA getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Sonden für die Gelretardations-Analysen wurden durch die Hybridisierung zweier passender Oligonukleotide hergestellt, die Markierung der Proben wurde beschrieben (4.6.2).

Pipettierschema für die Bindungsreaktion:

2	µl	5 x Bindungspuffer (100 mM Hepes, 250 mM KCl, 5 mM EDTA, 20 % Ficoll)
1,5	µl	Poly(dIdC) (2 mg/ml)
1	µl	Fettsäurefreies BSA (10 mg/ml)
1-5	µl	Proteinextrakt
0,5-1	µl	<sup>32</sup> P-DNA-Fragment (30000-60000 cpm/µl)
Ad 20	µl	H <sub>2</sub> O

Alle Komponenten werden bei RT gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Im Fall eines Supershift-Experimentes wird der Proteinextrakt zunächst nur mit dem entsprechenden Antikörper (in 1xBindungspuffer verdünnt) für 10 min bei RT vorinkubiert, danach die restlichen Komponenten zugegeben. Die gebildeten Komplexe werden über ein natives Acrylamid-Gel (4 %; 0,5xTBE; Laufpuffer: 0,5x TBE) aufgetrennt. Der Gelvorlauf erfolgt 1 h bei 140 V, der anschließende Gellauf dauert 2,5 bis 3 h. Das Gel wird danach für 1 h getrocknet (80°C, Vakuumtrockner) und auf einem Röntgenfilm exponiert.

## 4.12 Zellkulturtechniken

### 4.12.1 Zentrifugation von Zellen

Die Zentrifugationsschritte wurden, falls nicht anders vermerkt, in einer Heraeus-Zentrifuge bei 900-1000 rpm für 5 min durchgeführt.

### 4.12.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zunächst wurde ein Deckglas angebracht und dann ein Tropfen einer Zellsuspension seitlich zugegeben. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl in einem großen Quadrat bestimmt, die mit  $1 \times 10^4$  multipliziert die Zellzahl/ml

ergab. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension vor dem Zählen mit Trypanblau angefärbt. Nach ca. 30 sec waren die toten Zellen blau angefärbt und wurden bei der Zellzahlbestimmung nicht berücksichtigt.

### 4.12.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden pelletiert und  $0,1 \times 10^7$ - $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml gekühltem Einfriermedium (90 % FCS; 10 % DMSO) suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,8 ml Kryogefäße (Fa. Greiner) überführt und in einer Styroporbox bei  $-70^\circ\text{C}$  langsam eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfriereröhrchen in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) mit 10 ml eiskaltem Medium überführt und zentrifugiert (5 min; 900 rpm; Heraeus-Zentrifuge). Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen ausgesät.

### 4.12.4 Kultivieren von transformierten Zelllinien

Alle Arbeiten wurden unter Laminarluftfluss mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren oder mit sterilen Kunststoffmaterialien und Nährmedien durchgeführt. Die adhärent-wachsenden Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz 1:10 gesplittet. Dazu wurden die Zellen durch 1-5 min Behandlung mit einer 0,5 % Trypsin-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und nach Suspendierung in frischem Medium wieder ausplattiert. Suspensionszellen wurden ca. alle 2 bis 4 Tage passagiert. Die verwendeten Zellen wurden in verschiedenen Medien mit 2-10 % fötalem Kälberserum (PAN Systems), Penicillin/Streptomycin (Fa. GibcoBRL.), L-Glutamin (Fa. GibcoBRL.) und  $50 \mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (Fa. Sigma) bei  $37^\circ\text{C}$  und 5-10 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Bob.1/OBF.1 defizienten Abelsonvirus-transformierten präB-Zelllinien MB10 und MG5 sowie die daraus abgeleiteten stabilen Zelllinien MB10-K10, -K15 und -mock wurden in IMDM (Iscoves modifiziertes Dulbeccos-Medium) mit 10 % FCS bei 10 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die HL-Zelllinien („hodgkin lymphome“-Zelllinien) KM-H2, L1236, L428, daraus abgeleitete stabile Zelllinien ,sowie die humanen B-Zelllinien Namalwa, BJA-B, Raji, Jok-1, DG-75 und Ramos wurden in RPMI-Medium (Fa. GibcoBRL) mit 10 % FCS und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Alle weiteren verwendeten Zelllinien (Maus-B-Zelllinie PD31, WEHI, S194, S107; Fibroblastenzelllinie NIH/3T3; Cervixkarzinomzelllinie HeLa; Phoenix Virus-produzierende Zelllinie) wurden in DMEM-Medium (Fa. GibcoBRL) mit 10 % FCS in 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Um die Zellen zu stimulieren, wurden verschiedene Reagenzien in folgenden Endkonzentrationen verwendet: Hydroxytamoxifen (gelöst in Ethanol) 200 nM, LPS (gelöst in Wasser) 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 4.12.5 Herstellung und Kultivierung von primären präB-Zellen

#### 4.12.5.1 Gewinnung von IL-7-haltigem Kulturüberstand

J558-Zellen (Dr. A. Rolink; Basel) mit einer stabil integrierten IL-7-cDNA wurden in SF-Medium (176,6g IMDM-Pulver, Fa. GibcoBRL; 30,24g Natriumhydrogencarbonat; 100ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren, Fa. GibcoBRL; 10 ml 5 mg/ml Insulinlösung, Fa. Sigma; 30ml Primaton, Dr. A. Rolink, Basel; gelöst in 10 l Wasser), das mit 2 % FCS, 1xPenicillin/Streptomycin und 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol supplementiert wurde, kultiviert und alle drei Tage passagiert. Der Überstand wurde nach fünftägiger Kultur ohne Passage geerntet, filtriert (0,2  $\mu$ m Filter; Fa. Millipore) und bei -20°C gelagert. Für die Kultur von primären präB-Zellen wurden 2 % dieses Überstandes eingesetzt, was ca. 10000-25000 U/ml entspricht.

#### 4.12.5.2 Kultivieren der ST2-Stromazellen

Die Stromazelllinie ST2 wurde mit SF-Medium (siehe 4.12.5.1) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Fa. Renner oder Fa. Greiner) kultiviert (37°C; 10 % CO<sub>2</sub>) und alle drei Tage passagiert. ST2-Zellen, die als „feeder“-Zellen für die primären präB-Zellen eingesetzt wurden, wurden durch  $\gamma$ -Bestrahlung (3000 rad) in ihrem Wachstum gehemmt und 60-70 % konfluent verwendet.

#### 4.12.5.3 Etablierung und Kultivierung von primären präB-Zellen

Fötale Lebern von 15-17 Tage alten Embryonen wurden isoliert und in SF-Medium (siehe 4.12.5.1) mit 2 % IL-7-Überstand überführt. Einzelzell-Suspensionen wurden durch ein Zerstreichen der fötalen Leber über ein Stück sterile Mullbinde hergestellt und die Zellzahl der Suspension bestimmt.  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  Zellen wurden in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Fa. Renner oder Fa. Greiner) mit bestrahlten ST2-Stromazellen überführt und nach 5-7 Tagen waren die ersten präB-Zellkolonien unter dem Mikroskop sichtbar. Das Kultivieren der primären präB-Zellen erfolgte auf bestrahlten ST2-Stromazellen nach dem folgenden Schema:

Zellkulturflasche: Zellzahl: SF-Medium + 2 % IL-7:

25 cm<sup>2</sup>            1 x 10<sup>6</sup>            7 ml

75 cm<sup>2</sup>            3 x 10<sup>6</sup>            20 ml

Nach dreitägiger Kultur in IL-7-haltigem SF-Medium erhöhte sich die Zellzahl um den Faktor 10-20 und die primären präB-Zellen wurden erneut passagiert. Das Ablösen der primären präB-Zellen erfolgte durch vorsichtiges Klopfen. Die primären präB-Zelllinien Bcl5 und Bcl7, präB<sup>WT</sup>, präB-BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>, präB-Oct2<sup>-/-</sup> wurden nach diesem Schema kultiviert.

## 4.13 Transfektionen und Infektion von Zelllinien

### 4.13.1 DEAE-Dextran-Transfektion von MB10-präB-Zelllinien

Die DNA für die Transfektion wurde durch Ethanolpräzipitation gefällt und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml TS-Puffer (1 ml

## Methoden und Material

---

Magnesiumchlorid/Kalziumchlorid-Lösung (10 mg/ml); 99 ml 1xTD pH 7,4 (4 g Natriumchlorid; 0,19 g Kaliumchlorid; 50 µg Di-Natriumhydrogenphosphat; 1,5 g Tris; ad. 500ml Wasser)) gelöst. Der DNA-Lösung wurden 75 µl DEAE-Dextran (10 mg/ml) zugegeben, vorsichtig gemischt und inkubiert (15 min; RT). In dieser Zeit wurden die Zellen pelletiert und einmal mit TS-Puffer gewaschen (5 min; 13000 rpm; Heraeus-Zentrifuge). Das Zellpellet wurde in 1 ml TS-Puffer aufgenommen und zum DNA/TS/DEAE-Gemisch zugegeben und inkubiert (30 min; RT). Während der Inkubation wurde das Röhrchen mehrmals durch leichtes Klopfen durchmischt, um das Verklumpen von Zellen und DEAE-Dextran zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min; 900 rpm; Heraeus-Zentrifuge), in 10 ml DMEM-Medium aufgenommen und kultiviert (37°C; 5 % CO<sub>2</sub>). Nach 16-20 h wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt.

### 4.13.2 Kalziumphosphat-Transfektion von NIH/3T3-Zellen

Die DNA wurde, wie in Kapitel 4.16.1 beschrieben, vorbereitet und danach in 225 µl Wasser gelöst. Zu der DNA-Lösung wurden zunächst 250 µl 2xHBS pH 7,04 (280 mM Natriumchlorid; 1,5 mM Natriumhydrogenphosphat; 12 mM Glukose; 50 mM Hepes) und anschließend langsam 25 µl 2,5 M Kalziumchlorid unter ständigem Schütteln zugegeben. Die Lösung wurde für 20 min bei RT inkubiert, wobei sich Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitate ausbildeten, die eine Trübung der Lösung verursachten. In dieser Zeit wurden die Zellen für die Transfektion vorbereitet, wobei für einen Transfektionsansatz eine ca. 60-70 % konfluente Gewebekulturschale (94 mm; Fa. Greiner) mit Fibroblasten verwendet wurde. Von den Zellen wurde das Medium abgesaugt, anschließend das Kopräzipitat direkt auf die Zellen gegeben und 10-20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 10ml frisches DMEM-Medium (siehe 4.14.3) zugegeben und die Zellen weiter kultiviert (37°C; 5 % CO<sub>2</sub>). Nach 16-20 h wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt.

### 4.13.3 Elektroporation verschiedener B-Zelllinien

Zur transienten Transfektion verschiedener Zelllinien, die als Suspensionszellkultur wachsen (alle HRS-Zelllinien, alle humanen B-Zelllinien sowie die Maus-B-Zelllinien PD31 und S194), wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml Zellkulturmedium ausplattiert. Zur Transfektion wurden  $10^7$  Zellen pro Transfektionsansatz pelletiert und in 270 µl Zellkulturmedium resuspendiert. Die zu transfizierende DNA (10-20 µg) wurde, in 30 µl Wasser gelöst zu den Zellen gegeben, gemischt und in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette überführt und mit einem Biorad Genepulser elektroporiert (240 V, 950 µF). Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und auf Gewebekulturschalen ausplattiert und weiterkultiviert. Nach 20 h wurden das Medium gewechselt und die Zellen wurden für 1-2 Wochen mit Puromycin (2 µg/ml) selektioniert. Am Tag vor einer Infektion wurden die Phoenix-Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Schale in 7 ml Medium ausgesät.

### 4.13.4 Stabile Transfektion von Phoenix-Zellen

Die Phoenix-Zellen wurden mit der Kalziumphosphat Methode (siehe 4.13.2) transfiziert. Fünf Minuten vor Zugabe des Präzipitats zu den Zellen werden die Zellen mit 25 µM Chloroquin behandelt, um die DNA-Aufnahme zu erhöhen. 24 h nach der Transfektion wird das Medium gewechselt gegen ein Selektionsmedium mit 2 µg/ml Puromycin, worin die Zellen 1-2 Wochen selektioniert wurden.

### 4.13.5 Infektion von B-Zelllinien

Am Tag vor einer Infektion wurden die stabil transfizierten Phoenix-Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Schale in 7 ml Medium ausgesät. Am Tag der Infektion wurde das Medium (=viraler Überstand) von den Phoenix-Zellen abgenommen, durch einen 0,45 µm Sterilfilter (Fa. Schleicher & Schüll) filtriert und mit 5 µg/ml Polybrene versetzt.  $10^5$  der zu infizierenden Zellen (z. B. MB10 BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup>-präB-Zellen) werden pelletiert (5 min; 900 rpm; Heraeus-Zentrifuge), in 5 ml des Virusüberstandes resuspendiert und 3 h bei 1500 rpm zentrifugiert (25-30°C). Danach werden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und weiter kultiviert. Am Tag 3 nach der Infektion wird das Medium der Zellen gegen ein Selektionsmedium (z. B. 2 µg/ml Puromycin für MB10-Zellen mit dem BobERPuro-Vektor infiziert) ersetzt.

### 4.13.6 Etablierung stabiler Zelllinien

Zur Etablierung von stabilen Zelllinien wurden die Zellen, wie beschrieben, mit einem Expressionsvektor transfiziert (Elektroporation, HRS-Zelllinien) oder infiziert (MB10-Zelllinie), der das zu exprimierende Gen und zusätzlich ein Gen zur Vermittlung von Puromycin-Resistenz enthält. Gegebenenfalls wurde ein zusätzlicher Expressionsvektor mit dem Puromycingen in einem Verhältnis von 1:20 kotransfiziert. 24 h nach der Elektroporation bzw. Infektion wurde Puromycin in für die verschiedenen Zelllinien variierenden Konzentrationen zugegeben (5 µg/ml Zellkulturmedium für HRS-Zelllinien, 2 µg für die MB10-Zelllinie). Zur Etablierung von Einzelklonen wurden die HRS-Zelllinien in verschiedenen Verdünnungen in 96 Loch Mikrotiterplatten ausplattiert und nach circa 3-4 Wochen als Einzelklone weiterkultiviert. Zur Etablierung von Einzelklonen aus den infizierten MB10-Zellen wurden diese in verschiedenen Verdünnungen in Medium + 2 % LMP Agarose („low melting point“-Agarose, Fa. GibcoBRL) + Puromycin eingebettet und nach 2-3 Wochen Einzelklone gepickt. Nach der Etablierung von Einzelklonen wurden die Zellen mittels Northernblot und Protein-Immunblot Analyse auf die Expression der stabil integrierten cDNAs untersucht.

### 4.13.7 Messung der Luziferase- und β-Galaktosidaseaktivität

*Messung der β-Galaktosidaseaktivität.* Für den Abgleich von transienten Transfektionen wurden zu den Ansätzen 100-200 ng DNA eines Expressionsvektors für β-Galaktosidase zugegeben. Ein künstliches Substrat der β-Galaktosidase ist ONPG (Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktosidase), bei dessen Spaltung eine Gelbfärbung nachgewiesen werden kann. 10-20 µl der Proteinextrakte (siehe 4.10.2a) aus transienten Transfektionen wurden mit 500 µl Reaktionspuffer (100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4; 10 mM Kaliumchlorid; 1 mM Magnesiumsulfat; 35 µl/10ml β-

## Methoden und Material

---

Mercaptoethanol) und 100 µl ONPG (4 mg/ml) gemischt und solange bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung sichtbar wurde. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl 1 M Natriumcarbonat gestoppt und die Absorption bei 420 nm im Photometer gemessen.

*Messung der Luziferaseaktivität.* Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte durch Bestimmung der Lichteinheiten, die bei der Umsetzung des Substrates Luziferin unter ATP-Verbrauch entstanden. 5-10 µl des Proteinextraktes (siehe 4.10.2a) wurden mit 25-100 µl Reaktionsmix (Angesetzt nach den Angaben des Herstellers; Fa. Boehringer Mannheim) gemischt und die Luziferaseaktivität für 10 sec gemessen (Biolumat; Fa. Berthold), wurde zum Abgleich pRL-TK kotransfiziert, so wurde die Reaktion mit ReaktionsmixA durchgeführt, dann wie beschrieben die Firefly-Luziferaseaktivität gemessen und in dieselbe Reaktion wurden 25-100 µl ReaktionsmixB zugegeben um die Renilla-Luziferaseaktivität zu messen (nach Angaben des Herstellers, Fa. Clontech). Zusätzlich wurde die Hintergrundaktivität des Reaktionsmixes ohne Proteinextrakt bestimmt und die absolute Luziferaseaktivität unter Berücksichtigung der Hintergrundaktivität berechnet. Die relative Luziferaseaktivität (in den Ergebnissen/Abbildungen als Stimulation bezeichnet) wurde berechnet als absolute Firefly-Luziferaseaktivität/ $\beta$ -Galaktosidaseaktivität oder absolute Firefly-Luziferaseaktivität/Renilla-Luziferaseaktivität.

### 4.14 Allgemein verwendete Materialien

#### 4.14.1 Chemikalien

APS	Guanidiniumthiocyanat	Natriumdodecylsulfat
Bromphenolblau	Hepes	Natriumhydrogencarbonat
Butanol	Isopropanol	Natrium-di-hydrogenphosphat
Cäsiumchlorid	Kaliumacetat	Di-Natriumhydrogenphosphat
Chloroform	Kaliumchlorid	Natriumhydroxid
Diethanolamin	Kalium-di-hydrogenphosphat	Natriumlauroylsarcosine
DMSO	Di-Kaliumhydrogenphosphat	Nonidet P40
DOC	Kalziumchlorid	Paraformaldehyd
DTT	Magnesiumchlorid	Phenol
EDTA	Magnesiumsulfat	Phosphorsäure
Essigsäure	$\beta$ -Mercaptoethanol	PMSF
Ethanol	Methanol	Salzsäure
Ethidiumbromid	MOPS	TEMED
Formaldehyd	Natriumacetat	Tris-Base
Formamid	Natriumazid	Triton-X-100
Glycerin	Natriumchlorid	Tween-20
Glycin	Natriumcitrat	Xylencyanol

## Methoden und Material

---

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Fa. Merck; Fa. Roth; Fa. Boehringer Mannheim; Fa. BIORAD; Fa. GibcoBRL; Fa. Pharmacia; Fa. Riedel de Haen; Fa. Serva; Fa. Sigma; Fa. Applichem; Fa. Fluka

### 4.14.2 Puffer und Lösungen

DNA-Farbmarker	15 %	Glycerin
	10 %	Ficoll
	40 mM	EDTA
	0,2 %	Xylencyanol
	0,2 %	Bromphenolblau
20xMOPS	0,4 M	MOPS
	100 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
10xPBS pH 7,2	87,65 g	Natriumchlorid
	2 g	Kaliumchlorid
	11,7 g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	2,4 g	Natrium-di-hydrogenphosphat
	ad. 1 l	H <sub>2</sub> O
1 M Phosphatpuffer	85 g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	4 ml	85 % ortho-Phosphorsäure
	ad. 1 l	H <sub>2</sub> O
20xSSC	3 M	Natriumchlorid
	0,3 M	Natriumcitrat
50xTAE	242 g	Tris-Base
	57,2 ml	Essigsäure
	37 g	EDTA
	ad. 1 l	H <sub>2</sub> O
10xTBE	1 M	Tris-Base
	1 M	Borsäure
	20 mM	EDTA pH 8,0
1xTE	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA pH 8,0

### 4.14.3 Medium für Bakterien- und Zellkultur

LB-Medium	10 g	Trypton	Fa. Difco
	5 g	Hefeextrakt	Fa. Difco
	10 g	Natriumchlorid	
	ad. 1 l	H <sub>2</sub> O	
LB-Platten	LB-Medium + 1,5 % Bacto-Agar, Fa. Difco		

## Methoden und Material

---

DMEM	Fa. GibcoBRL
IMDM-Pulver	Fa. GibcoBRL
100x nicht-essentielle Aminosäuren	Fa. GibcoBRL
10x Penicillin/Streptomycin	Fa. GibcoBRL
Trypsin/EDTA	Fa. GibcoBRL
Kälberserum	Fa. PAN
Insulin	Fa. Sigma
Primaton	Fa. Quest International

Alle Medien und Komponenten für die Zellkultur wurden, falls nicht anders angegeben, von der Fa. GibcoBRL verwendet.

### 4.14.4 Reagenzien

1kb-DNA-ladder	Fa. GibcoBRL
<sup>32</sup> P-markierte Nukleotide dCTP	Fa. Amersham
Acrylamid/Methyl-Bisacrylamid (37,5:1)	Fa. Applichem
Agarose	Fa. GibcoBRL
Ampicillin	Fa. Applichem
BSA	Fa. Boehringer Mannheim
Chloroquin	Fa. Sigma
Concanavalin A	Fa. Sigma
Coomasie Brilliant Blue G250	Fa. Serva
DEAE-Dextran	Fa. Sigma
DEPC	Fa. Sigma
Desoxyribonukleotide	Fa. Roth
Ficoll 400	Fa. Pharmacia
Glukose	Fa. Applichem
Hydroxytamoxifen	Fa. Biotrend Chemikalien GmbH
Kanamycin	Fa. Sigma
Lipopolysaccharide	Fa. Sigma
Lympholyte-M	Fa. Cedarlane
Magermilchpulver	Fa. Töpfer
Oligo-dT-Zellulose	Fa. Stratagene
Prestained Protein Marker	Fa. Sigma
Proteinase Inhibitoren „complete mini“	Fa. Roche Biochemicals
Puromycin	Fa. Sigma
Tetrazyklin	Fa. Sigma
Trypanblau	Fa. Boehringer Mannheim

## Methoden und Material

---

### 4.14.5 Antikörper für Protein-Immunblot und Gelretardations-Supershift

Kaninchen-anti-Oct1	Im Labor vorhanden
Maus-anti-Oct2	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Maus-anti-RelB	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen-anti-BOB.11/OBF.1	Pfisterer et al., 1996
Peroxidase- gekoppelter Esel-anti-Kaninchen	Fa. Dianova
Peroxidase- gekoppelter Ziege-anti-Maus	Fa. Dianova

### 4.14.6 Enzyme

Die Reaktionsbedingungen wurden nach den Angaben der jeweiligen Enzymhersteller gewählt.

Restriktionsendonukleasen	Fa. Biolabs; Fa. Amersham und Fa. Boehringer Mannheim
Klenow-Polymerase	Fa. Biolabs
T4-DNA-Ligase	Fa. Amersham
CIP	Fa. Boehringer Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Fa. GeneCraft und Fa. Pharmacia
Proteinase K	Fa. Sigma
RNase A	Fa. Sigma
Mung Bean Nuklease	Fa. GibcoBRL

### 4.14.7 Gebrauchsfertige Kits

ECL-System	Fa. Amersham
Dual-Luziferase-Detektions-Kit	Fa. Promega
Prime it II	Fa. Stratagene
5'-RACE System	Fa. GibcoBRL
rediprime II	Fa. Amersham
RT-PCR Kit	Fa. GibcoBRL
cDNA-Synthese Kit	Fa. Boehringer Mannheim

### 4.14.8 Primer

*Primer für das cDNA-RDA-Protokoll:*

J-Bgl-12	GATCTGTTTCATG
J-Bgl-24	ACCGACGTCGACTATCCATGAACA
N-Bgl-12	GATCTTCCCTCG
N-Bgl-24	AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA
R-Bgl-12	GATCTGCGGTGA
R-Bgl-24	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA

## Methoden und Material

### *Primer für das 5'-RACE-Protokoll:*

myGSP.1	CCATTGGCATCCTCCT	Herstellung von Doppelstrang cDNA (bp 314-329 MLC1A)
myGSP.2	TCCACCTCTGCCTCGCT	Amplifikation des 5'-RACE-Produkts
myGSP.3	CCGCAGCCCCTCCACGAAG	Amplifikation des 5'-RACE-Produkts

### *Primer für RT-PCRs*

MLC1A-3.1	GCCAGAACCCCACCAACGCAGAG	Primer für die MLC1A RT-PCR Analyse und zur Isolierung einer MLC1A DNA-Probe für Hybridisierung
MLC1A-5.1	TGCTCCACCTCTGCCTCGCTCATC	
MLC1A-5.2	CCCACCTCCACTGGAGAGCC	Primer für die MLC1A RT-PCR Analyse
MLC1A-5.3	CCTCTGTGGGGGCTCCTACCC	Primer für die MLC1A RT-PCR Analyse
MLC1A-5.4	CGAGCCACCTCTCCTCCTTTGG	Primer für die MLC1A RT-PCR Analyse
MLC1A-5.5	CCCACCCCTCTCTGGGTTTCC	Primer für die MLC1A RT-PCR Analyse
β-Aktin-5'	GGTCAGAAGGACTCCTATGTG	Primer für die β-Aktin RT-PCR Analyse
β-Aktin -3'	AGAGCAACATAGCACAGCTTC	Primer für die β-Aktin RT-PCR Analyse
J558-5'	TCCTCCTGTCAGTAACTGCAG	Primer für die J558 RT-PCR Analyse
J558-3'	ATGATGGCAGTGCTGGAGGAT	Primer für die J558 RT-PCR Analyse
C7-3'	GCTTCTTCTGCACAGGGCTTTATG	Primer zur Isolierung einer C7-DNA-Probe für Northern Hybridisierung
C7-5'	CTTGATGTATGTGCCCGAGATG	
Creg-5'	CCAGCAACCACATCTTCTGACG	Primer zur Isolierung einer Creg DNA-Probe für Northern Hybridisierung
Creg-3'	GCAGGATATGGTGGACTGAGTC	
CRISP-1-5'	GGCTTATCACATCCCACCAAG	Primer zur Isolierung einer CRISP-1 DNA-Probe für Northern Hybridisierung
CRISP-1-3'	GATTATGATGAATTTGAAGAATAA GGA	
Ahd2like-5'	TCTCAGCAGTGGCTCCACATC	Primer zur Isolierung einer Ahd2like DNA-Probe für Northern Hybridisierung
Ahd2like-3'	ACCCCGAGGAATAGAGCAGC	
Thymosinβ-5'	GGCAGACAAGCCGGACATGG	Primer zur Isolierung einer Thymosin-β DNA-Probe für Northern Hybridisierung
Thymosinβ-3'	GGGCAAACCGGTGAAATCTGG	
RBP1-5'	CGAGGAGTACCTGCGCGCG	Primer zur Isolierung einer RBP1 DNA-Probe für Northern Hybridisierung
RBP1-3'	GCAGATCACACCCTCAGCTCTC	
Id3-5'	CCCGGTCGTCCTGGCACC	Primer zur Isolierung einer Id3 DNA-Probe für Northern Hybridisierung
Id3-3'	GCAGAGTGCGCAGGGCAGC	

### *Primer für Oktamer-Gelretardations-Analyse*

EMSA-ED1	AGAGCTGAGCAAAAACACCACCT GGGTAATTTGCATTTCTAAAATA AGTCGA	Primer1 zur Herstellung (Hybridisierung mit Primer EMSA-ED2) einer Gelretardations-Probe (Sequenz Annweiler et al., 1994)
----------	--	---

## Methoden und Material

EMSA-ED2	AGAGTCGACTTATTTTAGAAATG CAAATTACCCAGGTGGTGTTTTG CTCAG	Primer2 zur Herstellung (Hybridisierung mit Primer EMSA-ED1) einer Gelretardations-Probe (Sequenz Annweiler et al., 1994)
----------	---	---

### 4.14.9 Vektoren und Plasmide

Aus dem Labor Prof. T. Wirth (Ulm) wurden die Vektoren pBS-Bob.1ORF, pBS-Bob.1, pCMV-Bob.1, pCMV-Oct2, pGAPDH, p- $\beta$ -Actin, p $\mu$ , pTATA.Luc, pTK.Luc, ED.TATA, Ed.TATA, 4xoct und 4xmut bereitgestellt, welche zum Teil bereits beschrieben wurden (Pfisterer et al., 1995, Pfisterer et al., 1996, Annweiler et al., 1992b). Zur Klonierung eines BOB.1/OBF.1-Östrogenrezeptor-Fusionsproteins wurde der pBS-Bob.1ORF-Vektor verwendet, welcher eine BOB.1/OBF.1-cDNA enthält, die das gesamte Gen kodiert und ein offenes Leseraster mit einer zusätzlich eingefügten BamHI-Restriktionsseite enthält. Der pBSBobER-Vektor wurde kloniert, indem ein Östrogenrezeptor (ER=„estrogen receptor“) Fragment (EcoRI/BamHI) aus dem pBJ4-omega-Vektor (zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kerkhoff; Kerkhoff and Rapp, 1997; Littlewood et al., 1995) im Leseraster in den pBSBob.1ORF-Vektor (XbaI/BamHI) kloniert wurde. Die retroviralen Expressionsvektoren pSFG-BobER und pBabePuro-BobER wurden kloniert, indem ein XhoI/EcoRI BobER Fragment aus dem pBSBobER-Vektor in die pSFG-Vektor (Bueler and Mulligan, 1996) bzw. pBabePuro-Vektor (Morgenstern and Land, 1990) kloniert wurde, die jeweils mit NcoI/BamHI oder SnaBI linearisiert wurden. Die pSFG-Bob.1- und pBabePuro-Bob.1-Expressionsvektoren wurde kloniert aus einem XhoI/BamHI-Fragment aus einer vollständigen Bob.1/OBF.1-cDNA aus dem pBS-Bob.1-Vektor, welches in den NcoI/BamHI linearisierten pSFG-Vektor bzw. in den SnaBI linearisierten pBabePuro-Vektor eingefügt wurde. Die T1.Luc- und T1M.Luc-Vektoren wurden kloniert, indem ein PvuII/SalI  $\kappa$ T1-Promotor-Fragment aus entweder dem T1 $\kappa$ -CAT bzw. dem T1 $\kappa$ -OCTA-Vektoren (zur Verfügung gestellt von Dr. K. Scheidereit, Pelletier et al., 1997) in den mit HindIII/XhoI linearisierten pTATA-Luc-Vektor kloniert wurden. Die  $\mu$ ET1-Luc- und  $\mu$ ET1M-Luc-Vektoren wurden kloniert, indem zusätzlich ein 1 kb großes XbaI  $\mu$ Enhancer-Fragment aus dem p $\mu$ -Vektor in die SmaI linearisierten T1-Luc und T1M-Luc-Vektoren eingefügt wurde. Ein Rbp1-Promotor-Luziferasevektor wurde kloniert indem, aus dem pCAT-Rbp-Promotor-Vektor (Smith et al., 1991) ein -3000bp Rbp1-Promotor-Fragment in den pTATA-Vektor kloniert wurde.

### 4.14.10 Biologische Materialien

Bakterienstamm E. coli: DH5 $\alpha$

#### Zelllinien:

NIH/3T3	Maus-Fibroblastenzelllinie
10T	Maus-Fibroblastenzelllinie
293T	humane embryonale Nierenepithelzelllinie
HeLa	humane Cervixkarzinomzelllinie
C2C12	Maus-Skelettmuskelzelllinie

## Methoden und Material

---

ST-2	Maus-Stromazelllinie aus dem Knochenmark (etabliert im Labor von Dr. A. Rolink, Basel)
Phoenix-ampho	293T-Zellen, die stabil die Verpackungsplasmide gag und env exprimieren
S107	Maus-Plasmazytomazelllinie
S194	Maus-Plasmazytomazelllinie
WEHI	reife Maus-B-Zelllinie
EML	lymphoide Maus-Vorläuferzelllinie
BW5147	Maus-T-Zell-Lymphomazelllinien
EL4	Maus-T-Zell-Lymphomazelllinien
70Z/3	Maus-präB-Lymphomazelllinie
PD31	Abelsonvirus-transformierte präB-Zelllinie
MB10, MG5	Abelsonvirus-transformierte BOB.1/OBF.1 <sup>-/-</sup> -präB-Zelllinien
MB10-K3	Einzelklon stabil pBabePuro-BobER infizierter MB10-Zellen
MB10-K10	Einzelklon stabil pBabePuro-BobER infizierter MB10-Zellen
MB10-K15	Einzelklon stabil pBabePuro-BobER infizierter MB10-Zellen
MB10-mock	Einzelklon stabil pBabePuro-Leervektor infizierter MB10-Zellen
abl1.1	Abelsonvirus-transformierte Oct2 <sup>-/-</sup> -präB-Zelllinien
B10	Abelsonvirus-transformierte Oct2 <sup>-/-</sup> -präB-Zelllinien, Oct2ER stabil
präB-wt	IL-7- und Stromazell-abhängige primäre präB-Zellen
präB-BOB.1 <sup>-/-</sup>	IL-7- und Stromazell-abhängige primäre BOB.1/OBF.1 <sup>-/-</sup> -präB-Zellen
präB-Oct2 <sup>-/-</sup>	IL-7- und Stromazell-abhängige primäre Oct2 <sup>-/-</sup> -präB-Zellen
Namalwa	humane Burkitt-Lymphoma-B-Zelllinie
BJA-B	humane Burkitt-Lymphoma-B-Zelllinie
Raji	humane Burkitt-Lymphoma-B-Zelllinie
Ramos	humane Burkitt-Lymphoma-B-Zelllinie
Jok-1	humane Burkitt-Lymphoma-B-Zelllinie
DG-75	humane Burkitt-Lymphoma-B-Zelllinie
KM-H2	Hodgkin-Reed-Sternberg-Lymphomazelllinie
L428	Hodgkin-Reed-Sternberg-Lymphomazelllinie
L1236	Hodgkin-Reed-Sternberg-Lymphomazelllinie
KM-H2mock	Einzelklon stabil mit pBabePuro-Leervektor infizierter KM-H2-Zellen
L428mock	Zellmassenkultur stabil mit pBabePuro-Leervektor infizierter L428-Zellen
L428-Bob	Zellmassenkultur stabil pBabePuro-Bob.1 infizierter L428-Zellen
KM-H2-Bob*1-4	Einzelklone Nr. 1-4 stabil pBabePuro-Bob.1 infizierter KM-H2-Zellen

## Methoden und Material

---

KM-H2-BobER\*1-3 Einzelklone Nr. 1-3 stabil pBabePuro-BobER  
infizierter KM-H2-Zellen  
L428-BobER Einzelklon stabil pBabePuro-BobER infizierter L428-Zellen

### *Mäuse:*

BOB.1/OBF.1<sup>-/-</sup> BOB.1/OBF.1-defiziente Mauslinie (Nielsen et al., 1996)  
C57Bl/6 Wildtypische Mauslinie

### **4.14.11 Verbrauchsmaterialien**

Elektroporationsküvetten (0,1 cm, 0,2 cm und 0,4 cm; Fa. BIORAD)  
Einfrierröhrchen (1.8 ml; Fa. Greiner)  
Eppendorf-Reaktionsgefäß (0,1 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml; Fa. Eppendorf)  
Gewebekulturplatten (6 well; Fa. Greiner)  
Gewebekulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup>; Fa. Renner und Fa. Greiner)  
Gewebekulturschalen (94 mm und 145 mm; Fa. Greiner)  
Plastikpipetten (1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml; Fa. Greiner und Fa. Renner)  
Hybridisierungsröhrchen (Fa. Hybaid)  
Küvetten (Kristallglas; Fa. Hellma)  
Küvetten (Plastik; Fa. Sarstedt)  
Neubauer-Zählkammer (Fa. GLW)  
Petrischalen (94 mm und 145 mm; Fa. Greiner)  
Pipettenspitzen (10 µl; 200µl; 1 ml; Fa. Gilson)  
Polycarbonröhrchen/Quickseals (5 ml; Fa. Beckmann)  
Röntgenfilme (Fa. Kodak und Fa. Fuji)  
Spritzen und Kanülen (Fa. Braun Melsungen)  
SubQ-Spritzen (Fa. Becton Dickinson)  
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml; Fa. Greiner)  
Zentrifugenröhrchen (12,5 ml; Fa. Sarstedt)  
Zentrifugenbecher (250 ml; Fa. Sorvall)

### **4.14.12 Membranen und Filter**

DEAE-Papier (Fa. Sigma)  
Faltenfilter (Fa. Hartenstein)  
Hybond-N (Fa. Amersham)  
3MM Whatman Papier (Fa. Hartenstein)  
push columns (Fa. Stratagene)  
PVDF (Fa. Millipore)  
Sterilfilter (0,22 µm und 0,45 µm; Fa. Millipore)

### 4.14.13 Geräte

Analysenwaagen (Fa. Satorius)  
Bidest-Anlage (Fa. Millipore)  
Brutschränke (Fa. Heraeus)  
Eppendorf-Zentrifuge (Fa. Heraeus)  
Eismaschine (Fa. Scotsman)  
Elektroporator (Fa. BIORAD)  
FACSCalibur (Fa. Becton Dickinson)  
Feinwaage (Fa. Scaltec)  
Filmentwickler (Fa. Kodak)  
Heraeus-Zentrifuge (Fa. Heraeus)  
Horizontalschüttler (Fa. GFL)  
Hybridisierungsöfen (Fa. Hybaid)  
Kühlschränke (Fa. Liebherr; Fa. Kedro)  
Lumat (Fa. Berthold)  
Magnetrührer (Fa. IKA Labortechnik)  
Mikropipetten (P10; P20; P100; P200; P1000; Fa. Gilson)  
Mikroskop (Fa. Leica)  
pH-Meter (Fa. Knick)  
Phosphorimager BAS 2000 (Fa. Fuji)  
Photometer (Fa. Hitachi)  
Schüttelinkubator (Fa. New Brunswick Scientific)  
Semidry-Apparatur (Fa. BIORAD)  
Spannungsgeräte (Fa. Desaga und Fa. BIORAD)  
Vakuumtrockner (Fa. Bachenhofer)  
Spektralphotometer (Fa. Hitachi)  
Sterilbank (Fa. Heraeus)  
Thermocycler (Fa. MWG)  
Überkopfschüttler (Fa. Heidolph)  
Ultra Turrax T25 (Fa. Janke&Kunkel)  
Ultrazentrifuge und VTi65-Rotor (Fa. Beckmann)  
UV-Crosslinker (Fa. Amersham)  
UV-Anlage (Fa. Herolab)  
UV-Videosystem (Fa. Sony)  
Vakuum-Blotter (Fa. Appligene)  
Vortex (Fa. Bender&Hohbein)  
Wasserbad (Fa. GFL)

### 4.14.14 Datenverarbeitung

Für die Auswertung der verschiedenen Messdaten und die Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde ein Power Macintosh G3 Rechner sowie ein Pentium-III PC (Windows 2000) verwendet. Folgende Programme wurden dabei angewandt:

Word 97

Excel 97

Canvas 3.5

Canvas 7.0

Netscape Navigator 3.01

Mozilla 1.5

PDFCreator 0.8.0

Lasergene Navigator

Cricket Graph III

Adobe Photoshop 3.0

Endnote 5.0

## 5. ABKÜRZUNGEN

Nicht aufgeführt werden international gebräuchliche Abkürzungen des SI-Systems.

-/-	defizient		E1A-stimulated genes
μE	intronischer Enhancer des schweren Immunglobulins	CRISP	cysteine-rich secreted protein
Abb.	Abbildung	CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
Ahd	Aldehyd-Dehydrogenase	DEAE	Diethanolaminethan
AP-1	activator protein 1	DEPC	Diethylpyrocarbonat
APS	Ammoniumpersulfat	DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
B4galt1	beta 1,4 galactosyltransferase	DNA	desoxy ribonucleic acid
BAFF	B cell activating factor	DP	difference product
BAFFR	BAFF receptor	DTT	Dithiothreitol
Bcl	B cell lymphoma	E.coli	Escherichia coli
BCMA	B cell maturation factor	EBF	early B cell factor
BCR	B cell receptor	EBV	Epstein-Barr Virus
BLC	B lymphocyte chemoattractant	ECL	enhanced chemoluminescence
BLR1	Burkitt's lymphoma receptor 1	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BOB.1	B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors	ER	estrogen receptor
BobER	BOB.1/OBF.1 + estrogen receptor hormone binding domain	EST	expressed sequence tag
bp	Basenpaare	EtBr	Ethidiumbromid
BSA	bovine serum albumin	Fa.	Firma
BSAP	B cell specific activator protein	FACS	Fluorescence associated cell sorting
BTC	basal transcription complex	FCS	fetal calf serum
BTK	Brutons Tyrosinkinase	GATA-1	GATA binding protein 1
cAMP	cyclic adenosin-5'-monophosphat	GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
CBP	CREB binding protein	HAT	Histonacetyltransferase
CCR-5	chemokine (C-C motif) receptor 5	HDAC	Histondeacetylase
CD	clusters of differentiation	HL	Hodgkin-Lymphom
CD40L	CD40-Ligand	HLH	helix loop helix
cDNA	complementary DNA	HMG2	high mobility group protein 2
RDA	representational difference analysis	HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
cHL	classical hodgkin lymphome	Hsp90	heat shock protein 90
CHX	Cycloheximid	Id	inhibitor of DNA binding
C7	complement protein C7	Idh	Isocitrat-Dehydrogenase
CIP	calf intestine phosphatase	Ig	Immunglobulin
CMV	Cytomegalovirus	IL	Interleukin
cpm	counts per minute	IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
Creg	cellular repressor of	IκB	Inhibitor-κB
		kb	Kilobasenpaare

## Abkürzungen

---

kD	Kilodalton	rpm	revolutions per minute
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase	RT	Raumtemperatur
LB	L-Broth Medium	RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	SAGE	serial analysis of gene expression
LEF	lymphoid enhancer binding factor	SCID	severe combined immunodeficiency
LPHL	Lymphozyten-prädominante HL	SDS	sodium dodecylsulfate
LPS	Lipopolysaccharid	SIAH	seven in absentia homolog
LTR	long terminal repeat	SLE	systemic lupus erythematosus
Luc	Luziferase	TBP	TATA bindendes Protein
MHC	major histocompatibility complex	TCR	T cell receptor
MLC1A	myosin light chain 1 atrial isoform	TdT	terminale Deoxynukleotidtransferase
MORE	more PORE	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
mRNA	messenger-RNA	tg	transgen
Ms4a11	membrane-spanning 4-domains A11 protein	TGF	transforming growth factor
MZB	Marginalzonen-B	TK	Thymidin-Kinase
NEAA	non-essential amino acids	TLR4	toll like receptor 4
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells	TNF	tumour necrosis factor
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B	TNP	trinitrophenyl
NK	natural killer	TRAF	TNF-receptor associated factor
NTP	Nukleotid-Triphosphat	TTP	Thymidin-5'-Triphosphat
OBF.1	Oct binding factor	U	Units, Einheit der Enzymaktivität
OCA-B	oct coactivator from B cells	UTR	untranslated region
OD	optische Dichte	UV	Ultraviolett
OHT	Hydroxytamoxifen	VP16	herpes simplex viral protein 16
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosidase	WT/wt	Wildtyp
CBP	CREB binding protein		
PBS	Phosphate buffered saline		
PCR	polymerase chain reaction		
pdIdC	poly-desoxy-Inosin-desoxy-Cytidin		
PI	Phosphorimager		
PLC	phospho lipase C		
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid		
PORE	palindromic octamer recognition element		
POU	Pit-Oct-Unc		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RA	retinoic acid		
RACE	rapid amplification of cDNA ends		
Rbp	Retinol bindendes Protein		
RNA	ribonucleic acid		
RNAse	Ribonuklease		

## 6. LITERATUR

- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R.R., Selvaggi, T., Kehry, M.R. and Staudt, L.M. (1996) BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood*, 87, 5257-5268.
- Allman, D., Karnell, F.G., Punt, J.A., Bakkour, S., Xu, L., Myung, P., Koretzky, G.A., Pui, J.C., Aster, J.C. and Pear, W.S. (2001) Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med*, 194, 99-106.
- Anagnostopoulos, I., Hansmann, M.L., Franssila, K., Harris, M., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Han, J., van Krieken, J.M., Poppema, S., Marafioti, T., Franklin, J., Sextro, M., Diehl, V. and Stein, H. (2000) European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*, 96, 1889-1899.
- Andersson, T., Samuelsson, A., Matthias, P. and Pettersson, S. (2000) The lymphoid-specific cofactor OBF-1 is essential for the expression of a V(H) promoter/HS1,2 enhancer-linked transgene in late B cell development. *Mol Immunol*, 37, 889-899.
- Annweiler, A., Müller, U. and Wirth, T. (1992a) Functional analysis of defined mutations in the immunoglobulin heavy-chain enhancer in transgenic mice. *Nucl. Acids Res.*, 20, 1503-1509.
- Annweiler, A., Muller-Immergluck, M. and Wirth, T. (1992b) Oct2 transactivation from a remote enhancer position requires a B-cell- restricted activity. *Mol Cell Biol*, 12, 3107-3116.
- Annweiler, A., Zwilling, S. and Wirth, T. (1994) Functional differences between the Oct2 transactivation domains determine the transactivation potential of individual Oct2 isoforms. *Nucl.AcidsRes.*, 22, 4250-4258.
- Babb, R., Cleary, M.A. and Herr, W. (1997) OCA-B is a functional analog of VP16 but targets a separate surface of the Oct-1 POU domain. *Mol.Cell.Biol.*, 17, 7295-7305.
- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M. and et al. (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, 79, 885-892.
- Bargou, R.C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M., Bommert, K., Royer, H., Scheidereit, C. and Dorken, B. (1996) High-level Nuclear-Factor  $\kappa$ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 87, 4340-4347.
- Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C. and Dorken, B. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, 100, 2961-2969.
- Barton, P.J. and Buckingham, M.E. (1985) The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem J*, 231, 249-261.
- Barton, P.J., Robert, B., Fiszman, M.Y., Leader, D.P. and Buckingham, M.E. (1985) The same myosin alkali light chain gene is expressed in adult cardiac atria and in fetal skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 6, 461-475.
- Barton, P.J., Robert, B., Cohen, A., Garner, I., Sassoon, D., Weydert, A. and Buckingham, M.E. (1988) Structure and sequence of the myosin alkali light chain gene expressed in adult cardiac atria and fetal striated muscle. *J Biol Chem*, 263, 12669-12676.
- Bergman, Y., Rice, D., Grosschedl, R. and Baltimore, D. (1984) Two regulatory elements for immunoglobulin  $\kappa$  light chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7041-7045.
- Bergman, Y., Fisher, A. and Cedar, H. (2003) Epigenetic mechanisms that regulate antigen receptor gene expression. *Curr Opin Immunol*, 15, 176-181.
- Bertolino, E. and Singh, H. (2002) POU/TBP cooperativity: a mechanism for enhancer action from a distance. *Mol Cell*, 10, 397-407.
- Blackwood, E.M. and Kadonaga, J.T. (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, 281, 61-63.
- Boehm, J., He, Y., Greiner, A., Staudt, L. and Wirth, T. (2001) Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH. *EMBO J*, 20, 4153-4162.
- Borowski, C., Martin, C., Gounari, F., Haughn, L., Aifantis, I., Grassi, F. and von Boehmer, H. (2002) On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol*, 14, 200-206.
- Brauninger, A., Hansmann, M.L., Strickler, J.G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K. and Kuppers, R. (1999) Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 340, 1239-1247.

## Literatur

---

- Browne, P., Petrosyan, K., Hernandez, A. and Chan, J.A. (2003) The B-cell transcription factors BSAP, Oct-2, and BOB.1 and the pan-B-cell markers CD20, CD22, and CD79a are useful in the differential diagnosis of classic Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 120, 767-777.
- Brunner, C., Marinkovic, D., Klein, J., Samardzic, T., Nitschke, L. and Wirth, T. (2003a) B cell-specific transgenic expression of Bcl2 rescues early B lymphopoiesis but not B cell responses in BOB.1/OBF.1-deficient mice. *J Exp Med*, 197, 1205-1211.
- Brunner, C., Laumen, H., Nielsen, P.J., Kraut, N. and Wirth, T. (2003b) Expression of the aldehyde dehydrogenase 2-like gene is controlled by BOB.1/OBF.1 in B lymphocytes. *J Biol Chem*, 278, 45231-45239.
- Buchanan, K.L., Hodgetts, S.I., Byrnes, J. and Webb, C.F. (1995) Differential transcription efficiency of two Ig VH promoters in vitro. *J Immunol*, 155, 4270-4277.
- Buchanan, K.L., Smith, E.A., Dou, S., Corcoran, L.M. and Webb, C.F. (1997) Family-specific differences in transcription efficiency of Ig heavy chain promoters. *J Immunol*, 159, 1247-1254.
- Buck, J., Ritter, G., Dannecker, L., Katta, V., Cohen, S.L., Chait, B.T. and Hammerling, U. (1990) Retinol is essential for growth of activated human B cells. *J Exp Med*, 171, 1613-1624.
- Buck, J., Derguini, F., Levi, E., Nakanishi, K. and Hammerling, U. (1991) Intracellular signaling by 14-hydroxy-4,14-retinoic acid. *Science*, 254, 1654-1656.
- Buck, J., Grun, F., Derguini, F., Chen, Y., Kimura, S., Noy, N. and Hammerling, U. (1993) Anhydrotretinol: a naturally occurring inhibitor of lymphocyte physiology. *J Exp Med*, 178, 675-680.
- Bueler, H. and Mulligan, R.C. (1996) Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1. *Mol Med*, 2, 545-555.
- Carbon, P., Murgo, S., Ebel, J.-P., Krol, A., Tebb, G. and Mattaj, I.W. (1987) A common octamer motif binding protein is involved in the transcription of U6 snRNA by RNA polymerase III and U2 snRNA by RNA polymerase II. *Cell*, 51, 71-79.
- Carsetti, R., Kohler, G. and Lamers, M.C. (1995) Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med*, 181, 2129-2140.
- Casellas, R., Jankovic, M., Meyer, G., Gazumyan, A., Luo, Y., Roeder, R. and Nussenzweig, M. (2002) OcaB is required for normal transcription and V(D)J recombination of a subset of immunoglobulin kappa genes. *Cell*, 110, 575-585.
- Catala, F., Wanner, R., Barton, P., Cohen, A., Wright, W. and Buckingham, M. (1995) A skeletal muscle-specific enhancer regulated by factors binding to E and CArG boxes is present in the promoter of the mouse myosin light-chain 1A gene. *Mol Cell Biol*, 15, 4585-4596.
- Cepek, K.L., Chasman, D.I. and Sharp, P.A. (1996) Sequence-specific DNA binding of the B-cell-specific coactivator OCA-B. *Genes Dev.*, 10, 2079-2088.
- Chang, C.C., Ye, B.H., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R. (1996) BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6947-6952.
- Chasman, D., Cepek, K., Sharp, P.A. and Pabo, C.O. (1999) Crystal structure of an OCA-B peptide bound to an Oct-1 POU domain/octamer DNA complex: specific recognition of a protein-DNA interface. *Genes Dev.*, 13, 2650-2657.
- Chen, U., Scheuermann, R.H., Wirth, T., Gerster, T., Roeder, R.G., Harshman, K. and Berger, C. (1991) Anti-IgM antibodies down modulate mu-enhancer activity and OTF2 levels in LPS-stimulated mouse splenic B-cells. *Nucleic Acids Res*, 19, 5981-5989.
- Chung, J.B., Silverman, M. and Monroe, J.G. (2003) Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*, 24, 343-349.
- Chuvpilo, S., Schomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F. and Serfling, E. (1993) Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 21, 5694-5704.
- Ciccone, D. and Oettinger, M. (2004) Chromatin modifications as clues to the regulation of antigen receptor assembly. *Novartis Found Symp*, 259, 146-158; discussion 158-169.
- Cohen, A., Barton, P.J., Robert, B., Garner, I., Alonso, S. and Buckingham, M.E. (1988) Promoter analysis of myosin alkali light chain genes expressed in mouse striated muscle. *Nucleic Acids Res*, 16, 10037-10052.
- Corcoran, L.M., Karvelas, M., Nossal, G.J., Ye, Z.S., Jacks, T. and Baltimore, D. (1993) Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival. *Genes Dev*, 7, 570-582.
- Corcoran, L.M. and Karvelas, M. (1994) Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity*, 1, 635-645.
- De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G. and Plum,

## Literatur

---

- J. (2002) Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *J Immunol*, 169, 3021-3029.
- DeGregori, J. (2002) The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta*, 1602, 131-150.
- DePina, A.S. and Langford, G.M. (1999) Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech*, 47, 93-106.
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D. and Staudt, L. M. (1997) Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*, 276, 589-92.
- Di Bacco, A. and Gill, G. (2003) The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene*, 22, 5436-5445.
- Douer, D. and Koeffler, H.P. (1982) Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. *J Clin Invest*, 69, 1039-1041.
- Dreyfus, M., Doyen, N. and Rougeon, F. (1987) The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *EMBO J.*, 6, 1685-1690.
- Duester, G. (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*, 35, 12221-12227.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*, 267, 4315-4324.
- Durand, D.B., Shaw, J.P., Bush, M.R., Replogle, R.E., Belagaje, R. and Crabtree, G.R. (1988) Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol*, 8, 1715-1724.
- Durkop, H., Hirsch, B., Hahn, C., Foss, H.D. and Stein, H. (2003) Differential expression and function of A20 and TRAF1 in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma and their induction by CD30 stimulation. *J Pathol*, 200, 229-239.
- Dzierzak, E. and Medvinsky, A. (1995) Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet*, 11, 359-366.
- Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K.R. and Bishop, J.M. (1989) Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature*, 340, 66-68.
- Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H. and Dorken, B. (1999) Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood*, 94, 3129-3134.
- Engel, I., Johns, C., Bain, G., Rivera, R.R. and Murre, C. (2001) Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med*, 194, 733-745.
- Ernst, P. and Smale, S.T. (1995) Combinatorial Regulation of transcription I: general aspects of transcriptional control. *Immunity*, 2, 311-319.
- Falkner, F.G. and Zachau, H.G. (1984) Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature*, 310, 71-74.
- Feinberg, A.P. (2001) Methylation meets genomics. *Nat Genet*, 27, 9-10.
- Feldhaus, A.L., Klug, C.A., Arvin, K.L. and Singh, H. (1993) Targeted disruption of the Oct-2 locus in a B cell provides genetic evidence for two distinct cell type-specific pathways of octamer element-mediated gene activation. *EMBO J.*, 12, 2763-2772.
- Ford, E., Strubin, M. and Hernandez, N. (1998) The Oct-1 POU domain activates snRNA gene transcription by contacting a region in the SNAPc largest subunit that bears sequence similarities to the Oct-1 coactivator OBF-1. *Genes Dev*, 12, 3528-3540.
- Foss, H.D., Reusch, R., Demel, G., Lenz, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M. and Stein, H. (1999) Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*, 94, 3108-3113.
- Foss, H.D., Marafioti, T. and Stein, H. (2000) [Hodgkin lymphoma. Classification and pathogenesis]. *Pathologe*, 21, 113-123.
- Franzoso, G., Carlson, L., Scharton-Kersten, T., Shores, E. W., Epstein, S., Grinberg, A., Tran, T., Shacter, E., Leonardi, A., Anver, M., Love, P., Sher, A. and Siebenlist, U. (1997) Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity*, 6, 479-90.
- Friedl, E.M. and Matthias, P. (1995) Transcriptional activation and repression, two properties of the lymphoid-specific transcription factor Oct-2a. *Eur J Biochem*, 234, 308-316.
- Garcia, J.F., Camacho, F.I., Morente, M., Fraga, M., Montalban, C., Alvaro, T., Bellas, C., Castano, A., Diez, A., Flores, T., Martin, C., Martinez, M.A., Mazon, F., Menarguez, J., Mestre, M.J., Mollejo, M., Saez,

## Literatur

---

- A.I., Sanchez, L. and Piris, M.A. (2003) Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood*, 101, 681-689.
- Georgopoulos, K. (2002) Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol*, 2, 162-174.
- Gerster, T., Matthias, P., Thali, M., Jiricny, J. and Schaffner, W. (1987) Cell type-specificity elements of the immunoglobulin heavy chain gene enhancer. *EMBO J.*, 6, 1323-1330.
- Gerster, T., Balmaceda, C.-G. and Roeder, R.G. (1990) The cell type-specific octamer transcription factor OTF-2 has two domains required for the activation of transcription. *EMBO J.*, 9, 1635-1643.
- Ghatpande, S., Ghatpande, A., Sher, J., Zile, M.H. and Evans, T. (2002) Retinoid signaling regulates primitive (yolk sac) hematopoiesis. *Blood*, 99, 2379-2386.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16, 225-260.
- Goode, B.L., Drubin, D.G. and Barnes, G. (2000) Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 63-71.
- Greiner, A., Muller, K.B., Hess, J., Pfeffer, K., Muller-Hermelink, H.K. and Wirth, T. (2000) Up-regulation of BOB.1/OBF.1 expression in normal germinal center B cells and germinal center-derived lymphomas. *Am J Pathol*, 156, 501-507.
- Gstaiger, M., Knoepfel, L., Georgiev, O., Schaffner, W. and Hovens, C.M. (1995) A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors. *Nature*, 373, 360-362.
- Gstaiger, M., Georgiev, O., van Leeuwen, H., van der Vliet, P. and Schaffner, W. (1996) The B cell coactivator Bob1 shows DNA sequence-dependent complex formation with Oct-1/Oct-2 factors, leading to differential promoter activation. *EMBO J*, 15, 2781-2790.
- Gu, Y.C., Kortessmaa, J., Tryggvason, K., Persson, J., Ekblom, P., Jacobsen, S.E. and Ekblom, M. (2003) Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood*, 101, 877-885.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Comte, I., Dessain, M.L., Drouet, M., Ayer-Le Lievre, C., Cogne, M. and Denizot, Y. (2003) Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model. *Biochim Biophys Acta*, 1642, 181-190.
- Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J.C., Rangel, R. and Martinez-Valdez, H. (2002) Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology*, 107, 167-175.
- Hardy, R.R., Li, Y.S. and Hayakawa, K. (1996) Distinctive developmental origins and specificities of the CD5+ B-cell subset. *Semin Immunol*, 8, 37-44.
- Hardy, R.R. and Hayakawa, K. (2001) B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, 19, 595-621.
- Hart, G., Flaishon, L., Becker-Herman, S. and Shachar, I. (2003) Ly49D receptor expressed on immature B cells regulates their IFN-gamma secretion, actin polymerization, and homing. *J Immunol*, 171, 4630-4638.
- He, X., Treacy, M.N., Simmons, D.M., Ingraham, H.A., Swanson, L.W. and Rosenfeld, M.G. (1989) Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature*, 340, 35-42.
- Hell, K., Pringle, J.H., Hansmann, M.L., Lorenzen, J., Colloby, P., Lauder, I. and Fischer, R. (1993a) Demonstration of light chain mRNA in Hodgkin's disease. *J Pathol*, 171, 137-143.
- Hell, K., Lorenzen, J., Hansmann, M.L., Fellbaum, C., Busch, R. and Fischer, R. (1993b) Expression of the proliferating cell nuclear antigen in the different types of Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol*, 99, 598-603.
- Hermanson, G.G., Briskin, M., Sigman, D. and Wall, R. (1989) Immunoglobulin enhancer and promoter motifs 5' of the B29 B-cell-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7341-7345.
- Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., Ruvkun, G. and et al. (1988) The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev*, 2, 1513-1516.
- Hertel, C.B., Zhou, X.G., Hamilton-Dutoit, S.J. and Junker, S. (2002) Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene*, 21, 4908-4920.
- Hess, J., Laumen, H., Muller, K.B. and Wirth, T. (1998) Molecular genetics of the germinal center reaction. *J Cell Physiol*, 177, 525-534.
- Hess, J., Nielsen, P.J., Fischer, K.D., Bujard, H. and Wirth, T. (2001) The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development. *Mol Cell Biol*, 21, 1531-1539.
- Horie, R., Watanabe, T., Ito, K., Morisita, Y., Watanabe, M., Ishida, T., Higashihara, M. and Kadin, M. (2002a)

## Literatur

---

- Cytoplasmic aggregation of TRAF2 and TRAF5 proteins in the Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol*, 160, 1647-1654.
- Horie, R., Watanabe, T., Morishita, Y., Ito, K., Ishida, T., Kanegae, Y., Saito, I., Higashihara, M., Mori, S. and Kadin, M.E. (2002b) Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 21, 2493-2503.
- Hubank, M. and Schatz, D.G. (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl.AcidsRes*, 22, 5640-5648.
- Humbert, P.O. and Corcoran, L.M. (1997) oct-2 gene disruption eliminates the peritoneal B-1 lymphocyte lineage and attenuates B-2 cell maturation and function. *J Immunol*, 159, 5273-5284.
- Jankovic, M. and Nussenzweig, M.C. (2003) OcaB regulates transitional B cell selection. *Int Immunol*, 9, 1099-1104.
- Jenuwein, T. and Grosschedl, R. (1991) Complex pattern of immunoglobulin  $\mu$  gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities. *Genes Dev.*, 5, 932-943.
- Jenuwein, T., Forrester, W.C., Fernández-Herrero, L.A., Laible, G., Dull, M. and Grosschedl, R. (1997) Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature*, 385, 269-272.
- Jenuwein, T. (2001) Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol*, 11, 266-273.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-1080.
- Johansson, K., Sigvardsson, M. and Leanderson, T. (1994) Transcriptional regulation of immunoglobulin gene expression by anti-Ig. *Int Immunol*, 6, 41-48.
- Jox, A., Zander, T., Kuppers, R., Irsch, J., Kanzler, H., Kornacker, M., Bohlen, H., Diehl, V. and Wolf, J. (1999) Somatic mutations within the untranslated regions of rearranged Ig genes in a case of classical Hodgkin's disease as a potential cause for the absence of Ig in the lymphoma cells. *Blood*, 93, 3964-3972.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H. and Dorken, B. (2002a) Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 99, 3398-3403.
- Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Probsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H. and Dorken, B. (2002b) Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood*, 99, 3060-3062.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Brjauninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. and R, K.u. (2000) Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*, 191, 395-402.
- Kamal, A. and Goldstein, L.S. (2000) Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 503-508.
- Kang, J.S., Kohlhuber, F., Hug, H., Marme, D., Eick, D. and Ueffing, M. (1996) Cloning and functional analysis of the hematopoietic cell-specific phospholipase C(gamma)2 promoter. *FEBS Lett*, 399, 14-20.
- Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M.L. and Rajewsky, K. (1996) Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*, 184, 1495-1505.
- Kee, B.L., Rivera, R.R. and Murre, C. (2001) Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta. *Nat Immunol*, 2, 242-247.
- Kerkhoff, E. and Rapp, U.R. (1997) Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol*, 17, 2576-2586.
- Khamlichi, A.A., Pinaud, E., Decourt, C., Chauveau, C. and Cogne, M. (2000) The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv Immunol*, 75, 317-345.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W. (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, 17, 1700-1709.
- Kim, U., Qin, F.-F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M. and Roeder, R.G. (1996) The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature*, 383, 542-547.
- Kim, U., Gunther, C.S. and Roeder, R.G. (2000) Genetic analyses of NFKB1 and OCA-B function: defects in B cells, serum IgM level, and antibody responses in Nfkb1-/-Oca-b-/- mice. *J Immunol*, 165, 6825-6832.
- Kim, U., Siegel, R., Ren, X., Gunther, C.S., Gaasterland, T. and Roeder, R.G. (2003) Identification of transcription coactivator OCA-B-dependent genes involved in antigen-dependent B cell differentiation by cDNA array analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8868-8873.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin

## Literatur

---

- fluidity. *Genes Dev*, 13, 2339-2352.
- Kinoshita, K., Yoo, B.S., Nozaki, Y., Sugiyama, M., Ikoma, S., Ohno, M., Funachi, M. and Kanamaru, A. (2003) Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J Immunol*, 170, 5793-5798.
- Kirillov, A., Kistler, B., Mostoslavsky, R., Cedar, H., Wirth, T. and Bergman, Y. (1996) A role for nuclear NF-kappaB in B-cell-specific demethylation of the Igkappa locus. *Nat Genet*, 13, 435-441.
- Klochender-Yeivin, A. and Yaniv, M. (2001) Chromatin modifiers and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta*, 1551, M1-10.
- Komatsu, S., Yano, T., Shibata, M., Tuft, R.A. and Ikebe, M. (2000) Effects of the regulatory light chain phosphorylation of myosin II on mitosis and cytokinesis of mammalian cells. *J Biol Chem*, 275, 34512-34520.
- Konig, H., Pfisterer, P., Corcoran, L.M. and Wirth, T. (1995) Identification of CD36 as the first gene dependent on the B-cell differentiation factor Oct-2. *Genes Dev*, 9, 1598-1607.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B. and Busslinger, M. (1992) The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol*, 12, 2662-2672.
- Krappmann, D., Emmerich, F., Kordes, U., Scharschmidt, E., Dorken, B. and Scheidereit, C. (1999) Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 18, 943-953.
- Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R. and Hansmann, M.L. (1994) Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10962-10966.
- Kuppers, R. and Rajewsky, K. (1998) The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol*, 16, 471-493.
- Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L. and Rajewsky, K. (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 341, 1520-1529.
- Kuppers, R., Brauninger, A., Muschen, M., Distler, V., Hansmann, M.L. and Rajewsky, K. (2001) Evidence that Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin disease do not represent cell fusions. *Blood*, 97, 818-821.
- Kuppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Brauninger, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Califano, A., Hansmann, M.L. and Dalla-Favera, R. (2003) Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest*, 111, 529-537.
- Kuwata, T., Wang, I.M., Tamura, T., Ponnampuruma, R.M., Levine, R., Holmes, K.L., Morse, H.C., De Luca, L.M. and Ozato, K. (2000) Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood*, 95, 3349-3356.
- LaBella, F., Sive, H.L., Roeder, R.G. and Heintz, N. (1988) Cell-cycle regulation of a human histone H2b gene is mediated by the H2b subtype-specific consensus element. *Genes Dev.*, 2, 32-39.
- Laumen, H., Nielsen, P.J. and Wirth, T. (2000) The BOB.1/OBF.1 coactivator is essential for octamer-dependent transcription in B cells. *Eur. J. Immunol.*, 30, 458-469.
- Laumen, H., Brunner, C., Greiner, A. and Wirth, T. (2004) Myosin light chain 1 atrial isoform (MLC1A) is expressed in pre-B cells under control of the BOB.1/OBF.1 coactivator. *Nucl. Acids Res.*, 32, 1577-1583.
- Leanderson, T. and Hsu, E. (1985) Anti-IgM treatment influences immunoglobulin heavy and light chain mRNA levels in mitogen-stimulated B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 15, 641-643.
- LeBowitz, J.H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D. and Sharp, P.A. (1988) Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro. *Genes Dev.*, 2, 1227-1237.
- Lee, S.J., Bahk, Y.Y., Yun, D.H., Lee, H.J., Lee, Y.H., Ryu, S.H. and Suh, P.G. (1997) The promoter activity of the phospholipase C-gamma2 gene is regulated by a cell-type-specific control element. *DNA Cell Biol*, 16, 485-492.
- Lenardo, M., Pierce, J.W. and Baltimore, D. (1987) Protein-binding sites in Ig gene enhancers determine transcriptional activity and inducibility. *Science*, 236, 1573-1577.
- Liang, R., Chan, W.P., Chan, A.C. and Ho, F.C. (1996) Rearrangement of the bcl-6 gene in Hodgkin's disease, lymphocyte predominant type. *Am J Hematol*, 52, 63-64.
- Lin, H. and Grosschedl, R. (1995) Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*, 376, 263-267.
- Lissy, N.A., Davis, P.K., Irwin, M., Kaelin, W.G. and Dowdy, S.F. (2000) A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature*, 407, 642-645.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G. and Evan, G.I. (1995) A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucl.*

## Literatur

---

- Acids Res.*, 23, 1686-1690.
- Lobo, S.M., Ifill, S. and Hernandez, N. (1990) cis-acting elements required for RNA polymerase II and III transcription in the human U2 and U6 snRNA promoters. *Nucleic Acids Res*, 18, 2891-2899.
- Loddenkemper, C., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Johrens-Leder, K., Foss, H.D., Jundt, F., Wirth, T., Dorken, B. and Stein, H. (2004) Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol*, 202, 60-69.
- Luo, Y., Fujii, H., Gerster, T. and Roeder, R.G. (1992) A novel B cell-derived coactivator potentiates the activation of immunoglobulin promoters by octamer-binding transcription factors. *Cell*, 71, 231-241.
- Luo, Y. and Roeder, R.G. (1995) Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-cell-specific transcriptional coactivator OCA-B. *Mol.Cell.Biol.*, 15, 4115-4124.
- Luo, H., Shan, X. and Wu, J. (1996) Expression of human mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase during lymphocyte activation. *J Cell Biochem*, 60, 495-507.
- Luo, Y., Ge, H., Stevens, S., Xiao, H. and Roeder, R.G. (1998) Coactivation by OCA-B: definition of critical regions and synergism with general cofactors. *Mol Cell Biol*, 18, 3803-3810.
- Lyons, G.E., Schiaffino, S., Sassoon, D., Barton, P. and Buckingham, M. (1990a) Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol*, 111, 2427-2436.
- Lyons, G.E., Ontell, M., Cox, R., Sassoon, D. and Buckingham, M. (1990b) The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J Cell Biol*, 111, 1465-1476.
- Magor, B.G., Ross, D.A., Pilstrom, L. and Warr, G.W. (1999) Transcriptional enhancers and the evolution of the IgH locus. *Immunol Today*, 20, 13-17.
- Mansfield, P.J., Shayman, J.A. and Boxer, L.A. (2000) Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood*, 95, 2407-2412.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P.G., Pileri, S. and Stein, H. (1997) Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med*, 337, 453-458.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Huhn, D. and Stein, H. (1999) Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J Clin Oncol*, 17, 3804-3809.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T. and Stein, H. (2000) Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*, 95, 1443-1450.
- Martensson, I.L., Rolink, A., Melchers, F., Mundt, C., Licence, S. and Shimizu, T. (2002) The pre-B cell receptor and its role in proliferation and Ig heavy chain allelic exclusion. *Semin Immunol*, 14, 335-342.
- Martin, F. and Kearney, J.F. (2000) B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev*, 175, 70-79.
- Martin, F. and Kearney, J.F. (2001) B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 13, 195-201.
- Martin, F., Oliver, A.M. and Kearney, J.F. (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T- independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 14, 617-629.
- Mason, J.O., Williams, G.T. and Neuberger, M.S. (1985) Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin V<sub>H</sub> gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell*, 41, 479-487.
- Matthias, P. (1998) Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site: who is doing what? *Semin Immunol*, 10, 155-163.
- Mattioni, T., Louvion, J.F. and Picard, D. (1994) Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods Cell Biol*, 43, 335-352.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J. and Maki, R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J*, 15, 5647-5658.
- Mermall, V., Post, P.L. and Mooseker, M.S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, 279, 527-533.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M. and Busslinger, M. (2002) Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science*, 297, 110-113.
- Miller, C.L., Feldhaus, A.L., Rooney, J.W., Rhodes, L.D., Sibley, C.H. and Singh, H. (1991) Regulation and a possible stage-specific function of Oct-2 during pre-B-cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 4885-4894.
- Mizushima-Sugano, J. and Roeder, R.G. (1986) Cell-type-specific transcription of an immunoglobulin kappa

## Literatur

---

- light chain gene in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 8511-8515.
- Morgenstern, J.P. and Land, H. (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucl. Acids Res*, 18, 3587-3596.
- Morimura, T., Miyatani, S., Kitamura, D. and Goitsuka, R. (2001) Notch signaling suppresses IgH gene expression in chicken B cells: implication in spatially restricted expression of Serrate2/Notch1 in the bursa of Fabricius. *J Immunol*, 166, 3277-3283.
- Moriuchi, M. and Moriuchi, H. (2001) Octamer transcription factors up-regulate the expression of CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Biol Chem*, 276, 8639-8642.
- Morrison, A.M., Nutt, S.L., Thevenin, C., Rolink, A. and Busslinger, M. (1998) Loss- and gain-of-function mutations reveal an important role of BSAP (Pax-5) at the start and end of B cell differentiation. *Semin Immunol*, 10, 133-142.
- Muller-Immergluck, M.M., Schaffner, W. and Matthias, P. (1990) Transcription factor Oct-2A contains functionally redundant activating domains and works selectively from a promoter but not from a remote enhancer position in non-lymphoid (HeLa) cells. *EMBO J*, 9, 1625-1634.
- Muschen, M., Rajewsky, K., Brauninger, A., Baur, A.S., Oudejans, J.J., Roers, A., Hansmann, M.L. and Kuppers, R. (2000) Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*, 191, 387-394.
- Muthusamy, N., Park do, J., Rho, H.W., Rhee, S.G. and Subbarao, B. (2003) Impaired antigen receptor induced calcium mobilization in a phospholipase C-gamma1 deficient B cell line. *Immunol Lett*, 90, 203-207.
- Naqvi, N.I., Wong, K.C., Tang, X. and Balasubramanian, M.K. (2000) Type II myosin regulatory light chain relieves auto-inhibition of myosin-heavy-chain function. *Nat Cell Biol*, 2, 855-858.
- Nielsen, P.J., Georgiev, O., Lorenz, B. and Schaffner, W. (1996) B lymphocytes are impaired in mice lacking the transcriptional co-activator Bob1/OCA-B/OBF1. *Eur. J. Immunol.*, 26, 3214-3218.
- Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Kohler, G. and Lamers, M.C. (1997) CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol*, 7, 133-143.
- Nutt, S.L., Urbanek, P., Rolink, A. and Busslinger, M. (1997) Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev*, 11, 476-491.
- Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dorfler, P., Rolink, A. and Busslinger, M. (1998) Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J*, 17, 2319-2333.
- Osipovich, O., Milley, R., Meade, A., Tachibana, M., Shinkai, Y., Krangel, M.S. and Oltz, E.M. (2004) Targeted inhibition of V(D)J recombination by a histone methyltransferase. *Nat Immunol*, 5, 309-316.
- Osmond, D.G., Rolink, A. and Melchers, F. (1998) Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today*, 19, 65-68.
- Pan, L., Sato, S., Frederick, J.P., Sun, X.H. and Zhuang, Y. (1999) Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the Id3 gene. *Mol Cell Biol*, 19, 5969-5980.
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Ford, D.L., Hurt, K.J., Bae, S.S., Suh, P.G., Kurosaki, T., Snyder, S.H. and Gill, D.L. (2002) Phospholipase C-gamma is required for agonist-induced Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell*, 111, 529-541.
- Pelletier, M.R., Hatada, E.N., Scholz, G. and Scheidereit, C. (1997) Efficient transcription of an immunoglobulin kappa promoter requires specific sequence elements overlapping with and downstream of the transcriptional start site. *Nucleic Acids Res*, 25, 3995-4003.
- Pfeuffer, I., Klein-Heßling, S., Heinfling, A., Chuvpilo, S., Escher, C., Brabletz, T., Hentsch, B., Schwarzenbach, H., Matthias, P. and Serfling, E. (1994) Octamer factors exert a dual effect on the IL-2 and IL-4 promoters. *J.Immunol.*, 153, 5572-5585.
- Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L.M. and Wirth, T. (1994) Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities. *EMBO J*, 13, 1655-1663.
- Pfisterer, P., Zwilling, S., Hess, J. and Wirth, T. (1995) Functional characterization of the murine homolog of the B-cell-specific coactivator BOB.1/OBF.1. *J.Biol.Chem.*, 270, 29870-29880.
- Pfisterer, P., König, H., Hess, J., Lipowsky, G., Haendler, B., Schleunig, W.-D. and Wirth, T. (1996) CRISP-3, a protein with homology to plant defense proteins, is expressed in mouse B cells the control of Oct2. *Mol.Cell.Biol.*, 16, 6160-6168.
- Pfisterer, P., Hess, J. and Wirth, T. (1997) Identification of target genes of the lymphoid-specific transcription factor Oct2. *Immunobiology*, 198, 217-226.
- Pierani, A., Heguy, A., Fujii, H. and Roeder, R.G. (1990) Activation of octamer-containing promoters by either octamer-binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B-cell-

## Literatur

---

- specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6204-6215.
- Poperechnaya, A., Varlamova, O., Lin, P.J., Stull, J.T. and Bresnick, A.R. (2000) Localization and activity of myosin light chain kinase isoforms during the cell cycle. *J Cell Biol*, 151, 697-708.
- Porter, A. (1998) Controlling your losses: conditional gene silencing in mammals. *Trends Genet*, 14, 73-79.
- Przylepa, J., Himes, C. and Kelsoe, G. (1998) Lymphocyte development and selection in germinal centers. *Curr Top Microbiol Immunol*, 229, 85-104.
- Ptashne, M. and Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386, 569-577.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C. and Pear, W.S. (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*, 11, 299-308.
- Purton, L.E., Bernstein, I.D. and Collins, S.J. (1999) All-trans retinoic acid delays the differentiation of primitive hematopoietic precursors (lin-c-kit+Sca-1(+)) while enhancing the terminal maturation of committed granulocyte/monocyte progenitors. *Blood*, 94, 483-495.
- Purton, L.E., Bernstein, I.D. and Collins, S.J. (2000) All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood*, 95, 470-477.
- Qin, X.F., Reichlin, A., Luo, Y., Roeder, R.G. and Nussenzweig, M.C. (1998) OCA-B integrates B cell antigen receptor-, CD40L- and IL 4-mediated signals for the germinal center pathway of B cell development. *EMBO J.*, 17, 5066-5075.
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V. and Gottesman, M.E. (1999) Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J*, 18, 4633-4644.
- Quong, M.W., Romanow, W.J. and Murre, C. (2002) E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol*, 20, 301-322.
- Quong, M.W., Martensson, A., Langerak, A.W., Rivera, R.R., Nemazee, D. and Murre, C. (2004) Receptor editing and marginal zone B cell development are regulated by the helix-loop-helix protein, E2A. *J Exp Med*, 199, 1101-1112.
- Re, D., Muschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V. and Wolf, J. (2001) Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res*, 61, 2080-2084.
- Rempel, R.E., Saenz-Robles, M.T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., Jakoi, L., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Smith, C. and Nevins, J.R. (2000) Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol Cell*, 6, 293-306.
- Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 263-273.
- Rivera, R.R., Johns, C.P., Quan, J., Johnson, R.S. and Murre, C. (2000) Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity*, 12, 17-26.
- Rivera, R. and Murre, C. (2001) The regulation and function of the Id proteins in lymphocyte development. *Oncogene*, 20, 8308-8316.
- Rolink, A.G., Schaniel, C., Busslinger, M., Nutt, S.L. and Melchers, F. (2000) Fidelity and infidelity in commitment to B-lymphocyte lineage development. *Immunol Rev*, 175, 104-111.
- Romanova, L.Y., Alexandrov, I.A., Blagosklonny, M.V., Nordan, R.P., Garfield, S., Acs, P., Nguyen, P., Trepel, J., Blumberg, P.M. and Mushinski, J.F. (1999) Regulation of actin cytoskeleton in lymphocytes: PKC-delta disrupts IL-3-induced membrane ruffles downstream of Rac1. *J Cell Physiol*, 179, 157-169.
- Rosenfeld, M.G. (1991) POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev.*, 5, 897-907.
- Rotter, M., Zimmerman, K., Poustka, A., Soussi-Yanicostas, N. and Starzinski-Powitz, A. (1991) The human embryonic myosin alkali light chain gene: use of alternative promoters and 3' non-coding regions. *Nucleic Acids Res*, 19, 1497-1504.
- Russell, E.S. (1979) Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet*, 20, 357-459.
- Ryan, A.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes & Development*, 11, 1207-1225.
- Saez, A.I., Artiga, M.J., Sanchez-Beato, M., Sanchez-Verde, L., Garcia, J.F., Camacho, F.I., Franco, R. and Piris, M.A. (2002) Analysis of octamer-binding transcription factors Oct2 and Oct1 and their coactivator BOB.1/OBF.1 in lymphomas. *Mod Pathol*, 15, 211-220.
- Salas, M. and Eckhardt, L.A. (2003) Critical role for the Oct-2/OCA-B partnership in Ig-secreting cells. *J Immunol*, 171, 6589-6598.
- Samardzic, T., Marinkovic, D., Nielsen, P.J., Nitschke, L. and Wirth, T. (2002) BOB.1/OBF.1 Deficiency Affects Marginal-Zone B-Cell Compartment. *Mol Cell Biol*, 22, 8320-8331.
- Samardzic, T., Gerlach, J., Muller, K., Marinkovic, D., Hess, J., Nitschke, L. and Wirth, T. (2002) CD22

## Literatur

---

- regulates early B cell development in BOB.1/OBF.1-deficient mice. *Eur J Immunol*, 32, 2481-2489.
- Sauter, P. and Matthias, P. (1997) The B cell-specific coactivator OBF-1 (OCA-B, Bob-1) is inducible in T cells and its expression is dispensable for IL-2 gene induction. *Immunobiology*, 198, 207-216.
- Sauter, P. and Matthias, P. (1998) Coactivator OBF-1 makes selective contacts with both the POU-specific domain and the POU homeodomain and acts as a molecular clamp on DNA. *Mol.Cell.Biol.*, 18, 7397-7409.
- Schaffner, W. (1989) How do different transcription factors binding the same DNA sequence sort out their jobs? *TIG*, 5, 37-39.
- Schebesta, M., Pfeffer, P.L. and Busslinger, M. (2002a) Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity*, 17, 473-485.
- Schebesta, M., Heavey, B. and Busslinger, M. (2002b) Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol*, 14, 216-223.
- Scheidereit, C., Heguy, A. and Roeder, R. G. (1987) Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro, *Cell*, 51, 783-793.
- Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. and Scott, M.L. (2001) An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 293, 2111-2114.
- Schöler, H.R. (1991) Octamania: The POU factors in murine development. *Trends Genet*, 7, 323-329.
- Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M. and Schaffner, W. (1988) Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCBA). *EMBO J.*, 7, 4221-4229.
- Schubart, D.B., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M.H., Botteri, F. and Matthias, P. (1996a) B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature*, 383, 538-542.
- Schubart, D.B., Sauter, P., Massa, S., Friedl, E.M., Schwarzenbach, H. and Matthias, P. (1996b) Gene structure and characterization of the murine homologue of the B cell-specific transcriptional coactivator OBF-1. *Nucleic Acids Res*, 24, 1913-1920.
- Schubart, D.B., Rolink, A., Schubart, K. and Matthias, P. (2000) Cutting edge: lack of peripheral B cells and severe agammaglobulinemia in mice simultaneously lacking Bruton's tyrosine kinase and the B cell-specific transcriptional coactivator OBF-1. *J Immunol*, 164, 18-22.
- Schubart, K., Massa, S., Schubart, D., Corcoran, L.M., Rolink, A.G. and Matthias, P. (2001) B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1. *Nat Immunol*, 2, 69-74.
- Schwarz, E. M., Krimpenfort, P., Berns, A. and Verma, I. M. (1997) Immunological defects in mice with a targeted disruption in Bcl-3. *Genes Dev*, 11, 187-97.
- Schwering, I., Brauninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K. and Kuppers, R. (2003) Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 101, 1505-1512.
- Schwering, I., Brauninger, A., Distler, V., Jesdinsky, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. and Kuppers, R. (2003) Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. *Mol Med*, 9, 85-95.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265, 1573-1577.
- Scott, E.W., Fisher, R.C., Olson, M.C., Kehrl, E.W., Simon, M.C. and Singh, H. (1997) PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*, 6, 437-447.
- Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C. and Stein, H. (2000) Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*, 95, 3020-3024.
- Sellers, J.R. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 1496, 3-22.
- Sepulveda, M.A., Emelyanov, A.V. and Birshtein, B.K. (2004) NF-kappa B and Oct-2 synergize to activate the human 3' Igh hs4 enhancer in B cells. *J Immunol*, 172, 1054-1064.
- Seyfert, V.L., Allman, D., He, Y. and Staudt, L.M. (1996) Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene*, 12, 2331-2342.
- Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E. I. and Baltimore, D. (1995) Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*, 80, 321-30.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D. and Sharp, P.A. (1986) A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*, 319, 154-158.
- Sive, H.L. and Roeder, R.G. (1986) Interaction of a common factor with conserved promoter and enhancer

## Literatur

---

- sequences in histone H2B, immunoglobulin, and U2 small nuclear RNA (snRNA) genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 6382-6386.
- Skinninger, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Trumper, L.H., von Bonin, F., Kapp, U., Patterson, B., Snow, B.E. and Mak, T.W. (2001) Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 97, 250-255.
- Skinninger, B.F. and Mak, T.W. (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99, 4283-4297.
- Skinninger, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U. and Mak, T.W. (2002) Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99, 618-626.
- Sloan, S.R., Shen, C.P., McCarrick-Walmsley, R. and Kadesch, T. (1996) Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Mol Cell Biol*, 16, 6900-6908.
- Smith, W.C., Nakshatri, H., Leroy, P., Rees, J. and Chambon, P. (1991) A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *EMBO J*, 10, 2223-2230.
- Spencer, D.M. (1996) Creating conditional mutations in mammals. *Trends Genet*, 12, 181-187.
- Stall, A.M., Wells, S.M. and Lam, K.P. (1996) B-1 cells: unique origins and functions. *Semin Immunol*, 8, 45-59.
- Staudt, L.M., Singh, H., Sen, R., Wirth, T., Sharp, P.A. and Baltimore, D. (1986) A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. *Nature*, 323, 640-643.
- Staudt, L.M., Clerc, R.G., Singh, H., LeBowitz, J.H., Sharp, P.A. and Baltimore, D. (1988) Cloning of a lymphoid-specific cDNA encoding a protein binding the regulatory octamer DNA motif. *Science*, 241, 577-580.
- Staudt, L.M. and Lenardo, M.J. (1991) Immunoglobulin gene transcription. *Annu. Rev. Immunol.*, 9, 373-398.
- Steimle-Grauer, S.A., Tinguely, M., Seada, L., Fellbaum, C. and Hansmann, M.L. (2003) Expression patterns of transcription factors in progressively transformed germinal centers and Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch*, 442, 284-293.
- Stein, H. and Hummel, M. (1999) Cellular origin and clonality of classic Hodgkin's lymphoma: immunophenotypic and molecular studies. *Semin Hematol*, 36, 233-241.
- Stein, H., Marafioti, T., Foss, H.D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G. and Falini, B. (2001) Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, 97, 496-501.
- Stevens, S., Wang, L. and Roeder, R.G. (2000a) Functional analysis of the OCA-B promoter. *J Immunol*, 164, 6372-6379.
- Stevens, S., Ong, J., Kim, U., Eckhardt, L.A. and Roeder, R.G. (2000b) Role of OCA-B in 3'-IgH enhancer function. *J Immunol*, 164, 5306-5312.
- Strubin, M., Newell, J.W. and Matthias, P. (1995) OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell*, 80, 497-506.
- Sturm, R.A. and Herr, W. (1988) The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature*, 336, 601-604.
- Sun, X.H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Baltimore, D. (1991) Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol*, 11, 5603-5611.
- Sun, X.H. (1994) Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell*, 79, 893-900.
- Sun, J., Matthias, G., Mihatsch, M.J., Georgopoulos, K. and Matthias, P. (2003) Lack of the transcriptional coactivator OBF-1 prevents the development of systemic lupus erythematosus-like phenotypes in Aiolos mutant mice. *J Immunol*, 170, 1699-1706.
- Tanaka, M., Grossniklaus, U., Herr, W. and Hernandez, N. (1988) Activation of the U2 snRNA promoter by the octamer motif defines a new class of RNA polymerase II enhancer elements. *Genes Dev.*, 2, 1764-1778.
- Tang, H. and Sharp, P.A. (1999) Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity*, 11, 517-526.
- Tarlinton, D. (1998) Germinal centers: form and function. *Curr Opin Immunol*, 10, 245-251.
- ten Boekel, E., Melchers, F. and Rolink, A.G. (1998) Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity*, 8, 199-207.
- Theil, J., Laumen, H., Marafioti, T., Hummel, M., Lenz, G., Wirth, T. and Stein, H. (2001) Defective octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells. *Blood*, 97, 3191-3196.
- Thevenin, C., Rieckmann, P., Kozlow, E.J. and Kehrl, J.H. (1992) Identification of a diverged octamer binding site important in the B cell-specific expression of the CD20 gene. *Trans Assoc Am Physicians*, 105, 15-24.
- Thevenin, C., Nutt, S.L. and Busslinger, M. (1998) Early function of Pax5 (BSAP) before the pre-B cell receptor

## Literatur

---

- stage of B lymphopoiesis. *J Exp Med*, 188, 735-744.
- Tiedt, R., Bartholdy, B.A., Matthias, G., Newell, J.W. and Matthias, P. (2001) The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. *EMBO J*, 20, 4143-4152.
- Tomilin, A., Remenyi, A., Lins, K., Bak, H., Leidel, S., Vriend, G., Wilmanns, M. and Scholer, H.R. (2000) Synergism with the coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration. *Cell*, 103, 853-864.
- Ullman, K.S., Flanagan, W.M., Edwards, C.A. and Crabtree, G.R. (1991) Activation of early gene expression in T lymphocytes by Oct-1 and an inducible protein, OAP40. *Science*, 254, 558-562.
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F. and Busslinger, M. (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*, 79, 901-12.
- Ushmorov, A., Ritz, O., Hummel, M., Leithauser, F., Moller, P., Stein, H. and Wirth, T. (2004) Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood*.
- Veal, E., Eisenstein, M., Tseng, Z.H. and Gill, G. (1998) A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol*, 18, 5032-5041.
- Veal, E., Groisman, R., Eisenstein, M. and Gill, G. (2000) The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. *Oncogene*, 19, 2120-2128.
- Verrijzer, C.P., Strating, M., Mul, Y.M. and van der Vliet, P.C. (1992) POU domain transcription factors from different subclasses stimulate adenovirus DNA replication. *Nucl. Acids Res.*, 20, 6369-6375.
- Walker, S., Hayes, S. and O'Hare, P. (1994) Site-specific conformational alteration of the Oct-1 POU domain-DNA complex as the basis for differential recognition by Vmw65 (VP16). *Cell*, 79, 841-852.
- Wang, J.H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M. and Georgopoulos, K. (1996) Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*, 5, 537-549.
- Wang, D., Feng, J., Wen, R., Marine, J.C., Sangster, M.Y., Parganas, E., Hoffmeyer, A., Jackson, C.W., Cleveland, J.L., Murray, P.J. and Ihle, J.N. (2000) Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity*, 13, 25-35.
- Wang, D., Boylin, E.C., Minegishi, Y., Wen, R., Smith, C.I., Ihle, J.N. and Conley, M.E. (2001) Variations in the human phospholipase Cgamma2 gene in patients with B-cell defects of unknown etiology. *Immunogenetics*, 53, 550-556.
- Warren, L.A. and Rothenberg, E.V. (2003) Regulatory coding of lymphoid lineage choice by hematopoietic transcription factors. *Curr Opin Immunol*, 15, 166-175.
- Webb, C.F., Dou, S., Buchanan, K.L., Resta, R., Smithson, G. and Smith, E.A. (1997) Reassessment of germline heavy chain transcripts from two murine VH families. *Mol Immunol*, 34, 743-750.
- Wegner, M., Drolet, D.W. and Rosenfeld, M.G. (1993) POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr Opin Cell Biol*, 5, 488-498.
- Weiss, M.J., Keller, G. and Orkin, S.H. (1994) Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev*, 8, 1184-1197.
- Wirth, T., Staudt, L. and Baltimore, D. (1987) An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature*, 329, 174-178.
- Wirth, T., Priess, A., Annweiler, A., Zwilling, S. and Oeler, B. (1991) Multiple Oct2 isoforms are generated by alternative splicing. *Nucl. Acids Res.*, 19, 43-51.
- Wirth, T., Pfisterer, P., Annweiler, A., Zwilling, S. and König, H. (1995) Molecular principles of Oct2-mediated gene activation in B cells. *Immunobiol.*, 193, 161-170.
- Wolf, I., Pevzner, V., Kaiser, E., Bernhardt, G., Claudio, E., Siebenlist, U., Forster, R. and Lipp, M. (1998) Downstream activation of a TATA-less promoter by Oct-2, Bob1, and NF- kappaB directs expression of the homing receptor BLR1 to mature B cells. *J Biol Chem*, 273, 28831-28836.
- Wolstein, O., Silkov, A., Revach, M. and Dikstein, R. (2000) Specific interaction of TAFII105 with OCA-B is involved in activation of octamer-dependent transcription. *J Biol Chem*, 275, 16459-16465.
- Worm, M., Krah, J.M., Manz, R.A. and Henz, B.M. (1998) Retinoic acid inhibits CD40 + interleukin-4-mediated IgE production in vitro. *Blood*, 92, 1713-1720.
- Yamasaki, L. (1999) Balancing proliferation and apoptosis in vivo: the Goldilocks theory of E2F/DP action. *Biochim Biophys Acta*, 1423, M9-15.
- Yang, L., Luo, H., Vinay, P. and Wu, J. (1996) Molecular cloning of the cDNA of mouse mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and the expression of the gene during lymphocyte activation. *J Cell Biochem*, 60, 400-410.

## Literatur

---

- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation, *Nat Genet*, 16, 161-70.
- Yeh, K. and Lim, R.W. (2000) Genomic organization and promoter analysis of the murine Id3 gene. *Gene*, 254, 163-171.
- Yu, X., Wang, L., Luo, Y. and Roeder, R.G. (2001) Identification and characterization of a novel OCA-B isoform. implications for a role in B cell signaling pathways. *Immunity*, 14, 157-167.
- Zhuang, Y., Soriano, P. and Weintraub, H. (1994) The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell*, 79, 875-884.
- Zile, M.H. (2001) Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr*, 131, 705-708.
- Zimmermann, K., Kautz, S., Hajdu, G., Winter, C., Whalen, R.G. and Starzinski-Powitz, A. (1990) Heterogenic mRNAs with an identical protein-coding region of the human embryonic myosin alkali light chain in skeletal muscle cells. *J Mol Biol*, 211, 505-513.
- Zon, L.I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H.F. and Orkin, S.H. (1991) Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10638-10641.
- Zwilling, S., Annweiler, A. and Wirth, T. (1994) The POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. *Nucl. Acids Res.*, 22, 1655-1662.
- Zwilling, S., Konig, H. and Wirth, T. (1995) High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J*, 14, 1198-1208.
- Zwilling, S., Dieckmann, A., Pfisterer, P., Angel, P. and Wirth, T. (1997) Inducible expression and phosphorylation of coactivator BOB.1/OBF.1 in T cells. *Science*, 277, 221-225.

### 7. LEBENS LAUF

Helmut Laumen

Scheffelstrasse 3

97072 Würzburg

geboren am 03.01.1970 in Immerath

ledig - eine Tochter

- 1976-1980    Grundschule Erkelenz-Gerderath
- 1980-1989    Realschule Ratheim / Kreisgymnasium Heinsberg und Städtisches  
Gymnasium Schleiden/Eifel mit Abschluss Abitur
- 1989-1990    Zivildienst beim Malteser-Hilfsdienst Hamm
- 1990-1996    Biologiestudium (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg.  
Diplomarbeit in der Abteilung Stoffwechsel der Hoechst AG Frankfurt/M  
zum Thema „Einfluß des LDL-Rezeptor-mRNA-Induktors Hoe auf die  
SREBP-1 und -2 Transkriptionsfaktoren.“.  
Betreuer: Dr. M. Leineweber, Hoechst AG Frankfurt/M und Prof. M. Gross,  
Institut für Biochemie der Universität Würzburg.
- 1996-2000    Promotionsstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg am MSZ (Universität Würzburg) sowie am Institut für  
Physiologische Chemie (Universität Ulm).  
Betreuer: Prof. T. Wirth (Institut für Physiologische Chemie Universität  
Ulm)  
Prof. T. Raabe (MSZ und Biologische Fakultät der Universität Würzburg)
- 2001         Wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Würzburg,  
Lehrstuhl für Physiologische Chemie I
- 2002-2004    Erziehungszeit, Betreuung meiner Tochter Lena

### 8. ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass diese Dissertation noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den dargelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben, noch zu erwerben versucht.

Würzburg, den 22.12.2004

Helmut Laumen