

Blimp-1 Δ exon7:

Eine natürlich vorkommende Blimp-1 Deletionsmutante

mit autoregulativen Eigenschaften

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

vorgelegt von

Doris Schmidt

aus

Ansbach

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

1. Gutachter: PD Dr. Berberich

2. Gutachter: Professor Dr. Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Würzburg, den 27.07.2007

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe in keinem früheren Verfahren einen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Doris Schmidt

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 17. März 2003 bis 31. Dezember 2006 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Professor Dr. Anneliese Schimpl und PD Dr. Ingolf Berberich angefertigt.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Ingolf Berberich für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit, seine unermüdliche Bereitschaft zu sehr lehrreichen und interessanten Diskussionen, seine Geduld und die kritische Auseinandersetzung mit wissenschaftlichen Themen. Zusammen mit der jederzeit gewährten Unterstützung und Freiheit hat er wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Schimpl danke ich besonders für die Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und ihr Verständnis der Immunologie, mit der sie diese Arbeit bereichert hat.

Frau Dr. Berberich-Siebelt und ihrer Arbeitsgruppe danke ich von Herzen für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen Anregungen. Durch ihr stetes Interesse und ihre tatkräftige Unterstützung sind Teile dieser Arbeit erst möglich geworden.

Herrn Prof. Dr. Hünig danke ich ganz herzlich für sein stetes Interesse an dieser Arbeit und dass er mir die Möglichkeit gab, am Graduiertenkolleg Immunmodulation teilzunehmen.

Frau Andrea Peters danke ich besonders für die schöne Arbeitsatmosphäre und für ihre Geduld beim Klonieren und Pipettieren unzähliger PCRs.

Frau Chris Kraus danke ich ganz herzlich für ihre Unterstützung und die sorgfältige Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer in jeder Weise unterstützt hat, ein offenes Ohr und viel Geduld hatten, und mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die bisher nicht genannt worden sind, aber in irgendeiner Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. DANKE!

1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem	1
1.1.1	Angeborenes Immunsystem	1
1.1.2	Adaptives Immunsystem.....	2
1.2	Zellen des adaptiven Immunsystems	4
1.2.1	T-Lymphozyten	4
1.2.2	B-Lymphozyten	6
1.3	Entwicklung der Zellen des Immunsystems	7
1.3.1	Frühe B-Zellentwicklung	8
1.3.2	Transkriptionsfaktoren in der frühen B-Zellentwicklung	9
1.3.3	B-Zellentwicklung in der Peripherie.....	11
1.3.4	Transkriptionsfaktoren in der späten B-Zellentwicklung	13
1.4	Terminale B-Zelldifferenzierung und Blimp-1	14
1.4.1	Blimp-1 als transkriptioneller Repressor	15
1.4.2	Regulation der Blimp-1 Expression.....	17
1.5	Ziele der Arbeit	19
2	Material	20
2.1	Antibiotika	20
2.2	Antikörper	20
2.3	Bakterien	21
2.4	Chemikalien	22
2.5	Enzyme	23
2.6	Filmmaterial	23
2.7	Medien	23

2.8 Kits	24
2.9 Plasmide	25
2.10 Klonierungen.....	26
2.11 Oligonukleotide für RT-PCR	26
2.12 Puffer und Lösungen	28
2.13 Zelllinien.....	29
3 Methoden	30
3.1 Zelluläre Methoden.....	30
3.1.1 Ermittlung der Zellzahl	30
3.1.2 Stimulation von primären B-Zellen	30
3.1.3 Stimulation von WEHI 231 Zellen	31
3.1.4 Kultivierung primärer B-Zellen	31
3.1.5 Kultivierung der Zelllinien	31
3.1.6 Transfektion/Infektion.....	31
3.1.7 Durchflußzytometrie	32
3.1.7.1 Oberflächenfärbung.....	33
3.1.7.2 Annexin V Färbung.....	33
3.1.8 Isolation von B-Lymphozyten aus Milzzellen.....	34
3.1.9 Lymphozytenisolierung aus Vollblut oder Buffycoat.....	36
3.2 RNA und DNA Techniken	36
3.2.1 RNA-Isolation aus Zellen.....	36
3.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA	37
3.2.3 RNA-Gel.....	37
3.2.4 Synthese von cDNA.....	37
3.2.5 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)- Ansatz mit cDNA als Template	38

3.2.6 Klonierungen	38
3.2.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	39
3.2.8 Minipräparation von Plasmid-DNA.....	40
3.2.9 Maxipräparation von Plasmid-DNA	40
3.2.10 DNA-Agarosegele.....	41
3.2.11 Konzentrationsbestimmung der DNA	41
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.3.1 Proteinextrakte zur Analyse der IgM Produktion	42
3.3.2 Herstellung von Kern- und Zytoplasmaextrakten.....	42
3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting	44
3.3.3.1 Herstellung der Gele.....	44
3.3.3.2 Western Blotting	45
3.3.3.3 Immunologische Detektion.....	46
3.4 Immunhistochemische Methoden.....	46
3.4.1 ELISPOT: enzyme-linked immunosorbent assay zum Nachweis der IgM-Sekretion auf Einzelzellniveau.....	46
3.4.2 Immunhistochemische Färbung	48
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Blimp-1Δexon7 mRNA wird in CD19+ B-Zellen exprimiert.....	49
4.2 Menge an Blimp-1Δexon7 mRNA variiert in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	51
4.3 Blimp-1ΔEx7F zeigt eine teilweise Kernlokalisierung	53
4.4 Ektopische Expression von Blimp-1ΔEx7F führt zu Zellzyklusarrest.....	55
4.5 Ektopische Expression von Blimp-1ΔEx7F induziert Apoptose.....	57
4.6 Blimp-1ΔEx7-GFP ist mit heterochromatischer DNA assoziiert	59
4.7 Überexpression von Blimp-1ΔEx7F induziert keine IgM-Sekretion.....	63

4.8 Blimp-1ΔEx7F blockiert die LPS-induzierte IgM-Sekretion	65
4.9 Ektopische Expression von Blimp-1ΔEx7F führt zu verminderter Expression von endogener Blimp-1 mRNA.....	66
4.10 Blimp-1ΔEx7F vermindert die Aktivität des <i>prdm1</i>-Promotors.....	68
5 Diskussion	71
5.1 Blimp-1Δexon7 wird während der B-Zellentwicklung stadienspezifisch exprimiert.....	72
5.2 Zinkfinger sind wichtig für Kernlokalisierung und DNA-Interaktion.....	72
5.3 Blimp-1ΔEx7 ist im Kern mit heterochromatischer DNA assoziiert.....	74
5.4 Ektokopische Expression von Blimp-1ΔEx7 führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose	76
5.5 Blimp-1ΔEx7 stört die Blimp-1 Expression und die terminale B- Zelldifferenzierung.....	78
6 Zusammenfassung	81
7 Summary.....	82
8 Literatur.....	83
8.1 Originalarbeiten.....	83
8.2 Weitere Literatur	88
9 Anhang.....	89
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	89
9.2 Publikationen	91
9.3 Lebenslauf	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entwicklung von Plasmazellen	13
Abbildung 2: Die Proteindomänen von Blimp-1	17
Abbildung 3: Blimp-1 Δ exon7 cDNA und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz	18
Abbildung 4: PCR-Strategie zur Amplifikation von Blimp-1 und Blimp-1 Δ exon7 cDNA	27
Abbildung 5: PCR-Strategie zur Amplifikation von endogener Blimp-1 cDNA	28
Abbildung 6: CD19 ⁺ B-Zellen haben eine relativ erhöhte Blimp-1 Δ exon7 mRNA Menge	50
Abbildung 7: Blimp-1 Δ exon7 mRNA ist nach Stimulation nicht mehr nachweisbar	52
Abbildung 8: Subzelluläre Lokalisation von Blimp-1 Δ Ex7	54
Abbildung 9: Blimp-1 Δ Ex7F interferiert mit der Proliferation	57
Abbildung 10: Blimp-1 Δ Ex7F induziert Apoptose in WEHI 231 Zellen	59
Abbildung 11: Blimp-1 Δ Ex7-GFP kolokalisiert partiell mit H3-K9 und HDAC2	62
Abbildung 12: Die ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7F induziert keine IgM-Sekretion in WEHI 231 Zellen	64
Abbildung 13: Die ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7F induziert keine IgM-Sekretion in primären B-Zellen	65
Abbildung 14: Blimp-1 Δ Ex7F interferiert mit LPS-induzierter IgM-Sekretion	66
Abbildung 15: In Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7F ist weniger endogene Blimp-1 mRNA nachweisbar	67
Abbildung 16: Blimp-1 Δ Ex7F reduziert die <i>prdm1</i> -Promotoraktivität	69

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus verschiedenen Zellen und Molekülen, die zusammen eine wirkungsvolle Abwehr gegen Krankheitserreger bilden. Sowohl pathogene Organismen, Fremdmoleküle, als auch „entartete“ körpereigenen Zellen wie beispielsweise Tumorzellen werden vom Immunsystem erkannt und bekämpft.

Im Wesentlichen wird das Immunsystem in zwei Komponenten unterteilt: Das angeborene Immunsystem und das erworbene oder adaptive Immunsystem, das im Folgenden kurz skizziert wird.

Hieran anschließend erfolgt eine Betrachtung der Zellen des adaptiven Immunsystems, mit dem Schwerpunkt auf B- und T-Zellen. Darauf folgt ein kurzer Überblick über deren Hämatopoese, wobei im Speziellen die Hämatopoese der B-Lymphozyten näher betrachtet wird. Den Abschluss dieses Kapitels bildet eine Zusammenfassung der terminalen B-Zelldifferenzierung.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem (1, 2)

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Abwehrlinie des Körpers gegen verschiedene Krankheitserreger und verhindert in vielen Fällen, dass sich eine Infektion etablieren kann. Epitheloberflächen hindern die Erreger daran in den Körper zu gelangen. Daher können viele Bakterien und Viren nur durch spezielle Wechselwirkungen mit den Zelloberflächen in den Körper eindringen. Krankheitserreger, denen es gelungen ist diese Barriere zu überwinden, werden entweder durch das Komplementsystem oder durch

Makrophagen sowie Neutrophile, die weitere Bestandteile der angeborenen Immunität darstellen, eliminiert.

Im Unterschied zu Zellen der adaptiven Immunität erkennen Makrophagen und Neutrophile ausschließlich Strukturen, die hoch konserviert und charakteristisch für mikrobielle Krankheitserreger sind, und als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet werden. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (pattern-recognition receptors, PRRs) haben eine limitierte Diversität, die bereits in der Keimbahn kodiert ist. Da keine somatischen Rekombinationen zur „Verfeinerung“ der Rezeptoren stattfinden muss, ist ein schnelles Erkennen mit anschließender Zerstörung der Krankheitserreger möglich [1].

Wenn ein Krankheitserreger von Makrophagen phagozytiert wurde, setzen diese Cytokine frei, die eine adaptive Immunantwort auslösen können und gleichzeitig die Art der adaptiven Immunantwort beeinflussen.

1.1.2 Adaptives Immunsystem (1)

Entgeht ein Krankheitserreger der angeborenen Immunität bzw. wird eine bestimmte Antigenmenge überschritten, wird die adaptive Immunantwort ausgelöst. Diese ist in der Lage Pathogene spezifischer und effizienter zu erkennen und zu eliminieren.

Die adaptive Immunantwort ist im Wesentlichen charakterisiert durch: Antigenpezifität, Diversität, immunologisches Gedächtnis und Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“.

1. Antigenpezifität

Die einzelnen Komponenten des adaptiven Immunsystems sind spezifisch für verschiedene Moleküle von Krankheitserregern und daher in der Lage, auf kleinste Unterschiede zwischen den Krankheitserregern oder den pathogenen Molekülen zu reagieren. Dabei können Proteine erkannt werden, die sich in nur einer Aminosäure unterscheiden.

2. Diversität

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem sind die Antigenerkennungsstellen der Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sehr unterschiedlich. Diese Diversität entsteht durch somatische Rekombinationen der Gensegmente, die für die entsprechenden Antigenrezeptoren kodieren. Diese Rekombinationen werden durch RAG-Proteine (rekombinationsaktivierende Gene) vermittelt. Im Prinzip können auf diese Weise Antigenrezeptoren gegen beliebig verschiedene Moleküle oder Strukturen generiert werden.

3. Ausbilden eines immunologischen Gedächtnisses

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems haben eine begrenzte Lebensdauer. Wenn das Antigen nicht mehr vorhanden ist, begehen die meisten antigenspezifischen Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose). Einige Zellen überleben jedoch und ermöglichen so eine schnellere und wirksamere Reaktion auf eine erneute Infektion mit demselben Krankheitserreger, was zu einer andauernden Immunität führt. Dieses Prinzip des immunologischen Gedächtnisses bildet auch die Grundlage für Impfungen.

4. Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind in der Lage auf viele verschiedene fremde („Nicht-Selbst“) Moleküle und Strukturen zu reagieren, ohne körpereigene („Selbst“) Strukturen anzugreifen. Die Selbst-Toleranz der Effektorzellen beruht auf der Inaktivierung von Zellen mit „Selbst“ erkennenden Rezeptoren während ihres

Reifungsprozesses. Ist dieser Mechanismus gestört, kommt es zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen.

1.2 Zellen des adaptiven Immunsystems (1)

Das adaptive Immunsystem besteht hauptsächlich aus drei Zelltypen: T-Lymphozyten (T-Zellen), B-Lymphozyten (B-Zellen) und antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APCs) wie Dendritische Zellen. Durch die Kooperation von APCs und T-Lymphozyten wird eine effektive Immunantwort eingeleitet. Dabei wird das von Dendritischen Zellen aufgenommene und prozessierte Antigen den T-Lymphozyten als Peptid präsentiert, wodurch diese aktiviert werden und eine Immunreaktion ausgelöst wird. Die Reifung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten findet in lymphatischen Organen statt. Dabei unterscheidet man zwischen primären und sekundären lymphatischen Organen. Die Reifung der B- und T-Lymphozyten in antigenerkennende Lymphozyten findet in den primären lymphatischen Organen statt, wobei B-Zellen im Knochenmark heranreifen und T-Zellen in der Thymusdrüse. In den sekundären lymphatischen Organen, wie Milz und Tonsillen, findet die Antigenpräsentation durch APCs statt, wodurch die Lymphozyten verstärkt proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren.

1.2.1 T-Lymphozyten (1, 5)

T-Zellen reifen im Thymus. Aus diesem Grund werden sie thymusabhängige (T-) Lymphozyten oder T-Zellen genannt. Die unreifen T-Zellen (Thymozyten) proliferieren und differenzieren im Thymus, wobei sie eine Reihe definierter Stadien durchlaufen, die durch die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern charakterisiert sind [2]. Die ausgereiften T-Zellen, die auch als naive, reife T-Zellen bezeichnet werden, verlassen den

Thymus und übersiedeln in die Peripherie, um hier ihre Funktion als Effektorzellen der adaptiven Immunantwort zu erfüllen.

Einzelne T-Zellen exprimieren an der Oberfläche einen Antigenrezeptor (T-Zell-Rezeptor, T cell receptor, TCR) mit einer einzigen Spezifität. Der TCR erkennt kein freies Antigen, sondern reagiert auf Antigene, die von APCs zusammen mit Haupthistokompatibilitätskomplex – (major histocompatibility complex, MHC) Molekülen präsentiert werden. Es existieren zwei verschiedene Hauptklassen von MHC-Molekülen, bezeichnet als MHC-Klasse-I und -II. MHC-Klasse-I-Moleküle werden von fast allen Zellen exprimiert, wo hingegen MHC-Klasse-II-Moleküle ausschließlich von APCs präsentiert werden. Trifft eine naive T-Zelle auf einen zu ihrem TCR passenden Antigen-MHC-Komplex, fängt sie an zu proliferieren und differenziert zur Effektorzelle oder Gedächtniszelle. Dafür benötigt sie jedoch nicht nur das TCR-Signal, sondern zusätzlich ein zweites, so genanntes kostimulatorisches Signal, welches sie ebenfalls von den APCs erhält [3, 4].

Man unterscheidet zwei funktionelle Untergruppen der T-Zellen. Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind, werden von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen erkannt. Die Aufgabe dieser Zellen besteht darin, Zellen die mit Viren oder im Zytosol lebenden Bakterien infiziert sind, zu töten. Erkennt eine $CD8^+$ T-Zelle ein Antigen und erhält zusätzlich ein kostimulatorisches Signal, so differenziert sie zur Effektorzelle, einem zytotoxischen T-Lymphozyt (CTL). Dieser kann dann infizierte Zellen oder Zellen, die ein abnormes Antigen exprimieren, töten.

Krankheitserreger in den vesikulären Kompartimenten der Zelle werden von MHC-Klasse-II-Molekülen den $CD4^+$ T Helfer- (T_H) Zellen präsentiert. Diese Zellen sind darauf spezialisiert, bestimmte Cytokine frei zu setzen und dadurch andere Zellen des

Immunsystems zu aktivieren. In Abhängigkeit von den produzierten Cytokinen können CTL's, B-Zellen aber auch phagozytierende Zellen des Immunsystems aktiviert werden.

1.2.2 B-Lymphozyten (1, 3)

Der Name der B-Lymphozyten leitet sich von der Bursa Fabricii ab, einem primären lymphatischen Organ bei Vögeln, in dem die B-Zellen reifen. In Säugetieren reifen die B-Zellen im Knochenmark heran.

Alle B-Zellen exprimieren eine membrangebundene Form von Immunglobulinen (Ig), die zusammen mit den Signalübertragungseinheiten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ den Antigen- oder B-Zell-Rezeptor (B cell receptor, BCR) bilden. Ein Ig-Molekül besteht aus zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten) und zwei identischen schweren Ketten (H-Ketten), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede der vier Ketten besteht aus einer variablen Region, die zur antigenbindenden Stelle beiträgt und einer konstanten Region, die im Fall der H-Ketten den Isotyp und damit die funktionellen Eigenschaften bestimmt. Außerdem haben alle Oberflächenimmunglobuline einer B-Zelle dieselbe Spezifität.

In naiven B-Zellen ist das Immunglobulin des BCR vorwiegend IgM. Wenn ein Antigen an dieses membranständige IgM bindet, werden im Zellinneren Signalkaskaden ausgelöst, die zur Aktivierung der Zelle führen. Allerdings reicht die Quervernetzung des BCR alleine meist nicht aus, um eine B-Zelle zu anhaltender Proliferation oder Immunglobulin Sekretion anzuregen. Zusätzlich sind bestimmte Cytokine von T_H -Zellen notwendig um diese Prozesse in der B-Zelle zu induzieren. Diese Form der T-zellabhängigen B-Zellaktivierung findet vorwiegend in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe statt. Unter dem Einfluss von Cytokinen vollzieht sich dort der Klassenwechsel der H-Ketten und es finden somatische Hypermutationen zur Ausbildung eines spezifischen

BCR statt [5]. Wenn die B-Zellen die Keimzentren verlassen, tragen sie einen hochaffinen BCR an der Oberfläche und differenzieren weiter zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Als Plasmazellen produzieren und sezernieren sie innerhalb kurzer Zeit große Mengen an Immunglobulinen. Gedächtniszellen sezernieren keine Antikörper, werden aber bei einem nachfolgenden Kontakt mit demselben Antigen schneller als naive B-Zellen aktiviert.

B-Zellen können auch ohne T-Zell Hilfe zur Immunglobulinsekretion angeregt werden. Dies geschieht vor allem durch repetitive Strukturen, wie bakterielle Polysaccharide oder polymere Proteine, oder auch durch Bestandteile von gram-negativen Bakterien, wie das Lipopolysaccharid (LPS). LPS bindet an LPS-bindendes Protein (LBP) im Serum und dieser Komplex interagiert dann mit CD14. Nach der Dissoziation von LBP, reagiert der LPS-CD14 Komplex mit dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) und löst so intrazelluläre Signalkaskaden aus, die auch über das NF- κ B- (nuclear factor- κ B) System [6], zur Aktivierung der B-Zelle führen [7]. Im Gegensatz zu der T-zellabhängigen B-Zellantwort entsteht vor allem IgM und es wird kein immunologisches Gedächtnis ausgebildet.

1.3 Entwicklung der Zellen des Immunsystems

Wie alle Zellen des Blutes stammen auch die Zellen des Immunsystems von pluripotenten Stammzellen (hematopoietic stem cell, HSC) des Knochenmarks ab. Diese HSCs sind für die lebenslange Produktion der Blutzellen, mit Ausnahme der T-Zellen verantwortlich. Aus den HSCs entwickeln sich sowohl lymphoide Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor, CLP), als auch myeloide Vorläuferzellen (common myeloid progenitor, CMP). Aus CLPs entwickeln sich dann T-, B-, und natürliche Killerzellen (NK)-Zellen, jedoch keine myeloiden Zellen. Diese stammen ausschließlich von CMPs ab und werden später zu Makrophagen, Neutrophilen, Basophilen und Erythrozyten. Dendritische Zellen können

sich sowohl aus CLP's als auch aus CMP's entwickeln. Während der verschiedenen Differenzierungsstadien verlieren die Zellen zunehmend ihre Pluripotenz und spezialisieren sich auf die Eigenschaften des jeweiligen Zelltyps [8-10].

Im Folgenden soll die Entwicklung der B-Lymphozyten näher betrachtet werden.

1.3.1 Frühe B-Zellentwicklung (1, 2)

Die Entwicklung von B-Zellen aus den CLPs erfolgt zuerst in der fötalen Leber und nach der Geburt im Knochenmark. Dabei entstehen aus undifferenzierten B-Zellen, solche B-Zellen, die einen funktionellen BCR an der Oberfläche tragen.

Im Knochenmark durchlaufen die B-Zellen verschiedene Reifungsstadien, die vor allem durch die Umordnung der unterschiedlichen Immunglobulingene gekennzeichnet sind, und erst mit der Ausbildung eines funktionellen BCR an der Oberfläche enden.

Die frühesten Zellen der B-Linie sind die Pro- B-Zellen. In diesen Zellen findet die Umordnung der Gensegmente für den variablen Teil der H-Kette der Immunglobuline statt. Auf die D_H - J_H - Verknüpfung der frühen Pro- B-Zellen folgt die V_H - DJ_H - Verknüpfung in den späten Pro- B-Zellen. Eine erfolgreiche VDJ_H - Verknüpfung führt zur Expression einer intakten μ - H-Kette, dem Kennzeichen einer Prä- B-Zelle. Die Prä- B-Zellen exprimieren vorübergehend an der Oberfläche den Prä- B-Zellrezeptor, bestehend aus zwei umgeordneten μ - H-Ketten, den Signalübertragungseinheiten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ und der Ersatz-L-Kette, die aus $VpreB$ und $\lambda 5$ zusammengesetzt ist. Über den Prä- B-Zellrezeptor werden Signale an das Zellinnere übermittelt, die für die weitere B-Zellentwicklung essentiell sind und auch das Überleben der Zelle sicherstellen. Darüber hinaus bewirkt das Prä- B-Zellrezeptor Signal, dass die Zellen in den Zellzyklus eintreten, so dass sich Zellen mit intakter VDJ_H -Kette vermehren. Zudem verhindert das Signal eine weitere

Rekombination des H-Ketten-Locus. Etwa 75% aller B-Zellen sterben in diesem Entwicklungsstadium, da die Rekombination ihrer H-Ketten-Loci nicht erfolgreich war (positive Selektion).

In der weiteren Entwicklung der B-Zelle kommt es zur Umordnung der L-Ketten-Gene. Sobald diese abgeschlossen ist und ein komplettes IgM-Molekül auf der Oberfläche exprimiert wird, spricht man von einer unreifen B-Zelle. Wenn der Oberflächenrezeptor der unreifen B-Zellen „Selbst“-Antigene erkennt, werden auch diese Zellen apoptotisch (negative Selektion) oder werden funktionell inaktiviert (anerg) [11].

Die Oberflächen-IgM⁺, naiven B-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in die sekundären lymphatischen Organe, um dort zu reifen B-Zellen zu differenzieren, die neben IgM auch IgD an der Oberfläche tragen. Da die B-Zellen ihre Entwicklung noch nicht komplettiert haben, führt eine Stimulation des BCR in diesem Stadium entweder zur Apoptose oder zur Anergie (fehlende Reaktivität auf Antigene). Erst wenn die Zellen ihren Differenzierungsprozess zur reifen B-Zelle (IgM⁺ und IgD⁺) abgeschlossen haben und auf ihr spezifisches Antigen treffen, können die Zellen in der Anwesenheit notwendiger kostimulatorischer Signale aktiviert werden und die terminalen Differenzierungsschritte zur Plasmazelle oder Gedächtniszelle einleiten [12, 13].

1.3.2 Transkriptionsfaktoren in der frühen B-Zellentwicklung

Die B-Zellentwicklung wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gesteuert. Diese Transkriptionsfaktoren werden stadienspezifisch exprimiert und kennzeichnen so das jeweilige Entwicklungsstadium der B-Zelle.

PU.1, ein Transkriptionsfaktor aus der Ets-Familie, entscheidet über hämatopoetische Zellschicksale indem er die Transkription B-zellspezifischer Gene induziert [14]. PU.1

wird exprimiert, wenn aus der HSC ein CLP oder CMP wird. Dabei bestimmt die Menge an PU.1 darüber, ob die Entwicklung in Richtung B-Zellen oder Makrophagen verläuft. Eine schwache PU.1 Genexpression favorisiert eine Entwicklung in Richtung B-Zelllinie, wohingegen eine starke PU.1 Expression eine Entwicklung in Richtung myeloider Zellen begünstigt [15]. Darüber hinaus ist IKAROS als weiterer Transkriptionsfaktor zusammen mit PU.1 in den ersten Phasen der B-Zellentwicklung wichtig [16]. Nachdem durch PU.1 die Entwicklung in Richtung der B-Linie eingeleitet wurde, spielen in den darauf folgenden Entwicklungsstadien vor allem die Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und Pax5 eine wesentliche Rolle.

E2A ist ein Transkriptionsfaktor, der an E Box Elemente in den regulatorischen Modulen vieler Gene bindet [17]. Die Induktion von E2A zu Beginn der B-Lymphopoese ist wichtig, da in $E2A^{-/-}$ Mäusen am I_{gH} Locus keine V_H nach DJ_H Rekombination stattfindet und daher die B-Zellentwicklung bereits in einem sehr frühen Stadium blockiert ist [18, 19].

EBF (early B-cell factor) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor dessen Expression in diesem frühen Stadium der B-Zellentwicklung notwendig ist. Zusammen mit E2A reguliert er die Expression vieler B-zellspezifischer Gene wie beispielsweise $\lambda 5$, $VpreB$ und RAG1/2 [20-24].

Pax5 oder BSAP (B-cell-specific activator protein) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor dessen Expression schon sehr früh in der B-Zellentwicklung (Pro- B-Zellstadium) beginnt und erst im Plasmazellstadium endet. Pax5 ist vor allem notwendig, um die Zelle auf die B-Linie festzulegen (commitment factor) und um das B-zellspezifische Transkriptionsprogramm aufrecht zu erhalten. Dabei reprimiert Pax5 Gene, die für die B-Zellentwicklung nicht notwendig sind (*Notch1*, *Cd28*) und fördert gleichzeitig die Expression B-zellspezifischer Gene (*Cd19*, *Blnk*) [25-27]. Durch die Inaktivierung von

Pax5 in Pro- B-Zellen erlangen diese ihre Fähigkeit zurück *in vitro* zu Makrophagen und *in vivo* zu T-Zellen zu differenzieren [28]. Durch die Aktivierung von $Ig\alpha$, dem Korezeptor CD19 und des Adapterproteins Blnk ermöglicht Pax5 auch die Prä- B-Zellrezeptor-Signaltransduktion, einem wichtigen Kontrollpunkt der frühen B-Zellentwicklung.

1.3.3 B-Zellentwicklung in der Peripherie (1)

Nachdem die B-Zellen das Knochenmark verlassen haben, wandern sie zu den sekundären lymphatischen Organen. Dabei unterscheidet man zwei verschiedenen Subpopulationen: Follikuläre B2-Zellen (FO B-Zellen) und Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen). Eine weitere B-Zellpopulation stellen B1 B-Zellen dar. Sie werden in der Fötalen Leber gebildet und besiedeln im Erwachsenen als sich selbst erneuernde Zellen das Peritoneum [29-31]. Alle drei Subpopulationen unterscheiden sich aufgrund ihrer Oberflächenmarker, funktioneller Eigenschaften und ihrer anatomischen Lokalisation [32-34].

B1 B-Zellen siedeln sich vor allem in der Bauchfell- und Brusthöhle an und unterscheiden sich von den FO B-Zellen, da die meisten B1 B-Zellen den Oberflächenmarker CD5 tragen. Sie exprimieren vor allem IgM und kaum IgD an der Zelloberfläche und können schnell zu antikörpersezernierenden Plasmazellen differenzieren [35].

MZ B-Zellen befinden sich in der Marginalzone der Milz. Das in die Milz einströmende Blut passiert die Marginalzone und die darin enthaltenen MZ B-Zellen. Da sie so „strategisch günstig“ positioniert sind können MZ B-Zellen relativ schnell auf im Blut transportierte Antigene reagieren. Im Unterschied zu den FO B-Zellen exprimieren MZ B-Zellen große Mengen an IgM aber sehr wenig IgD und CD23 an der Oberfläche. MZ B-Zellen und B1 B-Zellen können sehr schnell zu Plasmazellen differenzieren und sind dabei nicht auf T_H -Zellen angewiesen. Obwohl die von ihnen produzierten Antikörper eine eher

schwache Antigenaffinität aufweisen, stellen sie eine erste, schnelle Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene dar [36].

FO B-Zellen reifen in den B-Zellbereichen der Milz (oder der Lymphknoten), die an die T-Zellbereiche angelagert sind, in Abhängigkeit von T_H -Zellen zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Sie unterscheiden sich von MZ B-Zellen und B1 B-Zellen unter anderem dadurch, dass sie einen für ein entsprechendes Antigen hochaffinen BCR exprimieren.

Eine Bindung des Antigens an eine naive B-Zelle bewirkt, dass die B-Zelle aktiviert wird. Sie proliferiert verstärkt, exprimiert bestimmte Oberflächenmoleküle und prozessiert das Antigen um es über MHC-Klasse-II-Moleküle den T_H -Zellen zu präsentieren. Diese Interaktion verstärkt wiederum die Aktivierung der T_H -Zellen, ihrerseits Oberflächenmoleküle zu exprimieren und Cytokine zu sezernieren, welche die B-Zellen weiter aktivieren. Durch diesen engen Kontakt zwischen B- und T-Zellen bilden sich so genannte Keimzentren aus, in denen sich die beiden Zelltypen wechselseitig aktivieren. Die antigenspezifischen B-Zellen proliferieren sehr stark und ihr BCR durchläuft eine Affinitätsreifung, um am Ende einen für das entsprechende Antigen hochaffinen BCR zu präsentieren. Diese Affinitätsreifung besteht im Wesentlichen aus dem Klassenwechsel der H-Ketten und aus somatischer Hypermutation [37, 38].

Die B-Zelle kann das Keimzentrum entweder als Gedächtniszelle oder als Plasmablast verlassen [39]. Gedächtniszellen sind B-Zellen, die auch ohne Antigenkontakt relativ lange leben können. Sie zirkulieren im Blut oder besiedeln Lymphknoten, sezernieren aber keine Antikörper. Sobald ein erneuter Kontakt mit dem Antigen erfolgt, für das ihr BCR spezifisch ist, werden sie sofort aktiviert und ermöglichen so eine sehr schnelle Produktion von entsprechendem Antigen (Abb. 1).

Im Gegensatz dazu verlassen Plasmablasten die Keimzentren, um sich zu terminal differenzierten, nicht-poliferierenden Plasmazellen zu entwickeln, deren einzige Aufgabe darin besteht Antikörper zu sezernieren. Die meisten dieser Plasmazellen sterben sehr schnell, aber es wandern auch einige dieser Plasmablasten ins Knochenmark, um dort als langlebige Plasmazellen zu überleben [40, 41].

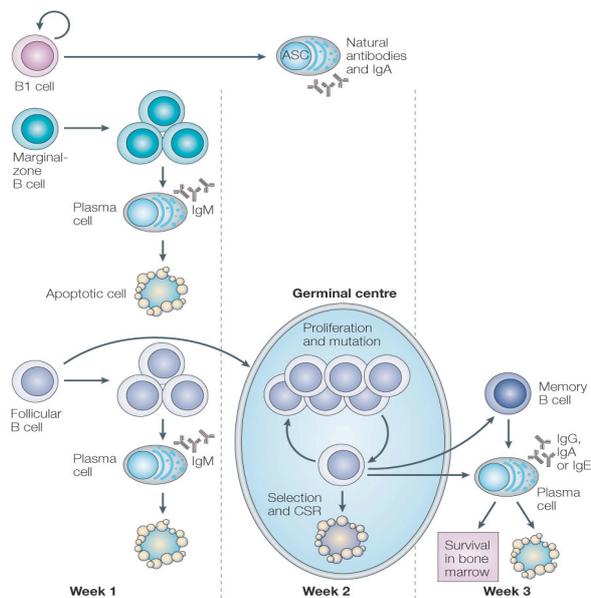


Abbildung 1: Die Entwicklung von Plasmazellen [39]

1.3.4 Transkriptionsfaktoren in der späten B-Zellentwicklung

Ebenso wie die frühen Stadien der B-Zellentwicklung sind auch die späten Stadien durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren charakterisiert.

Während der Keimzentrumsreaktion ist vor allem der Transkriptionsfaktor BCL-6 (B-cell lymphoma-6) von Bedeutung. Dies wird deutlich da in BCL-6^{-/-}-Mäusen die frühe B-Zellentwicklung normal verläuft, sich jedoch keine Keimzentren ausbilden können. [38, 42, 43].

Es wurden verschiedene Zielgene von BCL-6 identifiziert, die durch die Bindung von BCL-6 an das BCL-6 response element (BRE) reprimiert werden. Viele dieser Gene sind wichtig für die Plasmazelldifferenzierung und dürfen nicht vorzeitig, schon während der Keimzentrumsreaktion, aktiviert werden [44, 45]. Erst am Ende der Keimzentrumsreaktion wird durch Quervernetzung des BCR eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Phosphorylierung von BCL-6 durch MAP Kinasen führt, und nachfolgend zu dessen proteasomalem Abbau [46].

Neben BCL-6 spielt auch Pax5 eine entscheidende Rolle bei der Keimzentrumsreaktion, da es die Expression von activation-induced cytidine deaminase (AID) induziert, welches sowohl die somatische Hypermutation als auch den Klassenwechsel steuert [47]. Weitere Zielgene, die von Pax5 reprimiert werden, sind *Sdc1* (CD138) und *IgJ* [28]. Außerdem blockiert Pax5 die Expression von XBP-1, einem Protein, welches erst in der Plasmazelle zur Antikörperproduktion benötigt wird. [48-51]. Die Repression sowohl von Pax5 als auch von BCL-6 ist notwendig, damit die B-Zelle die Keimzentrumsreaktion abschließen, und die terminalen Differenzierungsschritte zur Plasmazelle durchlaufen kann.

1.4 Terminale B-Zelldifferenzierung und Blimp-1

Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, welche Signale die Keimzentrumsreaktion beenden und die terminale B-Zellentwicklung einleiten [39, 52]. Es wurde jedoch gezeigt, dass die terminale B-Zelldifferenzierung im Wesentlichen durch den Transkriptionsfaktor Blimp-1 (B lymphocyte induced maturation protein-1) gesteuert wird [40, 53], der in allen Plasmazellen nachgewiesen werden kann [54].

Blimp-1 wurde ursprünglich identifiziert, da es die Plasmazelldifferenzierung von BCL-1 B-Lymphomzellen ermöglicht [53]. Darüber hinaus ist die ektopische Expression von

Blimp-1 ausreichend, um sowohl in B-Zell-Lymphomlinien als auch in primären B-Zellen der Maus die Differenzierung zu IgM sezernierenden Zellen einzuleiten [53, 55, 56]. Mäuse mit einem B-zellspezifischen „knockout“ von *prdm1*, dem Blimp-1 kodierenden Gen, können weder in T-zellabhängiger noch in T-zellunabhängiger Weise Plasmazellen ausbilden und haben auch im Vergleich zu Kontrollmäusen stark reduzierte Serum Ig-Spiegel [57]. Darüber hinaus ist in diesen Mäusen die Anzahl langlebiger Plasmazellen im Knochenmark stark reduziert [58].

1.4.1 Blimp-1 als transkriptioneller Repressor

Murines Blimp-1, und sein humanes Homolog PRDI-BF1, sind transkriptionelle Repressoren aus der *prdm*-Familie (*PRDI-BF1* and *RIZ* homology domain), deren DNA-Bindung durch fünf Zinkfinger vermittelt wird [59]. Blimp-1 reprimiert verschiedene Transkriptionsfaktoren, was letztendlich dazu führt, dass die Zelle zur Plasmazelle differenziert [56, 60]. Dafür ist es wichtig, dass die Keimzentrumsreaktion abgeschlossen ist und Gene, die diese gesteuert haben nicht mehr aktiv sind. Darüber hinaus müssen die Zellen die Proliferation einstellen.

Blimp-1 reprimiert die Expression von BCL-6, wodurch keine weitere Keimzentrumsreaktion mehr möglich ist [61]. Darüber hinaus wird auch Pax5 durch Blimp-1 reprimiert, so dass viele Gene dereprimiert werden, die für die Ig-Sekretion und die Plasmazelldifferenzierung notwendig sind (*IgJ*, *Xbp1*) [56, 62].

Blimp-1 hat aber auch einen Einfluss auf Proliferation und Überleben der Zelle. Es unterdrückt die Proliferation zumindest zum Teil dadurch, dass es die Expression von *c-MYC* verhindert [63] und die Expression von MAD-4, p21 und p18 aktiviert [56]. Darüber hinaus führt die ektopische Expression von Blimp-1 in unreifen B-Zellen zur Apoptose, da

unter anderem das anti-apoptische BCL-2 Familienmitglied A1 durch Blimp-1 reprimiert wird [64].

Die B-Zelldifferenzierung ist weniger durch die initiale Aktivierung von Genen gekennzeichnet, als vielmehr durch die Repression von Genen, die in vorherigen Entwicklungsstadien aktiv waren. Diese unterdrückten ihrerseits Gene, die nur für die terminale Differenzierung benötigt werden. Somit fungiert Blimp-1 als Repressor, der durch die Repression von Zielgenen die Derepression der Gene bewirkt, die für die plasmazytische B-Zelldifferenzierung essentiell sind.

Blimp-1 ist ein großes Protein (98 kD), welches um die Expression seiner Zielgene zu unterdrücken, über verschiedene Proteindomänen mit Korepressoren interagiert. Neben dem Zinkfingermotiv vom *Drosophila* Krüppel-Typ C2H2, besitzt Blimp-1 noch zwei saure Domänen, eine am N- und eine am C-Terminus, eine PR (PRDI-BF1 and RIZ) Domäne und eine Prolinreiche Sequenz. Über die Prolinreiche Sequenz kann Blimp-1 mit dem Korepressor Groucho [65] und mit der Histondeacetylase-2 (HDAC2) interagieren [66]. Auch die Zinkfingerdomäne dient als Proteininteraktionsmotiv sowohl für HDAC2 als auch für Histon H3 Lysin 9 (H3-K9) Methyltransferase G9a [66, 67]. Die Rolle der PR Domäne ist noch nicht abschließend geklärt, aber in humanen Tumoren wurden Isoformen von Blimp-1 und anderen *prdm*-Familienmitgliedern gefunden, denen die PR-Domäne fehlt und deren Expression mit der Onkogenese verschiedener Tumore in Zusammenhang gebracht wird [68-71]. Die Funktion der zwei sauren Domänen ist noch unklar (Abb. 2).

Wenn Blimp-1 seine Zielsequenz erkannt hat, bindet es an die DNA und bildet eine Plattform, an die sich seine Korepressoren anlagern können. Für eine sequenzspezifische DNA-Bindung sind die ersten beiden Zinkfinger von Bedeutung [59]. Durch Anlagerung des Korepressors Groucho, die Interaktion mit HDAC2 und mit Histon H3 Lysin 9 Methyltransferase G9a wird ein Komplex aufgebaut, der das entsprechende Gen

inaktiviert. Auf diese Weise reguliert Blimp-1 die Expression von mehr als 200 Genen [56].



Abbildung 2: Die Proteindomänen von Blimp-1

Schematisch dargestellt sind die unterschiedlichen Proteindomänen von Blimp-1 wie sie im Text beschrieben sind.

Ac: saure Domäne, PR: PR-Domäne, Pro: Prolinreiche Sequenz, ZnF: Zinkfingerdomäne

1.4.2 Regulation der Blimp-1 Expression

Für eine optimale humorale Immunantwort ist es wichtig, dass Blimp-1 nicht vorzeitig exprimiert wird. Shaffer et al. konnten zeigen, dass Blimp-1 als direktes Zielgen während der Keimzentrumsreaktion von BCL-6 reprimiert wird [45]. Darüber hinaus interferiert BCL-6 auch mit dem transkriptionellen Aktivator AP-1, der *prdm1* aktivieren kann [72]. Nach dem Abbau von BCL-6 startet die Blimp-1 Expression, welches seinerseits wiederum die BCL-6 Expression unterdrückt.

Neben der transkriptionellen Kontrolle des *prdm1*-Lokus durch BCL-6, wird die *prdm1* Aktivierung in einer T-zellabhängigen Immunantwort auch durch verschiedene Cytokine reguliert. Die Quervernetzung des BCR zusammen mit IL-6 und IL-10 aktivieren STAT3, welches an seine Bindestelle in Intron 4 des *prdm1*-Gens bindet und dort dessen Expression induziert [61, 73, 74].

In einer T-zellunabhängigen Immunantwort bewirkt die Stimulation des TLR-4 die Aktivierung von NF- κ B [6]. Eine direkte Induktion von Blimp-1 durch NF- κ B ist noch

nicht gezeigt worden, aber es gibt NF- κ B Bindestellen in der Promotorregion von *prdm1*, und murine Fibroblasten und B-Zell-Lymphome denen die p50 und p65 Untereinheiten von NF- κ B fehlen, zeigen nach TLR-Aktivierung keine Blimp-1 Expression [39].

prdm1 wird in vier verschiedene mRNAs transkribiert. Drei von ihnen entstehen durch den Gebrauch alternativer Polyadenylierungssignale und kodieren das volllängen Blimp-1 Protein. Eine weitere mRNA Isoform ist identisch mit den anderen drei Isoformen, allerdings fehlt nach alternativem Spleißen das Exon 7 (Blimp-1 Δ exon7). Dieses Exon enthält die Information über die ersten zwei Zinkfinger, die essentiell für die sequenzspezifische DNA-Bindung von Blimp-1 sind [59, 75]. Allerdings wird durch das Nichtvorhandensein von Exon 7 nicht das ursprüngliche Leseraster der Blimp-1 mRNA zerstört, so dass auch der C-Terminale Bereich von Blimp-1 in seiner „wildtypischen“ Form vorliegt.

Weder das genaue Expressionsmuster noch die funktionelle Relevanz des von Blimp-1 Δ exon7 kodierten Proteins (Blimp-1 Δ Ex7) sind bislang bekannt (Abb. 3).

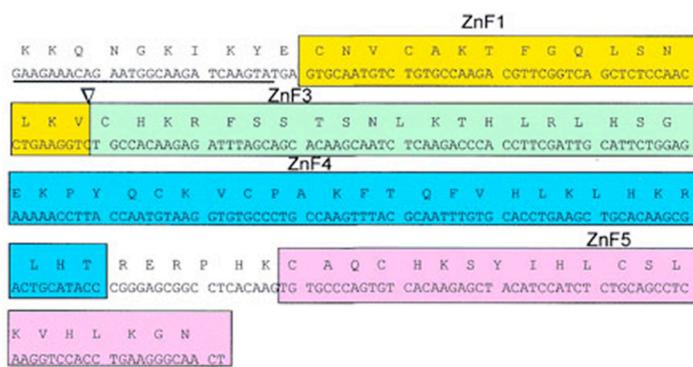


Abbildung 3: Blimp-1 Δ exon7 cDNA und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz [75]

1.5 Ziele der Arbeit

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Analyse des von der Blimp-1 Δ exon7 mRNA kodierten Proteins Blimp-1 Δ Ex7. Hintergrund ist die Beobachtung, dass einige Gene der *prdm*-Familie als Isoformen exprimiert werden, die sich gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen können [69]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Aktivität und welches Potential Blimp-1 Δ Ex7 im Vergleich zum volllängen Blimp-1 Protein besitzt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob und gegebenenfalls in welcher Weise die Expression von Blimp-1 Δ Ex7 die Expression und die Funktion von Blimp-1 beeinflusst.

2 Material

2.1 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Penicillin	Apotheke
Streptomycin	Apotheke
Zeocin	Invitrogen®

2.2 Antikörper

Stimulation	
LPS	Sigma Aldrich
Anti- μ F(ab') ₂	Dianova
<i>Staphylococcus aureus</i> cells Cowan I strain	Calbiochem
Humanes IL-2	Arbeitskreis
Western blots	
anti-Flag (M2) (Maus, monoklonal)	Sigma
anti-GFP (Kaninchen, polyklonal)	Clontech
anti-ERK (C-14) (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz
anti-Maus IgM (μ -Kette)	Jackson
anti-Maus (Peroxidase-konjugiertes Ziegen-IgG)	Jackson
anti-Kaninchen (Peroxidase konjugiertes Esel IgG)	Dianova

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISPOT)

anti-Maus IgG + IgM (H-+L-Kette) Dianova

anti-Maus IgM (Alkalische Phosphatase konjugiert) Dianova

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Anti-Trimethyl-Histon H3 Lysin9 Upstate

Anti-Histondeacetylase 2 (HDAC2) Sigma

Anti-rabbit Cy-3 Alexa 555 Jackson

B-Zellreinigung

anti-Thy1.2 (13-4) (monoklonaler, IgM-Antikörper) Arbeitskreis

anti-CD4 (monoklonaler, Ratte-IgM-Antikörper) Arbeitskreis

anti-CD8 (monoklonaler, Ratte-IgM-Antikörper) Arbeitskreis

Durchflußzytometrie

PE-B220 Pharmingen

PE-CD19 Pharmingen

Annexin V- Cy5 Becton Dickinson

pKH26 linker kit Sigma

2.3 Bakterien

Top 10 F Arbeitskreis

2.4 Chemikalien

Agarose	Roth
EDTA	Roth
EGTA	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Tris	Roth
KCL	Roth
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma
DTT	Sigma
Trypanblau	Sigma
Wasserstoffperoxid	AppliChemGmbH
HEPES	AppliChemGmbH
SDS	AppliChemGmbH
TEMED	AppliChemGmbH
Tween20	AppliChemGmbH
TRI reagent	Invitrogen
BCIP	Sigma
AMP	Sigma
TritonX	AppliChemGmbH
Magnesiumchlorid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Polyacrylamid	AppliChemGmbH
APS	Sigma
Ethanol	Roth

Methanol	AppliChemGmbH
Percoll	Pharmacia
Acinomycin D	Sigma

2.5 Enzyme

BamH I	NEB
EcoR I	NEB
Pfu DNA Polymerase	Promega
DNA-Polymerase „Advantage™ Klen Taq Polymerase Mix“	CLONTECH
T4 DNA Ligase	NEB
SAP	MBI

2.6 Filmmaterial

„x-ray RETINA“ XBD, medizinischer Röntgenfilm	Fotochemische Werke GmbH
---	--------------------------

2.7 Medien

Zellen	
RPMI 1640	Gibco BRL
X-VIVO15	Calbiochem
supplementiert mit	
Glutamin (0,07%)	GibcoBRL
nicht essentielle Aminosäuren (1:100)	GibcoBRL

Natriumpyruvat (1:100)	GibcoBRL
Fötalem Kälberserum (10%, hitzeinaktiviert 45 min bei 56°C)	GibcoBRL
β-Mercaptoethanol (0,05 mM)	GibcoBRL
Penicillin (0,025%)	Apotheke
Streptomycin (0,025%)	Apotheke
DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium)	Haus
supplementiert mit	
Fötalem Kälberserum (10%)	GibcoBRL
Penicillin (0,025%)	Apotheke
Streptomycin (0,025%)	Apotheke
Bakterien	
LB-Medium (Fertigmedium: GibcoBRL)	
Ampicillinplatten LB-Medium mit 1,5% Agar-Agar (Roth) + 50µg/ml Ampicillin	

2.8 Kits

DNA Präparation:

Kits für DNA Maxipräparation Sigma

DNA-Aufreinigung:

GENECLEAN® III Kit Bio 101, Inc.

Polymerase Kettenreaktion (PCR):

2x PCR mastermix Fermentas

cDNA Synthese aus RNA:

First strand cDNA synthesis kit

Fermentas

Isolation humaner CD19⁺ B-Zellen:

Anti-human CD19 MicroBeads

Miltenyi Biotec

2.9 Plasmide

Die cDNAs für die verschiedenen Konstrukte wurden in bicistronische, retrovirale Vektorplasmide kloniert, die das Transgen mit einem C-terminalen Flag-Marker exprimieren. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pEYZ/MCS-F wurde bei Herold 2005 beschrieben (4). Er trägt sowohl eine Zeocinresistenz als auch enhanced yellow fluorescence protein (EYFP) als Selektionsmarker. In transduzierten Zielzellen sorgt eine Internal Ribosomal Entry Site (IRES) für die gekoppelte Expression von dem Fluoreszenzprotein EYFP und dem Testgen. Daher können erfolgreich transduzierte Zellen direkt im FACS analysiert werden. Der Vektor pIZ-MCS basiert auf dem pEYZ/MCS-F, allerdings wird das Transgen mit enhanced green fluorescence protein (EGFP) als Fusionsprotein exprimiert.

Für Verpackung der rekombinanten retroviralen genomischen RNA in HEK 293T-Zellen wurden folgende Vektoren eingesetzt:

pHIT60/gag-pol

Kingsman Labor (Oxford)

pHIT123/env (ekotrop)

Kingsman Labor

Der jeweilige FW beider Primerpaare bindet in Exon 6 und der jeweilige RV in Exon 8. Daher werden in einem PCR Ansatz sowohl Blimp-1 als auch die Deletionsmutante Blimp-1 Δ exon7 amplifiziert [75].

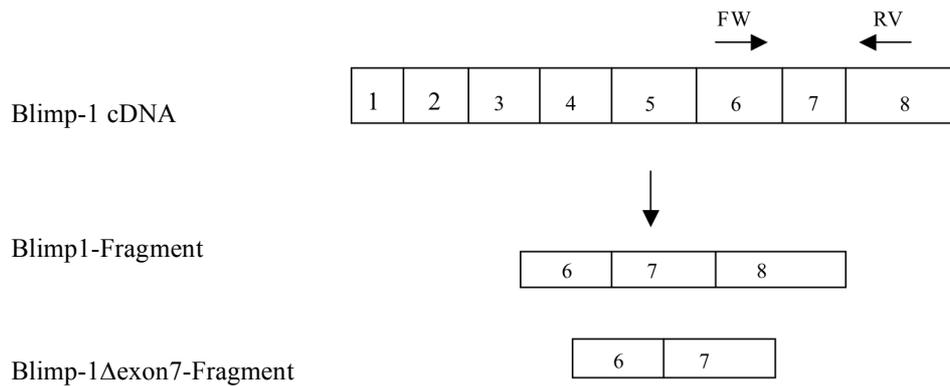


Abbildung 4: PCR-Strategie zur Amplifikation von Blimp-1 und Blimp-1 Δ exon7 cDNA

Maus β -actin: FW 5`-CCAGGTCATCACTATTGGCAACGA-3`;

RV 5`-GAGCAGTAATCTCCTTCTGCATC-3`

Humanes β - actin: FW 5`-GAGCTGCCTGACGGCCAG-3`;

RV 5`-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3`

Um ausschließlich endogenes Blimp-1 zu amplifizieren, wurde der FW im Exon 7 platziert und der RV im 3`UTR der endogenen Blimp-1 cDNA

Maus endogenes Blimp-1: FW 5`-GAAGCCACATGAGTGCCAGG-3`

RV 5`-GATCTGGAGTCATGTACAAGCA-3`

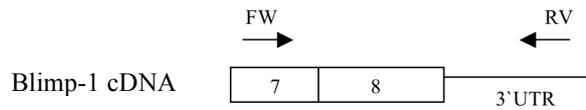


Abbildung 5: PCR-Strategie zur Amplifikation von endogener Blimp-1 cDNA

2.12 Puffer und Lösungen

ATV:

NaCl 80g

KCl 4g

Glucose 10g

NaHCO₃ 5,8g

Trypsin (1:250) 5g

Versene 2g

H₂O ad 1l

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):

NaCl 8g

KCl 0,2g

Na₂HPO₄ 1,15g

KH₂PO₄ 2g

CaCl₂ 1,67g

MgCl₂ 1g

BSA 0,1g

H₂O ad 10l

TAE (50x):

2 M Tris-Base

2 M Essigsäure

100 mM EDTA

pH = 7,8 (einstellen mit Essigsäure)

TBS (10x):

0,5 M Tris

1,5 M NaOH

pH = 7,5 (einstellen mit Salzsäure)

2.13 Zelllinien

WEHI 231 (murines B-Zell-Lymphom, ATCC CRL 1702)

HEK 293T (humane embryonale Nierenkarzinom Zelllinie, ATCC CCRL 11268)

3 Methoden

3.1 Zelluläre Methoden

Alle zellulären Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.1.1 Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung (Stocklösung 1:5 in PBS verdünnt) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das Trypanblau wird von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht es daher, diese von lebenden Zellen zu unterscheiden. 15 µl der Verdünnung wurden anschließend unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß $(\text{Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$ berechnet.

3.1.2 Stimulation von primären B-Zellen

Es wurde entweder mit LPS (10 µg/ml Kultur) alleine oder mit dem BZR-quervernetzenden anti- μ F(ab')₂-Fragment (3 µg/ml Kultur) in Kombination mit LPS (10 µg/ml Kultur) stimuliert. Die Zelldichte zu Beginn der Stimulation lag bei $1,5 \times 10^6$ bis 2×10^6 Zellen/ml.

3.1.3 Stimulation von WEHI 231 Zellen

Die Zellen wurden mit LPS (20 µg/ml Kultur) stimuliert. Die Zelldichte zu Beginn der Stimulation lag bei $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml.

3.1.4 Kultivierung primärer B-Zellen

Frisch isolierte murine naive B-Zellen wurden in jeweils 3 ml RPMI/X-VIVO 15 in 24 Well Platten bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden nach 24 h durch retrovirale Infektionen transduziert und dem Medium infizierter Zellen wurde Zeocin (250 µg/ml) zugesetzt.

3.1.5 Kultivierung der Zelllinien

WEHI 231 Zellen wurden in jeweils 5 ml RPMI/X-VIVO15 in 50 ml Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und alle zwei bis drei Tage 1:10 verdünnt (Zelldichten bewegten sich zwischen 5×10^4 und 6×10^5 Zellen/ml).

HEK 293T-Zellen wurden in 25 ml Kulturschalen in 10-15 ml DMEM im Brutschrank bei 25°C und 5% CO₂ kultiviert. Sie wurden alle drei bis vier Tage mit ATV von der Platte abgelöst und 1:10 bis 1:20 verdünnt.

3.1.6 Transfektion/Infektion

Rekombinante, replikationsdefekte retrovirale Partikel wurden unter Benutzung des pHIT Verpackungssystems wie von Soneoka et al. beschrieben hergestellt [76]. HEK 293T-Zellen wurden transient mit den Expressionskonstrukten für Gag/Pol (pHIT60) und Env

(pHIT123 ekotrop) des Murinen Leukämie Virus (MuLV) kotransfiziert. Die Kotransfektion wurde entweder zusammen mit dem leeren Vektorplasmid oder dem Vektor mit der jeweiligen für das angegebene Protein kodierenden cDNA durchgeführt. Es wurde die Standard Calciumphosphat Methode verwendet. Nach 18 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die viralen Überstände wurden weitere 24 und 48 h später abgenommen und sterilfiltriert (0,45 µm). Zum Filtrat wurde Polybren (Sigma) zugegeben (Endkonzentration: 10 µg/ml).

1-2 x 10⁵ WEHI 231 Zellen oder 2 x 10⁶ vorstimulierte primäre B-Zellen wurden für 2-3 h mit 5 ml des infektiösen Überstandes inkubiert, mit RPMI/X-VIVO 15 gewaschen und wieder in Kultur genommen. Um hohe Infektionsraten zu erzielen wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösen Überstand zentrifugiert (2-3 h bei 32°C mit 2200 rpm).

Die Identifizierung EYFP-exprimierender Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie.

3.1.7 Durchflußzytometrie

Zellen, die eine Farbfluoreszenz aufweisen, können mit Durchflußzytometrie untersucht werden. Die Fluoreszenz kann entweder von einer vorher durchgeführten Färbung gegen Oberflächenproteine herrühren oder durch die Expression eines Fluoreszenzproteins, das durch Infektion in die Zelle eingeführt wurde.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Scan“ (FACScan, Becton-Dickinson) angeregt und emittieren anschließend Licht charakteristischer Wellenlänge, welches von dem Gerät detektiert wird. Die Zellen können auch aufgrund ihrer Fluoreszenz sortiert werden (FACSVantage, Becton Dickinson). Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest-Software für Apple-Macintosh.

3.1.7.1 Oberflächenfärbung

Zum abblocken unspezifischer Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren, wurden primäre B-Zellen für 20 min bei RT mit Fc-block (Arbeitskreis) inkubiert. Danach wurden die jeweiligen fluoreszenzgekoppelten Antikörper in entsprechender Verdünnung zugesetzt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln behandelt. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (5 min, 1500 rpm) mit FACS-Puffer (PBS/ 1% BSA) entfernt. Zur Analyse wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.1.7.2 Annexin V Färbung

Lösungen:

10x Annexin V Bindungspuffer

0,1 M HEPES pH = 7,4

1,4 mM NaCl

25 mM CaCl₂

in H₂O

FACS-Puffer

PBS ohne CaCl₂ und MgCl₂

Mit Hilfe dieser Färbung können apoptotische Zellen sichtbar gemacht werden. WEHI 231 Zellen wurden transduziert und 2 Tage später anhand ihrer Fluoreszenz (EYFP⁺) sortiert (FACSvantage, Becton Dickinson). 1 x 10⁵ der EYFP⁺ WEHI 231 Zellen, wurden einmal in FACS-Puffer gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V gekoppelt mit dem Farbstoff Cychrom 5 in 1x Bindungspuffer für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurden die gefärbten Zellen in der Durchflußzytometrie analysiert.

3.1.8 Isolation von B-Lymphozyten aus Milzzellen

Herstellung von Milzzellsuspensionen

4-6 Wochen alte Mäuse (C57Bl/6) wurden durch Genickbruch getötet, mit 70% Ethanol befeuchtet und auf die rechte Seite gelegt. Nach Öffnung der linken, lateralen Bauchdecke wurde die Milz steril entnommen, weitgehend von Fett- und Geweberesten befreit und in eiskaltem BSS/BSA aufbewahrt. Anschließend wurde die Milz in einem sterilen Einmalsieb zerrieben, die Zellen durch wiederholtes Spülen mit BSS/BSA in ein 50 ml Röhrchen überführt und 10 min auf Eis gehalten, damit sich größere Gewebetrümmer absetzen können. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min, 1000 rpm, 10°C). Aus dem Zellsediment wurden anschließend die B-Lymphozyten isoliert.

Isolation von B-Lymphozyten aus Milzzellsuspensionen

CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten wurden durch Inkubation der Milzzellen mit monoklonalen Antikörpern gegen diese T-Zellepitope und anschließende Komplement-Lyse entfernt. Hierfür wurden die sedimentierten Milzzellen mit Antikörpern gegen Thy 1.2 (T24), CD4 (GK1.5) und CD8 aus Hybridomüberständen in einer für den jeweiligen Antikörper zuvor ermittelten Optimalkonzentration 30 min auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Zellen mit BSS/BSA gewaschen, in Meerschweichenserum als Komplementquelle (Arbeitskreis) aufgenommen und 45 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut mit BSS/BSA gewaschen.

Anreicherung von B-Lymphozyten verschiedener Aktivierungsstadien mittels Percollgradienten

Diese Methode basiert auf der sich unterscheidenden Dichte von ruhenden und aktivierten B-Zellen. Ruhende B-Zellen sind vergleichsweise kleiner und kompakter – daher dichter – als aktivierte B-Zellen und können mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt werden.

Die gewaschenen Zellen wurden nach der Komplement-Behandlung in 10 ml BSS/BSA aufgenommen, in Gradientenröhrchen überführt und nochmals gewaschen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellsediment in 2 ml 80% (v/v in 0,9% NaCl) Percoll resuspendiert und vorsichtig mit jeweils 2 ml der weiteren Percollstufen (70%, 65%, 60%, 50% v/v in 0,9% NaCl) sowie abschließend 2 ml BSS/BSA überschichtet. Alle Percoll-Stufen wurden aus 90% Percoll (v/v in 9% NaCl) hergestellt.

Nach erfolgter Zentrifugation (20 min, 4°C, 2000 rpm, ohne Bremse) wurden die Zellen der gewünschten Dichte aus den entsprechenden Interphasen isoliert. Ruhende B-Zellen wurden aus Interphase 70/65% Percoll, leicht aktivierte B-Zellen aus 65/60% Percoll und aktivierte B-Zellen aus 60/50% Percoll isoliert. Um Percollreste zu entfernen wurden die Zellen danach zweimal mit BSS/BSA gewaschen, gezählt und in Kulturmedium unter entsprechenden Stimulationsbedingungen aufgenommen.

Ein Percollgradient wurde maximal mit den Zellen aus fünf Milzen beladen. Die Reinheit der B-Zell-Präparation wurde mit $1,5-3 \times 10^5$ Zellen im FACScan durch Färbungen gegen CD19, CD4 und CD8 kontrolliert.

3.1.9 Lymphozytenisolierung aus Vollblut oder Buffycoat

Die Aufreinigung von Lymphozyten aus Vollblut oder Buffycoat erfolgte mit Lymphozytentrennmedium LSM 1077 (PAA Laboratories). Hierfür wurden 10 ml Separationsmedium in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml ungeronnenem Vollblut oder Buffycoat überschichtet. Danach wurde das Röhrchen für 20 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert und die Interphase, welche die Lymphozyten enthält, in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gestellt.

3.2 RNA und DNA Techniken

3.2.1 RNA-Isolation aus Zellen

Um RNA aus Zellen zu isolieren wurden diese in 500 µl TRIZOL aufgenommen, gevortext und anschließend bis zum weiteren Gebrauch auf -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 2- 3 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min, bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der gesamt RNA erfolgte 10 min bei RT und anschließender Zentrifugation wie im vorherigen Schritt. Das RNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und im Heizblock bei 55°C 10 min getrocknet. Die RNA wurde mit 10 µl DEPC-Wasser versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentration wurde über die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g RNA}$$

3.2.3 RNA-Gel

Für ein 1,2% Formaldehydgel wurden 0,25 g Agarose in 18 ml H₂O aufgeköcht. Der flüssigen Agarose wurden danach 2,5 ml 10x MOPS und 4,4 ml Formaldehyd zugemischt. Von der zu analysierenden Gesamt-RNA wurde 1 µg mit jeweils 3 µl Ladepuffer vermischt, 10 min auf 65°C erhitzt, kurz auf Eis gestellt und dann auf das Gel aufgetragen. Der Laufpuffer bestand aus 1x MOPS.

3.2.4 Synthese von cDNA

Die RNA wurde aufgetaut und gevortext. Für die cDNA-Synthese wurde der folgende Ansatz pipettiert:

2 µg RNA

1 µl Oligo-(dT)₁₈ primer (0,5 µg/ µl)

ad 11 µl mit H₂O

Der Ansatz wurde 5 min bei 70°C inkubiert, auf Eis gestellt und kurz abzentrifugiert.

Folgende Reagenzien wurden hinzu pipettiert:

4 µl 5x First-Strand-Puffer

1 µl Ribonuclease inhibitor (20 U/µl)

2 µl 10 mM dNTP-Mix

Der Ansatz wurde 5 min bei 37°C inkubiert, mit 2 µl M-MuLV-RT (20U/µl) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde der Reaktionsansatz 10 min auf 70°C erhitzt und danach bei -20°C weggefroren.

3.2.5 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) - Ansatz mit cDNA als Template

1-2 µl cDNA

0,75 µl Primermix (25 µM)

6,25 µl 2x PCR Mastermix

ad 12 µl mit H₂O

Standard-Reaktionsbedingungen:

96°C, 1 min

(96°C, 1 min/62°C, 1 min/72°C, 2 min) x 25

72°C 10 min

4°C, ∞

3.2.6 Klonierungen

Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI/Bam HI gemäß den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers behandelt. Die Restriktionsreaktion wurde auf einem Agarosegel auf ihren Erfolg hin überprüft und die Fragmente elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde ausgeschnitten und mittels GENE CLEAN III KIT nach den Angaben des Herstellers eluiert.

Das in den Vektor einzusetzende DNA-Fragment wurde entweder aus einem bereits existierenden Plasmid ausgeschnitten oder mittels PCR amplifiziert. Nach entsprechender Restriktion wurden die Fragmente analog zu den Vektoren gereinigt.

Für die anschließende Ligation wurden Vektorplasmid und Fragment in einem Verhältnis von eins zu drei eingesetzt und zusammen mit der T4 DNA Ligase in Ligationspuffer für 8-12 h bei 16°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge an Vektorplasmid ohne Fragment angesetzt. Beide Ansätze wurden dann parallel in kompetente E.Coli Bakterien (Top 10 F) transformiert. Hierzu wurden 20 µl Suspension kompetenter Bakterien auf Eis mit 1,5 µl aus dem 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 min inkubiert, dann 30 s lang auf 42°C gebracht und für 1-2 min auf Eis wieder abgekühlt. Danach wurden die Ansätze in 0,5 ml LB Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C mit 200 U/min geschüttelt. Die so gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf ampicillinhaltigen (40 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit je einer Kolonie aus mutmaßlich positiven, d.h. Vektor zusammen mit Fragment exprimierenden Kolonien wurden 3 ml Übernachtskulturen (LB/Ampicillin 40 µg/ml) zur Minipräparation von Plasmid-DNA angeimpft.

3.2.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für einen präparativen Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz gewählt:

2-3 µg Vektorplasmid

5 µl Puffer der verwendeten Endonuklease

1-3 Unit Restriktionsendonuklease

ad 50 µl mit H₂O

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz gewählt:

3 µl DNA

1 µl Puffer der verwendeten Endonuklease

1 Unit Restriktionsendonuklease

ad 10 µl mit H₂O

3.2.8 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Übernachtskulturen wurden bei 37°C und 200 U/min geschüttelt. Zum Ernten wurden die Bakterien pelletiert, in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 und 10 mM EDTA) aufgenommen und durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 N NaOH und 1% SDS) lysiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat und 2 M Essigsäure) erfolgte die Neutralisation. Die Lysate wurden zentrifugiert und die DNA aus den Überständen durch Zugabe von 2,5 Volumina 100% Ethanol ausgefällt, sedimentiert und anschließend in Wasser aufgenommen.

Restriktionsanalysen wurden mit entsprechenden Endonukleasen nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers durchgeführt und der Erhalt der entsprechenden Fragmentlänge durch Agarosegele überprüft. Die Richtigkeit der Sequenz des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.2.9 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von DNA aus 250 ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des „Genelute Plasmid Maxi-Prep Kit“ der Firma Sigma gemäß den Vorschriften des Herstellers.

3.2.10 DNA-Agarosegele

Lösungen:

10x Probenpuffer: 50% Glycerin; 14 mM EDTA pH 8.0; 0.25% (w/v) Bromphenolblau;

0.25% (w/v) Xylencyanol

1x TAE : 40 mM Tris-Acetat; 10 mM EDTA

DNA-Fragmente wurden über Agarosegele aufgetrennt. Dabei wurde der Agarosegehalt der verwendeten Gele unter Berücksichtigung Fragmentlänge variiert. Verwendung fanden 1-3% Agarosegele.

Die entsprechende Agarosemenge wurde eingewogen, in 1x TAE aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 50-60°C mit Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in H₂O) versetzt (1:10000) und in einen Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in eine mit 1x TAE gefüllte Laufkammer eingesetzt und mit den Proben beladen. Diese wurden zuvor mit 1/10 Volumen 5x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 Volt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

3.2.11 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA-Konzentration wurde über die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit folgender Formel berechnet:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g RNA}$$

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinextrakte zur Analyse der IgM Produktion

6x Probenpuffer (Laemmli): 14 ml Puffer B; 6 ml Glycerin; 2 g SDS; 2,5 mg Bromphenolblau; 1,85 g DTT

WEHI 231 Zellen wurden transduziert und zwei Tage nach der Transduktion im FACS analysiert. Die Zellen wurden auf 3×10^5 Zellen in 1 ml eingestellt und 6 h bei 37°C inkubiert.

Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, 6000 rpm) und das Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde dann in 50 µl 2x Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 98°C lysiert. Zur Analyse der sezernierten IgM Menge wurden direkt nach der Zentrifugation 400 µl des Überstands in ein frisches Cup überführt und vor der Lyse mit 80 µl 6x Probenpuffer versetzt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

Zur Analyse der sezernierten IgM Menge nach LPS-Stimulation, wurden die Zellen einen Tag nach der Transduktion mit 20 µg/ml LPS versetzt und zwei Tage später im FACS analysiert. Die Zellen wurden auf gleiche Lebendzellzahl eingestellt und danach weiter wie oben beschrieben verfahren.

3.3.2 Herstellung von Kern- und Zytoplasmaextrakten

Puffer A: 10 mM Hepes pH 7.9
 10 mM KCL
 0,1 mM EDTA
 0,1 mM EGTA
 1 mM DTT

1:100 Proteaseinhibitor

Puffer C: 20 mM Hepes pH 7,9

0,4 M KCL

1 mM EDTA

1 mM EGTA

10% Glycerol

1 mM DTT

1: 100 Proteaseinhibitor

Alle Versuchsschritte wurden auf Eis mit eisgekühlten Reagenzien durchgeführt.

Transfizierte HEK 293T-Zellen wurden mit PBS von der Kulturschale gespült und in ein Eppendorf-Cup überführt. Durch kurze Zentrifugation (10 sec, 13000 rpm) wurden die Zellen pelletiert, das Pellet in 180 µl Puffer A aufgenommen und die Zellen zum Quellen 20 min auf Eis inkubiert. Um die Zytoplasmamembran zu zerstören wurde die Suspension danach mehrmals mit einer Spritze durch eine 26 ½ G-Nadel gepresst. Durch eine Trypanblaufärbung (s.o.) wurde überprüft, ob alle Zellen vollständig geöffnet waren.

Durch Zentrifugation (2 min, 6000 rpm) wurden die Kerne pelletiert und der Überstand, der die zytoplasmatischen Bestandteile enthält, in ein neues Cup überführt. Der Zytoplasmaextrakt wurde mit 20 µl 6x Probenpuffer versetzt und bei 98°C für 10 min lysiert.

Das Kernpellet wurde mit 80 µl Puffer C versetzt und 40 min bei 4°C geschüttelt. Zur Pelletierung der Membranen wurde der Kernextrakt 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand danach in ein neues Cup überführt, mit 20 µl 6x Probenpuffer versetzt und lysiert.

Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting

Die Herstellung der Gele, Durchführung der SDS- PAGE und der Western Blot erfolgten im Wesentlichen wie bei Herold 2000 (4) beschrieben.

3.3.3.1 Herstellung der Gele

Puffer A: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS

Puffer B: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS

30% (w/v) Acrylamid/0,8% (w/v) Bisacrylamid in H₂O

10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Zusammensetzung des Gels:

Zum Auftrennen von Proteinen mit hohem Molekulargewicht (ca 100 kD) wurden im Allgemeinen Gele mit einer 10% Acrylamidkonzentration verwendet.

Trenngelzusammensetzung:

Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% (ml): 5 ml

Puffer A: 3 ml

H₂O: 6,25 ml

10% APS: 150 µl

TEMED: 25 µl

Sammelgelzusammensetzung:

Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% (ml): 650 µl

Puffer B: 1,25 ml

H₂O: 3 ml

10% APS: 25 μ l

TEMED: 5 μ l

Nach dem Einspannen der Minigelplatten in eine Gießapparatur wurde das Trenngel bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Wasser überschichtet. Das Wasser wurde nach der Polymerisation sorgfältig entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Geltaschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ebenfalls polymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in eine Vertikallaufkammer gespannt. Sowohl das obere als auch das untere Pufferreservoir der Vertikallaufkammer wurden mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden aufgetragen und bei 30 mA aufgetrennt. Für eine nachfolgende Identifizierung der Proteinbanden, wurden zusätzlich zu den Proben 3 μ l des „Bench Mark™ Prestained Protein Ladder“ (GibcoBRL) aufgetragen, einem Gemisch von Proteinen bekannten Molekulargewichts zwischen 10 und 200 kD.

3.3.3.2 Western Blotting

Durch Western Blotting können bestimmte Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Dabei werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Blotmembran transferiert, um sie mit einem spezifischen primären Antikörper nachzuweisen. Dieser wird dann mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper detektiert und mit dem ECL-System (Amersham) nachgewiesen.

Dafür wurde nach der SDS-PAGE das Sammelgel abgetrennt und die Proteine des Trenngels in einer Blotkammer auf eine Blotmembran (Immobilon™-P, PVDF-Membran, MILLIPORE) transferiert. Der Transfer erfolgte über 2 h mit 70 mA bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran kurz in 100% Methanol getaucht und zur Fixierung der Proteine auf der Membran luftgetrocknet.

3.3.3.3 Immunologische Detektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst bei RT für 1,5-2 h in Blockpuffer (5% (w/v) Magermilch in TBS/Tween) geschwenkt und dann über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (3x 10 min mit TBS/TWEEN) erfolgte eine zweistündige Inkubation mit einem sekundären, Antikörper in TBS/Tween. Anschließend wurde die Membran gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems durchgeführt. Dabei wird in der von der Peroxidase katalysierten Reaktion Licht erzeugt, mit dem ein Röntgenfilm belichtet wird der sofort entwickelt wurde.

3.4 Immunhistochemische Methoden

3.4.1 ELISPOT: enzyme-linked immunosorbent assay zum Nachweis der IgM-Sekretion auf Einzelzellniveau

AMP-Substratpuffer: 95,8 ml AMP

150 mg $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

100 μl Triton X-100

ad 1000 ml mit H_2O , pH 10,25

AMP/BCIP Lösung: 100 mg BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Idoylpphospat)/100 ml AMP-Substratpuffer (w/v)

Substrat-Lösung: 20 ml AMP/BCIP-Lösung + 5 ml 3% low melting point Agarose (Roth) in H_2O (w/v)

Der ELISPOT dient dem Nachweis der Immunglobulinsekretion durch B-Zellen. Dabei wird eine Platte mit einem primären Antikörper gegen das nachzuweisende Ig-Molekül

beschickt und danach die Zellen in einer definierten Anzahl ausplattiert. Das von den B-Zellen sezernierte Ig bindet an den Antikörper und bleibt so an der Platte haften. Nach dem Entfernen der Zellen kann dieser Komplex über einen sekundären, Alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper nachgewiesen werden. Dazu wird ein BCIP/NBT (Nitroblau Tetrazolium)-p-Toluidinsalz Substratsystem verwendet, das nach Inkubation mit Alkalischer Phosphatase zu NBT Diformazan umgewandelt wird und als blauer Punkt (Spot) sichtbar wird. Die nach dem Entwickeln auf der Platte sichtbaren Punkte repräsentieren jeweils eine Ig-sezernierende Zelle. Da die Zellen in einer definierten Anzahl pro Napf ausplattiert wurden, kann über die Anzahl der blauen Punkte auf die Anzahl Ig-sezernierender Zellen in der Kultur zurückgerechnet werden.

Zur Vorbereitung des ELISPOTS wurden die Platten mit 1 ml anti-mouse IgM-Antikörper (2 µg/ml) in Coating-Puffer (0,05 M Tris, pH 9,4) je Napf beschichtet und auf 4°C über Nacht inkubiert. Nach absaugen des Antikörpers wurden die Platten 3x mit BSS gespült und zum blockieren unspezifischer Bindungen 1,5 h mit BSS/BSA auf 37°C gestellt.

Die mit LPS alleine oder in Kombination mit anti- μ F(ab')₂-Fragment stimulierten und transduzierten B-Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 3x mit je 5 ml BSS gewaschen (5 min, 1500 rpm, RT). Danach wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und sorgfältig gezählt. Die Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe in je 1 ml Kulturmedium auf die Platten gegeben und für die Ig-Sekretion über Nacht im Brutschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen abgesaugt und die Platte 3x mit PBS/Tween (0,5% Tween (v/v)) und 1x mit PBS gewaschen. Danach wurde pro Napf 1 ml PBS/anti-Maus IgM-Alkalische Phosphatase (1: 2000 (v/v)) zugegeben und 3h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Vor dem Entwickeln wurden die Platten erneut 3x mit PBS/Tween und 1x mit

PBS gewaschen und dann die Substratlösung zugegeben. Das Aushärten der Agarose erfolgte bei 4°C.

3.4.2 Immunhistochemische Färbung

Die Färbung und anschließende konfokale Laserscanning-Mikroskopie erfolgten zur Analyse der subzellulären Lokalisation der jeweiligen Proteine.

2-3 x 10⁵ HEK 293T-Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen ausplattiert und wie bereits beschrieben transfiziert. Die Menge an pIZ-Vektor mit der jeweiligen für das angegebene Protein kodierenden cDNA betrug 1-2 µg.

24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen je 2x mit PBS gewaschen und danach mit je 2 ml 2% Formaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Das Formaldehyd wurde abgesaugt, die Zellen zur Permeabilisierung für 5 min mit 0,2% Triton X-100 inkubiert und danach 3x 5 min mit PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Zellen für 20 min bei RT mit „normal donkey serum“ (1: 20 in PBS (v/v)) überschichtet und 1x 2 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte mit der für den Antikörper zuvor ermittelten Verdünnung für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (3x 5 min) mit PBS wurde der sekundäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung zugegeben und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde mit PBS herunter gewaschen (3x 5 min), die Deckgläschen kurz getrocknet und danach auf Objektträgern montiert. Als Trägermedium wurde „Fluoromount G“ (SouthernBiotech) verwendet, in welches für die DNA-Färbung DAPI 1: 250 (v/v) verdünnt zugegeben wurde. Die Analyse der Präparate erfolgte am LSM510 konfokalen Laserscanning-Mikroskop unter Verwendung der ZEISS Laser Scanning Microscope LSM 510 Software 3.2 SP2.

4 Ergebnisse

4.1 Blimp-1 Δ exon7 mRNA wird in CD19⁺ B-Zellen exprimiert

Während der terminalen B-Zelldifferenzierung kontrolliert Blimp-1 die Entwicklung von einer aktivierten B-Zelle zur Plasmazelle. Da über Blimp-1 Δ exon7 nicht bekannt war, ob seine Expression ebenfalls Stadien spezifisch erfolgt, wurden Gesamtmilzzellen und CD19⁺ B-Zellen auf deren relativen Gehalt an Blimp-1 und Blimp-1 Δ exon7 mRNA hin analysiert. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA aus Milzzellen der Maus und aus hoch aufgereinigten CD19⁺ B-Zellen dieses Organs isoliert, eine cDNA-Synthese durchgeführt und diese in einer PCR eingesetzt. Für die PCR wurde ein Primerpaar verwendet, welches in Exon 6 und Exon 8 greift und daher in einer PCR-Reaktion sowohl die Blimp-1 Δ exon7 cDNA (508 bp) als auch die volllängen Blimp-1 cDNA (637 bp) amplifiziert [75]. Verglichen mit dem Expressionsmuster in Gesamtmilzzellen konnte in CD19⁺ B-Zellen ein relativer Anstieg an Blimp-1 Δ exon7 cDNA im Vergleich zur volllängen cDNA beobachtet werden (Abb. 6a). Eine Sequenzanalyse beider PCR-Produkte zeigte, dass beide Amplifikate mit der publizierten Sequenz für die jeweilige Isoform übereinstimmten. Darüber hinaus konnte durch Titration von Plasmiden, die für Blimp-1 und Blimp-1 Δ Ex7 kodieren, in einem PCR-Ansatz die bevorzugte Amplifikation eines der beiden Plasmide ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

In einer weiteren Analyse wurde die Expression der Blimp-1 mRNAs in WEHI 231 Zellen, einem B-Zell-Lymphom, untersucht. Sie exprimieren in unstimuliertem Zustand kein Blimp-1, allerdings steigt die Menge an Blimp-1 mRNA deutlich an, wenn die Zellen mit LPS zur Differenzierung stimuliert werden. Um zu untersuchen, ob WEHI 231 Zellen Blimp-1 Δ exon7 mRNA exprimieren, wurde RNA aus unstimulierten (Spur 1) und

verschieden stimulierten WEHI 231 Zellen (Spur 2-5) isoliert und deren RNA auf die Menge an Blimp-1 Δ exon7 mRNA hin untersucht (Abb. 6b). Wie bereits gezeigt steigt die Menge an Blimp-1 mRNA nach LPS-Stimulation an, allerdings ist nach keiner Stimulation das Signal der Blimp-1 Δ exon7 Deletionsmutante detektierbar.

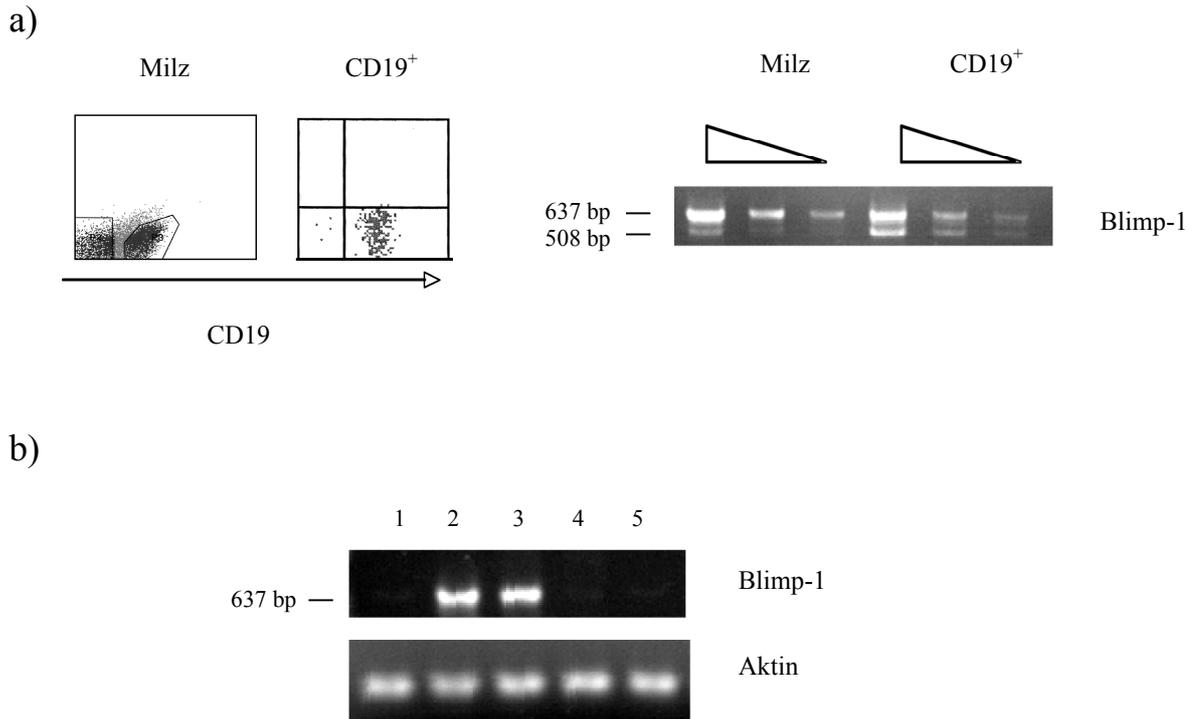


Abbildung 6: CD19⁺ B-Zellen haben eine relativ erhöhte Blimp-1 Δ exon7 mRNA Menge.

a) Links: FACS-Analyse der Gesamtmilzzellen und der daraus aufgereinigten CD19⁺ B-Zellen; rechts: Ergebnis der PCR-Untersuchung zur Analyse der relativen Blimp-1 mRNA Menge in Gesamtmilzzellen und in CD19⁺ B-Zellen. Die jeweiligen Amplifikate wurden 1:3 und 1:9 verdünnt

b) WEHI 231 Zellen wurden mittels PCR auf Blimp-1 und Blimp-1 Δ exon7 mRNA Expression untersucht. Spur 1: unstimuliert; Spur 2: 1 Tag LPS-Stimulation; Spur 3: 2 Tage LPS-Stimulation; Spur 4: anti- μ F(ab')₂-Stimulation; Spur 5: anti-CD40-Stimulation. Aktin-PCR diente als Ladekontrolle.

4.2 Menge an Blimp-1 Δ exon7 mRNA variiert in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

Um der Frage nachzugehen, ob die Expression von Blimp-1 Δ exon7 mRNA während der B-Zelldifferenzierung differentiell exprimiert wird, wurden ruhende B-Zellen auf ihre relative Menge an Blimp-1 Δ exon7 mRNA hin untersucht. Als Vergleich dienten B-Zellen, die durch Stimulation mit LPS, zu Ig-sezernierenden Zellen stimuliert worden waren.

Die ruhenden B-Zellen wurden aus Gesamtmilz suspensionen isoliert. Entsprechend ihres Aktivierungsstadiums weisen die B-Zellen eine voneinander unterschiedliche Dichte auf, so dass sie über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt, und daraus die Population ruhender B-Zellen angereichert werden kann (siehe Methoden).

Aus einem Teil der Zellen wurde direkt RNA isoliert, und die restlichen Zellen zur Induktion der terminalen Differenzierungsprozesse 3 Tage mit LPS stimuliert.

Anschließend wurde wieder mittels RT-PCR-Analyse deren Gesamt-RNA auf die relative Blimp-1 Δ exon7 mRNA-Menge hin untersucht (Abb. 7a). Dabei wurde deutlich, dass mit zunehmender Aktivierung der Zellen auch die Blimp-1 Expression ansteigt, wo hingegen Blimp-1 Δ exon7 mRNA in aktivierten Zellen kaum mehr nachweisbar war. Ein Anstieg der Blimp-1 Expression mit zunehmender B-Zellaktivierung ist nicht überraschend, da die terminale B-Zelldifferenzierung mit steigender Blimp-1 Expression gekoppelt ist [77]. Die gleichzeitige relative Abnahme der Blimp-1 Δ exon7 mRNA-Menge deutet auf eine reziproke Regulation der Expression beider mRNAs während der B-Zelldifferenzierung hin.

Blimp-1 ist ein hoch konserviertes Protein, welches auch während der Hämatopoese des Menschen eine wichtige Rolle spielt, und dessen Expression auch im humanen System eng an die Plasmazelldifferenzierung gekoppelt ist [78-80]. Daher wurden humane B-Zellen

auf deren Menge an Blimp-1 Δ exon7 mRNA hin untersucht. CD 19⁺ B-Zellen wurden aus peripherem Vollblut mittels anti-human CD19 MicroBeads angereichert. Die Zellen wurden entweder direkt nach der Isolation für die RNA-Präparation verwendet, oder 3 Tage mittels Kostimulation bestehend aus SAC und IL-2 zur Differenzierung angeregt. Analog zu den Ergebnissen in murinen B-Zellen konnte auch in unstimulierten humanen B-Zellen die Blimp-1 Δ exon7 mRNA Deletionsmutante nachgewiesen werden. Ebenso nahm deren Expression im Laufe des Differenzierungsprozesses ab (Abb. 7b).

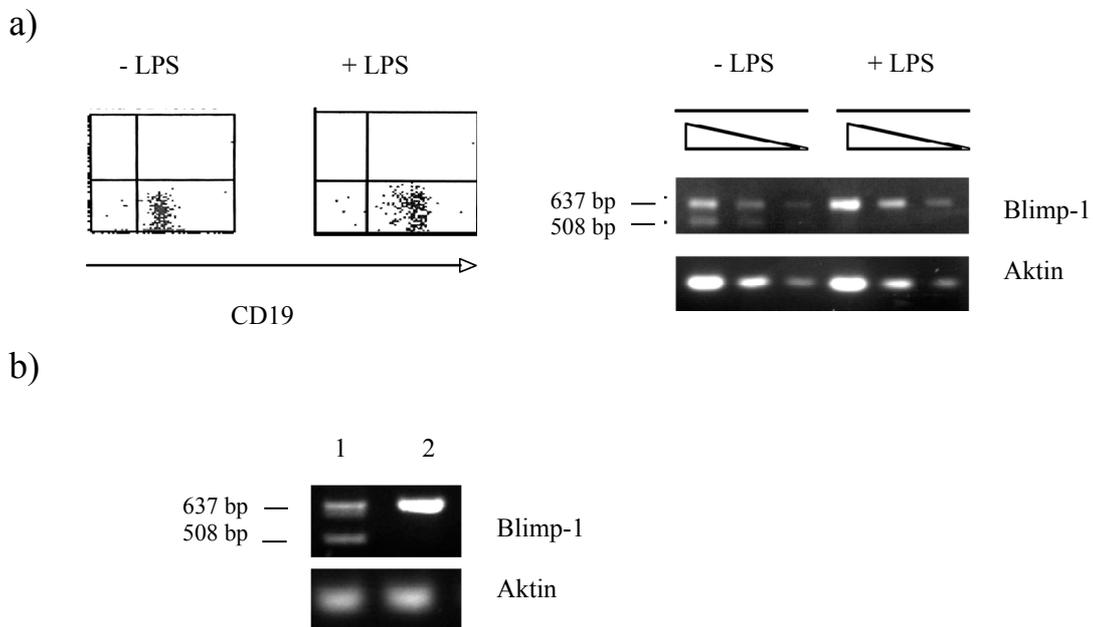


Abbildung 7: Blimp-1 Δ exon7 mRNA ist nach Stimulation nicht mehr nachweisbar

a) Links: FACS-Analyse der aus dem Percoll-Gradienten isolierten murinen CD19⁺ ruhenden B-Zellen. Rechts: Ergebnis der PCR-Untersuchung zur Analyse der relativen Blimp-1 mRNA Menge der unstimulierten (- LPS) und mit LPS stimulierten (+ LPS) Zellen.

b) PCR-Analyse der unstimulierten und mit SAC/IL-2 stimulierten CD19⁺ humanen B-Zellen auf Blimp-1 bzw. Blimp-1 Δ exon7 mRNA Expression. Spur 1: CD19⁺ humane B-Zellen ohne Stimulation; Spur 2: CD19⁺ humane B-Zellen 3 Tage mit SAC/IL-2 stimuliert. Aktin-PCR diente als Ladekontrolle.

4.3 Blimp-1 Δ Ex7F zeigt eine teilweise Kernlokalisierung

Blimp-1 ist ein Transkriptionsfaktor der im Kern an die DNA bindet. Da nicht bekannt ist, ob seine Kernlokalisierung durch die Zinkfingerdomäne, die teilweise durch Exon 7 kodiert wird, vermittelt wird, sollte in einem ersten Versuch die subzelluläre Lokalisation des Blimp-1 Δ Exon7 mRNA kodierten Proteins näher untersucht werden. Dazu wurde die entsprechende DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert und in den retroviralen Expressionsvektor pEYZ/MCS-F kloniert (siehe Material). Das daraus entstandene Plasmid (pEYZ-Blimp-1 Δ Ex7F) wurde für die Transfektion von HEK 293T-Zellen verwendet, aus denen anschließend die Kern- und Zytoplasmaextrakte isoliert wurden. Als Kontrollpopulationen dienten zum einen Zellen, die nur das Markergen EYFP exprimierten (pEYZ/MCS-F) und zum anderen Zellen, die anstelle der Deletionsmutante das volllängen Protein (pEYZ-Blimp-1F) exprimierten. Wie erwartet wurde Blimp-1F ausschließlich im Kernextrakt nachgewiesen [53], wo hingegen Blimp-1 Δ Ex7F vorwiegend in der zytoplasmatischen Fraktion zu finden war, und zu einem geringeren Teil auch in der Kernfraktion (Abb. 8b).

Für eine weitere Untersuchung mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie wurden HEK 293T-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, in dem die jeweiligen Blimp-1 Proteine als Fusionsprotein mit EGFP exprimiert wurden (siehe Material). Dies ermöglicht den direkten Nachweis des Proteins anhand der EGFP-Fluoreszenz, ohne zusätzliche Färbung. Die Art der Proteinmarkierung hat dabei keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation, da sowohl EGFP- als auch Flag- markierte Proteine im Western-Blot das gleiche Expressionsmuster aufwiesen (nicht gezeigt).

Bei den Analysen der Zellen, die mit EGFP allein transfiziert wurden (pIZ-MCS), konnte eine gleichmäßige EGFP Verteilung innerhalb der Zellen beobachtet werden, wenngleich

einige Zellen EGFP homogen nur im Kern oder nur im Zytoplasma aufwiesen. Verantwortlich hierfür könnten unterschiedliche Zellzyklusstadien sein, die den Kern mehr oder weniger zugänglich für EGFP machen.

Blimp-1-GFP ist analog zu den Ergebnissen des Western-Blots ausschließlich im Zellkern zu finden. Im Gegensatz dazu ist Blimp-1 Δ Ex7-GFP sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu sehen. Die zytoplasmatische Verteilung von Blimp-1 Δ Ex7-GFP scheint eher gleichmäßig zu sein, wo hingegen im Kern große Punkte sichtbar werden (Abb. 8a).

Da ein deutlicher Anteil an Blimp-1 Δ Ex7-GFP im Zytoplasma zu finden ist, scheinen die ersten beiden Zinkfinger für den Kerntransport notwendig zu sein oder die Kernlokalisierung zu beeinflussen.

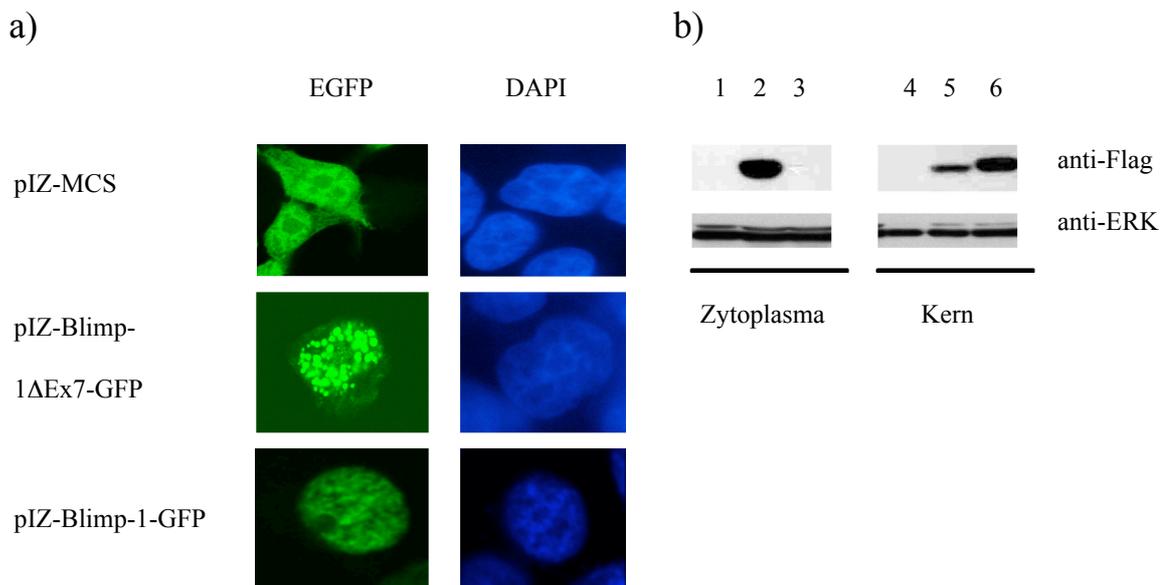


Abbildung 8: Subzelluläre Lokalisation von Blimp-1 Δ Ex7

a) Konfokale Laserscanning-Mikroskopie von HEK 293T-Zellen transfiziert mit EGFP (pIZ-MCS) oder den jeweiligen Fusionsproteinen (grün). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau).

b) Die jeweiligen Kern- und Zytoplasmaextrakte wurden aus HEK 293T-Zellen gewonnen und wie beschrieben im Western-Blot analysiert. Die entsprechenden Proteine wurden anhand ihrer Flag-markierung mit einem anti-Flag Antikörper detektiert. Gleiche Lademengen wurden über anti-ERK Detektion überprüft. Spur 1 u. 4: pEYZ/MCS-F; Spur 2 u. 5: pEYZ-Blimp-1 Δ Ex7F; Spur 3 u. 6: pEYZ-Blimp-1F.

4.4 Ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7F führt zu Zellzyklusarrest

Die bisherigen Versuche dieser Arbeit zeigen, dass Blimp-1 Δ exon7 mRNA in B-Zellen nachweisbar ist, und die Expression in ruhenden B-Zellen relativ zur Blimp-1 mRNA erhöht ist. Darüber hinaus konnte auch eine partielle Kernlokalisierung des Proteins nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob und gegebenenfalls welche Funktion Blimp-1 Δ Ex7 in B-Zellen ausübt.

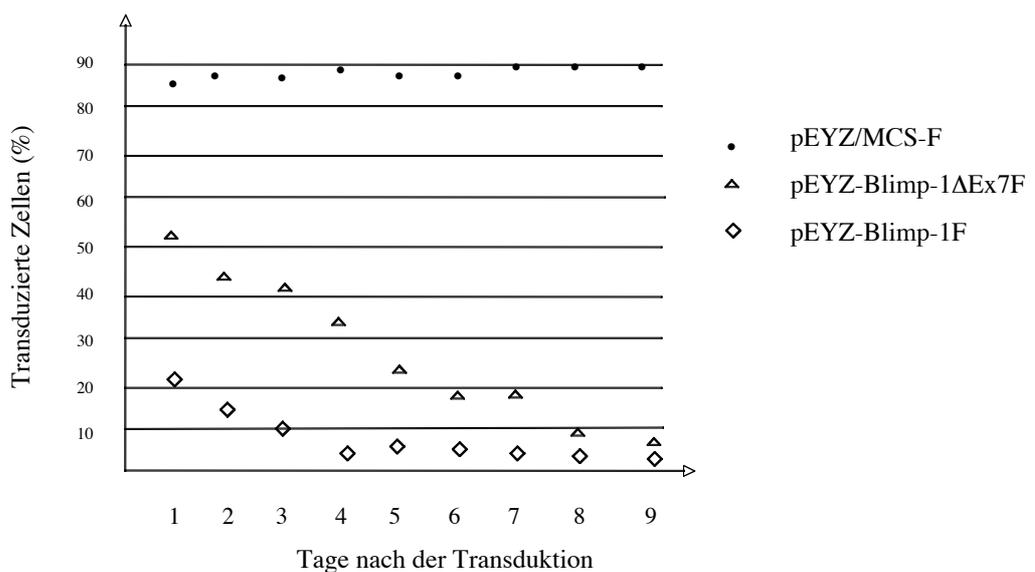
Da die ektopische Expression von Blimp-1 in WEHI 231 Zellen den Zellzyklusarrest induziert [64], sollte untersucht werden, ob die Überexpression von Blimp-1 Δ Ex7 denselben Effekt hat.

Zu diesem Zweck wurden WEHI 231 Zellen mit pEYZ-Blimp-1 Δ Ex7F transduziert, und die transduzierte Zellpopulation, anhand des über eine IRES an die Expression des Transgens gekoppelte EYFP Expression, im FACS analysiert (siehe Material). Als Kontrollpopulation dienten Zellen, die entweder EYFP alleine oder zusammen mit Blimp-1F exprimierten. Wie exemplarisch in Abbildung 9a gezeigt, weisen Blimp-1F transduzierte WEHI 231 Zellen eine niedrige Überlebensrate auf, was durch den Verlust der EYFP exprimierenden Zellen in Abhängigkeit von der Zeit deutlich wird. Auch Blimp-1 Δ Ex7F transduzierte Zellen sind in ihrem Überleben beeinträchtigt, da auch hier die Menge an EYFP exprimierenden Zellen stark abnahm. Dass der Verlust der transduzierten Zellpopulation nicht auf das Markergen an sich zurückzuführen ist, zeigt die konstante Überlebensrate der Zellen, die nur mit pEYZ/MCS-F allein transduziert wurden (Abb. 9a). Die eingeschränkte Überlebensrate der Blimp-1F transduzierten Zellen in diesem Versuch ist zumindest zum Teil auf die direkte Repression des *c-MYC* Locus durch Blimp-1 zurückzuführen, wodurch die Proliferation der Zellen stark beeinträchtigt wird [63]. In

einer weiteren Untersuchung sollte daher geklärt werden, ob auch Blimp-1 Δ Ex7 einen negativen Effekt auf die Proliferation der Zellen ausübt. Daher wurden wie oben beschrieben WEHI 231 Zellen transduziert, und sowohl transduzierte (EYFP+) als auch untransduzierte (EYFP-) Zellen in der Kultur zwei Tage später mit dem Membranfarbstoff pKH26 gefärbt. Dieser Farbstoff verdünnt sich aus, wenn die Zellen proliferieren. Die Auswertung erfolgte durch FACS-Analyse jeweils an Tag 2 und Tag 4 nach der Transduktion.

Während bei der nur mit EYFP-transduzierten Kontrollpopulation sowohl transduzierte als auch untransduzierte Zellen gleichermaßen den Farbstoff verlieren, sich also in gleicher Weise teilen, nimmt der Farbstoff bei den mit Blimp-1F transduzierten Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen derselben Population viel weniger ab. Dies lässt darauf schließen, dass Blimp-1 exprimierenden Zellen eine eingeschränkte Zellteilungsrate aufweisen. Ein ähnlicher Effekt wurde bei den Blimp-1 Δ Ex7 exprimierenden Zellen beobachtet, allerdings war der Effekt nicht so stark ausgeprägt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Blimp-1 Δ Ex7 die Proliferation von WEHI 231 Zellen negativ beeinflusst (Abb. 9b).

a)



b)

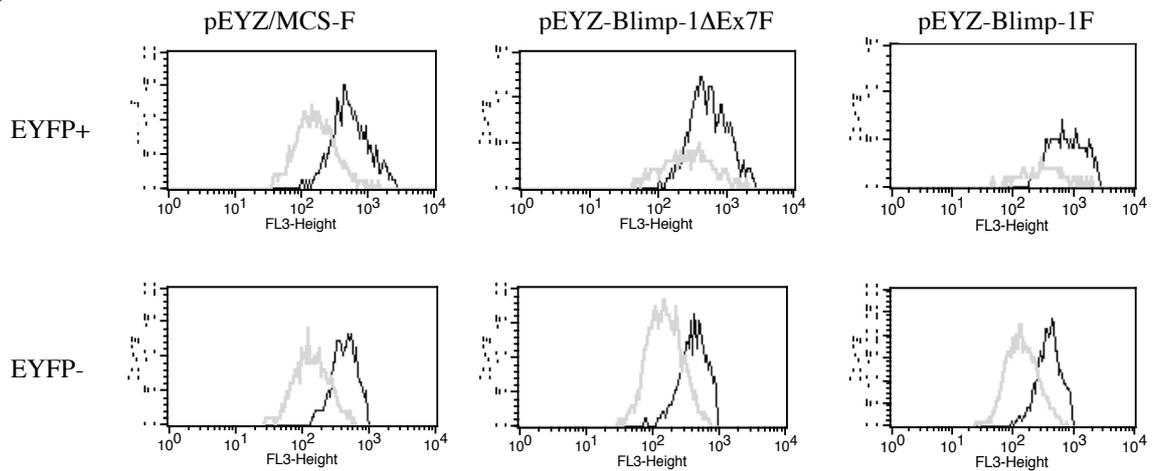


Abbildung 9: Blimp-1 Δ Ex7F interferiert mit der Proliferation

- a) Exemplarische Darstellung der Kinetik von WEHI 231 Zellen die ektopisch die jeweiligen Plasmide exprimieren. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten im FACS analysiert und der Prozentsatz der transduzierten Zellen der Population grafisch dargestellt.
- b) pKH26-Färbung von WEHI 231 Zellen. Die transduzierten Zellen einer Kultur wurden mit pKH26 angefärbt und im FACS beobachtet. Zur Auswertung wurden dann separat EYFP+ (oben) und EYFP- (unten) Zellen analysiert. Die schwarze Linie repräsentiert die Zellpopulation an Tag 2, die graue Linie repräsentiert die Population an Tag 4 nach der Transduktion.

4.5 Ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7F induziert Apoptose

Die Expression von Blimp-1 in WEHI 231 Zellen und B-Zellen führt nicht nur zum Zellzyklusarrest, sondern auch zur Apoptose. Der genaue Mechanismus über den Blimp-1 den Zelltod vermittelt ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt allerdings Hinweise, dass der Effekt unter anderem abhängig vom Differenzierungsstadium der Zelle ist, da die Blimp-1 Expression in frühen Stadien der B-Zellentwicklung zum Zelltod führt, langlebige Plasmazellen in Knochenmark jedoch große Blimp-1 Mengen tolerieren und sogar brauchen [57, 58, 81].

Nachdem die ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7, ähnlich wie Blimp-1, die Proliferation inhibiert, sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob Blimp-1 Δ Ex7 ebenfalls vergleichbar mit Blimp-1, in transduzierten Zellen Apoptose induziert.

Zu diesem Zweck wurden WEHI 231 Zellen mit Blimp-1 Δ Ex7F transduziert. 2 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen im FACS analysiert und die erfolgreich transduzierten Zellen (EYFP+) über einen Zellsorter aussortiert. Direkt nach dem Sortieren wurden die Zellen in Kultur genommen und im FACS auf ihre Reinheit hin überprüft. Anschließend erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich eine Annexin V Färbung, um die Menge an apoptotischen Zellen in der Kultur zu analysieren. Als Kontrollpopulationen wurden wieder EYFP alleine exprimierende Zellen und Blimp-1F exprimierende Zellen verwendet. Die Zellpopulation, welche nur mit EYFP transduziert wurde, zeigte direkt nach dem Sortieren weniger Annexin V negative (Annexin V⁻) Zellen (Tag 0), also völlig intakte Zellen auf, als zu späteren Zeitpunkten (Tag 2). Dies ist möglicherweise auf den Stress zurückzuführen, dem die Zellen sowohl durch die Transduktion als auch durch das Sortieren ausgesetzt waren. Im Gegensatz dazu wies die mit Blimp-1F transduzierte Zellkultur bereits 2 Tage nach dem Sortieren nur noch etwa 10 % Annexin V⁻ Zellen auf, und auch die mit Blimp-1 Δ Ex7F transduzierte Zellkultur, zeigte 3 Tage nach dem Sortieren nur noch 40 % lebende, Annexin V⁻ Zellen.

Damit wurde gezeigt, dass Blimp-1 Δ Ex7F exprimierende Zellen den programmierten Zelltod durchlaufen, wenngleich der Effekt deutlich schwächer ist als nach Blimp1-Expression (Abb. 10).

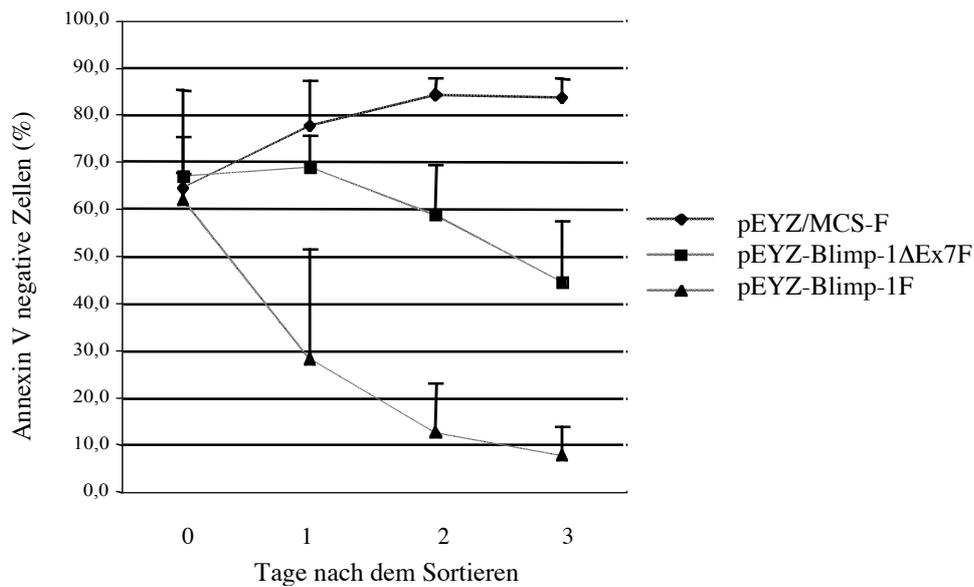


Abbildung 10: Blimp-1ΔEx7F induziert Apoptose in WEHI 231 Zellen

Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transduktion sortiert, die erfolgreich transduzierten Zellen mit Annexin V gefärbt und im FACS analysiert. Abgebildet ist die Menge der Annexin V negativen Zellen in der Kultur. Dargestellt ist der Durchschnitt aus fünf unabhängigen Versuchsreihen.

4.6 Blimp-1ΔEx7-GFP ist mit heterochromatischer DNA assoziiert

Durch Blimp-1 wird die Expression von mehr als 200 Genen reprimiert [56, 60]. Nach bisherigem Verständnis bildet Blimp-1 durch die DNA-Bindung eine Plattform aus, an die sich verschiedene Kofaktoren anlagern und zusammen mit Blimp-1 die entsprechenden Gene durch Induktion von Heterochromatin reprimieren [67, 82]. Am besten charakterisiert sind dabei die Interaktionen von Blimp-1 mit Histon H3 Lysin 9 (H3-K9) Methyltransferase G9a und mit Histondeacetylase-2 (HDAC2) [66].

Durch die von HDAC2 vermittelte Deacetylierung der positiv geladenen Lysine im Histonkern kann die DNA dicht gepackt werden, was durch zusätzliche Methylierung von Histon H3 Lysin 9 zur Heterochromatisierung des Genlocus führt.

Die Interaktion von Blimp-1 mit den Korepressoren wird über verschiedene Proteindomänen vermittelt. Neben der DNA-Bindung sind die Zinkfinger (AS 557- 714) auch ein Interaktionsmotiv für HDAC2 und die H3-K9 Methyltransferase G9a. HDAC2 kann aber zusätzlich über die Prolinreiche Sequenz (AS 312- 492) mit Blimp-1 wechselwirken [65-67, 82].

Das Entfernen von Exon 7 aus der prä-mRNA führt nicht zu einer Leserasterverschiebung im „hinteren“ Teil des offenen Leserasters. Somit enthält Blimp-1 Δ Ex7 außer dem Zinkfingermotiv alle weiteren Proteininteraktionsdomänen für Korepressoren und könnte daher die Heterochromatisierung bestimmter Zielgene beeinflussen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden HEK 293T-Zellen mit Blimp-1 Δ Ex7-GFP und als Kontrolle mit EGFP alleine (pIZ-MCS) oder Blimp-1-GFP alleine transfiziert. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Antikörper gegen dreifach methyliertes Histon H3 Lysin 9 (H3-K9) gefärbt. Durch eine Färbung gegen H3-K9 können heterochromatische Bereiche der DNA sichtbar gemacht werden. Eine Kollokalisierung von Blimp-1 Δ Ex7-GFP und dem H3-K9-Signal gibt somit Hinweise über eine Assoziation von Blimp-1 Δ Ex7 mit heterochromatischer DNA. Die Auswertung erfolgte durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie.

Wie in Abbildung 11a gezeigt, gibt es in der Zelle Bereiche, in denen die Signale von Blimp-1 Δ Ex7-GFP (grün) und H3-K9 (rot) überlagern. In diesen Bereichen sind die punktförmigen Strukturen von Blimp-1 Δ Ex7-GFP im Kern mit heterochromatischer DNA assoziiert, was auf eine Beteiligung von Blimp-1 Δ Ex7 an transkriptioneller Repression hindeutet.

Die Lokalisation von Blimp-1 Δ Ex7 in heterochromatische Bereiche der DNA könnte über die Interaktion von HDAC2 mit der Prolinreichen Domäne von Blimp-1 Δ Ex7 vermittelt werden. Daher wurden HEK 293T-Zellen in einem analogen Versuch nach der Transfektion mit einem Antikörper gegen HDAC2 gefärbt. Die Analyse zeigte auch hier Bereiche in der Zelle, in denen die Signale von Blimp-1 Δ Ex7-GFP (grün) und HDAC2 (rot) überlagern, was auf eine Interaktion der beiden Proteine hinweist (Abb. 11b). Da allerdings das HDAC2-Signal eher diffus über die Zelle verteilt ist, und daher eine eindeutige Aussage schwierig ist, wurde eine Interaktion von Blimp-1 Δ Ex7 und HDAC2 zusätzlich über Koimmunpräzipitation der beiden Proteine untersucht. Diese wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Berberich-Siebelt durchgeführt und zeigte, dass beide Proteine miteinander präzipitierten. Als Kontrolle diente erneut Blimp-1, welches ebenfalls mit HDAC2 präzipitierte. Ein Plasmid welches nur EYFP exprimierte wies keine entsprechende Wechselwirkung auf (nicht gezeigt).

Die Lokalisation von Blimp-1 Δ Ex7 an heterochromatische Bereiche der DNA und die Interaktion mit HDAC2 legen den Schluss nahe, dass Blimp-1 Δ Ex7 die transkriptionelle Repression entweder vermittelt oder eine bereits bestehende Repression bestimmter Loci noch verstärkt.

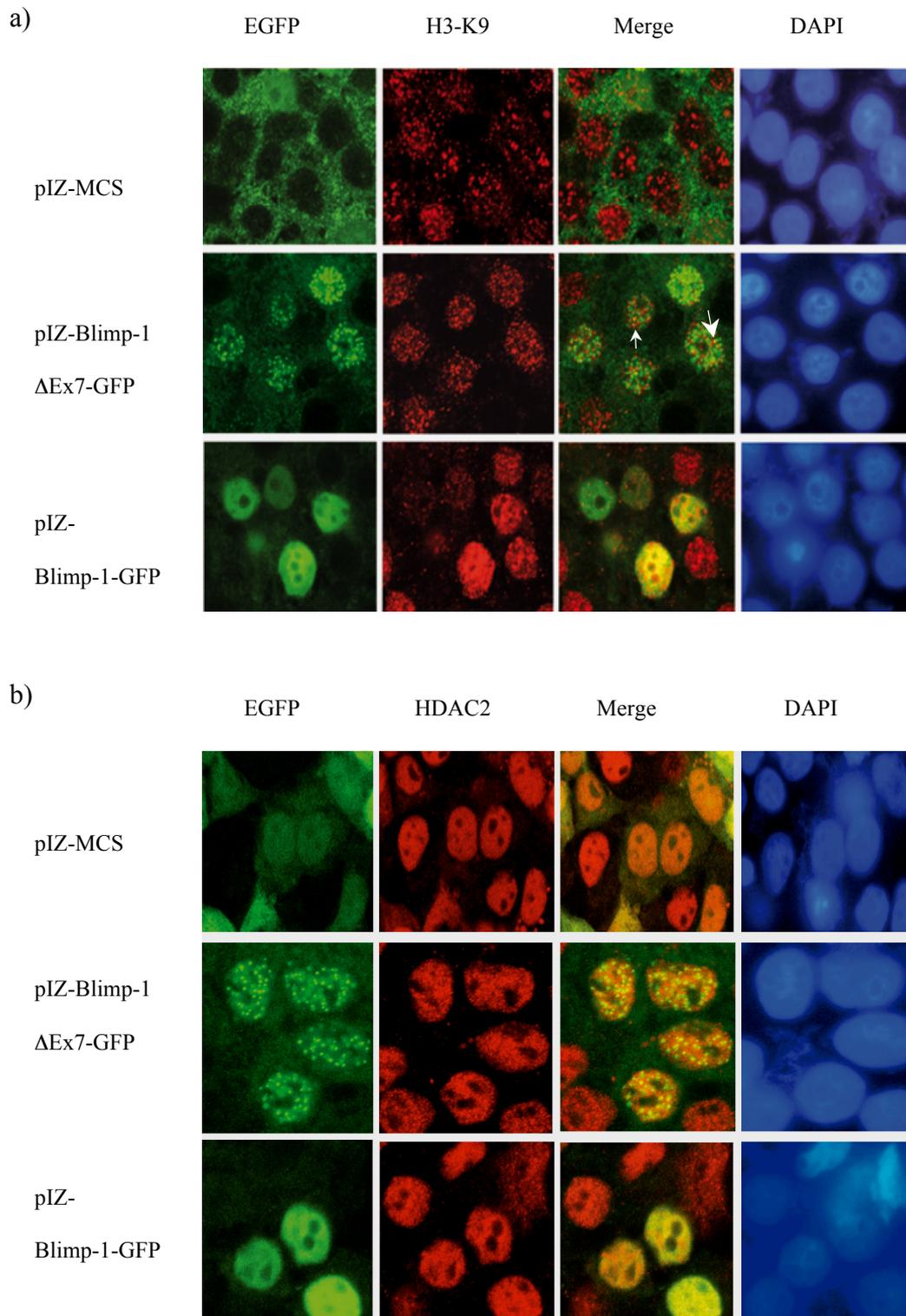


Abbildung 11: Blimp-1 Δ Ex7-GFP kolokalisiert partiell mit H3-K9 (a) und mit HDAC2 (b)

HEK 293T-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (grün), fixiert, mit einem Antikörper gegen H3-K9 (a) oder HDAC2 (b) (rot) behandelt und mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau).

4.7 Überexpression von Blimp-1 Δ Ex7F induziert keine IgM-Sekretion

Blimp-1 ist das Schlüsselprotein der terminalen B-Zelldifferenzierung, indem es die B-Zelle dazu anregt zur Plasmazelle zu reifen, das heißt Immunglobuline zu produzieren und zu sezernieren. Bereits die Überexpression von Blimp-1 in BCL-1 Zellen (einer noch nicht differenzierten B-Zelllinie) und auch in primären B-Zellen der Maus reicht dabei aus, das Differenzierungsprogramm zur Plasmazelle auszulösen [53, 55, 83]. Auch in WEHI 231 Zellen ist die ektopische Expression von Blimp-1 ausreichend, um die IgM-Sekretion zu induzieren [64].

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die verkürzte Variante von Blimp-1 noch anti-proliferative Wirkung hat, und auch die apoptotische Funktion des volllängen Proteins ist zum Teil noch vorhanden. Daher wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob eine Überexpression von Blimp-1 Δ Ex7 ebenfalls noch IgM-Sekretion induzieren kann. Zu diesem Zweck wurden wiederum WEHI 231 Zellen mit Blimp-1 Δ Ex7F transduziert und in Kultur genommen. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen im FACS analysiert. Die Transduktionsrate für Blimp-1 Δ Ex7F betrug mehr als 80%. Als Kontrollpopulationen wurden Blimp-1F und EYFP transduzierte Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf die gleiche Lebendzellzahl eingestellt und 6 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden sowohl Zellpellet als auch der Kulturüberstand auf IgM im Western-Blot überprüft. Die Überexpression von Blimp-1F zeigte einen deutlichen Anstieg an sezerniertem IgM wo hingegen nach Blimp-1 Δ Ex7F Expression kein Anstieg an extrazellulärem IgM, also sezerniertem IgM, zu beobachten war (Abb. 12).

Um auszuschließen, dass WEHI 231 Zellen möglicherweise nicht adäquat auf Blimp-1 Δ Ex7F reagieren können, wurde das Experiment in primären B-Zellen der Maus

wiederholt. Dazu wurden ruhende B-Zellen aus der Milz isoliert und mit einer Kombination aus LPS und anti- μ F(ab')₂-Fragment stimuliert. Diese Stimulation induziert die Proliferation der Zellen, ohne sie zur Differenzierung anzuregen [55]. Nach der Transduktion wurden die Zellen im FACS analysiert und transduzierte Zellen wurden herausortiert. Anschließend wurden die Zellen für den ELISPOT eingesetzt, der eine Analyse der IgM-Sekretion auf Einzelzellniveau erlaubt.

Die Auswertung des ELISPOTs zeigte ebenfalls einen starken Anstieg an IgM-sezernierenden B-Zellen wenn Blimp-1F überexprimiert wurde, jedoch konnte auch hier Blimp-1 Δ Ex7F im Vergleich mit den EYFP-Kontrollzellen keine IgM-Sekretion induzieren (Abb. 13).

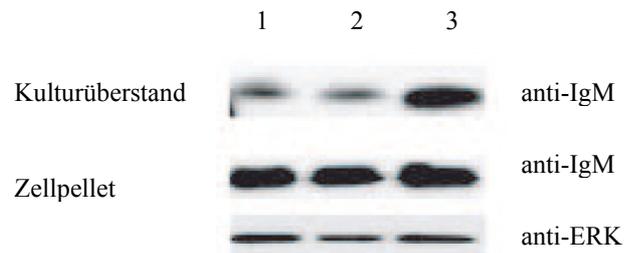


Abbildung 12: Die ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7F induziert keine IgM-Sekretion in WEHI 231 Zellen

Zellpellet und Kulturüberstand transduzierter WEHI 231 Zellen wurden im Western-Blot auf IgM-Produktion untersucht. Gleiche Lademengen wurden durch Detektion mit einem anti-ERK-Antikörper überprüft.

Spur 1: pEYZ/ MCS-F; Spur 2: pEYZ-Blimp-1 Δ Ex7F; Spur 3: pEYZ-Blimp-1F

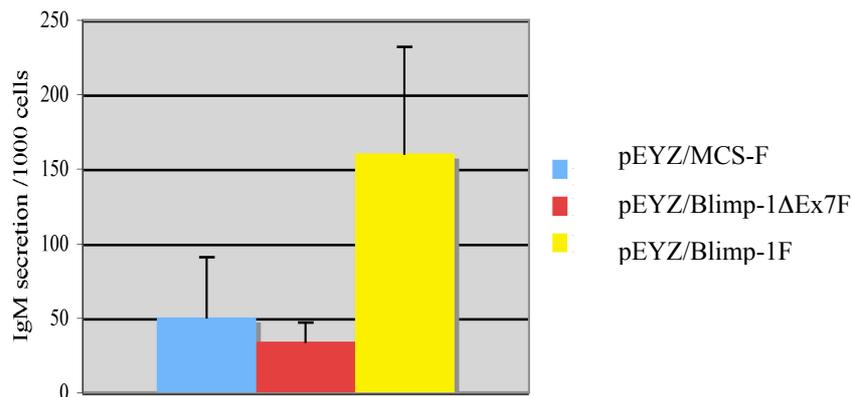


Abbildung 13: Die ektopische Expression von Blimp-1ΔEx7F induziert keine IgM-Sekretion in primären B-Zellen

Auswertung des ELISPOTs transduzierter primärer B-Zellen. Gezeigt ist die Menge an IgM-sezernierenden Zellen pro 1000 ausplattierter Zellen. Dargestellt ist der Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.8 Blimp-1ΔEx7F blockiert die LPS-induzierte IgM-Sekretion

In scharfem Gegensatz zu dem Phänotyp der nach Überexpression von Blimp-1F zu beobachten ist, induziert die ektopische Expression von Blimp-1ΔEx7F keine IgM-Sekretion in WEHI 231 Zellen. Daher sollte im Folgenden geklärt werden, ob Blimp-1ΔEx7F nicht nur die IgM-Sekretion nicht induziert, sondern darüber hinaus mit der Plasmazell-Differenzierung interferiert.

Um diese Frage experimentell zu klären, wurden transduzierte WEHI 231 Zellen entweder unstimuliert oder für 48 h mit LPS stimuliert in Kultur genommen, und auf IgM-Produktion hin überprüft.

Zellen die nur mit EYFP transduziert waren, zeigten nach zwei Tagen LPS-Stimulation einen deutlichen Anstieg an IgM-Sekretion. Dagegen wurde bei Blimp-1ΔEx7F überexprimierenden Zellen kein Anstieg der sezernierten IgM Menge beobachtet, was den

Schluss zulässt, dass Blimp-1 Δ Ex7F die LPS-induzierte IgM-Sekretion blockiert, indem es mit essentiellen Prozessen der terminalen B-Zelldifferenzierung interferiert (Abb. 14).

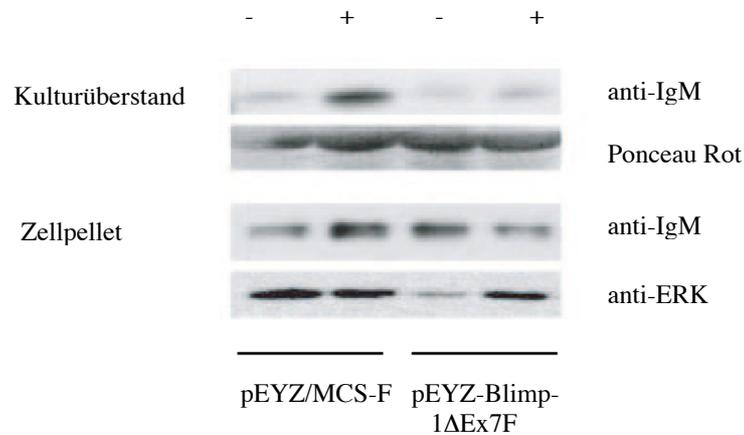


Abbildung 14: Blimp-1 Δ Ex7F interferiert mit LPS-induzierter IgM-Sekretion

Western-Blot von Zellpellet und Kulturüberstand transduzierter WEHI 231 Zellen, die entweder 48 h ohne LPS (-) oder mit LPS (+) kultiviert wurden. Die IgM-Sekretion der Zellen wurde mittels anti-IgM-Antikörper nachgewiesen. Gleiche Lademengen an Kulturüberstand wurde mittels Ponceau Rot Färbung überprüft. Gleiche Lademengen an Zellpellet wurden über anti-ERK-Detektion überprüft.

4.9 Ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7F führt zu verminderter Expression von endogener Blimp-1 mRNA

Die LPS-induzierte B-Zelldifferenzierung wird durch die Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7F gestört. Da für die terminale B-Zellentwicklung zur antikörpersezernierenden Zelle die Blimp-1 Expression notwendig ist [53, 55], wurde nachfolgend der Einfluss von Blimp-1 Δ Ex7F auf die Menge endogener Blimp-1 mRNA untersucht. Dafür wurden transduzierte WEHI 231 Zellen mit LPS stimuliert und 48 h später deren RNA isoliert. Um Aufschluss über die Menge an endogener Blimp-1 mRNA zu erhalten, wurde die aus den Zellen isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und in einer PCR hinsichtlich endogener Blimp-1 mRNA analysiert. Dafür wurden Primer verwendet, die ausschließlich das endogene

Blimp-1 amplifizieren. Als Kontrolle wurde sowohl der Kulturüberstand als auch das Zellpellet auf IgM Produktion hin überprüft. Wie im vorausgegangenen Versuch wurde durch Blimp-1 Δ Ex7F die IgM-Sekretion blockiert (nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde in einer weiteren PCR die Menge an ektopisch exprimierter Blimp-1F und Blimp-1 Δ Ex7F mRNA nachgewiesen (Abb. 15b).

WEHI 231 Zellen die nur mit EYFP transduziert waren, zeigten nach LPS-Stimulation einen deutlichen Anstieg an endogener Blimp-1 mRNA Menge (Abb. 15a, Spur 2). Dasselbe wurde auch bei Blimp-1F überexprimierenden WEHI 231 Zellen deutlich (Spur 10). Im Gegensatz dazu stieg die Menge an Blimp-1 mRNA nach ektopischer Expression von Blimp-1 Δ Ex7F nur auf ca. 30% der beiden Kontrollpopulationen an (Spur 6).

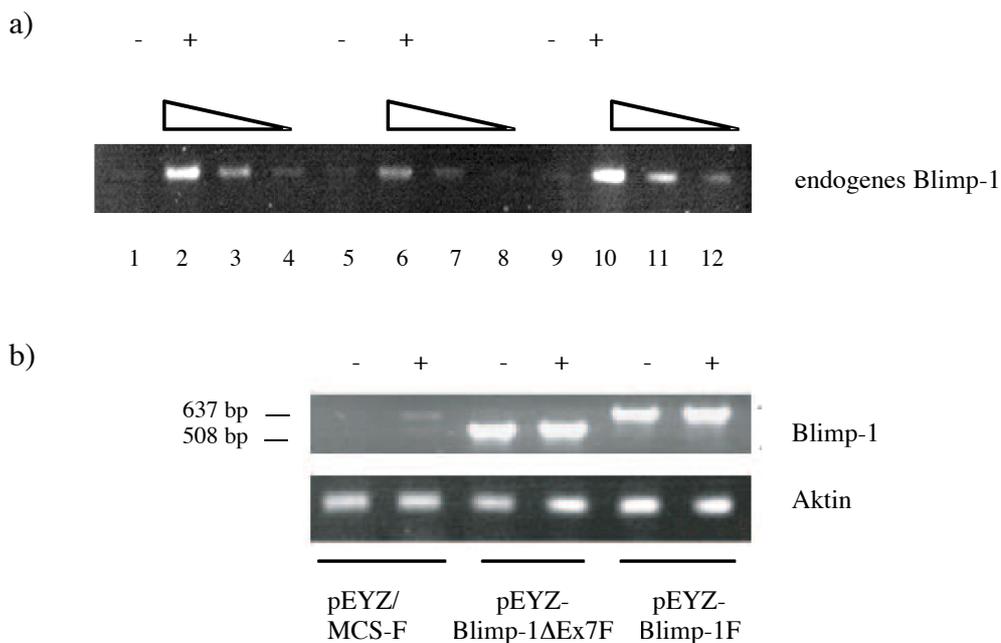


Abbildung 15: In Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7F ist weniger endogene Blimp-1 mRNA nachweisbar

- a) Transduzierte WEHI 231 Zellen wurden 2 Tage ohne LPS (-) oder mit LPS (+) kultiviert und die Menge an endogener Blimp-1 mRNA nach cDNA Synthese mittels PCR analysiert. Spur 1: pEYZ/MCS-F (-), Spur 2-4: pEYZ/MCS-F (+), 1:3 und 1:9 verdünnt; Spur 5: pEYZ-Blimp-1 Δ Ex7F (-), Spur 6-8: pEYZ-Blimp-1 Δ Ex7F(+), 1:3 und 1:9 verdünnt; Spur 9: pEYZ-Blimp-1F (-), Spur 10-12: pEYZ-Blimp-1F (+), 1:3 und 1:9 verdünnt.
- b) Kontroll-PCR mit den in a) gezeigten Extrakten auf überexprimiertes Blimp-1F bzw. Blimp-1 Δ Ex7F. Zur Kontrolle gleicher Lademengen wurde eine Aktin-PCR durchgeführt.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass in Blimp-1 Δ Ex7F überexprimierenden Zellen die LPS-induzierte terminale B-Zelldifferenzierung aufgrund verminderter Blimp-1 mRNA Menge beeinträchtigt ist.

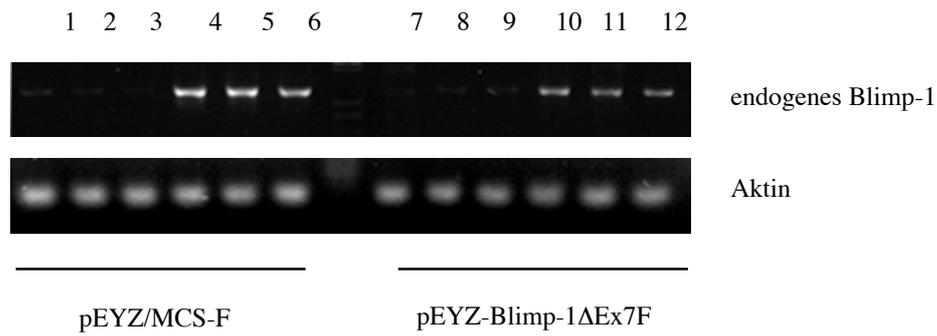
4.10 Blimp-1 Δ Ex7F vermindert die Aktivität des *prdm1*-Promotors

Die reduzierte Menge endogener Blimp-1 mRNA könnte entweder auf eine verminderte mRNA Stabilität oder eine schwächere mRNA Expression zurückzuführen sein.

Daher wurde in weiteren Experimenten zunächst der Frage nachgegangen, ob in Gegenwart von ektopisch exprimiertem Blimp-1 Δ Ex7F die mRNA Stabilität endogener Blimp-1 mRNA beeinträchtigt ist.

Wie bereits beschrieben wurden transduzierte WEHI 231 Zellen 48 h mit LPS stimuliert. Transduzierte unstimulierte WEHI 231 Zellen dienten als Kontrolle. Bevor die Zellen geerntet wurden, wurde für jeweils 30 min oder 1 h Actinomycin D zugegeben. Dieses zytotoxische Antibiotikum wirkt durch Interkalation der Guanin-Nukleotide der DNA, und hemmt so die DNA-abhängige RNA-Synthese. In einer PCR-Analyse, wurde darauf hin die Menge an Blimp-1 mRNA vor und nach der Gabe von Actinomycin D ermittelt. Verglichen mit der Überexpression von EYFP alleine, konnte nach ektopischer Expression von Blimp-1 Δ Ex7F und Actinomycin D Zugabe keine verringerte Stabilität endogener Blimp-1 mRNA beobachtet werden (Abb. 16a).

a)



b)

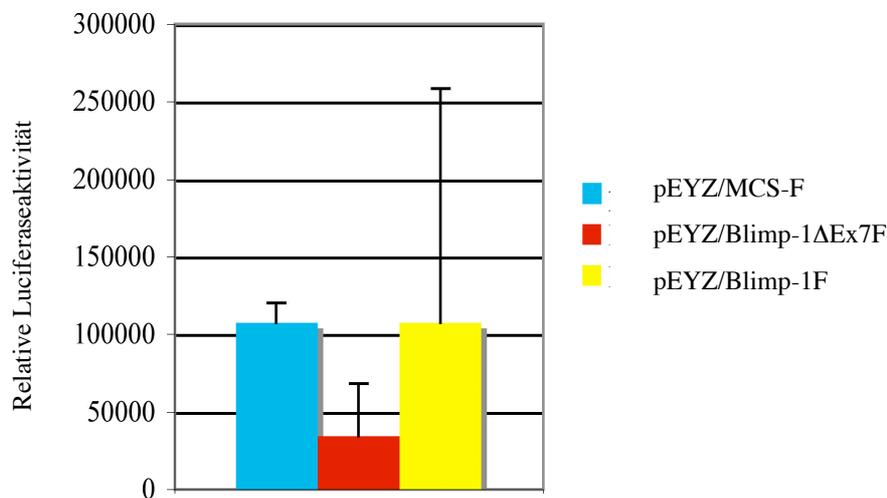


Abbildung 16: Blimp-1ΔEx7F reduziert die *prdm1*-Promotoraktivität

a) pEYZ/MCS-F (Spur 1-6) und pEYZ-Blimp-1ΔEx7F (Spur 7-12) transduzierte WEHI 231 Zellen wurden ohne (-) LPS (Spur 1-3 u. Spur 7-9) oder mit (+) LPS (Spur 4-6 u. Spur 10-12) kultiviert und je 30 min oder 1 h mit 4 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D (Act.D) behandelt. Anschließend wurde die Stabilität der endogenen Blimp-1 mRNA mittels PCR überprüft. Als Ladekontrolle diente eine Aktin-PCR.: Spur 1: pEYZ/MCS-F(-) unstimuliert; Spur 2: 30 min Act.D; Spur 3: 1 h Act.D; Spur 4: pEYZ/MCS-F(+) unstimuliert; Spur 5: 30 min Act.D; Spur 6: 1 h Act.D; Spur 7: pEYZ-Blimp-1ΔEx7F (-) unstimuliert; Spur 8: 30 min Act.D; Spur 9: 1 h Act.D; Spur 10: pEYZ-Blimp-1ΔEx7F (+) unstimuliert; Spur 11: 30 min Act.D; Spur 12: 1 h Act.D.

b) Relative Luciferaseaktivität des *prdm1*-Promotors in Gegenwart von EYFP, Blimp-1F und Blimp-1ΔEx7F. die Luciferaseaktivität wurde auf den jeweiligen Proteingehalt der Lysate normalisiert. Gleiche Transfektionseffizienz wurde anhand der EYFP-Expression der jeweiligen Konstrukte im Western-Blot überprüft.

Darauf hin wurde untersucht, ob Blimp-1 Δ Ex7F die *prdm1*-Promotoraktivität beeinträchtigt, was sich ebenfalls in einer verringerten Blimp-1 mRNA-Menge zeigen würde. Dazu wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Berberich-Siebelt ein Luciferase-Assay durchgeführt. Hierzu wurden HEK 293T-Zellen transient mit Blimp-1F oder Blimp-1 Δ Ex7F und einem Vektor kotransfiziert, der ein Luciferase Reportergen unter der Kontrolle des *prdm1*-Promotors trägt.

Wie in Abbildung 16b gezeigt, zeigt der *prdm1*-Promotor in Anwesenheit von Blimp-1 Δ Ex7F eine deutlich verringerte Aktivität, wo hingegen weder Blimp-1F noch pEYZ/MCS-F einen Einfluss auf die Promotoraktivität hatten (Abb. 16b).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass durch Blimp-1 Δ Ex7 die *prdm1*-Promotoraktivität negativ beeinflusst wird, und dadurch die LPS-induzierte B-Zellentwicklung gestört ist.

5 Diskussion

Blimp-1 ist das Schlüsselprotein der terminalen B-Zelldifferenzierung, welches funktionell mit der Sekretion von Ig, einer niedrigen Zellteilungsrate und Apoptose assoziiert ist [54]. Die Funktion von Blimp-1 während der B-Zellentwicklung ist bereits in vielen Studien untersucht worden, allerdings ist bisher wenig über die Regulation der Blimp-1 Funktion bekannt.

Bei den Studien zu Genstruktur und Expressionsmuster von *prdm1*, stießen Tunyaplin et al. auf eine mRNA Spleißvariante, der das Exon 7 fehlt, wobei das ursprüngliche Leseraster der mRNA unverändert ist [75]. Dieser Deletionsmutante fehlen somit nur die ersten zwei der insgesamt fünf Zinkfinger, der Rest des Proteins bleibt unverändert. Da diese beiden Zinkfinger für die sequenzspezifische DNA-Bindung absolut notwendig sind, kann das von der verkürzten mRNA kodierte Protein nicht mehr an die ursprüngliche Blimp-1 Zielsequenz binden ([59], Dr. Berberich-Siebelt, nicht gezeigt). Trotzdem wurde in dieser Arbeit Blimp-1 Δ Ex7 Protein auch im Kern gefunden, teilweise assoziiert mit heterochromatischer DNA (Abb. 11a). Daneben wurde eine Kolo-kalisation mit HDAC2 nachgewiesen (Abb. 11b), was ebenfalls für eine Funktion von Blimp-1 Δ Ex7 bei der Repression genetischer Loci spricht. Analog zur Blimp-1 Expression, hat die Deletionsmutante sowohl auf die Proliferation als auch das Überleben der Zelle einen negativen Einfluss, bewirkt aber im Gegensatz zum volllängen Protein keine Ig Sekretion. Es ist also die terminale B-Zelldifferenzierung in Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7 gestört, indem die Blimp-1 Expression stark eingeschränkt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass Blimp-1 Δ Ex7 mit heterochromatischer DNA assoziiert, und durch Repression des *prdm1*-Lokus die Blimp-1 Funktion und damit die terminale B-Zelldifferenzierung beeinträchtigt.

5.1 Blimp-1 Δ exon7 wird während der B-Zellentwicklung stadienspezifisch exprimiert

Um die Funktion von Blimp-1 Δ Ex7 während der B-Zellentwicklung zu analysieren, wurden B-Zellpopulationen unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellpopulationen hatte Blimp-1 Δ exon7 mRNA nur einen kleinen Anteil an der gesamten Blimp-1 mRNA, was in Einklang mit den Ergebnissen von Tunyaplin et al. ist [75]. Allerdings war in naiven CD19⁺ B-Zellen der relative Anteil von Blimp-1 Δ exon7 mRNA an der Gesamt-RNA deutlich erhöht, was darauf hindeutet, dass der Deletionsmutante in diesem Entwicklungsstadium eine besondere Funktion zukommt. Die Stimulation der Zellen mit LPS bzw. SAC/IL-2 bewirkte eine Verschiebung der mRNA Verteilung zu Gunsten von Blimp-1 und der terminalen B-Zelldifferenzierung (Abb. 7). Die Tatsache, dass dies sowohl für primäre Mauszellen als auch für primäre humane B-Zellen zutrif, legt nahe, dass die Bildung der Blimp-1 Δ exon7 mRNA von Maus zu Mensch konserviert ist, und vermutlich regulatorische Funktionen hat.

5.2 Zinkfinger sind wichtig für Kernlokalisierung und DNA-Interaktion

Blimp-1 ist ausschließlich im Kern lokalisiert, wo es als reprimierender Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Zielgene steuert [53, 56]. Da Kernproteine über 90 kD nicht ohne entsprechendes Signal die Kernporen passieren können, ist es wahrscheinlich, dass auch für Blimp-1 ein solches Signal existiert [84]. Allerdings konnte bisher keine Kernlokalisationssequenz (nuclear localization sequence,

NLS) in dem Protein nachgewiesen werden, und es ist auch nicht bekannt, wie das Protein in den Kern geschleust wird. Denkbar wäre, dass eine Kernlokalisierung von einer intakten Zinkfingerdomäne abhängt, da diese für eine korrekte DNA Interaktion notwendig ist [59], und somit beim Kerntransport gleichzeitig die Funktionalität des Proteins sichergestellt würde.

Die Annahme, dass die Zinkfinger an der Kernlokalisierung beteiligt sind, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, da sowohl in Western-Blot Untersuchungen als auch bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie deutlich wurde, dass sich ein Teil des Blimp-1 Δ Ex7 Proteins im Kern befindet und ein Teil im Zytoplasma (Abb. 8 und Abb. 11). Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der Zinkfingerdomäne alleine (AS 461- AS 751), dass sie direkt in den Kern lokalisiert (nicht gezeigt). Diese Beobachtung impliziert, dass die Zinkfingerdomäne nicht nur für die DNA-Interaktion wichtig ist, sondern auch an der Kernlokalisierung des Proteins beteiligt ist. Allerdings ist der genaue Mechanismus unklar. Da der Verlust der ersten beiden Zinkfinger eine partielle Kernlokalisierung erlaubt, muss die NLS zumindest teilweise unabhängig von diesen beiden Zinkfingern sein. Alternativ könnte durch die ersten beiden Zinkfinger die spezifische DNA-Wechselwirkung vermittelt werden, welche den Rücktransport des Proteins aus dem Kern ins Zytoplasma verhindert. Da diese DNA-Interaktionen bei Blimp-1 Δ Ex7 verändert sind, könnte so ein Teil des Proteins aus dem Kern zurück ins Zytoplasma gelangen.

Die Zinkfinger sind jedoch nicht nur für die Kernlokalisierung wichtig. Keller und Maniatis konnten bei Untersuchungen am humanen Interferon- β (IFN- β) Promotors zeigen, dass die sequenzspezifische DNA-Interaktion des humanen Blimp-1 Analogs im Wesentlichen über die ersten beiden Zinkfinger vermittelt wird [59]. Diese Zinkfinger fehlen in der Blimp-1 Δ Ex7 Deletionsmutante. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in einem EMSA (Electron Mobility Shift Assay) keine Interaktion des murinen Blimp-1 Δ Ex7F mit der

Blimp-1 Bindestelle des *c-MYC*-Promotors festgestellt werden. Die Interaktion von Blimp-1 mit der Promotorsequenz konnte unter denselben Bedingungen nachgewiesen werden (Dr. Berberich-Siebelt, nicht gezeigt). Eine spezifische DNA-Wechselwirkung von Blimp-1 Δ Ex7 ist trotzdem nicht ausgeschlossen, da über die verbleibenden Zinkfinger eine Interaktion mit der DNA vermittelt werden könnte. Die Menge der Zinkfinger motive in einem Protein kann sehr unterschiedlich sein [85, 86] und manche Transkriptionsfaktoren, wie GATA-1, binden nur über zwei Zinkfinger an die DNA [87]. Daher könnte eine DNA-Interaktion von Blimp-1 Δ Ex7 mit von der Blimp-1 Konsensussequenz unterschiedlichen Promotorsequenzen, auch über die restlichen Zinkfinger erfolgen.

5.3 Blimp-1 Δ Ex7 ist im Kern mit heterochromatischer DNA assoziiert

Neben der Vermittlung der spezifischen DNA-Bindung, konnten Gyory et al. zeigen, dass über die ersten beiden Zinkfinger auch die Interaktion von Blimp-1 mit der Histon H3 Methyltransferase G9a erfolgt [67]. Obwohl diese Interaktionsdomäne bei Blimp-1 Δ Ex7 nicht mehr vorhanden ist, besteht eine partielle Kolo-kalisation von Blimp-1 Δ Ex7-YFP mit H3-K9 (Abb. 11). Diese Beobachtung legt nahe, dass auch die Blimp-1 Deletionsmutante mit heterochromatischer DNA assoziiert ist. Darüber hinaus besteht eine Wechselwirkung zwischen Blimp-1 Δ Ex7 und HDAC2, welche sowohl durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie (Abb. 11) als auch durch eine Koimmunpräzipitation (nicht gezeigt) nachgewiesen wurde. Diese Befunde implizieren, dass Blimp-1 Δ Ex7 die Repression genetischer Loci vermitteln kann, welches durch den generell reprimierenden Effekt von Blimp-1 Δ Ex7 auf die untersuchten Zellfunktionen deutlich wird.

Bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie fiel neben der teilweisen zytoplasmatischen Lokalisation von Blimp-1 Δ Ex7 auch die unterschiedliche Verteilung von Blimp-1 und Blimp-1 Δ Ex7 im Kern auf. Während Blimp-1 eher homogen im Kern verteilt ist, konzentriert sich Blimp-1 Δ Ex7 auf bestimmte Bereiche und bildet punktförmige Strukturen (Abb. 8). Warum sich diese Strukturen ausbilden ist momentan nicht klar. Das nur partiell eine Kolo-kalisation von Blimp-1 Δ Ex7-YFP mit HDAC2 bzw. H3-K9 nachgewiesen werden konnte deutet darauf hin, dass nicht alles Protein im Kern mit heterochromatischer DNA assoziiert ist. Ein Teil des Proteins könnte mit unterschiedlichen Kernstrukturen assoziiert sein, die im Folgenden beschrieben werden.

Immunfluoreszenzmikroskopie verschiedener Transkriptionsfaktoren wie GATA-1 [88] oder Sp1 [89] zeigt, dass diese meist homogen über das Kernplasma verteilt sind. Nach dem „hit-and-run“ Modell binden sie in einem dynamischen Prozess an die DNA, wobei die Interaktion einige Minuten oder aber nur wenige Sekunden andauern kann [90-92]. Allerdings konnten auch verschiedenen Kernstrukturen identifiziert werden, in denen sich Transkriptionsfaktoren ansammeln um modifiziert und/oder gespeichert zu werden. Zu diesen Strukturen gehören beispielsweise „interchromatin granule clusters“ (IGCs) [93-95], „promyelocytic leukemia“ (PML) Kernkörper [96, 97] und „polycomb group“ (PcG) Proteinkomplexe [98].

Teile des Blimp-1 Δ Ex7 Proteins im Kern könnten mit IGCs assoziiert sein. IGCs sind Kerndomänen, in denen prä-mRNA Spleißfaktoren und möglicherweise auch Transkriptionsfaktoren modifiziert werden [93-95]. So wurde gezeigt, dass die große Untereinheit der RNA-Polymerase II dort modifiziert und gespeichert werden kann, was auch für Blimp-1 Δ Ex7 gelten könnte [99].

Eine Interaktion von Blimp-1 Δ Ex7 mit PML-Kernkörpern ist eine weitere Möglichkeit. Die genaue Funktion von PML-Kernkörpern ist bisher nicht bekannt, aber es gibt

Untersuchungen, die zeigen, dass sie in die Regulation der Transkription involviert sind. Darüber hinaus enthalten PML-Kernkörper HP-1, ein Protein welches mit heterochromatischer DNA assoziiert ist [100, 101].

PcG Proteine wurden ursprünglich in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. Sie binden an so genannte „Polycombe response elements“ (PREs) und können dadurch Gene in *cis* reprimieren [98]. PcG homologe Proteine wurden auch in humanen Zellen gefunden und scheinen auch da die Regulation der Genexpression zu beeinflussen [98, 102]. Zu den PcG Proteinkomplexen gehört unter anderem „Extra Sex Combs“ und „Enhancer of Zeste E(z)“. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Proteinkomplex bei der Trimethylierung von Lysin 9 des Histons H3 eine Rolle spielt, und damit bei der Repression bestimmter DNA Bereiche [103-106]. Interessanterweise weist die PR-Domäne von Blimp-1 eine signifikante Homologie zu der SET-Familie der Methyltransferasen auf, zu der unter anderem auch „Enhancer of Zeste“ gehört [107].

Auf diese Weise könnte, neben der Assoziation mit HDAC2, eine weitere Verbindung zwischen Blimp-1 Δ Ex7 und der transkriptionellen Regulation genetischer Loci bestehen.

Ob Blimp-1 Δ Ex7 wirklich mit einer der genannten Strukturen interagiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und muss in späteren Studien direkt analysiert werden.

5.4 Ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7 führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose

Die Überexpression von Blimp-1 in WEHI 231 Zellen und in primären B-Zellen führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose [64]. Zellzyklusarrest wird nach dem momentanen Verständnis auch durch die direkte Bindung von Blimp-1 an den *c-MYC*-Promotor

vermittelt, wodurch nach Rekrutierung von Korepressoren die Aktivität des Lokus vermindert wird [63, 108]. Interessanter Weise konnte nach ektopischer Expression von Blimp-1 Δ Ex7F ebenfalls ein Rückgang der Teilungsrate der Zelle beobachtet werden, wenngleich dieser nicht so stark ausgeprägt war wie nach Überexpression von Blimp-1F (Abb. 9). Eine Interaktion von Blimp-1 Δ Ex7 mit der Blimp-1 spezifischen Promotorsequenz von *c-MYC* konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl Blimp-1 unter den gegebenen Umständen mit der entsprechenden Sequenz interagiert. Dies legt den Schluss nahe, dass für die „Stilllegung“ des *c-MYC*-Promotors eine direkte DNA-Bindung von Blimp-1 notwendig ist, die wahrscheinlich von den ersten beiden Zinkfingern abhängig ist.

Neben *c-MYC* wurde auch A1, ein anti-apoptisches BCL-2 Familienmitglied, als direktes Zielgen von Blimp-1 identifiziert. Eine verminderte A1 Expression trägt dazu bei, dass die Zelle in ihrem Überleben beeinträchtigt ist [64]. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch in Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7F die Menge an A1 mRNA reduziert war, wenngleich nicht so stark wie bei Anwesenheit von Blimp-1 (Dr. Berberich-Siebelt, nicht gezeigt).

Die Reduktion der A1 Expression in Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7 könnte durch die Bindung von Blimp-1 Δ Ex7 an eine bisher nicht identifizierte Bindestelle in der A1-Promotorregion verursacht werden, wobei die DNA-Interaktion, wie unter 5.2 beschrieben, über die verbleibenden Zinkfinger vermittelt würde. Allerdings kann momentan auch nicht ausgeschlossen werden, dass der reprimierende Effekt indirekt über Proteinwechselwirkungen vermittelt wird.

Der selektive Einfluss von Blimp-1 Δ Ex7 auf die Expression von A1 nicht jedoch auf *c-MYC*, könnte den vergleichsweise milderen Verlauf der Apoptose in den Zellen erklären.

In einer weiteren Studie zur Apoptoseinduktion durch Blimp-1 von Messika et al. wurden verschiedenen Deletionsmutanten von Blimp-1 untersucht, um herauszufinden welche seiner Proteindomänen den Apoptoseprozess vermitteln könnten. Dabei konnten die Autoren zeigen, dass eine Sequenz von 69 AS innerhalb der Prolinreichen Domäne von Blimp-1 für die Induktion der Apoptose notwendig ist. Allerdings ist bisher nicht klar auf welche Weise dieser Sequenzabschnitt Einfluss auf das Überleben der Zellen nimmt [79]. Möglicherweise fungiert dieser Sequenzabschnitt als Proteininteraktionsdomäne, über den Korepressoren mit Blimp-1 interagieren. Der Prolinreiche Sequenzbereich ist in der Blimp-1 Δ Ex7 Deletionsmutante vollständig vorhanden. Daher könnte sie als Adapter dienen, um einen hochmolekularen reprimierenden Komplex auszubilden. Diese Annahme steht in Einklang mit den in der Arbeit beschriebenen Interaktionen von Blimp-1 Δ Ex7 mit H3-K9 und HDAC2 und es liegt nahe, dass die beobachtete Apoptose durch diesen Bereich des Proteins zumindest teilweise vermittelt wird.

5.5 Blimp-1 Δ Ex7 stört die Blimp-1 Expression und die terminale B-Zelldifferenzierung

Die LPS vermittelte Stimulation des TLR-4 führt über Aktivierung des NF- κ B-Systems zur Blimp-1 Expression, und bewirkt, dass WEHI 231 Zellen und naive B-Zellen zu antikörpersezernierenden Zellen differenzieren [38, 55]. Derselbe Effekt wird durch die ektopische Expression von Blimp-1 in diesen Zellen erreicht [64]. Im Gegensatz dazu vermittelte die Überexpression von Blimp-1 Δ Ex7F weder in WEHI 231 Zellen noch in naiven B-Zellen den Differenzierungsprozess zur antikörpersezernierenden Zelle (Abb.12 und Abb. 13). Durch den Verlust der ersten beiden Zinkfinger ist die Blimp-1-sequenzspezifische DNA-Bindung nicht mehr möglich, weswegen ein Teil der zur

Differenzierung notwendigen Zielgene nicht mehr aktiv werden können [60]. Weiterhin könnte auch aufgrund der veränderten subzellulären Lokalisation von Blimp-1 Δ Ex7 einfach nicht genug Protein in den Kern lokalisieren bzw. dort verbleiben, um eine vollständige Repression der entsprechenden Zielgene zu vermitteln. Diese Möglichkeit erscheint jedoch weniger wahrscheinlich.

Erstaunlicher Weise wurde durch die ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7 nicht nur die Differenzierung hin zur Ig-sezernierenden Zelle unterdrückt, sondern die Differenzierung durch LPS-Stimulation konnte nicht mehr induziert werden. Selbst ein Anstieg an intrazellulärem IgM konnte in dieser Situation nicht mehr beobachtet werden (Abb. 14). Diese Beobachtung deutet auf eine dominant-negative Funktion von Blimp-1 Δ Ex7 während der B-Zelldifferenzierung hin, die einer durch Stimulation des TLR-4 induzierten B-Zellaktivierung entgegen wirkt. Ursache hierfür scheint die verminderte *prdm1*-Promotoraktivität in Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7 zu sein, die zu einer verminderten Blimp-1 Expression führt (Abb. 16). Dabei wirkt Blimp-1 Δ Ex7 wahrscheinlich direkt auf den *prdm1*-Promotor, da zum einen die relative Luciferaseaktivität des *prdm1*-Promotorkonstrukts eingeschränkt ist, zum anderen aber die Halbwertszeit der mRNA nicht beeinträchtigt ist (Abb. 16). Darüber hinaus konnte keine Labilisierung des volllängen Proteins nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Ob dieser Effekt allerdings durch eine direkte DNA-Bindung der Deletionsmutante oder durch Rekrutierung des Proteins und Proteininteraktionen vermittelt wird, ist momentan unklar.

Bei der Analyse der Blimp-1 Funktion in verschiedenen B-Zellstadien konnte gezeigt werden, dass in partiell aktivierten B-Zellen und in WEHI 231 Zellen über Blimp-1 gesteuert wird, ob die Zelle stirbt oder differenziert [79]. Nach dem Modell von Messika et al. beeinflusst Blimp-1 durch das Zusammenspiel mit stadienspezifisch exprimierten

6 Zusammenfassung

Blimp-1 (B lymphocyte induced maturation protein-1) kontrolliert die Regulation der terminalen B-Zelldifferenzierung. So ist die ektopische Expression von Blimp-1 ausreichend, damit naive B-Zellen zu antikörpersezernierenden Zellen differenzieren können. Dabei wirkt Blimp-1 als transkriptioneller Repressor, der zusammen mit Kofaktoren die Chromatinstruktur in der Promotorregion der Zielgene modifiziert und so deren Expression steuert.

Neben der ursprünglich beschriebenen Blimp-1 mRNA existiert eine weitere mRNA, welcher das Exon 7 fehlt (Blimp-1 Δ Exon7). In diesem Exon sind die ersten zwei von insgesamt fünf Zinkfingern kodiert, welche nachweislich essentiell für die sequenzspezifische DNA-Interaktion von Blimp-1 sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Blimp-1 Δ Exon7 Deletionsmutante vorwiegend in ruhenden CD19⁺ B-Zellen der Maus und in unstimulierten humanen B-Zellen exprimiert wird. Obwohl die Blimp-1 sequenzspezifische DNA-Bindung des Proteins (Blimp-1 Δ Ex7) nicht mehr gegeben ist, lokalisiert es teilweise in den Kern, interagiert ebenfalls mit Korepressoren wie Histondeacetylase-2, und assoziiert mit heterochromatischen Bereichen der DNA. Die ektopische Expression von Blimp-1 Δ Ex7 in einer murinen B-Zell-Lymphomlinie, führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose, ohne jedoch die Differenzierung zur Plasmazelle zu ermöglichen. Darüber hinaus ist in Gegenwart von Blimp-1 Δ Ex7 die LPS-induzierte B-Zelldifferenzierung blockiert. Die Unterdrückung der Differenzierung korreliert mit einer verminderten Blimp-1 Expression. Zusammenfassend legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass Blimp-1 Δ Ex7 in naiven B-Zellen exprimiert wird und eine vorzeitige Differenzierung verhindert, indem es autoregulativ die Promotoraktivität herabsetzt und damit Blimp-1 kontrolliert.

7 Summary

Blimp-1 (B lymphocyte induced maturation protein-1) is the key regulator of terminal B cell differentiation. Ectopic expression of Blimp-1 is sufficient to drive naive B cells to differentiate into antibody-secreting cells. In this context, Blimp-1 acts as a transcriptional repressor that modifies, together with cofactors, the chromatin structure in the promoter region of its target genes and thereby controls their expression.

In addition to Blimp-1 mRNA there is another mRNA existing lacking exon 7 (Blimp-1 Δ exon7). This exon codifies two of the five zinc fingers that are absolutely essential for sequence-specific DNA interaction of Blimp-1.

The Blimp-1 Δ exon7 deletion mutant is predominantly expressed in resting or unstimulated CD19⁺ B cells of mice or humans, respectively. Although the protein (Blimp-1 Δ Ex7) cannot bind to the Blimp-1-specific DNA sequences, it partially localizes to the nucleus where it interacts with corepressors like histone deacetylase-2 and is associated with heterochromatic DNA. Ectopic expression of Blimp-1 Δ Ex7 in a murine B cell lymphoma line leads to cell cycle arrest and apoptosis without prior induction of plasma cell differentiation. Furthermore, in the presence of Blimp-1 Δ Ex7, LPS induced B cell differentiation is blocked. This block of differentiation correlates with a reduction in endogenous Blimp-1 expression.

Taken together, the data imply that Blimp-1 Δ Ex7 is expressed in naïve B cells to block premature differentiation by regulating the promoter activity in an auto-regulatory manner and is thereby controlling Blimp-1.

8 Literatur

8.1 Originalarbeiten

1. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 197-216.
2. Ellmeier, W., S. Sawada, and D.R. Littman, *The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development*. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 523-54.
3. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 233-58.
4. MacDonald, H.R. and M. Nabholz, *T-cell activation*. Annu Rev Cell Biol, 1986. 2: p. 231-53.
5. Maizels, N., *Immunoglobulin gene diversification*. Annu Rev Genet, 2005. 39: p. 23-46.
6. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Semin Immunol, 2004. 16(1): p. 3-9.
7. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. 17(1): p. 1-14.
8. Kondo, M., et al., *Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 759-806.
9. Ikuta, K., et al., *Lymphocyte development from stem cells*. Annu Rev Immunol, 1992. 10: p. 759-83.
10. Rolink, A.G., et al., *Early lymphocyte development in bone marrow and thymus*. Swiss Med Wkly, 2006. 136(43-44): p. 679-83.
11. Ollila, J. and M. Vihinen, *B cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. 37(3): p. 518-23.
12. Hardy, R.R., et al., *B-cell commitment, development and selection*. Immunol Rev, 2000. 175: p. 23-32.
13. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 595-621.
14. Hagman, J. and K. Lukin, *Transcription factors drive B cell development*. Curr Opin Immunol, 2006. 18(2): p. 127-34.
15. DeKoter, R.P. and H. Singh, *Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1*. Science, 2000. 288(5470): p. 1439-41.
16. Georgopoulos, K., S. Winandy, and N. Avitahl, *The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis*. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 155-76.
17. Murre, C., et al., *Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence*. Cell, 1989. 58(3): p. 537-44.
18. Bain, G., et al., *E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements*. Cell, 1994. 79(5): p. 885-92.
19. Zhuang, Y., P. Soriano, and H. Weintraub, *The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation*. Cell, 1994. 79(5): p. 875-84.
20. Sigvardsson, M., *Overlapping expression of early B-cell factor and basic helix-loop-helix proteins as a mechanism to dictate B-lineage-specific activity of the lambda5 promoter*. Mol Cell Biol, 2000. 20(10): p. 3640-54.

21. Sigvardsson, M., et al., *Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter*. Mol Cell Biol, 2002. 22(24): p. 8539-51.
22. Sigvardsson, M., M. O'Riordan, and R. Grosschedl, *EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes*. Immunity, 1997. 7(1): p. 25-36.
23. O'Riordan, M. and R. Grosschedl, *Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A*. Immunity, 1999. 11(1): p. 21-31.
24. Gisler, R. and M. Sigvardsson, *The human V-preB promoter is a target for coordinated activation by early B cell factor and E47*. J Immunol, 2002. 168(10): p. 5130-8.
25. Mikkola, I., et al., *Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression*. Science, 2002. 297(5578): p. 110-3.
26. Holmes, M.L., et al., *Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment*. Genes Dev, 2006. 20(8): p. 933-8.
27. Delogu, A., et al., *Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells*. Immunity, 2006. 24(3): p. 269-81.
28. Cobaleda, C., et al., *Pax5: the guardian of B cell identity and function*. Nat Immunol, 2007. 8(5): p. 463-70.
29. Hayakawa, K. and R.R. Hardy, *Development and function of B-1 cells*. Curr Opin Immunol, 2000. 12(3): p. 346-53.
30. Hayakawa, K., et al., *B-1 cell definition*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. 252: p. 15-22.
31. Martin, F. and J.F. Kearney, *Selection in the mature B cell repertoire*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. 252: p. 97-105.
32. Martin, F. and J.F. Kearney, *B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"*. Immunol Rev, 2000. 175: p. 70-9.
33. Won, W.J. and J.F. Kearney, *CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice*. J Immunol, 2002. 168(11): p. 5605-11.
34. Lopes-Carvalho, T. and J.F. Kearney, *Development and selection of marginal zone B cells*. Immunol Rev, 2004. 197: p. 192-205.
35. Berland, R. and H.H. Wortis, *Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5*. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 253-300.
36. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 161-96.
37. Henderson, A. and K. Calame, *Transcriptional regulation during B cell development*. Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 163-200.
38. Calame, K.L., K.I. Lin, and C. Tunyaplin, *Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 205-30.
39. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(3): p. 230-42.
40. Kallies, A. and S.L. Nutt, *Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1*. Curr Opin Immunol, 2007. 19(2): p. 156-62.
41. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(10): p. 741-50.
42. Dent, A.L., et al., *Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6*. Science, 1997. 276(5312): p. 589-92.

43. Ye, B.H., et al., *The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation*. Nat Genet, 1997. 16(2): p. 161-70.
44. Seyfert, V.L., et al., *Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6*. Oncogene, 1996. 12(11): p. 2331-42.
45. Shaffer, A.L., et al., *BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control*. Immunity, 2000. 13(2): p. 199-212.
46. Niu, H., B.H. Ye, and R. Dalla-Favera, *Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor*. Genes Dev, 1998. 12(13): p. 1953-61.
47. Gonda, H., et al., *The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression*. J Exp Med, 2003. 198(9): p. 1427-37.
48. Reimold, A.M., et al., *Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1*. J Exp Med, 1996. 183(2): p. 393-401.
49. Rinkenberger, J.L., et al., *An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene*. Immunity, 1996. 5(4): p. 377-86.
50. Singh, M. and B.K. Birshstein, *NF-HB (BSAP) is a repressor of the murine immunoglobulin heavy-chain 3' alpha enhancer at early stages of B-cell differentiation*. Mol Cell Biol, 1993. 13(6): p. 3611-22.
51. Shaffer, A.L., A. Peng, and M.S. Schlissel, *In vivo occupancy of the kappa light chain enhancers in primary pro- and pre-B cells: a model for kappa locus activation*. Immunity, 1997. 6(2): p. 131-43.
52. Johnson, K., et al., *Regulatory events in early and late B-cell differentiation*. Mol Immunol, 2005. 42(7): p. 749-61.
53. Turner, C.A., Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, *Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells*. Cell, 1994. 77(2): p. 297-306.
54. Angelin-Duclos, C., et al., *Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo*. J Immunol, 2000. 165(10): p. 5462-71.
55. Schliephake, D.E. and A. Schimpl, *Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti-mu F(ab')2-co-stimulated B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1996. 26(1): p. 268-71.
56. Shaffer, A.L., et al., *Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program*. Immunity, 2002. 17(1): p. 51-62.
57. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. Immunity, 2003. 19(4): p. 607-20.
58. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow*. J Exp Med, 2005. 202(11): p. 1471-6.
59. Keller, A.D. and T. Maniatis, *Only two of the five zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding*. Mol Cell Biol, 1992. 12(5): p. 1940-9.
60. Sciammas, R. and M.M. Davis, *Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation*. J Immunol, 2004. 172(9): p. 5427-40.
61. Tunyaplin, C., et al., *Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation*. J Immunol, 2004. 173(2): p. 1158-65.

62. Lin, K.I., et al., *Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells*. Mol Cell Biol, 2002. 22(13): p. 4771-80.
63. Lin, Y., K. Wong, and K. Calame, *Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation*. Science, 1997. 276(5312): p. 596-9.
64. Knodel, M., et al., *Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family*. Eur J Immunol, 1999. 29(9): p. 2988-98.
65. Ren, B., et al., *PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins*. Genes Dev, 1999. 13(1): p. 125-37.
66. Yu, J., et al., *Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase*. Mol Cell Biol, 2000. 20(7): p. 2592-603.
67. Gyory, I., et al., *PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing*. Nat Immunol, 2004. 5(3): p. 299-308.
68. Fears, S., et al., *Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(4): p. 1642-7.
69. Gyory, I., et al., *Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines*. J Immunol, 2003. 170(6): p. 3125-33.
70. Fichelson, S., et al., *Evi-1 expression in leukemic patients with rearrangements of the 3q25-q28 chromosomal region*. Leukemia, 1992. 6(2): p. 93-9.
71. Yang, X.H. and S. Huang, *PFMI (PRDM4), a new member of the PR-domain family, maps to a tumor suppressor locus on human chromosome 12q23-q24.1*. Genomics, 1999. 61(3): p. 319-25.
72. Vasanwala, F.H., et al., *Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene*. J Immunol, 2002. 169(4): p. 1922-9.
73. Choe, J. and Y.S. Choi, *IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells*. Eur J Immunol, 1998. 28(2): p. 508-15.
74. Reljic, R., et al., *Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6*. J Exp Med, 2000. 192(12): p. 1841-8.
75. Tunyaplin, C., M.A. Shapiro, and K.L. Calame, *Characterization of the B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) gene, mRNA isoforms and basal promoter*. Nucleic Acids Res, 2000. 28(24): p. 4846-55.
76. Soneoka, Y., et al., *A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors*. Nucleic Acids Res, 1995. 23(4): p. 628-33.
77. Kallies, A., et al., *Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression*. J Exp Med, 2004. 200(8): p. 967-77.
78. Huang, S., *Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF1*. Cell, 1994. 78(1): p. 9.
79. Cattoretta, G., et al., *PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage*. J Pathol, 2005. 206(1): p. 76-86.
80. Chang, D.H., C. Angelin-Duclos, and K. Calame, *BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage*. Nat Immunol, 2000. 1(2): p. 169-76.
81. Messika, E.J., et al., *Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development*. J Exp Med, 1998. 188(3): p. 515-25.

82. Lee, S.C., A. Bottaro, and R.A. Insel, *Activation of terminal B cell differentiation by inhibition of histone deacetylation*. Mol Immunol, 2003. 39(15): p. 923-32.
83. Piskurich, J.F., et al., *BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells*. Nat Immunol, 2000. 1(6): p. 526-32.
84. Silver, P.A., *How proteins enter the nucleus*. Cell, 1991. 64(3): p. 489-97.
85. Bellefroid, E.J., et al., *The human genome contains hundreds of genes coding for finger proteins of the Kruppel type*. DNA, 1989. 8(6): p. 377-87.
86. Baldarelli, R.M., et al., *Transcripts of the Drosophila blastoderm-specific locus, terminus, are concentrated posteriorly and encode a potential DNA-binding finger*. Dev Biol, 1988. 125(1): p. 85-95.
87. Ghirlando, R. and C.D. Trainor, *Determinants of GATA-1 binding to DNA: the role of non-finger residues*. J Biol Chem, 2003. 278(46): p. 45620-8.
88. Elefanty, A.G., et al., *GATA transcription factors associate with a novel class of nuclear bodies in erythroblasts and megakaryocytes*. Embo J, 1996. 15(2): p. 319-33.
89. Spann, T.P., et al., *Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription*. J Cell Biol, 2002. 156(4): p. 603-8.
90. Hager, G.L., C. Elbi, and M. Becker, *Protein dynamics in the nuclear compartment*. Curr Opin Genet Dev, 2002. 12(2): p. 137-41.
91. McNally, J.G., et al., *The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells*. Science, 2000. 287(5456): p. 1262-5.
92. Fletcher, T.M., et al., *Structure and dynamic properties of a glucocorticoid receptor-induced chromatin transition*. Mol Cell Biol, 2000. 20(17): p. 6466-75.
93. Misteli, T. and D.L. Spector, *The cellular organization of gene expression*. Curr Opin Cell Biol, 1998. 10(3): p. 323-31.
94. Huang, S. and D.L. Spector, *Dynamic organization of pre-mRNA splicing factors*. J Cell Biochem, 1996. 62(2): p. 191-7.
95. Jimenez-Garcia, L.F. and D.L. Spector, *In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism*. Cell, 1993. 73(1): p. 47-59.
96. Zhong, S., P. Salomoni, and P.P. Pandolfi, *The transcriptional role of PML and the nuclear body*. Nat Cell Biol, 2000. 2(5): p. E85-90.
97. Borden, K.L., *Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies*. Mol Cell Biol, 2002. 22(15): p. 5259-69.
98. Brock, H.W. and M. van Lohuizen, *The Polycomb group--no longer an exclusive club?* Curr Opin Genet Dev, 2001. 11(2): p. 175-81.
99. Mintz, P.J., et al., *Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters*. Embo J, 1999. 18(15): p. 4308-20.
100. Seeler, J.S., et al., *Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(13): p. 7316-21.
101. Everett, R.D., et al., *Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition*. J Cell Sci, 1999. 112 (Pt 24): p. 4581-8.
102. Saurin, A.J., et al., *The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain*. J Cell Biol, 1998. 142(4): p. 887-98.
103. Czermin, B., et al., *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. Cell, 2002. 111(2): p. 185-96.

Kofaktoren die Entwicklung der Zelle in die eine oder andere Richtung. Die Kofaktoren, die stadienspezifisch exprimiert werden, bestimmen letztendlich, ob durch Blimp-1 die Apoptose oder die B-Zelldifferenzierung ausgelöst wird.

Da die relative Menge an Blimp-1 Δ exon7 mRNA in naiven B-Zellen am höchsten war und nach LPS Stimulation deutlich abnahm (Abb. 7), und darüber hinaus die Überexpression von Blimp-1 Δ Ex7 in WEHI 231 Zellen Apoptose induziert (Abb. 10), ist eine besondere Rolle von Blimp-1 Δ Ex7 während der B-Zelldifferenzierung anzunehmen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten legen nahe, dass Blimp-1 Δ Ex7 einer der Faktoren ist, der stadienspezifisch exprimiert Blimp-1 kontrolliert, und damit einer spontanen B-Zelldifferenzierung entgegen wirkt.

104. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. 298(5595): p. 1039-43.
105. Muller, J., et al., *Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex*. Cell, 2002. 111(2): p. 197-208.
106. Spector, D.L., *The dynamics of chromosome organization and gene regulation*. Annu Rev Biochem, 2003. 72: p. 573-608.
107. Huang, S., G. Shao, and L. Liu, *The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression*. J Biol Chem, 1998. 273(26): p. 15933-9.
108. Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan, *c-MYC: more than just a matter of life and death*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(10): p. 764-76.

8.2 Weitere Literatur

- (1) **Abbas, K. A., Lichtman, A. H.**, Cellular and Molecular Immunology. 5th edition, Elsevier Saunders, 2005
- (2) **Janeway, C. A., Travers, P.**, Immunobiology – The immune system in health and disease. 5th edition, Garland Publishing, 2001
- (3) **Benjamini, E., Leskowitz, S.**, Immunologie – Ein Kurzlehrbuch. Schwer Verlag Stuttgart, 1988
- (4) **Herold, M.**, Der C-Terminus des antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes A1 reguliert Stabilität und Funktionalität des Proteins. Dissertation, Würzburg, 2005
- (5) **Janeway, C. A., Travers, P.**, Immunologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1997

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

anti μ bzw. anti μ F(ab') ₂	F(ab') ₂ -Fragment eines Ziege-anti-Maus IgM Antikörpers
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Blimp-1	B lymphocyte induced maturation protein-1
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	balancierte Salzlösung
BZR	B-Zellrezeptor
CMV	Cytomegalivirus
Cy	Cychrom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGN	enhanced green fluorescent/ neomycin protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein

EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
ERK	Extrazellulär aktivierte Kinase
EYZ	enhanced yellow fluorescent/ zeozin protein
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	fötales Kälberserum
h	Stunde(n)
HEK	humanes embryonales Nierenzellkarzinom
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	internal ribosomal entry site
kd	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	Multiple Cloning Site
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

9.2 Publikationsliste

Schmidt, D. et al., *Blimp-1 Δ exon7: A naturally occurring Blimp-1 deletion mutant with auto-regulatory qualities*. Zur Veröffentlichung eingereicht

9.3 Lebenslauf

Name	Doris Schmidt, geb. Wittmann
Geburtstag	29.03.1977
Geburtsort	Ansbach, Deutschland
Anschrift	Karmelitenstr. 39, 97070 Würzburg
Familienstand	verheiratet
Schulausbildung	1983 – 1987 Grundschule Lichtenau 1987 – 1996 Platen-Gymnasium Ansbach
Studium	
1996– 2003	Studium der Diplombiologie an der Universität Bayreuth (Schwerpunkte: Genetik, Biochemie und Mikrobiologie)
01 bis 10/2002	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth mit dem Titel „Charakterisierung des Zentromerproteins CID und interagierender Gene“
seit 03/2003	Promotion unter der Betreuung von PD Dr. Ingolf Berberich am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg mit dem Schwerpunkt „Regulation der terminalen B- Zelldifferenzierung“

Würzburg, den

.....

Doris Schmidt