

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Ch. P. Speer

Das Leichtketten Kappa Immunglobulin-
repertoire in der kindlichen Tonsille

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Carina Bräutigam
aus Mainstockheim

Würzburg, April 2004

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Ch. P. Speer

Das Leichtketten Kappa Immunglobulin-
repertoire in der kindlichen Tonsille

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Carina Bräutigam
aus Mainstockheim

Würzburg, April 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. H. J. Girschick

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Vogel

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 31/12/2004

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Die Antikörper.....	2
1.2.1	Grundstruktur und Aufbau.....	2
1.2.2	Die variable Domäne.....	5
1.3	Die Immunglobulingen-Loci.....	6
1.3.1	Allgemein.....	6
1.3.2	Die Immunglobulin Leichtketten Kappalokus.....	7
1.4	Gründe der Mannigfaltigkeit im Prozeß des V(D)J Gen-Rearrangements von Immunglobulinen.....	10
1.4.1	Immunglobulin Gen-Rearrangement.....	10
1.4.2	RAG1/RAG2 (recombination activating genes)...	11
1.4.3	Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase).....	12
1.4.4	Exonuklease.....	13
1.4.5	DNS-Ligase.....	13
1.5	Die Entwicklung eines Keimzentrums.....	14
1.6	Somatische Hypermutation.....	18
1.7	Fragestellungen.....	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Aufbereitung von B Zellen aus Tonsillengewebe.....	22
2.2	Sortieren der Zellen.....	22
2.3	PCR Amplifikation der genomischen Immunglobulin DNS aus sortierten Einzelzellen.....	22
2.4	Sequenzen-Analyse.....	24
2.5	Statistische Methoden.....	25

3 Ergebnisse	26
3.1 Analyse der verwendeten V_{κ} Einzelgene in der kindlichen Tonsille, Vergleich zwischen nicht-produktivem und produktivem Repertoire und Vergleich mit Nabelschnurblut und Erwachsenenblut	26
3.1.1 Verteilung der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements aus der kindlichen Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire des Erwachsenen.....	26
3.1.2 Verteilung der produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements aus der kindlichen Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire des Erwachsenen....	27
3.1.3 Verteilung der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements aus der Tonsille im Vergleich mit der Verteilung der produktiven Rearrangements aus der Tonsille	28
3.1.4 Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements der naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille	29
3.1.5 Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements der Germinal Center Founder Zellen aus der kindlichen Tonsille	30
3.1.6 Vergleich der nicht-produktiven und	

	produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements der Centroblasten aus der kindlichen Tonsille	31
3.1.7	Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements der Centrocyten aus der kindlichen Tonsille	31
3.1.8	Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements der Memory B Zellen aus der kindlichen Tonsille	32
3.1.9	Verteilung der V κ Gene in nicht-produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen.....	33
3.1.10	Verteilung der V κ Gene in produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen.....	33
3.1.11	Verteilung der nicht-produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements in naiven B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des nicht-produktiven V κ J κ Repertoires von IgM ⁺ B Zellen des Erwachsenen.....	34
3.1.12	Verteilung der produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements in naiven B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des produktiven V κ J κ Repertoires von IgM ⁺ B Zellen des Erwachsenen.....	34
3.1.13	Verteilung der nicht-produktiven V κ J κ Gen-Rearrangements in B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der Verteilung in IgD ⁺	

	Nabelschnurblut B Zellen und im Vergleich mit IgM+ B Zellen des Erwachsenen	35
3.1.14	Verteilung der produktiven V _κ J _κ Gen- Rearrangements in B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der Verteilung in IgD+ Nabelschnurblut B Zellen und im Vergleich mit IgM+ B Zellen des Erwachsenen	36
3.2	Analyse der Mutationsverteilung	37
3.2.1	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _κ J _κ Kodons in produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	37
3.2.2	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _κ J _κ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	38
3.2.3	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _κ J _κ Kodons in naiven B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	38
3.2.4	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _κ J _κ Kodons in Germinal Center Founder Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	40
3.2.5	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _κ J _κ Kodons in Centroblasten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	40
3.2.6	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _κ J _κ Kodons in Centrocyten Sequenzen	

	aus der kindlichen Tonsille	41
3.2.7	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in Memory B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	42
3.3	Analyse der Mutationsverteilung in mit B2 oder B3 rearrangierten Sequenzen.....	42
3.3.1	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	43
3.3.2	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten naiven B Zell Sequenzen.....	43
3.3.3	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen.....	44
3.3.4	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Centroblasten Sequenzen.....	44
3.3.5	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Centrocyten Sequenzen.....	45
3.3.6	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Memory B Zell Sequenzen.....	46

3.4	Analyse der Mutationsverteilung in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Sequenzen.....	46
3.4.1	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille	46
3.4.2	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten naiven B Zell Sequenzen	47
3.4.3	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen.....	47
3.4.4	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Centroblasten Sequenzen.....	48
3.4.5	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Centrocyten Sequenzen.....	48
3.4.6	Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V _K J _K Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Memory B Zell Sequenzen.....	49
3.5	Analyse des Verhältnisses von Austauschmutationen zu stillen Mutationen	49

3.6	Analyse des Anteils an Austauschmutationen im CDR Bereich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen mutierten Sequenzen (Regressionsanalyse).....	51
4	Diskussion	52
4.1	Die Auswahl der V κ Gene.....	52
4.1.1	Das nicht-produktive Repertoire.....	52
4.1.2	Das produktive Repertoire.....	55
4.1.3	Proximale oder distale Kasette.....	58
4.2	Somatische Hypermutationen.....	59
5	Zusammenfassung	66
6	Abkürzungen	68
7	Literaturverzeichnis	70
8	Figuren	76
8.1	Figurenlegende.....	76

Meinen Eltern

Bernd und Irene

mit einem Dank für die
grenzenlose Unterstützung

1 Einleitung

1.1 Einführung

Unser Abwehrsystem ist ein multizelluläres System (1). Die unspezifische (oder angeborene) Abwehr, die u.a. aus Komplementsystem, Makrophagen und polymorphkernigen Granulozyten besteht, stellt das erste, aber stets im gleichen Muster ablaufende Hindernis für einen Infektionserreger dar. Die spezifische (oder adaptive) Abwehr, bestehend aus Dendritischen Zellen, B und T Lymphozyten, folgt wenige Tage später. Sie ist anpassungsfähig und kann mit einem maßgeschneiderten Plan auf den Eindringling reagieren. B und T Lymphozyten patrouillieren ständig im Blut, wandern in die sekundären Lymphorgane (Lymphknoten, Milz, Tonsillen) ein und halten stets Ausschau nach Fremdanitigenen. Um diese Fremdanitigene zu erkennen, benötigen sie die Hilfe von Antigen-präsentierenden Zellen. Diese präsentieren in den MHC-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche Peptide von Fremdanitigenen, welche phagozytiert und im Proteasom proteolytisch wurden. Lymphozyten sind während ihrer Entwicklung und Reifung einem Prozeß der Prüfung unterzogen worden, der beinhaltet, daß sie sowohl mit ihren Rezeptoren diese MHC-Komplexe erkennen (positive Selektion), als auch körpereigene Proteine von Fremdprotein unterscheiden können (negative Selektion). Präsentiert nun eine Körperzelle mit ihrem MHC I-Komplex Peptide eines intrazellulären Erregers, dann kann eine für dieses Peptid spezifische T Zelle mit ihrem entsprechenden Rezeptor aktiviert werden. Der gebundene T Lymphozyt wird dadurch zur zytotoxischen T Zelle aktiviert und ist potentiell in der Lage, diese Körperzelle zu eliminieren.

Der Weg zur Aktivierung eines B Lymphozyten ist dazu different. Die B Lymphozyten suchen mit ihren Oberflächen-Rezeptoren (membranständiges Immunglobulin) vor allem im extrazellulären Milieu nach

Antigenen, welche sie mit ihren Rezeptoren erkennen können (Schlüssel-Schloß-Prinzip). Haben sie nun ein für sie spezifisches Antigen gebunden, wird dieser ganze Rezeptor-Antigen-Komplex erst einmal internalisiert und in Fragmente zerlegt, die dann als MHC II-gebundene Peptide an die Membranoberfläche zurückkehren (1). In dieser Form kann das Antigen von T Zellen erkannt werden. Die B Lymphozyten können sich in dieser Kostimulation mit T Zellen im Rahmen einer Keimzentrumsreaktion weiter in Plasmazellen differenzieren. Diese produzieren nun den ursprünglich zellständigen B Zellrezeptor als annähernd identische (2,3) lösliche Variante. Diese Antikörper werden sezerniert, um die entsprechenden Fremdartigene im Körper aufzuspüren und zu binden (humorale Immunantwort).

1.2 Die Antikörper

1.2.1 Grundstruktur und Aufbau

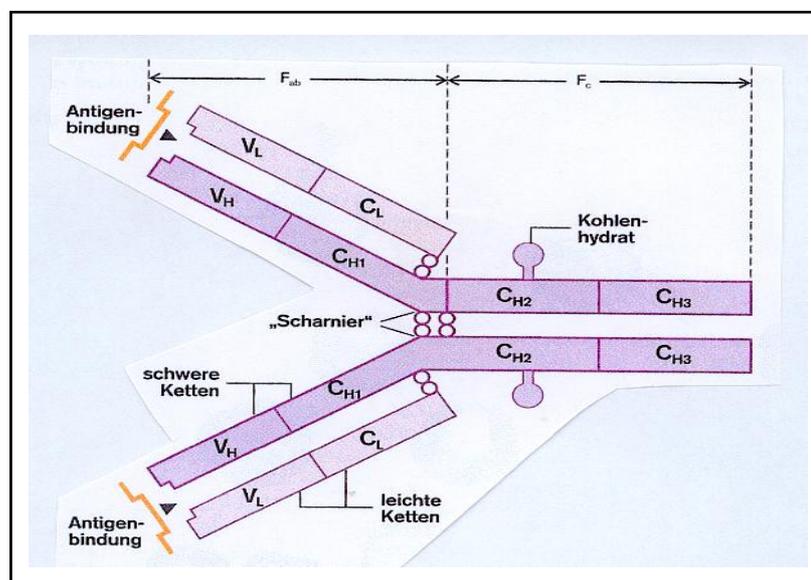


Abbildung 1: typische Grundstruktur eines Antikörpers mit zwei leichten Ketten (mit den Untereinheiten V_L und C_L) sowie zwei schweren Ketten (mit den Untereinheiten V_H, C_{H1}, C_{H2} und C_{H3}) (modifiziert aus (4)).

Antikörper machen etwa 20 Prozent unserer Plasmaproteine aus. In der Serumelektrophorese befinden sich diese in der Gammaglobulinfraktion. Alle Antikörper besitzen die gleiche Y-förmige Grundstruktur. Sie bestehen aus jeweils zwei identischen leichten und schweren Ketten. Bei den leichten Ketten (oder light chains aufgrund ihrer Molekularmasse von 25000 Dalton) werden die zwei Typen lambda (λ) und kappa (κ) unterschieden (2). Zwei identische schwere Ketten (oder heavy chains mit einer Molekularmasse zwischen 50000 und 70000 Dalton je nach Antikörperklasse) bilden das Hauptgerüst. Die schwere Kette bestimmt die Antikörperklasse. Es gibt fünf verschiedene schwere Ketten (γ , μ , α , δ , ϵ) und somit fünf Antikörperklassen: IgG (γ -Kette), IgM (μ -Kette), IgA (α -Kette), IgD (δ -Kette) und IgE (ϵ -Kette). Subklassen kennt man bei IgG (Verteilung bei Gesunden in etwa: IgG1 66%, IgG2 23%, IgG3 7%, IgG4 4%) und IgA (IgA1 und IgA2). IgA und IgM treten als Oligomere (zwei, respektive fünf) dieses vierkettigen Grundmodells auf.

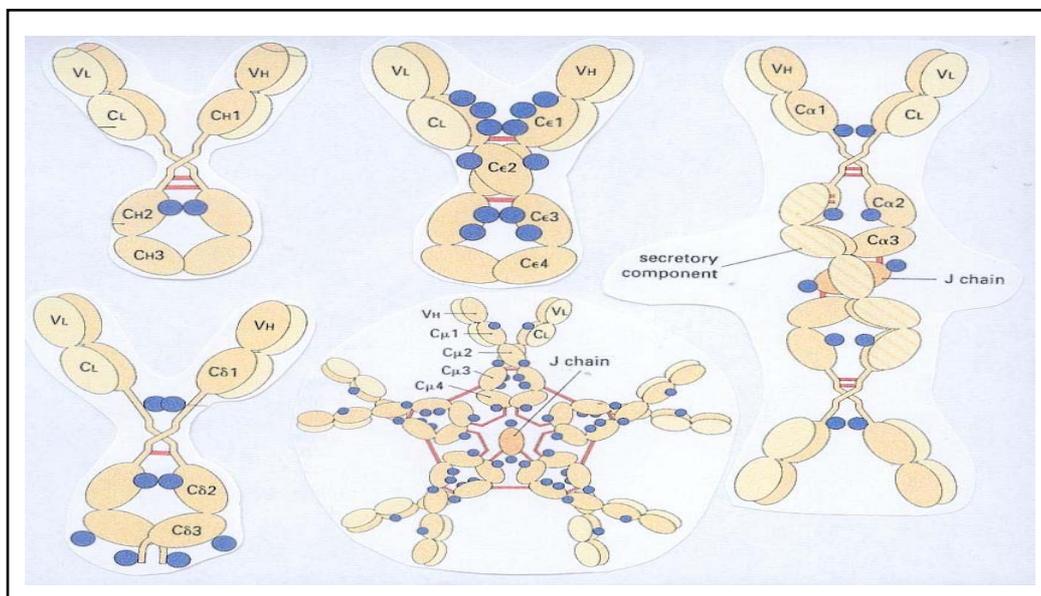


Abbildung 2: Grundstruktur der fünf Antikörperklassen:

oben von links IgG, IgE, IgA-Dimer; unten IgD und IgM-Pentamer (modifiziert aus (3))

Innerhalb der Ketten kann man wiederum kompakt gefaltete Homologieregionen oder Domänen abgrenzen. Jede dieser Regionen umfaßt etwa 110 Aminosäuren, davon sind 60-70 Aminosäuren als zentral gelegener Ring angeordnet, der von einer Disulfidbrücke zusammengehalten wird. Sie bilden zwei Ebenen, mit jeweils drei bzw. vier Segmenten antiparalleler Faltblattstrukturen. Eine leichte Kette besitzt zwei solcher Domänen: am aminoterminalen Ende eine variable Immunglobulindomäne (VL) und am carboxyterminalen Ende eine konstante Immunglobulindomäne (CL). Analog dazu besteht eine heavy chain ebenso aus einer variablen Immunglobulindomäne (VH) und mehreren, sich daran anschließenden, im Falle des IgG drei konstanten Immunglobulindomänen (CH1, CH2, CH3).

Die homologen Domänen ordnen sich paarig an, so daß eine leichte Kette zusammen mit einer VH und CH1 Domäne jeweils einen Arm des Ypsilon bilden. Den Stamm des Ypsilon bilden die übrigen konstanten Domänen der schweren Kette. Eine Ausnahme in der paarigen Anordnung bilden die CH2 Domänen, die durch Kohlenhydrateinheiten auseinandergehalten werden.

Zwischen den Armen des Ypsilon (CH1 Domänen) und dem Stamm (CH2 Domänen) findet man die flexible Scharnierregion (hinge), die den beiden Armen eine relativ unabhängige Bewegung voneinander ermöglicht (2). Eine gewisse Flexibilität konnte auch zwischen den V und C Domänen beobachtet werden (molekulares Kugelgelenk)(2).

Unterzieht man einen IgG-Antikörper einer proteolytischen Spaltung mit Papain, so erhält man zwei sog. Fab-Fragmente (**F**ragment **A**ntigen **b**indend) und ein Fc-Fragment („**k**ristallisierbar“). Dies deutet die Bifunktionalität eines Antikörpers an. Die beiden Fab Fragmente binden das Antigen, während der Fc Anteil dazu nicht in der Lage ist. Dieser ist aber für weiteren Funktionen, wie die Komplementaktivierung oder Bindung an Fc Rezeptoren, zuständig (siehe Abbildung 1).

1.2.2 Die variable Domäne

In den variablen Domänen können jeweils drei Bereiche abgegrenzt werden, die sich durch eine besonders stark ausgeprägte Variabilität auszeichnen, die hypervariablen Regionen (2,3).

Diese, zusammen sechs, hypervariablen Regionen beider „heavy und light“ Domänen (5) bilden einen Verbund am Ende des Ypsilon-Armes, der die „komplementäre“ Haftstelle für das Antigen darstellt. Diese „complementarity determining regions“ (CDRs) reichen auf der Kappa Leichtkette von Aminosäure 24 bis 34 (CDR1), 50 bis 56 (CDR2) und 89 bis 97 (CDR3). Die dazwischenliegenden Abschnitte bezeichnet man als framework regions (FR1 bis FR4)(1), sie sind wichtig für die Integrität und den Strukturaufbau der variablen Domäne (6).

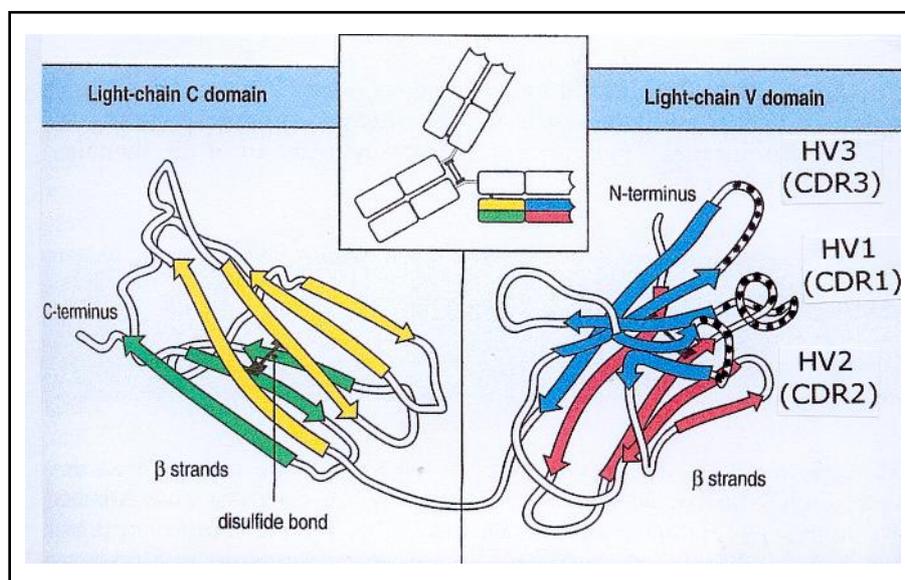


Abbildung 3: schematische Darstellung der **Faltung einer Leichtkette** mit eingezeichneten hypervariablen (HV) Regionen (modifiziert aus (2)).

1.3 Die Immunglobulingen-Loci

1.3.1 Allgemein

Die adaptive Immunantwort dient der Abwehr von Infektionserregern und Umweltpathogenen unter der Verwendung eines theoretisch unbegrenzt (7) mannigfaltigen Repertoires an antigen-spezifischen Rezeptoren auf T und B Zellen. Es gibt mehrere Wege, über die diese Mannigfaltigkeit unseres Immunrepertoires erzeugt wird (8). Der Grundstock befindet sich bereits auf genetisch somatischer Ebene. Jede mögliche variable Domäne zur Antigenerkennung kann nicht bereits komplett in unserem Genom vorhanden sein, denn allein dazu bräuchten wir mehr Gene, als wir überhaupt besitzen (2). So werden die Gensequenzen für eine variable Domäne aus mehreren Stücken, den Gensegmenten zusammengebaut.

Die einzelnen Segmente für das Gen-Rearrangement einer **schweren Kette** befinden sich auf dem langen Arm von **Chromosom 14 (14q32.3)** (9). Für die variable Domäne stehen 50-60 funktionelle variable (VH), 15-30 diversity (D) und 6 joining Segmente (JH) zur Verfügung. Für die konstante Domäne der schweren Kette gibt es 5 Segmente (μ - δ - γ - ϵ - α).

Chromosom 22 (22q11.2) ist der Lokalisationsort für die Segmente der **Lambda Leichtkette** mit 119 variablen (davon sind etwa 36 funktionelle) (V λ), 7 joining (J λ) und 7 konstanten Segmenten (C λ) (9).

Der Locus der **Kappa Leichtkette** ist auf **Chromosom 2 (2cen-p11.2)** (9) lokalisiert. Er besteht aus 76 variablen (V κ), 5 joining (J κ) und 1 konstanten Segment (C κ) (9). Dabei kodiert ein V κ -Segment die Aminosäuren 1-95 und ein J κ -Segment die restlichen Aminosäuren einer V-Domäne.

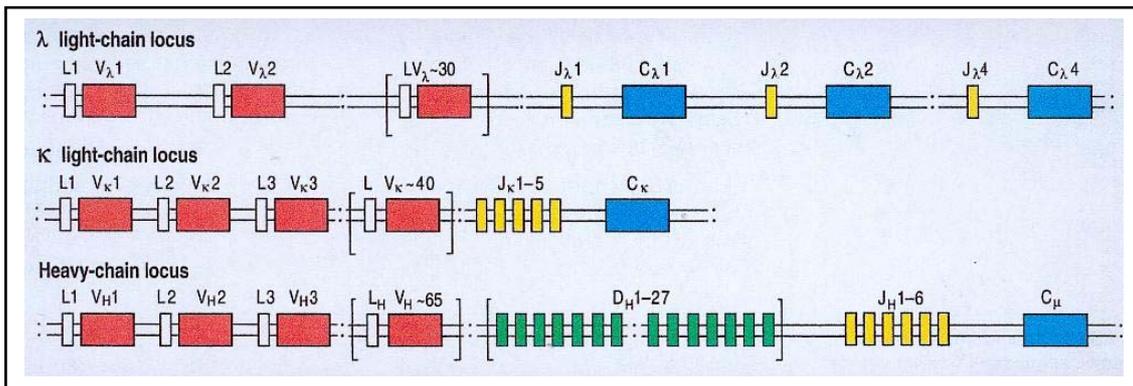


Abbildung 4: schematische Darstellung der einzelnen **Genloci** mit ihren Gensegmenten. Der Lambdalokus mit etwa 30 funktionellen V-Segmenten und je vier funktionellen J- und C-Segmenten. Der Kappalokus mit seinen circa 40 funktionellen V-Segmenten, gefolgt von fünf J-Segmenten und einem C-Segment. Der Schwerkettenloкус mit etwa 65 funktionellen V-Segmenten, 27 D-Segmenten, 6 J-Segmenten und einem C-Segment (aus (2)).

1.3.2 Der Immunglobulin Leichtketten Kappalokus

Betrachtet man den Kappalokus genauer umfaßt er 1.010.706 Nukleotide (9), 0,1% (7) unseres 3000 Mb menschlichen Genoms (10) (siehe Abbildung 5).

Etwa aus 600 kb besteht die proximale Kassette für 1 C_κ, 5 J_κ und 40 V_κ (Bereiche Op, Ap, Lp, B; J_κ, C_κ). Aus 440 kb besteht die sehr ähnliche, aber nicht identische Duplikatur, die distale Kassette mit 36 V_κ Genen (Od, Ad, Ld). Sie ist in gegenläufiger 5´-3´-Polarität an die proximale Kassette angefügt (10-12). Im Durchschnitt unterscheidet sich die proximale von der distalen Kassette in ungefähr 1% der Basenpaare (12), wobei 1% etwa 1 Million Jahre genetischer Evolution entspricht (13). Wegen der großen Ähnlichkeit der beiden Kassetten hat die Duplikatur das Gen-Repertoire (prinzipiell) nicht besonders erweitert (12). Mehrere Studien zeigten auch die sehr seltene Verwendung des distalen Lokus (14). Die Existenz von homozygot ge-

sunden Menschen ohne distale Kasette, bekannt als „Haplotyp 11“ (15), zeigt deren Entbehrlichkeit (12).

Von 76 V_{κ} Genen sind etwa 40 potentiell funktionstüchtig, 16 haben geringe Defekte (d.h. 1 oder 2 bp Veränderungen) und 25 sind Pseudogene (10,12). 10 der 76 sind Einzelgene, 33 Genpaare auf den 2 Kassetten, deren Sequenzen in den kodierenden Regionen zwischen 95 und 100% identisch sind (12). Zusätzlich konnten noch 24, außerhalb des Kappalokus im Genom verstreute, V_{κ} -„Waisen-Gene“ (orphon) gefunden werden, eines auf dem kurzen Arm von Chromosom 2, 12 auf dem langen Arm von Chromosom 2, der Rest auf Chromosom 1 und 22 (10,12). Die meisten sind jedoch nicht funktionelle Pseudogene (12).

Man teilt die V_{κ} Gene noch weiter in die Familien I-VII ein, wobei die Mitglieder einer Untergruppe mindestens 80% Ähnlichkeit haben (13). In den Untergruppen V-VII gibt es nur bis zu 5 Gene (16). Es stellte sich aus dieser Kenntnis des Kappalokus nun die Frage, ob die verschiedenen V und J Gene auch gleich häufig und damit statistisch verwendet werden. In Studien, die dies bisher untersuchten, war die Verwendungshäufigkeit aber nicht zufällig. Es gab Favoriten für ein Rearrangement. In Nabelschnurblut B Zellen tragen 9 Gene oder nicht unterscheidbare Genpaare (O2/O12, O8/O18, L9, L12(L12a), A3/A19, A27, L2, L6 und B) zu 75% der gesamten V_{κ} Sequenzen bei (14). Auch beim Erwachsenen sind die beliebtesten V_{κ} Gene O2/O12, O8/O18, A17, L12, A3/A19, A27, L2, L6 und B3 (17). Auch die fünf J_{κ} Gene werden mit unterschiedlicher Häufigkeit verwendet. Relativ selten sieht man $J_{\kappa}3$ und $J_{\kappa}5$ rearrangiert. Auch scheinen die einzelnen V_{κ} Subgruppen unterschiedliche Vorlieben für die verschiedenen J_{κ} zu haben (18).

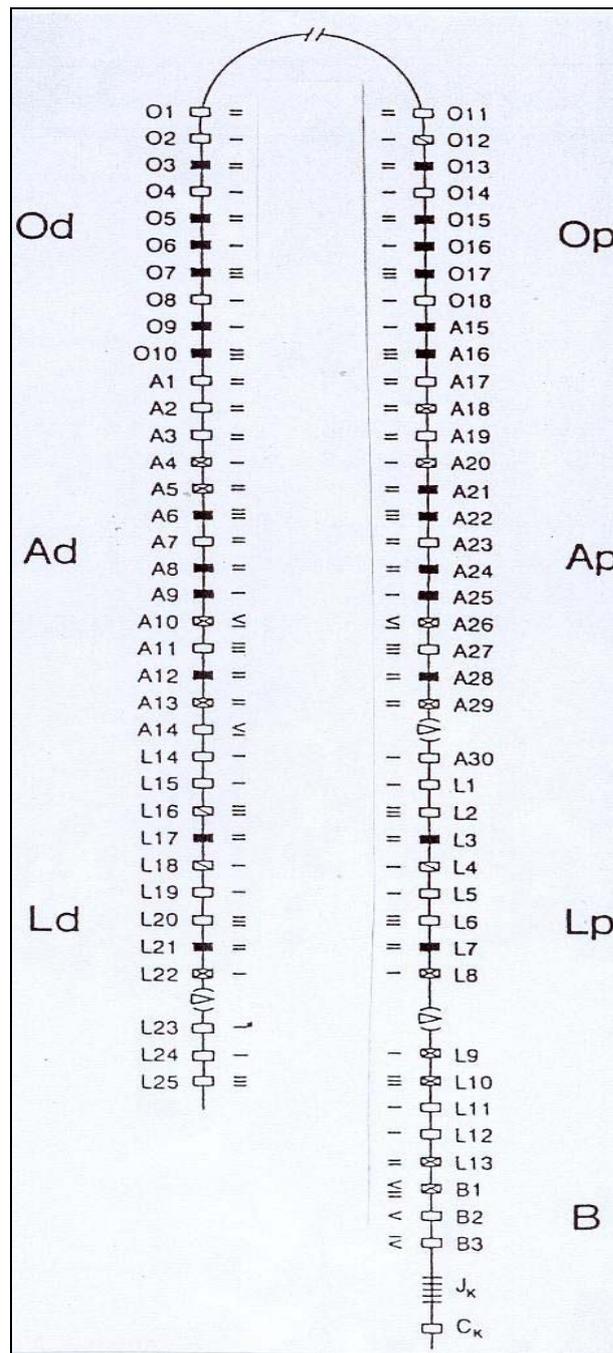


Abbildung 5: Kappalokus

- Potentiell funktionstüchtige Gene
- Pseudogene
- Gene mit geringen Defekten

Die V_k Familien sind mit römischen Zahlen gekennzeichnet.

(modifiziert nach (18))

1.4 Gründe der Mannigfaltigkeit im Prozeß des V(D)J Gen-Rearrangements von Immunglobulinen

1.4.1 Immunglobulin Gen-Rearrangement

Die Entwicklung einer B Zelle beginnt als Stammzelle im Knochenmark. Als erstes wird mit der Zusammenstellung einer schweren Kette begonnen. Beginnend mit dem Rearrangement eines D-Segments mit einem J-Segment (frühe pro-B Zelle), anschließend die Verbindung eines V-Segments mit diesem DJ-Segment (19) (späte pro-B Zelle). Nur etwa 55% der Rearrangements (2) sind bei diesem Schritt erfolgreich und sind anschließend in der Lage als große prä-B Zelle erstmals den prä-B Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dieser besteht aus der gerade fertig gestellten μ -Kette und der sogenannten Ersatzleichtkette, welche von den Genen V_{preB} für die variable Kette und 14.1 für deren konstanten Anteil abgeschrieben wurde. Danach beginnen sie sich in kleine prä-B Zellen zu teilen. Diese versuchen sich nun im Gen-Rearrangement einer Leichtkette. Der menschliche Kappalokus scheint Vorrang vor dem Lambdalokus zu haben. Dabei wird ein „zufällig ausgewähltes“ V_{κ} -Segment mit einem ebenso „zufällig ausgewähltem“ J_{κ} -Segment verbunden und anschließend mit dem C_{κ} -Segment zusammengefügt. Aufgrund unterschiedlicher 5' 3' Orientierung bedienen sich die Gene B2, B3 und die distale Kasette eines Inversionsmechanismus (20), die proximale Kasette eines Deletionsmechanismus (21). Im Unterschied zum Rearrangement einer schweren Kette, wo auf jedem Chromosom oft nur ein Versuch gestattet wird, und bei zwei Mißerfolgen das ganze in Apoptose der B Zelle endet, können beim Leichtketten-Rearrangement mehrere Versuche auf dem gleichen Chromosom gestartet werden. War das Rearrangement erfolgreich, wird die leichte mit der schweren Kette kombiniert und als IgM oder IgD auf die Oberfläche gebracht.

Diese unreife IgM+ IgD+ B Zelle kann nun als reife naive B Zelle das Knochenmark verlassen.

Ein Leitsystem für den Rekombinase-Enzymkomplex (RAG1 u. RAG2, Ku70:Ku80, Tdt, Exonuklease) ist allerdings nötig, damit an den richtigen Stellen im Kappalokus geschnitten wird und die richtigen Segmente zusammenkommen.

So ist jedes V-Gensegment am 3´-Ende und jedes J-Gensegment am 5´-Ende flankiert von einer sog. „Rekombinations-Signal-Sequenz“ (RSS), bestehend aus einem 7bp langen palindromischen Heptamer (5´CACAGTG3´) (8), einem Spacer mit 12 oder 23 Nukleotiden und einem 9bp Nonamer (5´ACAAAAACC3´) (8). Ein brauchbares V(D)J Rearrangement kommt nur zwischen 12-bp-spacer-Rekombinations-Signal-Sequenzen und 23-bp-spacer-Rekombinations-Signal-Sequenzen vor („12/23-spacer-Regel“) (8).

1.4.2 RAG1 und RAG2 (recombination activating genes)

Diese Signalsequenzen zu erkennen und die DNS dort präzise zu schneiden ist ausschließliche Aufgabe der RAG1 und RAG2-Enzyme (22). Sie formieren einen Komplex zwischen zwei RSS (3), der die Form einer Schleife hat und die beiden kodierenden Gensegmente näher zusammenbringt. Zum Verbinden schaffen die RAG-Enzyme Einzelstrang-DNS Enden. Manchmal enthalten diese Einzelstrang-DNS Enden auch Nukleotide, die ursprünglich komplementär auf beiden Strängen waren und jetzt kurze DNS-Palindrome auf einem Strang bilden (P-Nukleotide). RAG Gene sind aktiviert während den jeweiligen Rearrangements der schweren bzw. der leichten Kette (frühe B Zelle, späte B Zelle bzw. kleine prä-B Zelle) und inaktiviert während der Proliferation (große prä-B Zelle). In den letzten Jahren hat sich jedoch vermehrt gezeigt, daß das Vorhandensein aktiver RAG-

Enzyme und eines möglicherweise ablaufenden V(D)J Gen-Rearrangements nicht ausschließlich auf das Knochenmark beschränkt zu sein scheint, sondern daß es zu einer Reexpression der RAG-Enzyme innerhalb des Keimzentrums in sekundären Lymphorganen kommen kann und somit zu einem möglichen sekundären V(D)J-Gen-Rearrangement (23,24).

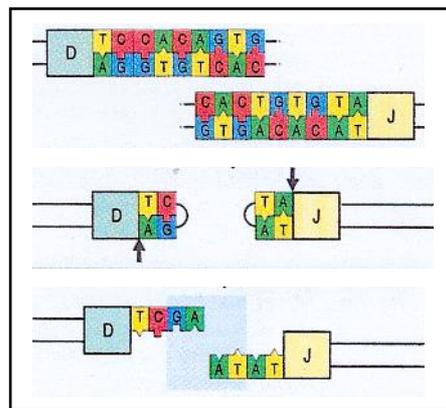


Abbildung 6: Der RAG Enzymkomplex schneidet die zu verbindenden DNS Enden an beliebiger Stelle und hängt ehemals komplementäre Nucleotide palindromisch an den Einzelstrang (modifiziert aus (2)).

1.4.3 Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase)

Die Tdt ist ein Enzym, das beliebig sog. N-Nucleotide (Non-templated) in die Verbindungsstelle einbringen kann, die nicht DNS-kodiert, sondern zufällig sind. Die Tdt ist nicht essentiell für das Rearrangement (2). Während der Fetalentwicklung zeigt die Tdt sehr niedrige Werte, bei Erwachsenen sinken die Werte vom Pro-Stadium (Schwerketten-Rearrangement) in Richtung Prä-Stadium (Leichtketten-Rearrangement). N-Regionen wurden im Nabelschnurblut bei 28% der produktiven und bei 40% der nicht-produktiven Rearrangements gefunden (25). Die Werte bei Erwachsenen liegen bei 57% für produktive und bei 69% für nicht-produktive Rearrangements (25).



Abbildung 7: Zusätzliche sog. N-Nukleotide durch die **Tdt** (modifiziert aus (2)).

1.4.4 Exonuklease

Paarungsunfähige Nukleotide werden von der Exonuklease entfernt und ebenso die entstandenen Lücken aufgefüllt. Zusätzlich werden bis zu einem gewissen Grad zufällig einzelne Nukleotide an den 5' und 3' Enden der Schnittstelle entfernt.

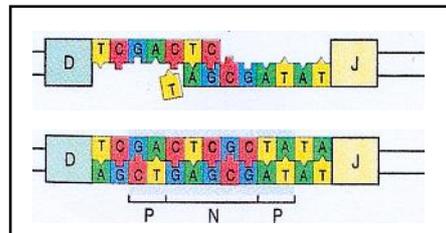


Abbildung 8: Entfernung nicht paarungsfähiger Nukleotide durch die **Exonuklease**. Die fertige Verbindungsstelle mit P- (durch RAG) und N- (durch Tdt) Nukleotiden (modifiziert aus (2)).

1.4.5 DNS-Ligase

Die DNS-Ligase verbindet die Stränge über ein paar wenige basenpaare.

Die Vielfalt des primären Antikörperrepertoires wird erreicht durch

1. Gen-Rearrangement der V(D)J-Segmente (Kombinationsvielfalt)
2. Ungenauigkeiten beim Zusammenfügen dieser Segmente (Junktionale Vielfalt)(26)
3. Zufälliges Kombinieren von schweren und leichten Ketten (Kombinationsvielfalt)

All diese molekularen Ereignisse finden vor Antigenkontakt statt (27).

1.5 Die Entwicklung eines Keimzentrums

Das Knochenmark entläßt ständig zahlreiche ($10\text{-}20 \times 10^6/\text{Tag}$) (2) naive B Zellen in die Zirkulation. Sie haben die primäre Lymphozytenentwicklung mit einem potentiell funktionstüchtigen Rezeptor (19) auf der Oberfläche abgeschlossen und sind nun bereit für weitere Auswahl. Nur eine kleine Fraktion gelangt letztendlich in den peripheren B Zell-Pool (28) und die sekundär lymphatischen Organe (Lymphknoten, Tonsille, Adenoide, Peyer-Plaques, Appendix), und nur wer ein passendes Antigen findet überlebt die nächsten „drei“ Tage (2).

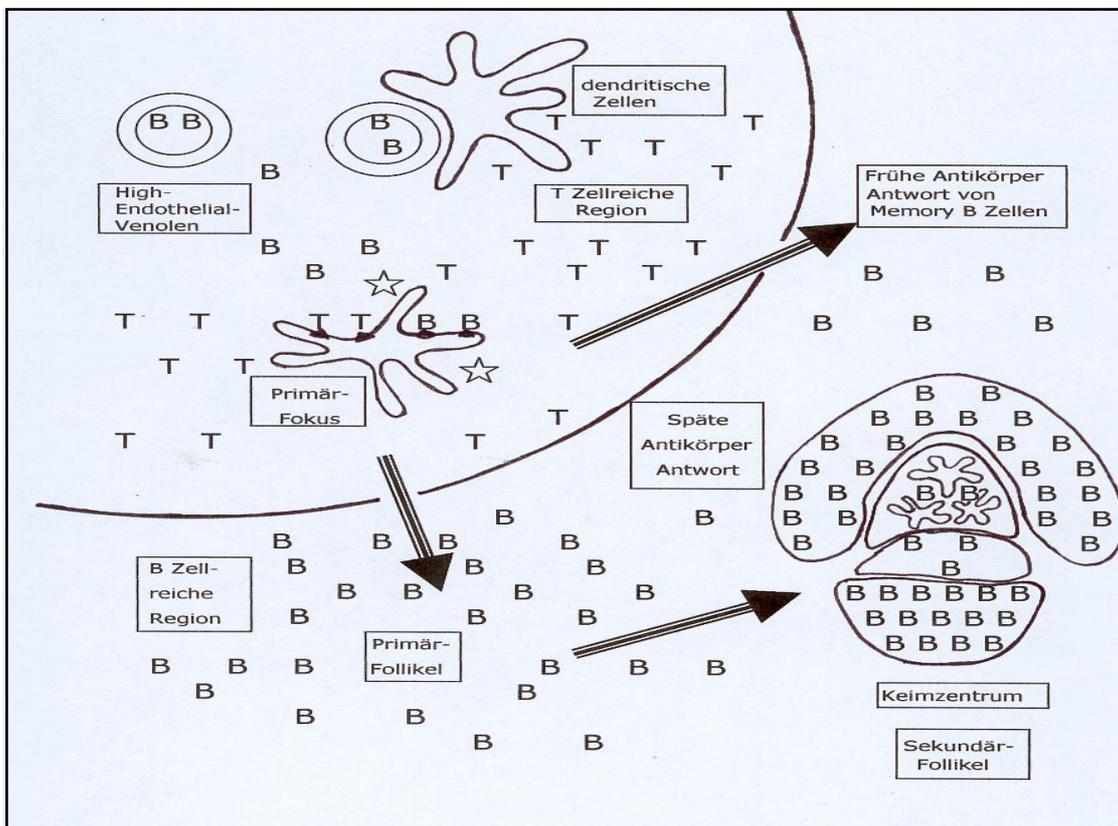


Abbildung 9: Eintritt der B Zellen in ein **sekundär lymphatisches Organ**, über High Endothelial Venolen Erreichen der T Zellreichen Region, Interaktion mit dendritischen Zellen, von dort Start der primären Antikörperantwort oder Abwanderung in die B Zellreiche Region zur Entwicklung eines Keimzentrums.

Über „high endothelial“ Venolen kann ein B Lymphozyt die T Zell-reichen Regionen des sekundären Lymphorgans erreichen. Hier präsentieren dendritische Zellen Antigen und warten auf einen B Lymphozyt mit passendem Rezeptor. Passende T Lymphozyten werden ebenso festgehalten und gegebenenfalls aktiviert.

Findet sich nun ein antigen-spezifischer Lymphozyt, unterbricht er hier seine Wanderung und die Interaktion dieser drei Zellen mündet in der Aktivierung des B Lymphozyten zum Lymphoblasten, der sich vergrößert und proliferiert (29). Diesen entstandenen Komplex bezeichnet man als Primärfokus.

Handelt es sich bei dem B Lymphozyten um eine Gedächtnis B Zelle, dann kann die Mehrheit der in der Folge klonal durch mitotische Teilung entstandenen Nachkommen des aktivierten Lymphoblasten in die Markstränge der Lymphknoten oder die rote Pulpa der Milz abwandern, um als kurzlebige Plasmazellen mit der sofortigen Antikörperproduktion zu beginnen (30) (frühe primäre Antikörperantwort).

Die restlichen aktivierten B Zellen, in der Regel naive B Zellen und einige Memory B Zellen, wandern vom Primärfokus in die B Zell-reichen Regionen, um dort die Entwicklung eines Keimzentrums aus einem Primärfollikel zu starten (29,31,32).

Der zelluläre Hauptbestandteil von Primärfollikeln oder ruhenden Follikeln sind rezirkulierende B Zellen umgeben von einem Netzwerk aus Follikulär Dendritischen Zellen (29). Die Transitzeit beträgt ungefähr 24 Stunden (29). Wenn Primärfollikel sich zu Keimzentren entwickeln und so an der Antigenantwort teilhaben, nennt man sie auch Sekundärfollikel.

In menschlichen Lymphknoten starten ungefähr 10-20 Gründerzellen (Germinal Center Founder Cells, GCF) eine Keimzentrumsreaktion (33). Aber nur diejenigen, die einen Antigenrezeptor mit relativ hoher

Affinität besitzen, werden ausgewählt, um weiter klonal zu proliferieren und sich zu Centroblasten zu differenzieren (34). Dabei werden die kleinen rezirkulierenden B Zellen durch die Dynamik der Proliferation auf die Seite gedrängt und bilden nun einen Randwall, die Mantelregion, um das entstehende Keimzentrum. Im Keimzentrum selbst lassen sich bald zwei Bereiche abgrenzen: die dunkle und die helle Zone. Die dunkle Zone ist vollgepackt mit sich teilenden Centroblasten (29), ein Zellzyklus dauert etwa 7 Stunden (30). Die meisten Centroblasten haben bereits ihre μ -Kette durch Immunglobulin-Klassenwechsel verloren (29). Sie entwickeln sich zu Centrocyten, die zusammen mit einem Netzwerk aus Follikulär Dendritischen Zellen die helle Zone bilden. Die Todesrate unter den Centrocyten ist sehr hoch (29). Sie gehen durch Apoptose zu Grunde (31), wenn sie Antigen spezifische Signale nicht erkennen können. An diesem Selektionsvorgang scheinen sowohl die Follikulär Dendritischen Zellen, als auch die dort ansässigen T Zellen beteiligt zu sein. Die Centrocyten müssen in der Lage sein, das von Follikulär Dendritischen Zellen gezeigte Antigen aufzunehmen, zu verarbeiten und anschließend auf der eigenen Oberfläche in Verbindung mit einem MHC II-Komplex zu zeigen (31), so daß es von T Helfer Zellen erkannt werden kann.

Die spezifische Interaktion von T und B Zellen über kostimulatorische Moleküle, z.B. CD40-154, entscheidet ebenso über das weitere Überleben (31,35). Nur eine Minderheit der Centrocyten wird Rezeptoren mit einer stärkeren Bindungsfähigkeit aufweisen. Nur diese werden auserwählt für weitere Teilungen (24) und können so Memory B Zellen oder Plasmazellen werden (24,35). Sie verlassen das Keimzentrum, schließen sich dem rezirkulierendem Lymphozytenpool an und wandern in die verschiedenen Gewebe ab (späte primäre Immunantwort).

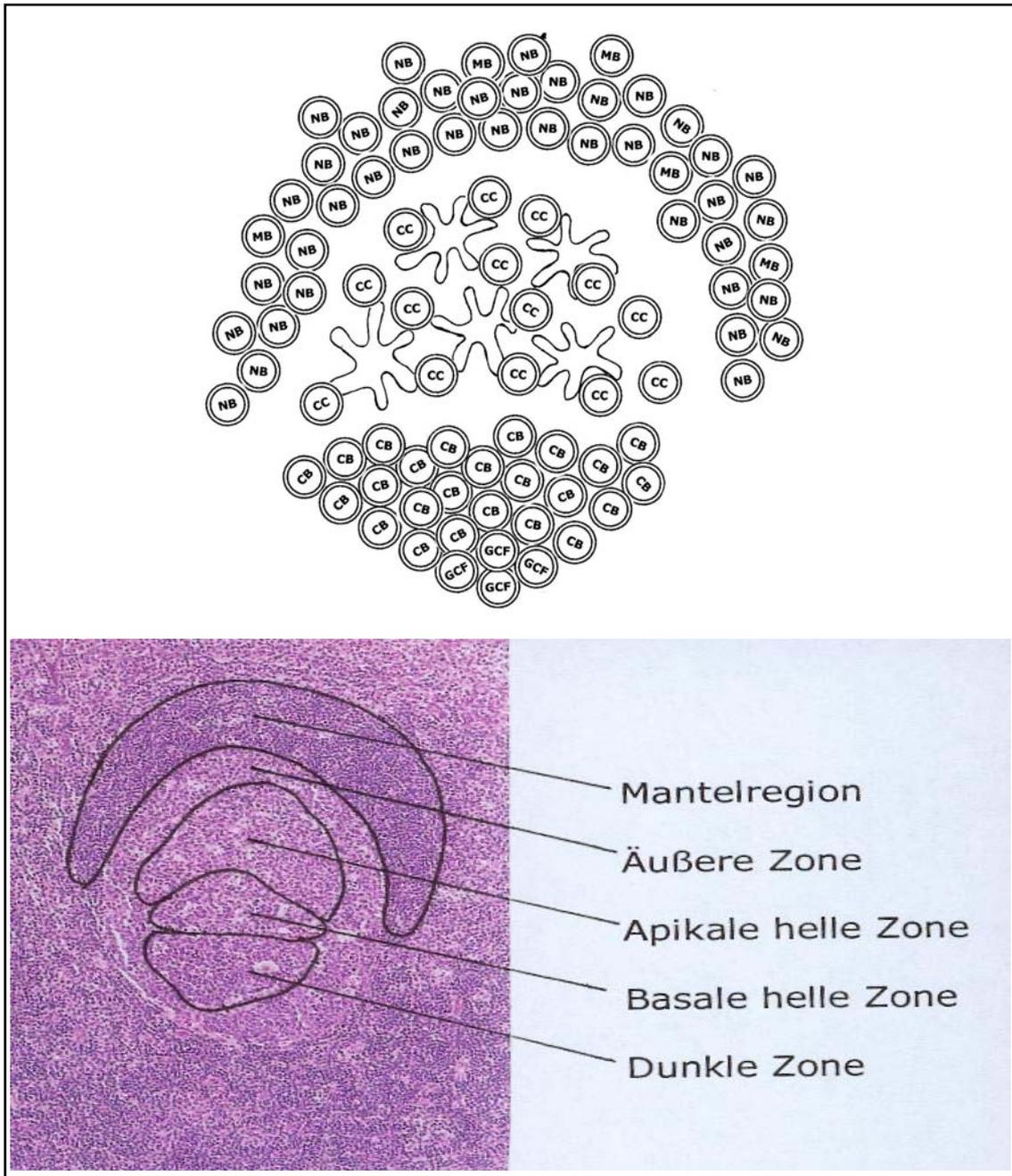


Abbildung 10: Struktur eines Keimzentrums:

oben: ein paar wenige Germinal Center Founder Cells (GCF) starten eine Keimzentrumsentwicklung. Die dicht gedrängten Centroblasten (CB) finden sich in der sog. dunklen Zone, die lockerer angeordneten Centrocyten zusammen mit Follikulär Dendritischen Zellen in der hellen Zone. Den Randwall bildend, in der sog. Mantelregion, liegen die auf Seite gedrängten naiven B Zellen (NB), sowie vereinzelt aus dem Keimzentrum hervorgegangene Memory B Zellen (MB). Unten: die Einteilung eines Keimzentrums projiziert auf eine lichtmikroskopische Aufnahme (modifiziert (36), Einteilung nach (29)).

1.6 Somatische Hypermuation

Während einer T Zell-abhängigen Antikörperantwort ändern B Zellen innerhalb des Keimzentrums die Affinität ihrer Antigenrezeptoren indem sie somatische Mutationen in die IgV-Regionen einführen (34). Dabei handelt es sich in erster Linie um Punktmutationen (37), die mit hoher Geschwindigkeit ($1/10^3\text{bp/generation}$) (27,38) eingebracht werden. Das entspricht 0,5-1 Mutationsereignis pro Zellteilung (39,40).

Die Auswirkung der Mutationen im Immunglobulinen auf die Antigenbindungsfähigkeit ist vielfältig. Die Einführung eines Stopkodons kann das Rearrangement unbrauchbar machen. Die Faltstruktur kann sich verändern. Eine niedrigere Affinität des Rezeptors kann zu Autoimmunität führen. Es kann aber auch den gewünschten positiven Effekt eines in der Bindungsfähigkeit verbesserten Antikörpers mit sich bringen. Während einer neuen Mutationsrunde sind Keimzentrums B Zellen in Gefahr durch Apoptose zu sterben, sofern sie nicht durch Interaktion mit Antigen und einem Kostimulationssignal (CD40-CD154) positiv selektioniert werden (34). Es erfolgen mehrere Runden der Selektionierung, mit der Konsequenz, daß die produzierten Rezeptoren und B Zellen mit der Zeit eine immer stärkere Bindungsfähigkeit aufweisen (affinity maturation)(39).

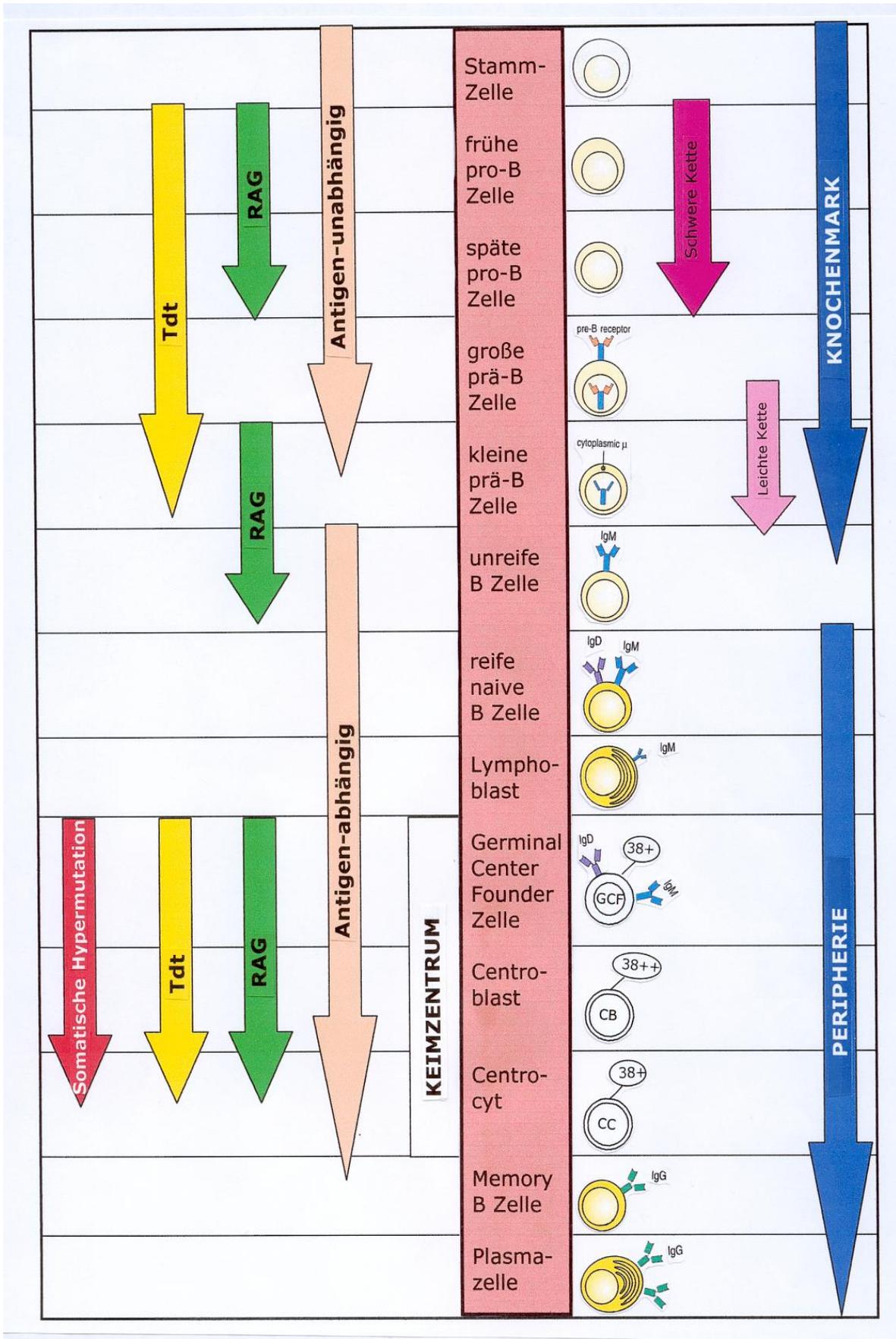
Bei der Lokalisierung der Mutationen in V(D)J-Schwerketten Rearrangement konnten mehrere Studien eine Konzentrierung der Replacement Mutationen auf die CDRs zeigen, während stille Mutationen sich gleichmäßiger über CDRs und FRs verteilten (27).

Auch ergaben weitere Mutationsanalysen, daß sog. RGYW-Quartette (purin/G/pyrimidin/A oder T) besonders beliebter Zielort für Mutationen sind (27). Somatische Hypermuation scheint auf B Zellen beschränkt zu sein, die innerhalb des Mikrokosmos Keimzentrum proli-

ferieren (33,39). Daher sind somatische mutierte V-Regionen eine einzigartige Charakteristik von Keimzentrums B Zellen und deren Nachkommen (6).

Die Antikörperantwort von Neugeborenen ist noch eingeschränkt, im allgemeinen produzieren sie IgM und IgD Antikörper und Antikörper mit niedriger Affinität (39). Wenige Studien zeigten, daß in den meisten Nabelschnurblut B Zellen keine Hinweise auf somatische Mutationen gefunden werden konnten (14,39).

Abbildung 11): (siehe Seite 20) **B Lymphozytenentwicklung im Knochenmark und in der Peripherie.** B Zellen dargestellt mit ihren Oberflächenmarkern (B Zellmarker CD19 zur Vereinfachung weggelassen, naive B Zelle (NB) IgD+, CD38-; Germinal Center Founder Zelle (GCF) IgD+, CD38+/++; Centroblast (CB) IgD-, CD38++; Centrocyt (CC) IgD-, CD38+; Memory B Zelle (MB) IgD-, CD38-. Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Expression der Enzymkomplexe RAG (recombination activating genes) und Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase), das Auftreten von somatischer Hypermutation und das Rearrangement der Antikörperketten an (teilweise nach (2)).



1.7 Fragestellungen

Analyse der verwendeten V_{κ} Einzelgene im Immunglobulin Repertoire aus der kindlichen Tonsille

Das Kappa Leichtketten Repertoire in B Zellen aus der kindlichen Tonsille wird analysiert, um molekulare Prozesse zu identifizieren, die an der Generierung und Modifizierung von $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements während der Keimzentrumsbildung in einem sekundär lymphatischen Organ beteiligt sind. Das nicht-produktive Repertoire ist das Ergebnis der primären V_{κ} Genauswahl, bevor das Repertoire durch positive oder negative Selektionsfaktoren beeinflusst wird. Durch die Analyse des produktiven oder exprimierten Repertoires und des Vergleichs mit dem nicht-produktiven können Prozesse der Selektion herausgearbeitet werden.

Das $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire aus der kindlichen Tonsille kann mit $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires von B Zellen aus dem Nabelschnurblut und dem Erwachsenenblut verglichen und Unterschiede zu den verschiedenen Lebenszeitpunkten betrachtet werden.

Analyse der somatischen Mutationen in $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements aus der kindlichen Tonsille

Die Analyse der gesetzten Mutationen im nicht-produktiven Repertoire zeigt die primäre Wirkungsweise des Mutators. Die Analyse des produktiven Repertoires und der Vergleich mit dem nicht-produktiven kann entscheidende Vorteile in Lokalisation und Art der Mutation für eine Selektion in das produktive Repertoire aufzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbereitung von B Zellen aus Tonsillengewebe

Das verwendete Gewebe stammt von Tonsillektomien von 6 gesunden Kindern im Alter zwischen 4 und 7 Jahren. Die tonsillären mononukleären Zellen wurden 30min lang mit Kollagenase Gewebsverdauung aus dem Gewebsverband gelöst und anschließend mittels einer Dichtegradienten Zentrifugation zentrifugiert.

2.2 Sortieren der Zellen (siehe Abbildung 12)

Die einzelnen B Zelluntergruppen wurden über ihre Oberflächenmarker definiert:

B Zellen jeweils CD19+;

naive B Zelle (NB) IgD+, CD38-

Germinal Center Founder Zelle (GCF) IgD+, CD38+/++

Centroblast (CB) IgD-, CD38++

Centrocyt (CC) IgD-, CD38+

Memory B Zelle (MB) IgD-, CD38-

Eine immunfluoreszierende Markierung erfolgte mit einem monoklonalen Anti-human CD19 Antikörper, einem monoklonalem Anti-human CD38 Antikörper und einem Anti-human-IgD-Antikörper. Anschließend wurden die Zellen in eine 96-Loch-PCR-Platte mit einem FACSTARplus-Gerät (fluorescence activated cell sorter) sortiert.

2.3 PCR Amplifikation der genomischen Immunglobulin DNS aus sortierten Einzelzellen

Jedes Loch beinhaltete eine 5µl Lyse-Lösung (50mM KCl, 10 mM TRIS-HCl, pH 9.0, 0.1% Triton-X-100). Die PCR-Amplifikation bestand

aus einer initialen Primer-Verlängerungs-Prä-amplifikation und anschließenden ineinanderübergreifenden (nested) PCR-Schritten, welche spezifisch für verschiedene Immunglobulin Kappafamilien waren. Dabei wurden initial als Primer Zufalls-15Mere verwendet und insgesamt 60 Runden PCR Amplifikationen mit Taq-Polymerase durchgeführt um genügend DNS zu gewinnen für die folgende DNS Amplifikationen mit spezifischen V_k Primerpaaren.

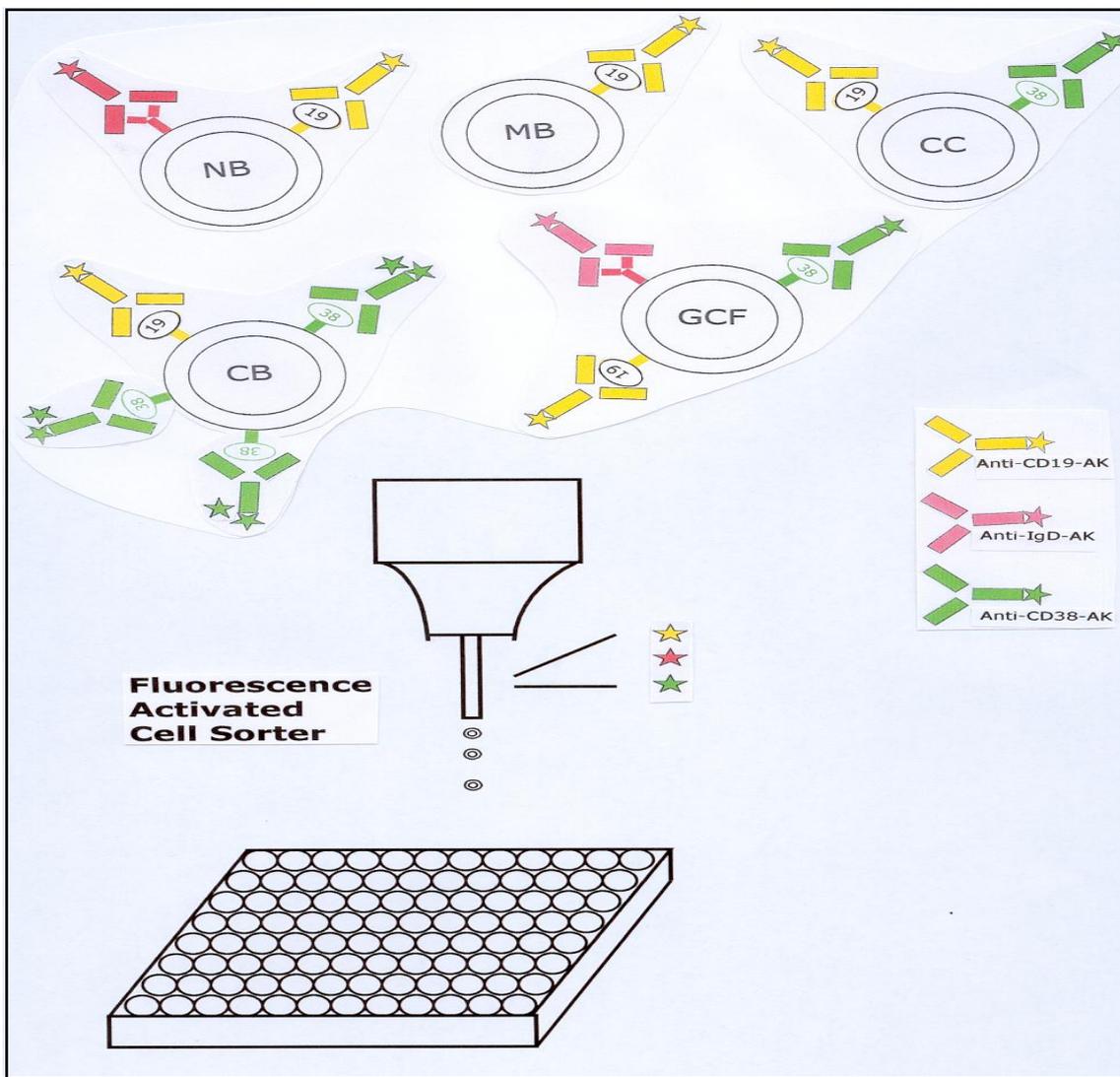


Abbildung 12: Markierung der B Zellen mit den entsprechenden Antikörpern, die beim Durchtritt durch das FACS-Gerät fluoreszieren und somit eine Zuordnung zu einer B Zelluntergruppe ermöglicht. Die Zellen wurden in eine 96-Loch-PCR-Platte sortiert.

2.4 Sequenzen-Analyse

Es folgte die Trennung der PCR Produkte mit Elektrophorese auf einem 1,5% Agarose Gel und eine Reinigung in GenElute Säulchen. Die gereinigten Produkte wurden direkt mit dem ABI Prism Dye Termination Cycle Sequencing Kit sequenziert und mit einem automatischen Sequenzierer (ABI 3700) analysiert. Zur Identifizierung der V_{κ} Gen-segmente wurde das V base directory nach Tomlinson et al. (40) verwendet in Verbindung mit den Softwareprogrammen Sequencher und Gene Works. Die V_{κ} und J_{κ} Gen Nomenklatur wurde vom V Base Sequence Directory übernommen. Ein Rearrangement wurde als produktiv bezeichnet, wenn die $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Verbindungsstelle bis ins J_{κ} Segment im Leseraster blieb ($n=375$). War dies nicht der Fall, wurden sie als nicht-produktiv rearrangiert eingeordnet ($n=219$). Es wurde kein Rearrangement gefunden, das ein Stopkodon eingeführt hatte. Rearrangements, die Pseudogene verwendeten, wurden von vorne herein als nicht-produktiv eingestuft (V_{κ} Gene A18: $n=9$; A21: $n=2$; B1: $n=2$; L4: $n=4$). An der Verbindungsstelle wurden Sequenzen, die im verbindenden Kodon noch Nukleotide der Keimbahn aufwiesen als „keimbahnkodiert“ (germline) bezeichnet. Zusätzliche Nukleotide an der Verbindungsstelle wurden als P-(Palindromische)-Nukleotide bezeichnet, wenn es sich um „in sich“ spiegelbildliche Nukleotide handelte, bzw. als N-(Non-templated)-Nukleotide, wenn sie zufällig eingefügt waren (siehe Figuren 6 und 7).

Insgesamt konnten 594 Sequenzen untersucht werden. Dabei waren
215 (IgD+, CD38-; d.h. NB): 97 nicht-produktiv, 118 produktiv
75 (IgD+, CD38+/+++; d.h. GCF): 24 nicht-produktiv, 51 produktiv
141 (IgD-, CD38+++; d.h. CB): 39 nicht-produktiv, 102 produktiv
144 (IgD-, CD38+; d.h. CC): 49 nicht-produktiv, 95 produktiv
19 (IgD-, CD38-; d.h. MB): 10 nicht-produktiv, 9 produktiv

rearrangiert.

Zum Vergleich wurden 782 Sequenzen (232 nicht-produktiv, 450 produktiv) von 2 Erwachsenen (26 und 45 Jahre alt) (41) und 190 neonatale Sequenzen (88 nicht-produktiv, 102 produktiv) (25) herangezogen.

2.5 Statistische Methoden

Der Chi-Square-Test wurde angewandt um die Gen-Segmentauswahl und die Unterschiede in den junktionalen Nukleotiden des produktiven und nicht-produktiven Repertoires der einzelnen tonsillären B Zelluntergruppen zu vergleichen.

Der Chi-Square-Goodness-of-fit-Test wurde angewendet um das beobachtete Auftreten der einzelnen V_{κ} Gene mit dem statistisch zu erwartendem Auftreten bei angenommenen zufälligen Gebrauch.

Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen, basierend auf der Anzahl der bekannten funktionellen V_{κ} Gene im Genom wurde die statistische Erwartung mit 2,5% berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 **Analyse der verwendeten V_{κ} Einzelgene in der kindlichen Tonsille, Vergleich zwischen nicht-produktivem und produktivem Repertoire und Vergleich mit Nabelschurblut und Erwachsenenblut**

3.1.1 Verteilung der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements aus der kindlichen Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires des Erwachsenen

Von den 219 ausgewerteten nicht-produktiv rearrangierten Tonsillenfrequenzen verwendeten 70% eines der folgenden V_{κ} Gene: B3 (21%), B2 (4,54%), L6 (4,11%), A27 (8,22%), A19/A3 (5,02%), A18 (4,11%), O18/O8 (11,87%) oder O12/O2 (10,05%). Eine signifikant erhöhte Verwendung im Vergleich zur statistischen Erwartung wurde für die V_{κ} Gene B3 ($p \leq 0,00001$), B2 ($p \leq 0,05$), A27 ($p \leq 0,00001$), O18/O8 ($p \leq 0,00001$) und O12/O2 ($p \leq 0,001$) berechnet (χ^2 goodness of fit Test). Im publizierten nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Adulten Repertoire wurden die Gene B3, B2, A27, A18, A17, O18/O8 und O12/O2 signifikant vermehrt ausgewählt (41). Somit sind es die gleichen Gene, die in der Tonsille und im Erwachsenenblut im nicht-produktiven Repertoire statistisch häufiger ausgewählt werden, im Erwachsenenblut aber noch um A18 und A17 erweitert. Unterzieht man die beiden nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires einem Vergleich (χ^2 Test), zeigen die Gene B3 und Vh ($p \leq 0,00001$ und $p \leq 0,05$) signifikant häufigere Verwendung in der kindlichen Tonsille; im Erwachsenenblut sind hingegen L1, A30, A20 und A17 (jeweils $p \leq 0,05$) häufiger ausgewählt (Figur 1).

3.1.2 Verteilung der produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements aus der kindlichen Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires des Erwachsenen

In den 375 analysierten produktiven Tonsillenfrequenzen waren V_{κ} Gene zu finden, die im Vergleich zur statistischen Erwartung (2,5% für Einzelgene bzw. 5% für durch die PCR nicht trennbare Genpaare) ausgeprägt vermehrt verwendet wurden. Dabei handelte es sich um B3, L12a, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,000001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,000001$) (χ^2 goodness of fit Test). Diese Frequenzen (B3 20,27%; L12a 6,13%; L6 8,8%; L2 8%; A27 15,73%; O18/O8 9,07%; O12/O2 13,07%) machen zusammen 81% des produktiven Tonsillenrepertoires aus. Ein V_{κ} Gen-Rearrangement aus der distalen Kasette des Kappalokus konnte nur in 3% der Frequenzen gefunden werden. Die Gene B2 ($p \leq 0,025$), L11 ($p \leq 0,01$), L9 ($p \leq 0,025$), L5/L19a ($p \leq 0,01$), L4 ($p \leq 0,01$), L1 ($p \leq 0,05$), A30 ($p \leq 0,025$), A26/A10 ($p \leq 0,005$), A23 ($p \leq 0,05$), A19/A3 ($p \leq 0,05$), O14/O4 ($p \leq 0,001$), O11/O1 ($p \leq 0,0025$), A11 ($p \leq 0,01$), L14 ($p \leq 0,01$), L16 ($p \leq 0,05$), L18 ($p \leq 0,01$), L19 ($p \leq 0,01$), L20 ($p \leq 0,01$), L23 ($p \leq 0,05$), L24 ($p \leq 0,01$), Vh ($p \leq 0,01$) waren in der Tonsille signifikant seltener als statistisch erwartet produktiv rearrangiert (χ^2 goodness of fit Test).

Im produktiv rearrangierten adulten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire konnte B3, L12, L6, L2, A27, A19/A3, A17 und O12/O2 signifikant häufiger gefunden werden. Signifikant seltener die Gene A26/A10, O4/O14, O1/O11, A1, A2, A11, L16, L20 und L25 (41).

Es sind also die gleichen Gene bzw. Genpaare, die in der kindlichen Tonsille und im Erwachsenenblut statistisch häufiger verwendet wer-

den, mit Ausnahme von O18/O8 (kindliche Tonsille) sowie A19/A3 und A17 (Erwachsenenblut).

Beim Vergleich (χ^2 Test) der beiden produktiven Repertoires ergaben sich signifikante Unterschiede für die V_{κ} Gene A30 ($p \leq 0,005$), A19/A3 ($p \leq 0,0005$) und A17 ($p \leq 0,0001$), die im Erwachsenenblut vermehrt ausgewählt wurden, und für B3 ($p \leq 0,00001$), das bevorzugt in der Tonsille rearrangiert wurde (Figur 2).

3.1.3 Verteilung der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements aus der Tonsille im Vergleich mit der Verteilung der produktiven Rearrangements aus der Tonsille

Vergleicht man das nicht-produktiv rearrangierte $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire mit dem produktiv rearrangierten, dann besteht die Möglichkeit molekulare Prozesse der Selektion einzuschätzen. Wie bereits oben erwähnt, wurden im nicht-produktiven Repertoire B3, B2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,001$) (χ^2 goodness of fit Test) statistisch signifikant häufiger rearrangiert, im produktiven Repertoire aus der Tonsille B3, L12a, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,000001$, $p \leq 0,00001$, $p \leq 0,000001$, $p \leq 0,000001$, $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,001$, $p \leq 0,000001$) (χ^2 goodness of fit Test). B3, A27, O18/O8 und O12/O2 sind also in beiden Repertoires beliebte V_{κ} Gene für ein Rearrangement. Eine statistisch signifikant positive Selektion in das produktive V_{κ} Repertoire zeigte sich bei den V_{κ} Genen L12a, L6, L2 und A27 ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,01$), negativ selektioniert wurden hingegen B2, A18, O14/O4, Vh und LFVK431 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,0001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$) (χ^2 Test) (Figur 3).

Im folgenden wurden nun die einzelnen Tonsillensubpopulationen (naive B Zellen, Germinal Center Founder Zellen, Centroblasten, Centrocyten und Memory B Zellen) auf ihre Präferenzen für die einzelnen V_{κ} Gene hin untersucht.

3.1.4 Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements der naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille

Die statistische Erwartung übertrafen bei den 97 nicht-produktiv rearrangierten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements der naiven B Zellen die V_{κ} Gene B3, B2, A27 und O18/O8 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,005$) (χ^2 goodness of fit Test), die zusammen in 47% der Fälle primär ausgewählt wurden (B3 19,59%; B2 7,22%; A27 9,28%; O18/O8 11,34%). O12/O2 wird im nicht-produktiven Repertoire nicht signifikant häufiger ausgewählt als erwartet (siehe oben).

Die sieben V_{κ} Gene die schon im gesamten produktiven Tonsillenrepertoire besonders häufig ausgewählt wurden (B3, L12a, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2), sind auch in 76% der 118 produktiv rearrangierten Frequenzen bei den naiven B Zellen zu finden. Am häufigsten ist das am proximalsten gelegene V_{κ} Gen B3 (18,64%) und das am anderen 3' Ende der proximalen Kasette gelegene Genpaar O12/O2 (16,1%) produktiv rearrangiert. O18/O8 wird bei den produktiven naiven B Zellen noch etwas über der Erwartung verwendet (6,78%), der Unterschied war nicht statistisch signifikant. B3, L12a, L6, L2, A27 und O12/O2 waren häufiger im produktiven Repertoire vertreten als erwartet ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 goodness of fit Test).

Ein Vergleich der beiden Repertoires ergab eine positive Selektion der V_{κ} Gene L12a, L2 und O12/O2 ($p \leq 0,005$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,05$), während

die Gene B2 und A19/A3 negativ selektioniert wurden (p jeweils $\leq 0,05$) (χ^2 Test) (Figur 4).

3.1.5 Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_k J_k$ Gen-Rearrangements der Germinal Center Founder Zellen aus der kindlichen Tonsille

In Germinal Center Founder Zellen zeigte die primäre Auswahl (nicht-produktiv) ebenso einen kräftigen Schwerpunkt am distalen Ende der proximalen Kasette. O14/O4 und O12/O2 wiesen eine Prävalenz von jeweils 16,67% auf. Zusammen mit dem proximalst gelegenen Gen B3 ist die primäre Auswahl mit 54% der V_k Gene bei den Germinal Center Founder Zellen von diesen drei Genen dominiert. Eben diese drei Gene bzw. Genpaare, B3, O14/O4 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$, $p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$), erreichen auch statistisch signifikant positive Werte gegenüber der Erwartung (χ^2 goodness of fit Test).

Bei den 51 produktiven Germinal Center Founder Zellen aus der kindlichen Tonsille machten die sieben am häufigsten verwendeten V_k Gene zusammen 88% aus (B3 13,73%; L12a 5,88%; L6 11,76%; L2 7,84%; A27 7,84%; O18/O8 21,57%; O12/O2 19,61%). Die am 3' Ende der proximalen Kasette gelegenen Genpaare, O18/O8 und O12/O2, dominierten dabei mit 41%. Höhere Werte als die statistisch errechnete Erwartung erreichten die V_k Gene B3, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,0001$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 goodness of fit Test).

Im Vergleich der beiden Repertoires zeigte sich eine statistisch signifikante negative Selektion in das produktive V_k Repertoire bei den Genen L8 und O14/O4 ($p \leq 0,05$ und $p \leq 0,005$) (χ^2 Test). Eine positive Selektion in das produktive Repertoire konnte nicht gefunden werden (Figur 5).

3.1.6 Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements der Centroblasten aus der kindlichen Tonsille

Die 39 ausgewerteten nicht-produktiv rearrangierten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements in Centroblasten beinhalteten zu 62% entweder B3 (28,21%), A27 (7,69%), O18/O8 (15,38%) oder O12/O2 (10,26%). Statistisch signifikante Werte gegenüber der Erwartung erreichten dabei B3 ($p \leq 0,00001$), A27 ($p \leq 0,05$) und O18/O8 ($p \leq 0,005$) (χ^2 goodness of fit Test).

Die sieben V_{κ} Gene, die im gesamten produktiven Repertoire der kindlichen Tonsille am häufigsten für ein Rearrangement ausgewählt wurden (B3, L12, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2) dominieren auch bei den 102 analysierten produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen 88% der produktiven Rearrangements. Dabei zeigte sich eine starke Dominanz von B3 und A27, die in 54% exprimiert wurden. Neben B3 und A27 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$) wurden auch noch L6 und L2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$) häufiger als statistisch zu erwarten gewesen wäre verwendet (χ^2 goodness of fit Test).

Im Vergleich der beiden Repertoires der Centroblasten zeigte sich eine positive Selektion ins produktive Repertoire bei A27 ($p \leq 0,05$), eine negative Selektion bei B1, O18/O8 und Vh (jeweils $p \leq 0,05$) (χ^2 Test) (Figur 6).

3.1.7 Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements der Centrocyten aus der kindlichen Tonsille

In den 49 nicht-produktiv rearrangierten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Centrocytensequenzen wurden bevorzugt die V_{κ} Gene B3 (16,33%), A27 (12,24%), A18 (10,2%), O18/O8 (12,24%) und O12/O2 (10,2%) ausgewählt. Bis auf das Gen O12/O2 erreicht die Häufigkeit aller anderen Gene (B3,

A27, A18 und O18/O8) signifikant erhöhte Werte gegenüber der Erwartung ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,05$) (χ^2 goodness of fit Test).

Von den 95 analysierten produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Centrocyclensequenzen waren in 72% folgende V_{κ} Gene rearrangiert: B3 (15,79%), L6 (9,47%), L2 (7,37%), A27 (16,84%), O18/O8 (9,47%) oder O12/O2 (12,63%), die Häufigkeiten lagen über der statistischen Erwartung (B3 $p \leq 0,00001$; L6 $p \leq 0,00001$; L2 $p \leq 0,005$; A27 $p \leq 0,00001$; O18/O8 $p \leq 0,05$; O12/O2 $p \leq 0,001$) (χ^2 goodness of fit Test).

Sowohl im produktiven als auch im nicht-produktiven Centrocyclenrepertoire ist das am häufigsten verwendete V_{κ} Gen B3, gefolgt von A27. Im χ^2 Test zum Vergleich der beiden Repertoires der Centrocyclen zeigt sich eine negative Selektion der V_{κ} Gene B2 und A18 ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,005$) (χ^2 Test) (Figur 7).

3.1.8 Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements der Memory B Zellen aus der kindlichen Tonsille

Betrachtet man die 10 nicht-produktiv und die 9 produktiv rearrangierten Memory B Zellen genauer ergeben sich statistisch signifikant erhöhte Häufigkeiten gegenüber der Erwartung für die V_{κ} Gene B3, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$) auf der Seite nicht-produktiver Rearrangements und für B3 und L8 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,0005$) bei den produktiv rearrangierten Rearrangements von Memory B Zellen (χ^2 goodness of fit Test). Statistisch signifikant unterschiedliche Häufigkeiten im Vergleich der nicht-produktiven und produktiven Gruppe gab es bei den Memory B Zellen nicht (χ^2 Test) (Figur 8).

3.1.9 Verteilung der V_{κ} Gene in nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen

Zusammenfassend waren die Unterschiede der primären V_{κ} Genauswahl innerhalb der B Zell Untergruppen aus der Tonsille nur sehr geringfügig. In allen Untergruppen zeigten sich deutliche Konzentrationen auf die V_{κ} Gene B3, A27 und die Genpaare O18/O8 sowie O12/O2. Im Vergleich zur Gesamtgruppe wurden V_{κ} O14/O4 bei den Germinal Center Founder Zellen und O12/O2 bei den Memory B Zellen signifikant vermehrt ausgewählt (16,67% vs. 2,7%, $p \leq 0,005$; 40% vs. 10%, $p \leq 0,005$) (χ^2 Test) (Figur 9).

3.1.10 Verteilung der V_{κ} Gene in den produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen

Auch bei den produktiven Repertoires der einzelnen Untergruppen konnten nur sehr minimale Unterschiede festgestellt werden. Gemeinsam ist allen die starke Bevorzugung der V_{κ} Gene B3, L12, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2. Im Vergleich zur Gesamtgruppe verwendeten die Germinal Center Founder Zellen O18/O8, die Centroblasten A27 und die Memory B Zellen L8 signifikant häufiger (21,6% vs. 9%, $p \leq 0,01$; 27,4% vs. 15,7% $p \leq 0,01$; 22% vs. 2,3%, $p \leq 0,0005$) (χ^2 Test) (Figur 10).

Im Vergleich der nicht-produktiven und produktiven Repertoires konnte eine negative Selektion in das produktive Repertoire der V_{κ} Gene B2 (bei NB $p \leq 0,05$; CC $p \leq 0,05$; gesamt $p \leq 0,001$), B1 (bei CB $p \leq 0,05$), L8 (bei GCF $p \leq 0,05$), A19/A3 (bei NB $p \leq 0,05$), A18 (bei CC $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,0001$), O18/O8 (bei CB $p \leq 0,05$), O14/O4 (bei GCF $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,05$), eine positive Selektion der V_{κ} Gene

L12 (bei NB $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,01$), L6 (bei gesamt $p \leq 0,05$), L2 (bei NB $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,005$), A27 (bei CB $p \leq 0,05$; gesamt $p \leq 0,01$) und O12/O2 (bei NB $p \leq 0,05$) beobachtet werden (χ^2 Test) (Figur 9+10).

3.1.11 Verteilung der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in naiven B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires von IgM+ B Zellen des Erwachsenen

Im nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire naiver B Zellen der kindlichen Tonsille waren die V_{κ} Gene B3, B2, A27 und O18/O8 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,005$) (χ^2 goodness of fit Test) statistisch signifikant häufiger für ein Rearrangement herangezogen als erwartet. Im publizierten nicht-produktiven adulten Repertoire waren vermehrt B3, B2, A27, A18, A17, O18/O8 und O12/O2 ausgewählt worden (41). Verglich man das nicht-produktive $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire naiver B Zellen mit dem nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire von peripheren IgM+ B Zellen des Erwachsenen, fand man ein signifikant häufigeres Auftreten der Gene B3, L25 und V_h in der Tonsille ($p \leq 0,0005$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$) (χ^2 Test) (Figur 11).

3.1.12 Verteilung der produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in naiven B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der publizierten Verteilung des produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires von IgM+ B Zellen des Erwachsenen

Die V_{κ} Gene B3, L12a, L6, L2, A27 und O12/O2 waren bei den produktiv rearrangierten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements der naiven B Zellen der Tonsille im Unterschied zur statistischen Erwartung häufiger

($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 goodness of fit Test). Im produktiv rearrangierten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire von adulten IgM⁺ peripheren B Zellen war der Vergleich zur Erwartung bei folgenden V_{κ} Genen signifikant gewesen: B3, L12, L6, L2, A27, A19/A3, A17 und O12/O2 (41). Im Erwachsenenblut waren zusätzlich noch die V_{κ} Gene A19/A3 und A17 vermehrt exprimiert.

Der Vergleich der beiden produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires erreichte bei den V_{κ} Genen B3 und O11/O1 ($p \leq 0,00005$; $p \leq 0,05$) und A19/A3 ($p \leq 0,01$) eine Signifikanz (χ^2 Test) (Figur 12).

3.1.13 Verteilung der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der Verteilung in IgD⁺ Nabelschnurblut B Zellen und im Vergleich mit IgM⁺ B Zellen des Erwachsenen

Die V_{κ} Gene B3, B2 und A27 wurden in nicht-produktiv rearrangierten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Sequenzen des Nabelschnurblutes im Vergleich zur Erwartung signifikant häufiger ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,00001$) für ein Rearrangement herangezogen (25). Im nicht-produktiv rearrangierten Repertoire der Tonsille waren neben B3, B2 und A27 auch noch O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,001$) statistisch signifikant vermehrt ausgewählt (χ^2 goodness of fit Test). In nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements des Erwachsenen wurden zusätzlich zu B3, B2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,025$; $p \leq 0,025$), noch A18 und A17 (jeweils $p \leq 0,001$) signifikant häufiger ausgewählt (41).

Betrachtet man die nicht-produktiven Rearrangements aus dem Nabelschnurblut im Vergleich mit den nicht-produktiven Rearrangements aus der Tonsille, wurden die V_{κ} Gene L11 und A30 signifikant häufiger im Nabelschnurblut ausgewählt ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$) (χ^2 Test).

Der Vergleich zwischen Rearrangements aus der Tonsille und nicht-produktiven Rearrangements aus dem Erwachsenenblut ergab für die V_{κ} Gene B3 und Vh eine signifikant häufigere Auswahl ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$) in der Tonsille, für L1, A30, A20 und A17 signifikant häufigere Auswahl ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,05$) im Erwachsenenblut (χ^2 Test) (Figur 13).

3.1.14 Verteilung der produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in B Zellen aus der Tonsille im Vergleich mit der Verteilung in Nabelschnurblut B Zellen und im Vergleich mit IgM+ B Zellen des Erwachsenen

Im produktiven Nabelschnurblut wurden die folgenden V_{κ} Gene im Vergleich zur Erwartung signifikant vermehrt verwendet: B3, B2, L12a, L9, L6, L2, A27 und O12/O2 ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,00001$) (25). Im produktiv rearrangierten Repertoire der Tonsille waren es, wie bereits erwähnt die V_{κ} Gene B3, L12a, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,000001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,000001$) (χ^2 goodness of fit Test). Im produktiv rearrangierten Repertoire des Erwachsenen waren die Frequenzen B3, L12, L6, L2, A27, A19/A3, A17 und O12/O2 häufiger als erwartet ($p \leq 0,005$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$) (41).

Wenn man das Repertoire aus der Tonsille mit dem aus dem Nabelschnurblut vergleicht, sind die V_{κ} Gene B3 und A27 häufiger ($p \leq 0,005$ bzw. $p \leq 0,05$) in der Tonsille rearrangiert, die Gene B2, L9, A30 und O12/O2 signifikant häufiger im Nabelschnurblut ($p \leq 0,00005$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,05$) (χ^2 Test). Beim Vergleich der produktiv rearrangierten $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Sequenzen der Tonsille mit den produktiv rear-

rangierten Sequenzen des Erwachsenen, waren die V_{κ} Gene A30, A19/A3, und A17 ($p \leq 0,005$; $p \leq 0,0005$; $p \leq 0,0001$) signifikant seltener in der Tonsille vertreten, während B3 ($p \leq 0,00001$) signifikant häufiger in der Tonsille vorkam (χ^2 Test) (Figur 14).

3.2 Analyse der Mutationsverteilung

3.2.1 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Im produktiv rearrangierten Tonsillenrepertoire waren die hier gefundenen 1215 Mutationen über alle Kodons verstreut, jedoch mit starker Konzentrierung auf die CDR-Bereiche (CDR1 Kodon 24-34, CDR2 Kodon 50-56, CDR3 Kodon 89-95). Obwohl die CDR-Bereiche nur maximal 31 Kodons einer 95 kodonlangen Sequenz ausmachen, befanden sich hier 65% der Austauschmutationen (Replacement; R) (586 von 897) und 45% der stillen Mutationen (Silente; S) (142 von 318). So liegen auch die 10 Kodons mit den meisten Mutationen alle im CDR-Bereich (CDR1: Kodon 28 (28R/1S), Kodon 29 (20R/10S), Kodon 30 (51R/13S), Kodon 31 (67R/6S), Kodon 31a (29R/3S), Kodon 32 (34R/8S); CDR2: Kodon 53 (35R/4S); CDR3: Kodon 92 (40R/4S), Kodon 93 (58R/5S), Kodon 94 (35R/7S)). Allein diese 10 Kodons beinhalten zusammen 397 von insgesamt 897 Austauschmutationen im produktiven Repertoire (44%) und 61 von insgesamt 318 stillen Mutationen (19%). Betrachtet man nur die Spitzenreiter in den CDR-Bereichen (Kodon 31, Kodon 53 und Kodon 93) konnten hier alleine 160 Austauschmutationen (18%) und 15 stille Mutationen (4,7%) gefunden werden (Figur 15).

3.2.2 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die nicht-produktiven Frequenzen zeigen eine gleichmäßigere Verteilung ihrer 272 Mutationen über alle Kodons, ohne die starke Konzentrierung auf die CDR-Bereiche oder ein paar wenige Kodons. So enthalten die CDR-Bereiche 49% aller Mutationen (133 von 272), 49% der Austauschmutationen (97 von 199) und 49% der stillen Mutationen (36 von 73). Addiert man die Mutationen in den beliebten Kodons des produktiven Repertoires im nicht-produktiven Bereich zusammen (Kodon 28, 29, 30, 31, 31a, 32, 53, 92, 93, 94) erhält man 47 von 199 (24%) Austauschmutationen und 7 von 73 (9,6%) stillen Mutationen. In den drei Spitzenreiter-Kodons (Kodon 31, 53, 93) sehen wir nur 15 Austauschmutationen und gar keine stille Mutationen (7,5% bzw. 0%) (Figur 16).

Im Vergleich der beiden Repertoires zeigte sich, daß die produktiven Sequenzen eine statistisch signifikant höhere Anzahl ihrer Gesamtmutationen und ihrer Austauschmutationen im CDR-Bereich plazierte als die nicht-produktiven (60% vs. 49%; $p \leq 0,000876$ bzw. 65% vs. 49%; $p \leq 1,3 \cdot 10^{-5}$) (χ^2 Test). Im Vergleich der 10er Kodon Gruppe im produktiven und im nicht-produktiven Repertoire ergaben sich für die Austauschmutationen (R) statistisch signifikante Unterschiede (R: 44% vs. 24%, $p \leq 8,06 \cdot 10^{-8}$). Gleiches gilt für die 3er „Spitzen“ Gruppe (R: 18% vs. 7,5%, $p \leq 0,000333$) (χ^2 Test).

3.2.3 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in naiven B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Betrachtet man nun die Verteilung der Mutationen in den einzelnen Untergruppen der Tonsille, so zeigen die produktiv rearrangierten

naiven B Zellen ein sehr ähnliches Bild wie die Gesamtpopulation, mit Mutationen in allen Kodons, aber mit Schwerpunkten in den CDR-Bereichen. Produktiv rearrangierte naive B Zellen hatten 58,6% ihrer Mutationen (195 von 333), 64,7% der Austauschmutationen (154 von 238) und 43,2% der stillen Mutationen (41 von 95) im CDR-Bereich. In den 10 mutationsreichsten Kodons (Kodon 28: 7R/0S, Kodon 29: 5R/3S, Kodon 30: 11R/2S, Kodon 31: 17R/3S, Kodon 31a: 6R/1S, Kodon 32: 8R/1S, Kodon 53: 13R/2S, Kodon 92: 15R/0S, Kodon 93: 15R/1S, Kodon 94: 9R/4S) konnten 106 der 238 Austauschmutationen gefunden werden (44,5%) und 17 der 95 stillen Mutationen (17,9%). Ebenso wie in der Gesamtpopulation sind auch bei den naiven in den 3 mutationsreichsten Kodons (Kodon 31, 53 und 93) allein 18,9% (45 von 238) der Austauschmutationen und 6,3% der stillen Mutationen (6 von 95) zu finden (Figur 17a).

Die nicht-produktiv rearrangierten naiven B Zellen zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung ihrer 99 Mutationen, 51,5% ihrer Mutationen sind im CDR-Bereich, 48,5% im FR-Bereich (55% der Austauschmutationen und 43,3% der stillen Mutationen im CDR-Bereich), mit ein paar wenigen Spitzen (Kodon 94, Kodon 34). Die Summe der Mutationen in den 10 mutationsreichsten Kodons aus dem produktiven Repertoire ergibt hier mit 17 Austauschmutationen und 2 stillen Mutationen nur 24,6% bzw. 6,7% aller Mutationen (Figur 17b).

Die unterschiedliche Konzentrierung der Austauschmutationen in den 10 mutationsreichsten Kodons ist statistisch signifikant unterschiedlich (produktiv 44,5%, nicht-produktiv 24,6%; $p \leq 0,00298$) (χ^2 Test). Während die produktiven naiven B Zell Sequenzen 18,9% (45 von 238) ihrer Austauschmutationen in den Kodons 31, 53 und 93 haben, findet man bei den nicht-produktiven naiven B Zellen hier vergleichsweise nur 8,7% der Austauschmutationen ($p \leq 0,04478$) (χ^2 Test).

3.2.4 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V_KJ_K Kodons in Germinal Center Founder Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zellen hatten in der Regel nur wenige Mutationen aufzuweisen, die recht gleichmäßig verteilt waren (Figur 18a). 50% der Austauschmutationen und 55,5% der stillen Mutationen befanden sich im CDR-Bereich.

Die nicht-produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zellen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Mutationen nur recht wenig von den produktiven, 40% der Austauschmutationen und 40% der stillen Mutationen fielen hier auf die CDR-Bereiche (Figur 18b).

3.2.5 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V_KJ_K Kodons in Centroblasten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Centroblastenpopulation mit produktiven V_KJ_K Rearrangements verteilte ihre 412 Mutationen über alle Kodons mit 57,8% (238 von 412) in den CDR-Bereichen, 61,6% der Austauschmutationen (186 von 302) und 47,3% (52 von 110) der stillen Mutationen befinden sich hier. Ebenso wie in den anderen produktiven Gruppen, haben auch die produktiv rearrangierten Centroblasten 40,7% ihrer 302 Austauschmutationen und 21,8% ihrer 110 stillen Mutationen in den Kodons 28 (9R/1S), 29 (6R/3S), 30 (15R/10S), 31 (24R/2S), 31a (12R/1S), 32 (9R/5S), 53 (8R/0S), 92 (11R/2S), 93 (20R/0S) und 94 (9R/0S). Beachtenswert ist ebenfalls, daß die drei Kodons (31, 53 und 93) 17,2% der Austauschmutationen und 2% der stillen Mutationen beherbergen (Figur 19a).

In der nicht-produktiv rearrangierten Centroblastenpopulation zeigte sich wiederum die gleichmäßigere Verteilung der Mutationen über alle Kodons ohne besondere Schwerpunkte, 50,4% der 113 Mutationen

sind im CDR-Bereich lokalisiert (48,3% der 87 Austauschmutationen und 57,7% der 26 stillen Mutationen). So finden sich in den 10 mutationsreichsten Kodons des produktiven Repertoires hier auch nur 24% der Austauschmutationen und 7,7% der stillen Mutationen. In den drei Spitzenkodons (31, 53, 93) nur 6,9% der Austauschmutationen und gar keine stille Mutation (Figur 19b).

Die Verteilung der Austauschmutationen ist signifikant unterschiedlich zwischen dem produktiv und nicht-produktiv rearrangierten Centroblastenrepertoire (61,6% vs. 48,3%; $p \leq 0,026315$), ebenso in der 10er Gruppe ($p \leq 0,004746$), als auch in der beschriebenen 3er Gruppe ($p \leq 0,017236$) (χ^2 Test).

3.2.6 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in Centrocyten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die als produktiv analysierten Centrocytensequenzen hatten ihre 383 Mutationen über alle Kodons verteilt mit sehr deutlichen Schwerpunkten in den CDR-Bereichen (64,8% aller Mutationen), 71% der Austauschmutationen und 44,4% der stillen Mutationen befanden sich hier. In den 10 CDR-Kodons 28,29, 30, 31, 31a, 32, 53, 92, 93 und 94 befinden sich 140 der 293 Austauschmutationen und 19 der 90 stillen Mutationen (47,8% bzw 21%). Beachtlich hohe Prozentwerte erreichen auch bei den produktiven Centrocyten allein die drei Kodons 31, 53 und 93 zusammen (17,4% bzw 6,7%) (Figur 20a).

Ausgeglichenere Werte weisen wiederum die nicht-produktiven Sequenzen auf, 44,2% aller Mutationen, 42,4% der Austauschmutationen und 50% der stillen Mutationen liegen im CDR-Bereich. Nur 21,2% der Austauschmutationen und 20% der stillen Mutationen befinden sich in der 10er Kodon Gruppe (Figur 20b).

Die unterschiedliche Konzentration der Mutationen im CDR-Bereich war zwischen produktiven und nicht-produktiven Repertoire statistisch signifikant (64,8% vs. 44,2%; $p \leq 0,00820$), ebenso die Dichte der Austauschmutationen (71% vs. 42,4%; $p \leq 0,0008447$) (χ^2 Test) zwischen produktiv und nicht-produktiv rearrangierten Centrocysten-repertoire.

3.2.7 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in Memory B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die produktiv rearrangierten Memory B Zellen haben 61,5% ihrer Austauschmutationen und 28,6% ihrer stillen Mutationen im CDR-Bereich, ansonsten eine sehr gleichmäßige Verteilung (Figur 21a).

Die nicht-produktiven Memory B Zellen haben insgesamt nur 7 Mutationen, ohne eindeutige Bevorzugung bestimmter Kodons (Figur 21b). Die Gesamtanzahl der Sequenzen war jedoch limitiert, so daß die Mutationsverteilung hier „eingeschränkt“ Einblick gibt.

3.3 Analyse der Mutationsverteilung in mit B2 oder B3 rearrangierten Sequenzen

Im folgendem wurden nun nur die Sequenzen betrachtet, die die J_{κ} nahen V_{κ} Gene B2 und B3 verwendeten. Im Vergleich dazu folgen Sequenzen, welche weiter distal von J_{κ} liegen. Die Hypothese war, daß J_{κ} nahe Gene eventuell zeitlich früher zu einem Rearrangement herangezogen werden als J_{κ} ferne Gene. Diese könnten im Rahmen von Receptor editing später rearrangiert und mutiert werden. Daher erschien es von Interesse ausgewählte Gene in den entsprechenden Regionen getrennt zu analysieren.

3.3.1 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Im gesamten produktiv rearrangierten Tonsillenrepertoire verwendeten 76 Sequenzen das V_{κ} Gen B3 und 2 das V_{κ} Gen B2. Von diesen Sequenzen wiesen 55 Mutationen auf (72%). Diese 55 Sequenzen hatten 192 Austauschmutationen und 86 stille Mutationen (durchschnittlich 5 Mutationen pro Sequenz). Betrachtet man die Verteilung der Mutationen auf die einzelnen Kodons, wurden die CDR1 und CDR3-Bereiche deutlich bevorzugt. In den CDR-Bereichen sind 60% aller Mutationen (166 von 278; CDR1 91 Mutationen (71R/20S); CDR2 21 Mutationen (16R/5S); CDR3 54 Mutationen (41R/13S)), 67% aller Austauschmutationen (128 von 192) und 44% aller stillen Mutationen (38 von 86) lokalisiert (Figur 22a).

Die V_{κ} Gene B3 und B2 wurden im nicht-produktiv rearrangierten Tonsillenrepertoire von 56 Zellen ausgewählt, davon beinhalteten 21 Sequenzen Mutationen (37,5%). Zusammen hatten diese 21 Sequenzen 132 Mutationen, aufgeteilt in 90 Austauschmutationen und 42 stille Mutationen (durchschnittlich 6,3 Mutationen pro Sequenz). In den CDR-Bereichen befinden sich im nicht-produktiven B3/B2-Repertoire nur 52% aller Mutationen, 47,8% aller Austauschmutationen und 61,9% aller stillen Mutationen (CDR1: 26R/9S; CDR2: 2R/4S; CDR3: 15R/13S) (Figur 22b).

3.3.2 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten naiven B Zell Sequenzen

24 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ produktiv rearrangierte naive B Zellen verwendeten die V_{κ} Gene B2 und B3, davon hatten 14 naive B Zell Sequenzen Mutationen (58%), 54 Austauschmutationen und 26 stille Mutationen (durch-

schnittlich 5,7 Mutationen pro Sequenz). 41 Mutationen (51%) befanden sich im CDR-Bereich, 31 Austauschmutationen (57,4%) und 10 stille Mutationen (38,5%). Eindeutige Spitzenreiter waren Kodon 31 (CDR1) und Kodon 93 (CDR3) mit jeweils 5 Austauschmutationen, gefolgt von Kodon 49 (direkt vor dem CDR2) mit 4 Austauschmutationen (Figur 23a).

Von den 26 nicht-produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen, die B2 oder B3 herangezogen hatten, zeigten nur 9 Zellen (34,6%) Mutationen. Diese 54 Mutationen (durchschnittlich 6 Mutationen pro Sequenz), 34 Austauschmutationen und 20 stille Mutationen, waren recht gleichmäßig über alle Kodons verteilt. 50% aller Mutationen lagen dabei im CDR-Bereich (CDR: 17R/10S; CDR1: 7R/3S; CDR2: 0R/1S; CDR3: 10R/6S) (Figur 23b).

3.3.3 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen

Bei den $V_{\kappa}J_{\kappa}$ produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen wurden 7 Zellen gefunden, die B3 als V_{κ} Gen ausgewählt hatten. Davon hatten 5 Sequenzen jeweils eine Mutation (1R/4S).

Von den 5 nicht-produktiv mit B3 rearrangierten Germinal Center Founder Zellen hat lediglich 1 Sequenz 1 stille Mutation.

3.3.4 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Centroblasten Sequenzen

Die Analyse der 28 produktiv mit B3 rearrangierten Centroblasten ergab, daß 21 Sequenzen (75%) Mutationen aufwiesen, insgesamt 103 Mutationen, 69 Austauschmutationen und 34 stille Mutationen (durchschnittlich 4,9 Mutationen pro Sequenz). Auch hier beobachtete

man eine gewisse Bevorzugung der CDR-Bereiche, in denen sich 58 (56,3%) aller Mutationen, 41 (59,4%) der Austauschmutationen und 17 (50%) der stillen Mutationen befanden (CDR1: 21R/12S; CDR2: 6R/2S; CDR3: 14R/3S) (Figur 24a).

Bei den 11 nicht-produktiv mit B3 oder B2 rearrangierten Centroblasten zeigten 7 (63,6%) Mutationen. Die 55 Mutationen, 37 Austauschmutationen und 18 stille Mutationen (durchschnittlich 7,9 Mutationen pro Sequenz) waren recht gleichmäßig über alle Kodons verteilt, 54,5% der Mutationen lagen dabei im CDR-Bereich (48,6% der Austauschmutationen und 66,7% der stillen Mutationen) (Figur 24b).

3.3.5 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Centrocyten Sequenzen

Von den 15 produktiv mit B3 rearrangierten Centrocyten beinhalteten 12 Sequenzen Mutationen (80%). Diese 12 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ produktiven Centrocyten Sequenzen wiesen 69 Mutationen, 53 Austauschmutationen und 16 stille Mutationen auf (durchschnittlich 5,75 Mutationen pro Sequenz). Bei den hier analysierten Centrocyten zeigt sich eine sehr deutliche Präferenz der CDR-Bereiche für die Platzierung der Mutationen. 53 (76,8%) aller Mutationen, 46 (86,8%) Austauschmutationen und 7 (43,8%) stille Mutationen findet man hier (CDR1: 28R/3S; CDR2: 7R/2S; CDR3: 11R/2S) (Figur 25a).

Bei den 11 nicht-produktiv mit B2 und B3 rearrangierten Centrocyten gab es nur 3 Sequenzen (27,3%) mit Mutationen. Insgesamt wurden hier 19 Mutationen beobachtet, 17 Austauschmutationen und 2 stille Mutationen (durchschnittlich 6,3 Mutationen pro Sequenz), die vollkommen gleichmäßig über alle Kodons verteilt waren (9 Mutationen im CDR-Bereich=47,4%) (Figur 25b).

3.3.6 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 rearrangierten Memory B Zell Sequenzen

4 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ produktiv rearrangierte Memory B Zellen wählten B3, in davon 3 (75%) Sequenzen fand man insgesamt 21 Mutationen, 15 Austauschmutationen und 6 stille Mutationen (durchschnittlich 7 Mutationen pro Sequenz). 11 (52,4%) Mutationen wurden dabei im CDR-Bereich gesetzt, 10 (66,7%) Austauschmutationen und 1 (16,7%) stille Mutation. Kodon 93 (CDR3) hat hierbei allein 5 Austauschmutationen (Figur 26a).

Im $V_{\kappa}J_{\kappa}$ nicht-produktiv rearrangierten Memory B Zell Repertoire waren 3 Zellen mit B3 rearrangiert, wovon nur 1 Sequenz insgesamt 3 Mutationen aufwies (Figur 26b).

3.4 Analyse der Mutationsverteilung in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Sequenzen

3.4.1 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

112 Zellen verwendeten im $V_{\kappa}J_{\kappa}$ produktiv rearrangierten Tonsillenrepertoire V_{κ} A27, L2 oder L12. In 76 (67,9%) dieser Sequenzen wurden dabei insgesamt 380 Mutationen (292R/88S) beobachtet (durchschnittlich 5 Mutationen pro Sequenz). Beachtliche 251 (66%) Mutationen lagen hiervon im CDR-Bereich, 205 (70,2%) Austauschmutationen und 46 (52,3%) stille Mutationen (Figur 27a).

Im nicht-produktiv mit A27, L2 und L12 rearrangierten Immunglobulin Repertoire wiesen 7 der insgesamt 25 Sequenzen 34 Austauschmutationen und 9 stille Mutationen auf (durchschnittlich 6,1 Mutatio-

nen pro Sequenz). Im CDR-Bereich lagen dabei 25 (58%) Mutationen, 19 (55,9%) Austauschmutationen und 6 (66,7%) stille Mutationen (Figur 27b).

3.4.2 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten naiven B Zell Sequenzen

A27, L2 oder L12 wurde von insgesamt 34 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ produktiv rearrangierten naiven B Zellen ausgewählt, in 21 davon konnten 103 Mutationen gefunden werden, aufgeteilt in 82 Austauschmutationen und 21 stille Mutationen. Auch hier lagen die Schwerpunkte in den CDR-Kodons mit 67 Mutationen (65%) insgesamt, bzw 56 (68,3%) Austauschmutationen und 11 (52,4%) stillen Mutationen (Figur 28).

Im $V_{\kappa}J_{\kappa}$ nicht-produktiven naiven B Zellrepertoire rearrangierten 10 Zellen mit A27, L2 oder L12. Allerdings fand sich in diesen Sequenzen keine einzige Mutation.

3.4.3 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 und L12 rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen

Bei den $V_{\kappa}J_{\kappa}$ produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zellen aus der Tonsille verwendeten 11 die V_{κ} Gene A27, L2 oder L12, lediglich eine einzige Sequenz hatte hierbei eine stille Mutation.

2 als nicht-produktiv eingestufte Germinal Center Founder Zell Sequenzen waren ein Rearrangement mit A27, L2 oder L12 eingegangen. Davon hatte eine Sequenz 1 Austauschmutation und 1 stille Mutation.

3.4.4 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Centroblasten Sequenzen

39 einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons produktive Centroblasten wählten A27, L2 oder L12 für ein Rearrangement, bei 31 (79,5%) Sequenzen konnten Mutationen beobachtet werden. Insgesamt 171 Mutationen, 128 Austauschmutationen und 43 stille Mutationen, davon waren 110 (64,3%) im CDR-Bereich lokalisiert, 89 (69,5%) der Austauschmutationen und 21 (48,8%) der stillen Mutationen (Figur 29a).

In der Tonsille konnten 5 $V_{\kappa}J_{\kappa}$ nicht-produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen gefunden werden, die als V_{κ} Gen A27, L2 oder L12 gewählt hatten. 4 dieser Sequenzen zeigten Mutationen, 26 Austauschmutationen und 5 stille Mutationen. 17 (54,8%) Mutationen lagen dabei im CDR-Bereich (Figur 29b).

3.4.5 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Centrocyten Sequenzen

A27, L2 oder L12 wurde von 28 Centrocyten für ein produktives Rearrangement herangezogen, bei 23 (82%) Centrocyten waren Mutationen nachweisbar. Sie beinhalteten 105 Mutationen, 82 Austauschmutationen und 23 stille Mutationen, mit eindeutigen Schwerpunkten in den CDR-Kodons, hier lagen 74 Mutationen (70,5%), 60 (73,2%) Austauschmutationen und 14 (60,9%) stille Mutationen (Figur 30a).

A27, L2 oder L12 wählten im $V_{\kappa}J_{\kappa}$ nicht-produktiv rearrangierten Centrocytenrepertoire 8 Sequenzen, 2 davon hatten zusammen 7 Austauschmutationen und 3 stille Mutationen (Figur 30b).

3.4.6 Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 rearrangierten Memory B Zell Sequenzen

Keine der analysierten Memory B Zellen verwendete A27, L2 oder L12.

3.5 Analyse des Verhältnisses von Austauschmutationen zu stillen Mutationen

In allen analysierten Sequenzen (375 produktiv und 219 nicht-produktiv $V_{\kappa}J_{\kappa}$ rearrangierte Sequenzen) konnten insgesamt 1488 Mutationen gefunden werden, davon waren 1096 Austauschmutationen (897 in den produktiven Sequenzen und 199 in den nicht-produktiven Sequenzen) und 391 stille Mutationen (318 davon im produktiven und 73 im nicht-produktiven Bereich). Eine produktive Sequenz hatte somit im Durchschnitt 3,24 Mutationen, eine nicht-produktive nur 1,24. Insgesamt haben produktive und nicht-produktive Sequenzen eine annähernd gleiche Ratio (2,8 bzw 2,7) (Quotient aus Austauschmutationen und stillen Mutationen) in ihrer Mutationsverteilung. Aufgeteilt in die einzelnen Subpopulationen in der Tonsille zeigen sich ebenso immer ähnliche Werte (2,5 und 2,3 bei den NB; 1,3 und 1,0 bei den GCF; 2,8 und 3,4 bei den CB; jeweils 3,3 bei den CC; 3,7 und 2,5 bei den MB).

Betrachtet man jedoch die Austauschmutationen und die stillen Mutationen in ihrer Verteilung auf die einzelnen FR- und CDR-Bereiche, weisen die produktiven Sequenzen, mit Ausnahme der Germinal Center Founder Zellen, durchgehend deutlich höhere Werte in ihrer Ratio in den CDR-Bereichen als im FR auf.

So kamen im CDR-Bereich aller produktiven Sequenzen auf eine stille Mutation 4,1 Austauschmutationen, während bei den gleichen Sequenzen im FR-Bereich auf eine stille Mutation nur 1,8 Austauschmutationen kamen. Dieser Unterschied zwischen CDR-Bereich und FR-Bereich ist in allen produktiven Sequenzen, sowohl insgesamt, als auch in den einzelnen Untergruppen, mit Ausnahme der Germinal Center Founder Zellen statistisch signifikant (gesamt $p \leq 1,01896 \cdot 10^{-10}$; NB $p \leq 0,00031$; CB $p \leq 0,00925$; CC $p \leq 4,01669 \cdot 10^{-6}$; MB $p \leq 0,027885$) (χ^2 Test).

Die $V_{\kappa}J_{\kappa}$ nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen zeigen eine ausgeglichenerere Verteilung ohne deutliche Schwerpunkte, häufig aber mit höheren Ratio-Werten im FR-Bereich, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Vergleicht man die einzelnen CDR-Bereiche im produktiven und im nicht-produktiven Repertoire, dann haben die produktiven Sequenzen hier stets die größere Ratio. In den FR-Bereichen zeigen jedoch die nicht-produktiven die höheren Werte in den Ratios.

Statistische Signifikanz ergab sich dabei für die Gesamtanzahl aller Sequenzen mit einer Ratio von 4,1 im CDR der produktiven Sequenzen im Vergleich mit 2,7 bei den nicht-produktiven ($p \leq 0,0477$), sowie 1,8 im FR der produktiven und 2,8 bei den nicht-produktiven ($p \leq 0,03665$) (χ^2 Test). Weitere statistisch signifikante Unterschiede zwischen produktiven und nicht-produktiven Sequenzen wurden noch im FR3 in der Gesamtpopulation ($p \leq 0,0352$), sowie im FR1 bei den MB ($p \leq 0,0253$) gefunden (χ^2 Test) (Tabelle 1).

3.6 Analyse des Anteils an Austauschmutationen im CDR Bereich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen mutierten Sequenzen (Regressionsanalyse)

Trägt man die Gesamtanzahl der Austauschmutationen einer Sequenz als X-Koordinate und die Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich dieser Sequenz als Y-Koordinate in ein Koordinatensystem, dann können durch die, aus diesen Daten berechnete Regressionsgerade und durch den Korrelationskoeffizienten (r) die Charakteristika der Mutationsverteilung der **einzelnen** Sequenzen weiter verdeutlicht werden. Die Korrelationskoeffizienten erreichten in den produktiv und nicht-produktiv rearrangierten Gesamtpopulationen der Tonsille, sowie in den jeweiligen Tonsillensubpopulationen sehr hohe Werte (P gesamt: $r=0,8673$; NP gesamt: $r=0,8908$; P NB: $r=0,9023$; NP NB: $r=0,9418$; P GCF: $r=0,9682$; P CB: $r=0,8541$; NP CB: $r=0,8820$; P CC: $r=0,8781$; NP CC: $r=0,9028$; P MB: $r=0,4155$; NP MB: $r=1,0000$) (eine Berechnung für NP GCF war nicht möglich). Diese hohen Werte zeigen, daß die einzelnen Sequenzen recht nahe an der Regressionslinie liegen. Die Steigung (a) der Regressionslinie, die der molekularen Präferenz entspricht, Mutationen bevorzugt in CDRs zu plazieren, war bei den produktiv rearrangierten Gruppen (gesamt: $a=0,5830$; NB: $a=0,6418$; GCF: $a=0,7500$; CB: $a=0,5486$; CC: $a=0,5970$; MB: $a=0,2302$) stets größer als bei den entsprechenden nicht-produktiv rearrangierten Gruppen (gesamt: $a=0,4957$; NB: $a=0,4231$; CB: $a=0,5414$; CC: $a=0,5434$; MB: $a=-1,0000$) (Figur 31a+b, 32a+b, 33, 34a+b, 35a+b, 36a+b).

4 **Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aufbau und somatische Mutationen des $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Immunglobulin Repertoires aus der kindlichen Tonsille untersucht, um molekulare Prozesse zu identifizieren, die an der Gestaltung und Veränderung der $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements während der Keimzentriumbildung in einem sekundär lymphatischen Organ beteiligt sind. Die Ergebnisse wurden mit Untersuchungen von $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoires des Neugeborenen und des Erwachsenen in einen ontogenetischen Zusammenhang gebracht.

4.1 **Die Auswahl der V_{κ} Gene**

4.1.1 **Das nicht-produktive Repertoire**

Die Analyse des nicht-produktiv rearrangierten Immunglobulin Repertoire gibt die Möglichkeit molekulare Prozesse der Auswahl von V und J Genen, die nicht durch positive oder negative Selektion beeinflusst sind zu analysieren.

In den nicht-produktiven Rearrangements der kindlichen Tonsille konnte eine molekulare Präferenz für die J_{κ} nächsten V_{κ} Gene B3 (21%) und B2 (4,54%), das in der Mitte der proximalen Kasette gelegene V_{κ} Gen A27 (8,22%), sowie für die am Ende der proximalen Kasette gelegenen V_{κ} Gene O18/O8 (11,87%) sowie O12/O2 (10,05%) gefunden werden.

In den $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements des Neugeborenen hatte sich eine besondere Bevorzugung für die V_{κ} Gene B3 und B2, sowie für V_{κ} Gen A27 gezeigt (25). Im Erwachsenen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Repertoire waren molekulare Präferenzen für die V_{κ} Gene B3, B2, A27, A18, A17, O18/O8 und O12/O2 festgestellt worden (41).

Der Vergleich dieser drei Repertoires ist von besonderem Interesse, da je nach Alter ein unterschiedlich intensiver genereller Antigenkontakt anzunehmen ist. So wird das neonatale Repertoire vor allem durch molekulare Mechanismen der $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rekombination und der Selektion durch Autoantigene geprägt, da der Fetus bedingt durch die Plazentaschranke von exogenen Antigenen im allgemeinen noch abgeschirmt ist. Im Alter von 4-6 Jahren (kindliche Tonsille) hat das Immunsystem generell schon die verschiedensten Erfahrungen mit Fremdanitigenen sammeln können, aber natürlich noch nicht in dem Ausmaße wie es im Erwachsenenalter der Fall ist.

Die Analyse dieser drei Repertoires bezüglich der primären V_{κ} Genauswahl demonstriert eine ständige Erweiterung ihrer Präferenzen (neonatal: **B3, B2, A27** → kindlich: B3, B2, A27, **O18/O8, O12/O2** → adult: B3, B2, A27, **A18, A17**, O18/O8, O12/O2). Besonders erwähnenswert ist die signifikante Überrepräsentation von V_{κ} B3 im nicht-produktiven neonatalen Repertoire, und ganz besonders im Tonsillenrepertoire, gegenüber dem Erwachsenenrepertoire. Obwohl die V_{κ} Gene B3 und B2 als einzige Ausnahmen in der proximalen Kasette durch Inversion und nicht nur durch einfachere Deletion rearrangiert werden müssen, spielt wohl ihr Vorteil, die J_{κ} am nächsten liegenden V_{κ} Gene zu sein (14), offensichtlich eine große Rolle in der frühen B Zell Entwicklung. Der deutliche Schwerpunkt auf V_{κ} B3 legt einen beträchtlichen Einfluß der chromosomalen Position auch noch im Alter von 4-6 Jahren nahe. Das Tonsillenrepertoire zeigt also in diesem Punkt starke Ähnlichkeit mit dem Nabelschnurblut Repertoire. Das V_{κ} Gen A30 wurde in der Tonsille seltener verwendet als im Nabelschnurblut.

Neben den am Anfang (B3, B2) und in der Mitte (A27) der proximalen Kasette gelegenen V_{κ} Genen, zeigen die Tonsillensequenzen aber auch noch eine starke molekulare Präferenz für die am Ende der pro-

ximalen Kasette gelegenen Genpaare O18/O8 und O12/O2. O18/O8 und O12/O2 spielen im Nabelschnurblut keine große Rolle, im Erwachsenenrepertoire sind sie hingegen ebenso überrepräsentiert. Mit der häufigen Verwendung von O18/O8 und O12/O2 weist das Tonsillenrepertoire also auch Gemeinsamkeiten mit dem Erwachsenenrepertoire auf. Die V_{κ} Gene L11, L1, A30, A20 und A17 wurden in der Tonsille seltener als im Erwachsenenblut für ein Rearrangement herangezogen.

Auch wenn aufgrund der geringen Fallzahl eine generelle Aussage schwierig ist, scheint im Laufe des Lebens sich die primäre Auswahl von Immunglobulingenen zum einen zu diversifizieren, zum anderen vor allem J_{κ} distal gelegene V_{κ} Gene präferentiell einzubeziehen.

Vergleicht man die Präferenzen in der V_{κ} Genauswahl für ein primäres Rearrangement in den Tonsillensubpopulationen, sind die Unterschiede in den einzelnen Untergruppen (naive B Zellen: B3, B2, A27, O18/O8; Germinal Center Founder Zellen B3, O14/O4, O12/O2; Centroblasten B3, A27, O18/O8; Centrocyten B3, A27, A18, O18/O8; Memory B Zellen B3, O18/O8, O12/O2) vergleichsweise gering, mit Ausnahme des Genpaares O12/O2, das bei den Memory B Zellen und O14/O4, das bei den Germinal Center Founder Zellen signifikant häufiger im Vergleich zur Gesamtgruppe rearrangiert wurde. Diese Daten unterstützen die These, daß sich innerhalb einer Keimzentrumsentwicklung die molekularen Grundlagen für den Rezeptor der B Zellen nicht ändern. In unserer Analyse wurde jedoch eine Vielzahl von Keimzentren in der Analyse erfaßt, so daß Veränderungen in einem einzelnen Keimzentrum, oder in begrenzten Regionen der Tonsille eventuell in der Analyse des gesamten untergehen. Gewisse Präferenzen in Memory B Zellen könnten indirekt auf Selektionsprozesse im produktiven Repertoire zurückzuführen sein, oder eine Bias durch

die begrenzte Zahl an ausgewerteten Sequenzen darstellen. Einschränkung ist zu sagen, daß durch die unselektive Auswahl einer Vielzahl von Keimzentren eine noch stärkere Expansion bestimmter BCR-Gene möglicherweise verdeckt bleibt.

4.1.2 Das produktive Repertoire

Mit der Analyse der produktiven Rearrangements, die funktionstüchtige Immunglobulin Proteine kodieren, und im Vergleich der produktiven und nicht-produktiven Rearrangements, besteht die Möglichkeit Erkenntnisse über potentielle Selektionseinflüsse zu gewinnen.

Auch das produktive Repertoire aus der kindlichen Tonsille beschränkte sich für die Mehrheit der Rearrangements auf ein paar wenige V_{κ} Gene (**B3, L12, L6, L2, A27, O18/O8, O12/O2**). Sowohl positive als auch negative Selektion in das produktive Repertoire konnte beobachtet werden. Negativ selektioniert wurden die Gene B2, A18, O14/O4, V_h , LFVK431, positiv selektioniert die Gene L12, L6, L2 und A27.

Im produktiven Nabelschnurblut Repertoire dominieren annähernd die gleichen V_{κ} Gene die Mehrzahl der Rearrangements (**B3, B2, L12, L9, L6, L2, A27, O12/O2**), wobei allerdings nur O12/O2 positiv selektioniert wurde (25). Ähnliches gilt für die produktiven Rearrangements aus dem Erwachsenenblut (**B3, L12, L6, L2, A27, O12/O2, A19/A3, A17**), positiv selektioniert wurden hier die Gene L2, L12 und A27 (41).

Die nicht rein zufällige V_{κ} Genauswahl zeigt in der kindlichen Tonsille durchaus wiederum Einflüsse durch chromosomale Position. So ist das V_{κ} Gen B3 sowohl gegenüber dem Adulten als auch dem neonatalen Repertoire signifikant überrepräsentiert.

Obwohl in allen drei Gruppen annähernd die gleichen V_{κ} Gene (dick gedruckt) überrepräsentiert sind, werden zu den unterschiedlichen Lebenszeitpunkten andere V_{κ} Gene positiv selektioniert. Die positive Selektion der V_{κ} Gene L12, L2 und A27 sowohl im Tonsillen Repertoire, als auch im Erwachsenen Repertoire, aber nicht im Nabelschnurblut, deutet darauf hin, daß die Interaktion mit den vorgeburtlichen Antigenen keine positive Selektion dieser V_{κ} Gene bewirkt, sondern erst die Begegnung mit bestimmten Antigenen während der frühen Kindheit und im Erwachsenenalter. L6 wurde nur in der kindlichen Tonsille positiv selektioniert, O12/O2 hingegen im Nabelschnurblut (25) und bei einem der beiden erwachsenen Spender (32).

Positive Selektion gibt es also sowohl im neonatalen, im Tonsillen als auch im Adulten Repertoire, jedoch sind zu den unterschiedlichen Lebenszeitpunkten auch unterschiedliche V_{κ} Gene bevorzugt beteiligt um den unterschiedlichen Anforderungen gerecht zu werden. Während die einen Gene (wie O12/O2) möglicherweise eher durch Kontakte mit Autoantigenen vor der Geburt positiv selektioniert werden (42), scheint für andere (L12, L2, A27) die Begegnung mit Fremdan antigenen in Form von Impfungen, „Umweltkontakt“ oder Infektionen entscheidend zu sein.

Negative Selektion einer B Zelle kann nach einer Begegnung mit Eigenantigenen auftreten. Es wird angenommen, daß die sich einer solchen Begegnung anschließende Eliminierung von autoreaktiven B Zellen die Entstehung einer Immunantwort gegen eigene Strukturen verhindert. Die untersuchten V_{κ} Repertoires aus dem Nabelschnur- und dem Erwachsenenblut zeigten keine negative Selektion. Anders in der kindlichen Tonsille, hier wurden zwar die V_{κ} Gene A18 und O14/O4 wie erwartet, B2 sogar häufiger als erwartet primär im nichtproduktiven Repertoire ausgewählt, jedoch erfolgte eine negative

Selektion in das produktive Repertoire. Dies könnte auf die besondere Struktur eines sekundär lymphatischen Organs zurückzuführen sein, die sich vom peripheren Blut unterscheidet. In der Tonsille wird die B Zellentwicklung von Antigenstimulation, Proliferation und Selektion beeinflusst. Ein Grund für die Eliminierung der V_{κ} Gene B2, A18 und O14/O4 könnte eine Kodierung für Autoantigene in dem Umfeld der Tonsille sein.

Vergleicht man die verwendeten V_{κ} Gene der produktiv rearrangierten Tonsillensubpopulationen, so sind auch hier nur geringfügige Unterschiede festzustellen. Sie verwendeten größtenteils die gleichen V_{κ} Gene (naive B Zellen: **B3**, L12, **L6**, **L2**, **A27**, **O12/O2**; Germinal Center Founder Zellen: **B3**, **L6**, **L2**, **A27**, O18/O8, **O12/O2**; Centroblasten: **B3**, **L6**, **L2**, **A27**; Centrocyten: **B3**, **L6**, **L2**, **A27**, O18/O8, **O12/O2**; Memory B Zellen: **B3**, L8), haben aber unterschiedliche V_{κ} positiv oder negativ selektioniert. Negativ selektioniert wurden bei den naiven B Zellen V_{κ} B2, A19/A3, bei den Germinal Center Founder Zellen L8 und O14/O4, bei den Centroblasten B1, O18/O8 und V_h , bei den Centrocyten B2 und A18. Positiv selektioniert waren bei den naiven B Zellen L12, L2 und O12/O2, bei den Centroblasten A27. Da die untersuchten B Zellen aus dem Organ Tonsille präpariert wurden, ist davon auszugehen, daß eine Vielzahl von Keimzentren in der Analyse mit erfaßt wurden. Dies mag eine Erklärung für die Unterschiede in den positiven und negativen Selektionen der Subpopulationen sein.

Prinzipiell könnte der Shift hin zum Rearrangement von J_{κ} fernen V_{κ} Genen der proximalen Kasette je älter der Mensch wird, auch durch ein verstärktes Receptor editing verursacht sein. Dafür spricht, daß eine RAG-Genexpression in früheren Analysen der AG Girschick in der Tonsille nachgewiesen werden konnte (43), welche zu Receptor editing führen kann.

4.1.3 Proximale oder distale Kasette

Die Bevorzugung von V_{κ} Genen aus der J_{κ} proximalen Kasette gegenüber der J_{κ} distalen Kasette, die man sowohl im Adulten Repertoire (nicht-produktive Sequenzen: 61% proximale Kasette; 12,5% distale Kasette) (41), als auch im Nabelschnurblut (nicht-produktive Sequenzen: 70% proximale Kasette; 6,6% distale Kasette) (25) gefunden hatte, konnte auch in der kindlichen Tonsille aufgezeigt werden (nicht-produktive Sequenzen: 57,5% proximale Kasette; 8,2% distale Kasette). Die Differenz zeigt orphons oder Gene an, die nicht eindeutig den Kassetten zuordenbar waren. Zwei mögliche Gründe für den seltenen Gebrauch von V_{κ} Genen aus der distalen Kasette sind zum einen die sehr große Distanz von der J_{κ} Region bis zur distalen Kasette (1,45-1,9Mb) (14), und zum anderen die Tatsache, daß die distalen V_{κ} Gene durch Inversion rearrangiert werden müssen, was in einigen Studien als die weniger bevorzugte Methode für ein Rearrangement aufgezeigt wurde (44,45).

Der Mangel an Rearrangements mit V_{κ} Genen aus der distalen Kasette verringert zwar die effektive Größe des Repertoires, auf der anderen Seite sind die distalen Gene oft sehr ähnlich oder nahezu identisch zu ihren in der proximalen Kasette gelegenen Kopien, so daß dieser relative Mangel an distalen V_{κ} Genen für das Gesamtrepertoire wohl nur eine untergeordnete Rolle spielt. Eine Ausnahme bilden aber spezifische Immunantworten, die in ihren Antikörperantworten auf die distale Kasette zurückgreifen. Beispielsweise bildet die Mehrheit der mit *Hämophilus influenzae* Typ b Polysaccharid geimpften Personen vor allem A2 anti-Hib-Antikörper (46,47). Bei Individuen, denen die distale Kasette fehlt („Individuum 11“) führte der Impfstoff zur Bildung von Antikörpern, deren Leichtketten gezwungenermaßen V_{κ} Gene aus der „proximalen“ Kasette verwendeten, die

gebildeten Leichtketten enthielten aber mehr somatische Mutationen als die sonst üblichen A2-Leichtketten (15).

Obwohl weniger als 10 V_{κ} Gene den Großteil des peripheren V_{κ} Repertoires bilden, wird auf die anderen 35-38 funktionellen V_{κ} Gene möglicherweise bei spezifischen Immunantworten „zurückgegriffen“ (14).

4.2 Somatische Hypermutation

Rein theoretisch könnte jeder Mensch allein durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der V, D und J Segmente auf genetisch somatischer Ebene ungefähr $3,4 \cdot 10^6$ unterschiedliche Antikörper produzieren (H Kette: 65 funktionstüchtige V_H Segmente, 27 D Segmente, 6 JH Segmente $\rightarrow 65 \cdot 27 \cdot 6 = 10530$; κ Leichtkette: 40 funktionstüchtige V_{κ} und 5 J_{κ} $\rightarrow 40 \cdot 5 = 200$; λ Leichtkette: 30 funktionstüchtige V_{λ} und 4 J_{λ} $\rightarrow 30 \cdot 4 = 120$; $\Rightarrow 320$ mögliche Leichtketten * 10530 mögliche Schwereketten = $3,4 \cdot 10^6$ mögliche Antikörper). Die eben beschriebene Auswahl der V_{κ} Gene in der kindlichen Tonsille und die Tatsache, daß eben nur ein paar wenige V_{κ} Gene den Großteil des Repertoires bilden, macht deutlich, daß dieser allein durch Kombination mögliche Wert in der Praxis wohl viel niedriger liegt. Neben Kombination entsteht Vielfalt während der frühen B Zell-entwicklung auch noch durch das Einbringen von N- und P-Nukleotiden an den Verbindungsstellen. B Zellen haben aber die einzigartige Fähigkeit auch noch zu einem späteren Zeitpunkt, während der Reifung in Keimzentren von sekundär lymphatischen Organen, zusätzliche Vielfalt ihres Immunglobulin Repertoires durch den Prozeß der somatischen Hypermutation zu erzeugen (48).

Somatische Hypermutationen spielen eine essentielle Rolle in der Produktion von immer bindungsstärkeren Antikörpern im Laufe einer

Immunantwort. Die Analyse des nicht-produktiven Repertoires ist besonders wichtig um den direkten Einfluß der somatischen Hypermutationsmaschinerie zu beurteilen (27), wohingegen Unterschiede im Mutationsmuster des nicht-produktiven und produktiven Repertoires Einflüsse von positiver und negativer Selektion widerspiegeln (48).

In der kindlichen Tonsille konnten bei den ins produktive Repertoire selektierten Rearrangements durchschnittlich mehr Mutationen als bei Rearrangements des nicht-produktiven Repertoires festgestellt werden (P: 5 Mutationen pro mutierter Sequenz; NP: 4 Mutationen pro mutierter Sequenz). Desweiteren lag auch der prozentuale Anteil von Rearrangements mit Mutationen im produktiven Repertoire zwei- bis dreimal über dem des nicht-produktiven Repertoires (P vs. NP: gesamt 61% vs. 30%; NB 57,6% vs. 33%; GCF 25,5% vs. 25%; CB 75,8% vs. 24,5%; MB 77,8% vs. 30%). Dies legt nahe, daß in einem Keimzentrum in der kindlichen Tonsille bevorzugt B Zellen positiv selektioniert werden, die mutierte $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements vorweisen können.

Obwohl die CDR-Bereiche maximal einen Anteil von 35% (31 von 95 Kodons) an einem $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangement ausmachen, neigte die somatische Hypermutationsmaschinerie in der kindlichen Tonsille dazu in diesen CDR-Regionen besonders aktiv Mutationen zu plazieren (NP: Mutationen im CDR: gesamt 49%; NB: 51,5%; GCF: 40%; CB: 50,4%; CC 44,2%; MB: 28,6%). Auch die Betrachtung der proximalen Gene B3/B2 (NP: 52%) und der weiter distal gelegenen A27/L2/L12 (NP: 58%) lieferte vergleichbare Ergebnisse. Die ursprüngliche $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Sequenz trägt demnach bereits einen Teil zur Attraktivität der CDR-Bereiche für das Einbringen von Mutationen bei.

Der gewaltige Einfluß von Selektion auf die Art (R oder S) und die Verteilung (CDR oder FR) der Mutationen in einem V_kJ_k Rearrangement wurde im Vergleich des nicht-produktiven mit dem produktiven Repertoire besonders deutlich.

Die Analyse der Sequenzen zeigte eine Selektion von Rearrangements in das produktive Repertoire, bei denen Mutationen vor allem in den CDR-Bereichen vorhanden waren (Mutationen im CDR: P gesamt: 60%; NB: 58,6%; GCF: 52,4%; CB: 57,8%; CC: 64,8%; MB: 54,5%) (B3/B2: P 60% und A27/L2/L12: P 66%).

Insgesamt wurden Austauschmutationen und stille Mutationen im produktiv und im nicht-produktiv rearrangierten Tonsillenrepertoire in einem annähernd gleichen Verhältnis eingebracht (P: 2,8 (897R/318S); NP: 2,7 (199R/73S)). Bei genauerer Betrachtung ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede. Die nicht-produktiven Sequenzen zeigten ähnliche Werte ihrer Ratios (Quotient aus Austauschmutationen zu stillen Mutationen) im CDR- und im FR-Bereich (2,7 bzw. 2,8), so daß offensichtlich Austauschmutationen nicht von vorneherein bevorzugt in den CDR-Bereichen gesetzt wurden. Die signifikant unterschiedlichen Ratios im CDR- und im FR-Bereich bei den produktiven Sequenzen (4,1 bzw. 1,8) sprechen vielmehr für eine bevorzugte Selektion von Rearrangements in das produktive Repertoire, die ihren Schwerpunkt für Austauschmutationen in den CDR-Bereichen hatten. Die Ratio-Werte im CDR-Bereich des produktiven Repertoires lagen immer über den entsprechenden Werten des nicht-produktiven Repertoires (CDR1: 4,3 vs. 3,4; CDR2: 3,3 vs. 2,0; CDR3: 4,3 vs. 2,4). Die Ratio-Werte in den FR-Bereichen der produktiven Rearrangements lagen immer unter denen der nicht-produktiven Rearrangements (FR1: 3,2 vs. 4,3; FR2: 1,8 vs. 2,2; FR3: 1,6 vs. 2,9).

Ein signifikanter Unterschied in den Ratios zwischen CDR- und FR-Bereichen der produktiven Rearrangements konnte auch in sämtlichen B Zellsubpopulationen der Tonsille, mit Ausnahme der Germinal Center Founder Zellen, beobachtet werden (NB: 3,8 vs. 1,5; CB: 3,6 vs. 2,0; CC: 5,2 vs. 1,7; MB: 8,0 vs. 2,0). Auffallend war ebenso, daß die Ratiowerte vom Germinal Center Founder Stadium über Centroblasten und Centrocyten zu den Memory B Zellen immer extremere Werte zugunsten der Austauschmutationen im CDR-Bereich zeigten (GCF: 1,2; CB: 3,6; CC: 5,2; MB: 8,0), ein möglicher Hinweis für den wachsenden Selektionsdruck innerhalb eines Keimzentrums.

Im Vergleich der entsprechenden CDR- und FR-Bereiche zwischen produktiven und nicht-produktiven Repertoire innerhalb der Tonsillensubpopulationen, zeigten meistens auch hier die produktiven Rearrangements die höheren Ratiowerte in den CDR-Bereichen, während die nicht-produktiven Rearrangements die höheren Ratiowerte in den FR-Bereichen lieferten.

Bei der Betrachtung der Austauschmutationen im CDR Bereich als Funktion der Gesamtanzahl aller Austauschmutationen einer Sequenz (Regressionsanalyse), lieferten alle produktiv rearrangierten Gruppen stets Regressionslinien mit einer größeren Steigung als die entsprechenden nicht-produktiv rearrangierten Gruppen. Das bedeutet, daß die einzelne produktive Sequenz auch einen höheren Anteil ihrer Austauschmutationen im CDR Bereich vorzuweisen hatte als vergleichbare nicht-produktive Sequenzen. Prinzipiell spiegelt diese Regressionsanalyse die Daten, die in der Ratio (Austausch/Silente Mutation) Analyse bereits dargelegt wurde, wieder. Die Mutationen im Diagramm liegen alle dicht entlang der Regressionslinien (hohe Korrelationskoeffizienten). Dies zeigt, daß die V_kJ_k Sequenzen in Bezug

auf den relativen Anteil an Austauschmutationen im CDR Bereich in den einzelnen Gruppen recht homogen sind.

Demnach wurden in $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements aus der kindlichen Tonsille Austauschmutationen im CDR positiv selektioniert, wohingegen Austauschmutationen im FR größtenteils aus dem produktiven Repertoire eliminiert wurden. Um eine effektivere Immunantwort zu erreichen, sind Austauschmutationen in den CDR-Bereichen die entscheidende Grundlage. Nur Austauschmutationen im CDR-Bereich können potentiell die Affinität eines Immunglobulin Moleküls zu einem bestimmten Antigen erhöhen. Mutationen, die nicht direkt die Antigenbindung verbessern, haben die Möglichkeit die Vielfalt des exprimierten Repertoires zu erweitern (49). Die Tonsillen Rearrangements zeigten aber nicht nur eine positive Selektion von Rearrangements mit Austauschmutationen im CDR-Bereich, sondern darüber hinaus auch eine Selektion von Rearrangements, die ihre Mutationen in ganz bestimmten Kodons des CDR-Bereiches hatten. Die zehn Kodons 28, 29, 30, 31, 31a, 32, 53, 92, 93 und 94 (alle im CDR) enthalten bei den produktiven Rearrangements allein beachtliche 44% aller Austauschmutationen, bei den nicht-produktiven Rearrangements finden sich hier nur 24% aller Austauschmutationen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Feststellung, daß die besonders häufig mutierten Kodons (30, 31, 53, 93) in den zu 81% der im produktiven Repertoire verwendeten V_{κ} Gene meist (in 64%) für die Aminosäure Serin (AGC oder AGT) kodieren. [B3 (20,27%) TTA-TAC-ACC-**AGT**; L12 (6,13%) **AGT-AGC-AGT-AGT**; L6 (8,8%) **AGC-AGC-AAC-AAC**; L2 (8%) **AGC-AGC-ACC-AAC**; A27 (15,73%) **AGC-AGC-AGC-AGC**; O18/O8 (9,07%) **AGC-AAC-AAT-AAT**; O12/O2 (13,07%) **AGC-AGC-AGT-AGT**].

Nachdem die FR-Bereiche nicht direkt an der Antigenbindung teilhaben, ist es unwahrscheinlich, daß die verminderte Frequenz von Austauschmutationen im FR-Bereich von produktiven Rearrangements ein Resultat negativer Selektion aufgrund aufgetretener Autoreaktivität ist (48). Vielmehr spiegelt diese verminderte Frequenz von Austauschmutationen produktiver Rearrangements die notwendige Expression eines funktionstüchtigen Immunglobulins wieder. Viele Austauschmutationen im FR-Bereich könnten empfindliche Strukturen des Immunglobulinmoleküls treffen und so die Integrität der dreidimensionalen Struktur ändern. Dies könnte zu einer unsachgemäßen Faltung oder ineffektiven Paarung der Kette führen. B Zellen, die ein funktionstüchtiges Immunglobulinmolekül vermissen lassen, aufgrund von Mutationen, die die strukturelle Integrität verändert haben, werden aus dem Repertoire eliminiert (27).

Mit jeder zusätzlichen Mutation steigt das Risiko empfindliche Strukturen zu treffen oder autoreaktiv zu werden. Zu wenige Mutationen bringen auf der anderen Seite keine großen Veränderungen in der Affinität. Die produktiv rearrangierten Sequenzen zeigten im Gesamtrepertoire durchschnittlich mehr Mutationen pro mutierter Sequenz als die nicht-produktiven (5 vs. 4). Bei Sequenzen, die mit B2, B3, A27, L2 oder L12 rearrangiert waren, lag der Durchschnittsmutationswert im nicht-produktiven Repertoire aber über dem des produktiven Repertoires (P vs. NP; B2/B3 gesamt: 5 vs. 6,3; A27/L2/L12 gesamt: 5 vs. 6,1). Man könnte vermuten, daß eine gut tolerierbare Anzahl an Mutationen für die Selektion in das produktive Repertoire vorteilhaft ist. Nur eine begrenzte Anzahl an Mutationen bietet die optimale Balance zwischen verbesserter Antigenbindung und dem Risiko von Autoreaktivität und strukturellen Unzulänglich-

keiten eine positive Selektion in das produktive Repertoire zu erfahren (50).

Die Antikörperantwort von Neugeborenen ist noch stark limitiert. Hauptsächlich produzieren sie IgM Antikörper von niedriger Affinität. Ein Grund für die geringe Bindungsstärke ist das Fehlen von somatischen Hypermutationen im Ig Repertoire von Neugeborenen. Zum Zeitpunkt der Geburt exprimieren IgM+ B Zellen praktisch mutationslose V Gene (51).

Im Gegensatz dazu ist die somatische Hypermutationsmaschinerie im Alter von 4-6 Jahren in der kindlichen Tonsille schon voll funktionsfähig und leistet einen enormen Beitrag zur Vielfalt des Immunglobulinrepertoires.

5 Zusammenfassung

Die Kappa Leichtketten Rearrangements von den verschiedenen B Zelluntergruppen in Keimzentren der kindlichen (4-6 Jahre) Tonsille wurden mit Hilfe der Einzelzell PCR analysiert. Es konnten 219 nicht-produktive und 375 produktive $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Rearrangements sequenziert werden. Sie wurden anschließend mit IgD⁺ B Zellen aus dem Nabelschnurblut und IgM⁺ B Zellen aus dem Erwachsenenblut verglichen. Die Verteilung der verwendeten V_{κ} Einzelgene war nicht zufällig. Die V_{κ} Gene B3, B2, A27, O18/O8 und O12/O2 wurden im nicht-produktiven Repertoire der kindlichen Tonsille signifikant vermehrt für ein Rearrangement herangezogen. Bei B Zellen aus dem Nabelschnurblut waren es nur die V_{κ} Gene B3, B2 und A27 gewesen. In B Zellen aus dem Erwachsenenblut war diese Gruppe noch um A18 und A17 erweitert gewesen. Im produktiven Repertoire aus der Tonsille waren die V_{κ} Gene B3, L12, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 häufiger als erwartet verwendet worden. Negative Selektion fand man bei den Genen B2, A18, O14/O4, Vh und LFVK431. Positiv selektioniert wurden die Gene L12, L6, L2 und A27. Negative Selektion konnte weder im Nabelschnurblut noch im Erwachsenenblut festgestellt werden. Positiv selektioniert waren im Nabelschnurblut O12/O2 gewesen, im Erwachsenenblut L2, L12, A27 und O12/O2. Die detaillierte Analyse des V_{κ} Repertoires der einzelnen B Zelluntergruppen (naive B Zellen (NB), Germinal Center Founder Zellen (GCF), Centroblasten (CB), Centrocyten (CC) und Memory B Zellen (MB)) zeigte nur geringfügige Unterschiede.

Die Analyse der somatischen Hypermutationen in den einzelnen B Zelluntergruppen aus der kindlichen Tonsille zeigte eine generelle Präferenz von mutierten Rearrangements für eine positive Selektion in das produktive Repertoire. Desweiteren wurden besonders Se-

quenzen bevorzugt, bei denen Mutationen, und ganz besonders Austauschmutationen, im CDR-Bereich lokalisiert waren. Während die Mutationen im nicht-produktiven Repertoire relativ gleichmäßig über alle Kodons eines Rearrangements verteilt waren, konnte im produktiven Repertoire eine signifikante Konzentration von Austauschmutationen auf die CDR-Bereiche beobachtet werden. Dabei muß aber auch bedacht werden, daß nur eine limitierte Anzahl an Mutationen die optimale Balance, zwischen Erhaltung der strukturellen Integrität und Steigerung der Affinität, mit sich bringt.

Während Neugeborene fast keine somatischen Hypermutationen in ihren variablen Antikörperbereichen aufweisen, sind die Rearrangements aus der kindlichen Tonsille in diesem Bezug bereits mit dem Erwachsenen vergleichbar.

Die V_{κ} Genauswahl zeigt zum einen, mit der bevorzugten Verwendung proximal gelegener V_{κ} Gene, Gemeinsamkeiten mit dem neonatalen Repertoire, zum anderen, mit der gleichermaßen bevorzugten Verwendung weiter distal gelegener V_{κ} Gene, aber auch bereits Ähnlichkeit mit dem des Erwachsenen.

6 Abkürzungen

A	Adenin
AAC/AAT	Basentriplett, kodiert für Asparagin
ACC	Basentriplett, kodiert für Threonin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
CDR	complementarity determining regions
CB	Centroblast
CC	Centrocyt
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CL	konstanter Anteil der leichten Kette
C κ	konstanter Anteil der leichten Kappakette
C λ	konstanter Anteil der leichten Lambdakette
χ^2 Test	Chi Square Test
D	D (diversity) Segment der schweren Kette
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FR	framework regions
G	Guanin
GCF	Germinal Center Founder Zelle
HV	hypervariable Regionen
Ig	Immunglobulin
JH	J (joining) Segment der schweren Kette
JL	J (joining) Segment der leichten Kette
J κ	J (joining) Segment der leichten Kappakette
J λ	J (joining) Segment der leichten Lambdakette
kb	Kilobasen (1000 basen bzw. basenpaare)
MB	Memory B Zelle

MHC	major histocompatibility complex
NB	naive B Zelle
N-Nukleotide	zufällig ausgewählte (non-templated) Nukleotide
NP	nicht-produktiv
P	produktiv
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-Nukleotide	palindromische Nukleotide
RAG	recombination activating genes
RSS	Rekombinations Signal Sequenz
T	Thymin
TAC	Basentriplett, kodiert für Tyrosin
Tdt	terminal desoxynucleotidyl transferase
TTA	Basentriplett, kodiert für Leucin
VH	variabler Anteil der schweren Kette
VL	variabler Anteil der leichten Kette
V κ	variabler Anteil der leichten Kappakette
V λ	variabler Anteil der leichten Lambdakette

7 Literaturverzeichnis

- (1) Löffler G., Petrides P. E. (1997) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- (2) Janeway Ch., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2001) Immunobiology-the immune system in health and disease. 5th edition, Garland Publishing, New York.
- (3) Roitt I., Brostoff J., Male D. (2001) Immunology. 6th edition, Mosby-harcourt Publishers Limited, London.
- (4) Klinke R., Silbernagl S. (1996) Lehrbuch der Physiologie. 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- (5) Tomlinson I., Cox J., Gherardi E., Lesk A., Chothia C. (1995) The structural repertoire of the human V κ domain. EMBO J 14: 4628-4638.
- (6) Klein U., Goossens T., Fischer M., Kanzler H., Braeuninger A., Rajewsky K., Küppers R. (1998) Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. Immunol Rev 162: 261-280.
- (7) Zachau H.G. (1993) The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned looking closely at one-tenth of a percent of the human genom. Gene 135: 167-73.
- (8) Fanning L., Connor A., Wu G. (1996) Short analytical review Development of the immunoglobulin repertoire. Clinical immunology and immunopathology 79: 1-14.
- (9) Kawasaki K., Minoshima S., Nakato E., Shibuya K., Shintani A., Asakawa S., Sasaki T., Klobeck H.-G., Combriato G., Zachau H.G., Shimizu N. (2001) Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the V κ genes. Eur J Immunol 31: 1017-1028.
- (10) Zachau H.G. (1996) The human immunoglobulin kappa genes. The Immunologist 4: 49-54.

- (11) Weichhold G.M., Ohnheiser T., Zachau H.G. (1993) The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics* 16: 503-511.
- (12) Schäble K.F., Zachau H.G. (1993) The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus (review). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374: 1001-1022.
- (13) Wilson A.C., Ochman H., Prager E.M. (1987) Molecular time scale for evolution. *Trends Genet* 3: 241-247.
- (14) Feeney A., Lugo G., Escuro G. (1997) Human cord blood kappa repertoire. *J Immunol* 158: 3761-3768.
- (15) Zachau H.G. (1995) The human immunoglobulin K genes. In *Honjo T., Alt F. (Eds) Immunoglobulin genes, 2nd edn.*, Academic press, New York: 173-191.
- (16) Straubinger B., Thiebe R., Huber C., Osterholzer E., Zachau H. G. (1988a) Two unusual human immunoglobulin V kappa genes. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369: 601-607.
- (17) Klein R., Jaenichen R., Zachau H.G. (1993) Expressed human immunoglobulin kappa genes and their hypermutation. *Eur J Immunol* 23: 3248-3271.
- (18) Klein R., Zachau H.G. (1995) Expression and hypermutation of human immunoglobulin kappa genes. *Ann N Y Acad Sci (US)* 764: 74-83.
- (19) Tarlinton D. (1994) B-cell differentiation in the bone marrow and the periphery. *Immunol Rev* 137: 203-229.
- (20) Klobeck H. G., Zimmer F. J. Combriato G., Zachau H. G. (1987) Linking of the human immunoglobulin V κ and J κ C κ regions by chromosomal walking. *Nucl Acids Res* 15: 9655-9665.
- (21) Weichhold G. M., Klobeck H. G., Ohnheiser R., Combriato G., Zachau H. G. (1990) Megabase inversions in the human genome as physiological events. *Nature* 347: 90-92.

- (22) Oettinger M.A., Schatz D.G., Gorka C., Baltimore D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-1523.
- (23) Han S., Zheng B., Schatz D., Spanopoulou E., Kelsoe G. (1996) Neoteny in lymphocytes: RAG1 and RAG2 expression in germinal center B cells. *Science* 274: 2094-2097.
- (24) Giachino C., Padovan E., Lanzavecchia A. (1998) Re-expression of RAG-1 and RAG-2 genes and evidence for secondary rearrangements in human germinal center B lymphocytes. *Eur J Immunol* 28: 3506-3513.
- (25) Girschick H., Lipsky P. (2001) The kappa repertoire of human neonatal B cells. *Mol Immunol* 38: 1113-1127.
- (26) Betz A.G., Neuberger M.S., Milstein C. (1993) Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol Today (England)* 14: 405-411.
- (27) Dörner T., Farner N.L., Lipsky P.E. (1999) Two Mechanisms of Somatic Hypermutation of Ig V Genes. *The Immunologist* 7: 153-162.
- (28) MacLennan I. C., Gray D. (1986) Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol Rev* 91: 61-85.
- (29) MacLennan I.C. (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12: 117-139.
- (30) Liu Y.J., Zhang J., Lane P.J., Chan E.Y., MacLennan I.C. (1991) Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell dependent and T cell independent antigens. *Eur J Immunol* 21: 2951-62.
- (31) MacLennan I.C. (1994) From the dark zone to the light. *Current Biology* 4: 70-72.
- (32) Kelsoe G. (1996) The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Seminars in Immunology* 8: 179-184.

- (33)** Küppers R., Zhao M., Hansmann M., Rajewsky K. (1993) Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EBMO J* 12: 4955-4967.
- (34)** Liu Y.J., Arpin Ch. (1997) Germinal Center Development. *Immunol Rev* 156: 111-126.
- (35)** Feuillard J., Taylor D., Casamayor-Palleja M., Johnson G., MacLennan I. (1995) Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching. *International Immunology* 7: 121-130.
- (36)** Cotran R., Kumar V., Collins T. (1999) Robbins pathologic basis of disease. 6th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- (37)** Tomlinson I.M., Walter G., Jones P.T., Dear P.H., Sonnhammer E.L., Winter G. (1996) The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol Biol* 256: 813-817.
- (38)** Siekevitz M., Kocks Ch., Rajewsky K., Dildrop R. (1987) Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. *Cell* 48: 757-770.
- (39)** Ridings J., Nicholson I.C., Goldsworthy W., Haslam R., Robertson D.M., Zola H. (1997) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes in human neonates. *Clin Exp Immunol* 108: 366-374.
- (40)** Tomlinson I., Williams S., Corbett S., Cox B., Winter G. (1996) V base sequence directory. MRC Centre for protein engineering, Cambridge.
- (41)** Foster S., Brezinschek H., Brezinschek R., Lipsky P. (1997) Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM⁺ B cells. *J Clin Invest* 99: 1614-1627.

- (42)** Hayakawa K., Asano M., Shinton S., Gui M., Allman D., Stewart C., Sriver J., Hardy R. (1999) Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285: 113-116.
- (43)** Girschick H., Grammer A., Nanki T., Mayo M., Lipsky P. (2001) RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood. *J Immunol* 166: 377-386.
- (44)** Gauss G., Lieber M. (1993) Unequal signal and coding joint formation in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 13: 3900-3906.
- (45)** Gauss G., Lieber M. (1992) The basis for the mechanistic bias for deletional over inversional V(D)J recombination. *Genes Dev* 6: 1553-1561.
- (46)** Scott M., Crimmins D., McCourt W., Zocher R., Thiebe R., Zachau H., Nahm M. (1989) Clonal characterization of the human IgG antibody repertoire to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide III: a single V II gene and one of several J genes are joined by an invariant arginine to form the most common L chain V region. *J Immunol* 143: 4110-4116.
- (47)** Lucas A., Langley D., Granoff D., Nahm M., Kitamura M., Scott M. (1991) An idiopathic marker associated with a germ-line encoded light chain variable region that predominates the vaccine-induced human antibody response to the *Haemophilus influenzae* b polysaccharide. *J Clin Invest* 88: 1811-1818.
- (48)** Dörner T., Brezinschek H.-P., Brezinschek R., Foster S., Domiati-Saad R., Lipsky P. (1997) Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. *J Immunol* 158: 2779-2789.
- (49)** Foster S., Dörner T., Lipsky P. (1999) Targeting and subsequent selection of somatic hypermutations in the human V repertoire. *Eur J Immunol* 29: 3122-3132.

(50) Dörner T., Brezinschek H.-P., Foster S., Brezinschek R., Farner N., Lipsky P. (1998) Delineation of selective influences shaping the mutated expressed human Ig heavy chain repertoire. *J Immunol* 160: 2831-2841.

(51) Klein U., Küppers R., Rajewsky K. (1994) Variable region gene analysis of b cell subsets derived from a 4-year-old child: somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at a young age. *J Exp Med* 180: 1383-1393.

8 Figuren

8.1 Figurenlegende

Adult	Erwachsenen Repertoire
CB	Centroblast
CC	Centrocyt
CDR	complementarity determining region
χ^2 Test	Chi Square Test
GCF	Germinal Center Founder Zelle
LFVK431	sehr selten verwendetes V_{κ} Waisen Gen mit unbekannter Lokalisation im Kappalokus, kodiert für Antiinsulin-Antikörper
MB	Memory B Zelle
NB	naive B Zelle
ND	nicht definierbar
NP	nicht-produktiv
Orph-C2	V_{κ} Waisen Gen (orphan)
P	produktiv
R	(Replacement-) Austauschmutation
r	Korrelationskoeffizient
S	(Silent-) stille Mutation
Vh	sehr selten verwendetes V_{κ} Waisen Gen mit unbekannter Lokalisation
W6	sehr selten verwendetes V_{κ} Waisen Gen mit unbekannter Lokalisation
13KO	sehr selten verwendetes V_{κ} Waisen Gen mit unbekannter Lokalisation im Kappalokus, kodiert für Antiinsulin-Antikörper
X	statistisch signifikant

*	statistisch signifikanter Unterschied
⌈	
&	negative Selektion
#	positive Selektion

Figur 1: Vergleich der nicht-produktiven V_kJ_k Gen-Rearrangements von CD19+ B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut

Die Frequenzen von nicht-produktiven Genrearrangements aus der Tonsille wurden mit den nicht-produktiven Repertoire des Erwachsenen verglichen. Die V_k Gene B3, B2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,001$) wurden statistisch häufiger als erwartet verwendet (χ^2 goodness of fit Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Tonsillenrepertoire und dem erwachsenen Repertoire zeigten B3 und V_h ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; häufiger in der Tonsille), sowie L1, A30, A20 und A17 (jeweils $p \leq 0,05$; häufiger im Erwachsenenblut) (χ^2 Test).

Figur 2: Vergleich der produktiven V_kJ_k Gen-Rearrangements von CD19+ B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut

Die produktiven Frequenzen aus der Tonsille wurden mit dem produktiven Repertoire des Erwachsenen verglichen. Die V_k Gene B3, L12a, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,000001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,000001$) (χ^2 goodness of fit Test) waren statistisch häufiger vertreten als erwartet. Ein signifikanter Unterschied zwischen B Zellen aus der Tonsille und Erwachsenenblut zeigte sich bei A30, A19/A3, A17 und B3 ($p \leq 0,005$; $p \leq 0,0005$; $p \leq 0,0001$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 Test).

Figur 3: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V_kJ_k Gen-Rearrangements von CD19+ B Zellen aus der kindlichen Tonsille

Die nicht-produktiven und produktiven Frequenzen aus der Tonsille wurden miteinander verglichen. Die Gene B3, B2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,001$)

waren im nicht-produktiven Repertoire statistisch häufiger vertreten als erwartet, im produktiven Repertoire die Gene B3, L12a, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,000001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,000001$) (χ^2 goodness of fit Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-produktivem und produktivem Repertoire zeigte sich bei den Genen L12a, L6, L2 und A27 ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,01$) (positive Selektion), sowie den Genen B2, A18, O14/O4, Vh und LFVK431 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,0001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$) (negative Selektion) (χ^2 Test).

Figur 4: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille

Die Frequenz der nicht-produktiven Rearrangements bei den naiven B Zellen in der Tonsille wurde mit den produktiven der naiven B Zellen verglichen. Die Gene B3, B2, A27 und O18/O8 waren im nicht-produktiven Repertoire statistisch häufiger vertreten als erwartet ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,005$) (χ^2 goodness of fit Test), im produktiven Repertoire der naiven B Zellen die V_{κ} Gene L12a, L6, L2, A27 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 goodness of fit Test). Der Vergleich zwischen nicht-produktiv und produktivem Repertoire zeigte einen signifikanten Unterschied mit positiver Selektion der V_{κ} Gene L12a, L2 und O12/O2 ($p \leq 0,005$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,05$), und eine negative Selektion der Gene B2 und A19/A3 (p jeweils $\leq 0,05$) (χ^2 Test).

Figur 5: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von Germinal Center Founder Zellen aus der kindlichen Tonsille

Die Frequenz der nicht-produktiven Rearrangements bei den Germinal Center Founder Zellen in der Tonsille wurde mit den produktiven

der Germinal Center Founder Zellen verglichen. Statistisch häufiger rearrangiert waren in der nicht-produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Gruppe die V_{κ} Gene B3, O14/O4 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$, $p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$), in der produktiven die Gene B3, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,0001$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 goodness of fit Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-produktivem und produktivem Repertoire zeigte sich bei L8 und O14/O4 ($p \leq 0,05$ und $p \leq 0,005$) (χ^2 Test).

Figur 6: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von Centroblasten aus der kindlichen Tonsille

Die Frequenz der nicht-produktiven Rearrangements bei den Centroblasten in der Tonsille wurde mit den produktiven der Centroblasten verglichen. Statistisch häufiger rearrangiert wurden bei den nicht-produktiven Centroblasten die V_{κ} Gene B3, A27 und O18/O8 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,005$), in der produktiven Gruppe die Gene B3, L6, L2 und A27 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 goodness of fit Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-produktivem und produktivem Repertoire zeigte sich bei B1, O18/O8, Vh und A27 (jeweils $p \leq 0,05$) (χ^2 Test).

Figur 7: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von Centrocyten aus der kindlichen Tonsille

Die Frequenz der nicht-produktiven Rearrangements bei den Centrocyten in der Tonsille wurde mit den produktiven der Centrocyten verglichen. Statistisch häufiger rearrangiert wurden bei den nicht-produktiven Centrocyten die V_{κ} Gene B3, A27, A18 und O18/O8 ($p \leq 0,00001$, $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,05$), bei den produktiven die Gene B3, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$) (χ^2 goodness of fit Test). Ein

signifikanter Unterschied zwischen nicht-produktivem und produktivem Repertoire zeigte sich bei B2 und A18 ($p \leq 0,05$ und $p \leq 0,005$) (χ^2 Test).

Figur 8: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von Memory B Zellen aus der kindlichen Tonsille

Die Frequenz der nicht-produktiven Rearrangements bei den Memory B Zellen in der Tonsille wurde mit den produktiven der Memory B Zellen verglichen. Statistisch häufiger rearrangiert wurden bei den nicht-produktiven Memory B Zellen die V_{κ} Gene B3, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$) und bei den produktiven die Gene B3 und L8 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,0005$) (χ^2 goodness of fit Test). Einen signifikanten Unterschied zwischen nicht-produktivem und produktivem Repertoire gab es nicht (χ^2 Test).

Figur 9: Verteilung der V_{κ} Gene in nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen

Die Verteilung der ausgewählten V_{κ} Gene in nicht-produktiven Rearrangements wurde innerhalb der Tonsillensubpopulationen verglichen. Statistische Signifikanz im Vergleich zur Gesamtgruppe erreichte O14/O4 bei den Germinal Center Founder Zellen und O12/O2 bei den Memory B Zellen (p jeweils $\leq 0,005$) (χ^2 Test).

Figur 10: Verteilung der V_{κ} Gene in produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen

Die Verteilung der verwendeten V_{κ} Gene in produktiven Rearrangements wurde innerhalb der Tonsillensubpopulationen verglichen. Statistische Signifikanz im Vergleich zur Gesamtgruppe erreichte O18/O8 bei den Germinal Center Founder Zellen ($p \leq 0,01$), A27 bei den Centroblasten ($p \leq 0,01$), und L8 bei den Memory B Zellen ($p \leq 0,0005$) (χ^2 Test).

Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen produktiven und nicht-produktiven Repertoire zeigte sich bei V_{κ} Gen B2 (bei NB $p \leq 0,05$; CC $p \leq 0,05$; gesamt $p \leq 0,001$), B1 (bei CB $p \leq 0,05$), L8 (bei GCF $p \leq 0,05$), A19/A3 (bei NB $p \leq 0,05$), A18 (bei CC $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,0001$), O18/O8 (bei CB $p \leq 0,05$), O14/O4 (bei GCF $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,05$), L12 (bei NB $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,01$), L6 (bei gesamt $p \leq 0,05$), L2 (bei NB $p \leq 0,005$; gesamt $p \leq 0,005$), A27 (bei CB $p \leq 0,05$; gesamt $p \leq 0,01$) und O12/O2 (bei NB $p \leq 0,05$) (χ^2 Test).

Figur 11: Vergleich der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut

Die Frequenzen der nicht-produktiven naiven B Zellen wurden mit den nicht-produktiven Frequenzen aus dem Erwachsenenblut verglichen. Die V_{κ} Gene B3, B2, A27 und O18/O8 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,005$) waren in der Tonsille statistisch häufiger vertreten als erwartet (χ^2 goodness of fit Test). Im nicht-produktiven adulten Repertoire waren es B3, B2, A27, A18, A17, O18/O8 und O12/O2 gewesen. Ein signifikanter Unterschied zwischen naiven B Zellen aus der Tonsille und adultem Repertoire zeigte sich bei den Genen B3, L25 und Vh ($p \leq 0,0005$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$) (χ^2 Test).

Figur 12: Vergleich der produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut

Die produktiven Frequenzen der naiven B Zellen wurden mit den produktiven Frequenzen des Erwachsenenblutes verglichen. Die V_{κ} Gene B3, L12a, L6, L2, A27 und O12/O2 waren bei den naiven B Zellen statistisch häufiger vertreten als erwartet ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00005$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$) (χ^2 goodness of fit Test),

im produktiv adulten Repertoire die V_{κ} Gene B3, L12, L6, L2, A27, A19/A3, A17 und O12/O2. Ein signifikanter Unterschied zwischen naiven B Zellen und Adulten zeigte sich bei den Genen B3 und O11/O1 ($p \leq 0,00005$; $p \leq 0,05$) und A19/A3 ($p \leq 0,01$) (χ^2 Test).

Figur 13: Vergleich der nicht-produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von IgD+ B Zellen aus dem Nabelschnurblut mit B Zellen aus der kindlichen Tonsille und IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut

Die nicht-produktiven Frequenzen aus der Tonsille wurden mit nicht-produktiven Frequenzen aus dem Nabelschnurblut und nicht-produktiven Frequenzen aus dem Erwachsenenblut verglichen. Die V_{κ} Gene B3, B2 und A27 waren im nicht-produktiven Nabelschnurblut statistisch häufiger vertreten als erwartet ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,00001$). Im nicht-produktiven Tonsillenrepertoire B3, B2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,001$) (χ^2 goodness of fit Test). Im nicht-produktiven adulten Repertoire waren es B3, B2, A27, A18, A17, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,025$; $p \leq 0,025$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Nabelschnurblut und Tonsillen Repertoire zeigte sich bei L11 und A30 ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,05$) (χ^2 Test). Zwischen Tonsillenrearrangements und Erwachsenenblut Rearrangements zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den V_{κ} Genen B3 und V_{h} ($p \leq 0,00001$; $p \leq 0,05$), sowie bei L1, A30, A20 und A17 (jeweils $p \leq 0,05$) (χ^2 Test).

Figur 14: Vergleich der produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Gen-Rearrangements von IgD+ B Zellen aus dem Nabelschnurblut mit B Zellen aus der kindlichen Tonsille und IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut

Die produktiven Frequenzen aus der Tonsille wurden mit produktiven Frequenzen aus dem Nabelschnurblut und produktiven Frequenzen

aus dem Erwachsenenblut verglichen. Im Nabelschnurblut waren die V_{κ} Gene B3, B2, L12a, L9, L6, L2, A27 und O12/O2 ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$; $p \leq 0,00001$) signifikant häufiger rearrangiert, in der Tonsille die V_{κ} Gene B3, L12a, L6, L2, A27, O18/O8 und O12/O2 ($p \leq 0,000001$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,000001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,000001$) (χ^2 goodness of fit Test) und im Erwachsenenblut B3, L12, L6, L2, A27, A19/A3, A17 und O12/O2 ($p \leq 0,005$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$) (41).

Ein signifikanter Unterschied zwischen Tonsille und Nabelschnurblut zeigte sich bei den V_{κ} Genen B3 und A27 ($p \leq 0,005$ bzw. $p \leq 0,05$), sowie B2, L9, A30 und O12/O2 ($p \leq 0,00005$; $p \leq 0,00001$; $p \leq 0,005$; $p \leq 0,05$) (χ^2 Test). Im Vergleich Tonsille mit Erwachsenenblut bei den Genen A30, A19/A3, und A17 ($p \leq 0,005$; $p \leq 0,0005$; $p \leq 0,0001$), sowie B3 ($p \leq 0,00001$) (χ^2 Test).

Figur 15: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller produktiven Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 16: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller nicht-produktiven Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 17a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller produktiven naiven B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 17b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller nicht-produktiven naiven B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 18a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller produktiven Germinal Center Founder Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 18b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller nicht-produktiven Germinal Center Founder Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 19a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller produktiven Centroblasten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 19b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller nicht-produktiven Centroblasten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 20a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller produktiven Centrocyten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 20b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller nicht-produktiven Centrocyten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 21a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller produktiven Memory B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 21b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller nicht-produktiven Memory B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 22a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller produktiven B2 oder B3 Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 22b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller nicht-produktiven B2 oder B3 Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 23a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 produktiven naiven B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 23b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 nicht-produktiven naiven B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 24a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 produktiven Centroblasten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 24b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 nicht-produktiven Centroblasten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 25a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 produktiven Centrocyten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 25b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 nicht-produktiven Centrocyten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 26a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 produktiven Memory B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 26b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit B2 oder B3 nicht-produktiven Memory B Zell Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 27a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit A27, L2 oder L12 produktiven Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 27b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiven Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 28: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit A27, L2 oder L12 produktiven Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 29a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit A27, L2 oder L12 produktiven Centroblasten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 29b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiven Centroblasten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 30a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V_{\kappa}J_{\kappa}$ Kodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit A27, L2 oder L12 produktiven Centrocyten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Figur 30b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V_KJ_K Kodons in mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille

Die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen aller mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiven Centrocysten Rearrangements wurde in den einzelnen Kodons betrachtet.

Tabelle 1: Ratio von Austauschmutationen und Stillen Mutationen

Die Anzahl der Austauschmutationen und stillen Mutationen in den einzelnen Bereichen einer V_KJ_K-Sequenz wurde für die Gesamtzahl aller produktiven und nicht-produktiven Tonsillensequenzen sowie für alle Subpopulationen aufgelistet und die Ratio berechnet (Quotient aus Austauschmutationen und stillen Mutationen) [in Tabelle: Ratio(Austauschmutationen/Stille Mutationen)].

Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen CDR-Bereich und FR-Bereich (in der Tabelle mit roter Farbe gekennzeichnet) ergaben sich im produktiven Repertoire für die Gesamtanzahl aller produktiven Sequenzen, die produktiven naiven B Zellen, die produktiven Centroblasten, die produktiven Centrocysten, und die produktiven Memory B Zellen ($p \leq 1,01896 \cdot 10^{-10}$; $p \leq 0,00031$; $p \leq 0,00925$; $p \leq 4,01669 \cdot 10^{-6}$; $p \leq 0,027885$) (χ^2 Test).

Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen produktivem und nicht-produktivem Repertoire (in der Tabelle mit # gekennzeichnet) zeigten sich im FR3, im CDR und im FR bei der Gesamtpopulation ($p \leq 0,0352$; $p \leq 0,0477$; $p \leq 0,03665$), sowie im FR1 bei den Memory B Zellen ($p \leq 0,0253$) (χ^2 Test).

Figur 31a: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen produktiven Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte produktive Sequenz aufgetragen.

Die Mutationen im CDR wurden mittels Sigma Plot[®] als Funktion (Regressionsgerade) der gesamten Zahl von Austauschmutationen /Sequenz dargestellt ($y=ax+t$). Der Korrelationskoeffizient r wurde berechnet.

Figur 31b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen nicht-produktiven Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte nicht-produktive Sequenz aufgetragen.

Figur 32a: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen produktiven naiven B Zell Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte produktive naive B Zell Sequenz aufgetragen.

Figur 32b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen nicht-produktiven naiven B Zell Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte nicht-produktive naive B Zell Sequenz aufgetragen.

Figur 33: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen produktiven Germinal Center Founder Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte produktive Germinal Center Founder Sequenz aufgetragen.

Figur 34a: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen produktiven Centroblasten Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte produktive Centroblasten Sequenz aufgetragen.

Figur 34b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen nicht-produktiven Centroblasten Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte nicht-produktive Centroblasten Sequenz aufgetragen.

Figur 35a: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen produktiven Centrocyten Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte produktive Centrocyten Sequenz aufgetragen.

Figur 35b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen nicht-produktiven Centrocyten Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte nicht-produktive Centrocyten Sequenz aufgetragen.

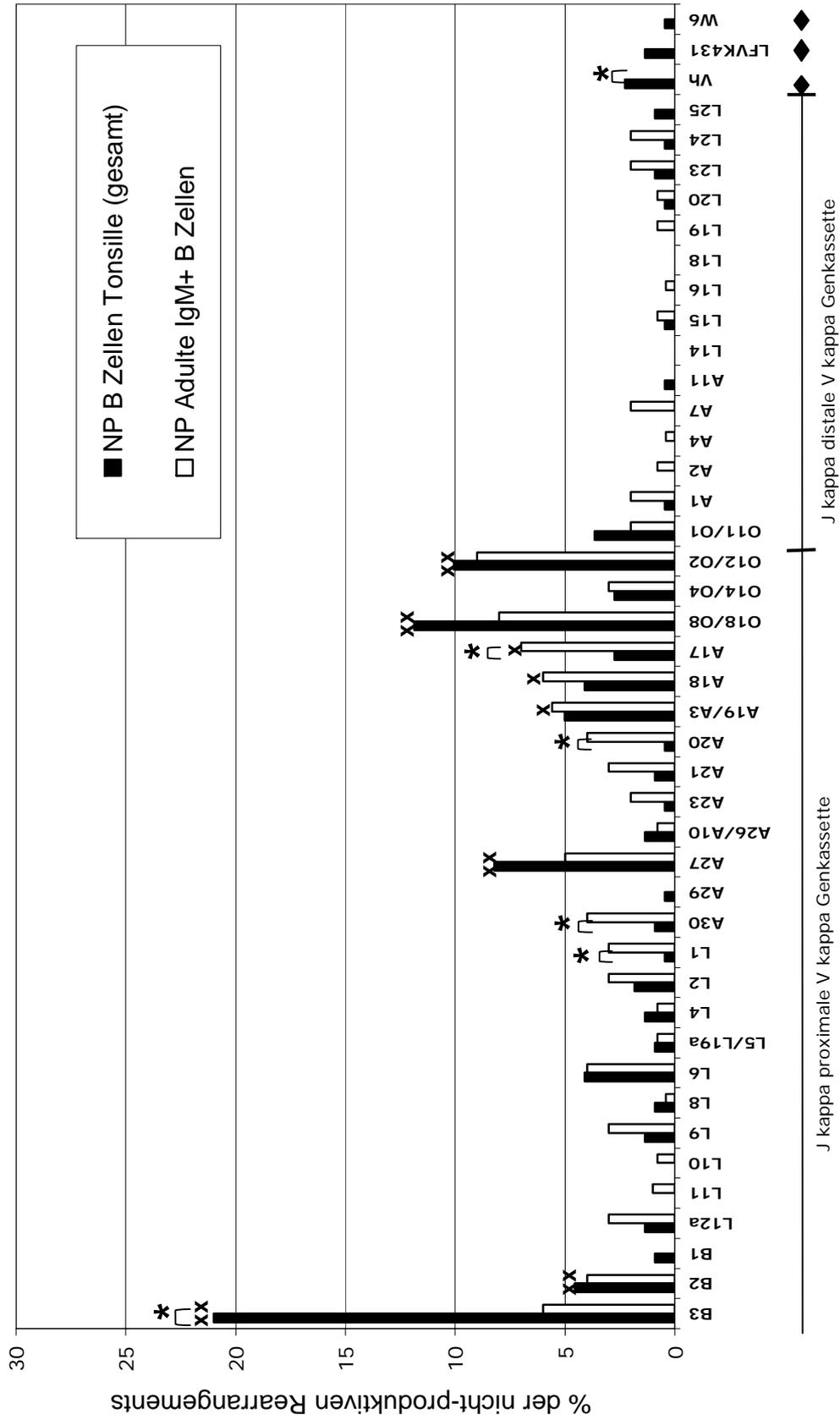
Figur 36a: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen produktiven Memory B Zell Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte produktive Memory B Zell Sequenz aufgetragen.

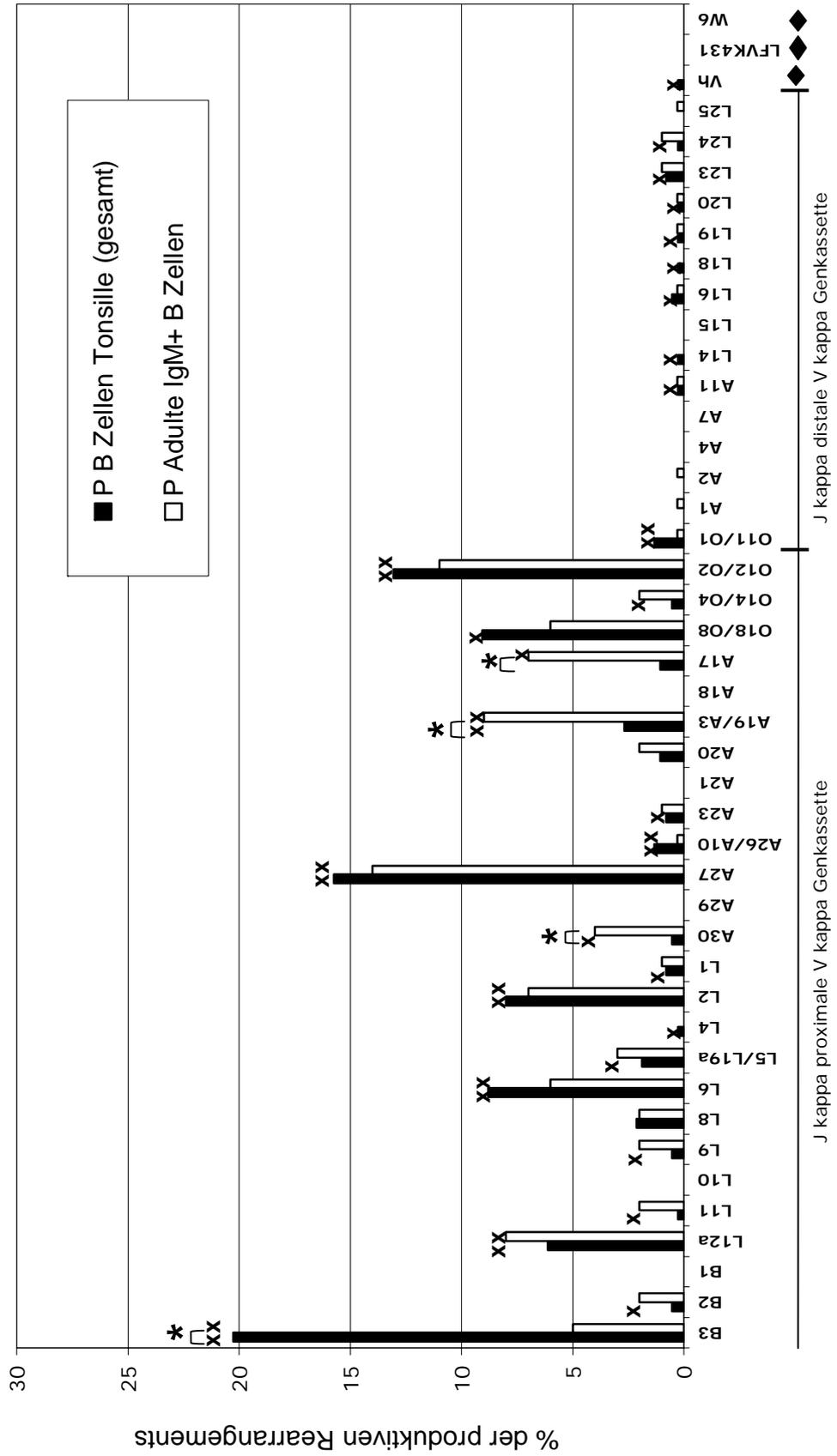
Figur 36b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen nicht-produktiven Memory B Zell Sequenzen

Die Austauschmutationen im CDR Bereich wurden als Funktion der Gesamtanzahl der Austauschmutationen für jede einzelne mutierte nicht-produktive Memory B Zell Sequenz aufgetragen.

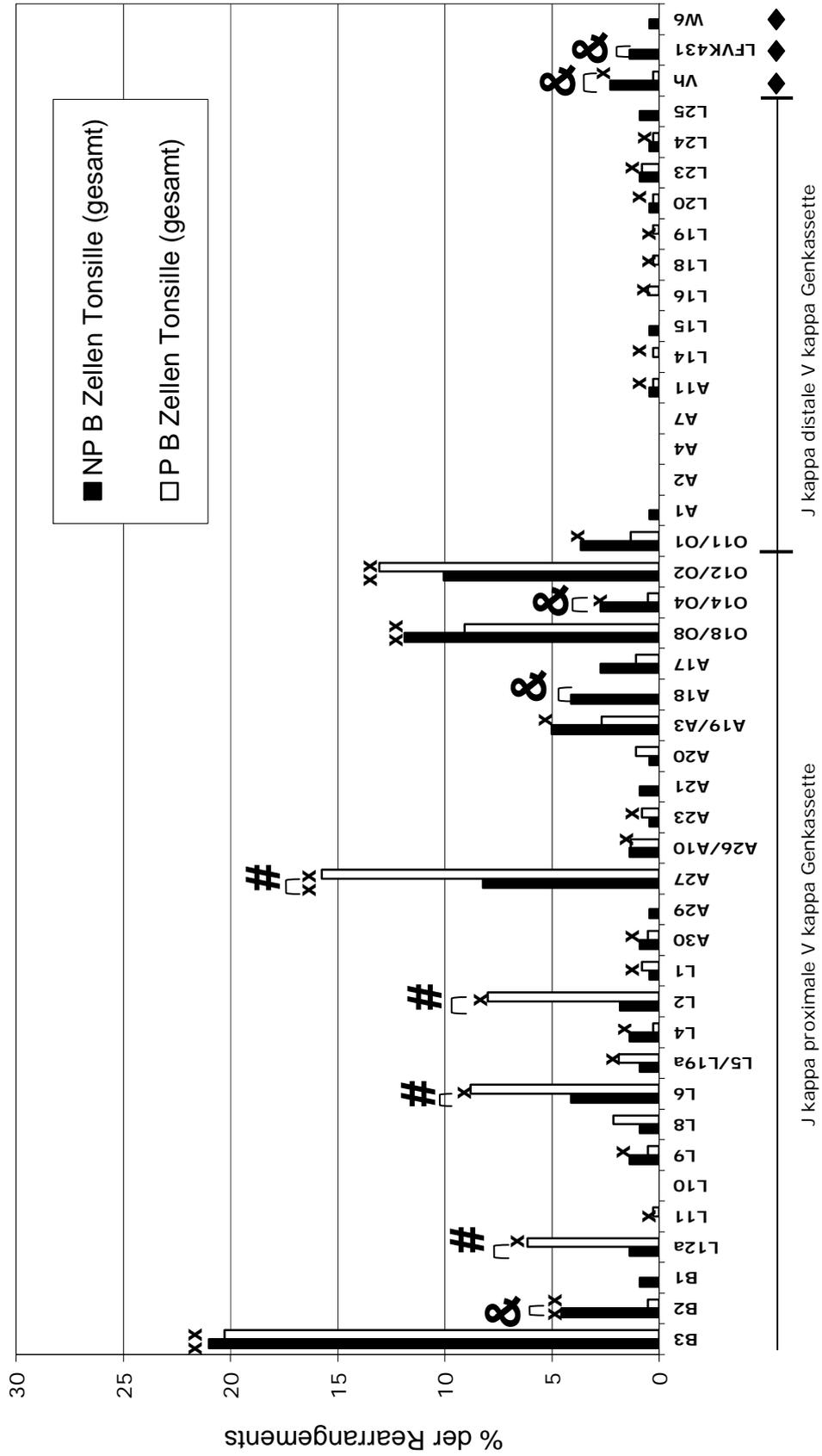
Figur 1: Vergleich der nicht-produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von CD19+ B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut



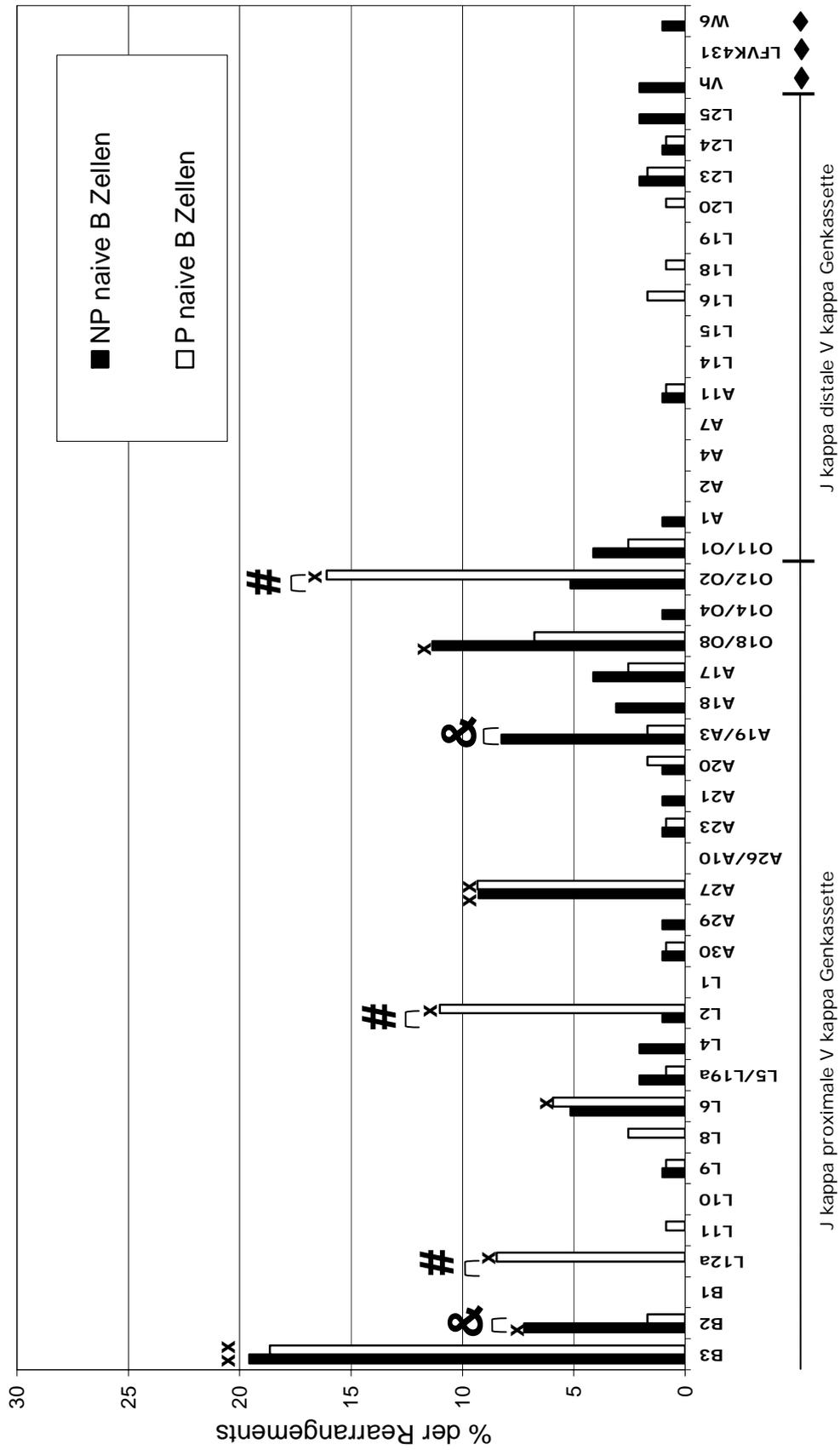
Figur 2: Vergleich der produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von CD19+ B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut



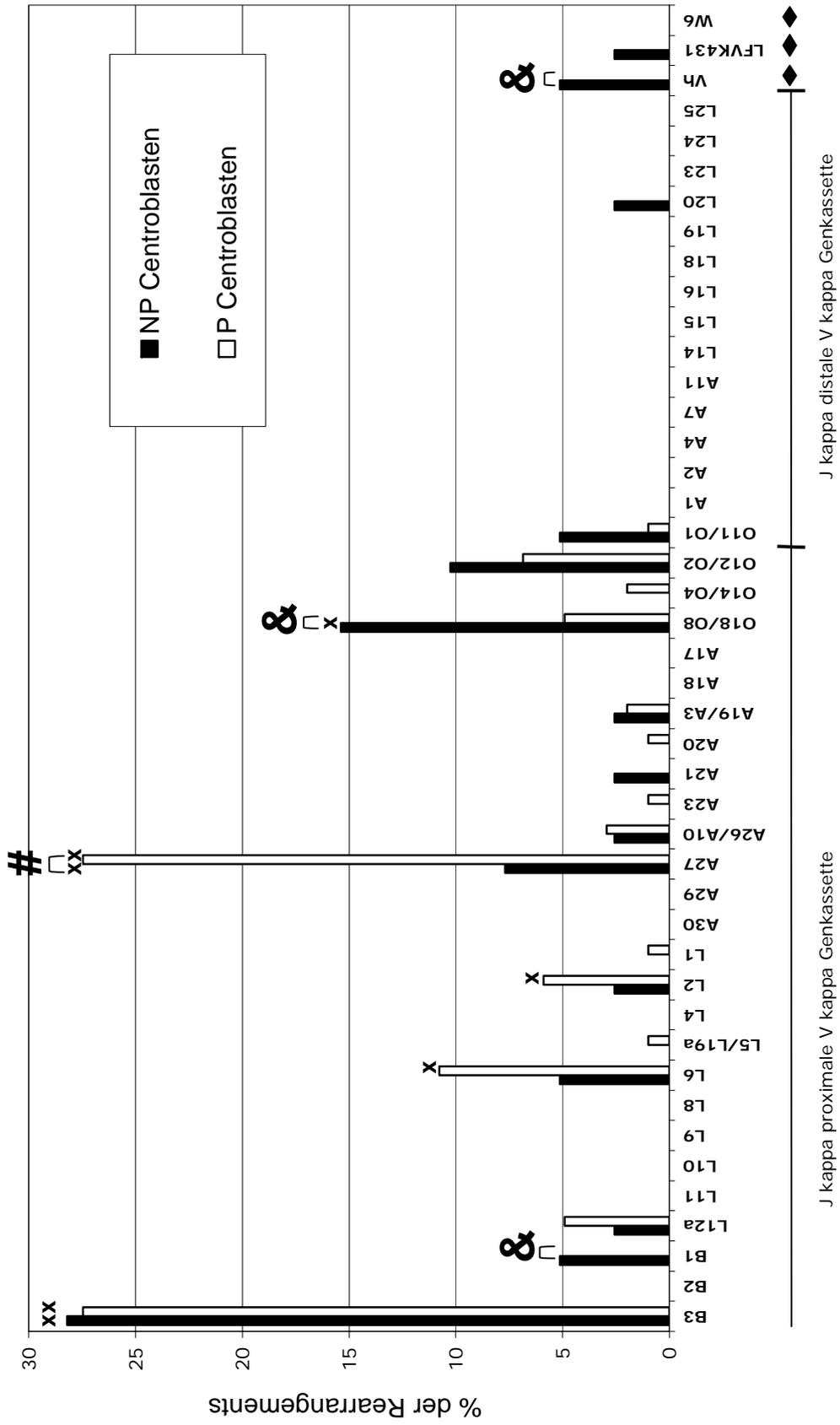
Figur 3: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von CD19+ B Zellen aus der kindlichen Tonsille



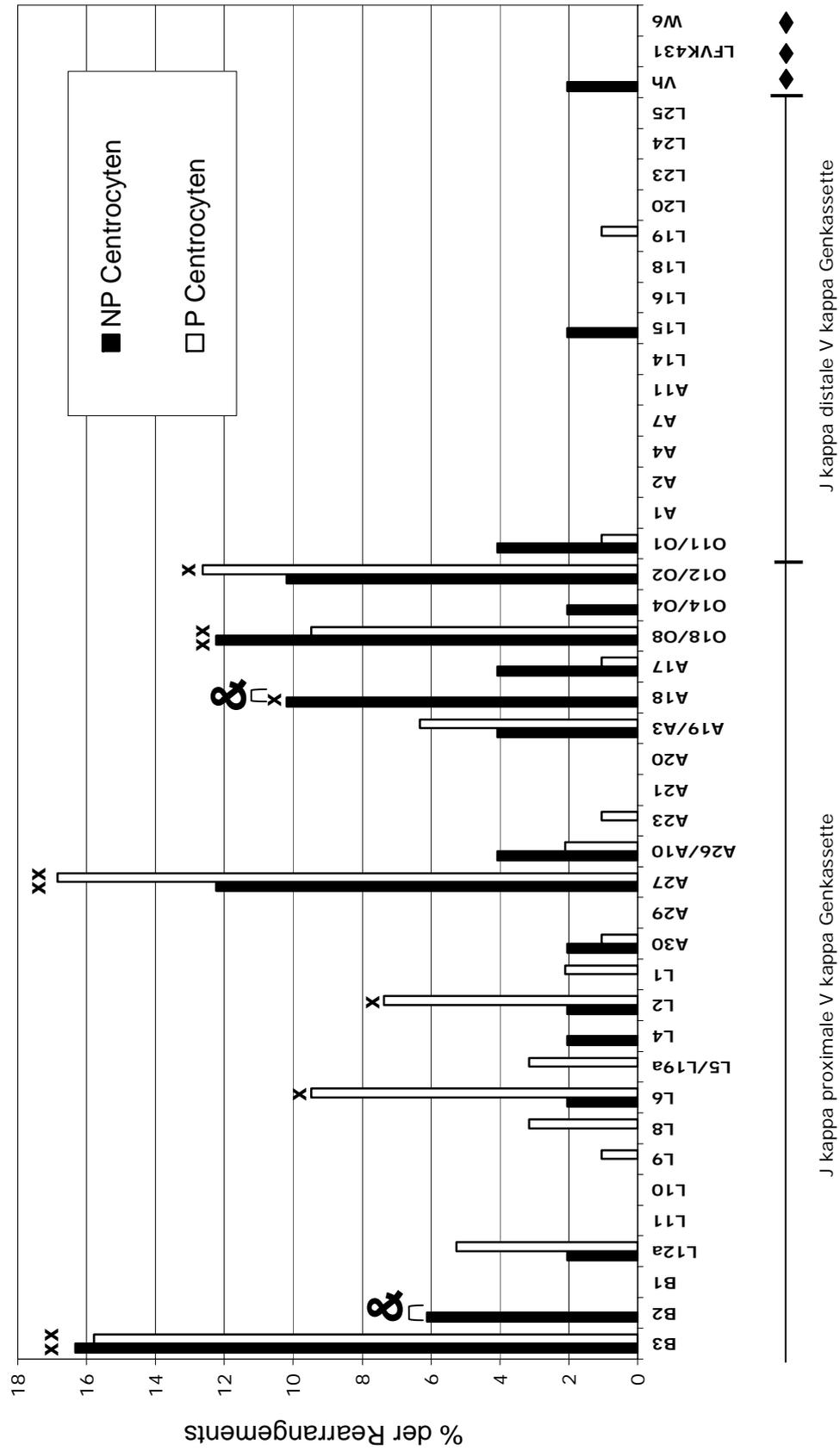
Figur 4: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille



Figur 6: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von Centroblasten aus der kindlichen Tonsille



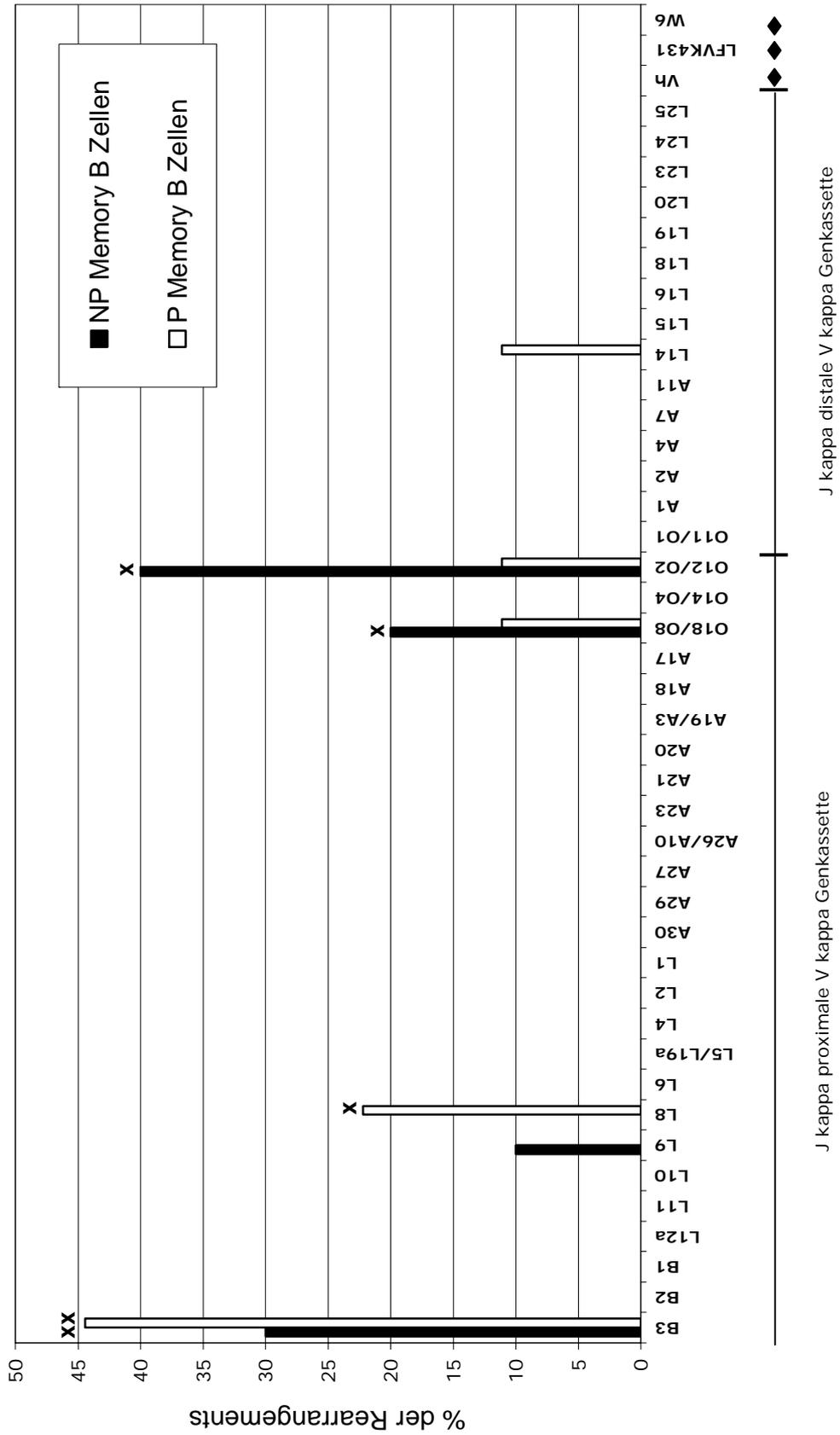
**Figur 7: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V kappa J kappa Gen-
Rearrangements von Centrocysten aus der kindlichen Tonsille**



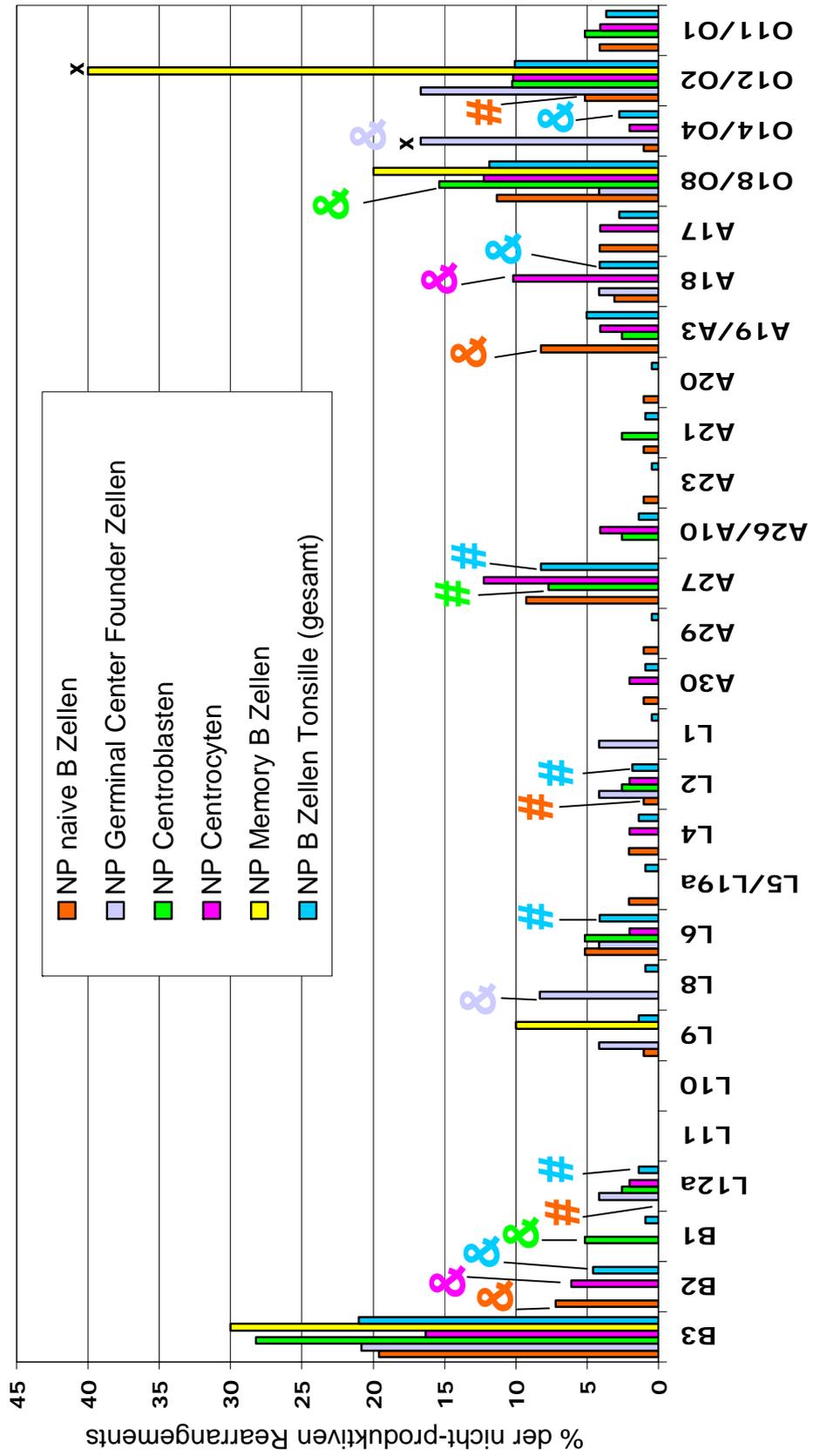
J kappa distale V kappa Genkassette

J kappa proximale V kappa Genkassette

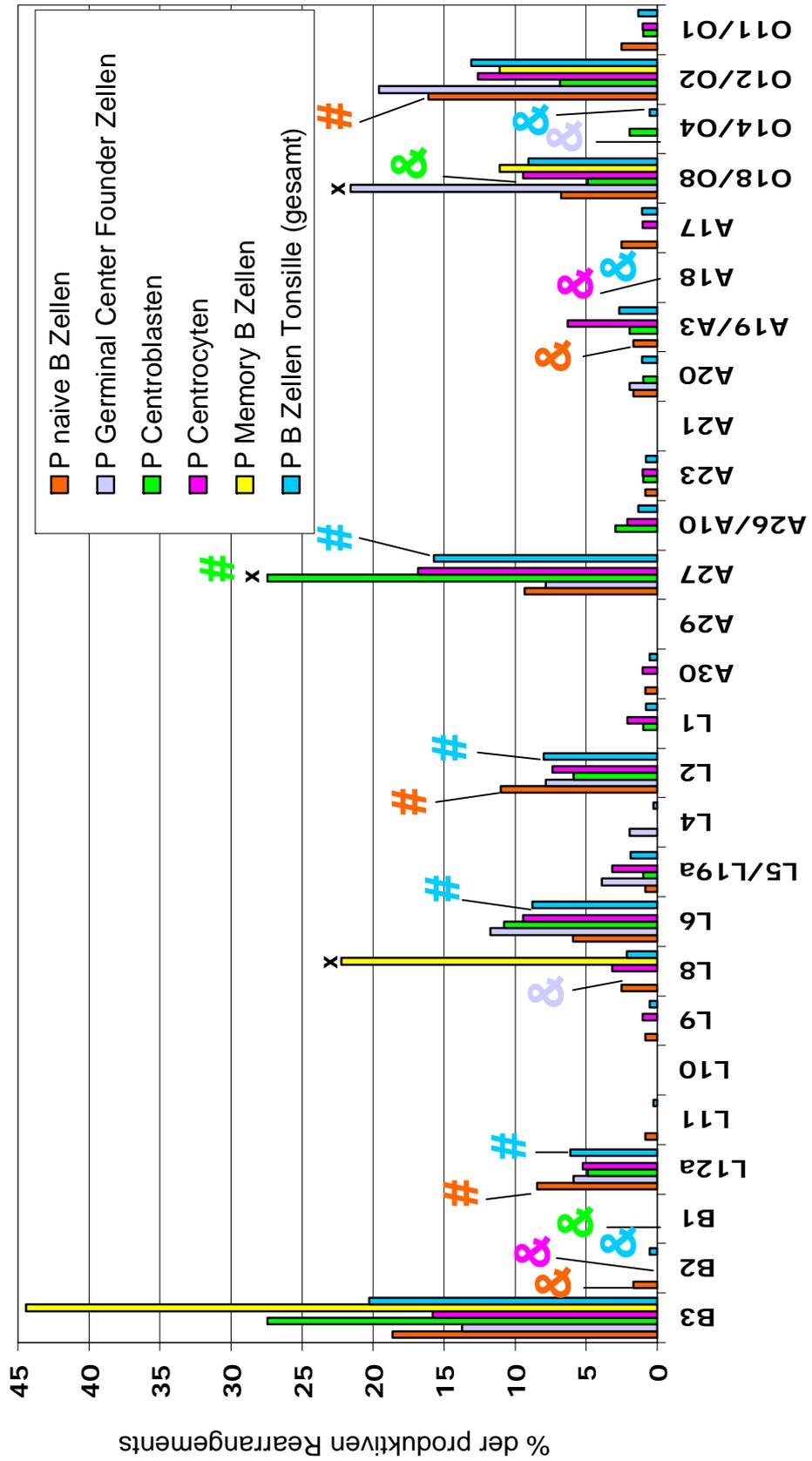
Figur 8: Vergleich der nicht-produktiven und produktiven V kappa J kappa Rearrangements von Memory B Zellen aus der kindlichen Tonsille



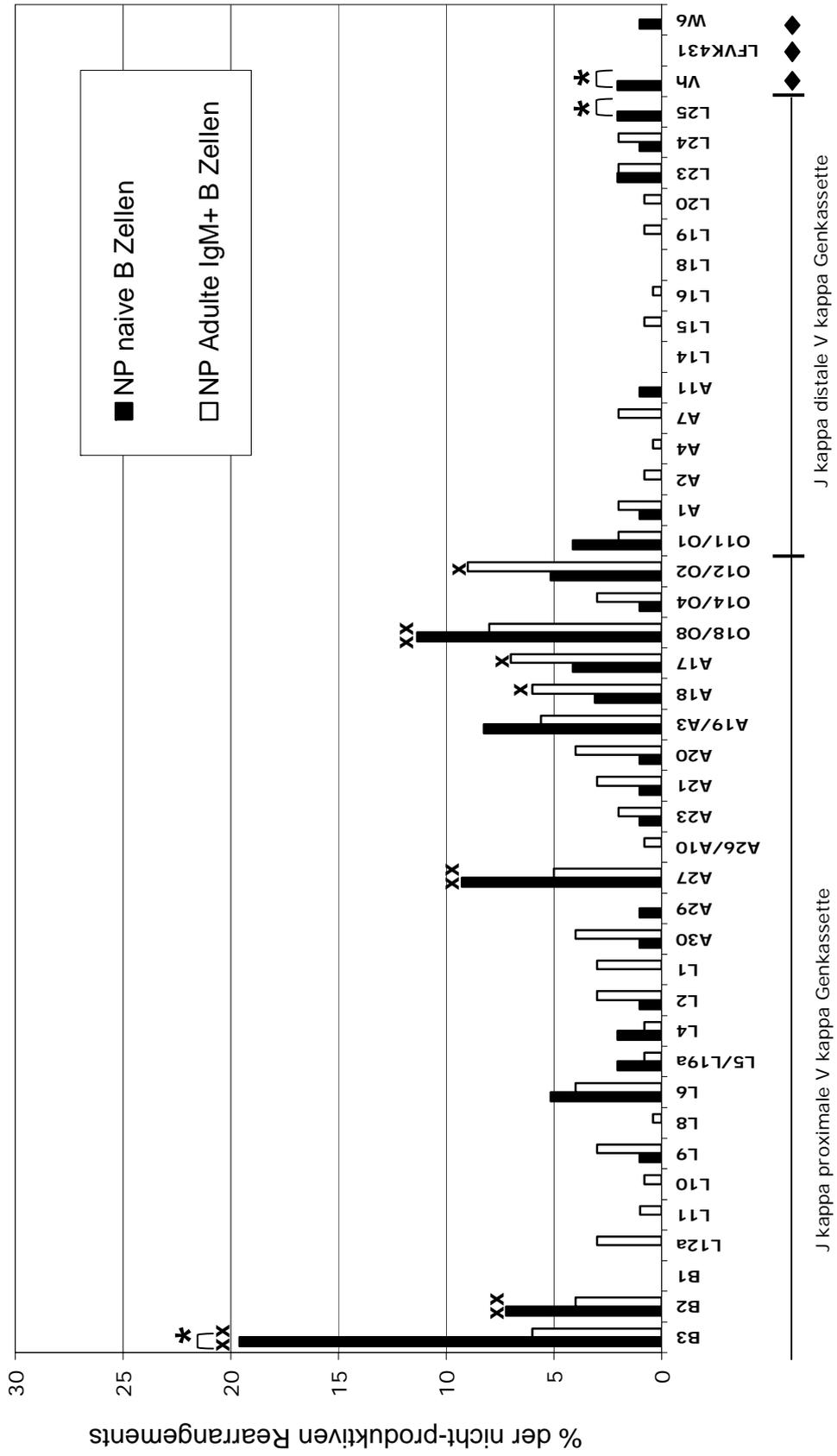
Figur 9: Verteilung der V kappa Gene in nicht-produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen



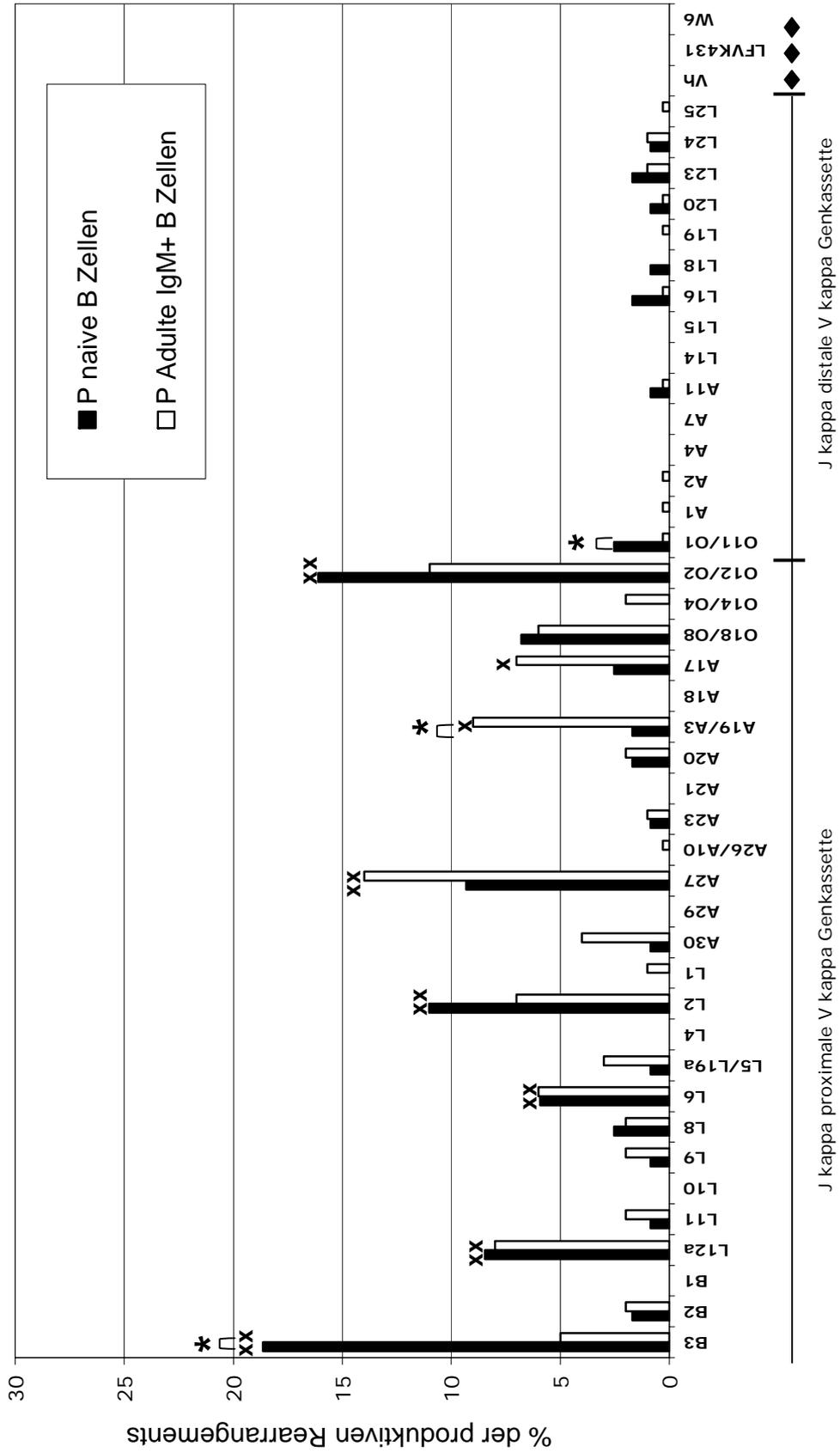
Figur 10: Verteilung der V kappa Gene in produktiven V kappa kappa Gen-Rearrangements in den verschiedenen Tonsillenuntergruppen



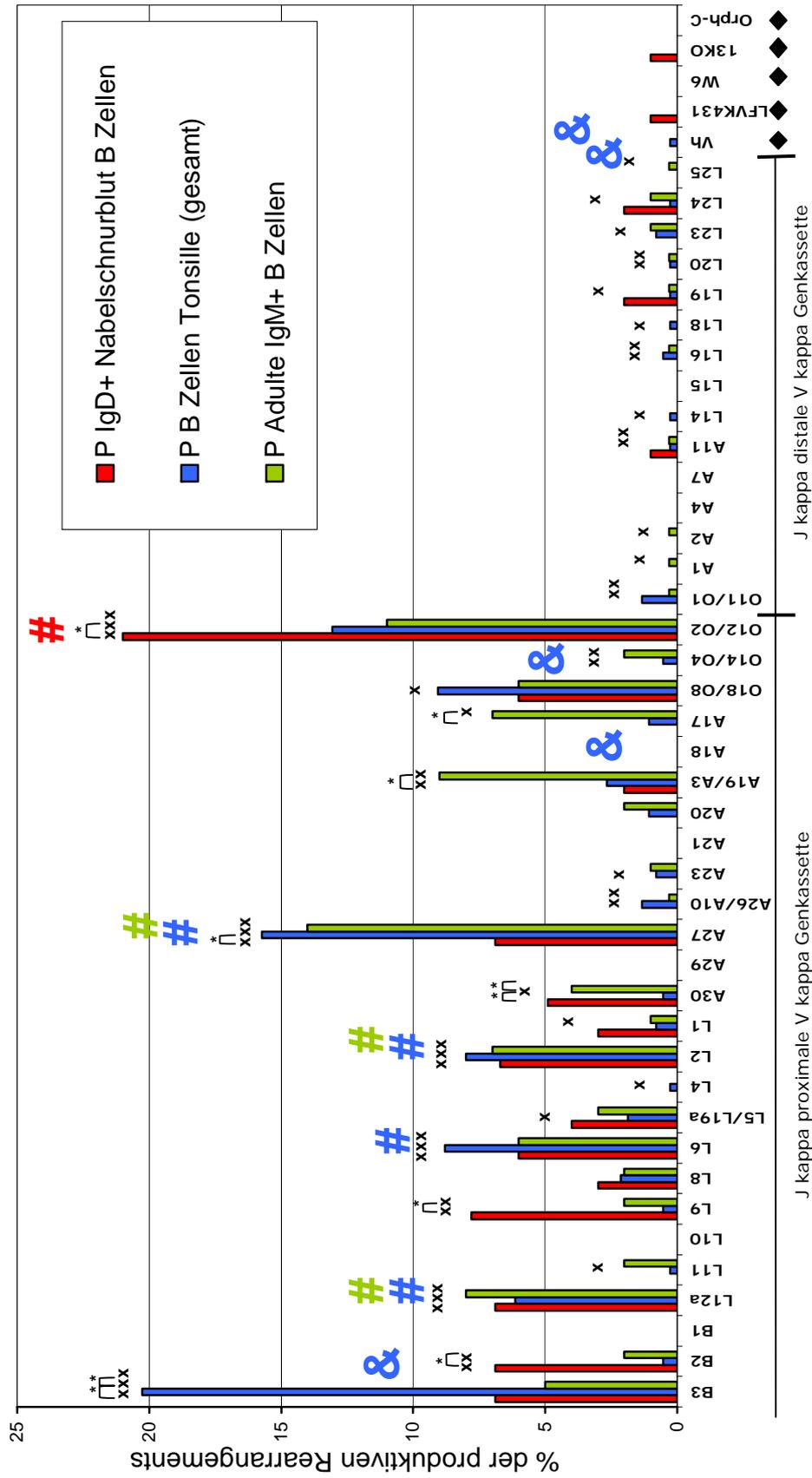
Figur 11: Vergleich der nicht-produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut



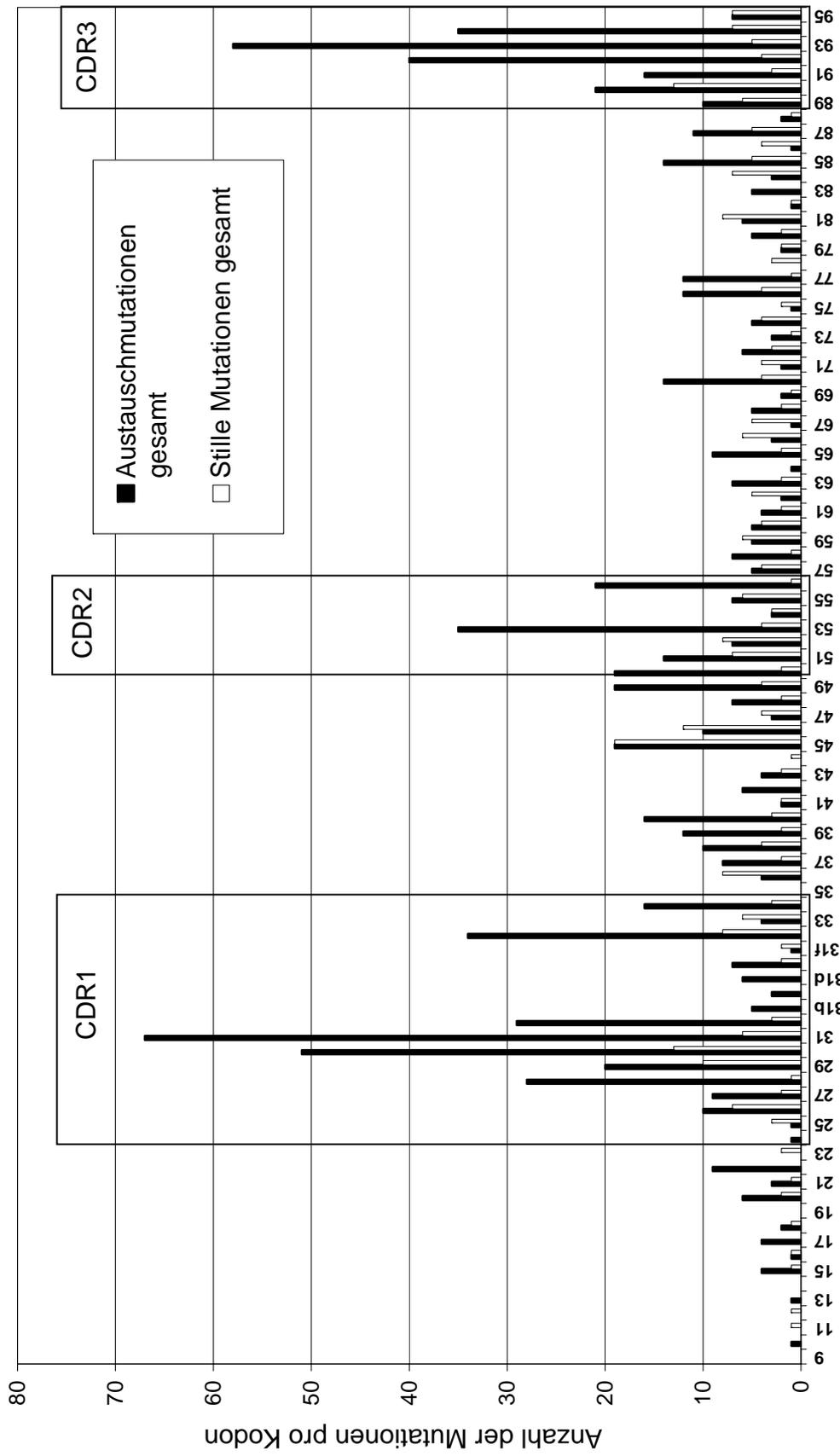
Figur 12: Vergleich der produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von naiven B Zellen aus der kindlichen Tonsille mit IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut



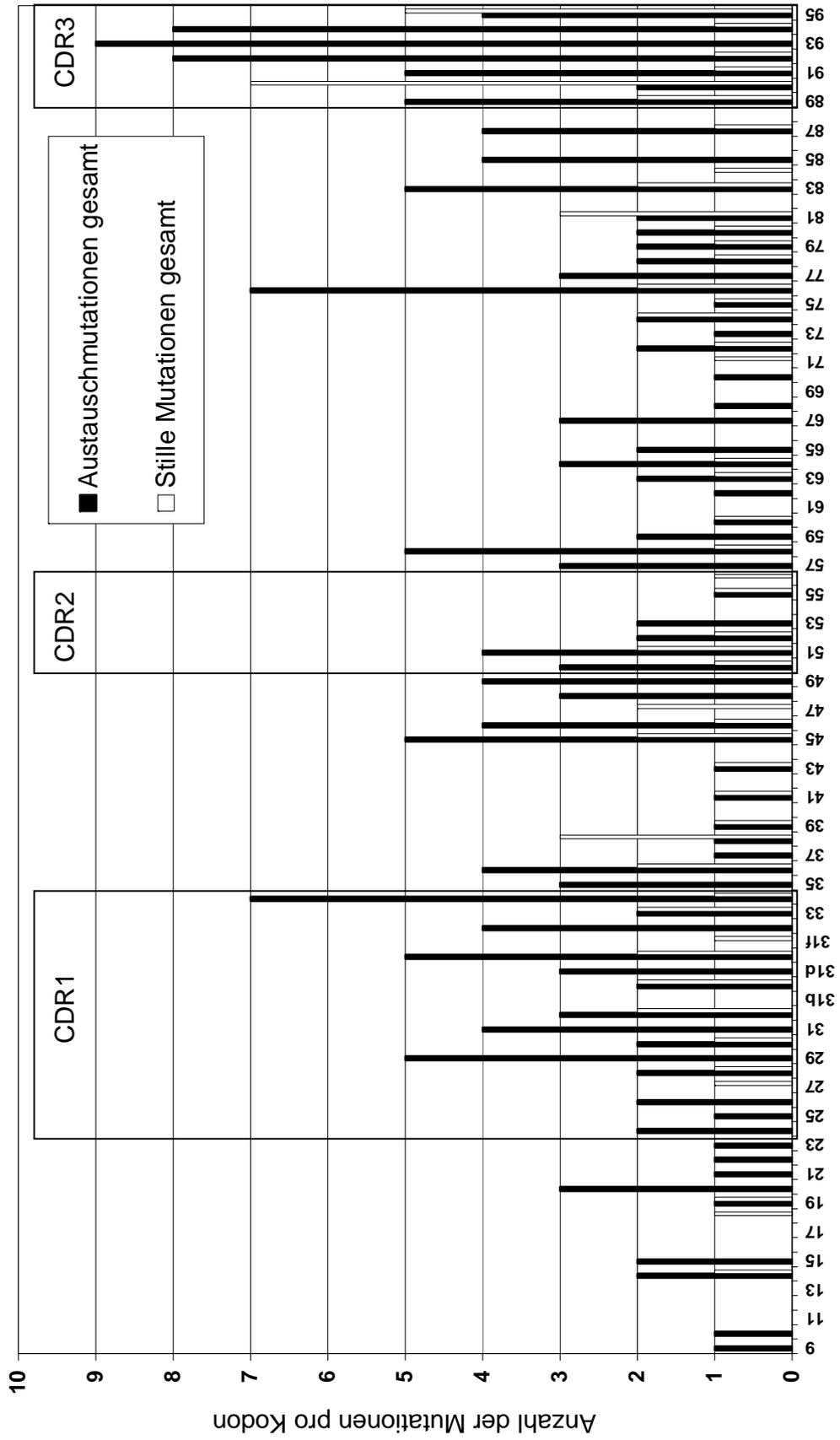
Figur 14: Vergleich der produktiven V kappa J kappa Gen-Rearrangements von IgD+ B Zellen aus dem Nabelschnurblut mit B Zellen aus der kindlichen Tonsille und IgM+ B Zellen aus dem Erwachsenenblut



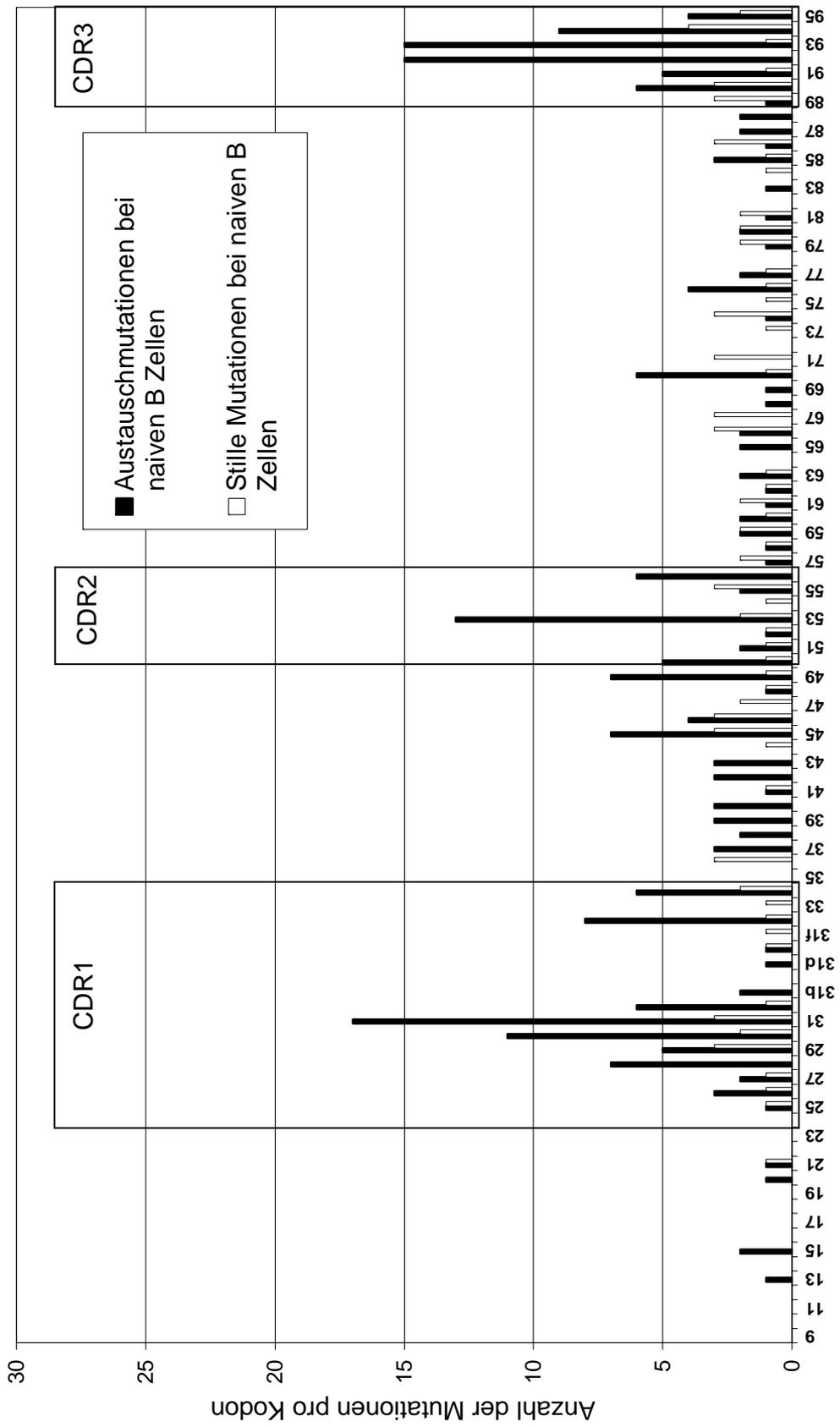
Figur 15: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen κ Jkappa Kodons in produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



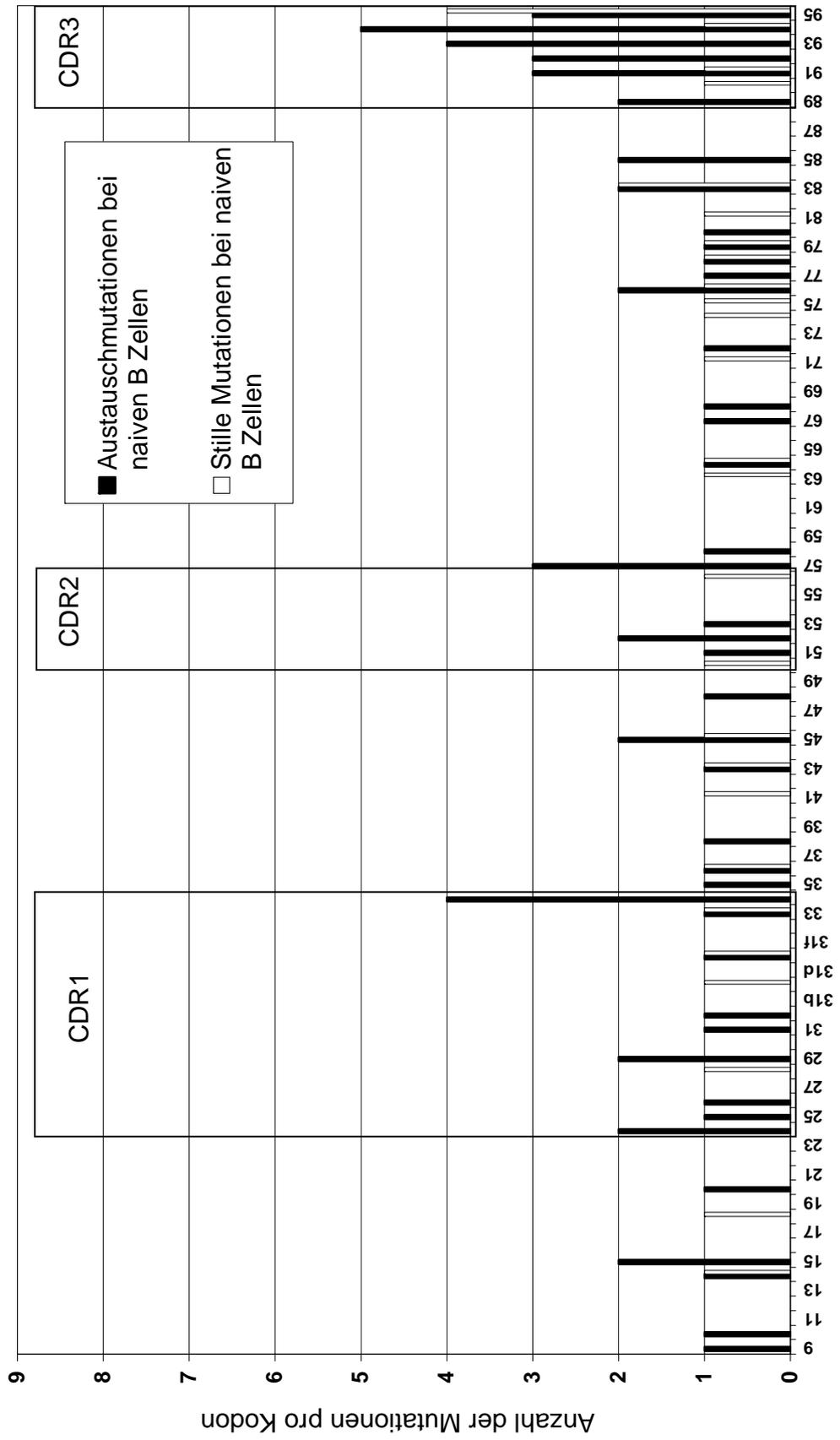
Figur 16: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen κ Jkappa Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



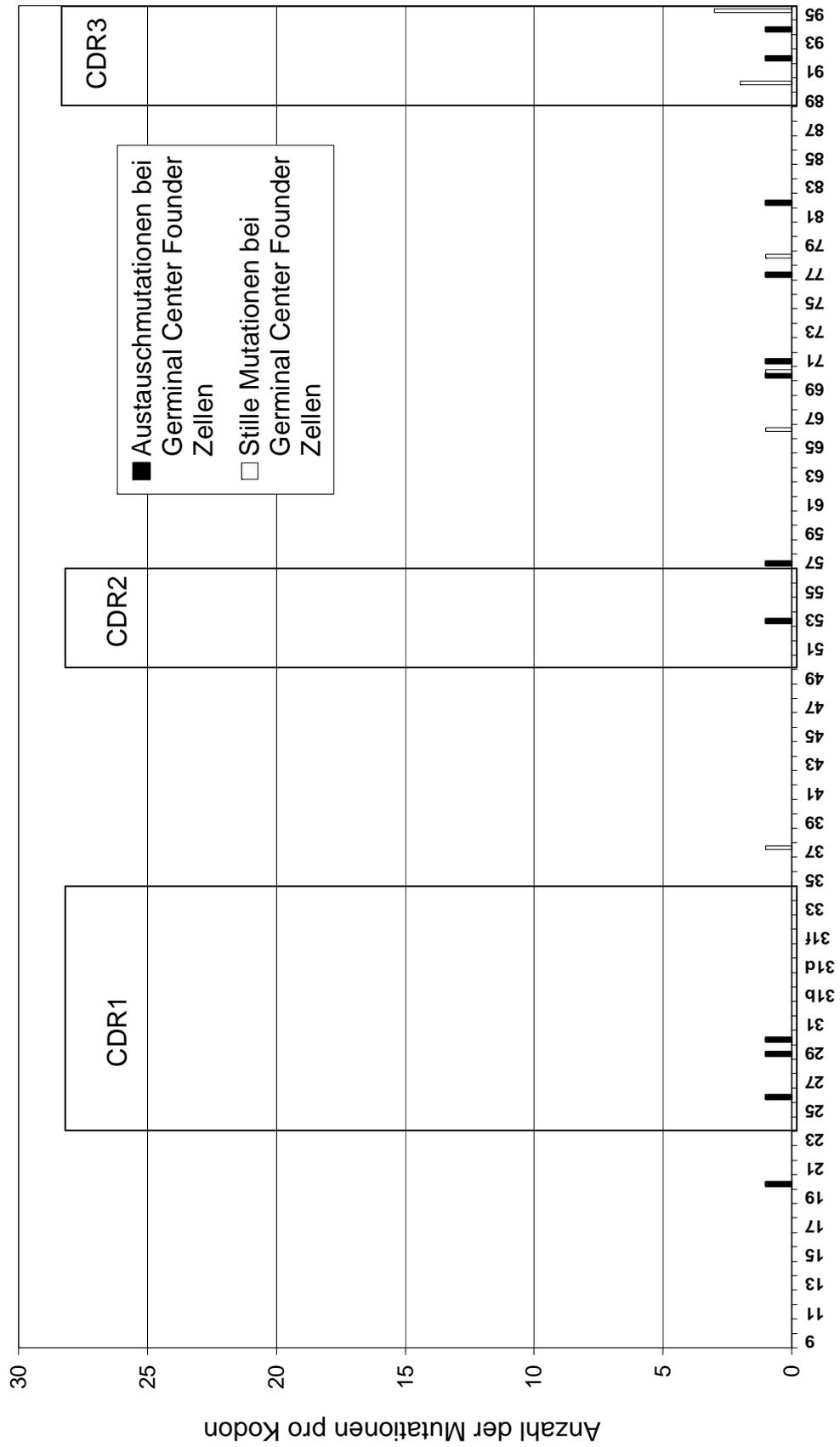
Figur 17a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



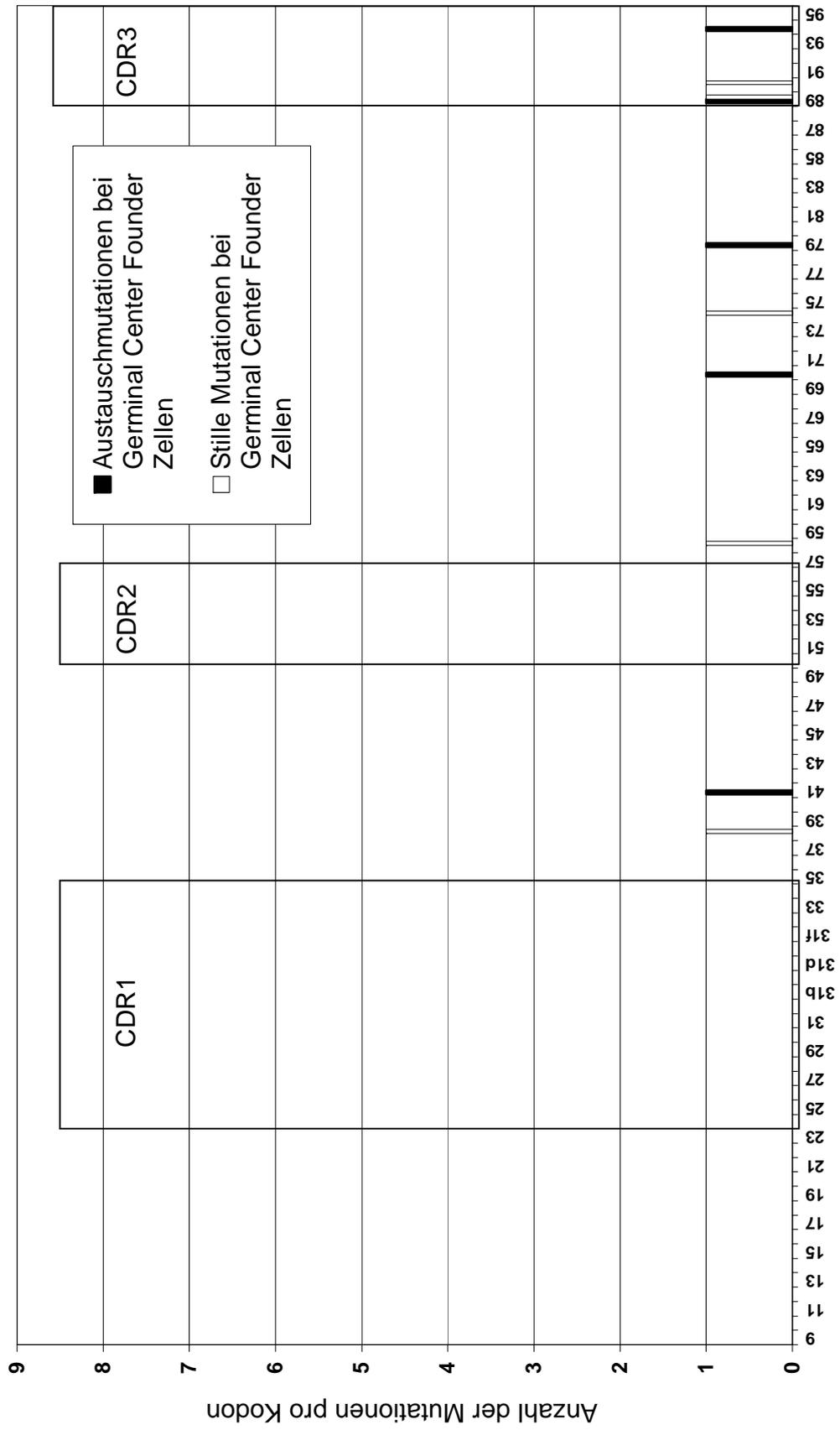
Figur 17b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in nicht-produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen



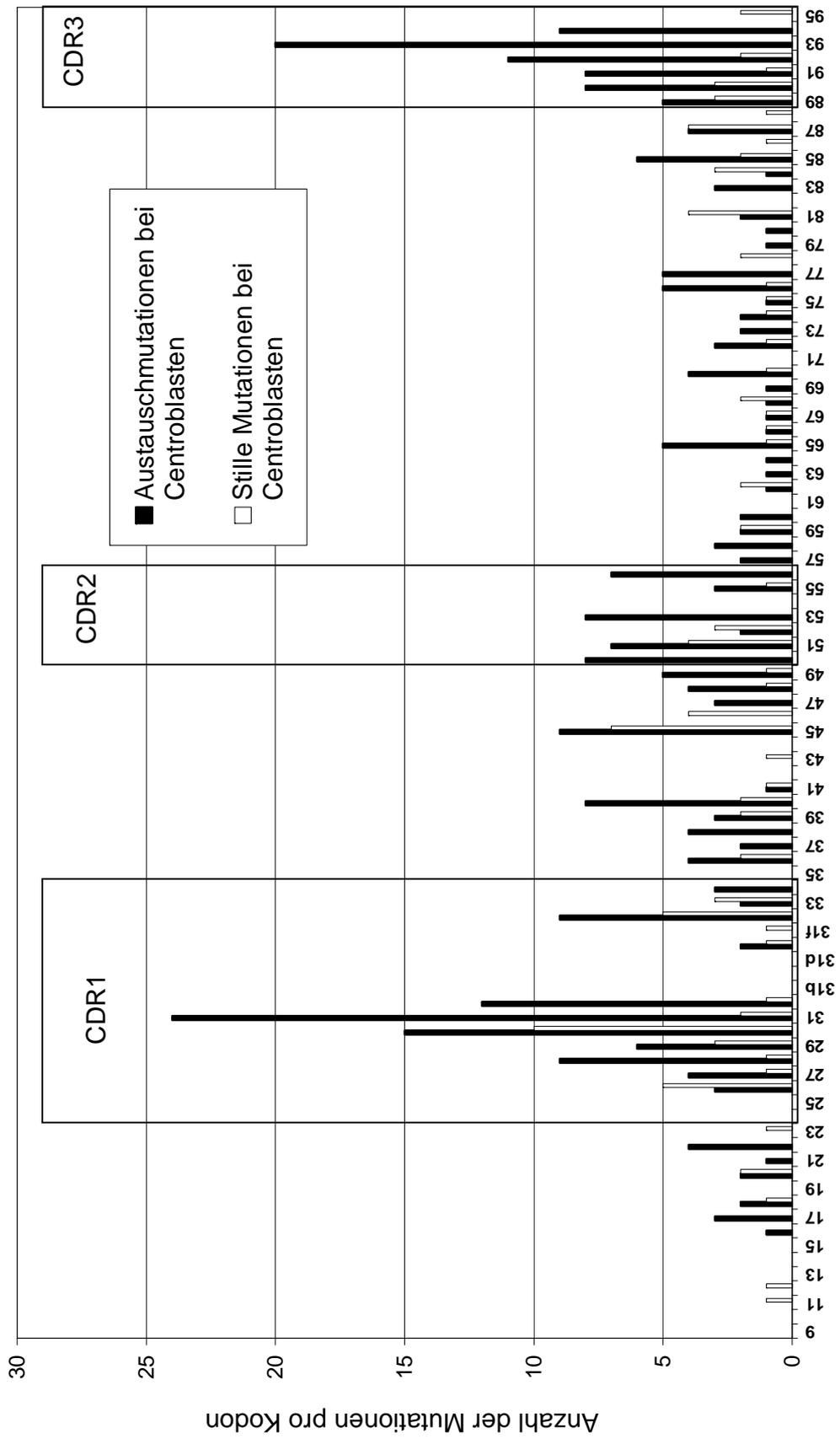
Figur 18a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V κ ppaJkappa Kodons in produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



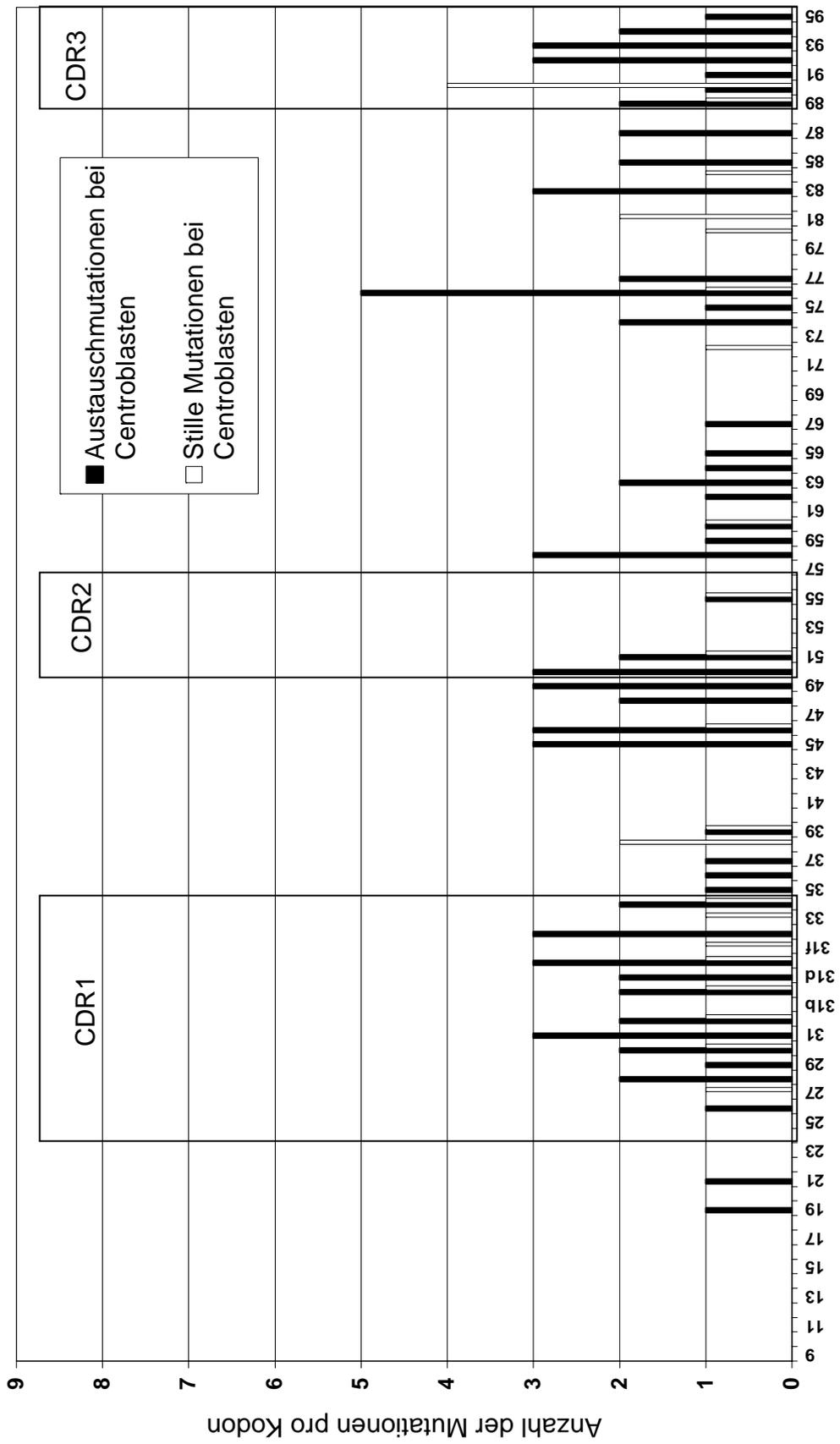
Figur 18b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Germinal Center Founder Zell Sequenzen



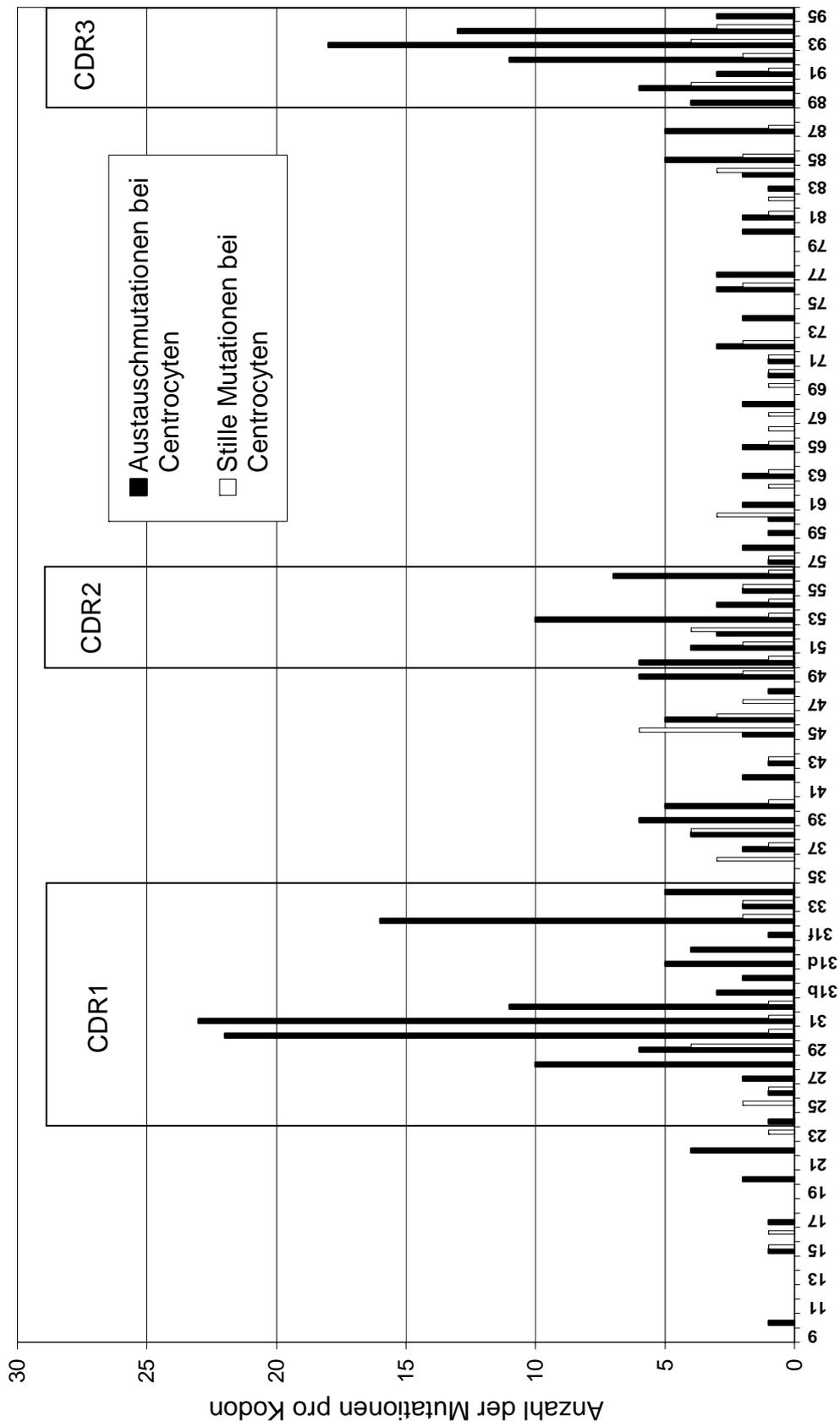
Figur 19a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



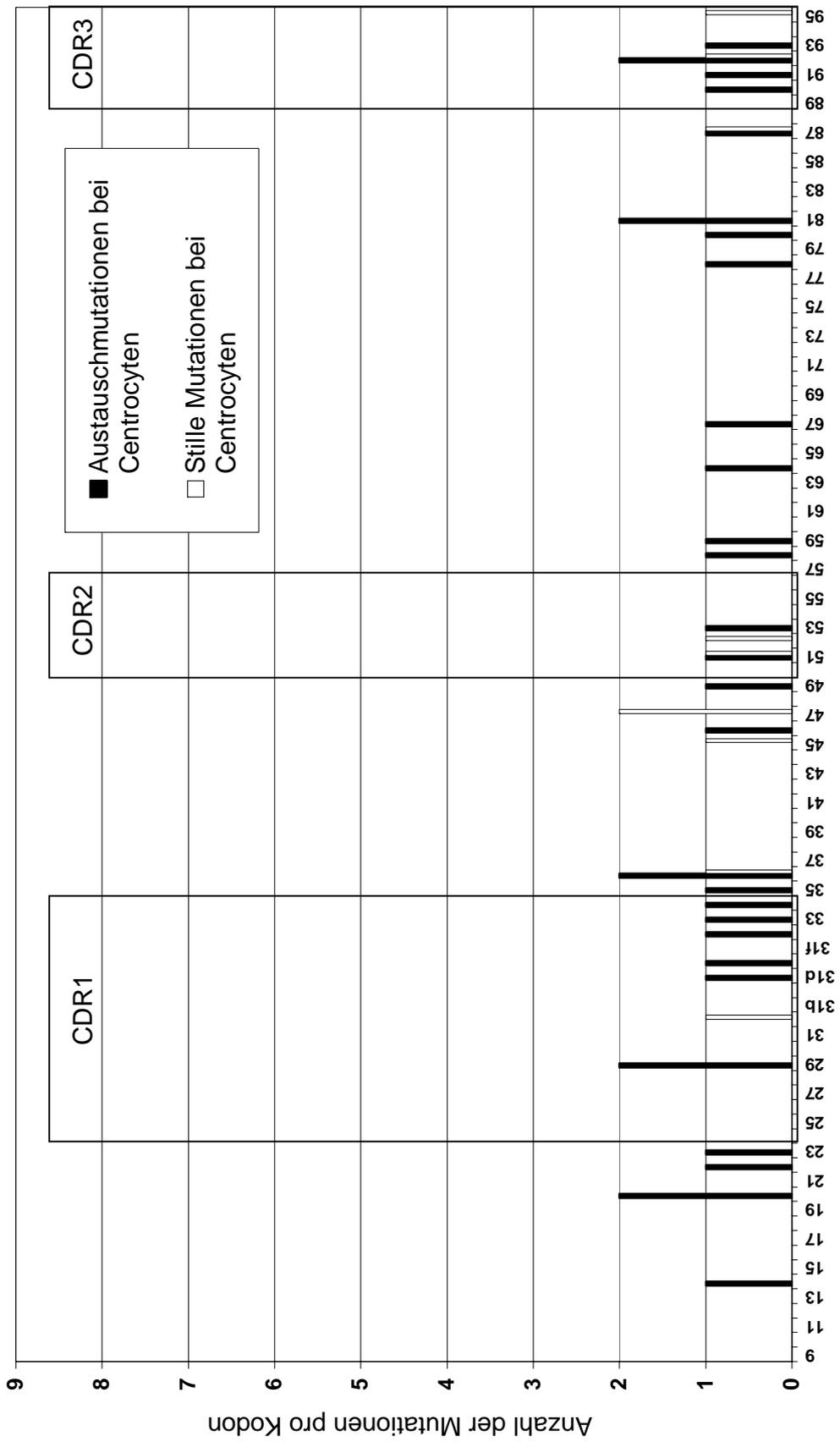
Figur 19b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen κ Jkappa Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen



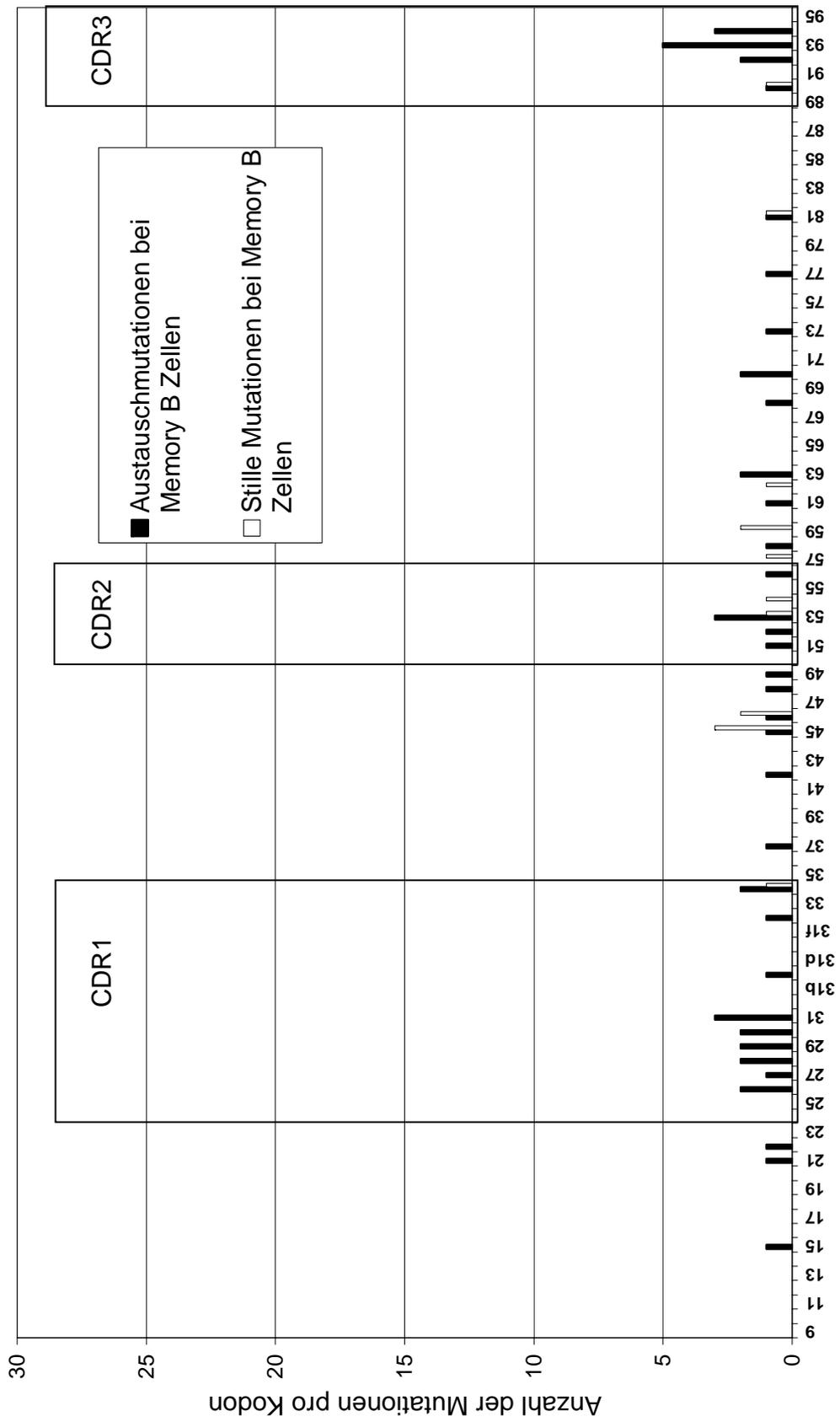
Figur 20a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in produktiv rearrangierten Centrocysten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



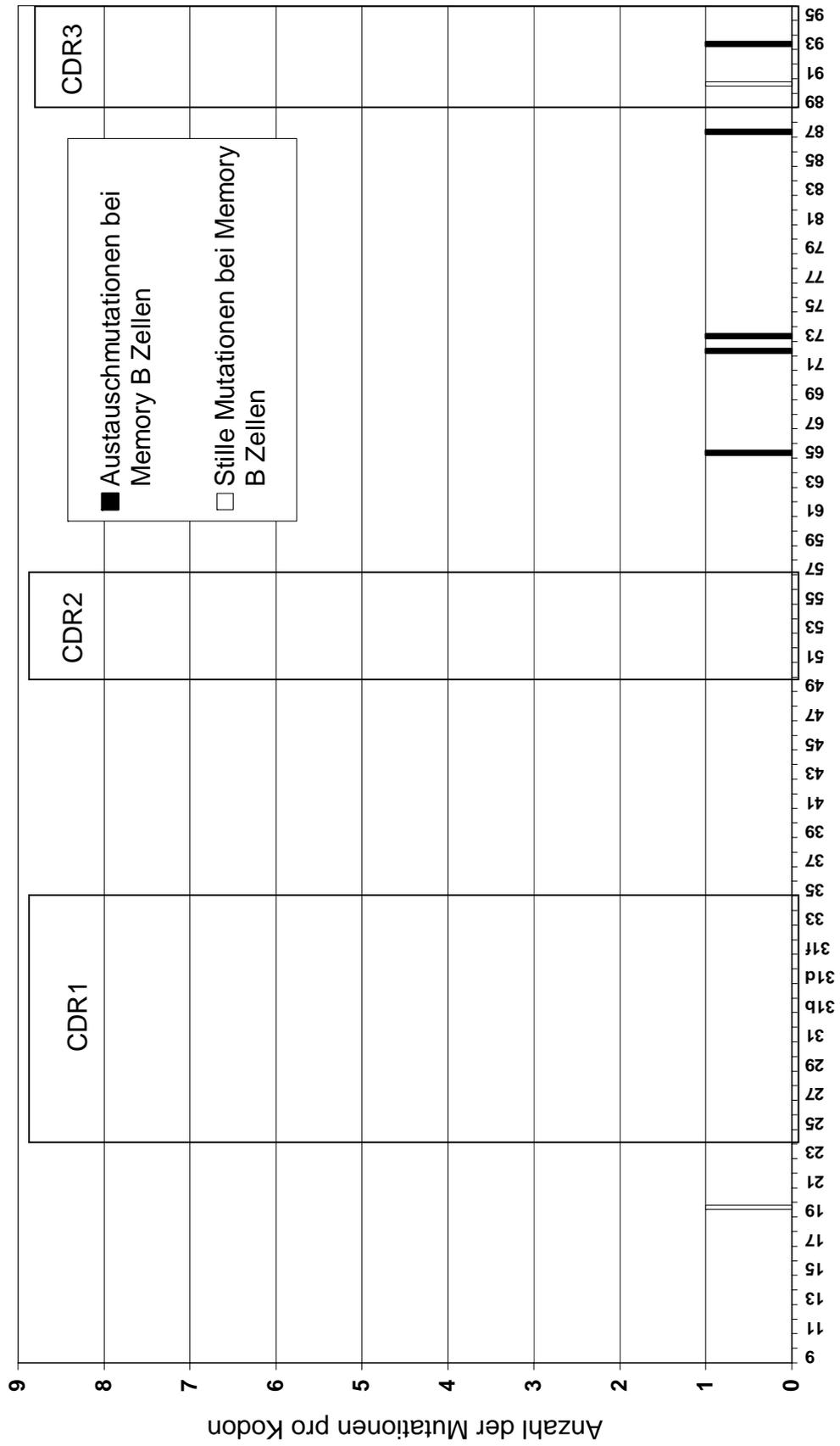
Figur 20b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen



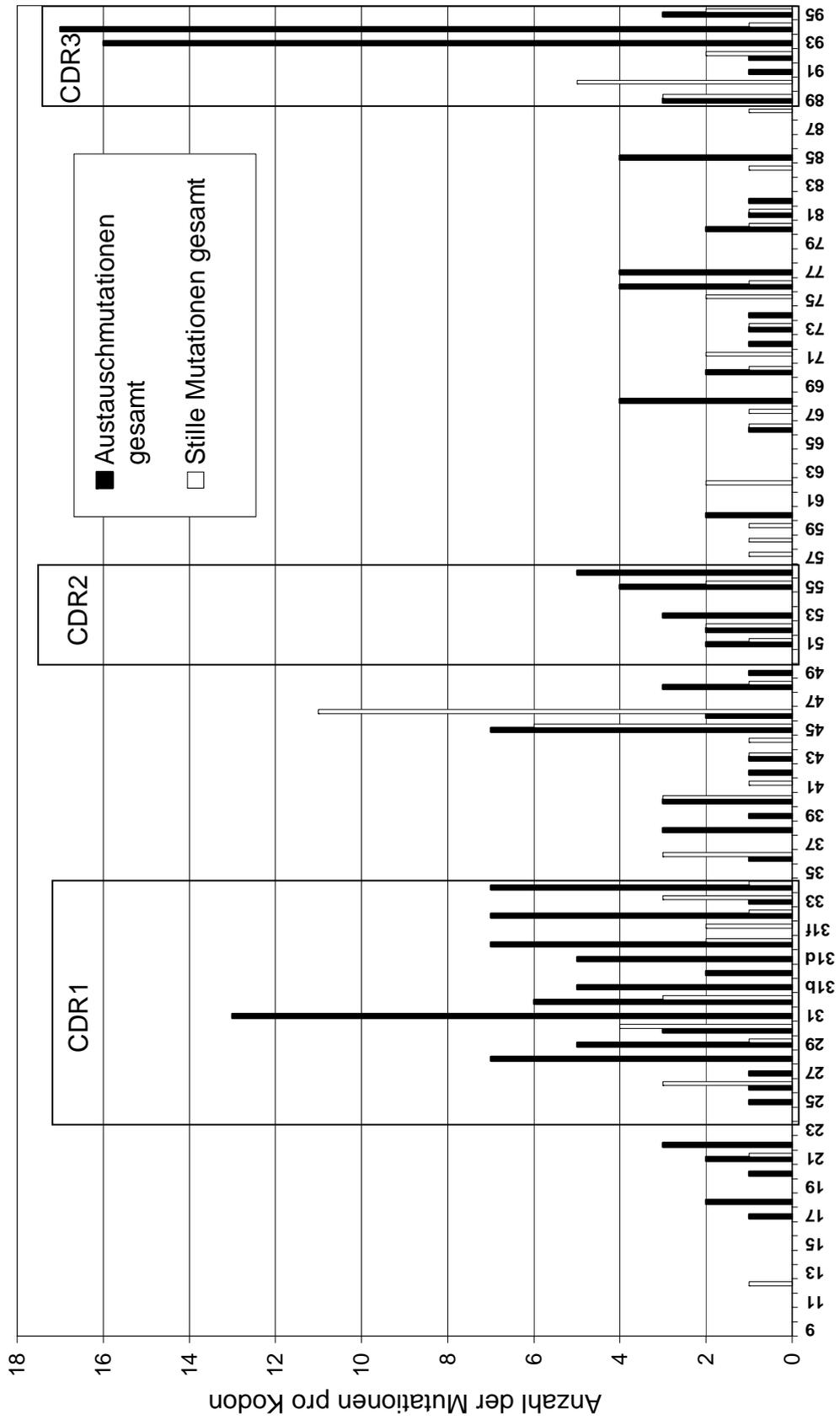
Figur 21a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



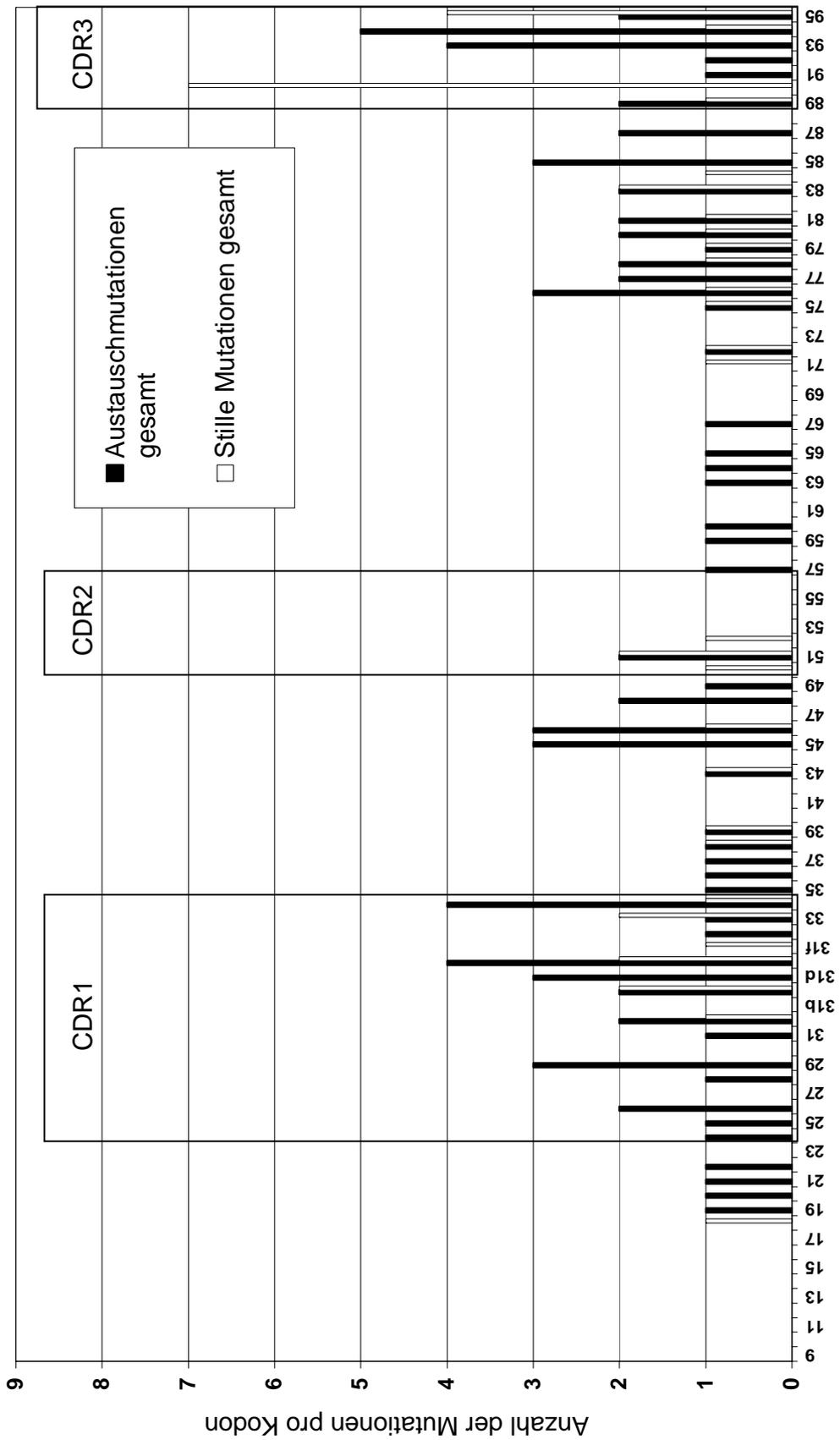
Figur 21b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen κ Jkappa Kodons in nicht-produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen



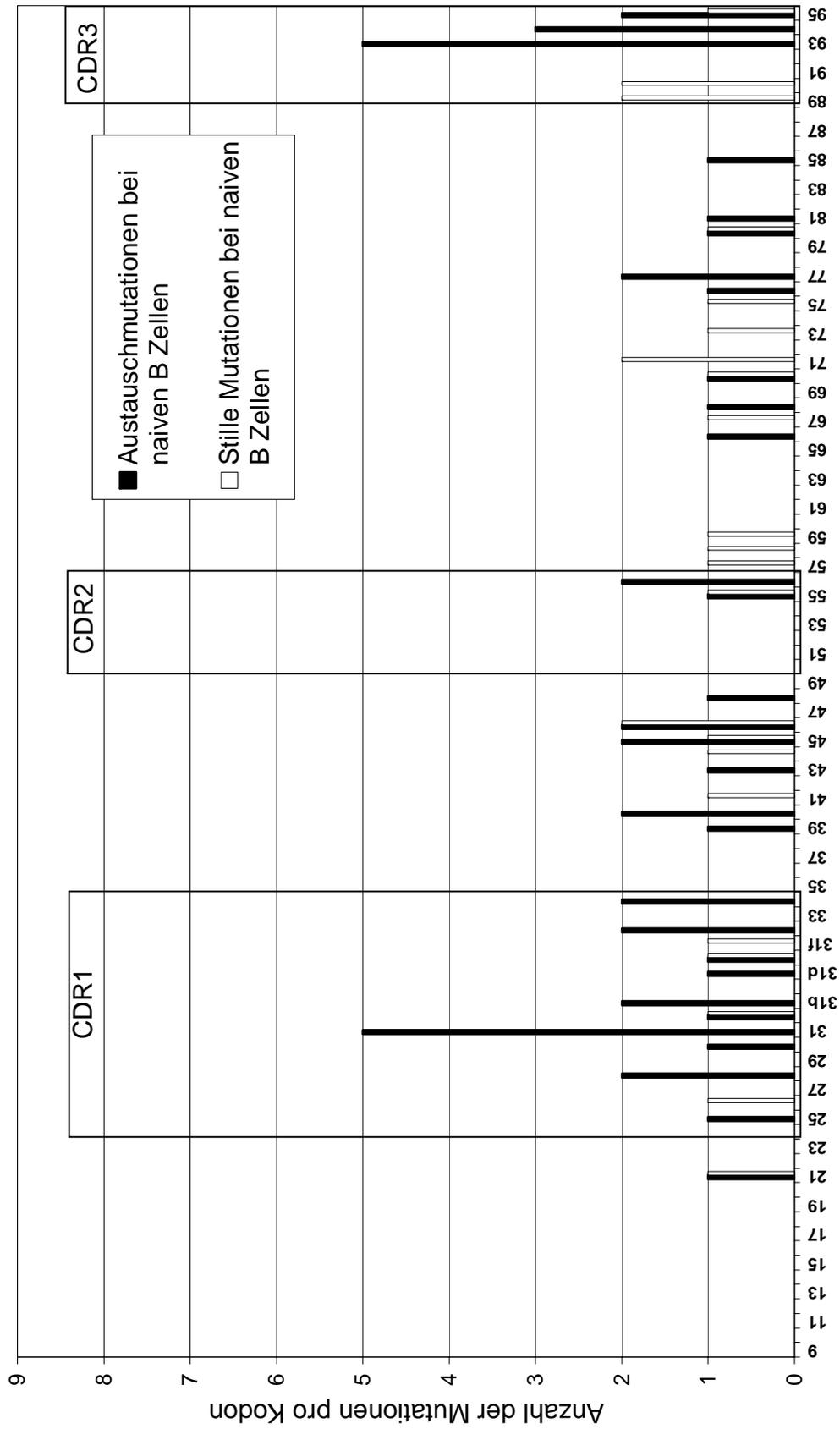
Figur 22a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ und $J\kappa$ Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



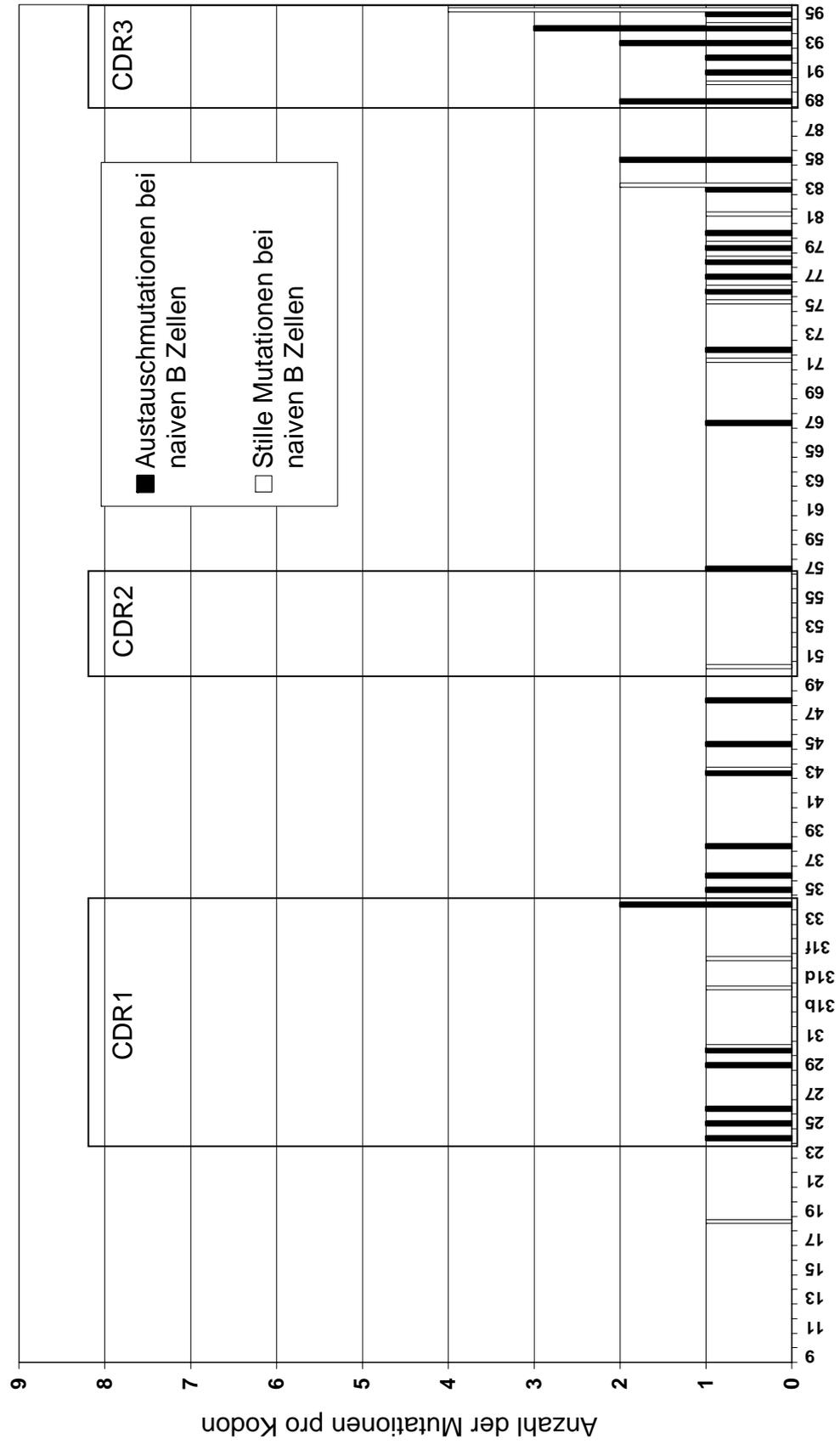
Figur 22b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



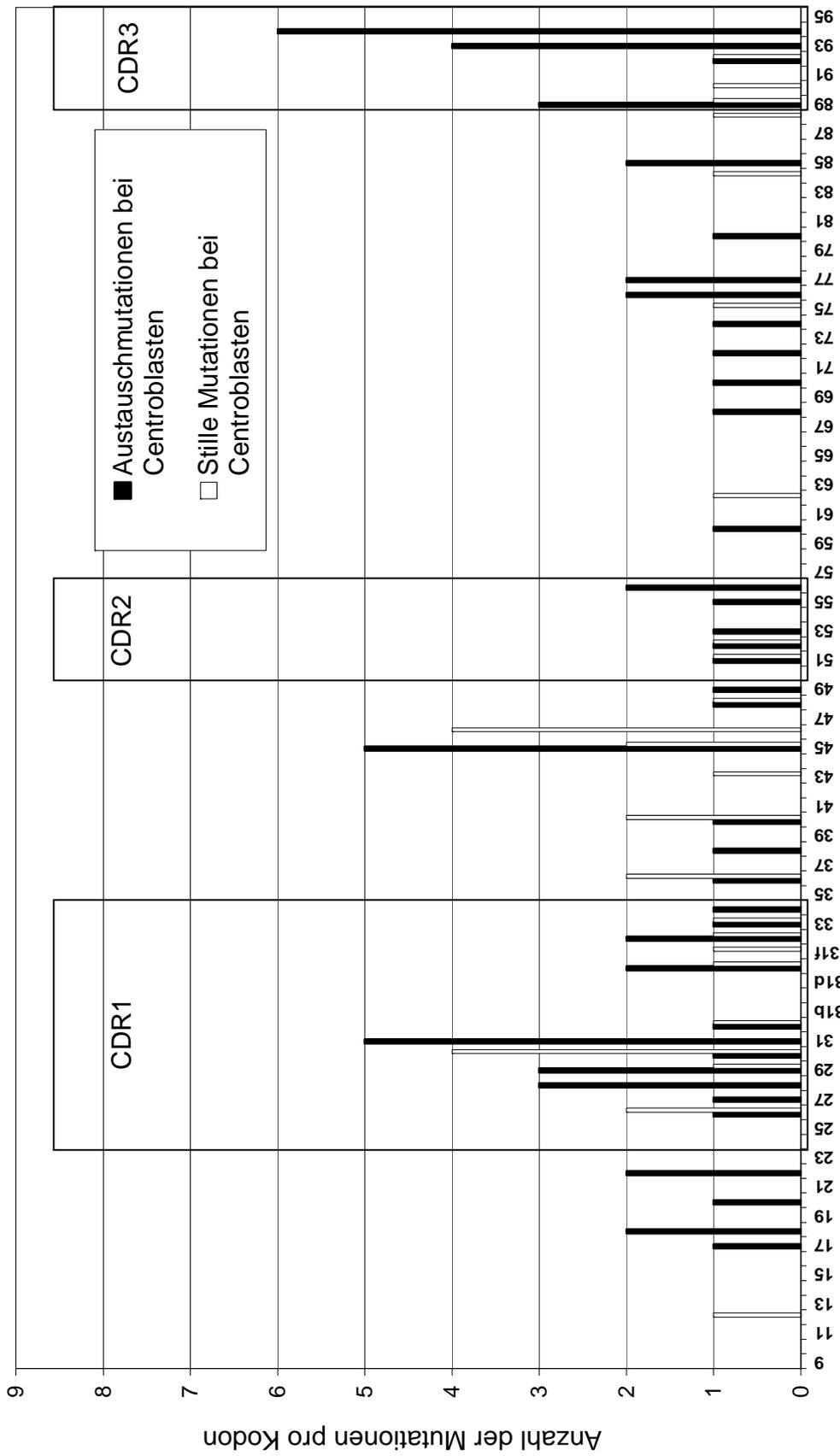
Figur 23a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen



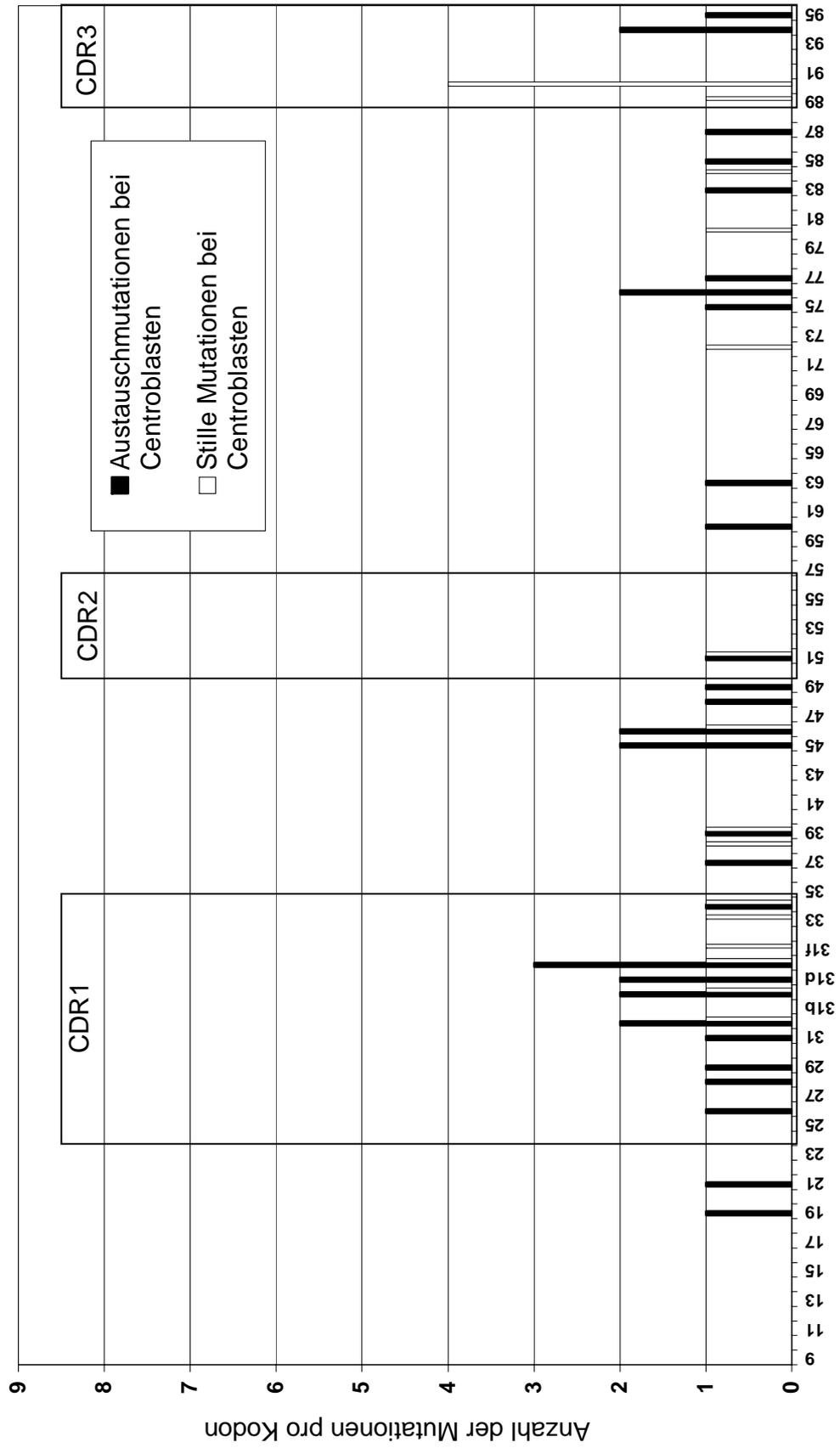
Figur 23b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen



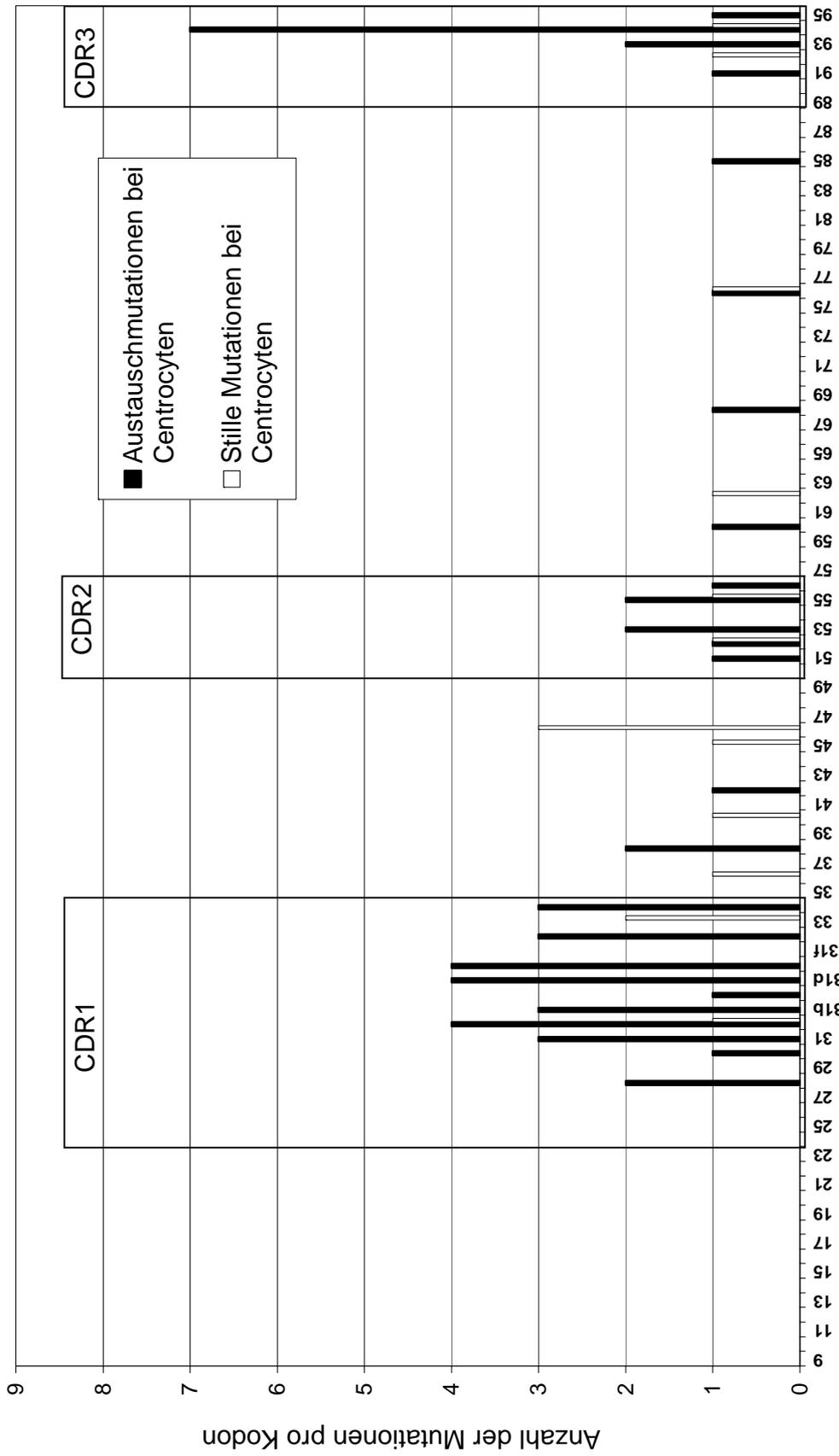
Figur 24a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen



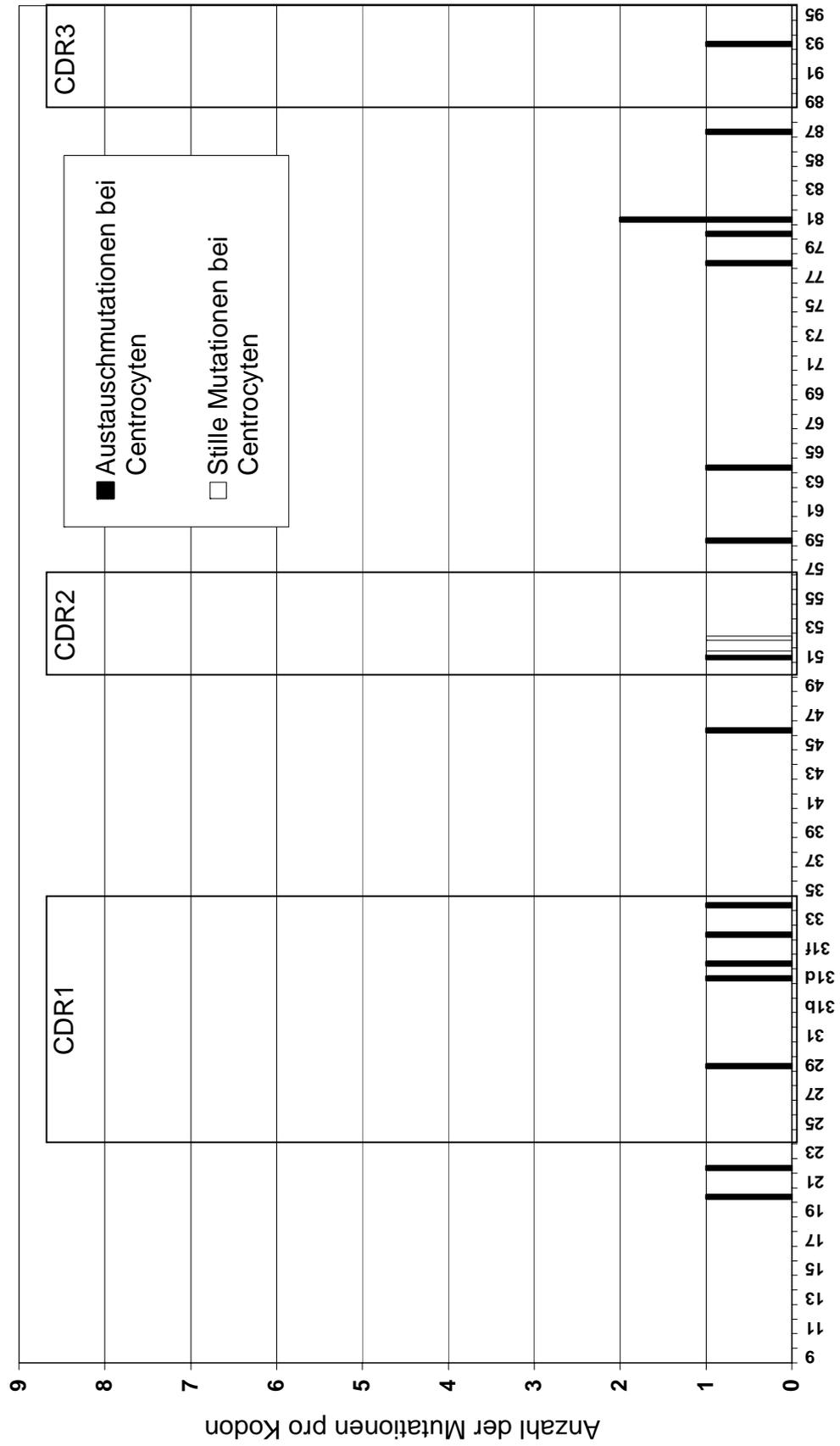
Figur 24b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen



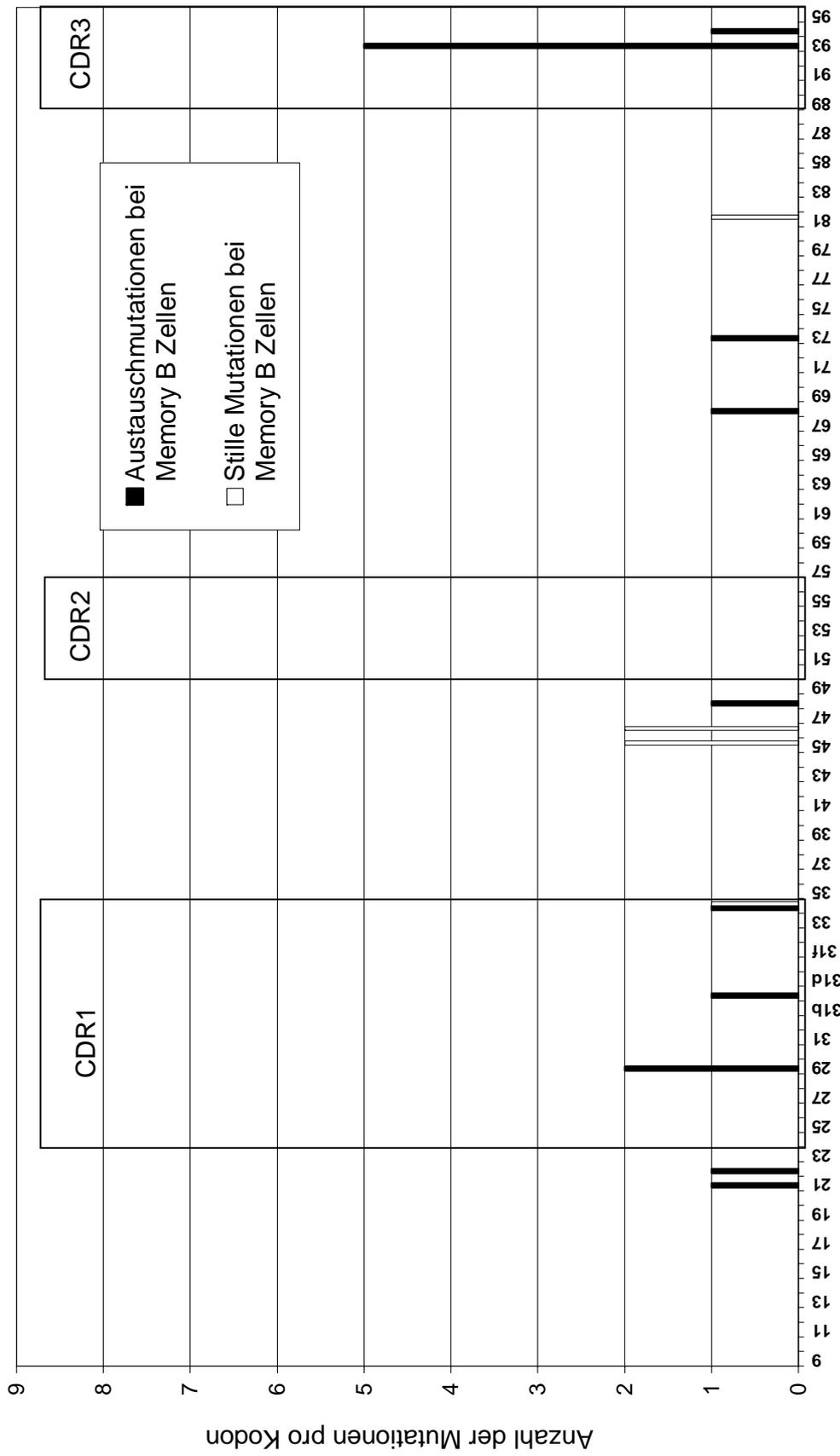
Figur 25a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V κ appa κ appa Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen



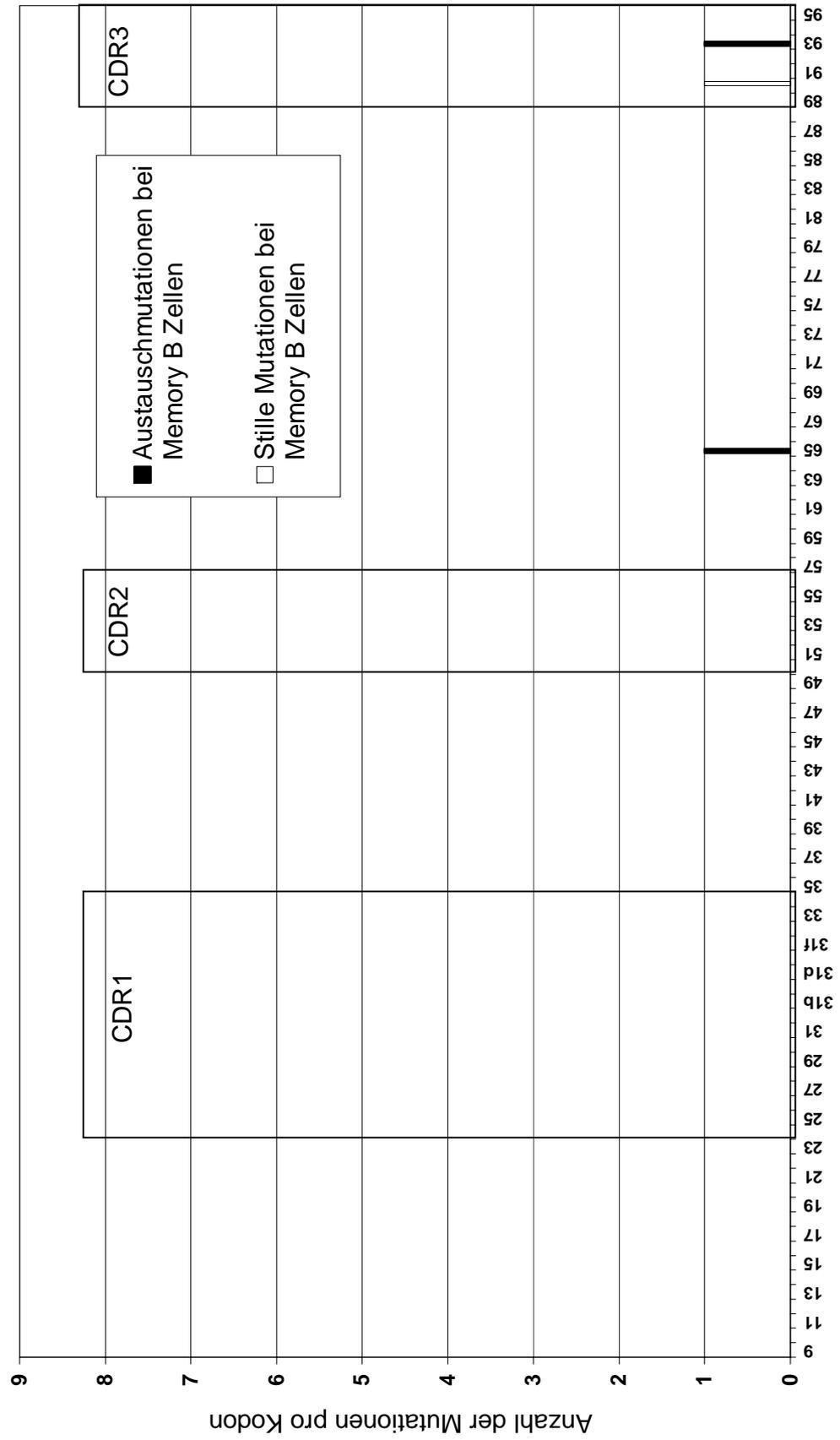
Figur 25b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Centrocyten Sequenzen



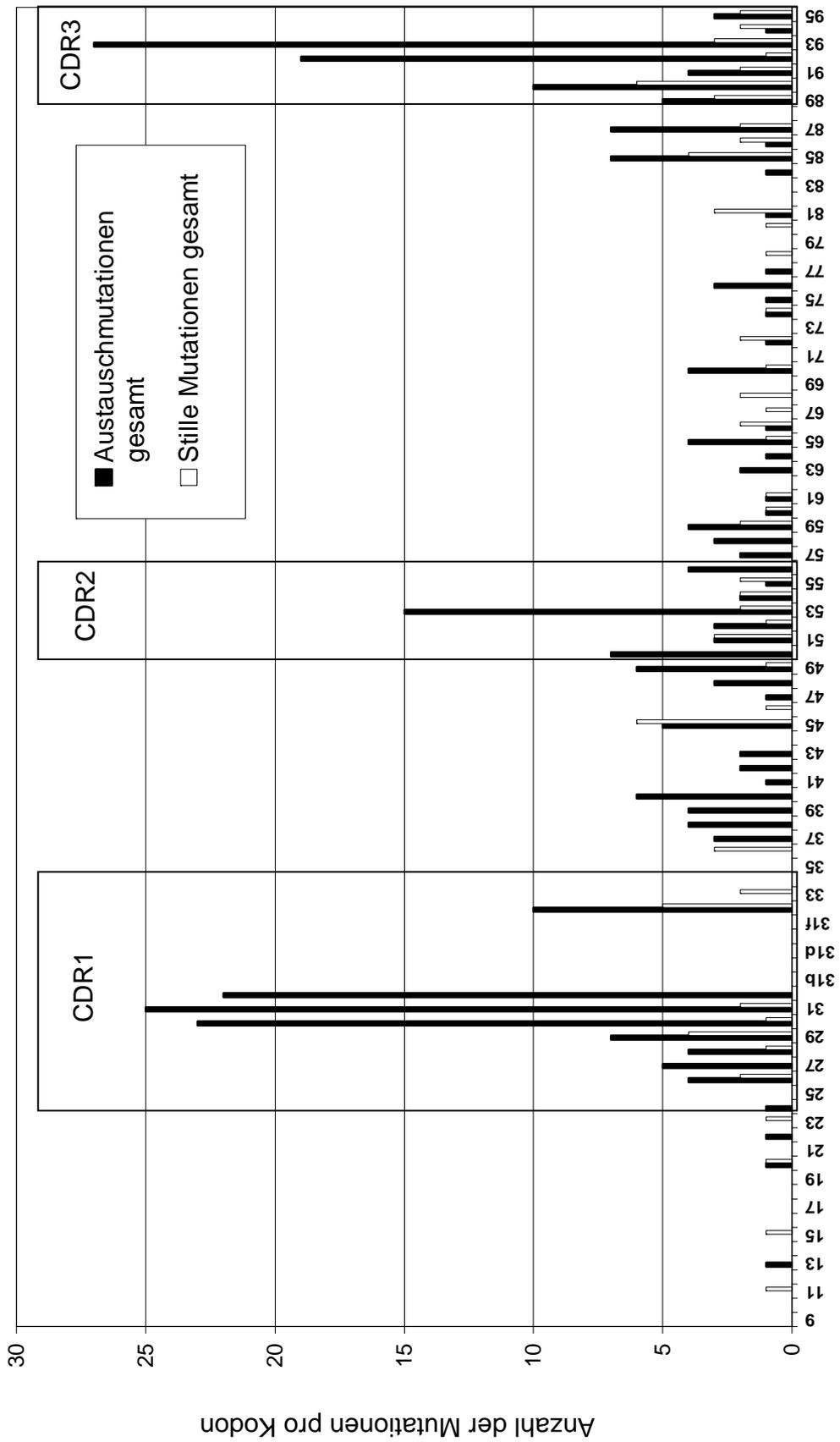
Figur 26a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen κ Jkappa Kodons in mit B2 oder B3 produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen



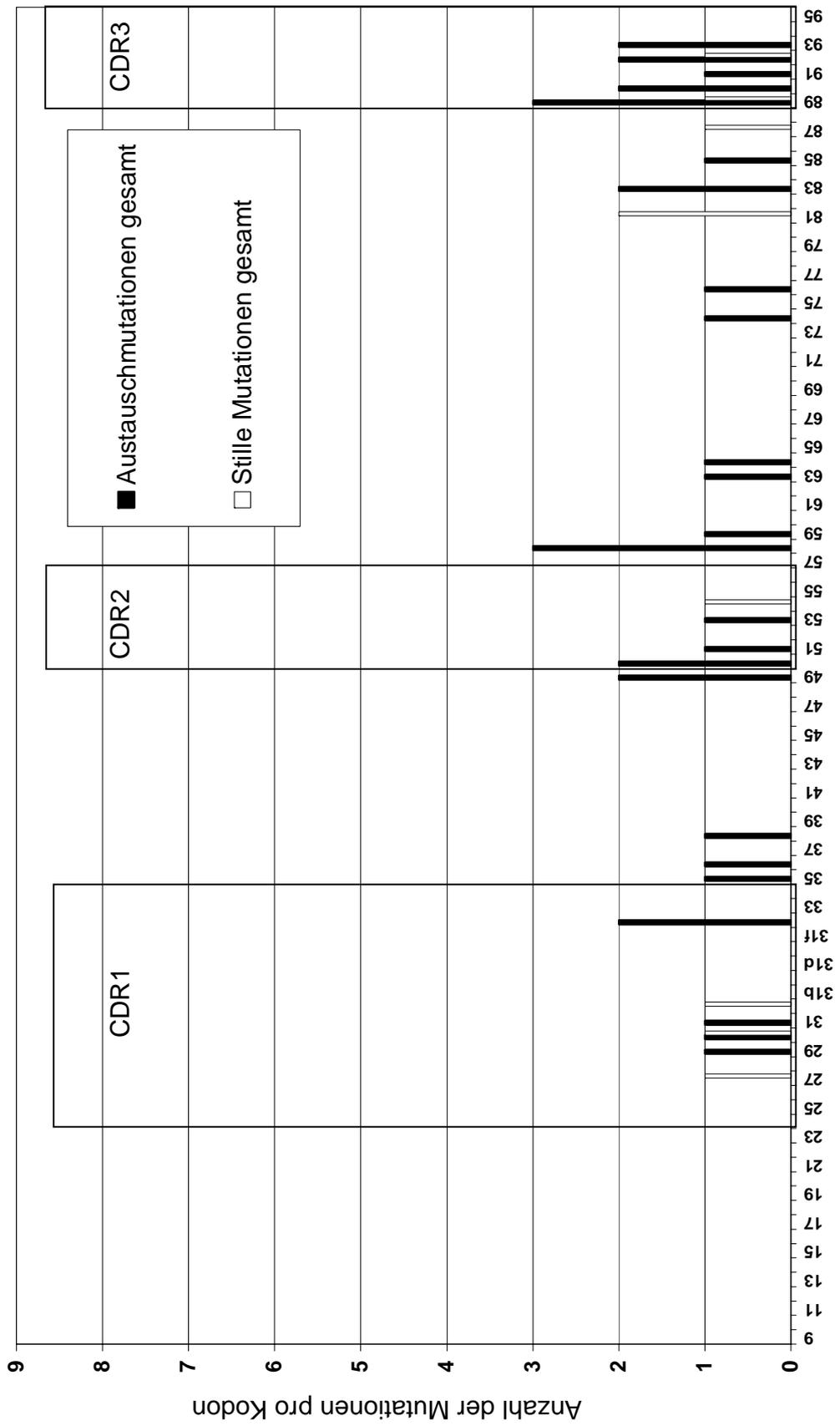
Figur 26b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen κ CDR3 Kodons in mit B2 oder B3 nicht-produktiv rearrangierten Memory B Zell Sequenzen



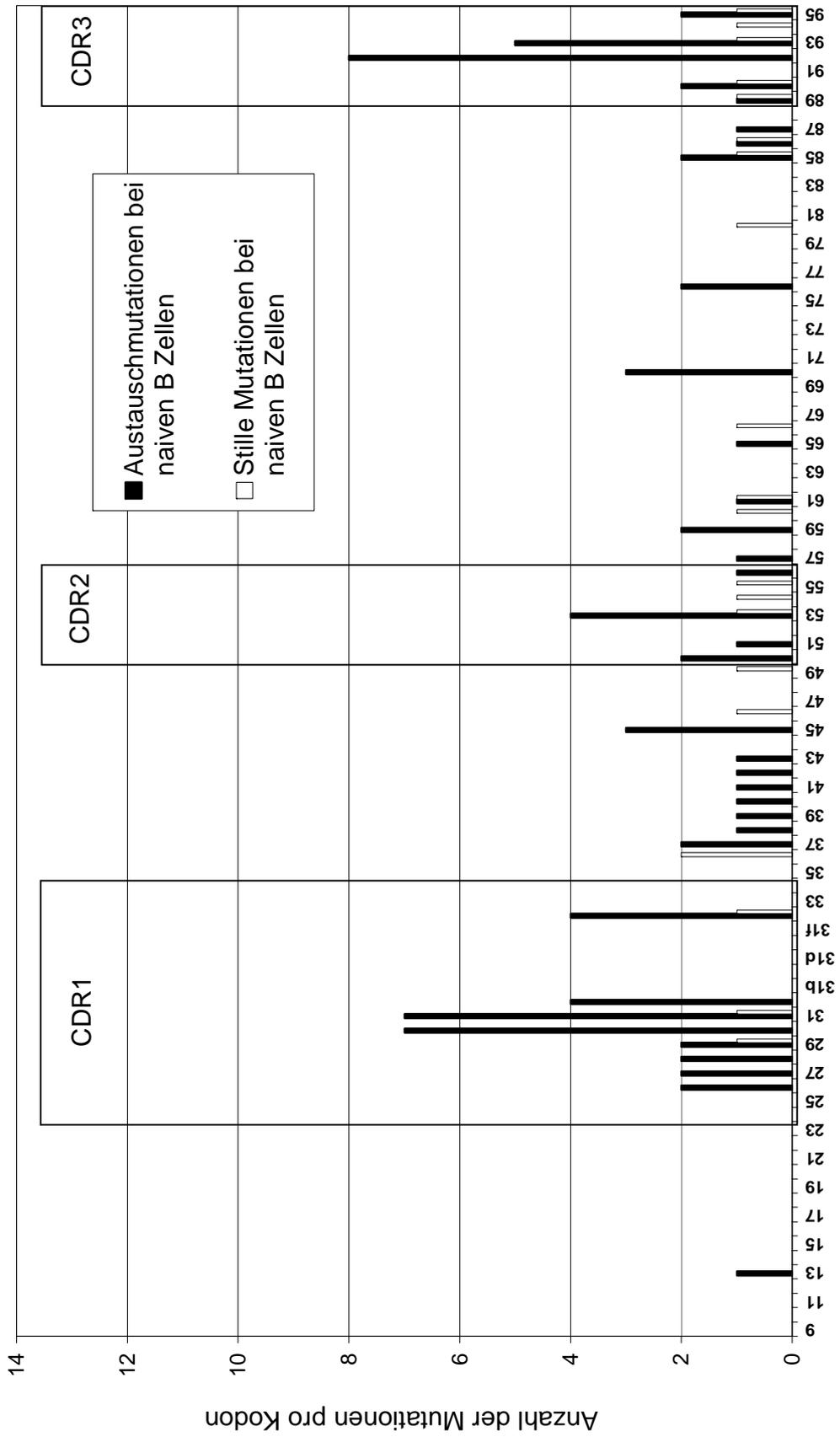
Figur 27a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen κ JkappaKodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



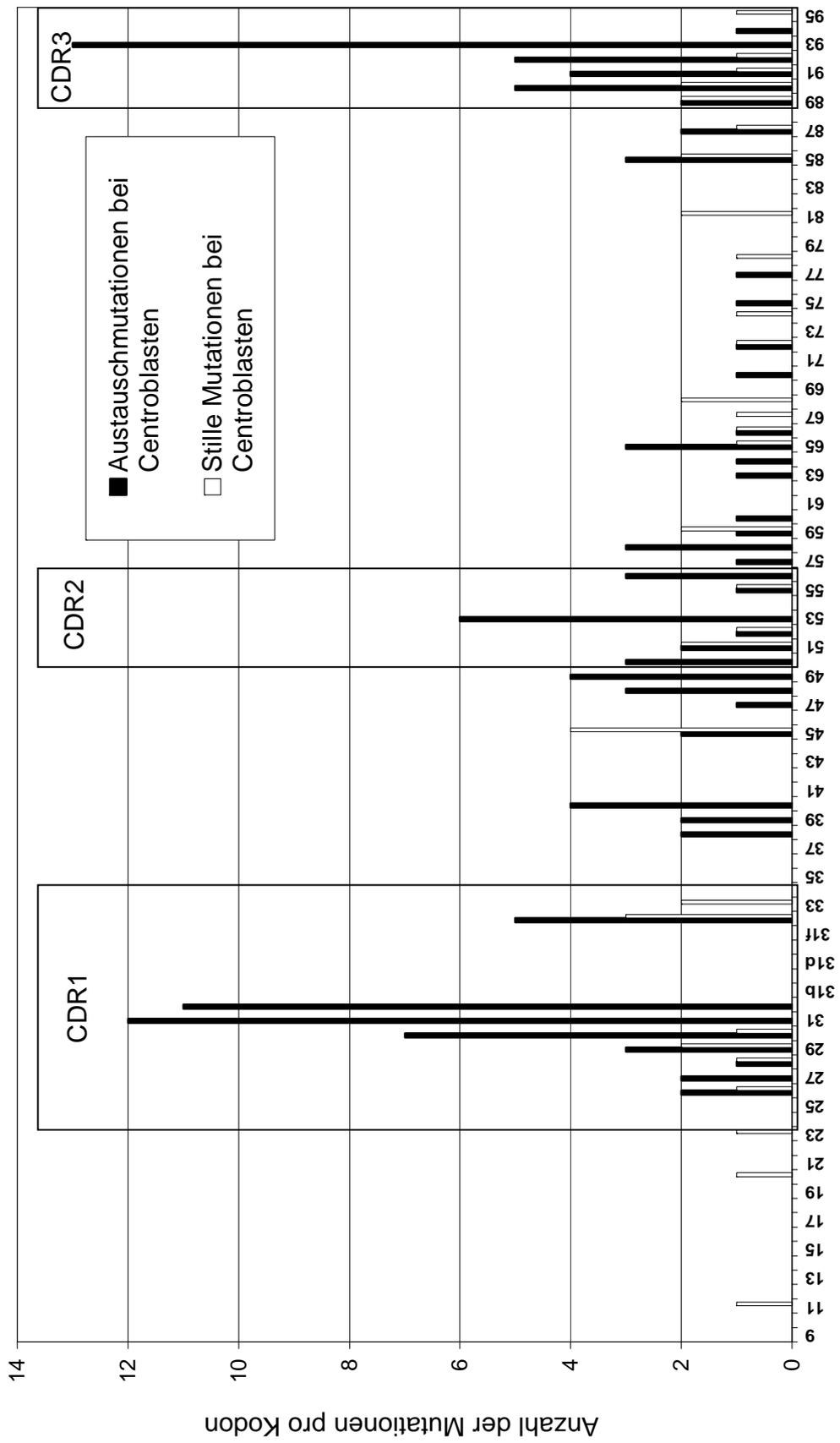
Figur 27b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen aus der kindlichen Tonsille



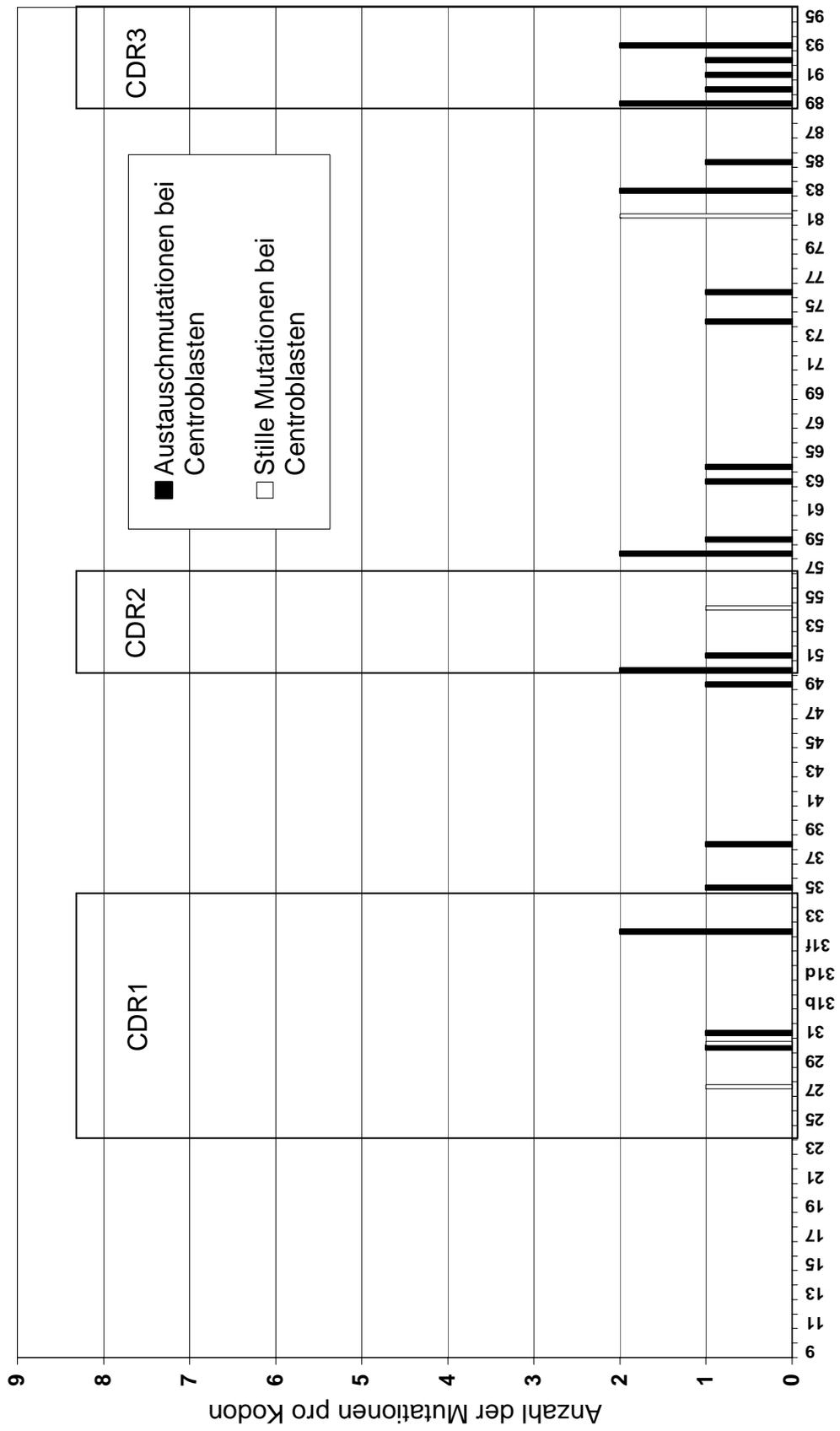
Figur 28: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten naiven B Zell Sequenzen



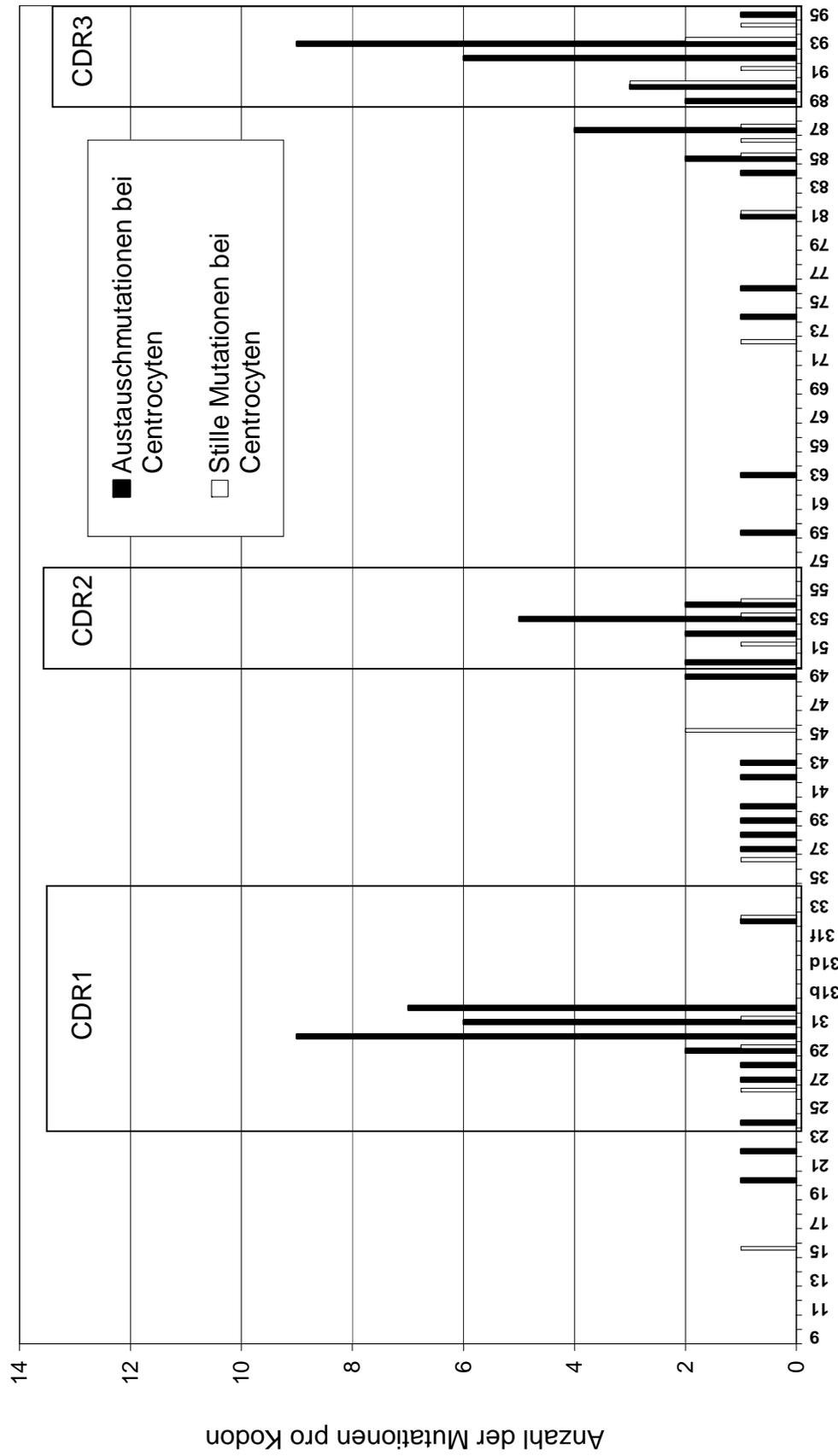
Figur 29a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen



Figur 29b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V_{κ} Jkappa Kodons in mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiv rearrangierten Centroblasten Sequenzen



Figur 30a: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen V κ kap κ Kodons in mit A27, L2 oder L12 produktiv rearrangierten Centrocysten Sequenzen



Figur 30b: Die Verteilung der Mutationen in den einzelnen $V\kappa$ Jkappa Kodons in mit A27, L2 oder L12 nicht-produktiv rearrangierten Centrocysten Sequenzen

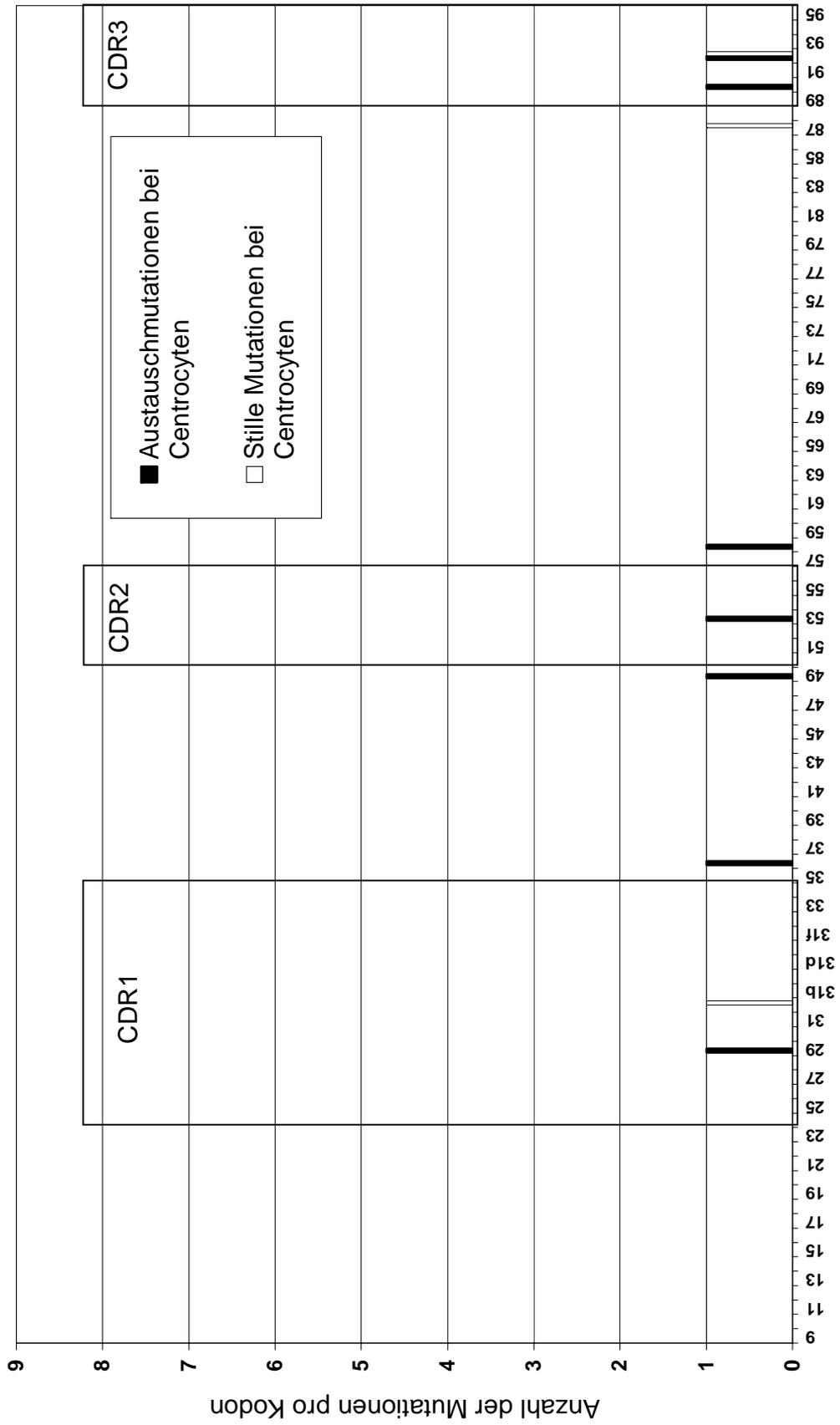
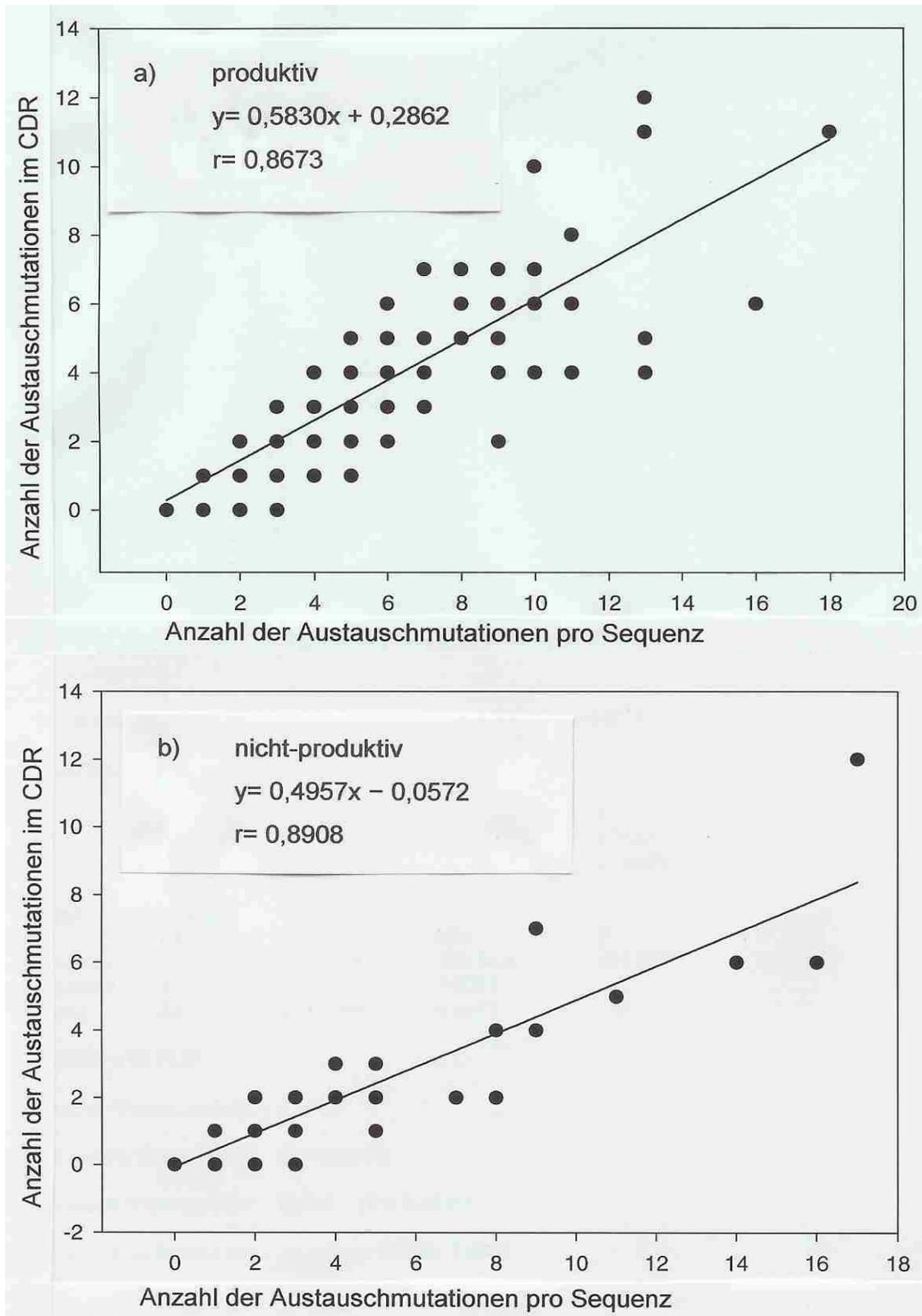


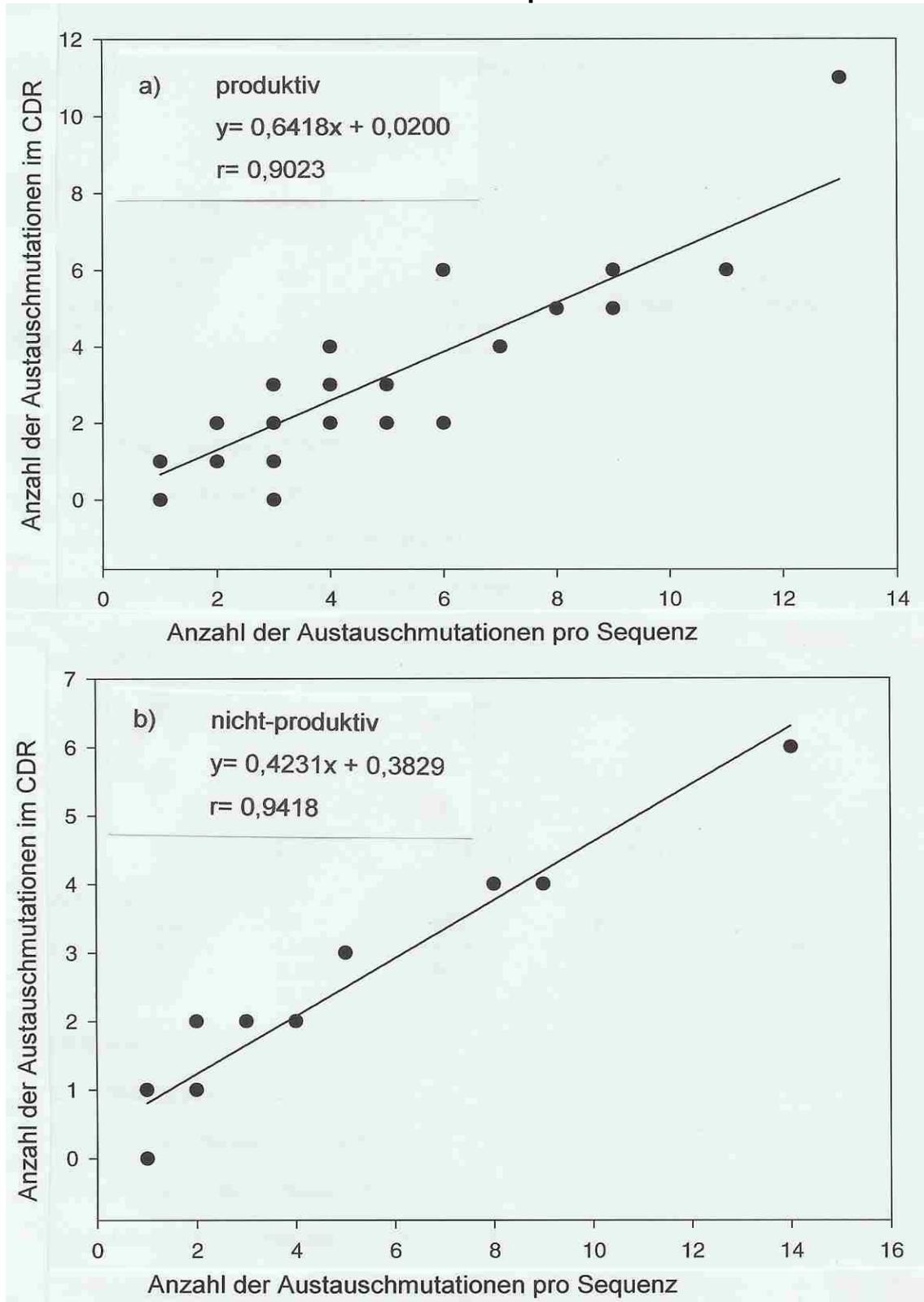
Tabelle 1: RATIO VON AUSTAUSCHMUTATIONEN (R=Replacement) und STILLEN MUTATIONEN (S=Silent)

	TONSILLENPOPULATION gesamt		NAIVE B ZELLEN		GERMINAL CENTER FOUNDER	
	P	NP	P	NP	P	NP
FR1	3,2 (32R/10S)	4,3 (13R/3S)	5,0 (5R/1S)	3,0 (6R/2S)	ND (1R/0S)	ND (0R/0S)
CDR1	4,3 (289R/66S)	3,4 (44R/13S)	3,8 (70R/18S)	3,5 (14R/4S)	ND (3R/0S)	ND (0R/0S)
FR2	1,8 (120R/67S)	2,2 (28R/13S)	2,5 (37R/15S)	1,8 (7R/4S)	0 (0R/1S)	1,0 (1R/1S)
CDR2	3,3 (107R/32S)	2,0 (12R/6S)	3,2 (29R/9S)	2,0 (4R/2S)	ND (1R/0S)	ND (0R/0S)
FR3	1,6 (159R/99S)	2,9 (61R/21S)	1,1 (42R/38S)	1,6 (18R/11S)	1,7 (5R/3S)	1,0 (2R/2S)
CDR3	4,3 (190R/44S)	# 2,4 (41R/17S)	3,9 (55R/14S)	2,9 (20R/7S)	0,4 (2R/5S)	1,0 (2R/2S)
CDR	4,1 (586R/142S)	# 2,7 (97R/36S)	3,8 (154R/41S)	2,9 (38R/13S)	1,2 (6R/5S)	1,0 (2R/2S)
FR	1,8 (311R/176S)	# 2,8 (102R/37S)	1,5 (84R/54S)	1,8 (31R/17S)	1,5 (6R/4S)	1,0 (3R/3S)
total	2,8 (897R/318S)	2,7 (199R/73S)	2,5 (238R/95S)	2,3 (69R/30S)	1,3 (12R/9S)	1,0 (5R/5S)
	CENTROBLASTEN		CENTROCYTEN		MEMORY B ZELLEN	
	P	NP	P	NP	P	NP
FR1	2,2 (13R/6S)	ND (2R/0S)	3,0 (9R/3S)	ND (5R/0S)	ND (4R/0S)	# 0 (0R/1S)
CDR1	2,7 (89R/33S)	2,9 (23R/8S)	8,0 (112R/14S)	7,0 (7R/1S)	15 (15R/1S)	ND (0R/0S)
FR2	1,9 (43R/23S)	3,8 (15R/4S)	1,5 (34R/23S)	1,3 (5R/4S)	1,2 (6R/5S)	ND (0R/0S)
CDR2	4,4 (35R/8S)	3,0 (6R/2S)	2,8 (36R/13S)	1,0 (2R/2S)	3,0 (6R/2S)	ND (0R/0S)
FR3	2,1 (60R/29S)	4,0 (28R/7S)	1,8 (42R/24S)	9,0 (9R/1S)	2,0 (10R/5S)	ND (4R/0S)
CDR3	5,6 (62R/11S)	2,6 (13R/5S)	4,3 (60R/13S)	2,5 (5R/2S)	11 (11R/1S)	1,0 (1R/1S)
CDR	3,6 (186R/52S)	2,8 (42R/15S)	5,2 (208R/40S)	2,8 (14R/5S)	8,0 (32R/4S)	1,0 (1R/1S)
FR	2,0 (116R/58S)	4,1 (45R/11S)	1,7 (85R/50S)	3,8 (19R/5S)	2,0 (20R/10S)	4,0 (4R/1S)
total	2,8 (302R/110S)	3,4 (87R/26S)	3,3 (293R/90S)	3,3 (33R/10S)	3,7 (52R/14S)	2,5 (5R/2S)

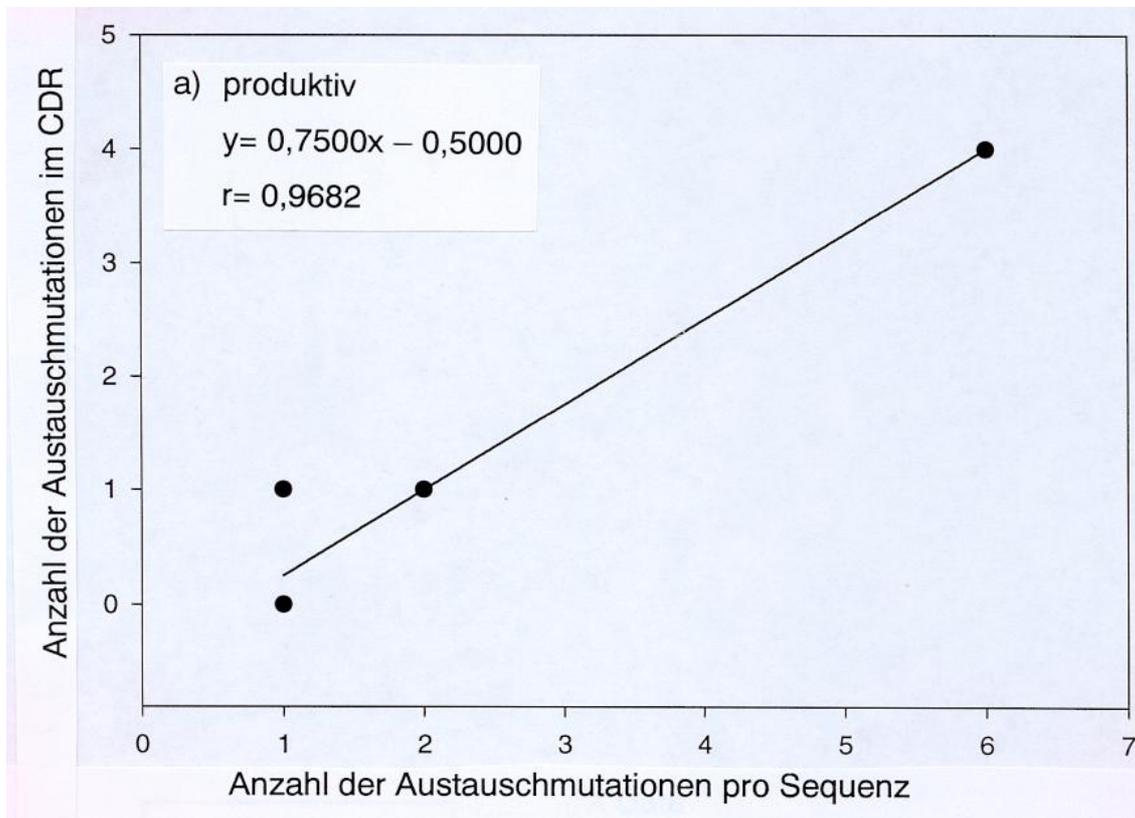
Figur 31 a+b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen Sequenzen (gesamt)



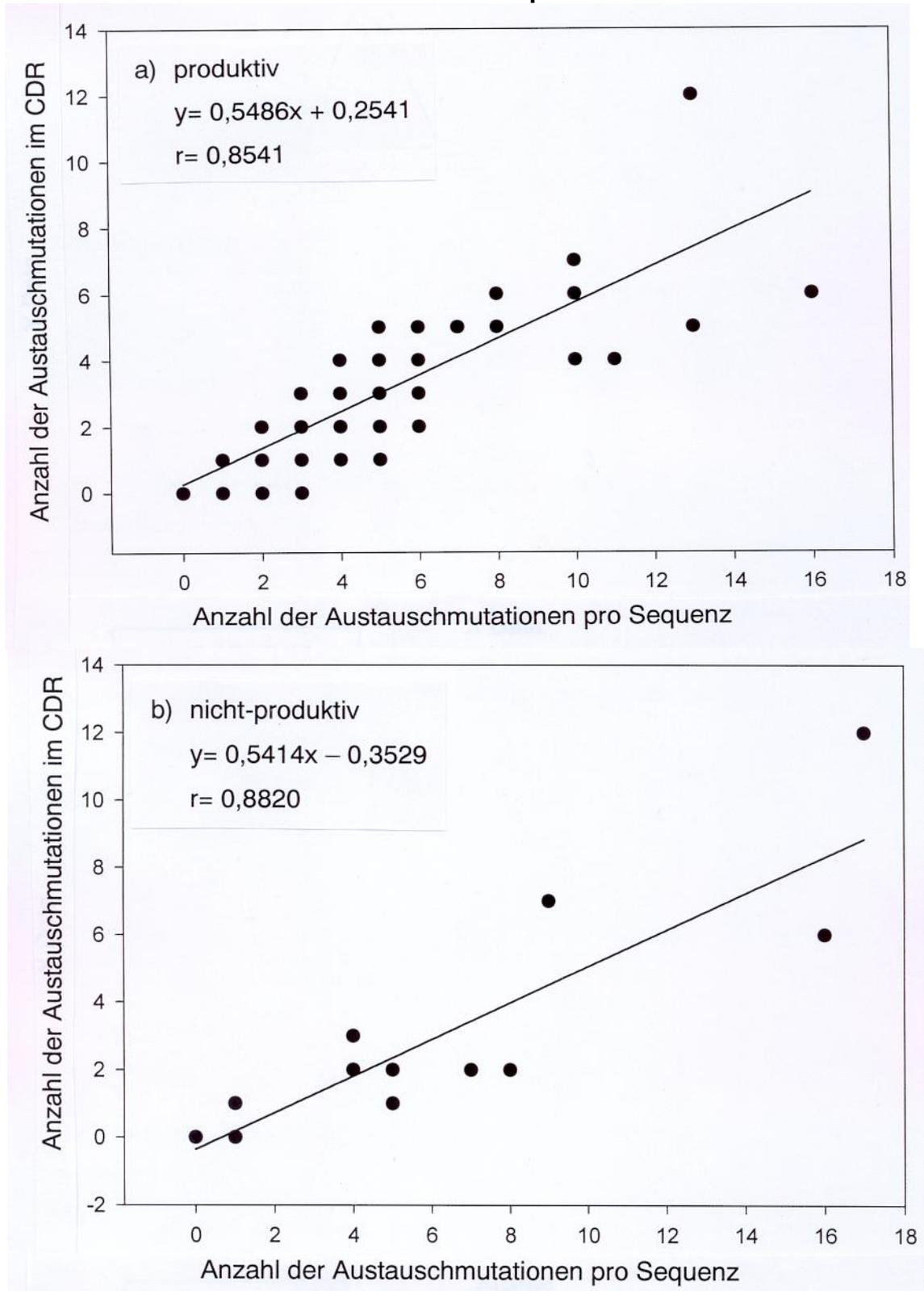
Figur 32 a+b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen naiven B Zell Sequenzen



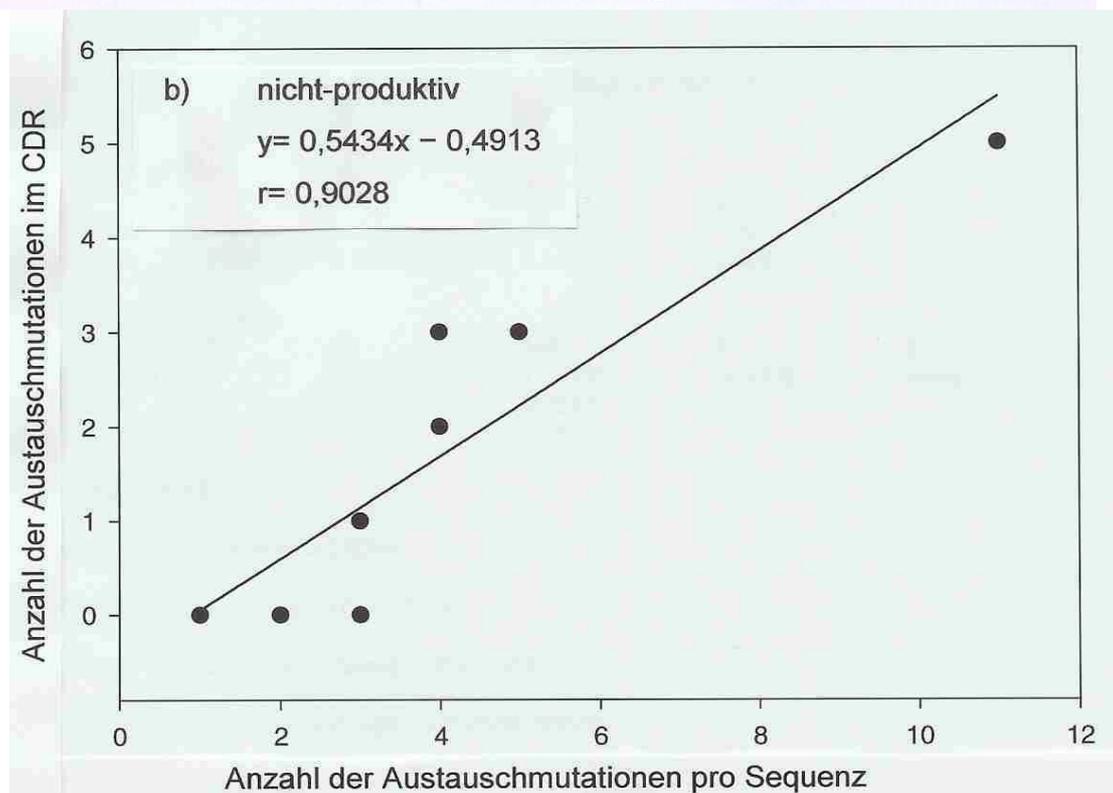
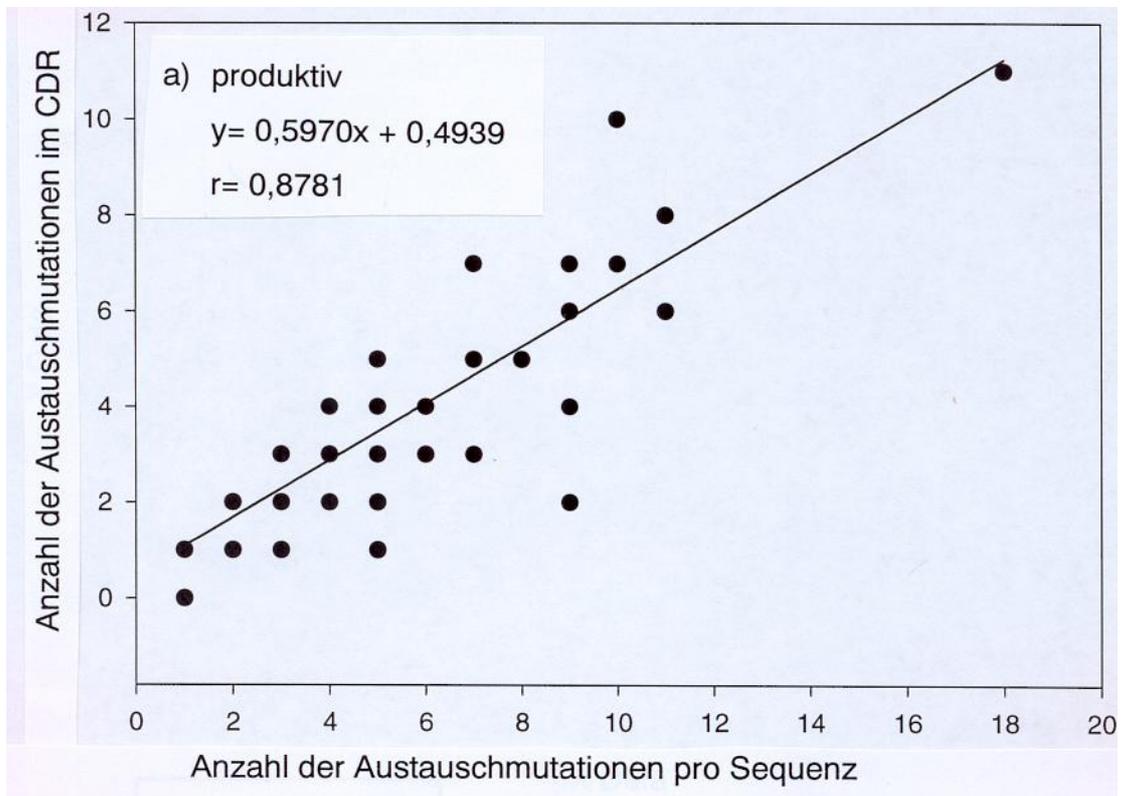
Figur 33: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen Germinal Center Founder Zell Sequenzen



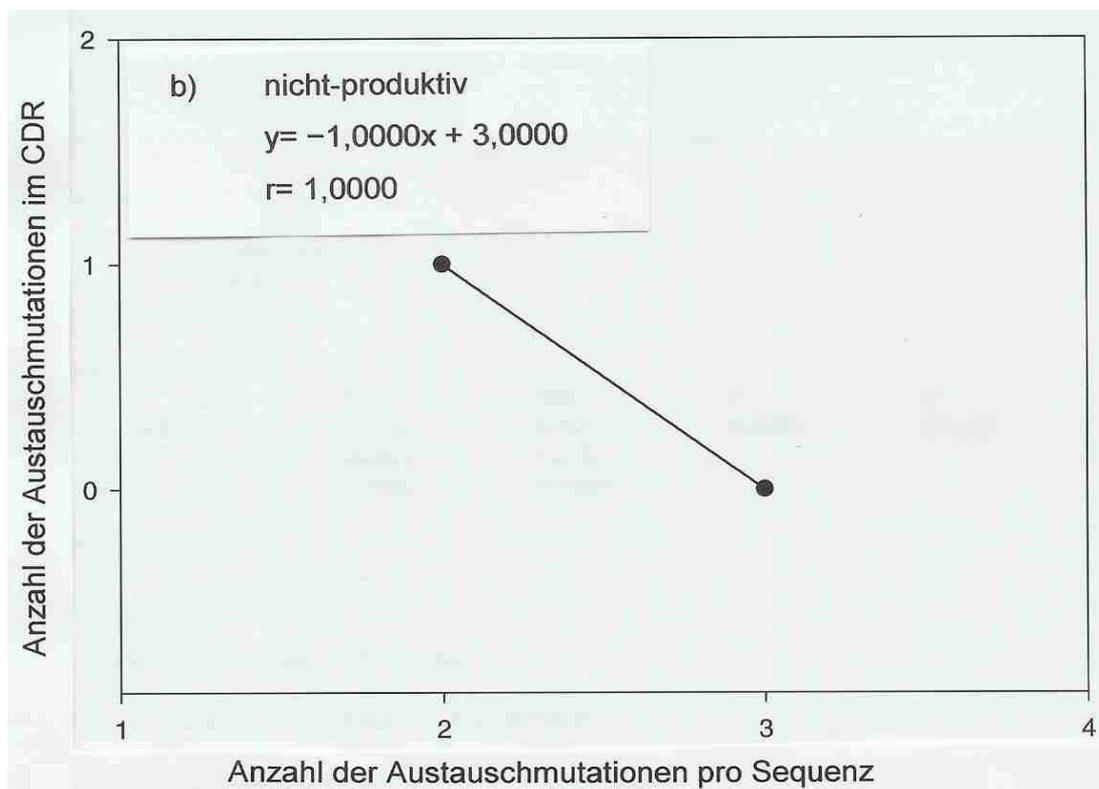
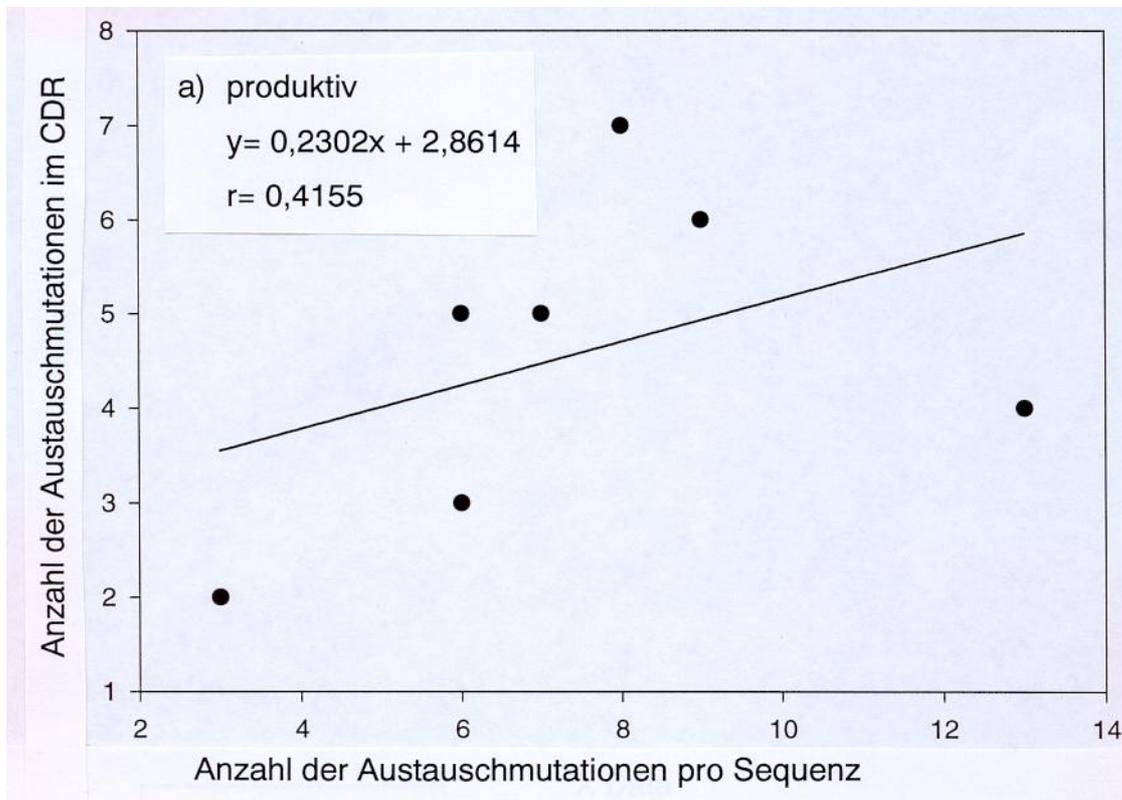
Figur 34 a+b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen Centroblasten Sequenzen



Figur 35 a+b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen Centrocyten Sequenzen



Figur 36 a+b: Anzahl der Austauschmutationen im CDR Bereich im Vergleich zur Gesamtanzahl der Austauschmutationen in den einzelnen Memory B Zell Sequenzen



Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Girschick danke ich für die Überlassung des Themas, für die gute Strukturierung und die vielen hilfreichen fachlichen Erläuterungen. Ganz besonders möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die aufwendigere Betreuung während der letzten Monate bedanken.

Herrn Professor Dr. med. Ulrich Vogel danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Lebenslauf:

Ulla Carina **Bräutigam**

geboren am 01. März 1975 in Würzburg

wohnhaft: Am Hädler 18, 97320 Mainstockheim

09.1981-07.1985	Grundschule Mainstockheim
09.1985-07.1992	Armin-Knab-Gymnasium, Kitzingen
08.1992-07.1993	Garfield High School, Woodbridge, VA, USA
09.1993-06.1995	Armin-Knab-Gymnasium, Kitzingen
30.06.1995	Allgemeine Hochschulreife
05.1996-05.2003	Humanmedizin an der Universität Würzburg
03.1999	Ärztliche Vorprüfung
03.2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.2001	USMLE Step1
03.2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2002-03.2003	Praktisches Jahr am Lehrkrankenhaus Coburg
05.2003	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07.2003	TOEFL-Test
09.2003	USMLE Step2
01.2004	Clinical Skill Assessment Test
06.2004	Residency Kinderheilkunde Georgetown University, Washington, D.C., USA

Carina Bräutigam

(Carina Bräutigam)

Mainstockheim, April 2004