

6 Zusammenfassung

Um mit einer wirksamen Immunantwort auf möglichst viele in der Umwelt vorhandene Antigene reagieren zu können, haben B-Zellen die Fähigkeit, ihr genetisches Material zu rekombinieren und dadurch aus einer relativ geringen Anzahl von Gensegmenten auf der DNA ein sehr grosses Repertoire an Genkombinationen zu bilden. Dabei kommt es temporär zu einer Destabilisierung der DNA, die gleichzeitig immer auch eine Gefahr für die Zelle bedeutet. Der Rekombinationsmechanismus sollte also sehr fein reguliert sein, damit die Zelle von dieser Fähigkeit profitieren kann. Eine Schlüsselstellung in der Regulation dieser Rekombinationsvorgänge spielt die Aktivitätsinduzierte Cytidin Deaminase (AID). Angesichts der grundlegenden Bedeutung von AID für die Erzeugung der Antikörpervariabilität ist es erforderlich, die bisher wenig bekannte molekulare Wirkungsweise dieses Enzyms aufzuklären. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob AID als Transkriptionsfaktor wirkt, der die Expression von Genen induziert, die an Rekombinationsvorgängen beteiligt sind. Als Modellsystem für die Untersuchungen wurde die B-Zelllinie DT40 benutzt, da in dieser Zelllinie Genkonversion, als einer der beteiligten Rekombinationsmechanismen, abläuft. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass nach Ausschalten des AID-Gens in DT40-Zellen keine Genkonversion mehr stattfindet.

Um mögliche Expressionsunterschiede darzustellen, wurden Transkriptionsprofile von AID-positiven und AID-negativen Zellen angefertigt. Mittels dieser für die Klinik bisher relativ neuen molekulardiagnostischen Methode kann die Transkriptionsaktivität von Zellen in Form von Mikroarrays sichtbar gemacht werden. Die Mikroarrays waren in diesem Falle Nylonfilter, auf denen B-zellspezifische cDNAs aufgetragen sind. Die Mikroarray-Filter wurden dann mit radioaktiv markierter cDNA aus mRNA AID-positiver bzw. AID-negativer DT40-Zellen hybridisiert. Falls AID die Transkription von Genen induziert, sollten sich die Hybridisierungsmuster unterscheiden. Nach Analyse der Primärdaten der Profile schienen einzelne Gene unterschiedlich hoch exprimiert zu sein. Die Primärdaten sind die Daten, die von einem speziell für Mikroarrays konzipierten Computerprogramm erzeugt werden. Danach kann jedem Punkt gemäß seiner Intensität auf dem Filter ein Zahlenwert zugeordnet werden. Da bei Anfertigung der Arrays viele nichtsignifikante Werte erzeugt werden, wurde durch statistische Methoden angestrebt, diese aus der Auswertung herauszufiltern. Die meisten der durch das Programm berechneten Werte fielen damit hinaus. Einige Gene wurden gefunden, deren Expression in der AID-negativen Zelle herunterreguliert zu sein schien. Dieses Ergebnis wurde überprüft, indem die RNA-Mengen dieser Kandidatengene direkt mit RT-PCR verglichen wurden. Die detektierten, statistisch signifikanten Expressionsunterschiede konnten mit dieser Methode nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass AID nicht als Transkriptionsfaktor wirkt, der das Expressionsmuster der Zelle global beeinflusst. Allerdings

kann es sein, dass einzelne differentiell exprimierte Gene mit der hier verwendeten Methode nicht erfasst wurden. Dieses Ergebnis stimmt mit kürzlich veröffentlichten Arbeiten überein, wonach das AID-Genprodukt nicht primär die Transkription von Genen induziert, sondern Cytosin zu Uracil auf der DNA deaminiert. Die so erzeugte Mutation ruft sekundär Reparaturprozesse hervor.