

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

Analyse des Immunglobulinrepertoires in peripheren  
B-Zellen von Patienten mit  
Systemischem Lupus Erythematoses

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Heidi Kränzle  
aus Dillingen

Würzburg, November 2007



Referent: Prof. Dr. med. H.J. Girschick

Korreferent: Prof. Dr. med. Ch. Kneitz

Dekan: Prof. Dr.med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2008

Die Promovendin ist Ärztin



Meinen Eltern  
Annemarie und Helmut



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Einführung in das Immunsystem	1
1.1.1	Angeborene und erworbene Immunität	1
1.1.2	B-Lymphozyten	2
1.2	Die Immunglobuline	4
1.2.1	Die molekulare Struktur der Immunglobuline von B-Zellen	4
1.2.2	Genetik der Immunglobuline und die Entstehung der Antikörperdiversität	6
1.2.2.1	erbliche Grundlagen für die Diversität	6
1.2.2.1.1	Der „heavy chain locus“ (Schwerkettenlocus)	6
1.2.2.1.2	Der „lambda ( $\lambda$ )-locus“ (Leichtkettenlocus)	6
1.2.2.1.3	Der „kappa ( $\kappa$ )-locus“ (Leichtkettenlocus)	7
1.2.2.2	kombinatorische Diversität	8
1.2.2.3	Junktionale Diversität	9
1.2.2.4	Diversität durch somatische Hypermutation, „receptor-editing“ und „class-switch“	10
1.3	Autoimmunität und systemischer Lupus erythematodes	11
1.3.1	Autoimmunität als Fehlreaktion des adaptiven Immunsystems	11
1.3.2	Systemischer Lupus erythematodes	13
1.3.3	B-Zellen bei systemischem Lupus erythematodes	16
1.4	Fragestellung	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut	19
2.2	Einzelzell-Sortierung	19
2.3	DNA-Amplifikation der sortierten Zellen mittels PCR	20
2.4	Sequenzanalyse	21
2.5	genetische Polymorphismen	23
2.6	Abschätzung der Taq-Polymerase Fehlerrate	23
2.7	Statistische Methoden	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	Analyse des $V_{\kappa}$ -Rearrangements und Vergleich mit alterstypischen Repertoires	25
3.1.1	Analyse der Häufigkeiten der $V_{\kappa}$ -Genfamilien in nichtproduktiven und produktiven Immunglobulinrearrangements von B-Zellen des SLE- Patienten	25
3.1.2	Analyse der Verteilung der nichtproduktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ - Genrearrangements der peripheren B-Zellen von SLE-Patienten	26

3.1.3	Analyse der Frequenzen der J <sub>κ</sub> -Genrearrangements im nichtproduktiven und produktiven Repertoire der peripheren B-Zellen des SLE-Patienten	30
3.1.4	Analyse der Länge des CDR 3 in nichtproduktiven und produktiven Immunglobulinrearrangements der peripheren B-Zellen des SLE-Patienten	32
3.1.5	Analyse der Modifikationen der V <sub>κ</sub> J <sub>κ</sub> -Schnittstelle durch TdT-Aktivität, Insertionen von palindromischen Nukleotiden und durch Exonukleaseaktivität in nichtproduktiven und produktiven Immunglobulinrearrangements der peripheren B-Zellen des SLE-Patienten	33
3.1.5.1	TdT-Aktivität	33
3.1.5.2	Insertion palindromischer Nukleotide am 5`- und 3`-Ende der V <sub>κ</sub> -Gene während des Rearrangements	33
3.1.5.3	Exonukleaseaktivität an den 5` der J <sub>κ</sub> -Gene und 3`-Enden der V <sub>κ</sub> -Gene während des Rearrangements	34
3.2	Analyse der Mutationen in den nichtproduktiven und produktiven V <sub>κ</sub> -Rearrangements	35
3.2.1	Analyse der Mutationsfrequenzen in den nichtproduktiven und produktiven V <sub>κ</sub> -Rearrangements und Vergleich mit alterstypischen Repertoires	35
3.2.2	Analyse der Mutationsverteilung in nichtproduktiven und produktiven V <sub>κ</sub> -Rearrangements	37
3.2.2.1	Verteilung der Mutationen in den CDR- und FR-Regionen	37
3.2.2.2	Verteilung der Mutationen auf die Codons	37
3.2.3	Analyse der Mutationsarten in den nichtproduktiven und produktiven V <sub>κ</sub> -Rearrangements	38
3.2.3.1	Verteilung der Anzahl der Replacement- und Silent-Mutationen in den Codons	38
3.2.3.2	Vergleich der R/S-Verhältnisse in speziellen Regionen nichtproduktiver und produktiver V <sub>κ</sub> -Rearrangements	39
3.2.3.3	Darstellung der Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen in nichtproduktiven und produktiven V <sub>κ</sub> -Rearrangements als Funktion (Regression)	40
3.2.3.4	Vergleich der Häufigkeiten von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl von Replacement-Mutationen in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver Rearrangements	41
3.2.4	Analyse der Lokation der Mutationen in den nichtproduktiven und produktiven V <sub>κ</sub> -Rearrangement	42
3.2.4.1	Vergleich der mutierten Nukleotide in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver V <sub>κ</sub> -Rearrangements	42
3.2.4.2	Vergleich der Häufigkeiten von Transversion und Transition in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver V <sub>κ</sub> -Rearrangements	42
3.2.4.3	Vergleich der Häufigkeit multipler Mutationen in einem Codon nichtproduktiver und produktiver V <sub>κ</sub> -Rearrangements	43



3.2.5	<b>Analyse der Verteilung der Mutationen in bestimmten Motiven nichtproduktiven und produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements</b>	<b>44</b>
3.2.5.1	Vergleich der Verteilung der Replacement- und Silent- Mutationen in den bestimmten Motiven nichtproduktiver und produktiver V <sub>κ</sub> -Rearrangements	44
3.2.5.2	Vergleich der mutierten Motive in den CDR- und FR- Regionen nichtproduktiver und produktiver V <sub>κ</sub> -Rearrangements	45
3.2.5.3	Vergleich der Lokation der Mutationen in den RGYW- und WRCY-Motiven produktiver und nichtproduktiver V <sub>κ</sub> -Rearrangements	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Diversität des Genrepertoires	49
4.1.1	Auswahl der V <sub>κ</sub> - Gene	49
4.1.2	Auswahl der J <sub>κ</sub> -Gene	53
4.2	Diversität der VJ-Schnittstelle	54
4.3	Somatische Hypermutation	56
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Figuren</b>	<b>74</b>
8.1	Figurenlegenden	74
8.2	Figuren	89



## 1 Einleitung

Das Immunsystem des Menschen ist ein riesiges Verbundsystem von Molekülen, Zellen und Organen, das vor allem dem Zweck dient, zwischen „eigen“ und „fremd“ zu unterscheiden. Seine Hauptaufgabe besteht darin, den Menschen vor der großen Anzahl infektiöser Mikroorganismen – Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten – zu schützen und damit die innere Unversehrtheit des Organismus zu gewährleisten. Aufgrund der großen Vielfalt an spezifischen mikrobiellen und wirtseigenen Antigenen kann der komplizierte Mechanismus der „Selbst-Erkennung“ gestört sein, und so zu Reaktionen gegen körpereigene Gewebeantigene führen. Derartige autoallergische oder Autoimmun-Reaktionen können zum Entstehen von Autoimmunerkrankungen führen wie z.B. beim systemischen Lupus erythematodes.

### 1.1 Einführung in das Immunsystem

#### 1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem benutzt zwei verschiedene, jedoch kommunizierende Wege bei der Eliminierung der Krankheitserreger. Das **angeborene Abwehrsystem** bildet eine erste Verteidigungslinie gegen viele der üblichen Mikroorganismen und ist vor allem für die Bekämpfung häufiger bakterieller Infektionen von besonderer Bedeutung. Es ist vor allem durch seine schnelle, stereotype und unspezifische Immunantwort gekennzeichnet. Das molekulare Arsenal des angeborenen (unspezifischen) Immunsystems setzt sich aus chemischen Abwehrfaktoren auf Haut und Schleimhaut (Lysozym, Säureschutzmantel, Magensaft), aus humoralen Faktoren (Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine, Zytokine, Interferone) und aus „unspezifischen“ Abwehrzellen (Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen) zusammen. [19]

Das **adaptive erworbene Immunsystem** stellt somit die zweite „Abwehrlinie“ dar. Es wird nur dann aktiviert, wenn ein infektiöser Organismus die angeborene Abwehrlinie durchbrochen hat. Im Unterschied zum angeborenen Abwehrsystem zeichnet sich die erworbene Immunität dadurch aus, dass die Reaktionen für das auslösende Antigen spezifisch sind und dass durch Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses ein stärkerer Schutz im Falle einer erneuten Infektion vorhanden ist. Bei dieser spezifischen Immunantwort spielen zwei Effektorsysteme eine entscheidende Rolle: die über T-Lymphozyten vermittelte **zelluläre** Abwehr und die über B-Lymphozyten

vermittelte **humorale** Abwehr. In der Regel sind jedoch sowohl T- als auch B-Zellen an den meisten Immunantworten beteiligt. Beide Typen von Lymphozyten erhalten ihre Spezifität über Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, wodurch sie nur „passende“ Antigene hochspezifisch erkennen und dadurch stimuliert werden. Die Wirkung beider Zellsysteme beruht dann auf einer durch den Antigenkontakt eingeleiteten klonalen Selektion, in deren Rahmen sich aus einer einzelnen antigen-spezifischen Zelle rasch ein Klon identischer Tochterzellen entwickelt und je nach Zellart die Antigeneliminierung induziert. Dabei differenzieren die T-Zellen zu T-Helferzellen, die dann wiederum zytotoxische T-Zellen und andere Effektorzellen (NK-Zellen, Eosinophile, Mastzellen) aktivieren, während die B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren.

### 1.1.2 B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten bilden die Effektorzellen der humoralen Immunantwort und sind für die Bereitstellung von Antikörpern verantwortlich. Mittels ihrer antigenspezifischen Oberflächenrezeptoren (B-Zell-Rezeptor), die eine membrangebundene Form der Immunglobuline darstellen, erkennen sie ein extrem breites Spektrum verschiedener Antigene. Besonders während der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark können Pathologien entstehen, die in der Ätiologie der Autoimmunerkrankung des systemischen Lupus erythematoses eine entscheidende Rolle spielen.

Eine wesentliche Voraussetzung für die humorale Immunantwort ist die funktionelle Reifung der B-Lymphozyten von der noch nicht festgelegten Stammzelle bis hin zum reifen B-Lymphozyten mit seinen einzigartigen Antigenrezeptoren und seiner Bereitschaft, auf ein fremdes Antigen zu reagieren. Ausgehend von der **pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle**, die im spezialisierten Mikromilieu des Knochenmarks zu finden ist, durchlaufen die B-Zellen im Zuge ihres Differenzierungsprozesses verschiedene Entwicklungsstadien (**Figur 1**). Kennzeichen dieser Stadien sind, dass Segmente der Immunglobulingene der Reihe nach umgeordnet werden und so ein unterschiedliches Repertoire an Antigenrezeptoren erzeugen. Neben den Immunglobulinen werden noch andere Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert, die für jedes Entwicklungsstadium typisch sind. Das erste Stadium der B-Zell-Linie ist die **Pro-B-Zelle**. Im Frühstadium dieser Zelle wird der Locus für die schwere Kette mit Hilfe von Enzymen (RAG 1, RAG 2, TdT) umgeordnet und in einer späteren Stufe führt eine produktive VDJ<sub>H</sub>-Genumordnung zur Expression einer intakten schweren Kette, durch die das nächste entscheidende Entwicklungsstadium definiert ist, das Prä-B-Zell-

Stadium. Die großen **Prä-B-Zellen**, die eine schwere Kette vorübergehend auf der Oberfläche als Teil eines Prä-B-Zell-Rezeptors exprimieren, teilen sich in kleine Prä-B-Zellen, in denen zusätzlich mit der Umordnung für die leichten Ketten begonnen wird. Sobald zur schweren Kette ein Gen für die leichte Kette kombiniert wird und damit ein vollständiges IgM-Molekül auf der Zelloberfläche exprimiert wird, definiert man sie als **unreife B-Zelle**. Bis zu diesem Punkt ist die Ausdifferenzierung unabhängig von einem Antigen und findet innerhalb des Knochenmarks statt, das mit seinen nicht-lymphatischen Stromazellen während der B-Zell-Entwicklung eine wichtige Voraussetzung darstellt. Bevor die Lymphozyten in die peripheren sekundären Lymphorgane wandern, werden sie noch einer strikten Selektion unterzogen.

Dabei hängt das weitere Schicksal des unreifen B-Lymphozyten von der Spezifität seines Antigenrezeptors ab. Diejenigen unreifen B-Lymphozyten, die ein Fremdanigen erkennen und darauf antworten können, werden positiv selektiert und stehen somit für das Lymphozytenrepertoire zur Verfügung. Nach weiteren Differenzierungsschritten entstehen **reife B-Zellen**, die zusätzlich zu IgM IgD exprimieren. Bis sie ihr spezifisches Antigen getroffen haben, werden sie als naive B-Zelle bezeichnet.

Zellen hingegen, die an Autoantigene binden und einen starken autoreaktiven Rezeptor exprimieren, durchlaufen vermutlich ein anderes Schicksal, um Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Ein Mechanismus, der solche autoreaktiven B-Zellen aus dem Repertoire eliminiert, ist der Prozess der **klonalen Deletion**. Er führt unweigerlich zum programmierten Zelltod (Apoptose). Vor dem Zelltod gibt es jedoch eine Phase, in der die autoreaktive B-Zelle einen neuen nicht autoreaktiven Rezeptor durch weitere Genumlagerungen herstellt und dadurch gerettet werden kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als „**receptor-editing**“. Dabei werden die Gene der leichten Kette nochmals umgeordnet und die, den autoreaktiven Rezeptor codierenden Gensegmente, herausgeschnitten. Wurden die Segmente der leichten Kappa-Kette aufgebraucht, so können die Zellen auf den Lamda-Locus zurückgreifen. Der Mechanismus der **Anergie** ist eine weitere Möglichkeit. Wenn sich unreife B-Zellen an lösliche Autoantigene binden, die B-Zell-Rezeptoren quervernetzen können, werden sie anergisch, d.h. sie können nicht mehr auf das Antigen reagieren. Ihre Weiterleitung von Signalen, die Expression von Oberflächen-IgM und weitere wichtigen Funktionen werden beeinträchtigt, wodurch ihre Überlebenschancen nach der Wanderung in die peripheren lymphatischen Organe vermindert sind. Ein weiterer Mechanismus des Immunsystems im Umgang mit einer autoreaktiven B-Zelle ist die **klonale Ignoranz**, bei der die Zellen eine schwache, aber eindeutige Affinität für ein Autoantigen besitzen, aber normal heranreifen und IgM und IgD auf der Zelloberfläche exprimieren. Sie sind

somit potenziell autoreaktiv, werden dennoch nicht aktiviert und verbleiben so im B-Zell-Repertoire. [19]

Während der Entwicklung der B-Zellen kommt es somit zu einem Balanceakt des Immunsystems, in dem zum einen jegliche Reaktionen mit körpereigenen Antigenen ausgeschaltet werden müssen und zum anderen die Fähigkeit erhalten bleiben muss, auf eine breite Vielfalt an Pathogenen zu reagieren.

## 1.2 Die Immunglobuline

Immunglobuline oder Antikörper sind die Vermittler der erworbenen humoralen Immunantwort. Um die große Anzahl an verschiedensten Antigenen, mit denen ein Mensch im Laufe seines Lebens in Berührung kommt, zu erkennen und zu bekämpfen, werden die Immunglobuline von B-Zellen mit einem großen Spektrum von Antigenespezifitäten produziert, wobei jede B-Zelle in der Regel ein Immunglobulin mit einer einzigen Spezifität synthetisiert. Die Kenntnisse über den Aufbau eines typischen spezifischen Antikörpers, das ihm zugrundeliegende Genrepertoire in der Keimbahn sowie die Mechanismen, die dem Antikörper seine enorme Diversität verleihen, sind die Grundlage, um die zentrale Funktion von Antikörpern bei einer normalen Immunantwort und bei einer Autoimmunerkrankung zu verstehen.

### 1.2.1 Die molekulare Struktur der Immunglobuline von B-Zellen

Die Grundstruktur eines Immunglobulins (**Figur 2**) besteht aus vier Polypeptidketten, dabei handelt es sich jeweils um zwei identische schwere Ketten (H; heavy) und zwei identische leichte Ketten (L; light), die so angeordnet sind, dass sich jeweils eine leichte Kette mit einer schweren Kette paart und über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen zu einem Y-förmigen Molekül verbinden [19]. Von den leichten Ketten können aufgrund des kodierenden Genlocus zwei Haupttypen unterschieden werden, die man als Lambda- und Kappa-Ketten bezeichnet. Die schweren Ketten treten hingegen in fünf verschiedenen Formen auf. Sie werden mit den kleinen griechischen Buchstaben  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und  $\alpha$  gekennzeichnet. Sie bestimmen bei ihrer Expression die Klassenzugehörigkeit und damit die Effektorfunktion bzw. die funktionelle Aktivität des Antikörpers. Entsprechend der griechischen Bezeichnung der schweren Kette unterscheidet man fünf Hauptklassen von Immunglobulinen: Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin E (IgE) und Immunglobulin A (IgA).

Gemeinsame Bauelemente der schweren wie der leichten Ketten sind strukturelle Untereinheiten, sog. Domänen aus etwa 110 Aminosäuren. Die leichte Kette besteht aus zwei solcher Immunglobulindomänen (210 – 221 Aminosäuren), die schwere Kette hingegen aus vier Domänen (440 Aminosäuren) [32]. Sowohl bei den schweren als auch bei den leichten Ketten variieren die aminoterminalen Domänen (V-Region) von Antikörper zu Antikörper. Sie zeichnen sich durch eine ausgeprägte Sequenzvariabilität aus. Zusammen bilden die beiden V-Regionen der schweren und leichten Ketten ( $V_H$  bzw.  $V_L$ ) am N-Terminus die Antigenbindungsstelle und bestimmen die Antigen-Spezifität eines Antikörpers. Die übrigen Domänen am C-Terminus sind dagegen konstant und werden als C-Regionen der schweren und leichten Kette ( $C_H$  bzw.  $C_L$ ) definiert.

Mittels eines proteolytischen Enzyms (Papain) kann das Immunglobulin in drei Teile – zwei  $F_{ab}$ -Fragmente und ein  $F_c$ -Fragment - gespalten werden, die für seine verschiedenen Funktionen verantwortlich sind. Die beiden identischen  $F_{ab}$ -Fragmente enthalten die variablen Regionen und sind somit für die Antigenbindung verantwortlich. Das  $F_c$ -Fragment enthält die konstanten Abschnitte des Antikörpers und vermittelt die biologischen Effektorfunktionen wie die Klassenzugehörigkeit, Halbwertszeit, Plazentapassage, Komplementfixierung sowie der damit verbundenen Aktivierung der Abwehrmechanismen [19].

Die wichtigste Region eines Antikörpers stellt die Antigenbindungsstelle dar, die jeweils von der variablen Domäne der schweren und leichten Kette am N-Terminus gebildet wird. Sie verleiht dem Antikörper die Spezifität, die der Organismus benötigt, um das große Spektrum der Antigene zu erkennen. Die hohe Variabilität erhält die Antigenbindungsstelle vor allem durch jeweils drei definierte hypervariable Regionen (HV) in den  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen, die man auch komplementaritätsbestimmende Region (CDR) nennt. Zwischen den CDR liegen Regionen, die einen wesentlich geringeren Grad an Variabilität aufweisen. Man nennt sie Gerüstregionen oder framework regions (FR). Zusätzlich zur Sequenzvielfalt der hypervariablen Regionen ist auch ihre räumliche Anordnung für die Antigen-spezifität von großer Bedeutung. Die Gerüstregionen beider Ketten bilden nämlich in ihrer Tertiärstruktur Beta-Faltblätter, wodurch sich dann die hypervariablen Regionen als Schleifen anordnen und in der gefalteten Struktur eng beieinander liegen. Besitzt ein Antigen die zur Antigenbindungsstelle komplementäre Aminosäuresequenz, so kann es zu einem Antigen-Antikörper-Komplex kommen. Zur Bindung tragen außerdem nicht-kovalente Kräfte bei, wie z.B. elektrostatische Kräfte bei entgegengesetzten Ladungen, Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Kräfte [30][19].

## 1.2.2 Genetik der Immunglobuline und die Entstehung der Antikörperdiversität

Das riesige Immunglobulinrepertoire des Menschen, das aus ungefähr  $10^{11}$  verschiedenen Antikörpern besteht, hat die Frage nach den Mechanismen der Antikörperdiversität aufgeworfen. Wie ist es möglich aus einem Minimum an Genen ein Maximum an Antikörpern herzustellen ?

Um die Vielfalt der Antikörper für die Antigenerkennung zu erreichen, hat die Evolution eine Reihe von molekularen Mechanismen generiert, die in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

### 1.2.2.1 erbliche Grundlagen für die Diversität

Die genetische Information für die humanen Immunglobuline ist auf drei separaten Genloci verteilt, die jeweils für die schwere Kette (Chromosom 14) sowie für die leichten Ketten vom Kappa- (Chromosom 2) und Lambda-Typ (Chromosom 22) kodieren. Jeder Genort enthält sowohl Gene für den variablen als auch für den konstanten Abschnitt des Immunglobulin-Moleküls. Diese Gene setzen sich jedoch aus mehreren Gensegmenten zusammen, die außerdem in multiplen Kopien vorliegen.

#### 1.2.2.1.1 Der „heavy chain locus“ (Schwerkettenlocus)

Der menschliche Schwerkettenlocus (Chromosom 14q32.3) setzt sich aus vier verschiedenen Genabschnitten zusammen. Dazu zählen das am aminoterminalen Ende liegende V- („variable“)-Segment, das D- („diversity“)-Segment, das kleine J- („joining“) Segment sowie das C- („constant“) Segment, das die konstante Region kodiert. Von jedem Segment liegen eine bestimmte Anzahl an Kopien vor: ungefähr 65  $V_H$ -Gene, 27  $D_H$ -Gene, 6  $J_H$ - und 5  $C_H$ -Gene. Aus diesen Keimbahngenen wird in einem ersten Schritt durch die VDJ-Rekombination ein funktionierender Genabschnitt zusammengeführt und mit einem konstanten  $V_H$ -Gen kombiniert [19].

#### 1.2.2.1.2 Der „lambda ( $\lambda$ )-locus“ (Leichtkettenlocus)

Der lambda Leichtkettenlocus ist auf dem Chromosom 22q11.2 lokalisiert und hat insgesamt 51  $V_\lambda$ -Gene, von denen nur etwa 30 als funktionell gewertet werden. 7  $J_\lambda$ -Gen liegen einzeln zwischen den konstanten  $C_\lambda$ -Segmenten. D-Gene sind bei beiden leichten Ketten nicht vorhanden. Alle  $\lambda$ -Gene werden wiederum in 10 verschiedene Genfamilien eingeteilt, die wiederum in drei Cluster unterteilt werden.



### 1.2.2.1.3 Der „kappa ( $\kappa$ )-locus“ (Leichtkettenloкус)

Der kappa ( $\kappa$ )-locus ist auf dem Chromosom 2p11.12 lokalisiert und besteht aus einem Gen  $C_\kappa$  für die konstante Region, 5 Gensegmenten für das  $J_\kappa$ -Gen und aus 76  $V_\kappa$ -Genen. Die  $V_\kappa$ -Gene sind aus zwei eng verwandten, parallel verlaufenden Regionen aufgebaut, die jedoch in ihrer Orientierung gegenläufig sind. Die Ursache dafür ist, dass der distale Anteil (36  $V_\kappa$ -Gene, Ld, Ad, Od) während der Phylogenese dupliziert und invertiert wurde [31]. Eingeteilt wird der kappa-Lokus somit in die  $C_{\text{kappa}}$ - nahe proximale Kasette (Lp, Ap, Op), die  $C_{\text{kappa}}$ - ferne distale Kasette (Ld, Ad, Od) und in eine den  $J_\kappa$ -Genen am nächsten liegende Region (B) aus einzelnen Genen. Insgesamt besteht der kappa-Locus aus 33 Genpaaren, deren Sequenzen in 95-100% übereinstimmen und durch Duplikatur entstanden sind, und 10 einzelnen Genen. Von den 76- $V_\kappa$ -Genen sind nur 32 Gene potentiell funktionsfähig, 16 Gene haben kleinere Defekte und 25 sind Pseudogene. Alle 76  $V_\kappa$ -Gene sind in **Figur 3** zusammengefasst [26] [27]. Zusätzlich zum Hauptgenort, Chromosom 2, wurden Gene außerhalb des Locus auf Chromosom 1, 22 und 2 gefunden [26][18]. Diese verstreuten  $V_\kappa$ -Gene werden als Orphons bezeichnet.

Außerdem lassen sich die variablen Gene je nach genetischer Homologie der Sequenzen in 7 verschiedene  $V_\kappa$  -Genfamilien einteilen, in denen die Mitglieder mindestens 80% der DNA-Sequenz gemeinsam haben. So gehören der  $V_\kappa$  I-Familie 19 funktionelle  $V_\kappa$ -Gene an, der  $V_\kappa$ -II Familie 9 Gene und der  $V_\kappa$  III Familie 7 Gene. Jeweils 1 Gen lassen sich in den  $V_\kappa$  IV und  $V_\kappa$  V-Familien finden. Die Familie  $V_\kappa$  VI zählt 3 Gene.  $V_\kappa$  VII enthält kein funktionelles  $V_\kappa$ -Gen [35] [26].

Bei allen drei Ketten findet man neben den funktionellen Gensegmenten eine große Zahl an Genen mit kleinen Defekten und sogenannten Pseudogenen, die zu einem nicht funktionsfähigen Genabschnitt führen. Sie tragen zwar zur Vielfalt der Gensegmente bei, müssen jedoch zum nichtproduktiven Immunglobulinrepertoire gezählt werden.

Wichtige Grundlage für die außerordentliche Diversität im Immunglobulinrepertoire ist somit das Vorhandensein vieler verschiedener Gensegmente im Keimbahn-genom, die zu einem Gen zusammengebaut werden. Da jedoch nicht jede Variante der Immunglobuline vollständig im Genom codiert sein kann, denn das würde mehr Gene für Antikörper erfordern, als es Gene im gesamten Genom gibt, haben sich weitere Mechanismen für die Produktion der hochvariablen Proteine entwickelt.

### 1.2.2.2 kombinatorische Diversität

Die kombinatorische Diversität ist für einen beträchtlichen Teil der Vielfalt in den variablen Regionen der schweren und leichten Ketten verantwortlich und durch zwei unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Zum einen zählt die **somatische Rekombination** [1] dazu, die wie ein genetisches Kartenspiel funktioniert, das sich zu Millionen neuer Variationen mischen lässt und so eine schier unbegrenzte Vielfalt an Antikörpern produziert (**Figur 4**). Sie findet nur während der Reifung der B-Zellen statt und konstruiert aus den zahlreichen Versionen der V-, D- und J-Gensegmenten der schweren Kette sowie der V- und J-Gensegmenten der leichten Kette ein zufällig kombiniertes neues Gen für die variable Region der jeweiligen Kette. Jede Kombination aus den vielen verschiedenen Gensegmenten führt zur Produktion einer Antikörperkette mit spezieller Aminosäuresequenz und damit einzigartigen Antigenpezifität. Da die zu rekombinierenden Gensegmente (Exons) jedoch durch lange Zwischensequenzen aus zusätzlichen Gensegmenten und Introns weit voneinander entfernt auf der DNA verteilt sind, wird zunächst wie am Beispiel der leichten Kappa-Kette ein V-Segment in direkte Nachbarschaft zum J-Segment gebracht, indem die dazwischenliegende DNA als geschlossenes zirkuläres Fragment entfernt wird (Deletion). Bestimmte Gene (B3 und B2) werden beim kappa-Lokus jedoch auch durch Inversion rearrangiert [20]. Anschließend werden die Enden der Gensegmenten durch DNA-Ligasen zur codierenden Verknüpfungssequenz verbunden.

Gesteuert wird der Mechanismus der VDJ-Rekombination durch Rekombinationssignalsequenzen (RSS), die direkt auf die Stellen folgen, an denen die Rekombination stattfindet. Diese Sequenzen bestehen immer aus einem 7 Nukleotide beinhalteten Heptamer 5`CACAGTG3`, einer variablen Abstandhaltersequenz (Spacer) von 12 oder 23 Basenpaaren und einem Block aus 9 gleichbleibenden Nukleotiden, dem sogenannten Nonamer 5`ACAAAACC3`. Die Enzyme **RAG1** (Recombination activation genes) und **RAG2**, die die enzymatischen Schritte bei der DNA-Umlagerung bewerkstelligen, erkennen die RSS und folgen der 12/23-Rekombinationsregel, die besagt, dass ein Gensegment mit einem 12 Basenpaaren flankierten Spacer nur mit einem Gensegment verknüpft werden kann, das mit einem 23 RSS ausgestattet ist. Zur Vervollständigung einer mRNA für die leichte Kette eines Immunglobulins wird das V-Region-Exon mit der C-Region-Sequenz, die durch ein separates Exon codiert wird, nach der Transkription durch RNA-Spleißen verknüpft. Durch Translation entsteht dann die leichte Polypeptidkette. Die Rekombination für die schwere Kette läuft nach dem

gleichen Prinzip, nur dass das zusätzliche D-Segment zuerst mit dem J-Segment verknüpft wird.

Den zweiten Mechanismus der kombinatorischen Diversität findet man beim Zusammenbau des Immunglobulins und somit auf der Ebene der Proteinexpression. Da jede mögliche leichte Kette mit jeder möglichen schweren Kette kombiniert werden kann und die variablen Regionen beider Ketten die Antigenbindungsstellen bilden, wird durch die Zahl der möglichen Kombinationen die Antikörperspezifität enorm erhöht.

### 1.2.2.3 Funktionale Diversität

Eine weitere Erhöhung der Vielfalt im Immunglobulinrepertoire entsteht durch die Variabilität an der Verbindungsstelle zwischen den V-, (D)- und J-Gensegmenten, die die dritte hypervariable Schleife codiert und damit besonders die Antigen-spezifität signifikant verändern kann. Diese zusätzlichen Variationsmöglichkeiten können durch Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden an der Verknüpfungsstelle während der Genuklagerung erreicht werden. Dabei unterscheidet man bei den hinzugefügten Nukleotiden zwischen den P- und N-Nukleotiden. **P-Nukleotide** sind definitionsgemäß in die V-(D)-J- Schnittstelle eingefügte Nukleotide, die eine Palindromsequenz besitzen. Palindrom bedeutet, dass sie spiegelbildlich zu der angrenzenden Basensequenz der Keimbahn sind und somit vom komplementären Strang stammen. Verantwortlich dafür sind DNA-Reparaturenzyme, die einzelne Nukleotide des komplementären DNA –Strangs duplizieren und in die Schnittstelle einbauen. Durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyltransferase (**TdT**) hingegen werden die **N-Nukleotide** (Non-templated), die nicht in der DNA-Matrix codiert sind, sondern nach dem Zufallsprinzip entstehen, an die einzelsträngigen Enden der codierenden DNA hinzugefügt. Die Einzelstränge bilden daraufhin Basenpaare aus, Reparaturenzyme schneiden ungepaarte Nukleotide weg, füllen die verbliebenen Einzelstränge mit komplementären Nukleotiden auf und verknüpfen die DNA und die P- und N-Nukleotide zu einer codierenden Verknüpfungssequenz.

Eine andere Variationsmöglichkeit ist das Entfernen von Nukleotiden an der Verbindungsstelle durch **Exonukleasen**, die dadurch zu einer Verkürzung der Länge der dritten hypervariablen Schleife (CDR3) und somit zu unterschiedlichen Aminosäuresequenzen führen können. Diese Exonuklease-Aktivität beruht auf Zufall vor allem am 3`-Ende eines V-Gensegments und am 5`-Ende einer J-Gensegments [20].

#### 1.2.2.4 Diversität durch somatische Hypermuation, „receptor-editing“ und „class-switch“

Der letzte Mechanismus, der zur Diversität der Immunglobuline beiträgt, findet während einem späteren Stadium der B-Zell-Entwicklung in den peripheren lymphatischen Organen statt und ist an die Keimzentrumsbildung gebunden. Wenn die B-Zellen mit ihren funktionsfähigen antigenspezifischen Immunglobulinrezeptoren im Keimzentrum nach Signalen von aktivierten T-Zellen auf ihr Antigen reagieren, wird die Modifikation durch den Prozess der **somatischen Hypermuation** aktiviert. Bei diesem Prozess werden eine große Anzahl an Punktmutationen vor allem in die variablen Regionen der umgeordneten Gene für die schweren und leichten Ketten eingeführt, wodurch sich jeweils nur eine einzige Aminosäure ändert. Dadurch wird eine Reihe miteinander verwandter B-Zellen geschaffen, die sich in ihrer Affinität gegenüber einem Antigen und folglich auch in ihrer Spezifität gering unterscheiden. Die aktivierten B-Zellen können in ihrem Werdegang durch diese Mutationen unterschiedlich beeinflusst werden. Zum einen kann die Rezeptorfunktion verloren gehen, indem ein durch die Mutation eingeführtes Stoppcodon die Translokation verhindert oder die richtige Faltung und damit die Struktur des Immunglobulins durch eine im Grundgerüst gelegene Mutation zerstört wird. Außerdem kann eine Mutation in den komplementaritätsbestimmenden Regionen die Antigenbindungsstelle so verändern, dass die Affinität zum Antigen vermindert wird. B-Zellen mit solchen zerstörerischen Mutationen werden negativ selektiert und durch Apoptose eliminiert. Zum anderen werden B-Zellen positiv selektiert, deren Mutationen vor allem in den hypervariablen Regionen (CDR) liegen und durch den verstärkten Austausch von Basen und damit auch durch die veränderte Aminosäuresequenz eine erhöhte Affinität zum Antigen hervorrufen. Diese überlebenden Zellen durchlaufen dann innerhalb des Keimzentrums mehrere Mutations- und Selektionszyklen, wodurch sich im Laufe der Zeit die Affinität für die erkannten Antigene in der Population der B-Zellen deutlich verbessert (Affinitätsreifung).

Durch den Selektionsdruck sind die Mutationen vor allem in den hypervariablen Regionen zu finden, wobei gewisse Bereiche mit kurzen Motiven von meist vier Nukleotiden (RGYW und WRCY) bevorzugt mutiert werden. Außerdem werden in den CDR-Regionen bedingt durch die Selektion auf verbesserte Antigenbindung verstärkt Mutationen mit einem Austausch von Basen impliziert, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz und damit auch der Proteinstruktur führen (replacement mutation).

Über die gesamte V-Region hingegen werden die stillen Mutationen (silent mutation) verteilt, da es zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz kommt und damit die Struktur nicht beeinträchtigt wird. Sie tragen aber damit zur Diversität des B-Zell-Repertoires bei.

Durch die somatische Hypermutation können aus den primordialen Keimbahngenen so unterschiedliche somatische Gene in den einzelnen B-Zell-Klonen entstehen, die sich durch verbesserte Affinität und Spezifität auszeichnen. Der intrinsische molekulare Mechanismus der somatischen Hypermutation ist jedoch weitgehend noch unbekannt.

Eine zusätzliche Erhöhung der Diversität des Immunglobulinrepertoires wird durch den Vorgang des „**receptor-editing**“ bewirkt. Es stellt den Versuch der Zelle dar, aus einem nicht-funktionellen V-(D)-J-Rearrangement, z.B. geringe Antigenrezeptoraffinität, durch ein zweites Rearrangement der verbliebenen Keimbahnsegmente eine funktionelle Rekombination herzustellen. Dieser Vorgang kann so oft wiederholt werden, bis das genetische Material im Immunglobulinlokus aufgebraucht, ein produktives Immunglobulin-Gen rekombiniert oder die Zelle erschöpft ist. Wenn die V-Abschnitte dieser Zelle determiniert sind, verbleiben sie danach in ihrer Grundstruktur unverändert, mit Ausnahme eventueller somatischer Mutationen.

Die konstanten Gene der schweren Kette können aber noch im Laufe der Immunantwort mittels des Antikörperklassenwechsels („**class-switch**“) die biologischen Eigenschaften des Antikörpers verändern und dadurch die Vielfalt des Repertoires erhöhen.

### **1.3 Autoimmunität und systemischer Lupus erythematodes**

#### **1.3.1 Autoimmunität als Fehlreaktion des adaptiven Immunsystems**

Bei der Erforschung der Immunität erkannte der Forscher Paul Ehrlich schon sehr früh (1900) die Bedeutung der Unterscheidung zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“. Er prägte den Begriff des „**horror autotoxicus**“ (Furcht vor der Selbstzerstörung), der ausdrücken soll, dass körpereigene Bestandteile normalerweise nicht zu einer Immunisierung führen. Er vermutete jedoch, dass die Effektormechanismen, die bei der Immunabwehr zum Zuge kommen, schwere Gewebeschäden verursachen könnten, wenn sie sich gegen sich „selbst“ richten. Genau diese schweren Gewebeschäden, die Ehrlich voraussagte, spielen bei der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle.

Um eine solche gefährliche Autoreaktivität zu vermeiden, entwickelte das Immunsystem mehrere verschiedene Toleranzmechanismen, die zur Toleranz

gegenüber Autoantigenen führen. Sowohl während der Reifung im Knochenmark (siehe Kapitel 1.1.2., klonale Deletion, „receptor editing“, Anergie, klonale Ignoranz) als auch in der Peripherie (Apoptose, Anergie) werden die autoreaktiven B-Zellen in Schach gehalten. Den reifen autoreaktiven B-Zellen fehlt vor allem die Aktivierung durch T-Helferzellen, da es solche Zellen mit Spezifität für Autoantigene normalerweise nicht gibt. Stattdessen werden die B-Zellen durch die **Apoptose** eliminiert. Der zweite Mechanismus zur Inaktivierung autoreaktiver B-Zellen in der Peripherie ist die Induktion der **Anergie**. Diese anergischen Zellen können dann durch zytotoxische T-Zellen mittels einer Fas-vermittelten Signalkette abgetötet werden. Außerdem gibt es noch Hinweise auf einen Mechanismus zur Beseitigung von B-Zellen, die während einer Reaktion mit einem Fremdartigen infolge somatischer Hypermutation autoreaktive Spezifitäten erworben haben. Sie werden nach der Bindung von Autoantigenen durch induzierte Apoptose entfernt.

All diese Mechanismen der Selbsttoleranz tragen dazu bei Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Da das Immunsystem jedoch eine enorme Diversität seines Repertoires anstrebt, um eine breite Vielfalt an Pathogenen zu eliminieren, kann es dazu führen, dass Komponenten des „Selbst“ in das Repertoire aufgenommen werden. Durch das Zusammenbrechen der Selbsttoleranzmechanismen kann die Kontrolle der in jedem Individuum vorhandenen „autoreaktiven“ Zellklone durchbrochen werden. Autoreaktive Lymphozyten könnten dann aktiviert werden. Da das Immunsystem in der Regel nicht in der Lage ist, die körpereigenen Antigene zu beseitigen, kommt es zu einer andauernden Immunreaktion, die folglich zu einem chronischen entzündlichen Gewebeschaden und damit zu einer klinisch manifesten Autoimmunerkrankung führen kann. Von einer Autoimmunerkrankung wird nur dann im eigentlichen Sinn gesprochen, wenn der Autoimmunprozeß selbst für die Erkrankungserscheinungen verantwortlich ist. Aufgrund ihrer Manifestation unterscheidet man zwei Arten von Autoimmunerkrankungen: zum einen die Krankheiten, bei denen der Ausbruch der Autoimmunität auf bestimmte Organe des Körpers beschränkt bleibt und als „organspezifisch“ bezeichnet werden (Beispiele: Diabetes mellitus Typ I, Hashimoto-Thyreoiditis); zum anderen die „systemischen“ Autoimmunerkrankungen, bei denen im Körper zahlreiche Gewebe betroffen sind (Beispiele: Rheumatoide Arthritis; Kollagenosen) [19]. Als Prototyp der systemischen Autoimmunerkrankungen gilt hierbei der systemische Lupus erythematodes, dessen Immunpathologie in dieser Arbeit genauer untersucht wurde.

### 1.3.2 Systemischer Lupus erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses, bei dem das Immunsystem aus noch unbekanntem Ursachen verändert ist und den eigenen Körper bekämpft, ist eine schubweise verlaufende, chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung mit Befall zahlreicher Organsysteme. Charakteristisch ist die Produktion von Autoantikörpern gegen Zellkernbestandteile, die mit einer Reihe klinischer Manifestationen assoziiert ist. Besonders häufig sind Frauen (F : M = 10:1) im Alter zwischen 18 und 40 Jahren betroffen. Neben dem Geschlecht spielen ethnische Faktoren eine wichtige prädisponierende Rolle. Die Erkrankung kommt zwar weltweit vor, jedoch ist die Prävalenz in der schwarzen Bevölkerung Nordamerikas sowie bei den Asiaten (1:1000) deutlich höher als bei Weißen (12,5:100000). Die eigentliche Ursache der Erkrankung ist heute noch unbekannt. Man vermutet eine genetische Veranlagung, die im Zusammenhang mit äußeren Faktoren zur Erkrankung führen [17]. Bei den Erbfaktoren zeigte sich eine vermehrte Assoziation mit den Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), die in essentieller Weise für die Regulation der Immunantwort bedeutsam sind. Vor allem die Produktion der HLA-Antigene HLA-DR2, -DR3 und -DQ, die wiederum mit der Produktion bestimmter antinukleärer Antikörper verknüpft sind, ist für den systemischen Lupus erythematoses typisch. Genetisch bedingt ist ebenfalls das Fehlen oder die mangelhafte Produktion der Komplementfaktoren C2 und C4 im Blut von SLE-Kranken, die damit zu einer schlechteren Opsonisierung und Elimination von Immunkomplexen führt. Aus der Tatsache, dass vor allem Frauen im gebärfähigen Alter betroffen sind, lässt sich auf einen weiteren prädisponierenden Faktor schließen: die weiblichen Geschlechtshormone Östrogene, die Einfluss auf die Selbsterkennung und möglicherweise auch auf die Antikörperregulation haben. Auch Triggerfaktoren wie UV-Strahlung, Infektionskrankheiten, körperliche und seelische Belastung sowie bestimmte Medikamente (Hydralazin, Procainamid, Isoniazid) können ein Aufflackern des SLE bewirken.

Die hochaffinen Autoantikörper, die hauptsächlich gegen nukleäre Antigene wie Nukleinsäuren (native DNA (dsDNA), Einzelstrang-DNA (ssDNA)), Histone (H1 – H4) und nukleäre Proteine (Sm-Antigen, SS-A/RO, SS-B/LA, n-RNP) aber auch gegen zytoplasmatische Antigene, Phospholipide, Zytoskelettproteine, Basalmembran und verschiedene Zelloberflächendeterminanten auf Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten gerichtet sind, spielen durch ihre Beteiligung an der Bildung von Immunkomplexen eine zentrale immunpathogenetische Bedeutung. Die in großer Zahl gebildeten Immunkomplexe übersteigen die Kapazität der für die

Immunkomplexbeseitigung zuständigen Systeme (mononukleäres Phagozytensystem, Erythrozyten, Komplementsystem) und es kommt zur Gewebeschädigung durch deren Ablagerung. Bevorzugte Lokalisationen beim SLE sind die Glomeruli, die peritubulären Nierenkapillaren, die epidermale Basalmembran, der Plexus choroideus und kleine bis mittlere Arterien in Haut, Gelenken, Lunge, Leber und ZNS. Immunkomplexe können entweder aus der Zirkulation kommend in den Organen abgelagert oder lokal gebildet werden [23]. Unabhängig davon lösen sie eine Reihe von Entzündungsprozessen aus (Komplementaktivierung, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und chemotaktischen Faktoren, Thrombozytenaggregation), die zum typischen Krankheitsbild des SLE führen.

Das klinische Bild wird wesentlich von der Art der Organbeteiligung, die in unterschiedlicher Häufigkeit auftreten, bestimmt und besticht durch seine große Vielfalt an klinischen Symptomen, wodurch der SLE auch als „Chamäleon“ bezeichnet wird. Häufig beginnt der SLE mit uncharakteristischen Allgemeinsymptomen vergleichbar mit einer Grippe, wobei besonders Müdigkeit, Leistungsknick, leicht erhöhte Temperaturen um 38 Grad Celsius, Lymphknotenschwellung, Arthralgien, Gewichtsabnahme und Sonnenempfindlichkeit typische anamnestische Angaben bilden. Was nach den ersten Allgemeinsymptomen folgt, ist allerdings für jeden Betroffenen unterschiedlich; mitunter liegen Jahre oder Jahrzehnte zwischen den ersten allgemeinen Symptomen und dem Befall eines oder mehrerer Organe. Zu den häufigsten Krankheitserscheinungen (90% aller Patienten) zählt die Polyarthritits ohne typisches Verteilungsmuster wie bei der rheumatoiden Arthritis, wobei Finger-, Hand- und Kniegelenke am häufigsten betroffen sind. Charakteristische Hautveränderungen werden bei 70% der Patienten mit manifesten SLE gefunden. Dazu zählen u.a. das der Erkrankung namengebende Schmetterlingserythem auf den Wangen und dem Nasenrücken, akute erythematöse Läsionen an lichtexponierten Stellen, Mundschleimhautulzerationen, lokalisierte, diskoide, hyperkeratotische Hautläsionen in Verbindung mit Vitiligo und Hyperpigmentation sowie eine fleckige Alopezie. Da beim Lupus noch viele verschiedene Organe betroffen sind, gibt folgende Tabelle einen Überblick über weitere mögliche Manifestationen.



**Tabelle 1:** Allgemeinsymptome und Organbeteiligung bei SLE

Allgemeinsymptome (95%)	Herz (35%)	Muskel- und Skelettsystem (95%)
Fieber, Abgeschlagenheit Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme Lymphadenopathie, Splenomegalie Erbrechen, Bauchschmerzen, Durchfall Konjunktivitis, Xerophthalmia sicca	Perikarditis Endokarditis (Libman-Sacks) Aortenklappendefekte systolische Herzgeräusche	Nicht-destruierende Polyarthrit Myalgien avaskuläre Osteonekrosen
Haut (70%)	Niere (35%)	Nervensystem (30%)
Schmetterlingserythem Photosensibilität Alopezie Hyperkeratosen oro-nasale Ulzera	Glomerulonephritis (aller Typen) mit Proteinurie, Hämaturie, Zylinder, Leukozyturie, Kreatinin >1,5mg%, patholog. Nierenbiopsie	Migräne Sehstörungen periphere Neuropathie Psychosen Apoplexie
Vaskulär (45%)	Lunge (15%)	Hämatologisch (80%)
Raynaud-Syndrom Thrombosen, art. Verschlüsse Vaskulitis	Pleuritis Pneumonitis	Leukopenie, v.a. Lymphopenie Thrombozytopenie autoimmunhämolytische Anämie

Das diagnostische Vorgehen basiert vor allem auf Klinik und Labor. Dabei sind die 11 Diagnosekriterien der American Rheumatism Association (ARA) eine Hilfestellung. Bei gleichzeitigem oder seriellem Nachweis von mindestens 4 Kriterien während eines beliebigen Beobachtungszeitraums gilt ein Patient als an einem SLE erkrankt.

**Tabelle 2:** SLE-Diagnosekriterien (nach ARA 1982) [34]

- Schmetterlingserythem
- Diskoide Hautläsionen
- Photosensibilität
- Schleimhautulzerationen: schmerzlose orale oder nasopharyngeale
- Arthritis: mehr als zwei periphere Gelenke
- Serositis: Pleuritis, Perikarditis
- Glomerulonephritis: persistierende Proteinurie >0,5 g/d
- Neuropsychiatrische Auffälligkeiten: Krampfanfälle, Psychosen
- Hämatologische Befunde: hämolytische Anämie, Leukopenie (<4000/mm<sup>3</sup>),  
Lymphopenie (<1500/mm<sup>3</sup>), Thrombopenie (< 10000/ml)
- Immunologische Befunde: LE-Zellnachweis, dsDNS-Autoantikörper,  
Sm-Autoantikörper, falsch-positive Luesreaktion
- Antinukleäre Antikörper: abnorm hoher ANA-Titer

Die Diagnose „Lupus erythematoses“ allein ist kein Grund für eine medikamentöse Therapie. Abhängig von den Krankheitserscheinungen ergibt sich die Notwendigkeit zur Therapie und Art der Behandlung. Individuell angepasst können entzündungshemmende Mittel (nicht-steroidale Antirheumatika, Steroide) und Langzeittherapien mit Antimalariamitteln oder Immunsuppressiva (Azathioprin, Zytostatika wie Cyclophosphamid, Methotrexat) eingesetzt werden, um das vermehrt arbeitende Abwehrsystem zu bremsen. Ein effizientes Therapieprinzip für einen akuten systemischen Lupus erythematoses stellt die Plasmapherese dar, die eine vorübergehende Reduktion von Autoantikörpern und Immunkomplexen bewirkt. Neben der Prophylaxe (Meidung bestimmter Medikamente, Sonnenbestrahlung) ist auch das frühzeitige Erkennen einer Krankheitsaktivierung und Organveränderung für den Erfolg der Behandlung wichtig. Wenn die Erkrankung bald nach ihrem Ausbruch erkannt und behandelt wird, haben die Lupus-Patienten heute eine normale Lebenserwartung (5-JÜR 80-90%, 10-JÜR 70-80%). Die Lebensqualität kann jedoch mehr oder weniger eingeschränkt sein. Trotzdem darf man nicht vergessen, dass es sich um eine chronische Dauererkrankung handelt, die gepaart ist mit den Gefahren einer immunsuppressiven Langzeittherapie.

### **1.3.3 B-Zellen bei systemischem Lupus erythematoses**

Die zahlreichen immunpathogenetischen Mechanismen, die an der Entstehung des systemischen Lupus erythematoses beteiligt sind, sind im Detail noch immer ungeklärt. Eine Assoziation mit unzähligen immunregulatorischen Veränderungen wurde jedoch in den letzten Jahren immer häufiger beschrieben. Nachdem zuerst das Hauptinteresse der Forschung bei den T-Zellen lag, konnte durch Untersuchungen im Tiermodell die essentielle Rolle der B-Zellpathologie für die Pathogenese des SLE gezeigt werden [21]. Vor allem die Produktion verschiedenster Autoantikörper (v.a. Anti-ds-DNA) durch klonal expandierte, autoreaktive B-Zellen, die dadurch das Immunglobulinrepertoire der Lupus-B-Zellen deutlich verändern, sowie eine T-Zell-abhängige Hyperaktivität der B-Zellen zeichnen den systemischen Lupus erythematoses aus. Diese Überaktivität beinhaltet vor allem Veränderungen in der B-Zell-Aktivierung, Signaldefekte, eine zunehmende Expression kostimulatorischer Moleküle (CD 40-Liganden) sowie bestimmten Zytokinen (IL-6, IL-10), die die B-Zell-Funktion stimulieren, verstärkte Mutationsaktivität und Veränderungen in der positiven und negativen Selektion der B-Zellen [21]. Besonders der hohe Grad an somatischen Hypermutationen [6] sowie ein gesteigertes receptor editing [5] in den Keimzentren der

sekundären Lymphorgane werden mit der Entstehung der Autoantikörper in Verbindung gebracht. Eine weitere Analyse der immunregulatorischen Veränderungen beim SLE hat eine vermehrte Expression der RAG 1 und RAG 2-Enzyme, die vor allem im Knochenmark bei der B-Zellentwicklung aktiv sind, im peripheren Blut des SLE-Patienten gezeigt [15], das wiederum die Hypothese des verstärkten „receptor editing“ verdeutlicht.

Da die Kenntnisse über die immunpathologischen Mechanismen, die beim systemischen Lupus erythematodes zur Produktion von verschiedensten Autoantikörper führen, noch immer limitiert sind, konzentrierte sich die Gruppe um Peter E. Lipsky und Thomas Dörner in früheren Untersuchungen auf die Analyse der B-Zellen und ihrer Autoantikörper. Im Vordergrund der Untersuchungen standen die leichten Ketten vom Kappa-Typ, die sowohl in nichtproduktiv als auch in produktiv rearrangierten Immunglobulinen der peripheren B-Zellen von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes analysiert wurden. Frühere Untersuchungen des B-Zell-Repertoires beim SLE haben gezeigt [5], dass einzelne  $V_k$ -Familien und  $J_k$ -Gensegmente unterschiedlich häufig verwendet wurden. Im Vergleich zur Verteilung beim normalen Erwachsenenrepertoire zeigten sich im nichtproduktiven Repertoire keine Unterschiede. Im produktiven Repertoire des SLE hingegen ergab sich eine erhöhte Verwendung von  $J_{k5}$ -Segmenten und eine signifikante Präferenz von  $V_{k1}$ - und  $V_{k4}$ -Mitgliedern, besonders L15, O14/O4 und B3. Zusätzlich enthielten die produktiven  $V_k$ -Genrearrangements mit  $J_{k5}$  signifikant mehr Mutationen, was als Hinweis für ein häufigeres receptor-editing beim SLE als bei normalen Erwachsenen gewertet wurde. Eine verstärkte Mutationsaktivität der  $V_k$ -Genrearrangements in SLE B-Zellen wurde in einer späteren Publikation von Thomas Dörner analysiert [6]. Sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven  $V_k$ -Repertoire waren die Mutationsraten beim SLE signifikant höher als in der normalen Vergleichsgruppe. Zusätzlich zu den „Mutations-hot-spots“ in den CDR-Bereichen, die sich bei den Normalen gezeigt haben, waren viele Mutationen auch in den FR-Regionen zu finden. Wie in früheren Publikationen beschrieben bevorzugte der „Mutator“ auch beim SLE die Motive RGYW und WRCY, um vor allem im nichtproduktiven Repertoire Replacement-Mutationen zu installieren. Das Ergebnis, dass im nichtproduktiven Repertoire mehr Mutationen gezählt wurden als im produktiven Repertoire, sprach für eine negative Selektion von Rearrangements mit Mutationen im Immunglobulinrepertoire von SLE-Patienten. Das Fazit der Untersuchung von Thomas Dörner war somit eine verstärkte Mutationsaktivität in den  $V_k$ -Genrearrangements beim SLE, aber ohne positive Selektion von Rearrangements mit Mutationen. Diese Beobachtung wurde in Zusammenhang mit der Entstehung von Autoreaktivität gebracht.

## 1.4 Fragestellung

Basierend auf den Ergebnissen von Peter E. Lipsky und Thomas Dörner, die 76  $V_kJ_k$  - Rearrangements beim systemischen Lupus erythematoses analysiert haben, ist es das Ziel dieser Arbeit, das  $V_kJ_k$ -Immunglobulinrepertoire in peripheren B-Zellen von Patienten mit systemischen Lupus erythematoses an einer größeren sowohl produktiv (exprimiert) (n=221) als auch nichtproduktiv (nicht-exprimiert) (n=194) rearrangierten Zahl von Immunglobulingenen zu analysieren und mit alterstypischen Repertoires zu vergleichen. Zum Vergleich wurden das Repertoire des Nabelschnurblutes [14], des Erwachsenen [9] und das B-Zell-Repertoire der Tonsille herangezogen. Die Schwerpunkte der Analyse lagen auf dem Aufbau des  $V_k$ -Immunglobulin Repertoires aus einzelnen Familienmitgliedern, um die Rolle der molekularen Präferenz bestimmter Gene in der Entstehung der Autoimmunität herauszufinden, sowie auf der Modifikation der  $V_k$ - $J_k$ -Schnittstelle durch Rekombinationsenzyme (TdT, Exonukleasen, P- und N-Nukleotide, RAG). Neben der Struktur der rearrangierten Gene standen auch die Analysen der somatischen Hypermutation sowie des „receptor editing“ (sekundäres Rearrangement) im Vordergrund. Die Analyse des nichtproduktiven Repertoires ist besonders wichtig, um die direkte Einwirkung von intrinsischen molekularen Prozessen wie Rekombination und somatische Hypermutation zu beurteilen, da die nichtproduktiven Rearrangements nicht durch Mechanismen der antigenabhängigen Selektion beeinflusst werden. Das produktive Repertoire hingegen wird durch eine Vielzahl von antigenabhängigen Selektionsprozessen beeinflusst. Durch den Vergleich beider Repertoires können Einflüsse durch extrinsische molekulare Prozesse aufgezeigt werden [7].

Folgende Hypothesen sind nun in dieser Arbeit zu überprüfen:

B-Zellen von Patienten mit systemischen Lupus erythematoses weisen

1. ein verändertes Immunglobulin-Repertoire,
2. eine erhöhte somatische Hypermutation, sowie
3. ein verstärktes „receptor editing“ auf.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Der erste Schritt bei der Analyse der Lymphozyten von zwei Patienten, die alle Kriterien der Klassifikation des systemischen Lupus erythematoses erfüllten [34], war die Isolierung der B-Zellen aus dem peripheren Blut. Das Blut wurde zunächst verdünnt und mit Heparin gerinnungsunfähig gemacht. Mittels der Ficoll Hypaque Gradientenzentrifugation (**Figur 5a**) wurden dann die mononukleären Zellen, v.a. bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, von den roten Blutkörperchen sowie polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten durch Zentrifugation getrennt. Anschließend wurden aus der heterogenen Lymphozytenpopulation mithilfe von antikörperbeschichteten magnetischen Partikeln in einem starken Magnetfeld die B-Zellen aufgrund der fehlenden Expression eines spezifischen Oberflächenmoleküls negativ selektioniert (Magnetseparation). Da die B-Zellen zahlreiche funktionelle Subpopulationen umfassen, die sich ebenfalls voneinander durch die Expression ihrer jeweiligen Zelloberflächen unterscheiden, wurden sie immunzytochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19 (anti CD 19 monoklonale Antikörper (mAk) von Coulter, Miami, FL) gefärbt, an die Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem FACscalibur Durchflusszytometer analysiert und mit der CellQuest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA) ausgewertet.

### 2.2 Einzelzell-Sortierung

In Abhängigkeit ihrer CD19 Expression wurden die CD19 positiven B-Zellen mittels eines FACsStar<sup>Plus</sup> Durchflusszytometers (Becton Dickinson, San Jose, CA) identifiziert (**Figur 5b**). Das Prinzip dieser Methode beruht zum einen auf einem Laserstrahl, der auf den Zellstrom gerichtet wird, der bei der Wanderung der antikörpermarkierten Zellen durch eine dünne Kapillare entsteht. Zum anderen messen empfindliche Fotodetektoren sowohl das gestreute als auch das emittierte Laserlicht der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Je nach den zu messenden Parametern wurden die Zellen dann aufgeteilt, wobei die CD19<sup>+</sup> B-Zellen in eine 96-PCR-Lochplatte (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA) sortiert wurden. In jedem Loch der PCR-Platte

befanden sich 5 µl Zell-lytische Lösung (50mM KCL, 10mM Tris-HCL, pH 9.0, 0,1% Triton-X-100) (Sigma), die die Zellen und ihre Zellkerne lysierten [3].

### 2.3 DNA-Amplifikation der sortierten Zellen mittels PCR

Um die rearrangierten Immunglobulin-Gene der produktiven und nichtproduktiven  $V_{\kappa}$  - Rearrangements analysieren zu können, musste ein bestimmter DNA-Abschnitt einer individuellen CD19<sup>+</sup> B-Zelle durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) vermehrt werden. Ein Zyklus einer PCR besteht immer aus drei Einzelschritten: Strangtrennung, Hybridisierung der Primer und Verlängerung der Primer durch DNA-Synthese.

Außerdem sind folgende Komponenten zur Durchführung nötig:

Zwei Oligonukleotide (Primer), alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase (Promega, Madison, WI)).

In diesem Fall wurde nach der Zellyse zunächst eine unspezifische Vervielfachung des genomischen Materials einer B-Zelle durchgeführt, wobei ein unspezifischer Primer verwendet wurde, der eine zufällige Nukleotidzusammensetzung aufweist. In 60 Amplifikationszyklen wurde eine allgemeine Vermehrung der genomischen DNA durchgeführt. Die exakte Beschreibung zur Durchführung dieser Präamplifikation wurde aus der Arbeit von Brezinschek et al., 1995 [3], 1997 [2] entnommen.

Im Anschluß daran wurden 2 x 30 Amplifikationszyklen mit spezifischen Primern für die leichte kappa Kette (nested PCR) durchgeführt, die am 5`-Ende von FR1 jeder  $V_{\kappa}$ -Familie und im J-Bereich am 3`-Ende binden. Die Sequenzen der  $V_{\kappa}$ -spezifischen Oligonukleotide basierten auf der Arbeit von Foster et al., 1997 [9].

Sowohl die unspezifischen als auch die spezifischen Primer haben in früheren Analysen eine hinreichend vergleichbare Amplifikationseffizienz untereinander gezeigt.

**Tabelle 3:** Sequenzen der spezifischen Oligonukleotid-Primer für die Amplifikation der V<sub>k</sub>-J<sub>k</sub>-Rearrangements

External 5`primers

V <sub>k</sub> I/IIIE	5`-GCTCAGCTCCTGGGGCT-3`
V <sub>k</sub> IIIE	5`-GGAA(AG)CCCCAGC(AGT)CAGC-3`
V <sub>k</sub> IV/VE	5`-CT(CG)TT(GC)CT(CT)TGGATCTCTG-3`
V <sub>k</sub> VI/VIIE	5`-CT(GC)CTGCTCTGGG(CT)TCC-3`

External 3`primers

J <sub>k</sub> 2E	5`-ACGTTTGATCTCCAGCTTG-3`
J <sub>k</sub> 5E	5`-CTTACGTTTAATCTCCAGTC-3`

Internal 5`primers

V <sub>k</sub> I-I	5`-CATCCAG(AT)TGACCCAGTCTCC-3`
V <sub>k</sub> II-I	5`-TCCAGTGGGGATATTGTGATGAC-3`
V <sub>k</sub> III-I	5`-GTCT(GT)TGTCTCCAGGGGAAAGAG-3`
V <sub>k</sub> IV-I	5`-GACATCGTGATGACCCAGTCTC-3`
V <sub>k</sub> V-I	5`-GGGCAGAAACGACACTCACGCA-3`
V <sub>k</sub> VI-I	5`-TCCAGGGGTGAAATTGTG(AC)TGAC-3`
V <sub>k</sub> VII-I	5`-GCTGCAATGGGGACATTGTGCT-3`

Internal 3`primers

J <sub>k</sub> 2I	5`-CAGCTTGGTCCCCTGGCCAAA-3`
J <sub>k</sub> 5I	5`-CCAGTCGTGTCCCTTGGCCG-3`

## 2.4 Sequenzanalyse

Mittels der Gelelektrophorese, bei der 1,5% Agarosegel (FMC Bioproducts, Rockland, ME) verwendet wurde, wurden die PCR-Produkte je nach Größe, Form und elektrischer Ladung aufgetrennt und sichtbar gemacht. Positive Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und von Agarosegel gereinigt (mittels GenElute<sup>®</sup>-Säulen, Supelco, Bellefonte, PA). Die gereinigten Produkte wurden dann direkt sequenziert unter Verwendung des ABI Prism Dye Termination Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Die hierbei verwendeten Primer entsprachen denen der zweiten PCR-Amplifikationsrunde. Die anschließende Analyse erfolgte mit einem ABI Prism 377 Sequenziergerät (Applied Biosystems, Foster City, CA) (**Figur 6**). Für die Identifikation der V<sub>k</sub>-Gensequenzen wurden die Softwareprogramme Sequencer (Gene codes, Ann Arbor, MI) und Geneworks (release 2.45., IntelliGenetics, Mountain

View, CA) verwendet sowie die Gendatenbank (NCBI, PubMed) benutzt. Die  $V_k$ - (V BASE Sequence Directory) und  $J_k$ -Nomenklaturen basierten auf der Arbeit von Tomlinson et al., 1996 [35].

221 produktive (P) und 194 nichtproduktive (NP)  $V_kJ_k$ -Rearrangements wurden sequenziert, wobei diejenigen als produktiv bezeichnet wurden, deren Leseraster bis zum  $J_k$ -Segment beibehalten wurde.  $V_kJ_k$ -Rearrangements, bei denen der Leseraster aus der Reihe lief oder die zu den Pseudogenen ( $n = 11$ ) gerechnet werden, wurden zu den Nichtproduktiven gezählt. Stop codons in Rearrangements wurden nicht gefunden. An der  $V_kJ_k$ -Schnittstelle wurden Nukleotide definitionsgemäß zur Keimbahn gezählt, wenn zwei aneinandergrenzende Nukleotide mit dem Ende der  $V_k$ - oder mit dem Anfang der  $J_k$ -Keimbahnsequenz übereinstimmten. Hierbei wurden sie je nach Zugehörigkeit der Nukleotide entweder zum  $V_k$ -Gen (5`-germline) oder zum  $J_k$ -Gen (3`-germline) gezählt. Zusätzlich am Ende der Gensegmente angebaute Nukleotide wurden entweder als N-Insertionen bezeichnet, wenn Nukleotide willkürlich ohne Codierung in der DNA-Matrize hinzugefügt wurden, oder als P-Nukleotide, wenn die eingebaute Nukleotidsequenz vom komplementären Strang stammte (Palindrom). Herausgeschnittene Nukleotide an der  $V_kJ_k$ -Schnittstelle wurden je nach Angriffsort der Exonuklease in zwei Gruppen (5`-Ende oder 3`-Ende) eingeteilt.

Die insgesamt 415 analysierten  $V_kJ_k$ -Rearrangements wurden unter Verwendung des Programms Microsoft Excel® in einer Tabelle zusammengefasst, die folgende Informationen enthielt: Sequenzier-Nummer, Name der Sequenz, Sequenziergel, Reihe,  $V_k$ -Gen, Anzahl der Mutationen, Länge der Sequenz, produktives (P) oder nichtproduktives (NP) Rearrangement,  $J_k$ -Gen, CDR3-Länge, Exonuklease-Aktivität am 3`-Ende oder am 5`-Ende der Schnittstelle, Keimbahnbasen am 3`-Ende oder am 5`-Ende, N-Nukleotide und P-Nukleotide am 3`-Ende oder am 5`-Ende der Schnittstelle. Aus dieser Tabelle wurden dann mithilfe einer Filterfunktion die Daten in gewünschter Weise selektioniert, die absoluten Zahlen gezählt und die entsprechenden Prozentwerte berechnet, die wiederum die Basis der Tabellen, Diagramme und Figuren darstellten. Nach der Analyse der  $V_kJ_k$ -Rearrangements wurden die Sequenzen mit dem  $V_kJ_k$ -Repertoire von B-Zellen des Erwachsenen (232 nichtproduktive, 321 produktive), das von Sandy Foster analysiert worden war [9], als auch mit den B-Zellen aus dem Nabelschnurblut (92 nichtproduktive, 102 produktive; [14]) und aus der Tonsille (219 nichtproduktive, 375 produktive; [13]) verglichen.



## 2.5 genetische Polymorphismen

Bei der Analyse der  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements konnten genetische Polymorphismen gefunden werden. Dieser Begriff bezeichnet die Variabilität eines Gensegments, bei dem an bestimmten Stellen im Genlocus strukturelle Varianten mit einer Häufigkeit von über 1% auftreten. Diese Variation (Allele) zeigt sich als Basenwechsel, der entweder keine Auswirkung auf den Leseraster hat oder der zu einem Austausch der Aminosäure führt und dadurch einen Effekt auf die Funktion bewirkt. Zur Kennzeichnung solcher Polymorphismen wurde der Gennamen mit einem „x“ versehen. Insgesamt konnten in 9 Gensegmenten des Lupus-kappa-Repertoire 11 Allele gefunden werden.

**Tabelle 4:** Genetische Polymorphismen im kappa-Genlocus

Gen	Codon Nr.	Wechsel	Anzahl	AS: R/S	AS
L12ax	51	GCG>GCA	15 von 24	S	Ala
A17x	31	TAC>CAC	8 von 8	R	Tyr>His
L8x	70	GAA>GAT	6 von 9	R	Glu>Asp
L8x	74	ACA>ACC	7 von 9	S	Thr
L14x	26	AGG>AGT	16 von 16	R	Arg>Ser
L14x	46	CAC>CGC	16 von 16	R	His>Arg
L24ax	76	AGT>AGC	4 von 8	S	Ser
13K18x	60	GCA>GCC	9 von 9	S	Ala
13K07x	53	AGC>AAC	2 von 3	R	Ser>Asn
Vhx	92	CAT>TAT	6 von 6	R	His>Tyr
B2x	59	CCA>TCA	31 von 40	R	Pro>Ser

## 2.6 Abschätzung der Taq-Polymerase Fehlerrate

Um die Genauigkeit der Amplifikation sowie der Sequenzierung mit der Taq-Polymerase in dieser Analyse abschätzen zu können, wurden mehrmals unspezifische und spezifische Vervielfachungen eines bekannten Rearrangements durchgeführt, bei denen sich eine minimale PCR-Fehlerrate von  $1,0 \times 10^{-4}$  herausstellte [8]. Die maximale PCR-Fehlerrate für  $V_{\kappa}$  lag bei  $1,2 \times 10^{-3}$  Mutationen pro Basenpaar bzw. 0,3 Fehler pro  $V_{\kappa}$ -Rearrangement. Diese maximale Rate wurde bei einem 4-jährigen

Patienten mit Hyper-IgM Syndrom berechnet [5]. Diese Zahlen stimmen beide mit den Fehlerraten überein, die für die Sequenzierung des Hybridoms als auch der Milz berechnet wurden.

## 2.7 Statistische Methoden

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede in der Verteilung von nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements, von unterschiedlichen Zusammensetzungen der Schnittstellen, von Mutationsfrequenzen als auch im Vergleich der B-Zelle des SLE-Patienten, des Nabelschnurblutes, des Erwachsenen und der Tonsille wurde der „**chi-square**“ Test ( $X^2$ -Test) angewendet.

Der „**Chi square goodness of fit**“-Test hingegen wurde in all den Fällen benutzt, in denen zwischen beobachteter und erwarteter Frequenz, die auf der Anzahl der Gene im Genom basiert, verglichen wurde.

Eine statistische Signifikanz in beiden Tests bestand bei p-Werten von gleich oder weniger als 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

Für die CDR3-Länge wurde der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Bei der Mutationsanalyse wurden bestimmte Codons als „**hot spots**“ bezeichnet, wenn sie mehr Mutationen enthielten als der Mittelwert + 1.96 Standardabweichung.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analyse des V<sub>κ</sub>-Rearrangements und Vergleich mit alterstypischen Repertoires

##### 3.1.1 Analyse der Häufigkeiten der V<sub>κ</sub>-Genfamilien in nichtproduktiven und produktiven Immunglobulinrearrangements von B-Zellen des SLE-Patienten

Die menschlichen V-Gen-Segmente lassen sich in Familien einteilen, in denen die Mitglieder mindestens 80 Prozent der DNA-Sequenz gemeinsam haben. Die leichte Kappa-Kette kann man in sieben solcher Familien unterteilen. Sechs dieser Familien enthalten funktionelle Gene. Die siebte Genfamilie wird von einem V<sub>κ</sub>-Gen gebildet, das als Pseudogen bezeichnet wird. Im menschlichen Genom befinden sich von den insgesamt 40 V<sub>κ</sub> Genen 19 in der V<sub>κ1</sub> Familie, 9 in V<sub>κ2</sub>, 7 in V<sub>κ3</sub>, jeweils 1 Gen in V<sub>κ4</sub> und V<sub>κ5</sub> und 3 in V<sub>κ6</sub>. Durch die im Genom bekannte Anzahl der Mitglieder pro Familie konnte man die erwartete Frequenz berechnen und mit der tatsächlichen Häufigkeit der V<sub>κ</sub>-Genfamilien beim SLE-Patienten vergleichen (**Figur 7**). Bei der Berechnung der Signifikanz kam der Chi square goodness of fit Test zur Anwendung. Hierbei zeigte sich, dass von den 194 nichtproduktiven Rearrangements 42,8% Mitglieder der V<sub>κ1</sub> Familie und 20,1% Mitglieder der V<sub>κ3</sub> Familie waren, was beides der erwarteten Frequenz entsprach. Die V<sub>κ2</sub> (8,2%) und V<sub>κ6</sub> (2,7%) Familien waren signifikant weniger exprimiert als erwartet (V<sub>κ2</sub>: p<0,0001, V<sub>κ6</sub>: p<0,01). Im Gegensatz dazu wurden V<sub>κ4</sub> (13,8%) und V<sub>κ5</sub> (13,2%) signifikant häufiger beobachtet als erwartet (p<0,0001).

Im produktiven Repertoire (n = 221) fand sich bei den V<sub>κ1</sub>- (32,1%), V<sub>κ2</sub>- (5,4%) und V<sub>κ6</sub>- (1,3%) Rearrangements eine signifikant geringere Frequenz (V<sub>κ1</sub>, V<sub>κ2</sub>: p<0,0001; V<sub>κ6</sub>: p<0,001). Zusätzlich wurde V<sub>κ1</sub> im produktiven Repertoire negativ selektioniert (p<0,05). Eine positive Selektion zeigte sich aber in der V<sub>κ3</sub>-Familie (36,2%; p<0,0005), die auch noch eine deutliche Signifikanz von p<0,0001 gegenüber der statistischen Erwartung aufwies. Ebenfalls signifikant häufiger lagen V<sub>κ4</sub> (17,3%) und V<sub>κ5</sub> (7,1%) im produktiven Repertoire vor (p<0,0001). Mitglieder der V<sub>κ7</sub> Familie wurden weder in nichtproduktiven noch in produktiven Rearrangements gefunden.

Um die Verteilung der Genfamilien des SLE-Patienten mit alterstypischen Ergebnissen vergleichen zu können, wurde der Chi-square Test (X<sup>2</sup>-Test) angewendet (**Figur 8a und 8b**). Hierbei zeigten sich im Vergleich mit dem Nabelschnurblut [14] im

nichtproduktiven Repertoire keine signifikanten Unterschiede mit Ausnahme der  $V_{\kappa 7}$  Familie, die dort mit 2,2% nachweisbar war ( $p < 0,05$ ). Innerhalb der produktiv rearrangierten  $V_{\kappa}$ -Gene wurde  $V_{\kappa 1}$  im Nabelschnurblut (62,7%) deutlich signifikant häufiger exprimiert als beim SLE-Patienten (32,1%;  $p < 0,0001$ ), wohingegen  $V_{\kappa 3}$  (36,2% versus 21,6%;  $p < 0,01$ ) und  $V_{\kappa 4}$  (17,3% versus 7,6%;  $p < 0,01$ ) eine signifikant geringere Frequenz aufwiesen.

Der Vergleich mit der Tonsillen-B-Zelle [13] zeigte im nichtproduktiven Repertoire signifikante Unterschiede in der  $V_{\kappa 2}$  (17,8% bei der Tonsille versus 8,2% beim Lupus;  $p < 0,005$ ) und  $V_{\kappa 4}$  (21% versus 13,8%;  $p < 0,05$ ) Familie. Zusätzlich wurde  $V_{\kappa 5}$  mit 4,6% gegenüber 13,2% beim SLE-Patienten ( $p < 0,005$ ) signifikant weniger exprimiert. Das produktive  $V_{\kappa}$ -Genrepertoire zeigte keine signifikanten Unterschiede bis auf die  $V_{\kappa 5}$ -Familie, die deutlich seltener ( $p < 0,0001$ ) nachweisbar war als beim SLE-Patienten.

Die nichtproduktiv rearrangierten  $V_{\kappa}$ -Gene des Erwachsenen [9] verwendeten die  $V_{\kappa 2}$ -Familie (29% versus 8,2%;  $p < 0,0001$ ) signifikant häufiger. Im Gegensatz dazu wurden  $V_{\kappa 3}$  (13%;  $p < 0,05$ ),  $V_{\kappa 4}$  (6%;  $p < 0,01$ ) und  $V_{\kappa 5}$  (4%;  $p < 0,005$ ) bei den Erwachsenen signifikant weniger nachgewiesen. Im produktiven Repertoire des Erwachsenen waren  $V_{\kappa 1}$  (44%;  $p < 0,005$ ) und  $V_{\kappa 2}$  (19%;  $p < 0,0001$ ) signifikant häufiger exprimiert als beim SLE-Patienten. Eine signifikant geringere Frequenz lag in der  $V_{\kappa 4}$  (5% versus 17,3%;  $p < 0,0001$ ) und  $V_{\kappa 5}$  (2% versus 7,1%;  $p < 0,005$ ) Familie vor.

### **3.1.2 Analyse der Verteilung der nichtproduktiven und produktiven $V_{\kappa}J_{\kappa}$ - Genrearrangements der peripheren B-Zellen von SLE-Patienten**

Insgesamt wurden 39  $V_{\kappa}$  Gene im nichtproduktiven und produktiven Repertoire des SLE-Patienten gefunden, die sich aus zwei Pseudogenen (L4, A21), 8 Genen mit kleineren Defekten (L9, L8, A26/A10, A20, A18, O12/O2, A5, L16), 29 funktionellen Genen (B3, B2, L12a, L11, L6, L5/L19a, L2, L1, A27, A23, A19/A3, A17, 018/03, 014/04, A1, A2, A7, A11, L14, L19, L20, L23, L24, L25) und aus drei Genen mit unklarer Position (13K04+7, 13K18, Vh), die in der Literatur als anti-Insulin Autoantikörper beschrieben worden sind [18], zusammensetzten. Die Gene B1, L10, A30, A29, 011/01, A4, L15 und L18 waren nicht nachweisbar. Da die J-distale Kasette durch Verdoppelung der J-proximalen Kette [26] entstanden ist, können die Gene 01, 02, 04, L8, A3 und A10 der distalen Kasette von den identischen Genen der proximalen Kasette nicht unterschieden werden.

Beim Vergleich der tatsächlichen Häufigkeit der jeweiligen Gene mit der erwarteten Frequenz, die auf ihrer Verteilung im menschlichen Genom basiert, wurden

Signifikanzunterschiede gefunden. Hierbei kam der Chi square goodness of fit test zur Anwendung (X).

In den nichtproduktiven  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements von den B-Zellen des SLE-Patienten waren besonders die J-proximalen  $V_{\kappa}$  Gene B3 (13,4%;  $p < 0,0001$ ) und B2 (12,9%;  $p < 0,0001$ ) signifikant häufiger exprimiert als erwartet (**Figur 9a**). Bei den nächsten J <sub>$\kappa$</sub> -nahen Genen L6 (5,2%;  $p < 0,05$ ), A27 (6,2%;  $p < 0,001$ ) und 018/08 (8,8%;  $p < 0,0001$ ) zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zur statistischen Erwartung. Eine signifikant geringere Frequenz war beim Gen A19/A3 (1,6%;  $p < 0,05$ ) als auch bei den im nichtproduktiven Repertoire nicht exprimierten Genen B1 und L10 ( $p < 0,05$ ), L5/L19a ( $p < 0,001$ ), A30, 011/01, A1, A4, L15, L16 und L19 ( $p < 0,05$ ) nachweisbar. Insgesamt machte die J <sub>$\kappa$</sub> -proximale Kasette zusammen 82,9% der nichtproduktiv rearrangierten Sequenzen aus. Die J <sub>$\kappa$</sub> -distale Kasette war somit kaum vertreten. Ein Vergleich zur statistischen Erwartung konnte bei den Genen 13K04+7 (1,6%), 13K18 (2,1%) und Vh (2,6%) aufgrund der unklaren Position im  $V_{\kappa}$ -Locus nicht erfolgen.

In den produktiven  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements (**Figur 9b**) bestätigte sich ebenfalls die Dominanz der J <sub>$\kappa$</sub> -proximalen Kasette mit 87% gegenüber der deutlich weniger verwendeten distalen Kasette. Besonders die unmittelbar J <sub>$\kappa$</sub>  angrenzenden Gene B3 (17,6%;  $p < 0,0001$ ), B2 (7,2%;  $p < 0,0001$ ) und L12a (8,1%;  $p < 0,0001$ ) wurden häufiger exprimiert als erwartet. Ebenso wie im nichtproduktiven Repertoire wurden die Gene L6 (9,0%;  $p < 0,0001$ ) und A27 (13,6%;  $p < 0,0001$ ) in den produktiven Sequenzen vermehrt nachgewiesen. Ein weiteres häufig exprimiertes Gen war L2 (10,9%), das zur statistischen Erwartung mit  $p < 0,0001$  eine ausgeprägte Signifikanz zeigte. In der distalen Kasette wurde L14 häufiger verwendet, aber es erreichte keine Signifikanz. Geringer exprimiert als erwartet wurden die Gene L5/L19a ( $p < 0,005$ ), A26/A10 ( $p < 0,05$ ) und 014/04 ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls bestanden signifikante Unterschiede zur statistischen Erwartung bei den Genen B1, L10, L4, A30, A21, A18, 011/01 ( $p < 0,001$ ), A2, A4, A5, A7 und L15 ( $p < 0,05$ ).

Im Vergleich von nichtproduktiven ( $n=194$ ) und produktiven ( $n=221$ )  $V_{\kappa}J_{\kappa}$  -Rearrangements (**Figur 10**) der Lupus-B-Zellen zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Gene. Besonders die Präferenz zu den Genen der J <sub>$\kappa$</sub> -nahen Kasette konnte in beiden Repertoires erkannt werden. Aber nur bei vier Genen konnten signifikante Unterschiede berechnet werden. Dazu zählten die Gene L12a (3,1% NP versus 8,1% P;  $p < 0,05$ ) und A27 (6,2% NP versus 13,6% P;  $p < 0,05$ ) ( $X^2$ -Test). Eine besonders ausgeprägte positive Selektion wurde bei L2 (2,6% NP versus 10,9% P) beobachtet. Der Unterschied der Frequenzen im nichtproduktiven zum produktiven Repertoire war hierbei mit  $p < 0,001$  ( $X^2$ -Test) deutlich signifikant. 018/08 wurde in den nichtproduktiven Sequenzen (8,8%) häufiger exprimiert als erwartet, aber im produktiven Repertoire

(4,1%) zeigte sich eine Abnahme in der Verwendung. Das Gen wurde also mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ( $X^2$ -Test) negativ selektioniert. Die im nichtproduktiven Repertoire besonders gehäuft rearrangierten Gene B2 und 012/02 waren im produktiven Repertoire deutlich weniger exprimiert, aber die Frequenzunterschiede waren nicht signifikant ( $p = 0,054$  bzw.  $p = 0,053$ ). Ebenfalls konnte keine Signifikanz bei L6 nachgewiesen werden, obwohl L6 in den produktiven Sequenzen (9,0%) deutlich häufiger verwendet wurde als in den nichtproduktiven (5,2%).

Um Ähnlichkeiten in der Verteilung der  $V_k$  Gene des SLE-Patienten mit anderen alterstypischen Verteilungen erkennen zu können, wurde das  $V_k$ -Repertoire des SLE-Patienten mit dem Repertoire des Erwachsenen, der Tonsille sowie des Nabelschnurblutes verglichen (**Figur 11a und 11b**). Sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire dieser alterstypischen Verteilungen kristallisierte sich heraus, dass die  $J_k$ -distale Kasette der  $V_k$ -Gene kaum vertreten war. Somit war der Blick besonders auf die  $J_k$ -proximale Kasette gerichtet.

Bei der Gegenüberstellung der nichtproduktiven Lupus-Verteilung und der nichtproduktiven Nabelschnurblut-Verteilung [14] stellte sich eine große Übereinstimmung der Daten heraus. Nur bei den Genen B1, A30 und LFVK431, die beim SLE-Patienten nicht nachgewiesen wurden, zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Auftreten. Für B1 wurde eine Signifikanz von  $p < 0,04$ , für A30 von  $p < 0,0009$  sowie für LFVK431 von  $p < 0,01$  ( $X^2$ -Test) berechnet. Im Vergleich von produktiven Lupus-Repertoire und produktiven Nabelschnurblut-Repertoire wurden häufiger unterschiedliche Signifikanzniveaus festgestellt. Das beim Lupus-Patienten sehr häufig aufgetretene Gen B3 (17,6%) sowie das Gen der distalen Kasette L14 (4,1%) wurden im produktiven Repertoire des Nabelschnurblutes signifikant weniger exprimiert (B3: 6,9%;  $p < 0,01$ , L14: 0%;  $p < 0,04$ ) ( $X^2$ -Test). Allerdings wurden die Gene L9 (7,8% versus 0,5%;  $p < 0,0002$ ), L5/L19a (4% versus 0,5%;  $p < 0,02$ ), A30 (4,9% versus 0%;  $p < 0,0009$ ) und 012/02 (21% versus 2,7%;  $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test) im Nabelschnurblut häufiger verwendet als beim Lupus. Der Vergleich der  $V_k$ -Genverteilung von B-Zellen des Lupus-Patienten und der Tonsille [13] ergab einige unterschiedliche Signifikanzniveaus sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire. In den nichtproduktiven  $V_k$ -Rearrangements zeigten sich Differenzen in der Häufigkeit des Auftretens bei den Genen B3, B2, L1, 011/01, L14 und 13k18. Hierbei traten die Gene B3 (21% versus 13,4%;  $p < 0,05$ ) und 011/01 (3,7% versus 0%;  $p < 0,01$ ) ( $X^2$ -Test) im Tonsillen-Repertoire vermehrt auf, wobei die Gene B2 (12,9% versus 4,6%;  $p < 0,005$ ) und L1 (3,6% versus 0,5%;  $p < 0,02$ ) beim Lupus-Patienten häufiger nachweisbar waren. Die bei den SLE-B-Zellen auftretenden Gene L14 und 13K18 wurden bei den B-Zellen der Tonsille in den nichtproduktiven  $V_k$ -

Rearrangements nicht gefunden. Der Signifikanzunterschied bei L14, das in der distalen Kasette liegt, betrug  $p < 0,005$  und bei 13k18, einem Gen mit unklarer Position im Genom, betrug  $p < 0,03$  ( $X^2$ -Test).

Auch im produktiven Repertoire konnten für diese Gene Signifikanzen berechnet werden (L14:  $p < 0,0005$ , 13k18:  $p < 0,005$ ) ( $X^2$ -Test). Eine weitere Parallele zum nichtproduktiven Repertoire konnte man in der abnehmenden Häufigkeit von B2 in den produktiven Rearrangements der Tonsille (0,5%) gegenüber dem Lupus (7,2%) erkennen. Der Unterschied war mit  $p < 0,0001$  deutlich statistisch signifikant. Desweiteren exprimierten die Tonsillen-B-Zellen die Gene 018/08 ( $p < 0,03$ ) und 012/02 ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test) im produktiven Repertoire signifikant häufiger als die Lupus-B-Zellen. Der Anteil für 018/08 lag bei der Tonsille bei 9,1% und im Vergleich zum Lupus-Patienten bei 4,1%. Für das beim Lupus-Patienten gering nachweisbare Gen 012/02 konnte ein Prozentanteil von 13,1% berechnet werden.

Bei den Erwachsenen IgM<sup>+</sup> B-Zellen [9] zeigte sich in der Analyse der  $V_k$ -Genverteilung eine der Lupus-B-Zelle spiegelbildlich umgekehrte Verteilung. Sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire des Erwachsenen wurde eher das Ende der proximalen Kasette bevorzugt und die Vorliebe zu den unmittelbar dem  $J_k$  angrenzenden Genen, wie sie bei den Lupus-B-Zellen festgestellt wurde, konnte beim Erwachsenen nicht beschrieben werden. Im nichtproduktiven Repertoire wurden die Gene B3 (6% versus 13,4%;  $p < 0,009$ ) und B2 (4% versus 12,9%;  $p < 0,001$ ) ( $X^2$ -Test) beim Erwachsenen statistisch signifikant weniger verwendet als beim Lupus-Patienten. In gleichen Maßen zeigte sich diese Verteilung im produktiven Repertoire des Erwachsenen. Die abnehmende Verwendung von B3 und B2 beim Erwachsenen verdeutlicht ihre berechneten Signifikanzen von  $p < 0,0001$  ( $X^2$ -Test) für B3 und von  $p < 0,002$  ( $X^2$ -Test) für B2. Außerdem ergaben sich in den nichtproduktiven Rearrangements weitere unterschiedlichere Häufigkeiten im Auftreten von  $V_k$ -Genen. Dazu gehörten die Gene L8, A30, A19/A3, A18, A17, L14, Vh und 13k18. Zu den Genen, die beim Erwachsenen signifikant häufiger rearrangiert wurden, zählten A30 (4% versus 0%;  $p < 0,006$ ), A19/A3 (6% versus 1,6%;  $p < 0,03$ ), A18 (6% versus 1,6%;  $p < 0,02$ ) und A17 (7% versus 2,6%;  $p < 0,04$ ) ( $X^2$ -Test). Im Gegensatz dazu wurden die Gene L8, L14, Vh und 13k18 deutlich weniger oder überhaupt nicht nachgewiesen. Hierbei wurden folgende Signifikanzunterschiede festgestellt: L8 ( $p < 0,03$ ), L14 ( $p < 0,004$ ), Vh ( $p < 0,02$ ) und 13k18 ( $p < 0,03$ ) ( $X^2$ -Test).

Das produktive Repertoire zeigte weitere Ähnlichkeiten zum Nichtproduktiven. Es wurden wiederum die Gene A19/A3 mit 9% beim Erwachsenen gegenüber 2,7% ( $p < 0,005$ ) beim SLE-Patienten sowie A17 mit 7% gegenüber 1,4% ( $p < 0,003$ ) signifikant vermehrt exprimiert ( $X^2$ -Test). Desweiteren waren L5/L19a und 012/02 mit einem

Signifikanzunterschied von  $p < 0,05$  und  $p < 0,0006$  häufiger zu finden. Im Gegensatz zum Lupus wurden beim Erwachsenen für L14 ( $p < 0,0003$ ) und 13k18 ( $p < 0,007$ ) auch im produktiven Bereich keine Rearrangements gezählt ( $X^2$ -Test).

### 3.1.3 Analyse der Frequenzen der $J_k$ -Genrearrangements im nichtproduktiven und produktiven Repertoire der peripheren B-Zellen des SLE-Patienten

Die  $J_k$ -Gen-Segmente liegen eingebettet im menschlichen Genom zwischen den variablen ( $V_k$ ) Gen-Segmenten und dem einzelnen konstanten ( $C_k$ ) Gen. Diese  $J_k$  Gruppe beinhaltet wiederum 5 Untergruppen, die aufgrund ihrer Existenz mit jeweils 20% zu erwarten sind. Sowohl in den nichtproduktiven als auch in den produktiven  $V_k$ -Rearrangements wurden alle 5  $J_k$ -Gene verwendet (**Figur 12**). Das am meisten rearrangierte  $J_k$ -Segment war  $J_{k2}$ . Es wurde in beiden Repertoires mit einer Signifikanz von  $p < 0,0001$  (Chi square goodness of fit-Test) deutlich häufiger rearrangiert als statistisch erwartet und machte in den nichtproduktiven Rearrangements 66,8% und in den produktiven sogar 70,6% aus. Der statistischen Erwartung entsprach die Gruppe  $J_{k1}$ , die mit 17,6% im nichtproduktiven und 20,8% im produktiven Bereich als zweit häufigstes Gen-Segment verwendet wurde. In der Reihenfolge als nächstes kam  $J_{k5}$ . Es fand sich eine signifikant geringere Frequenz im nichtproduktiven (13%) und produktiven (6,6%) Repertoire (Chi square goodness of fit-Test). Zusätzlich wurde  $J_{k5}$  noch im produktiven Bereich negativ selektioniert ( $p < 0,02$ ) ( $X^2$ -Test). Das Gen  $J_{k3}$  wurde jeweils nur einmal in den nichtproduktiven und produktiven Rearrangements gezählt, was nicht der statistischen Erwartung entsprach ( $p < 1 \times 10^{-11}$ ). Ebenso selten wurde  $J_{k4}$  rearrangiert (Chi square goodness of fit-Test).

Um die Dominanz von  $J_{k2}$  zu verdeutlichen, wurden die am häufigsten verwendeten Gene B3, B2, L12a, L6, L2, L1, A27, 018/08, 012/02 und L14 hinsichtlich ihrer  $J_k$ -Utilisation im nichtproduktiven (**Figur 13a**) und produktiven (**Figur 13b**) Repertoire untersucht. Hierbei sind die Gene B2 und 018/08 besonders ins Auge gestochen. Das Gen B2 verwendete  $J_{k2}$  in den nichtproduktiven Rearrangements nicht, wohingegen vermehrt  $J_{k1}$  und  $J_{k5}$  rearrangiert wurde. Im produktiven Repertoire hingegen wurden dann  $J_{k2}$  mit 100% positiv selektioniert ( $p < 0,0001$ ) und das nicht nachweisbare  $J_{k5}$ -Gen negativ selektioniert ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test). Eine weitere Ausnahme machte das Gen 018/08. Wie bei allen anderen Genen herrschte die Dominanz von  $J_{k2}$  auch bei 018/08 vor, jedoch nur im nichtproduktiven Repertoire. Im produktiven Repertoire fand eine negative Selektion für  $J_{k2}$  ( $p < 0,002$ ) ( $X^2$ -Test) statt. Es wurde zu 77,8%  $J_{k1}$  und zu 22,2%  $J_{k5}$  rearrangiert. Für die anderen Gene ergaben sich keine signifikanten



Unterschiede in der  $J_k$ -Verwendung zwischen produktiven und nichtproduktiven Rearrangements. Außerdem wurde die  $J_{k2}$  Dominanz in diesen einzelnen Genen bestätigt.

Beim Vergleich der  $J_k$ -Verwendung von SLE B-Zellen mit B-Zellen des Nabelschnurblutes, des Erwachsenen und der Tonsille (**Figur 14a und 14b**) zeigte sich ein ähnliches Bild hinsichtlich der Dominanz von  $J_{k2}$ , der abnehmenden Häufigkeit von  $J_{k1}$ ,  $J_{k5}$  und den kaum verwendeten  $J_{k3}$ - und  $J_{k4}$ -Genen.

Jedoch konnten beim Vergleich gewisse Differenzen in der  $J_k$ -Verteilung herausgearbeitet werden. Der Vergleich von Lupus- und Nabelschnurblut-B-Zellen zeigte im nichtproduktiven Repertoire eine parallele Verteilung, wohingegen die produktiven Rearrangements signifikante Unterschiede in  $J_{k1}$  ( $p < 0,007$ ) und  $J_{k5}$  ( $p < 0,0007$ ) ( $X^2$ -Test) aufwiesen.  $J_{k1}$  wurde mit 8,8% im Nabelschnurblut seltener verwendet als beim Lupus mit 20,8%. Im Gegensatz dazu wurde  $J_{k5}$  beim Nabelschnurblut (18,6%) häufiger rearrangiert als (6,6%) beim Lupus. Die Tonsillen-B-Zelle bevorzugt im nichtproduktiven Repertoire  $J_{k2}$  mehr und  $J_{k1}$  weniger als die Lupus-B-Zelle, wodurch sich unterschiedliche Signifikanzniveaus ergaben ( $J_{k2}$ :  $p < 0,003$ ;  $J_{k1}$ :  $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test). Auch in den produktiven Rearrangements wurde  $J_{k1}$  (12%) signifikant seltener gefunden als beim SLE-Patienten (20,8%). Zusätzlich wurde  $J_{k1}$  der Tonsille positiv selektioniert ( $p < 0,03$ ) ( $X^2$ -Test).

In der  $J_k$ -Verteilung des Erwachsenen wurde  $J_{k3}$  und  $J_{k4}$  sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire signifikant häufiger rearrangiert als beim Lupus-Patienten ( $J_{k3}$ : NP  $p < 0,02$ , P  $p < 0,001$ ;  $J_{k4}$ : NP  $p < 0,0000001$ , P  $p < 0,000000001$ ) ( $X^2$ -Test). Die Dominanz von  $J_{k2}$ , wie sie in den anderen alterstypischen Repertoires gefunden wurde, war beim Erwachsenen weniger ausgeprägt, wodurch es in den nichtproduktiven und produktiven Rearrangements gegenüber den Lupus-Rearrangements zu unterschiedlichen Signifikanzniveaus kam (NP  $p < 0,00000001$ ; P  $p < 0,0000000001$ ) ( $X^2$ -Test). Auch  $J_{k1}$ , das beim Erwachsenen im produktiven Repertoire positiv selektioniert wurde ( $p < 0,03$ ), wurde im produktiven Bereich häufiger verwendet als beim Lupus ( $p < 0,02$ ) ( $X^2$ -Test).

### 3.1.4 Analyse der Länge des CDR 3 in nichtproduktiven und produktiven Immunglobulinrearrangements der peripheren B-Zellen des SLE-Patienten

Definitionsgemäß wurde die Länge des CDR3-Bereichs von Codon 89 bis Codon 97 festgelegt. Hierbei zeigte sich (**Figur 15**), dass bei 54,3% aller produktiver Rearrangements der CDR3-Bereich 27 Nukleotide, bei 25,8% 30 Nukleotide und sogar noch bei 8,3% 33 Nukleotide lang war. Im nichtproduktiven Repertoire zeigten 75,9% der  $V_kJ_k$ -Rearrangements eine Länge von 25-29 Nukleotide. Weitere häufigere CDR3-Längen waren mit 5,2% 22 Nukleotide, mit 8,3% 31 Nukleotide und mit 3,1% 32 Nukleotide. Kürzere und längere CDR3-Regionen wurden gefunden, aber mit geringerer Häufigkeit. Für die durchschnittliche CDR3-Länge im nichtproduktiven Bereich wurde ein Mittelwert von  $27,09 \pm 3,4$  Nukleotiden und im produktiven Repertoire ein Wert von  $27,85 \pm 2,9$  Nukleotiden berechnet. Der Vergleich (**Figur 16a und 16b**) der durchschnittlichen CDR3-Länge zwischen Lupus-Rearrangements und Rearrangements des Erwachsenen zeigte, dass die CDR3-Längen beim Lupus sowohl im produktiven Bereich (Erwachsener  $27,2 \pm 2,5$ ) als auch im nichtproduktiven Bereich (Erwachsener  $26,7 \pm 4,5$ ) etwas länger waren als beim Erwachsenen.

Ansonsten zeigte die CDR3-Länge das Muster einer Gaußschen Verteilung. In den nichtproduktiven Rearrangements konnten beim Vergleich von Lupus- und Erwachsenen-B-Zellen signifikante Unterschiede bei der CDR3-Länge von 23 ( $p < 0,05$ ) und 26 ( $p < 0,0001$ ) Nukleotiden berechnet werden. Die Länge von 23 Nukleotiden wurde beim Erwachsenen (5% versus 1,5%) häufiger und die Länge von 26 Nukleotiden nur beim Lupus-Patienten (18,6%) verwendet. Im produktiven Repertoire wurde die Länge mit 27 Nukleotiden vom Erwachsenen (66%) signifikant ( $p < 0,007$ ) ( $X^2$ -Test) häufiger bevorzugt als vom Lupus (54,3%). Im Gegensatz dazu wurden die Längen 30 und 33 Nukleotide bei den Lupus-Rearrangements vermehrt nachgewiesen ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) ( $X^2$ -Test).

### **3.1.5 Analyse der Modifikationen der V<sub>κ</sub>J<sub>κ</sub>-Schnittstelle durch TdT-Aktivität, Insertionen von palindromischen Nukleotiden und durch Exonukleaseaktivität in nichtproduktiven und produktiven Immunglobulinrearrangements der peripheren B-Zellen des SLE-Patienten**

#### **3.1.5.1 TdT-Aktivität**

Das Enzym Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) fügte in 58,2% der nichtproduktiven und in 47,1% der produktiven Rearrangements N-Nukleotide nach dem Zufallsprinzip an der V<sub>κ</sub>J<sub>κ</sub>-Schnittstelle hinzu (**Figur 17**). Im Vergleich zum Immunglobulinrepertoire des Erwachsenen, bei dem die TdT-Aktivität im nichtproduktiven Bereich mit 69% und im produktiven Bereich mit 57% festgestellt wurde, war die TdT-Aktivität beim Lupus-Patienten sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire signifikant niedriger ( $p < 0,02$ ) ( $X^2$ -Test). Die Insertionen von einem und zwei Nukleotiden waren etwa in 18-20% der nichtproduktiven und in 12-14% der produktiven Rearrangements nachweisbar im Vergleich zu je 16-20% beim Erwachsenen. Mehr als zwei Einfügungen waren in abnehmender Frequenz nachweisbar, aber mehr als 8 Einfügungen wurden nur noch vereinzelt gezählt. Die größte Anzahl an N-Nukleotiden war beim Lupus 10 und beim Erwachsenen 15.

#### **3.1.5.2 Insertion palindromischer Nukleotide am 5`- und 3`-Ende der V<sub>κ</sub>-Gene während des Rearrangements**

Neben den oben beschriebenen N-Nukleotiden wurden noch die P-Nukleotide analysiert. Diese P-Nukleotide haben diese Bezeichnung, weil sie palindromische Sequenzen umfassen, die an das 5`- oder 3`-Ende der Gensegmente angebaut werden (**Figur 18a und 18b**). Insgesamt wurden in 25,4% der nichtproduktiven und 24,1% der produktiven Rearrangements am 5`-Ende P-Nukleotide hinzugefügt. Die Insertion von nur einem P-Nukleotid war etwa in je 18 % der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements am häufigsten nachweisbar. Mehr als eine Insertion wurde seltener beobachtet. Am 3`-Ende wurden im nichtproduktiven Repertoire (24,9%) signifikant häufiger P-Nukleotide hinzugefügt als im produktiven Repertoire (13,6%) ( $p < 0,004$ ) ( $X^2$ -Test). Somit fanden sich in 75,1% aller nichtproduktiven und in 86,4% aller produktiven Rearrangements keine P-Nukleotide. Wenn ein P-Nukleotid hinzugefügt wurde, dann war es zu 22,3% im nichtproduktiven und zu 12,7% im

produktiven Bereich ein einzelnes palindromisches Nukleotid. 2,6% der nichtproduktiven und 6% der produktiven Rearrangements wiesen mehr als zwei Insertionen auf.

### 3.1.5.3 Exonukleaseaktivität an den 5` der J<sub>k</sub>-Gene und 3`-Enden der V<sub>k</sub>-Gene während des Rearrangements

Sowohl an der 5`-Seite als auch an der 3`-Seite der Schnittstelle fand eine deutliche Modifikation durch Exonukleasen statt. Hierzu zählten am 5`-Ende (**Figur 19**) je 77,9% der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements. Im nichtproduktiven Repertoire wurden besonders häufig ein (19,6%), drei (18,6%) und vier (18,6%) Nukleotide an der Schnittstelle entfernt. Im Gegensatz dazu fand sich an der 5`-Seite der produktiven Rearrangements eine Präferenz in der Entfernung von einem (16,3%), drei (37,1%) und fünf (8,1%) Nukleotiden. Beim statistischen Vergleich von nichtproduktiven und produktiven Repertoire konnten für die Wegnahme von drei ( $p < 0,000001$ ), vier ( $p < 0,0000001$ ) sowie von fünf ( $p < 0,03$ ) Nukleotiden unterschiedliche Signifikanzniveaus berechnet werden ( $\chi^2$ -Test). Mehr als 10 Nukleotide wurden selten entfernt. Die größte Anzahl der entfernten Nukleotide waren in den nichtproduktiven 40 und in den produktiven Rearrangements 35. Um die Aktivität der Exonukleasen einschätzen zu können, wurden die Daten der Lupus-B-Zellen mit denen des Erwachsenen verglichen (**Figur 20a und 20b**). Dabei zeigte sich eine vom Lupus nur gering abweichende Exonuklease-Aktivität. Im nichtproduktiven Repertoire des Erwachsenen war die Tendenz vier Nukleotide zu entfernen signifikant geringer vorhanden ( $p < 0,03$ ) ( $\chi^2$ -Test), jedoch wurden häufiger Sequenzen mit Wegnahme von 10 und mehr Nukleotiden gezählt. Bei den produktiven Rearrangements des Erwachsenen gab es signifikant weniger Sequenzen mit Modifikation durch Exonukleasen ( $p < 0,04$ ) ( $\chi^2$ -Test) als beim Lupus. Die Entfernung von drei Nukleotiden wurde mit je 37% ebenso fokussiert.

Auf der 3`-Seite der V<sub>k</sub>J<sub>k</sub>-Schnittstelle wurde bei 13,9% der nichtproduktiven und bei 22,2% der produktiven Rearrangements keine Exonuklease-Aktivität festgesellt (**Figur 21**). Dabei konnte eine unterschiedliche Signifikanz von  $p < 0,03$  ( $\chi^2$ -Test) berechnet werden. Sowohl im nichtproduktiven (22,2%) als auch im produktiven (29,4%) Repertoire zeigte sich eine Präferenz in der Entfernung von nur einem Nukleotid. Desweiteren wurden bei den nichtproduktiven Rearrangements drei (14,4%;  $p < 0,02$ ) und sieben (7,2%;  $p < 0,04$ ) ( $\chi^2$ -Test) Nukleotide signifikant häufiger entfernt als bei den Produktiven. Im Gegensatz dazu wurde im produktiven Repertoire eine Vorliebe für die Wegnahme von fünf (16,7%;  $p < 0,01$ ) ( $\chi^2$ -Test) Nukleotiden nachgewiesen. Die größte

Anzahl entfernter Nukleotide war im nichtproduktiven Bereich mit 16. Im Vergleich (**Figur 22a und 22b**) zum nichtproduktiven Repertoire des Erwachsenen auf der 3'-Seite gab es beim Lupus-Patienten signifikant weniger Sequenzen ohne Exonuklease-Aktivität (13,9% versus 22,2%;  $p < 0,002$ ) ( $X^2$ -Test). Ansonsten war die Verteilung der entfernten Nukleotide mit Ausnahme der Präferenz in der Entfernung von sieben Nukleotiden beim Lupus-Patienten (7,2% versus 1%;  $p < 0,0005$ ) ( $X^2$ -Test) sehr ähnlich. Am 3'-Ende der produktiven Immunglobulinrearrangements ergaben sich beim Vergleich ebenfalls nur geringe Unterschiede. Die Entfernung von fünf und sechs Nukleotiden wurde beim Lupus signifikant häufiger durchgeführt als beim Erwachsenen ( $p < 0,002$ ;  $p < 0,05$ ) ( $X^2$ -Test). Insgesamt kann man auf der 5'-Seite eine deutliche Präferenz in der Entfernung von drei Nukleotiden (von 18,5% im nichtproduktiven und 37,1% im produktiven Repertoire) und auf der 3'-Seite eine Präferenz in der Entfernung von einem Nukleotid (von 22,2% im nichtproduktiven und 29,4% im produktiven Repertoire) erkennen. In dieser 3/1 Entfernung spiegelt sich die Dominanz der  $J_{k2}$  Verwendung wieder. Da  $J_{k2}$  als einziges  $J_k$ -Gen zwei einzelne Nukleotide außerhalb des letzten vollständigen Codons am 5'-Ende aufweist und alle  $V_k$ -Gene je zwei Basen am 3'-Ende besitzen, kommt es bei einer Entfernung von drei Basen am 5'-Ende und von einer Base am 3'-Ende zu einem produktiven Rearrangement mit erhaltenem Leseraster.

### **3.2 Analyse der Mutationen in den nichtproduktiven und produktiven $V_k$ -Rearrangements**

#### **3.2.1 Analyse der Mutationsfrequenzen in den nichtproduktiven und produktiven $V_k$ -Rearrangements und Vergleich mit alterstypischen Repertoires**

Im nichtproduktiven Repertoire des SLE-Patienten wurden von den insgesamt 194 Sequenzen 156 Rearrangements (80,4%) gezählt, die keine Mutationen aufwiesen (**Figur 23**). In 16,5% der Fälle konnten mutierte Sequenzen mit einer bis drei Mutationen gefunden werden und die restlichen 3,1% zählten mehr als vier Mutationen. Die gesamte Anzahl der Sequenzen mit Mutationen (19,6%) war aber im nichtproduktiven Repertoire signifikant geringer ( $p < 0,005$ ) ( $X^2$ -Test) als im produktiven Repertoire, in dem 32,1% aller Rearrangements mutiert waren. Diese vermehrte Zahl der Mutationen im produktiven Repertoire fand sich vor allem in der Kategorie der Sequenzen mit mehr als vier Mutationen wieder, die mit 16,3% signifikant häufiger ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test) im produktiven Repertoire vorhanden waren. Bei den Sequenzen

mit einer bis drei Mutationen gab es keinen Unterschied. Um die Mutationsfrequenzen berechnen zu können, wurden die absoluten Zahlen der  $V_{\kappa}$ -Nukleotide, der  $V_{\kappa}$ -Nukleotide in mutierten Sequenzen, der Mutationen sowie die Anzahl der Codons mit Mutationen bestimmt. Dabei ergaben sich zwischen nichtproduktiven und produktiven Repertoire signifikante Unterschiede von  $p < 0,0001$  in der absoluten Anzahl der Mutationen (116 im NP versus 376 im P) und somit auch in der Anzahl der Codons mit Mutationen (von 470 insgesamt 112 im NP und 358 im P). Aus diesen Angaben konnte eine Mutationsfrequenz für alle  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements im nichtproduktiven Repertoire von  $0,24 \times 10^{-2}$  und im produktiven Repertoire von  $0,68 \times 10^{-2}$  berechnet werden, wobei sich zusätzlich eine Signifikanz von  $p < 0,0001$  ergab. In den mutierten  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements wurden im nichtproduktiven Repertoire  $1,22 \times 10^{-2}$  und im produktiven Repertoire  $2,13 \times 10^{-2}$  berechnet. Auch hier ergab sich ein p-Wert von  $< 0,0001$ . Sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire lag die Mutationsfrequenz in den mutierten  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements somit signifikant höher ( $p < 10^{-40}$ ) ( $\chi^2$ -Test).

Um jedoch die Höhe der Mutationsfrequenzen beurteilen zu können, wurden Vergleichszahlen alterstypischer Repertoires herangezogen (**Figur 24**). Die in der Alterschronologie jüngste B-Zelle stammte aus dem Nabelschnurblut und wies die geringste Mutationshäufigkeit auf. Nur 12% der nichtproduktiven und 6% der produktiven Rearrangements waren mutiert. Hieraus ergab sich eine Mutationsfrequenz von  $4,7 \times 10^{-4}$  im nichtproduktiven und  $2,3 \times 10^{-4}$  im produktiven Repertoire. Die B-Zellen der Tonsille wurden von zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien repräsentiert. Zum einen die frühen B-Zellen des Keimzentrums, bei denen 42% der nichtproduktiven ( $2,3 \times 10^{-3}$ ) und 26% der produktiven ( $1,7 \times 10^{-3}$ ) Rearrangements mutiert waren, und zum anderen die Gedächtnis-B-Zellen mit 30% nichtproduktiven ( $2,7 \times 10^{-3}$ ) und 78% produktiven ( $2,9 \times 10^{-2}$ ) mutierten Sequenzen. Beim Erwachsenen wurden relativ hohe Mutationsfrequenzen von  $0,48 \times 10^{-2}$  im nichtproduktiven und  $1,08 \times 10^{-2}$  im produktiven Repertoire gefunden. In allen mutierten  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements des Erwachsenen stiegen die Mutationsfrequenzen auf  $2,03 \times 10^{-2}$  (P) und  $2,60 \times 10^{-2}$  (NP) [10]. Zusätzlich wurde ein von T.Dörner (1999) [6] beschriebener SLE-Patient als Vergleich miteinbezogen. Dessen Repertoire wies sehr hohe Mutationsfrequenzen auf, die in den nichtproduktiven Rearrangements bei  $3,7 \times 10^{-2}$  und in den produktiven Rearrangements bei  $2,8 \times 10^{-2}$  lagen. Somit waren insgesamt 82% der nichtproduktiven und 75% der produktiven Sequenzen mutiert. Diese hohen Frequenzen konnten bei den in dieser Arbeit analysierten SLE-Patienten nicht gefunden werden und zeigten wiederum die Vielfältigkeit des Lupus erythematoses. Der Vergleich mit den alterstypischen Repertoires zeigte, dass die

Mutationsfrequenzen der Lupus CD19<sup>+</sup> B-Zellen sehr niedrig waren und zwischen den Frequenzen der Tonsille und des Erwachsenen einzuordnen waren.

### **3.2.2 Analyse der Mutationsverteilung in nichtproduktiven und produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

#### **3.2.2.1 Verteilung der Mutationen in den CDR- und FR-Regionen**

Bei der Analyse der Mutationen hat sich die Frage gestellt, ob die Mutationen hinsichtlich ihrer Lage eine Vorliebe für bestimmte Regionen besitzen. Hierbei waren die CDR- und FR-Regionen von besonderem Interesse. Die geringere Anzahl der Mutationen (24,2%) wurde im nichtproduktiven Repertoire gefunden (**Figur 25**), wobei die FR-Region mit 14,8% signifikant häufiger ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test) mutiert war als die CDR-Region mit 9,4%. Im Gegensatz dazu wurden die Mutationen in den produktiven Rearrangements (75,8%) deutlich häufiger im CDR (46,5%) gefunden als im FR (29,3%). Auch hier konnte eine Signifikanz von  $p < 0,0001$  ( $X^2$ -Test) berechnet werden. Desweiteren wurden zwischen dem nichtproduktiven und dem produktiven Repertoire sowohl in der CDR- als auch in der FR-Region unterschiedliche Signifikanzniveaus berechnet ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test). Abschließend kann man feststellen, dass die produktiven Rearrangements häufiger mutiert wurden, wobei der Mutator eine Vorliebe im nichtproduktiven Repertoire für die FR-Region und im produktiven Repertoire für die CDR-Region zeigte.

#### **3.2.2.2 Verteilung der Mutationen auf die Codons**

Um die Verteilung der Mutationen in den Sequenzen detaillierter darzustellen, wurde die Anzahl der Mutationen in den Codons gemäß ihrer Codonposition aufgetragen (**Figur 26**). Daraus ergab sich, dass bestimmte Codonpositionen häufiger Mutationen enthielten. Besonders die Positionen 30 und 93 in den produktiven CDR-Bereichen wurden gegenüber dem nichtproduktiven Repertoire signifikant häufiger mutiert ( $p < 0,05$ ). Aber auch Codonposition 26, 31 (beide CDR1), 50, 53 (beide CDR2) sowie Codon 90 und 92 (beide CDR3) wiesen zum Teil bis 26 Mutationen auf. Im nichtproduktiven Repertoire wurden diese Hotspots im CDR nicht gefunden. Die Mutationen wurden eher über die gesamte Sequenz ohne bestimmte Häufung verteilt.

### 3.2.3 Analyse der Mutationsarten in den nichtproduktiven und produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements

#### 3.2.3.1 Verteilung der Anzahl der Replacement- und Silent-Mutationen in den Codons

Das Mutationsmuster der SLE-B-Zelle wurde genauer analysiert, indem neben der exakten Verteilung auch die Eigenschaften der Mutationen untersucht wurden. Hierbei wurde zwischen den Replacement-Mutationen, die zum Austausch der Aminosäuresequenz und damit der Proteinstruktur führen, und den Silent-Mutationen, die die Struktur nicht beeinträchtigen, unterschieden. Die insgesamt 415 analysierten V<sub>κ</sub>-Rearrangements enthielten 492 Mutationen, von denen 71,5% Replacement- und 28,5% Silent-Mutationen waren. Diese prozentualen Anteile der beiden Mutationsarten wurden sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire gefunden. Hinsichtlich ihrer Verteilung in den CDR- und FR-Regionen zeigten sich die beiden Repertoires unterschiedlich. In den nichtproduktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements (**Figur 27a**) der SLE-B-Zellen wurden insgesamt 117 Mutationen gezählt, wobei 60,7% in der FR-Region zu finden waren. Vor allem FR2 und FR3 enthielten die meisten der insgesamt 41% Replacement- und 19,7% Silent-Mutationen. In den CDR-Bereichen (39,3%) nahm jedoch die Häufigkeit der Replacement auf 29,9% und der Silent auf 9,4% ab. Durch dies zeigte sich, dass der Mutator im nichtproduktiven Repertoire die Mutationen ohne Vermeidung der strukturbestimmenden FR-Regionen fast willkürlich sogar mit gewisser Bevorzugung der FR-Regionen in den Sequenzen verteilte. Auch wurden nur wenige Codonpositionen mit mehr als 4 Mutationen gefunden (Codon 31, 57, 82 und 90).

Die 221 produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements der SLE-B-Zellen wiesen mit 375 signifikant mehr Mutationen auf als das nichtproduktive Repertoire ( $p < 10^{-40}$ ). Im Gegensatz zu den nichtproduktiven Sequenzen zeigte sich hier (**Figur 27b**) eine typische Verteilung mit häufig mutierten (61,1% der gesamten Mutationen) CDR-Bereichen und FR-Regionen, die zu 39,7% (25,3% Replacement und 14,4% Silent) mutiert waren. Besonders die CDR-Regionen wiesen mit 46,7% (175/375) einen hohen Anteil an Replacement-Mutationen auf. Der Anteil der Silent-Mutationen lag wie in den FR-Regionen bei 14,4% (54/375). Bei der Verteilung der Mutationen auf die Codons waren besonders häufig folgende Codonpositionen mutiert: 30, 31, 53, 90, 92 und 93.

Desweiteren wurde die Verteilung der Mutationen in häufig rearrangierten und mutierten V<sub>κ</sub>-Genen analysiert. Nach ihrer Herkunft im kappa-Locus wurden sie in J<sub>κ</sub>-



nahe (**Figur 28a**), J<sub>κ</sub>-ferne (**Figur 28b**) Gene (proximalen Kasette) und in Gene der distalen Kasette eingeteilt und untereinander verglichen. Die Gene L14, A5, L20, L23a und L24a der distalen Kasette wurden im nichtproduktiven und produktiven Repertoire selten mutiert, so dass sie für den Vergleich nicht repräsentativ waren. Ebenfalls erwiesen sich der statistische Vergleich der J<sub>κ</sub>-nahen und -fernen Gene des nichtproduktiven Repertoires durch die geringere Gesamtanzahl an Mutationen als nicht sinnvoll. Wohingegen in den produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements bei der Gegenüberstellung der J<sub>κ</sub>-nahen Gene B3 und B2 und den J<sub>κ</sub>-fernen Genen A27, L2 und L12a unterschiedliche Signifikanzniveaus hinsichtlich der Mutationsverteilungen in den FR- und CDR-Regionen erarbeitet werden konnten. Besonders in den Regionen CDR2, FR3 und CDR3 der J<sub>κ</sub>-nahen Gene wurden signifikant weniger Mutationen gezählt als bei den J<sub>κ</sub>-fernen Genen ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,02$ ;  $p < 0,02$ ) ( $\chi^2$ -Test). Bei den Genen B3 und B2 der J<sub>κ</sub>-nahen proximalen Kasette war das R/S-Verhältnis im CDR1 mit 10,5 (21 Replacement versus 2 Silent) gegenüber den J<sub>κ</sub>-fernen Genen mit einer Rate von 2,9 (29 Replacement versus 10 Silent) deutlich größer, wobei es aber zu keiner Signifikanz reichte. Dieser Vergleich verdeutlichte die Vorliebe des Mutators für die proximale Kasette, wobei besonders die J<sub>κ</sub>-fernen Gene bevorzugt wurden.

### **3.2.3.2 Vergleich der R/S-Verhältnisse in speziellen Regionen nichtproduktiver und produktiver V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Die R/S-Ratio ist eine Zahl, die das Verhältnis von Anzahl der Replacement zur Anzahl der Silent-Mutationen in einem bestimmten Abschnitt der Sequenz beschreibt und einen wichtigen Parameter für eventuelle Strukturveränderungen in den Immunglobulinen darstellt (**Figur 29**) [4]. In den nichtproduktiven Rearrangements ergaben die R/S-Verhältnisse kein einheitliches Bild. Die niedrigste Rate wurde in FR2 (1,2) gefunden, welche wichtige Aufgaben in der Stabilisierung von CDR1 und CDR2 sowie in der Wechselwirkung mit den leichten Ketten besitzt. Dies zeigt, dass der Mutator vermeidet dort strukturverändernde Replacements einzubauen. Im Gegensatz zu FR2 wurden in den Regionen FR1 und FR3 mit R/S-Ratio von 5,0 und 2,9 mehr Replacements gefunden. Bei den CDR-Regionen fiel besonders der CDR1-Bereich mit einem R/S-Verhältnis von 7,0 auf. Daran konnte man erkennen, dass dieser Bereich vom Mutator besonders bevorzugt wurde. CDR2 und CDR3 zeigten eine gewisse zunehmende Frequenz an Silent-Mutationen, wodurch die R/S-Verhältnisse auf 3,3 und 1,8 abnahmen.

An den R/S-Verhältnissen der produktiven Rearrangements konnte man eine Vermeidung der Replacements in den FR-Regionen und eine Vorliebe für Replacements in den CDR-Regionen erkennen. FR1 wies die geringste Rate von 0,6 auf, indem mehr Silent- als Replacement-Mutationen zu finden waren. In FR2 (1,6) und FR3 (2,2) stieg die Anzahl der Replacements wiederum an und damit auch die R/S-Verhältnisse. Die R/S-Ratio der gleichmäßig häufig mutierten CDR-Regionen des produktiven Repertoires variierten nur durch die unterschiedliche Zahl der Silents (CDR1: 3,6; CDR2: 4,2; CDR3: 2,5). Durch Zusammenfassung der einzelnen Regionen konnten für die CDR- und FR-Regionen der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements ein gemeinsamer Wert ermittelt werden. Dabei ergaben sich in den CDRs übereinstimmende R/S-Verhältnisse von 3,2 und in den FRs nur minimal abweichende Werte (NP 2,1; P 1,8).

Beim statistischen Vergleich der R/S-Verhältnisse in den einzelnen FR- und CDR-Regionen der nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, jedoch bei der Gegenüberstellung der R/S-Ratio der zusammengefassten CDR- und FR-Regionen des produktiven Repertoires konnte eine Signifikanz von  $p < 0,008$  ( $\chi^2$ -Test) berechnet werden.

### 3.2.3.3 Darstellung der Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen in nichtproduktiven und produktiven $V_{\kappa}$ -Rearrangements als Funktion (Regression)

Um die Verteilung der Replacement-Mutationen in den nichtproduktiven und produktiven Rearrangements im Detail zu demonstrieren, wurde die Anzahl der Replacements in den CDR- und FR-Regionen als Funktion graphisch dargestellt. Auf der x-Achse wurde die Anzahl der Replacement im CDR-Bereich und auf der y-Achse die Anzahl im FR-Bereich aufgetragen. Aus diesen Punkten konnte dann eine Regressionsgerade konstruiert werden und mittels Berechnung der Regressions- und Korrelationskoeffizienten das Maß der Abhängigkeit der beiden Größen bestimmt werden.

Durch die Berechnung der Geradensteigung im nichtproduktiven Repertoire (**Figur 30a**) (Regressionskoeffizient  $m = 1,32$ ) wurde nochmals verdeutlicht, dass die Replacement häufiger in den FR-Regionen lokalisiert sind als in den CDR-Regionen. Ebenfalls bewies der Korrelationskoeffizient von 0,85, der mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,0001$  zutraf, eine hohe Korrelation zwischen den Replacement im FR und CDR. In den produktiven Rearrangements (**Figur 30b**) waren die Replacement mit

signifikant hoher Wahrscheinlichkeit ( $p < 0,0001$ ) häufiger in den CDR-Regionen gefunden worden, was der berechnete Regressionskoeffizient von 0,8 ebenfalls bestätigt. Der Korrelationskoeffizient von 0,63 wies somit im produktiven Repertoire eine geringere Wechselwirkung in der Verteilung der Replacements auf.

### **3.2.3.4 Vergleich der Häufigkeiten von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl von Replacement-Mutationen in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver Rearrangements**

Zusätzlich zur Analyse der Verteilung der Replacements in den speziellen Regionen war die Bestimmung der Häufigkeit der Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Replacements von Interesse. Die 352 Replacements von insgesamt 492 Mutationen verteilten sich auf 141 Sequenzen, wobei davon 84 Replacement in 39 nichtproduktiven  $V_k$ -Rearrangements gefunden wurden. Innerhalb der nichtproduktiven  $V_k$ -Rearrangements (**Figur 31a**) wurden über 70% der Sequenzen nur einmal im CDR- oder FR-Bereich mutiert. In jeweils 11% zeigten die nichtproduktiven Sequenzen im CDR zwei und fünf Mutationen. Acht Replacements konnten in 5,6% der Fälle gezählt werden. In der FR-Region wurden häufiger (19,1%) drei Mutationen gefunden, aber auch jeweils 4,8% der Sequenzen wiesen 10 und 12 Mutationen auf.

Die restlichen 268 Replacement-Mutationen kamen in 102 produktiven Sequenzen vor. Dabei konnte der im nichtproduktiven Repertoire (**Figur 31b**) erkennbare Fokus auf eine Mutation nur in der FR-Region der produktiven  $V_k$ -Rearrangements mit 51,1% aller Sequenzen beobachtet werden. Die andere Hälfte verteilte sich vor allem auf zwei und drei Replacement pro Sequenz, mehr als vier Replacement wurden nur noch selten gezählt. Die größte Anzahl in der FR-Region des produktiven Repertoires wurde bei 2,1% der Sequenzen mit 7 Replacements gezählt. Im Vergleich dazu wurden in den CDR-Regionen signifikant weniger Sequenzen mit einer Mutation (25,5% versus 51,1%;  $p < 0,008$ ) und signifikant mehr mit fünf Replacements (18,2% versus 2,1%;  $p < 0,009$ ) gefunden ( $X^2$ -Test). Ebenso lagen mit jeweils 1,8% Sequenzen mit einer größeren Maximalanzahl von acht und neun Mutationen vor. Die restliche Verteilung der Replacements in der CDR-Region entsprach derjenigen im FR.

### **3.2.4 Analyse der Lokation der Mutationen in den nichtproduktiven und produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

#### **3.2.4.1 Vergleich der mutierten Nukleotide in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Neben der Lage der Mutationen in den Regionen konnte eine Präferenz des „Mutators“ (Enzym AID, activation induced deaminase) für bestimmte Nukleotide herausgearbeitet werden. Die Base Adenin wurde im nichtproduktiven Repertoire mit insgesamt 41% aller nichtproduktiven Mutationen am häufigsten mutiert, gefolgt von Guanin mit 23,1%, Cytosin mit 19,6% sowie Thymin mit 17,9%. Im produktiven Repertoire wies hingegen Guanin (34,9%) die meisten Mutationen auf, dann erst Adenin (31,7%). Cytosin und Thymin mutierten genauso selten wie im nichtproduktiven Repertoire.

Zusätzlich wurden die mutierten Nukleotide in den CDR-Regionen mit denen in den FR-Regionen verglichen, um eventuelle Vorlieben des Mutators innerhalb der speziellen Regionen herauszufinden (**Figur 32**). Die Verteilung der mutierten Nukleotide in den FR-Regionen entsprach den Ergebnisse, die sich unabhängig von der Region ergaben, d.h. im nichtproduktiven Repertoire Adenin (45,2% versus 26,4%;  $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test) und im produktiven Repertoire Guanin (34,7%). Dabei ergaben sich beim statistischen Vergleich in den nichtproduktiven Rearrangements signifikante Unterschiede des sehr häufig mutierten Adenin gegenüber den anderen drei Basen. Auch im produktiven Repertoire wurde Guanin signifikant häufiger mutiert als die Basen Cytosin und Thymin sowie Adenin häufiger als Thymin. Die Mutationen in den CDR-Regionen bevorzugten im nichtproduktiven Repertoire Adenin (32,6%), wohingegen sie sich in den produktiven Rearrangements gleichmäßig auf Adenin (35,4%) und Guanin (35,4%) verteilten. Dabei konnten gegenüber Cytosin und Thymin jeweils signifikante Unterschiede berechnet werden.

Insgesamt erwiesen sich somit Cytosin und Thymin für den Mutator als weniger interessante Basen.

#### **3.2.4.2 Vergleich der Häufigkeiten von Transversion und Transition in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Der Versuch das Mutationsmuster des systemischen Lupus erythematodes detaillierter darzustellen, warf die Frage auf, welche Veränderungen die Mutationen hervorrufen. Daraufhin wurden die mutierten Nukleotide hinsichtlich ihrer Basensubstitution speziell

in den CDR- und FR-Regionen der nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements untersucht (**Figur 33**). Die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) werden unter dem Buchstaben R und die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T) unter Y zusammengefasst. Der Austausch von Basen innerhalb der Purin- bzw. Pyrimidinbasen wird als Transition bezeichnet. Von einer Transversion spricht man, wenn Purinbasen durch Pyrimidinbasen und umgekehrt ersetzt werden.

Innerhalb der CDR-Regionen der nichtproduktiven Rearrangements zeigten sich nur minimale Unterschiede in der Häufigkeit von Y-(4,7%) und R-(5,1%) Transition als auch von Y-(2,2%) und R-(4,4%) Transversion. Im Gegensatz dazu wurden im produktiven Repertoire die Purinbasen signifikant häufiger verändert als die Pyrimidine ( $p < 0,0001$ ). Mit 31,4% aller Mutationen im CDR bildete die R-Transition den größten Anteil, gefolgt von der R-Transversion mit 27,7%. Etwa ein Drittel davon machten die Pyrimidin-Transition (13,9%) und -Transversion (10,6%) aus.

In den FR-Regionen zeigten sich vor allem in den nichtproduktiven Rearrangements Parallelen zur Verteilung im CDR-Bereich, wobei die jeweiligen Prozentanteile im FR um 2 –5 % höher lagen und die Y(Pyrimidin)-Veränderungen im Vergleich zu den R (Purin)-Veränderungen signifikant seltener vorkamen. Im produktiven Repertoire wurden die Y-Transversion mit 6,5% am wenigsten gezählt, die Y-Transition mit 19,4% kamen den R-Transition und -Transversion mit jeweils 20,4% in Bezug auf ihre Häufigkeit sehr nahe. Trotzdem konnten zwischen den Y- und R-Veränderungen signifikante Unterschiede berechnet werden ( $p < 0,001$ ) ( $X^2$ -Test).

Sowohl in den CDR- als auch in den FR-Regionen bestätigte sich wiederum die Vorliebe für die Veränderungen in den Basen Adenin und Guanin.

### **3.2.4.3 Vergleich der Häufigkeit multipler Mutationen in einem Codon nichtproduktiver und produktiver $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

In einer weiteren Analyse wurden die Codons mit Mutationen beobachtet, ob sich die Häufigkeiten multipler Mutationen innerhalb des gleichen Codons zwischen nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements unterscheiden (**Figur 34**). Nur eine Mutation pro Codon wurde in den allermeisten Fällen gezählt, wobei es im nichtproduktiven Repertoire mit 96,5% häufiger gefunden wurde als im produktiven Repertoire mit 93,1%. Zwei Mutationen im Codon wurden deutlich seltener gefunden, jedoch im produktiven Repertoire (6,9%) etwas häufiger als in den nichtproduktiven Rearrangements. Ein komplett mutiertes Codon wurde im nichtproduktiven Repertoire

nur einmal gezählt. Analyse der Verteilung der Mutationen in bestimmten Motiven nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements

#### **3.2.4.4 Vergleich der Verteilung der Replacement- und Silent- Mutationen in den bestimmten Motiven nichtproduktiver und produktiver $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Nachdem nun die einzelnen Nukleotide hinsichtlich ihres Mutationsverhaltens genauer untersucht wurden, war jetzt das Hauptaugenmerk auf die Umgebung der mutierten Nukleotide gerichtet. Neben den RGYW- und WRCY-Motiven, bei denen schon in früheren Veröffentlichungen eine gesteigerte Mutationsaktivität nachgewiesen wurde [11], enthielt die Analyse zusätzlich die Motive 3`-und 5`-Bridge, d.h. Mutationen an dem benachbarten Nukleotid vor bzw. nach den RGYW und WRCY, sowie das Motiv unrelated, d.h. Mutationen ohne Beziehung zu den beschriebenen Motiven. Die Motive RGYW und WRCY erwiesen sich auch beim SLE-Patienten als „hot spots“ für den „Mutator“ (**Figur 35**). Von allen Mutationsereignissen wurden 45,6% in den beiden Motiven gefunden, wobei die RGYW-Motive (24,5%) signifikant häufiger ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test) mutiert wurden als die WRCY-Motive (18,1%). Die Dominanz der beiden Motive gegenüber den 3`-und 5`-Bridge-Motiven sowie den unrelated-Motiven spiegelte sich in der eindeutigen Signifikanzberechnung wieder (jeweils  $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test). Am wenigsten häufig waren die Mutationen in der Position der 5`-Bridge mit 11,1% lokalisiert, wodurch zu allen anderen Motiven signifikante Unterschiede berechnet werden konnten. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die 3`-Bridge-Motive mit 20,6% als häufig mutierte Region. Die restlichen Mutationen konnten nicht in der Nähe der speziellen Motive gefunden werden, somit erwies sich die Gruppe der unrelated Mutationen mit 22,7% als sehr häufig. Beim Vergleich der Verteilungen in den nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements konnten mit Ausnahme der unrelated Mutationen ( $p < 0,03$ ) ( $X^2$ -Test) keine signifikanten Unterschiede berechnet werden.

Als nächster Schritt wurden sowohl in den nichtproduktiven als auch in den produktiven Rearrangements die Mutationen, sortiert nach Replacement- und Silent-Mutationen, den einzelnen Motiven zugeordnet. Innerhalb des nichtproduktiven Repertoires (**Figur 36**) zeigte sich ein zur Gesamtverteilung ähnliches Bild, bei dem die RGYW- und WRCY-Motive die meisten Mutationen enthielten (8,3%), gefolgt von den unrelated Mutationen (6,1%), den 3`-Bridge- (4,1%) und 5`-Bridge-Motiven (2,3%). Die nichtproduktiven Replacement-Mutationen (6,4%) wurden am häufigsten in den RGYW

und WRCY gefunden, die Silent-Mutationen (2,0%) dagegen konnten meist keinem Motiv zugeordnet werden. Im produktiven Repertoire (**Figur 37**) war wiederum eine deutliche Präferenz für die RGYW und WRCY-Regionen nachweisbar ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test). Neben den Replacement mit 28,4% konnten auch die Silent mit 9% dort am zahlreichsten gefunden werden. In jeweils 16,5% der Fälle lagen die Mutationen in unmittelbarer Nähe als 3'-Bridge (12% Replacement, 4,5% Silent) oder ohne Bezug zu den Motiven als unrelated Mutationen (11,4% Replacement, 5,1% Silent).

Zwischen den einzelnen Motiven wurden deutliche Signifikanzunterschiede ( $X^2$ -Test) berechnet, die in den einzelnen Figuren durch Klammern mit Sternen gekennzeichnet wurden.

#### 3.2.4.5 Vergleich der mutierten Motive in den CDR- und FR- Regionen nichtproduktiver und produktiver $V_{\kappa}$ -Rearrangements

Die  $V_{\kappa}$ -Rearrangements wurden nun hinsichtlich ihrer mutierten Motive im Gesamtrepertoire und speziell in den CDR- und FR-Regionen untersucht. Dabei bezog sich die prozentual berechnete Verteilung der mutierten Motive auf die nichtproduktive und produktive Gesamtanzahl bzw. auf die Gesamtanzahl in den CDR- und FR-Regionen.

Zunächst wurden alle mutierten Motive in den nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements ohne Bezug auf eine spezielle Region analysiert (**Figur 38**). Auffällig war dabei die deutliche Fokussierung des „Mutators“ auf die RGYW- und WRCY-Motive (NP:39,9%; P:47,1%). Besonders im produktiven Repertoire bildeten die RGYW das am häufigsten mutierte Motiv (29%), wodurch sich auch deutliche Signifikanzunterschiede zu den WRCY (18,1%;  $p < 0,0001$ ), den 5'- (11,1%;  $p < 0,0001$ ) und 3'- (20,9%;  $p < 0,002$ ) Bridge-Motiven sowie zu den unrelated Mutationen (20,9%;  $p < 0,002$ ) ( $X^2$ -Test) ergaben.

In den nichtproduktiven Rearrangements wurde die Dominanz der RGYW/WRCY-Motive vor allem durch die große Zahl der „freien“ Mutationen (29,4%) kleiner, die häufiger als die RGYW (21,7%)- und 3'-Bridge (19,6%)-Motive und sogar signifikant häufiger als die WRCY (18,2%;  $p < 0,02$ )- und 5'-Bridge (11,2%;  $p < 0,0002$ )-Motive beobachtet wurden. Signifikanzunterschiede zwischen den Repertoires konnte nur für die freien Mutationen ( $p < 0,05$ ) ( $X^2$ -Test) berechnet werden.

In den CDR-Regionen (**Figur 39**) vergrößerten sich die konträren Verteilungsmuster von nichtproduktiven und produktiven Repertoires. In den nichtproduktiven Rearrangements verminderte sich die Zahl der Mutationen in den RGYW und WRCY-

Motiven auf 36,8% und die Summe der Nicht-RGYW-Motive vergrößerte sich folglich auf 63%, wobei dies besonders durch die Zunahme der freien Mutationen auf 33,3% bedingt wurde. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich ein deutlicher Signifikanzunterschied ( $p < 0,005$ ) ( $X^2$ -Test) zugunsten der Nicht-RGYW-Motive. Die CDR-Regionen der produktiven Rearrangements wiesen hingegen signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Mutationen in den RGYW-Motiven (32,9%) auf als im nichtproduktiven Repertoire (19,3%) und in allen anderen Motiven des produktiven Repertoires (je  $p < 0,0001$ ). Somit wurden fast genauso viele Mutationen in den RGYW- und WRCY-Motiven (48,4%) gefunden wie in den Nicht-RGYW-Motiven (51,6%), die sich zu 13,9% aus 5'-Bridge-, 24,3% aus 3'-Bridge- und zu 13,4% aus unrelated Mutationen zusammensetzten ( $X^2$ -Test).

In den FR-Regionen (**Figur 40**) konnten sowohl im nichtproduktiven (58,1%) als auch im produktiven (55,7%) Repertoire signifikant häufiger ( $p < 0,04$ ) Mutationen in den Nicht-RGYW-Motiven gefunden werden, wobei die freien Mutationen mit 26,7% in den nichtproduktiven und mit 37,7% in den produktiven Rearrangements den größten Teil bildeten, gefolgt von den 3'-Bridge und 5'-Bridge-Motiven. Die RGYW/WRCY-Motive setzen sich im nichtproduktiven Repertoire vor allem aus den RGYW (23,3%) zusammen, gegensätzlich dazu das produktive Repertoire, bei dem die WRCY (24%) häufiger mutiert wurden. Signifikanzunterschiede zwischen den einzelnen Motiven wurden innerhalb des Repertoires mit einer Klammer versehen ( $X^2$ -Test).

#### 3.2.4.6 Vergleich der Lokation der Mutationen in den RGYW- und WRCY-Motiven produktiver und nichtproduktiver $V_{\kappa}$ -Rearrangements

Um Kenntnisse über den Mutationsmechanismus zu gewinnen, wurden die mutierten Motive RGYW und WRCY genauer analysiert. Das Hauptinteresse lag dabei auf der Position der Mutation im Motiv. Zunächst wurde die Position der Mutation in den RGYW- und WRCY-Motiven analysiert, ohne Unterscheidung der beiden Gruppen (**Figur 41**).

In 40,1% der nichtproduktiven und produktiven Motive saß die Mutation auf der zweiten Position, mit 31,1% signifikant ( $p < 0,02$ ) ( $X^2$ -Test) seltener auf der Position drei (31,1%). Die Stellen vier (18,6%) und eins (10,2%) wurden vom „Mutator“ weniger bevorzugt. Die im Gesamtrepertoire häufigere Verwendung der Position zwei wurde im nichtproduktiven Repertoire (**Figur 42a**) etwas weniger (5,5%) und die Position drei minimal mehr (6,1%) mutiert, jedoch dominierten in allen vier Positionen die Replacement- gegenüber den Silent-Mutationen (Signifikanzen zwischen  $p < 0,0002$



und  $p < 0,05$ ) ( $X^2$ -Test). In den produktiven Rearrangements (**Figur 42b**) hatte sich die Position (34,6%) zwei wieder als Fokus für die Mutationen herauskristallisiert. Die Lokation der Mutation auf der dritten Position wurde in 25% gezählt. Mit abnehmender Häufigkeit entschied sich der Mutator für die Positionen vier (14,4%) und eins (7,7%). Wie auch in der nichtproduktiven Verteilung waren die Replacement in der Überzahl ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test).

Im nächsten Schritt wurden die RGYW und WRCY im Bezug auf die Position der Mutation getrennt voneinander untersucht, wobei eine bestimmte Zählweise in den beiden Motiven festgelegt wurde. Die Position zwei im RGYW entspricht auch der Position zwei im WRCY.

Sense-Strang	5` RGYW 3`
Position	1 2 3 4
Antisense-Strang	3` YCRW 5`

Dabei zeigte sich bei den RGYW-Motiven (**Figur 43**) eine deutliche Präferenz des „Mutators“ zur Position zwei (47,3%), die sich in deutlichen Signifikanzunterschieden gegenüber der Position drei (22,4%;  $p < 0,0001$ ), vier (17,5%;  $p < 0,0001$ ) und besonders der Position eins (12,8%;  $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test) widerspiegelte.

Im nichtproduktiven Repertoire (**Figur 44a**) war die zweite Stelle im RGYW zwar am häufigsten mit 5,3% frequentiert, jedoch wurden die Positionen drei (4,3%) und vier (4,2%) nur geringfügig weniger mutiert. Obwohl in den nichtproduktiven Rearrangements eine sehr homogene Verteilung der Mutationen auf die vier Stellen im RGYW zu beobachten war, gab es doch bei den Mutationsarten Unterschiede. Auf den beiden ersten Positionen wurden ausschließlich Replacement-Mutationen nachgewiesen, die dritte und vierte Stelle im RGYW wies eine größere Frequenz an Silent-Mutationen auf. Auch im produktiven Repertoire (**Figur 44b**) stellte sich die Position drei als Fokus für Silent heraus (9,6% versus 8,5% Replacement). Besonders ausgeprägt war die Vorliebe für Mutationen auf der Position zwei (42%), die vor allem den Replacement galt (36,2%). Die restlichen Mutationen wurden zu 18,1% auf der dritten Position, zu 13,3% auf der vierten und zu 10,1% auf der ersten Position gefunden.

Im Gegensatz zu den RGYW-Motiven, in denen 47,3% der Mutationen auf der zweiten Position lokalisiert waren, wurden 44,4% der Mutationen in den WRCY-Motiven (**Figur 45**) auf der Position drei nachgewiesen und nur 29% auf der Position zwei. Die erste Base im WRCY, d.h. Adenin oder Thymin, wurde meist vom „Mutator“ übersprungen (6,4%) und dadurch konnten auch hohe Signifikanzunterschiede zu den anderen

Positionen berechnet werden. In den nichtproduktiven Rearrangements (**Figur 46a**) zeigte sich eine zum Gesamtrepertoire ähnliche Verteilung, nur die Prozentzahlen machten etwa ein fünftel der Gesamtzahlen aus. Das Verhältnis der Replacement- zu den Silent-Mutationen tendierte im vorderen Abschnitt der WRCY leicht zur Seite der Replacement, bei den letzten beiden Basen jedoch waren keine Silent mehr nachweisbar. Im produktiven Repertoire (**Figur 46b**) dominierten die Silent sogar die Positionen eins und zwei, in den anderen Positionen machten die Replacement wieder den Hauptanteil aus. Am häufigsten mutierte Lokation in den produktiven WRCY war wiederum die Position drei mit 35,5%, gefolgt von der Position zwei mit 23,4%, Position vier mit 10,1% und zu letzt die Position eins mit 4%.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Analyse des kappa-Immunglobulinrepertoires in peripheren B-Zellen von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes sowie dessen Vergleich mit alterstypischen Repertoires hinsichtlich Aufbau und den zugrunde liegenden molekularen Prozessen, die bei der Modifikation der V<sub>k</sub>J<sub>k</sub>-Rearrangements beteiligt sind. Dabei lagen die Schwerpunkte der Analyse auf der Verteilung der rearrangierten V<sub>k</sub>-Gene, auf der Enzymaktivität an der Rekombinationsschnittstelle sowie auf der Mutationsaktivität.

### 4.1 Diversität des Genrepertoires

#### 4.1.1 Auswahl der V<sub>k</sub>- Gene

Die Verteilung der in den nichtproduktiven und produktiven V<sub>k</sub>J<sub>k</sub>-Rearrangements gefundenen V<sub>k</sub>-Genen spiegelte nicht ihre Verteilung im Genom wieder, sondern es zeigte sich eine ungleichmässige Streuung über den V<sub>k</sub> Locus. Charakteristisch waren die Bevorzugung der J<sub>k</sub>-nahe gelegenen V<sub>k</sub>-Gene in der proximalen Kassette (NP 82,9%, P 87%) sowie eine Restriktion auf einzelne V<sub>k</sub>-Familien und V<sub>k</sub>-Gene.

Die Analyse des **nichtproduktiven** Immunglobulinrepertoires gibt die Möglichkeit molekulare Prozesse wie z.B. die Rekombination von V und J Genen unabhängig von positiver und negativer Selektion zu untersuchen. In den nichtproduktiven Rearrangements der B-Zellen beim SLE konnte eine signifikante Präferenz für fünf funktionell intakte Gene beobachtet werden. Am häufigsten wurden die J<sub>k</sub>-nahen V<sub>k</sub>-Gene **B3** (13,4%) und **B2** (12,9%) gefunden. Die in der Mitte der proximalen Kassette gelegenen V<sub>k</sub> Gene **L6** (5,2%) und **A27** (6,2%) sowie das am Ende der proximalen Kassette gelegene Gen **018/08** (8,8%) wurden signifikant überrepräsentiert. **012/02** (6,7%) wurde ebenso häufig rearrangiert, der Vergleich mit der erwarteten Frequenz im Genom war jedoch nicht statistisch signifikant.

Der Vergleich der Häufigkeiten der V<sub>k</sub>-Gene von nichtproduktiven SLE B-Zellen mit B-Zellen des Neugeborenen [14], der kindlichen Tonsille [13] und des Erwachsenen [9] zeigte sowohl Unterschiede durch molekulare Präferenzen als auch durch den Einfluß des Antigenkontakts in verschiedenen Entwicklungsstufen bzw. Immunpathologien wie beim SLE.

B-Zellen des **Nabelschnurblutes** rearrangierten die V $\kappa$ -Gene B3, B2 und A27 signifikant am häufigsten. Ansonsten konnte eine große Übereinstimmung beider Repertoires nachgewiesen werden. Im nichtproduktiven Repertoire der **kindlichen Tonsille** dominierten die Gene B3, B2, A27, 018/08 und 012/02, wobei die Dominanz von B3 in der kindlichen Tonsille signifikant stärker ausgeprägt war. B2 hingegen wurde beim Lupus signifikant vermehrt nachgewiesen. Beim **Erwachsenen** zeigte sich eine Verlagerung der molekularen Präferenzen auf das Ende der proximalen Kasette. Durch die Erweiterung auf folgende V $\kappa$ -Gene B3, B2, A27, A18, A17, 018/08 und 012/02 erhöht sich somit auch die Diversität des Immunglobulinrepertoires. B3 und B2 wurden signifikant weniger rearrangiert, hingegen die distaler gelegenen Gene A30, A19/A3, A18 und A17 wurden signifikant häufiger verwendet.

Der Vergleich der V $\kappa$ J $\kappa$ -Rearrangements des Neugeborenen, der kindlichen Tonsille und des Erwachsenen deutet an, dass sich zu den verschiedenen Lebenszeitpunkten die molekulare Präferenz verändert und sich im Laufe des Lebens mit zunehmenden Antigenkontakt die Diversität des Immunglobulinreperotoire deutlich vergrößert, indem z.B. präferentiell V $\kappa$  Gene aus der J $\kappa$  distalen Kasette rearrangiert werden. Das neonatale Repertoire ist zum einen besonders durch molekulare Mechanismen und zum anderen durch den Kontakt mit Autoantigenen geprägt. Bedingt durch die placentare Schranke kann der Fetus nämlich noch keinen Fremdartigen ausgesetzt sein. Im Gegensatz hierzu sammeln B-Zellen aus der kindlichen Tonsille sowie vom Erwachsenen vermehrt Erfahrungen mit Fremdartigen (Infektionen mit Mikroorganismen, Impfungen, Antigenen aus der Umwelt), das sich in der molekularen Erweiterung des V $\kappa$ -Genrepertoires verdeutlicht. Die Ergebnisse aus der Analyse des nichtproduktiven Immunglobulinrepertoires von adulten SLE-Patienten unterscheiden sich vom Repertoire des normalen Erwachsenen durch die signifikante Prädominanz der J $\kappa$  nahen V $\kappa$ -Gene B3 und B2 sowie durch die signifikant geringere Rearrangierung der J $\kappa$  distalen Gene wie A30, A19/A3, A18 und A17. Die V $\kappa$ -Genverteilung des SLE zeigt starke Ähnlichkeit mit der Verteilung des Neugeborenen, aber auch mit der kindlichen Tonsille. Besonders die Dominanz von B3 und in geringem Maße auch von B2 im Lupus, im neonatalen und noch ausgeprägter im Repertoire der kindlichen Tonsille gegenüber dem Erwachsenenrepertoire ist bemerkenswert. Da die V $\kappa$ -Gene B3 und B2 als einzige Ausnahmen der proximalen Kasette durch Inversion und nicht durch die effektivere Deletion rearrangiert werden [12], spielt der Einfluß der chromosomalen Position, die J $\kappa$ -nahe Lage der Gene B3, B2 vom J $\kappa$  beträgt nur 50kb, eine entscheidende Rolle bei der VJ-Rekombination zu spielen. Gründe für den selteneren Gebrauch der J $\kappa$ -distalen Kasette wurden durch den großen chromosomalen Abstand (1500-2000kb) von der J $\kappa$ -Region bis zu den J $\kappa$  distalen V $\kappa$ -Genen, durch den

ineffektiveren Mechanismus der Inversion [12] sowie durch Unterschiede in der Transkription [28] begründet. Eine weitere Begründung versteckt sich vermutlich in der Ähnlichkeit der Jk-proximalen mit den Jk-distalen Vk-Genen, die durch Duplikation entstanden sind. Die Diversität des Immunglobulinrepertoires ist somit durch die identischen bzw. sehr ähnlichen Kopien beider Kassetten nicht gefährdet.

In früheren Vergleichen von nichtproduktiven Rearrangements des SLE-Patienten und des Erwachsenen [5] konnten keine offensichtlichen Unterschiede in der molekularen Präferenz aufgezeigt werden. Die nichtproduktive Vk-Genverteilung vom SLE entsprach am ehesten der Verteilung des Erwachsenen. Das in dieser Arbeit analysierte Repertoire des SLE zeigt starke Ähnlichkeiten mit dem Repertoire des Nabelschnurblutes und der kindlichen Tonsille auf, Unterschiede zum Erwachsenen waren deutlich. Ursächlich für diese Unterschiede könnten zum einen interindividuelle Variationen und zum anderen eine generelle Sequenzvariabilität im Immunglobulinrepertoire von SLE-Patienten als Charakteristikum dieser Autoimmunerkrankung sein. Ebenfalls ist die Auswahl von SLE-Patienten und deren gewonnene B-Zellen für das Ergebnis der Analyse von großer Wichtigkeit. In dieser Analyse dominieren eher junge, evtl. transitionale B-Zellen, in denen eine Ähnlichkeit zu B-Zellen des Nabelschnurblutes besteht.

Die Analyse der **produktiven** Rearrangements, die tatsächlich funktionstüchtige Immunglobulinproteine kodieren, und ihr Vergleich mit dem nichtproduktiven Repertoire liefern Erkenntnisse über Selektions- und Eliminierungsprozesse sowie über die Ausformung des Immunglobulinrepertoires durch Kontakt mit Fremd- und Autoantigenen.

Im produktiven Repertoire der SLE-B-Zellen zeigte sich eine noch deutlichere Dominanz der Jk-proximalen Kasette (87% aller produktiven Vk-Gene). Eine signifikante Bevorzugung im molekularen Auswahlprozess wurde bei den Vk-Genen **B3** (17,6%), **B2** (7,2%), **L12a** (8,1%), **L6** (9,0%), **L2** (10,9%) und **A27** (13,6%) gefunden. Aus der Jk-distalen Kasette wurde nur L14 (4,1%) häufiger verwendet. Beim Vergleich beider Repertoires konnten sowohl positive als auch negative Selektionen in das produktive Immunglobulin Repertoire beobachtet werden. Positiv selektioniert wurden die in der Mitte der proximalen Kasette gelegenen Vk-Gene **L12a**, **L2** und **A27**. Das bereits im nichtproduktiven Repertoire dominierende Gen B3 steigerte seine Präsenz erneut, wobei die Differenz statistisch nicht signifikant war. Die Präferenz von B3, A27 und in gewisser Weise auch von L6 im nichtproduktiven und produktiven Repertoire deutet auf eine besonders starke Vorliebe sowie Stabilität im Selektionsprozess hin. Negativ selektioniert wurde das Vk-Gen **018/08**. B2 und 012/02

wurden ebenfalls deutlich negativ selektioniert, jedoch wurde das Signifikanzniveau gerade nicht erreicht. Die häufige Verwendung von B2, 018/08 und 012/02 im produktiven Repertoire scheint hauptsächlich durch die Präferenz dieser Gene im Rekombinationsprozess (im nichtproduktiven Repertoire) verursacht zu sein und vermutlich wegen geringem Selektionsdruck einem Eliminierungsprozess zu unterliegen.

Beim Neugeborenen zeigten annähernd die gleichen Gene Bevorzugung durch den molekularen Prozess (B3, B2, L12a, L9, L6, L2, A27, 012/02). Positiv selektioniert wurde nur das Gen 012/02. Im produktiven Repertoire der kindlichen Tonsille konnte eine molekulare Präferenz für folgende Gene gefunden werden: B3, L12a, L6, L2, A27, 018/08, 012/02. Hierbei wurden die Gene B2, A18, 014/04, Vh und LFVK431 negativ selektioniert, positiv hingegen L12, L6, L2 und A27. Im adulten Repertoire wurden besonders B3, L12, L6, L2, A27, 012/02, A19/A3 und A17 rearrangiert. Eine positive Selektion konnte bei L12, L2 und A27 nachgewiesen werden. Die positive Selektion von L12, L2 und A27 im Repertoire der kindlichen Tonsille, des Erwachsenen und des SLE-Patienten deuten auf eine antigenabhängige Selektion hin, da alle drei Repertoires Kontakt mit Fremdantigenen haben, wo hingegen die B-Zellen des Nabelschnurblutes nur Autoantigenen begegnen und dadurch einen anderen Selektionsprozess aufweisen.

Durch eine ausgeprägte Restriktion auf einzelne Gene (B3, B2, L12a, L6, L2, A27) im Lupusrepertoire errechneten sich einige signifikante Differenzen zu den drei Vergleichsgruppen. Bei Neugeborenen und Erwachsenen werden vermehrt auch Gene vom Ende der proximalen Kasette rearrangiert und es zeigt sich damit auch eine größere Streuung über den Locus. Hinsichtlich dem überdurchschnittlichem Gebrauch von B3 sowie der Verteilung über den Vk-Locus sind sich das Repertoire vom SLE und der kindlichen Tonsille am ähnlichsten.

Neben dem Prozess der Selektion (L12a, L2 und A27) spielt die Überrepräsentation von B3 eine entscheidende Rolle in der Formung des Repertoires von SLE-Patienten. Dies könnte auch ein Ergebnis aus dem Prozess des receptor editing in sekundären lymphatischen Organen sein. Dabei handelt es sich um eine erneute Genumlagerung bzw. einen Reparaturmechanismus, der nach dem primären im Knochenmark erfolgten Ig-Rearrangement in der Peripherie auftritt. B3 zählt zu den Genen, die durch Inversion rearrangiert werden, und verbleibt auch prinzipiell nach den ersten Rearrangements von distal gelegeneren Genen sowohl im unrearrangierten Vk-Locus als auch innerhalb des Genoms und kann somit weiteren Rearrangements zur Verfügung stehen [36]. Die Vorliebe zu B3 beim Neugeborenen und bei der kindlichen Tonsille wird vor allem durch die Jk-nahe Lage begründet. Beim SLE-Patienten wurde aber auch in früheren

Publikationen gezeigt, dass das receptor editing zum Gen B3 unter bestimmten Umständen vermehrt zu Autoantikörpern führen kann [22] (anti-dsDNA spezifische Idiotyp F4<sup>+</sup>).

In dieser Arbeit konnten jedoch insgesamt keine molekularen „Abnormalitäten“ oder speziellen Defekte in der V<sub>K</sub>-Gen-Selektion gezeigt werden.

#### 4.1.2 Auswahl der Jk-Gene

Bei der Analyse der **Jk-Utilisation** wurden ebenso molekulare Präferenzen festgestellt. Sowohl in den nichtproduktiven als und in den produktiven Rearrangements beim SLE zeigte sich eine deutlich signifikante Verwendung von Jk<sub>2</sub>, gefolgt von Jk<sub>1</sub>, das der erwarteten Frequenz entsprach. Jk<sub>5</sub>, Jk<sub>4</sub> und Jk<sub>3</sub> wurden signifikant weniger verwendet. Bei Jk<sub>5</sub> wurde zusätzlich eine negative Selektion in das produktive Repertoire festgestellt. Um Mechanismen bei der Auswahl von Jk-Genen herausarbeiten zu können, wurden die am häufigsten rearrangierten V<sub>K</sub>-Gene (B3, B2, L12a, L6, L2, L1, A27, 018/08, 012/02 und L14) auf ihre Jk-Verwendung hin untersucht. Die Jk<sub>2</sub> – Präferenz spiegelte sich deutlich wieder, wobei in den Jk-distaleren Genen im produktiven Repertoire Jk<sub>1</sub> dominierte. B2 rearrangierte im nichtproduktiven Repertoire fast nur mit Jk<sub>5</sub>, im produktiven Repertoire jedoch nur noch mit Jk<sub>2</sub>. Im Vergleich zu den anderen Repertoires war die Ähnlichkeit der Jk-Verteilung zum Nabelschnurblut am größten. Nur Jk<sub>1</sub> wurde im produktiven Repertoire signifikant vermehrt und Jk<sub>5</sub> signifikant weniger beim Lupus rearrangiert. In der kindlichen Tonsille war die Jk<sub>2</sub>-Dominanz stärker ausgeprägt. Jk<sub>1</sub> hingegen wurde im nichtproduktiven und produktiven Repertoire weniger exprimiert. Beim Erwachsenen war die Verteilung auf die Jk-Familien 1-5 deutlich verstreuter, wobei die Jk<sub>2</sub> –Dominanz weniger ausgeprägt war. Jk<sub>1</sub>, Jk<sub>3</sub> und Jk<sub>4</sub> waren gegenüber den anderen Repertoires überexprimiert. Letztendlich zeigte sich eine mehr oder weniger ausgeprägte Jk<sub>2</sub>-Dominanz, die nicht zufällig, sondern am ehesten durch intrinsische Regulationsmechanismen verursacht ist. Ein Hinweis auf ein receptor editing, das besonders durch die Bevorzugung von distalen Jk<sub>5</sub>-Genen gekennzeichnet wäre, hat sich nicht, wie in früheren Publikationen [5] beschrieben, bestätigt. Jk<sub>5</sub> wurde sogar beim Lupus-Patienten negativ selektioniert. Auch Jk<sub>4</sub> wurde deutlich unterexprimiert, obwohl es häufig in murinen anti-ds DNA Antikörpern, in 16/6 idiotypischen Anti-DNA Antikörpern (3F7-8) und auch in anti-RO Antikörpern zu finden ist [5]. Obwohl Jk<sub>2</sub> bei unseren SLE-Patienten dominierte, konnten keine A30/ Jk<sub>2</sub>-Rearrangements gefunden werden, die häufig für anti-ds DNA Antikörper speziell bei SLE-Patienten mit Nephritis codieren [33]. All diese Daten zeigen die große Variabilität des systemischen Lupus erythematoses und beweisen

wiederum, dass es kein typisches Muster von autoimmunen V-Genen gibt und sowohl in der Selektion von  $V_k$  als auch von  $J_k$ -Genen keine molekularen Abnormalitäten oder speziellen Defekte zu finden sind.

#### 4.2 Diversität der VJ-Schnittstelle

Einige molekulare Mechanismen, die durch unterschiedliche Aktivität von Enzymen zu einer Diversifizierung der VJ-Schnittstelle führen, spielen eine wichtige Rolle in der Restriktion der CDR3 Länge. In 54,3% der produktiven Rearrangements war die Länge dieser hypervariablen Region auf 27 Nukleotide ( $27,85 \pm 2,9$ ; 9 Aminosäuren) limitiert. Dies ähnelt publizierten Ergebnissen zur CDR3-Länge im  $V_k$ -Repertoire des Erwachsenen ( $27,2 \pm 2,5$ ) [9] und des Neugeborenen ( $27,4 \pm 3$ ) [14]. Im Vergleich zum produktiven Erwachsenen-Repertoire wurden jedoch beim Lupus signifikant häufiger längere CDR3-Regionen gefunden (30 Nukleotide 25,8%, 33 Nukleotide 8,3%). Das nichtproduktive Repertoire zeigte ebenfalls das Muster einer Gausschen Verteilung, mit der Anzahl an Basenpaaren von 1-35 bp. Am häufigsten wurde die Länge von 26 Nukleotiden beim Lupus-Patienten gefunden.

Die nahezu identischen Verteilungsmuster und Mittelwerte der CDR3-Länge beim Neugeborenen, beim Erwachsenen sowie beim SLE-Patienten sind der Ausdruck strenger Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene, die für die Diversität der Schnittstelle verantwortlich sind.

Die Aktivität des Enzyms Terminale Desoxynucleotidyltransferase (**TdT**) bestimmt zu einem großen Teil die CDR3-Länge. Es fügt an der VJ-Schnittstelle nach dem Zufallsprinzip Nukleotide (N-Nukleotide) hinzu. In den SLE-B-Zellen fand sich eine Aktivität des TdT-Enzyms mit N-Nukleotiden in 58,2% aller nichtproduktiven und in 47,1% aller produktiven Rearrangements. Im Vergleich zum Erwachsenen (NP: 69%, P: 57%) [9] ist sie in beiden Repertoires signifikant geringer ausgeprägt, nur beim Neugeborenen (NP: 40%, P: 27%) [14] und in der kindlichen Tonsille (NP: 46%, P: 42,4%) [13] ist die Aktivität noch geringer nachweisbar. Die Daten zeigen zum einen eine vom Entwicklungsstadium abhängige TdT-Aktivität, die zusätzlich durch einen zunehmenden Antigenkontakt beeinflusst sein könnte und zum anderen beim Vergleich nichtproduktiver mit produktiv rearrangierter Immunglobuline eine negative Selektion von N-Nukleotid-haltigen Rearrangements zu allen Lebenszeitpunkten. Die negative Selektion könnte auch ein Hinweis auf ein receptor editing sein, das durch sekundäres Rearrangement von primär nichtproduktiven Sequenzen zu einem produktiven Repertoire mit einer niedrigeren Anzahl von N-Insertionen geführt hat. Ursächlich dafür



ist die zum Zeitpunkt des receptor editing deutlich herunterregulierte Aktivität des TdT-Enzyms. Das Enzym ist besonders in den frühen B-Zell-Entwicklungsstadien beim Rearrangement von schweren und in geringerem Grade von primären leichten  $\kappa$  und  $\lambda$  Immunglobulinketten aktiv [19].

Im nichtproduktiven und produktiven Repertoire von SLE-Patienten und Erwachsenen waren das Einfügen von einem und zwei Nukleotiden am häufigsten, mehr als zwei Insertionen wurden mit abnehmender Frequenz nachgewiesen. Mehr als 8 Nukleotide wurden sehr selten eingebaut, das zum einen vermutlich die Kapazität des Enzyms übersteigt und zum anderen eher das Risiko nichtproduktiver Rearrangements steigert. Der Mechanismus des TdT-Enzyms die Diversität des Immunglobulin Repertoires zu steigern, ist prinzipiell durch seine altersabhängige Reifung und den unterschiedlichen Aktivitätsgrad sehr effektiv, jedoch nur bis zu einem begrenzten Maße sinnvoll.

Das Einfügen von palindromischer Nukleotide (**P-Nukleotide**) am 5'- und 3'-Ende der Gensegmente, die durch eine asymmetrische Auflösung der RAG1 und RAG2 induzierten Haarnadelstruktur am kodierenden Ende der rearrangierenden DNA entstehen [19], war sehr selten. Am 5'-Ende wurde in nichtproduktiven (25,4%) und produktiven (24,1%) Rearrangements geringfügig mehr Nukleotide eingefügt als am 3'-Ende. Das 3'-Ende wies im nichtproduktiven (24,9%) signifikant mehr Nukleotide auf als im produktiven (13,6%) Repertoire. Die bevorzugte, eingefügte Zahl war ein einzelnes palindromisches Nukleotid, wobei im produktiven Repertoire deutlich weniger gezählt wurden. Diese Polymeraseaktivität scheint beim VJ-Rearrangement des Lupus eher eine untergeordnete Rolle zu spielen und trägt nur gering zur Variabilität des B-Zell-Repertoire bei.

Zusätzlich zum Mechanismus der N- und P-Insertionen wird die V $\kappa$ J $\kappa$ -Schnittstelle durch die Aktivität von **Exonukleasen**, die Nukleotide am 5'- und 3'-Ende der Schnittstelle herausschneiden, modifiziert. In über 78% der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements waren Exonukleasen sowohl am 5'- und 3'-Ende ein wesentlicher Bestandteil in der Diversifizierung der Schnittstelle. Dieses Ergebnis entspricht früheren Publikationen vom Neugeborenen [14], von der kindlichen Tonsille [13] und vom Erwachsenen [9], wobei nur geringe Unterschiede in der Häufigkeit entfernter Nukleotide beobachtet wurden. Die Exonukleaseaktivität weist daher sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende ein relativ einheitliches Muster auf, wobei im Gegensatz zur TdT-Aktivität eine generelle Präsenz unabhängig vom Reifestadium und von der Lokalisation im Genom besteht. An der 5'-Seite der Schnittstelle dominierte die Wegnahme von einem (NP: 19,6%, P: 16,3%) und drei (NP: 18,6%, P: 37,1%) Nukleotiden und an der 3'-Seite zeigte sich eine Präferenz in der Entfernung von einem Nukleotid (NP: 22,2%, P: 29,4%). Durch die bevorzugte 3/1 Entfernung der

Nukleotide, beeinflusst durch die Dominanz von Jk<sub>2</sub> im Lupus-Repertoire, entstehen produktive Rearrangements mit erhaltenem Leseraster und meist einer CDR3 Länge von 27 Nukleotiden. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivität und das Muster der Exonukleasen abhängig von der Auswahl der Jk und Vk-Genen sind und somit Selektionseinflüssen untergeordnet sind. Wie jedoch das Zusammenspiel von VkJk Rekombination und die Aktivität der Enzyme an der Schnittstelle funktioniert bzw. durch welche Regulationsmechanismen die Diversifizierung gesteuert werden, ist unbekannt.

### 4.3 Somatische Hypermutation

Neben den bisher beschriebenen Mechanismen (somatische Diversifikation, VJ-Rekombination, Diversifizierung der Schnittstelle durch N- und P-Nukleotiden und Exonukleasen), welche die Vielfalt hervorbringen und während der ersten Entwicklungsphase von B-Zellen in den zentralen lymphatischen Organen stattfindet, gibt es noch den Prozess der somatischen Hypermutation, der nach der Erzeugung funktionsfähiger Immunglobulingene in den peripheren lymphatischen Organen auf die Vielfalt einwirkt. Dieser Prozess führt in die variablen Regionen ungeordneter Gene Punktmutationen ein, die negativen und positiven Selektionseinflüssen unterliegen, um eine bessere Antigenbindung im Laufe einer Immunantwort zu erreichen.

Der Mechanismus der somatischen Hypermutation ist aber noch in Details unbekannt. Frühere Publikationen von Mutationsanalysen [6] beim SLE-Patienten haben eine verstärkte Mutationsaktivität gezeigt, wobei mutierte Rearrangements nicht positiv selektioniert wurden.

Die Analyse des nichtproduktiven und produktiven Repertoires können Hinweise auf das Muster der Nukleotidaustausche geben. Besonders das nichtproduktive Repertoire veranschaulicht das Ergebnis der somatischen Hypermutation, wenn keine Selektion auf eine verstärkte Antigenbindung stattfindet. Der Vergleich der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements hinsichtlich des Mutationsmusters kann uns wichtige Hinweise auf die Einflüsse von positiver und negativer Selektion geben [10].

Die vorliegende Analyse zeigt, dass in nur 26,3% aller VkJk Rearrangements Mutationen gefunden wurden (**Mutationsaktivität**), wobei im produktiven Repertoire signifikant mehr Mutationen gezählt wurden (P: 32,1%, NP: 19,6%), nämlich 376 gegenüber 116 Mutationen im Nichtproduktiven. Die Mutationsfrequenzen für alle VkJk Rearrangements waren somit im nichtproduktiven Repertoire  $0,24 \times 10^{-2}$  und im produktiven Repertoire  $0,68 \times 10^{-2}$ . Besonders auffällig ist die positive Selektion von

Rearrangements mit mehr als 4 Mutationen ins produktive Repertoire, was beweist, dass bevorzugt B-Zellen mit mehreren Mutationen einem positiven Selektionsprozess unterzogen wurden. Durch das Heranziehen von Vergleichszahlen alterstypischer Repertoires ist es möglich die Aktivität zu unterschiedlichen Lebenszeiten und Reifestadien zu beurteilen.

Die somatische Hypermutation und ihr Beitrag zur Diversität des Immunglobulinrepertoires ist beim Neugeborenen am geringsten (NP:  $4,7 \times 10^{-4}$ , P:  $2,3 \times 10^{-4}$ ) [14]. Im Alter von 4-6 Jahren findet man in den B-Zellen der kindlichen Tonsille bereits eine normal aktive Hypermutationsmaschinerie, die vor allem in den Gedächtnis-B-Zellen schon voll funktionsfähig und vergleichbar mit den Mutationsfrequenzen von peripheren B-Zellen des Erwachsenen ist. Besonders im produktiven Bereich weisen diese Gedächtnis-B-Zellen hohe Mutationsfrequenzen auf, da sie die Keimzentren mehrmals durchlaufen haben. Dies ist auch ein Hinweis auf positive Selektion. Die Mutationsfrequenz des Erwachsenen stellt den Referenzwert dar. Im nichtproduktiven Repertoire wurde die Rate  $0,48 \times 10^{-2}$  und im produktiven Repertoire von  $1,08 \times 10^{-2}$  berechnet. Beim Vergleich dieser drei Reifestadien vom Neugeborenen über die kindliche B-Zellen bis zum Erwachsenen erkennt man, dass der Prozess der somatischen Hypermutation zu späteren Lebenszeitpunkten einen wichtigen Stellenwert bei der Entstehung der Antikörperdiversität einnimmt. Beim systemischen Lupus erythematoses beschrieb T. Dörner in früheren Arbeiten sehr hohe Mutationsraten [6], die sich aber in unserer Analyse nicht bestätigten. Insgesamt lag die Rate unserer Lupus CD19<sup>+</sup> B-Zellen deutlich unterhalb der Mutationsaktivität von Erwachsenen. Die Hypothese einer verstärkten Mutationsaktivität beim Lupus erythematoses wurde somit wiederlegt, wobei es die Vielfältigkeit dieser Autoimmunerkrankung erneut verdeutlicht.

Nun stellte sich die Frage, ob es neben der von früheren Arbeiten abweichenden Mutationsaktivität beim Lupus erythematoses auch Unterschiede im **Mutationsmuster** gibt. Die hypervariablen Regionen (CDR) lieben Mutationen, um durch Selektionsprozesse eine bessere Antigenbindung zu erreichen. Im produktiven Repertoire wurden signifikant vermehrt Mutationen in diesen CDR-Bereichen plaziert, um die bewusst gewollte Variabilität und auch Spezifität dieser Antigenbindungsstelle zu erhöhen. Die Gerüstregion (FR), die für die grundlegende Antikörperstruktur verantwortlich ist und auch den größten Bereich an einer Sequenz ausmacht (64 Codons), zählte nur 29,3% der Mutationen. Konträr verhielt sich die Hypermutationsmaschinerie im nichtproduktiven Repertoire. In den FR-Regionen wurden signifikant mehr Mutationen (14,8%) gefunden als in den CDR-Regionen

(9,4%), was zu einer Instabilität des Antikörpers führen kann. Trotzdem war eine positive Selektion dieser Mutationen im FR nachweisbar. Insgesamt kann man aber feststellen, dass das spezifische Mutationsenzym AID (activation induced cytidine deaminase) selektiv CDR-Bereiche und produktive Sequenzen bevorzugt auswählt oder dass Sequenzen mit Mutationen in den CDR-Bereichen besonders häufig positiv ins produktive Repertoire selektioniert werden.

Die Mutationen verteilten sich über die ganze variable Region (CDR und FR), wobei sie sich in den nichtproduktiven Sequenzen eher zufällig ohne bestimmte Häufung verteilten und in den produktiven Sequenzen jedoch Prädilektionsstellen dominierten. Herausragend vor allem Position 30 und 93, aber auch 26, 31, 50, 53, 90 und 92 (alle CDR). Die für multiple Mutationen bevorzugten Codons wurden schon in anderen Analysen als Hotspots der somatischen Hypermutation beschrieben [11].

Die bisherige Mutationsanalyse zeigte eine Selektion von Rearrangements in das produktive Repertoire, wenn die Mutationen in den CDR-Regionen zu finden waren. Nun stellte sich neben der Verteilung der Mutation auch die Frage nach der bevorzugten **Mutationsart**. Es wurde zwischen den Replacement (Austausch)- und den Silent (stillen)-Mutationen unterschieden. Die 415 analysierten V<sub>H</sub>J<sub>K</sub>-Rearrangements enthielten 492 Mutationen, von denen 71,5% Replacement- und 28,5% Silent-Mutationen waren. Diese Verteilung spiegelte sich im nichtproduktiven (R/S 2,44) und produktiven (R/S 2,54) Repertoire in den ähnlichen Werten der R/S-Ratio (Quotient aus Replacement und Silent-Mutationen) wieder. Große Unterschiede zeigten sich hinsichtlich der Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen auf die CDR- und FR-Regionen. In den nichtproduktiven Rearrangements wurden 60,7% der Mutationen in der Gerüstregion (FR), vor allem in FR1 (R/S 5,0) und FR3 (R/S 2,9), gefunden, die besonders von Replacements (R 41%, S 19,7%) dominiert wurden. Auch in den CDR-Regionen und vor allem in der CDR1 Region mit einer R/S Ratio von 7,0 zeigte sich der stärkste Drang zu Replacements. Hotspots mit mehr als 4 Mutationen waren die Codonpositionen 31 (CDR1), 57 (CDR2), 82 (FR3), 90 (CDR3). Diese Beobachtung zeigt, dass im nichtproduktiven Repertoire der Mutator Austauschmutationen sogar mit einer gewissen Bevorzugung in die FR-Regionen setzt, trotzdem die CDR-Regionen ihre Attraktivität für das Einbringen von Mutationen nicht verloren haben. In den produktiven Sequenzen wurden bevorzugt Replacements (46,7%) in den CDR-Regionen (insgesamt 61,1%) gefunden, was zu einem signifikanten Unterschied der R/S-Ratio im CDR- und FR-Bereich führte. Besonders häufig mutiert war der CDR1-Bereich (R/S 3,6) und der CDR2-Bereich (R/S 4,2). Ebenfalls waren beliebte Codonpositionen nachweisbar: 30, 31 (CDR1), 53 (CDR2), 90, 92, 93 (CDR3). Somit wurden Rearrangements mit Replacement-Mutationen im

CDR-Bereich einer positiven Selektion unterzogen, Sequenzen mit Austauschmutationen in der Gerüstregion, die sehr häufig die grundlegende Antikörperstruktur verändern, wurden aus dem funktionsfähigen Repertoire eliminiert. Um den Mechanismus der somatischen Hypermutation zu verstehen, wurde das Mutationsmuster im Bezug auf Verteilung und Art der Mutationen, aber auch auf molekulare Präferenzen hin untersucht. Bei der Gegenüberstellung produktiver Rearrangements mit Jk-nahen Genen (B3, B2) und Jk-fernen Genen (A27, L2, L12a) zeigte sich zum einen eine signifikant geringere Mutationsfrequenz in den Jk-nahen Genen und zum anderen die Bestätigung für die molekulare Präferenz von CDR-Bereichen zum Einbringen von Mutationen. Die Mutationsmaschinerie scheint also in der proximalen Kasette aktiver zu sein, wobei besonders die Jk-fernen Gene bevorzugt werden. Es könnte aber auch sein, dass in der Analyse aller CD19<sup>+</sup> B-Zellen, die nicht vorselektioniert sind, das Ergebnis dadurch beeinflusst wurde, dass Rearrangements mit B2 und B3 geringere Mutationsfrequenzen aufweisen, weil sie naiv d.h. ohne Antigenkontakt und ohne Selektionseinfluss sind. Reifere B-Zellen, die eher distalere Vk-Gene tragen und eher Kontakt mit Antigenen hatten, den Prozess der somatischen Hypermutation schon durchlebt haben und dadurch auch höhere Mutationsfrequenzen zeigen.

In der Regressionsanalyse wurde das bereits beschriebene Mutationsmuster graphisch als Funktion der Gesamtanzahl aller Replacement-Mutationen einer Sequenz dargestellt. Der Regressionskoeffizient (Steigung der Regressionslinie,  $m = 1,32$ ) verdeutlicht, dass in den nichtproduktiven Rearrangements häufiger Austauschmutationen in den FR-Regionen zu finden waren. Wohingegen im produktiven Repertoire die AID (activation induced cytidine deaminase, „Mutator“) bevorzugt Mutationen in den CDR-Regionen positionierte (Regressionskoeffizient  $m = 0,84$ ).

Weitere Untersuchungen richteten ihr Augenmerk auf die Häufigkeit von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl von Replacements in den CDR- und FR-Regionen. In nichtproduktiven Sequenzen wurden in 70% der Fälle nur eine Mutation in den Regionen gezählt. In den restlichen 30% der Sequenzen wurden in den CDR-Bereichen auch bis zu 8 Mutationen und in den FR-Bereichen bis zu 12 Mutationen gefunden. Die CDR-Regionen produktiver Sequenzen enthielten häufiger mehrere Mutationen, wobei die maximale Anzahl 9 Austauschmutationen war. In den FR-Regionen war die AID zurückhaltender. In 51,1% aller Sequenzen wurde nur eine einzige Mutation positioniert. Die andere Hälfte verteilte sich vor allem auf zwei und drei Replacements pro Sequenz, mehr als 4 Mutationen waren selten. Das AID-Enzym

häuft also gerne Mutationen an, produktive Rearrangements mit mehreren Mutationen besonders in den CDR-Bereichen werden besonders gerne positiv selektioniert.

Demnach folgt das AID-Enzym in den V<sub>k</sub>J<sub>k</sub>-Rearrangement von SLE-B-Zellen einem bestimmten Mutationsmuster. Das Enzym bevorzugt für das Einfügen von Mutationen produktive Sequenzen und CDR-Regionen, es zeigt eine Vorliebe für Austauschmutationen sowie für eine generelle Häufung von Replacements in den CDR-Regionen. Darüber hinaus wird eine Präferenz von J<sub>k</sub>-ferneren V<sub>k</sub>-Genen der proximalen Kasette und von bestimmten Codons (26, 30, 31, 50, 53, 90, 92, 93) beobachtet. Die Anzahl der Mutationen pro Codon beschränkte sich zumeist auf eine Mutation. Im produktiven Repertoire konnten in 6,9% der Fälle auch zwei Mutationen gefunden werden. Somit ist die Häufigkeit multipler Mutationen in einem Codon sehr gering und stellt einen gering bevorzugten Mechanismus des Mutators dar.

Beim Vergleich einzelner Nukleotide hinsichtlich ihrer Mutationen fiel eine gewisse Präferenz des AID-Enzyms für bestimmte Nukleotide auf. Mutationsfrequenzen einzelner Basen haben wir nicht berechnet, da wir den Referenzwert in der Keimbahn mittels der Verteilung der einzelnen Basen nicht ermittelt haben. Die Analyse der Anzahl der einzelnen mutierten Basen liefert uns jedoch Hinweise für die Vorliebe des Mutators für bestimmte Basen. Im nichtproduktiven Repertoire wurde Adenin (41% aller nichtproduktiven Mutationen) sowohl in den CDR- als auch in den FR-Regionen am häufigsten mutiert, gefolgt von Guanin (23,1%), Cytosin (19,6%) und Thymin (17,9%). Im produktiven Repertoire wurden bei Guanin (34,9%) und Adenin (31,7%) die meisten Mutationen gezählt. Die Verteilung entsprach der beim Erwachsenen, wohingegen die deutliche Präferenz von Guanin bei SLE-Patienten von T. Dörner hier nicht bestätigt werden konnte [6]. Interessant war außerdem, dass in den CDR- und FR-Regionen Mutationen von Guanin eher ins produktive Repertoire positiv selektioniert wurden, wohingegen in den CDR-Regionen Mutationen von Thymin und in den FR-Regionen Mutationen von Adenin negativ selektioniert wurden. Insgesamt kann man aber feststellen, dass Adenin deutlich häufiger als Thymin und Guanin häufiger als Cytosin Mutationen enthielten. Daraus stellt sich die Frage, ob der Mutator sequenz- oder strangabhängig die Mutationen setzt. In dieser Analyse zeigte sich durch die unterschiedliche Häufigkeit der Mutationen der Basenpaare AT und GC untereinander, dass sich das AID-Enzym vielleicht eher auf einem Strang, dem sense Strang, bewegt. Im nichtproduktiven Repertoire könnte man jedoch eine Strangpolarität für AT-Mutationen (A>T) und eine Sequenzpolarität für GC-Mutationen (G=C) vermuten.

Auch die Untersuchung von Transition und Transversion sollte weitere Hinweise zum Vorhandensein der Strang- oder Sequenzbevorzugung geben. Man unterscheidet

dabei zwischen den R (Purinbasen A und G) - und Y (Pyrimidinbasen C und T) - Transition (Wechsel innerhalb der Basengruppe) und den R- und Y-Transversion (Übergang von einer zur anderen Basengruppe). Es bestätigte sich erneut, dass besonders die Purinbasen Adenin und Guanin (R) im produktiven und etwas geringer im nichtproduktiven Repertoire häufig mutiert waren. Ein Wechsel innerhalb der Purinbasen (Transition) wurde insgesamt nur etwas mehr gezählt, der Übergang zur anderen Basengruppe (Transversion) ging zu meist von den Purinbasen aus. Frühere Publikationen beschrieben das Verhältnis von häufig mutierten Adenin und gering mutierten Thymin sowie die Dominanz von Transition gegenüber Transversion als Hinweis für eine Strangpolarität der Mutationsmaschinerie [4]. Jedoch sind durch die positive und negative Selektionen ins produktive Repertoire zusätzlich Selektionseinflüsse nachweisbar, die die Verteilung der Mutationen strangunabhängig verändern können.

Ein weiteres Ergebnis unserer Analyse beweist die schon in älteren Publikationen beschriebene Präferenz der Mutationsmaschinerie für einzelne DNA-Motive, unabhängig von Strangpolarität. Besonders Rogozin und Kolchanov [24] untersuchten in einer Computer unterstützten Analyse sogenannte hotspots, die besonders häufig mutiert waren. Das RGYW-Motiv, bei dem R für Adenin oder Guanin, das G für Guanin, das Y für Cytosin oder Thymin und das W für Adenin oder Thymin steht, findet man auf dem sense-Strang und seine inverse Wiederholung, das WRCY-Motiv (W = Adenin oder Thymin, R = Adenin oder Guanin, C = Cytosin, Y = Cytosin oder Thymin) auf dem anti-sense-Strang, wobei auf dem sense-Strang das RGYW-Motiv häufiger vorkommt. Unsere Arbeit enthielt zusätzlich die Motive 3`- und 5`-Bridge. Diese Motive liegen als „Brücken“ zu den RGYW und WRCY-Motiven und beinhalten je zwei Nukleotide, die an das 3`-Ende (3`-Bridge) und das 5`-Ende (5`-Bridge) der beiden Motive angrenzen. Sie liefern Hinweise auf eine Ungenauigkeit der Mutationsmaschinerie. Mutationen, die keinem Motiv zugeordnet werden konnten und ohne Beziehung zu den beschriebenen Motiven auftraten, wurden zur Gruppe der unrelated-Mutationen gezählt.

Die Analyse des nichtproduktiven Repertoires hinsichtlich ihrer mutierten Motive ist besonders wichtig, um das Muster der somatische Hypermutationsmaschinerie unabhängig von Selektionseinflüssen zu beurteilen, wohingegen der Vergleich des Mutationsmuster im nichtproduktiven und produktiven Repertoires Einflüsse von Selektionsprozessen wiedergibt.

In beiden Repertoires war eine deutliche Fokussierung des Mutators auf die RGYW- und WRCY-Motive nachweisbar (NP:39,9%, P: 47,1%), wobei das RGYW-Motiv den größten Anteil an allen mutierten Motiven ausmachte, in abnehmender Häufigkeit

gefolgt von der 3'-Bridge, dem WRCY sowie zuletzt der 5'-Bridge. Auffällig war die große Anzahl an freien Mutationen ohne Bezug zu Motiven. Im nichtproduktiven Repertoire wurden insgesamt 29,4% der Mutationen und im produktiven Repertoire 20,9% nicht in Motiven gefunden. Der Anteil nicht in Motiven gelegener Mutationen war besonders in den CDR-Regionen nichtproduktiver Rearrangements hoch, wobei eine negative Selektion ins produktive Repertoire gefunden wurde. Aber auch in den strukturbestimmenden FR-Regionen wurden interessanterweise am häufigsten Mutationen ohne Bezug zu Motiven gefunden, was ein Hinweis auf eine zufällige Streuung der Mutationen und weniger ein auf ein motivbetontes Mutationsmuster ist. Auffällig war aber eine positive Selektion dieser Mutationen ins produktive Repertoire. In den CDR-Regionen lässt sich dieser große Anteil an freien Mutationen durch das Bestreben nach Verbesserung der Antigenbindung erklären, wobei in den FR-Regionen trotz erhöhtem Risiko die Struktur des Antikörpers zu verändern, vermutlich die Diversität des Immunglobulinrepertoires dadurch gesteigert werden soll.

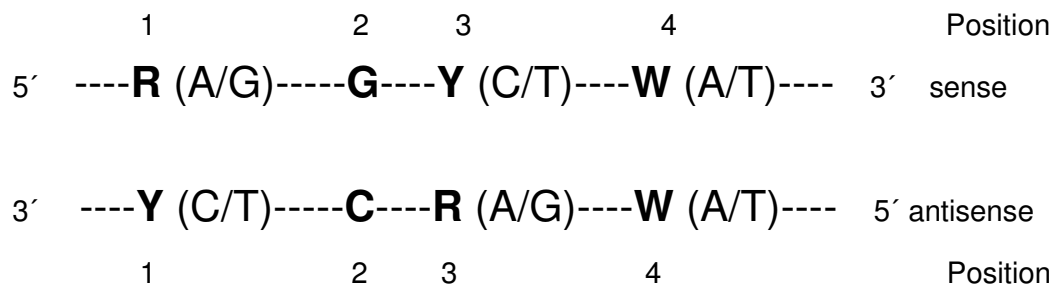
Wenn im produktiven Repertoire FR-Motive mutiert wurden, dann etwas mehr die WRCY- (24%) als die RGYW-(23,3%) Motive, was wiederum im Gesamt-Vk-Repertoire und in den CDR-Regionen umgekehrt nachweisbar war. In den CDR-Regionen wurden im produktiven Repertoire signifikant mehr die RGYW-Motive mutiert und sogar positiv selektioniert. Interessanterweise werden deutlich häufiger Mutationen am 3'-Ende gezählt. Der Mutator bevorzugt somit die 3'-Bridge gegenüber der sehr wenig mutierten 5'-Bridge und bezieht dieses Motive in seinen Mutationsprozess mit ein. Besonders häufig steuert die Mutationsmaschinerie die 3'-Bridge in den CDR-Bereichen produktiver Rearrangements an, wohingegen in den FR-Regionen freie Mutationen und Mutationen in den WRCY- und RGYW-Motiven mehr mutiert wurden. Insgesamt kann man durch die Motiv-Analyse feststellen, dass im nichtproduktiven Repertoire zwar RGYW und WRCY-Motive angesteuert werden, jedoch die Arbeitsweise des Mutators ungenauer ist und Mutationen eher zufällig ohne Mutationsmuster verstreut sind, verdeutlicht durch die hohe Anzahl unrelated Mutationen. Im produktiven Repertoire zielt der Mutator direkt auf die RGYW und WRCY-Motive sowie auf das Motiv der 3'-Bridge, die besonders in den CDR-Regionen gehäuft mutiert wurde und somit durch eine gezielte Unschärfe des Mutators vermutlich zur Diversität beitragen soll. Zusätzlich zu einer motiv-abhängigen somatischen Hypermutation wirken durch Antigenstimulation hervorgerufene selektive Einflüsse auf die Rearrangements ein. In den CDR-Regionen und im Gesamtrepertoire wurden besonders Mutationen in Motiven positiv selektioniert, hingegen waren freie Mutationen in den FR-Regionen darüber hinaus sehr beliebt. Hinsichtlich der Mutationsart dominierten deutlich die Replacement-Mutationen gegenüber den Silent-



Mutationen. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Motiven zeigten sich darin nicht.

Ein weiterer Schwerpunkt bei der Analyse der Motive war die Lokalisation der Mutation in den RGYW und WRCY-Motiven. Hierbei ist die Orientierung der Motive auf dem sense- und antisense-Strang von großer Bedeutung.

Schematische Darstellung der RGYW und WRCY –Motive auf dem DNA-Strang:



Im produktiven Repertoire zeigte sich in den beiden Motiven RGYW/WRCY eine Bevorzugung der zweiten und dritten Position, am seltensten wurde Position eins mutiert. Auffällig war die homogene Verteilung der Mutationen auf alle vier Positionen in den Motiven des nichtproduktiven Repertoires. Im RGYW-Motiv wird in 5′-3′-Orientierung gezählt und hier war besonders die zweite Position signifikant häufiger mutiert, gefolgt von der Position drei. Bevorzugte Mutationsart war die Replacement-Mutation, wobei auf Position drei noch am häufigsten Silent-Mutationen gezählt wurden. Im WRCY-Motiv, gezählt in 3′-5′-Orientierung, dominierte die Position drei und signifikant in geringem Masse auch die Position zwei. Dies zeigt, dass in 5′-3′-Orientierung die Position zwei im RGYW der Position „dritte Base“ im WRCY und die Position zwei im WRCY auch der Position „dritte Base“ im RGYW entspricht. Dieses Erkenntnis ist ein Hinweis, dass der Mutator (das Enzym AID) an der Position zwei im 5′-3′- Leseraster bevorzugt ansetzt, unabhängig von den Motiven RGYW und WRCY. Daraus stellt sich die Frage, ob das Enzym AID bevorzugt die Position 5′-2 mutiert oder eher präferentiell bestimmte Basen ansteuert, wie z.B. im RGYW die Base Guanin an der zweiten Position bzw. Cytosin/Thymin an der dritten Position und im WRCY die Basen Adenin/ Guanin an der dritten Position bzw. Cytosin an der zweiten Position. Unsere Ergebnisse in der Analyse der mutierten Basen bestätigte eine gewisse Häufung von Guanin. Zusammenfassend kann man aber feststellen, dass sicherlich mehrere Mechanismen die Mutationsmaschinerie beeinflussen. Zunächst steuert der Mutator gezielt bevorzugte Motive auf beiden Strängen an, jedoch bestehen zusätzlich innerhalb dieser Motive Erkennungssignale oder räumliche Strukturen,

wodurch der Mutator bevorzugt die Position 5'-2 mutiert. Außerdem beeinflussen Selektionsprozesse das produktive Repertoire.

Die somatische Hypermutation ist ein effektiver Mechanismus die Diversität eines Immunglobulinrepertoires zu erhöhen, sie bringt aber auch die Gefahr mit sich, dass Antikörper durch falsch platzierte Mutationen autoreaktiv werden oder ihre Struktur und damit verbunden ihre Effektorfunktionen verlieren. Dieser Balanceakt zwischen funktionsfähigem Immunglobulin mit breitem Spektrum und möglicher Autoimmunität könnte die Ursache der Vielzahl von Autoantikörpern beim Lupus erythematodes sein. In früheren Publikationen [7] wurden Hinweise gefunden, dass potentielle Autoantikörper während der Immunantwort auf fremde Antigene durch somatische Hypermutation entstehen können, die eigentlich auf molekularer Ebene, d.h. während der VJ-Rekombination keine Autoreaktivität haben. Zum einen die verstärkte Mutationsaktivität [6] und zum anderen die Stimulation durch exogene Antigene, wie zum Beispiel durch Pneumokokken-Antigen [7] konnten Autoreaktivität entstehen lassen. Außerdem wurde die zunehmende Frequenz von Replacement-Mutationen in den CDR-Regionen, die besonders die Affinität erhöhen sollen, mit Auto-Antikörpern in Verbindung gebracht. Die genauen Details über die Entstehung der Auto-Antikörper bei Lupus erythematodes bleiben trotzdem noch unklar.

## 5 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Einzelzell PCR wurden CD 19<sup>+</sup> B-Zellen aus dem peripheren Blut von zwei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses isoliert und anschließend die  $\kappa$ -Leichtketten Rearrangements analysiert. Es konnten 194 nichtproduktiv und 221 produktiv rearrangierte Immunglobuline sequenziert werden und mit alterstypischen Repertoires verglichen werden. Dazu zählen die IgD<sup>+</sup> B-Zellen aus dem Nabelschnurblut, verschiedene B-Zellen der kindlichen Tonsille und IgM<sup>+</sup> B-Zellen aus dem Erwachsenenblut. Die Schwerpunkte der Analyse lagen dabei auf dem Aufbau des  $V\kappa$ -Immunglobulinrepertoires aus den einzelnen  $V\kappa$ -Familien, auf der Modifikation der  $V\kappa$ J $\kappa$ -Schnittstelle durch die verschiedenen Rekombinationsenzyme Terminale Desoxynukleotidyl Transferase und Exonukleasen, durch P- und N-Nukleotide sowie auf der Modifikation der Immunglobuline durch somatische Hypermutation.

Alle 6 funktionellen  $V\kappa$ -Genfamilien wurden rearrangiert, wobei die Verteilung der verwendeten  $V\kappa$ -Gene nicht zufällig war. Die Genfamilie  $V\kappa_1$  und  $V\kappa_3$  wurden signifikant häufiger bevorzugt, gefolgt von  $V\kappa_4$  und  $V\kappa_5$ . Ins produktive Repertoire wurde die  $V\kappa_1$ -Familie negativ selektioniert. Eine positive Selektion wurde bei der  $V\kappa_3$ -Familie gefunden. Bevorzugte Einzelgene beim Lupus erythematoses waren im nichtproduktiven Repertoire B3, B2, L6, A27 und 018/08. Im Nabelschnurblut wurden nur B3, B2 und A27, bei B-Zellen der kindlichen Tonsille wurde B3, B2, A27, 018/08 und 012/02 und bei Erwachsenen zusätzlich zu den bei der Tonsille beschriebenen Genen auch A18 und A17 vermehrt für Rearrangements herangezogen. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genen der Vergleichsgruppen wurden gefunden. Im produktiven Repertoire wurden bei B-Zellen von Lupus-Patienten häufig B3, B2, L12a, L6, L2 und A27 nachgewiesen. Positive Selektion fand man bei den Einzelgenen L12a, L2 und A27, negativ selektioniert wurde nur 018/08. Im Nabelschnurblut wurden B3, B2, L12a, L9, L6, L2, A27 und 012/02 häufiger als erwartet verwendet und zusätzlich wurde bei 012/02 eine positive Selektion festgestellt. Auch bei der Tonsille waren vereinzelte Gene (B3, L12, L6, L2, A27, 18/08, 012/02) bevorzugt und auch hier zeigten sich positive (L12, L6, L2, A27) und negative (B2, A18, 014/04, Vh, LFVK431) Selektionen. Im produktiven Repertoire des Erwachsenen wurden häufig B3, L12, L6, L2, A27, 012/02, A19/A3 und A17 rearrangiert. Wie beim Nabelschnurblut wurden keine negativen Selektionen gefunden, positiv selektioniert wurden die Gene L12, L2 und A27.

Insgesamt war die V<sub>k</sub>-Genverteilung der B-Zellen von Lupus-Patienten im nichtproduktiven Repertoire der Tonsille und des Neugeborenen, im produktiven Repertoire besonders dem Tonsillen-Repertoire am ähnlichsten.

Auch die Verteilung der J<sub>k</sub>-Gene war nicht zufällig. Die Dominanz von J<sub>k2</sub> war bei den B-Zellen vom Lupus erythematodes als auch bei allen anderen Vergleichsrepertoires in nichtproduktiven und produktiven Rearrangements zu finden. Unterschiede zeigten sich bei der Ausprägung der J<sub>k2</sub>-Dominanz und bei der Verteilung auf die anderen J<sub>k</sub>-Familien. Beim Lupus folgte der Erwartung entsprechend J<sub>k1</sub> am zweit häufigsten. J<sub>k5</sub>, J<sub>k4</sub> und J<sub>k3</sub> waren deutlich unterexprimiert und J<sub>k5</sub> wurde auch negativ selektioniert. Beim Nabelschnurblut fand sich eine ähnliche Verteilung, nur J<sub>k5</sub> wurde am zweithäufigsten rearrangiert und entsprach der statistischen Erwartung. Die Dominanz von J<sub>k2</sub> war bei der kindlichen Tonsille am stärksten ausgeprägt und J<sub>k1</sub> wurde positiv selektioniert. Beim Erwachsenen rearrangierten die V<sub>k</sub>-Gene mit nahezu allen J<sub>k</sub>-Genen, jedoch waren J<sub>k1</sub> und J<sub>k2</sub> überexprimiert und J<sub>k1</sub> wurde sogar positiv selektioniert. Die durchschnittliche Länge des CDR3-Bereichs (Codon 89-97) war  $27,1 \pm 3,4$  im nichtproduktiven und  $27,9 \pm 2,9$  Nukleotide im produktiven Bereich und somit etwas länger als beim Erwachsenen. Die häufigsten Längen waren 25 - 32 bp im nichtproduktiven und 24 - 33 bp im produktiven Repertoire.

Die TdT-Aktivität (N-Nukleotide) beim Lupus war signifikant geringer ausgeprägt als beim Erwachsenen und sogar im produktiven Repertoire wurden signifikant weniger Einfügungen nachgewiesen. Insertionen von einem und zwei Nukleotiden wurden am häufigsten gezählt. Mehr als 15 N-Nukleotide beim Erwachsenen und mehr als 10 N-Nukleotide beim Lupus wurden nicht gefunden.

Die Polymeraseaktivität, die am 3'- und 5'- Ende palindromische (P)-Nukleotide einfügt, ist vernachlässigbar. Sie ist am 5'-Ende und im nichtproduktiven Repertoire geringfügig aktiver. Zumeist fügte sie nicht mehr als ein Nukleotid hinzu.

Die Exonukleaseaktivität war sowohl am 3'- und 5'-Ende gleichermaßen in über 2/3 der Rearrangements nachweisbar. Am 5'-Ende wurden bevorzugt eine oder drei Nukleotide entfernt, am 3'-Ende am häufigsten nur ein Nukleotid. Die bevorzugte 3/1-Entfernung, beeinflusst durch die Dominanz von J<sub>k2</sub>, führte zu einem erhaltenen Leseraster und damit zu einer produktiven CDR3-Länge von 27 Nukleotiden. Beim Vergleich zu den alterstypischen Repertoires zeigten sich nur geringe Unterschiede in der Exonukleaseaktivität, was ein Hinweis auf stetige Präsenz der Exonukleasen in allen Reifestadien ist.

Die Analyse der Mutationsfrequenz der B-Zellen beim Lupus erythematodes zeigte eine weniger aktive Mutationsmaschinerie als beim Erwachsenen, jedoch eine höhere Mutationsaktivität im Vergleich zur kindlichen Tonsille und zum Neugeborenen. Eine

verstärkte Mutationsaktivität bei Lupus-Patienten wie sie T. Dörner in früheren Publikationen beschrieben hat, konnten wir nicht bestätigen. Ursächlich für diese Unterschiede könnte die Selektion der B-Zellen sein. In unserer Arbeit beschriebene Mutationsfrequenzen deuten eher auf naive B-Zellen mit geringerer somatischer Hypermutation hin.

Bei der Analyse des Mutationsmusters konnten wir einige Eigenschaften der activation induced cytidine deaminase (AID) feststellen. Das AID-Enzym war besonders selektiv für produktive Rearrangements. Desweiteren wurden Sequenzen mit Replacement-Mutationen im CDR-Bereich positiv selektioniert und im FR-Bereich negativ selektioniert. Im nichtproduktiven Repertoire wurden signifikant weniger Mutationen gezählt, wobei die Mutationen dann besonders in den FR-Regionen gefunden wurden und sich eher diffus über die gesamte Sequenz verteilten. Hingegen in den produktiven Rearrangements zeigten sich die Codonpositionen 30 (CDR1) und 93 (CDR3), aber auch 26, 31 (CDR1), 50, 53 (CDR2), 90 und 92 (CDR3) als hot-spots. Anhäufung von mehreren Mutationen pro Sequenz wurden hier ebenfalls häufiger gefunden, wobei sowohl im produktiven als auch im nichtproduktiven Repertoire insgesamt zu meist nur eine Mutation pro Sequenz nachweisbar war. Multiple Mutationen pro Codon waren sehr selten.

Im Bezug auf die molekulare Präferenz von Vk-Genfamilien konnten wir zeigen, dass Jk-proximale Gene häufiger mutiert waren als Jk-nahe Gene wie B3 und B2.

Ein weiterer Teilbereich der Analyse konzentrierte sich auf die einzelnen mutierten Nukleotide bzw. Basen sowie auf die Transition und Transversion, durch die einige Autoren Strang- und Sequenzpolaritäten ableiten. In den nichtproduktiven Rearrangements konnte man eine Strangpolarität für AT-Mutationen (A-Mutationen > T-Mutationen) und eine Sequenzpolarität für GC-Mutationen (G-Mutationen ≥ C-Mutationen) vermuten. Auch die Dominanz der Transition gegenüber den Transversion, die auch in unserer Analyse gefunden wurde, verdeutlicht laut früherer Publikationen die Theorie der Strangbevorzugung. Durch eine positive Selektion von Guanin-Mutationen ins produktive Repertoire wurden hier mehr Mutationen von Guanin gezählt, gefolgt von Adenin, Cytosin und Thymin, wodurch eine Strangbevorzugung nicht mehr eindeutig abzuleiten war.

Ausführliche Hinweise zur Strang- und Sequenzpolarität und zur intrinsischen Aktivität des Mutators liefert uns die Analyse der motivbezogenen Mutationen. Dabei wurden folgende Motive untersucht: RGYW- und WRCY-Motive, 3'- und 5'-Bridges und freie motivunabhängige Mutationen. Fokus der somatischen Mutation waren die bekannten Motive RGYW und WRCY (NP: 39,9%; P: 47,1%), wobei das RGYW-Motiv den Hauptanteil ausmachte. Zusätzlich wurden Mutationen am 3'-Ende, als 3'-Bridge-Motiv

bezeichnet, vermehrt in den Mutationsprozess miteinbezogen. Sie stellen also eine gezielte Ungenauigkeit des Mutators dar. Mutationen am 5'-Ende waren vernachlässigbar.

Im nichtproduktiven Repertoire platzierte der Mutator die Mutationen bevorzugt in den Motiven, jedoch wurden signifikant häufig Mutationen ohne Bezug zu Motiven zufällig platziert (v.a. in den CDR-Regionen). In die produktiven Rearrangements wurden Mutationen in den Motiven positiv selektioniert, dabei ziegten die RGYW/WRCY-Motive und die 3'-Bridge eine generelle Präferenz. Freie Mutationen existierten seltener, wurden aber besonders in den FR-Regionen positiv selektioniert.

Um den Mechanismus des AID-Enzyms zu verstehen, war die Analyse der präferierten Mutationslokalisation in den RGYW und WRCY-Motiven entscheidend. Es stellte sich heraus, dass die Position zwei im RGYW und die Position drei im WRCY verstärkt mutiert waren. Durch die exakte Festlegung der Zählweise in 5'-3'-Orientierung ist erkennbar, dass die zwei oben beschriebenen Positionen durch den Leseraster des Mutators einander entsprechen. Die 5'-2'-Position in den Motiven scheint eine Prädilektionsstelle zu sein, somit unabhängig von einer Strangpolarität.

Generell kann man feststellen, dass in den B-Zellen des Lupus erythematosus das Vκ-Repertoire sowohl durch intrinsische molekulare Prozesse und gleichermaßen durch positive und negative Selektionsprozesse beeinflusst wird.

## 6 Abkürzungen

A	Adenin (Purinbase)
AID	activation induced cytidine deaminase
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
C	Cytosin (Pyrimidinbase)
CDR	Complementarity-determining region (Komplementaritätsbestimmende Region)
C <sub>k</sub> Gene	konstanter Abschnitt der kappa Gene
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FR	framework region (Gerüstregion)
G	Guanin (Purinbase)
J <sub>k</sub> Gene	verbindender (joining) Abschnitt der kappa Gene
n.a.	non-applicable (nicht anwendbar)
N-Nukleotide	non-templated nucleotide (ohne Matrize)
NP	nichtproduktive Rearrangement
n.s.	non-signifikant (nicht signifikant)
P	produktive Rearrangement
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-Nukleotide	palindromische Nukleotide
p-Wert	Signifikanz
R	Replacement (Aminosäure austauschende Mutation)
RGYW	Purin (Adenin oder Guanin), Guanin, Pyrimidin (Cytosin oder Thymin), Adenin oder Thymin
R-Transition	Übergang der Purinbasen A oder G zu Purinbasen A oder G
R-Transversion	Übergang der Purinbasen A oder G zu Pyrimidinbasen C oder T
S	silent Mutation (keine Aminosäure austauschende Mutation)
SLE	systemischer Lupus erythematoses

T	Thymin (Pyrimidinbase)
TdT	Terminale Desoxynucleotidyltransferase
V <sub>κ</sub> Gene	variabler Abschnitt der kappa Gene
WRCY	Adenin oder Thymin, Purin (Adenin oder Guanin), Cytosin, Pyrimidin (Cytosin oder Thymin)
X <sup>2</sup> -Test	Chi-Square Test
Y-Transversion	Übergang der Pyrimidinbasen C oder T zu Purinbasen A oder G
Y-Transition	Übergang der Pyrimidinbasen C oder T zu Pyrimidinbasen C oder T



## 7 Literaturverzeichnis

1. Alt, F.W., Baltimore, D., 1982. Joining of immunoglobulin heavy chain segments: implications from a chromosome with evidence of three DJH fusions. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4118.
2. Brezinschek, H.P., S.J. Foster, R.I. Brezinschek, T.Dörner, R. Domiati-Saad, and P.E. Lipsky.1997. Analysis of the human VH gene repertoire: Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5+/IgM+ and CD5-/ IgM+ B cells. *J.Clin.Invest.* 99, 2488-2145
3. Brezinschek, H.P., R.I. Brezinschek, and P.E. Lipsky. 1995. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J.Immunol.* 155,190.
4. Dörner, T., S. J. Foster, H. P. Brezinschek, and P.E.Lipsky.1998  
Analysis of the targeting of the hypermutational machinery and the impact of subsequent selection on the distribution of nucleotide changes in human VHJH rearrangements. *Immunol. Rev.*162:161
5. Dörner, T., S.J. Foster, N.L. Farner, and P.E. Lipsky. 1998, Immunoglobulin kappa Chain Receptor Editing in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 102, 688
6. Dörner,T., C. Heimbächer, N. L. Farner, and P. E. Lipsky.1999. Enhanced mutational activity of V<sub>κ</sub> gene rearrangements in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 92:188
7. Dörner, T. and P.E. Lipsky. 2001. Immunoglobulin variable-region gene usage in systemic autoimmune disease Arthritis and Rheumatism. Vol.44, No. 12: 2715-7
8. Farner, N.L., T.Dörner, and P.E. Lipsky. 1999. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V<sub>λ</sub>J<sub>λ</sub> repertoire. *J.Immunol.*, 162:2137
9. Foster, S. J., H. P. Brezinschek, R. I. Brezinschek, and P. E. Lipsky. 1997. Molecular Mechanisms and selective influences that shape the κ gene repertoire of IgM+ B cells..*Clin.Invest.* 99:1614
10. Foster, S. J., T.Dörner, and P. E. Lipsky. 1999. Targeting and Subsequent selection of somatic hypermutation in the Human V<sub>κ</sub> repertoire. *Eur.J. Immunol.* 29, 3122
11. Foster, S. J., T. Dörner, and P. E. Lipsky, 1999. Somatic hypermutation of V<sub>κ</sub>J<sub>κ</sub> rearrangements: targeting of RGYW motifs on both DNA strands and

- preferential selection of mutated codons within RGYW motifs. *Eur. J. Immunol.* 29,4011
12. Gauss, G.H., and M.R. Lieber.1992. The basis for the mechanistic bias for deletional over inversional V(D)J recombination. *Genes & Dev.* 6:1553-1561
  13. Girschick, H.J., and P.E.Lipsky. 2002. The evolution of the human kappa repertoire during germinal center formation in human tonsil. Young investigators meeting, PRES, Annual European Congress of Rheumatology EULAR, Stockholm 6/2002, Schweden
  14. Girschick, H. J., and P. E. Lipsky. 2001. The kappa gene repertoire of human neonatal B cells. *Mol.Immunol.*38,1113
  15. Girschick, H. J., A. C. Grammer, T. Nanki, E. Vazquez, and P.E. Lipsky. Expression of Recombination Activating Genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 46 (5), 1255, 2002.
  16. Gorman, J.R., Alt, F.W. 1997. Regulation of Immunoglobulin Light Chain Isotype Expression. *Adv. Immunol.* 69: 113
  17. Herrman M., T.Winkler, U.Gaipl, H-M.Lorenz, T.Geiler, J.R.Kalden 2000 Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int. Arch Allergy Immunol* 2000; 123:28
  18. Ichiyoshi, Y., M. Zhou, and P. Casali. 1995. A human anti-insulin IgG autoantibody apparently arises through clonal selection from an insulin-specific "germline" natural antibody template. Analysis by V gene segment reassortment and site-directed mutagenesis. *J.Immunol.* 154 (1), 226
  19. Janeway, C.A., Travers P., Walport, M, Shlomchik, M., *Immunologie*, 5.Auflage, 2002, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
  20. Lewis, S.M. 1994. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological and comparative analyses.. *Adv. Immunol.* 56, 27
  21. Lipsky, E.P., 2001. News and Views. *nature immunology*, Vol.2 (9)
  22. Manheimer-Lory, A.J., G.Zandman-Goddard, A. Davidson, C.Aranow, and B. Diamond. 1997. Lupus-specific antibodies reveal an altered pattern of somatic mutation. *J. Clin. Invest.* 100:2538 - 2546
  23. Peter, H.H.,*Klinische Immunologie* Urban & Schwarzenberg, 1991
  24. Rogozin, I.B. and N.A. Kolchanov, Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 1992. 1171:11-18
  25. Roitt, Ivan M., *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1995

26. Schäble, K. F., and H. G. Zachau. 1993. The variable genes of the human immunoglobulin  $\kappa$  locus. *Biol.Chem. Hoppe-Seyler*. 374:1001.
27. Schäble, K., R. Thiebe, A. Flugel, A. Meindl, and H.G. Zachau.1994. The human immunoglobulin kappa locus: pseudogenes, unique and Repetitive sequences. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375 (3), 189
28. Schlissel, M.S., and D.Baltimore. 1989. Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell*. 58:1001-1007
29. Spektrum der Wissenschaft, Spezial  
Das Immunsystem, 3.Auflage, 2001
30. Staines, N., Brostoff, J., James, K., *Immunologisches Grundwissen*. 3.Auflage, Fischer Verlag, Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm; 1997
31. Straubinger, B., E. Huber, W. Lorenz, E. Osterholzer, W. Pargent, M. Pech, H.D. Pohlenz, F.J. Zimmer, and H.G. Zachau. 1988. The human  $V_{\kappa}$  locus. Characterization of a duplicated region encoding 28 different immunoglobulin genes. *J.Mol. Biol.* 199 (1) 23
32. Stryer, Lubert. *Biochemie*. 4.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford;1996
33. Suzuki, N., T. Harada, S. Mihara, and T. Sakane. 1996. Characterization of a germline encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. *J.Clin.Invest.* 98:1843-1850
34. Tan, E.M., A.S. Cohen, J.F. Fries, A.T. Masi, D.J. McShane, N.F. Rothfield, et al., 1982. The 1982 revised criteria of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271
35. Tomlinson, I.M., S.C. Williams, O. Ignatovich, S.J. Corbett, B.L. Cox, G. Winter. 1996. *V Base Sequence Directory*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge
36. Zachau, G. H., *The Human Immunoglobulin K-Genes*. *The Immunologist* 4/2 (1996)


## 8 Figuren

### 8.1 Figurenlegenden

**#** Zeichen für den signifikanten Unterschied zwischen nichtproduktiven und produktiven V<sub>k</sub> Rearrangements

**#!** Zeichen für die positive Selektion des produktiven Repertoires gegenüber dem nichtproduktiven Repertoire

**#?** Zeichen für die negative Selektion des produktiven Repertoires gegenüber dem nichtproduktiven Repertoire

**\***  
 Zeichen für den signifikanten Unterschied zwischen zwei alterstypischen Repertoires

**X** Zeichen für den signifikanten Unterschied zwischen der Frequenz und der erwarteten Frequenz

**&** Zeichen für den signifikanten Unterschied innerhalb des nichtproduktiven oder produktiven Repertoires

**Figur 1: B-Zell-Entwicklung im Knochenmark des Menschen**

Die Entwicklung der B-Zellen durchläuft mehrere Stadien, die durch Umordnung (VDJ-Rearrangements) und Expression der Immunglobuline charakterisiert sind. Durch die Enzyme RAG1 und RAG2 werden die Keimbahngene der schweren Kette durch VDJ-Rearrangements so umgelagert, dass eine  $\mu$ -Kette zunächst vorübergehend auf der Oberfläche als Teil eines Prä-B-Rezeptors und später dann intrazellulär exprimiert wird. In der kleinen Prä-B-Zelle beginnt dann das VJ-Rearrangement der Gene der leichten  $\kappa$ -Kette. Zusammen bilden die schwere Kette und die leichte  $\kappa$ -Kette ein komplettes IgM-Molekül auf der Zelloberfläche einer unreifen B-Zelle.[18] (modifiziert nach C.A: Janeway, 2002)

**Figur 2: Struktur eines Antikörpermoleküls**

Antikörper sind in ihrer Grundstruktur  $\gamma$ -förmig und aus zwei schweren (H;heavy) und zwei leichten Ketten (L; light) zusammgebaut. Sie sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die konstante Region vermittelt die biologischen Effektorfunktionen, die variable Region bildet die Antigenbindungsstelle. Diese setzt sich aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette zusammen und zeichnet sich durch eine hohe Variabilität aus, die besonders durch die drei hypervariablen Regionen (HV) hervorgerufen wird. In der Proteinstruktur falten sich die Framework-Regionen (FR) zu einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, wodurch die hypervariablen Regionen in bestimmten Schleifen liegen. Durch die Paarung der Schleifen beider Ketten  $V_H$  und  $V_L$  entsteht eine einzigartige, hypervariable Antigenbindungsstelle an der Spitze des Fab-Fragments [19].

**Figur 3: Immunglobulin kappa Locus**

Der kappa-Locus liegt auf dem Chromosom 2 und setzt sich aus einem Gen für die konstante Region, 5 Gensegmente für das J-Gen und etwa 40 Gensegmente für die variable Region. Die Mitglieder der 7  $V_\kappa$ -Genfamilien sind über den gesamten Locus in der  $J_\kappa$ -proximalen und  $J_\kappa$ -distalen Kasette verteilt. Zwischen den funktionellen Genen gibt es auch noch Gene mit kleineren Defekten (17) und sogenannte Pseudogene (24), die zu einem funktionsunfähigem Genabschnitt führen [27].

**Figur 4: Entstehung der Antikörperdiversität**

Wichtige Voraussetzung für die strukturelle Vielfalt der V-Regionen der Antikörper ist die enorme Zahl verschiedener funktionsfähiger Gensegmente in der Keimbahn-DNA, die durch zufällige somatische Rekombinationen zu funktionellen Genen zusammengesetzt werden (VJ-Rearrangements). Dem VJ-Rearrangement der Kappa-

Kette liegt ein spezieller Mechanismus zugrunde. Zunächst wird eines von mehreren  $V_{\kappa}$ -Genen auf der Keimbahn-DNA neben einem J $\kappa$ -Segment platziert, sodass ein vollständiges Exon für die variable Region einer leichten Kette entsteht. Die B-Zell-DNA wird nun in ein primäres RNA-Transkript umgeschrieben (Transkription), das lange Zwischensequenzen aus zusätzlichen J-Segmenten und Introns enthält. Durch Herausschneiden der Zwischensequenzen (Spleißen) wird die variable Region mit der konstanten Region zusammengefügt und das Transkript zu einer mRNA verarbeitet, die wiederum mit Hilfe der Ribosomen in die  $\kappa$ -Polypeptidkette übersetzt (translatiert) wird.

Zusätzlich erhöht sich die Antikörpervielfalt durch Hinzufügen (P- und N- Nukleotide) und Entfernen (Exonukleasen) von Nukleotiden an der VJ-Schnittstelle.

Die Feinspezifität funktionsfähiger Antikörper kann z.B. durch somatische Mutationen beeinflusst werden, indem Punktmutationen vor allem in den hypervariablen Regionen zu einer höheren Affinität des Antikörpers zum Antigen führen. Aus nichtproduktiven VJ-Rearrangements können durch eventuelle weitere Rearrangements der verbliebenen Keimbahngene funktionstüchtige Immunglobuline hergestellt werden (receptor-editing). Der Wechsel der konstanten Kette der schweren Kette zu einer anderen Klasse verändert die biologischen Eigenschaften des Immunglobulins (Class-Switching).[18] (modifiziert nach C.A: Janeway, 2002)

#### **Figur 5: Schematische Darstellung von Isolierung (a) und Sortierung (b) der CD19+ B-Zellen aus dem peripheren Blut von SLE-Patienten**

Die B-Zellen der SLE-Patienten wurden mittels der Ficoll-Hypaque® Gradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut getrennt (a). Anschließend wurden die B-Zellen immunzytochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen CD 19 markiert und entsprechend ihrer CD19-Expression mittels eines FACs Star<sup>Plus</sup> Durchflusszytometers in eine 96-Loch-PCR-Platte sortiert. Zuerst wurde das genomische Material der B-Zelle durch die Polymerase-Kettenreaktion unspezifisch vervielfacht, indem unspezifische Oligonukleotide verwendet wurden. Als nächster Schritt folgte eine spezifische Nested-PCR mit  $V_{\kappa}$ -spezifischen Primern. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel (Gelelektrophorese) aufgetrennt und mittels dem ABI 377 Sequenzierer sequenziert. [22] (modifiziert nach I.M. Roitt, 1995)

#### **Figur 6: Darstellung einer Sequenzierung mittels ABI Prism 377 Sequenzierungsgerät**

Die Abbildung zeigt eine Aminosäuresequenz eines Immunglobulins, die mittels des ABI 377 Sequenzierungsgerätes ermittelt wurde. Zur Identifizierung wurde sie mit

bereits publizierten  $V_{\kappa}$ -Gensequenzen mittels Softwareprogrammen verglichen. Die hypervariablen Regionen sind mit römischen Nummern gekennzeichnet. Abweichende Aminosäuren sind eingekreist und stellen Punktmutationen dar. Von großem Interesse ist die VJ-Schnittstelle, die auf N-, P- Nukleotide und Exonukleaseaktivität untersucht wird. Außerdem beinhaltet die Analyse die Länge der Sequenz und der CDR3-Region.

### **Figur 7: Verteilung der $V_{\kappa}$ -Gene in produktiven und nichtproduktiven Rearrangements**

Die ersten drei Spalten der Tabelle beinhalten die 7 verschiedenen im menschlichen Genom vorhandenen Genfamilien der leichten kappa-Kette, genauer beschrieben durch ihre Anzahl der Familienmitglieder und die daraus berechnete statistisch erwartete Häufigkeit der jeweiligen Genfamilie. Im Anschluß befindet sich die Verteilung des nichtproduktiven Repertoires, die durch absolute Zahlen und daraus berechneten Prozentzahlen dargestellt wird. Die Spalte zwischen Nichtproduktiv und Produktiv gibt die jeweiligen statistischen Signifikanzniveaus zwischen erwarteter und tatsächlich gefundener Frequenz des nichtproduktiven Repertoires wieder, die mittels des „Chi square goodness of fit“-Test berechnet wurden. Es folgt das produktive Repertoire mit den absoluten Zahlen und ihren entsprechenden Prozentzahlen. Die darauffolgende Spalte stellt wiederum die signifikanten Unterschiede der produktiven Rearrangements zur erwarteten Frequenz dar. Die signifikanten Unterschiede zwischen nichtproduktiven und produktiven Daten werden in der letzten Spalte beschrieben ( $X^2$ , „Chi square“-Test) (n.a. nicht anwendbar, n.s. nicht signifikant).

### **Figur 8: Vergleich der Verteilung der $V_{\kappa}$ -Genfamilien in nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements zwischen B-Zellen des Nabelschnurblutes, der Tonsille, von Erwachsenen und von SLE-Patienten**

Die jeweiligen Frequenzen der 7 verschiedenen Genfamilien bei SLE-Patienten (NP n=194; P n=221) wurden mit der Frequenzverteilung des Nabelschnurblutes (NP n=92; P n=102), der Tonsille (NP n=219; P n=375) und des Erwachsenen (NP n=232; P n=321) verglichen. Die Klammern mit den dazugehörenden Sternen stellen dabei die Signifikanzunterschiede zwischen den Daten des SLE-Patienten und den entsprechenden Daten des Nabelschnurblutes, der Tonsille oder des Erwachsenen dar ( $X^2$ , „Chi square“-Test). Im nichtproduktiven Repertoire wurde besonders die  $V_{\kappa 1}$  Familie bevorzugt, wohingegen die produktiven Rearrangements vor allem zwischen der  $V_{\kappa 1}$  und  $V_{\kappa 2}$  Familie „wählten“.

**Figur 9: Vergleich der Verteilung von  $V_{\kappa}$ -Genen in nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements der peripheren Lupus-B-Zellen mit der erwarteten Frequenz**

Die Verteilung der  $V_{\kappa}$ -Gene im nichtproduktiven Repertoire von SLE-Patienten werden in Figur 3a und die im produktiven Repertoire in Figur 3b dargestellt. Die schwarzen Säulen repräsentieren dabei die Daten der SLE-Patienten (NP n=194, P n=221) und die grauen Säulen die statistische Erwartung. Der Buchstabe X gibt den Signifikanzunterschied zwischen der Anzahl der jeweiligen  $V_{\kappa}$ -Gene und der erwarteten Frequenz wieder („Chi-square goodness of fit“-Test). Auf der x-Achse sind die  $V_{\kappa}$ -Gene gemäß ihrer Position im  $V_{\kappa}$ -Genlocus aufgetragen und die y-Achse gibt die jeweilige Prozentzahl der Rearrangements wieder. Die schwarzen Rauten unterhalb des Diagramms kennzeichnen die Gene (13K04+7, 13K18, Vh) mit unklarer Position im  $V_{\kappa}$ -Genlocus.

Im nicht-produktiven (a) Repertoire haben sich bei der Berechnung folgende Signifikanzniveaus ergeben: B3 ( $p < 0,0001$ ), B2 ( $p < 0,0001$ ), L6 ( $p < 0,05$ ), A27 ( $p < 0,001$ ) und 018/08 ( $p < 0,0001$ )

Im produktiven (b) Repertoire waren die Gene B3 mit  $p < 0,0001$ , das Gen B2 mit  $p < 0,0001$ , L12a mit  $p < 0,0001$ , L6 mit  $p < 0,00001$ , L2 mit  $p < 0,00001$  und A27 mit  $p < 0,0001$  statistisch häufiger exprimiert als erwartet (X; „Chi square goodness of fit“-Test).

**Figur 10: Vergleich der Verteilung von  $V_{\kappa}$ -Genen zwischen nichtproduktiven und produktiven Rearrangements der peripheren Lupus-B-Zellen**

Die Frequenz der nichtproduktiven (schwarze Säulen) wurde mit der Frequenz der produktiven (weiße Säulen) verglichen ( $X^2$ -Test). Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied in den Genen L12a ( $p < 0,03$ ), L2 ( $p < 0,001$ ) und A27 ( $p < 0,05$ ), die somit positiv selektioniert (!) wurden. Nur für das Gen 018/08 wurde eine negative Selektion (?!) mit einem statistischen Unterschied von  $p < 0,05$  nachgewiesen. Ansonsten entspricht der Aufbau des Diagramms der Figur 9.

**Figur 11: Vergleich der Häufigkeiten der proximalen  $V_{\kappa}$ -Gene von nichtproduktiven (a) und produktiven (b) SLE B-Zellen mit B-Zellen des Nabelschnurblutes, von Erwachsenen und der Tonsille**

Die Verteilung der  $V_{\kappa}$ -Gene in den Nabelschnurblut- (schwarze Säulen; NP n=92, P n=102), in den Tonsillen- (dunkelgraue Säulen, NP n=219, P n=375), in den Erwachsenen- (weiße Säulen; NP n=232, P n=321) und in den Lupus- (hellgraue Säulen; NP n=194, P n=221) B-Zellen wurde auf die  $J_{\kappa}$  proximale Kasette des  $\kappa$ -Locus



beschränkt, da die distale Kasette kaum vertreten war und somit aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen wurde.

Die im Diagramm verwendeten Symbole kennzeichnen die unterschiedlichen Signifikanzniveaus in Bezug zum SLE-Patienten ( $X^2$ -Test).

### **Figur 12: $J_k$ -Utilisation in nichtproduktiven und produktiven Rearrangements der peripheren Lupus B-Zellen**

Die Frequenz der  $J_k$ -Verwendung in nichtproduktiven Sequenzen wurde mit der Frequenz der produktiven Sequenzen verglichen und daraus statistische Signifikanzen berechnet ( $X^2$ -Test). Hierbei zeigte nur das Gen  $J_{k5}$  einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,02$ , negative Selektion). Außerdem wurde ein Vergleich mit der statistischen Erwartung durchgeführt („Chi square goodness of fit“-Test), bei dem das Ergebnis im Diagramm als X wiedergegeben wurde.

Sowohl im nichtproduktiven als auch im produktiven Repertoire zeigte sich die Dominanz von  $J_{k2}$ .

### **Figur 13: Verwendung von $J_k$ -Genen durch häufig rearrangierte $V_k$ -Gene in nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements**

In den häufig rearrangierten  $V_k$ -Genen B3, B2, L12a, L6, L2, L1, A27, 018/08, 012/02 und L14 wurde die Verwendung von  $J_k$ -Genen verglichen. Die nichtproduktiven Rearrangements wurden in der Figur 13a und die produktiven Rearrangements wurden in der Figur 13b dargestellt. Hierbei wurden auf der x-Achse sowohl die häufig verwendeten  $V_k$ -Gene als auch die fünf möglichen  $J_k$ -Gene aufgetragen. Die y-Achse gibt die Prozentzahl der Rearrangements mit dem entsprechenden  $J_k$ -Gen wieder. #! und #? kennzeichnen den Signifikanzunterschied zwischen nichtproduktiven und produktiven Repertoires ( $X^2$ -Test).

### **Figur 14: Vergleich der $J_k$ -Utilisation von nichtproduktiven (a) und produktiven (b) SLE B-Zellen mit B-Zellen des Nabelschnurblutes, des Erwachsenen und der Tonsille**

Die Verwendung der  $J_k$ -Gene wurde zwischen B-Zellen des Nabelschnurblutes (schwarze Säule; NP n=88, P n=102), der Tonsille (dunkelgraue Säule; NP n=219, P n=375), des Erwachsenen (weiße Säule, NP n=232, P n=321) und des Lupus-Patienten (hellgraue Säule; NP n=194, P n=221) verglichen, indem Signifikanzen zwischen nichtproduktivem (a) und produktivem (b) Repertoire des SLE-Patienten (#! und #?;  $X^2$ -Test), zwischen den Daten des SLE-Patienten und den jeweils anderen drei

alterstypischen Repertoires (\*) sowie Signifikanzen zur statistischen Erwartung ( $\chi^2$ , „Chi-square goodness of fit“-Test) berechnet wurden.

**Figur 15: CDR3-Länge in nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}J_{\kappa}$  Rearrangements von SLE-B-Zellen**

Bei der Analyse der CDR3-Länge wurden in den Sequenzen die Basen von Codon 89 bis 97 gezählt, je nach Anzahl sortiert und in einem Diagramm dargestellt. Darin stellt die x-Achse die Länge der CDR3-Region in Nukleotiden dar und die y-Achse gibt die Anzahl der Sequenzen mit einer bestimmten CDR3-Länge wieder. Die produktiven Rearrangements ( $n=220$ ) sind durch eine durch drei teilbare CDR3-Länge gekennzeichnet. Die in CDR3-Länge 24 und 27 nachgewiesenen nichtproduktiven Sequenzen ( $n=193$ ) wurden durch das  $V_{\kappa}$ -Gen A18 gebildet, da dieses Gen ein Stopcodon aufweist und daher als Pseudogen eingestuft wird.

**Figur 16: Vergleich der CDR3-Länge zwischen SLE-B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen im nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Repertoire**

Die CDR3-Länge der SLE-B-Zellen (NP  $n=194$ , P  $n=221$ ) wurde mit den B-Zellen des Erwachsenen (NP  $n=232$ , P  $n=321$ ) verglichen [9]. Im nichtproduktiven Repertoire wurden besonders die Länge zwischen 25 und 29 Nukleotiden verwendet. Das produktive Repertoire bevorzugte besonders die Länge von 27 Nukleotiden. (\*,  $\chi^2$ -Test)

**Figur 17: Vergleich der TdT-Aktivität in SLE-B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen**

Die Anzahl der eingefügten N-Nukleotide der nichtproduktiven ( $n=194$ ) und produktiven ( $n=221$ ) Rearrangements des SLE-Patienten wurden mit denen des Erwachsenen (NP  $n=232$ , P  $n=321$ )[9] verglichen. Dabei wurde die Anzahl der eingefügten N-Nukleotide auf der x-Achse und die Prozentzahl der Sequenzen mit bestimmten N-Nukleotiden auf der y-Achse aufgetragen. Signifikanzunterschiede wurden mit den entsprechenden Symbolen gekennzeichnet ( $\chi^2$ -Test).

**Figur 18: Insertion von P-Nukleotiden am 5' (a) - und 3' (b) -Ende der  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Schnittstelle in nichtproduktiven und produktiven Rearrangements**

Die Anzahl der eingefügten palindromischer Nukleotide während des nichtproduktiven ( $n=194$ ) und produktiven ( $n=221$ )  $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements wurde am 5'-Ende (a) und am

3`-Ende (b) der  $V_kJ_k$ -Schnittstelle verglichen. #! steht für eine positive Selektion und #? für eine negative Selektion ( $X^2$ -Test).

**Figur 19: Vergleich der 5`-Exonuklease-Aktivität an der  $V_kJ_k$  Schnittstelle zwischen nichtproduktiven und produktiven rearrangierten  $V_kJ_k$ -Rearrangements in peripheren Lupus-B-Zellen**

Die Exonuklease-Aktivität wird durch die Anzahl der entfernten Nukleotide gekennzeichnet. Die auf der 5`-Seite entfernten Nukleotide im nichtproduktiven Repertoire (schwarze Säulen, n=194) wurden denen im produktiven (n=221) Repertoire gegenübergestellt. Die daraus berechneten Signifikanzen ( $X^2$ - Test) wurden im Diagramm mit den Symbolen #! und #? markiert.

**Figur 20: Vergleich der 5`-Exonuklease-Aktivität in nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements zwischen peripheren Lupus B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen**

Die auf der 5`-Seite aktiven Exonukleasen im nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Repertoire des SLE-Patienten wurden mit den Exonukleasen des Erwachsenen verglichen. In den nichtproduktiven Rearrangements von Lupus und Erwachsenen zeigte sich keine Präferenz in der Entfernung einer bestimmten Anzahl von Nukleotiden. Dagegen konnte man im produktiven Repertoire beider die Tendenz erkennen, drei Nukleotide am 5`-Ende zu entfernen.

**Figur 21: Vergleich der 3`Exonuklease Aktivität an der  $V_kJ_k$ -Schnittstelle zwischen nichtproduktiven und produktiven  $V_kJ_k$ -Rearrangements in peripheren Lupus B-Zellen**

Die Anzahl der Nukleotide der Keimbahn, welche am 3`-Ende der  $V_kJ_k$  Schnittstelle während der Rearrangements durch Exonukleasen entfernt wurden, wird zwischen den nichtproduktiven und produktiven Repertoires der SLE-B-Zellen verglichen. Signifikante Unterschiede wurden mit #! und #? gekennzeichnet ( $X^2$ - Test).

**Figur 22: Vergleich der 3`Exonuklease Aktivität in nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements zwischen peripheren Lupus B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen**

Der Vergleich der am 3`-Ende aktiven Exonuklease in nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements bezieht sich auf das Repertoire des SLE-Patienten und des Erwachsenen. Nur geringe signifikante Unterschiede haben sich dabei gezeigt ( $X^2$ -Test).

**Figur 23: Vergleich der Mutationsfrequenzen in den nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements des SLE-Patienten**

Die Anzahl der Sequenzen ohne Mutationen und mit Mutationen, die zusätzlich in die Kategorien eins bis drei Mutationen und mehr als vier Mutationen aufgeteilt sind, wurde zwischen nichtproduktiven und produktiven Rearrangements verglichen. Lediglich bei den Sequenzen mit eins bis drei Mutationen konnten keine signifikanten Unterschiede berechnet werden. Zur Berechnung der Mutationsfrequenzen mussten die absolute Anzahl der Nukleotide, die Anzahl der Nukleotide in den mutierten Sequenzen sowie die Codonanzahl mit Mutationen bestimmt werden. Daraus ergab sich zum einen die Mutationsfrequenz aller  $V_{\kappa}$ -Rearrangements, die durch den Quotienten aus der absoluten Anzahl der Mutationen und der absoluten Anzahl der  $V_{\kappa}$ -Nukleotide berechnet wurde. Zum anderen wurde die Mutationsfrequenz nur in allen mutierten  $V_{\kappa}$ -Rearrangements bestimmt, wobei sich hier die Mutationen auf die absolute Anzahl der  $V_{\kappa}$ -Nukleotide in mutierten Sequenzen bezogen. Signifikanzunterschiede zwischen nichtproduktiven und produktiven Rearrangements zeigten sich bei beiden Mutationsfrequenzen ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test).

**Figur 24: Vergleich der Mutationsfrequenzen der peripheren Lupus B-Zellen und alterstypischen Repertoires in den nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Die Mutationsfrequenzen der SLE-B-Zelle ( $CD19^+$ ) wurden mit B-Zellen unterschiedlicher Herkunft und auch anderer Entwicklungsstufe verglichen. Diese Vergleichs-B-Zellen stammten aus dem Nabelschnurblut, aus der Tonsille (zwei B-Zellen aus verschiedenen Entwicklungsstadien) und vom Erwachsenen. Zusätzlich wurden ältere Auswertungen von einem SLE-Patienten [6] zum Vergleich herangezogen. Die Vergleichskategorien waren der Prozentanteil der mutierten  $V_{\kappa}$ -Rearrangements und die Mutationsfrequenz aller  $V_{\kappa}$ -Rearrangements. Die Frequenzen in den mutierten Rearrangements des Nabelschnurblutes und der Tonsille wurden in den entsprechenden Datenquellen nicht gefunden.

**Figur 25: Verteilung der Mutationen auf CDR- und FR-Regionen in nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Bei der Analyse der Mutationsverteilung in den CDR- und FR-Regionen wurde zwischen den nichtproduktiven und produktiven Repertoires verglichen. Daraus ergab sich, dass das produktive Repertoire in den CDR- und FR-Regionen als auch im Gesamtrepertoire signifikant häufiger mutiert wurde als die nichtproduktiven

Rearrangements ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test). Ebenfalls zeigten sich signifikante Unterschiede innerhalb der Repertoires ( $p < 0,0001$ ) ( $X^2$ -Test). In den nichtproduktiven Rearrangements bevorzugten die Mutationen die FR-Regionen und gegensätzlich dazu wurden im produktiven Repertoire die Mutationen häufiger in den CDR-Regionen gezählt.

**Figur 26: Verteilung der Mutationen auf die Codons in nichtproduktiven und produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements von SLE-B-Zellen**

Die Anzahl der Mutationen in jedem Codon der 194 nichtproduktiven und 221 produktiven Rearrangements des SLE-Patienten wird in dieser Figur gezeigt. Die nichtproduktiven Mutationen werden durch die schwarzen Säulen repräsentiert und die produktiven Mutationen durch die weißen Säulen. Signifikante Unterschiede zwischen den nichtproduktiven und produktiven Repertoires konnten nur in den Codonpositionen 30 und 93, beide aus CDR-Regionen, bestimmt werden ( $p < 0,05$ ) ( $X^2$ -Test).

**Figur 27: Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen auf die Codons in nichtproduktiven (a) und produktiven (b)  $V_{\kappa}$ -Rearrangements von SLE-B-Zellen**

Die Verteilung der Replacements (schwarze Säulen) und der Silent-Mutationen (weiße Säulen) auf die einzelnen Codons der 415 analysierten Rearrangements wurden in den nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Repertoire getrennt voneinander analysiert. Im nichtproduktiven Repertoire wurden 60,7% in den FR-Regionen gefunden, von denen 41% Replacement und 20,7% Silent waren. Als hot spot wurden die Positionen 31, 57, 82 und 90 bezeichnet. Im Gegensatz dazu wurden die CDR-Regionen der produktiven Rearrangements zu 61,1% mutiert, wobei davon 46,7% Replacement-Mutationen waren. Auch fanden sich im produktiven Repertoire hot spot-Codons wie 30, 31, 53, 90, 92 und 93.

**Figur 28: Vergleich der Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen in  $J_{\kappa}$ -nahen (a) und  $J_{\kappa}$ -ferneren (b) Genen der proximalen Kasette in produktiven  $V_{\kappa}$ -Rearrangements von SLE-B-Zellen**

Die Anzahl der Replacement- und Silent-Mutationen in den  $J_{\kappa}$ -nahen Genen B3 und B2 wurde mit der in den  $J_{\kappa}$ -ferneren Genen A27, L2 und L12a der proximalen Kasette verglichen. Es zeigte sich, dass in den produktiven Regionen CDR2, FR3 und CDR3 der  $J_{\kappa}$ -ferneren Gene signifikant mehr Mutationen gefunden wurden als in den gleichen Abschnitten der  $J_{\kappa}$ -nahen Gene ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,02$ ;  $p < 0,02$ ) ( $X^2$ -Test). Die nichtproduktiven Rearrangements unterschieden sich nicht.

**Figur 29: Vergleich der R/S-Verhältnisse in speziellen Regionen und in zusammengefassten Regionen nichtproduktiver und produktiver  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Das Verhältnis der Replacements zu den Silent-Mutationen wurde in den einzelnen FR- und CDR-Regionen bestimmt, untereinander verglichen und eventuelle Signifikanzunterschiede berechnet. In den nichtproduktiven Rearrangements fielen die R/S-Verhältnisse in den Regionen FR1, CDR1 und FR3 höher aus als im produktiven Repertoire. Umgekehrt waren sie in den Regionen FR2, CDR2 und CDR3 im produktiven Repertoire höher als im nichtproduktiven. Signifikante Unterschiede waren aber nicht nachweisbar. Lediglich in den produktiven Rearrangements lagen zwischen dem R/S-Verhältnis in den CDR- und FR-Regionen Signifikanzunterschiede von  $p < 0,008$  ( $X^2$ -Test) vor.

**Figur 30: Darstellung der Replacement-Mutationen in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver (a) und produktiver (b)  $V_{\kappa}$ -Rearrangements als Funktion (Regression)**

Die Verteilung der Replacements in den CDR- und FR-Regionen wurde als Funktion dargestellt, um eine Korrelation zwischen den beiden Größen herausarbeiten zu können. Infolge dessen wurden für den nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Bereich jeweils Regressions- (m) und Korrelationskoeffizienten (R) berechnet. Beide Repertoires zeigten eine Korrelation in der Verteilung der Replacements in den CDR- und FR-Regionen (NP:  $R = 0,85$ ; P:  $R = 0,63$ ). Diese Korrelation war mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,0001$  signifikant.

**Figur 31: Vergleich der Häufigkeiten von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Replacement-Mutationen in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver (a) und produktiver (b)  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Die Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Replacements wurden nach den CDR- und FR-Regionen aufgeteilt und innerhalb der nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements miteinander verglichen. Im nichtproduktiven Repertoire wurden sowohl im CDR als auch im FR zu 70% Sequenzen mit nur einem Replacement gezählt. Rearrangements mit mehr als einem Replacement waren sehr selten nachweisbar. Die Sequenzen des produktiven Repertoires enthielten häufiger mehr als ein Replacement. In den produktiven Rearrangements konnten in der FR-Region signifikant häufiger nur eine Replacement-Mutation gefunden werden als in der CDR-Region ( $p < 0,008$ ) ( $X^2$ -Test). Die Anzahl von 5 Replacements wurden signifikant häufiger in CDR-Regionen gezählt ( $p < 0,009$ ) ( $X^2$ -Test).

**Figur 32: Vergleich der mutierten Nukleotide in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Für jedes der vier Nukleotide wurde für die CDR- und FR-Regionen der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements eine individuelle Mutationsfrequenz ermittelt. Eine Präferenz des Mutators für die Purinbasen Adenin und Guanin zeigte sich in den CDR- und FR-Regionen beider Repertoires. Dadurch konnten besonders gegenüber den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin deutliche Signifikanzunterschiede berechnet werden (\*). Signifikante Unterschiede zwischen dem nichtproduktiven und produktiven Repertoire lagen in der CDR-Region bei der Base Thymin ( $p < 0,05$ ) und in der FR-Region bei der Base Adenin ( $p < 0,005$ ) vor ( $\chi^2$ -Test).

**Figur 33: Vergleich der Häufigkeiten von Transversion und Transition in den CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Für das nichtproduktive und produktive Repertoire wurde speziell in den CDR-(linke Seite) und FR-Regionen (rechte Seite) die durch die Mutation hervorgerufene Basensubstitution untersucht. Die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) werden unter dem Buchstaben R und die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T) unter Y zusammengefasst. Der Austausch von Basen innerhalb der Purin- bzw. Pyrimidinbasen wird als Transition bezeichnet. Von einer Transversion spricht man, wenn Purinbasen durch Pyrimidinbasen und umgekehrt ersetzt werden.

Die Veränderungen in den nichtproduktiven und produktiven Rearrangements gingen signifikant häufiger von den Purinbasen (Y-Transition und –Transversion) aus als von den Pyrimidinen. Bei der Signifikanzberechnung wurden die Y-Transition und –Transversion sowie die R-Transition und –Transversion jeweils zusammengefasst und einander gegenübergestellt, was in der Figur durch die schrägen Klammern dargestellt wird ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,001$ ) ( $\chi^2$ -Test). Als 100% wurden die jeweilige Summe von Mutationen entweder in FR- oder CDR-Regionen gesetzt.

**Figur 34: Vergleich der Häufigkeit multipler Mutationen in einem Codon nichtproduktiver und produktiver V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Bei der Analyse der Codons wurde die Häufigkeit multipler Mutationen in einem Codon zwischen den nichtproduktiven und produktiven Rearrangements verglichen. In beiden Repertoires kamen in über 93% der Fälle nur eine Mutation pro Codon vor.

**Figur 35: Vergleich der Verteilung der Mutationen auf bestimmte Motive in den nichtproduktiven und produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Die Mutationsanalyse enthielt die Motive RGYW, WRCY, RGYW/WRCY, 3'-und 5'-Bridge sowie die Gruppe unrelated, d.h. Mutationen ohne Beziehung zu einem der oben genannten Motive. Häufigster Mutationsort war das Motiv aus RGYW und WRCY mit 45,6%. In dieser Figur wurden die Signifikanzunterschiede zwischen den einzelnen Motiven nur für das Gesamtrepertoire (alle Mutationen im produktiven und nichtproduktiven Rearrangements; Klammern mit \*) sowie Unterschiede zwischen dem nichtproduktiven und produktiven Repertoire (#!) berechnet (X<sup>2</sup>-Test).

**Figur 36: Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen auf die Motive in den nichtproduktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

In den nichtproduktiven Rearrangements wurde die Verteilung der Mutationen auf die Motive RGYW, WRCY, RGYW/WRCY, 3'- und 5'-Bridge sowie unrelated untersucht, wobei die Mutationen zusätzlich nach der Mutationsart wie Replacement und Silent sortiert wurden. Die schwarzen Säulen stellen die Replacement- und die weißen Säulen die Silent-Mutationen dar. Die Signifikanzunterschiede zwischen den Motiven wurden nur für das Gesamtrepertoire der nichtproduktiven Rearrangements (alle Mutationen im nichtproduktiven Repertoire) bestimmt und als Klammern über den jeweils vergleichenden Motiven angebracht. Wiederum zeigten sich die RGYW/WRCY-Motive als beliebtester Mutationsort (8,3%) (X<sup>2</sup>-Test).

**Figur 37: Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen auf die Motive in den produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Das produktive Repertoire wurde auf die Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen in den folgenden Motiven untersucht: RGYW, WRCY, RGYW/WRCY, 3'- und 5'-Bridge sowie freie Mutationen. 37,3% der Mutationen im produktiven Repertoire bevorzugten zumeist die RGYW/WRCY. Signifikante Unterschiede zeigten vor allem die Kombination aus den beiden Motiven RGYW und WRCY oder auch allein die RGYW gegenüber allen anderen Motiven (\*) (X<sup>2</sup>-Test), wobei die Signifikanzen nur für das Gesamtrepertoire der produktiven Rearrangements berechnet wurden.

**Figur 38: Vergleich aller mutierter Motive in den nichtproduktiven und produktiven V<sub>κ</sub>-Rearrangements**

Die Häufigkeit der mutierten Motive in den nichtproduktiven Rearrangements wurden mit dem produktiven Repertoire verglichen. In dieser Verteilung zeigte sich zwischen den beiden Repertoires eine große Ähnlichkeit, lediglich die freien Mutationen waren



im nichtproduktiven Repertoire (29,4%) signifikant ( $p < 0,05$ ) ( $X^2$ -Test) häufiger nachweisbar als im produktiven (20,9%). Außerdem wurden innerhalb des nichtproduktiven Repertoires mehr Mutationen in den Nicht-RGYW/WRCY-Motiven gefunden und somit konnte ein deutlicher Signifikanzunterschied zu den RGYW/WRCY-Motiven berechnet werden ( $p < 0,006$ ) ( $X^2$ -Test).

**Figur 39: Vergleich der mutierten Motive in den CDR-Regionen nichtproduktiver und produktiver  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Ein Vergleich der mutierten Motive speziell in den CDR-Regionen wurde zwischen dem nichtproduktiven und produktiven Repertoire durchgeführt. Dabei wurde gesehen, dass die RGYW-Mutationen im nichtproduktiven Repertoire (19,3%) signifikant seltener vorkamen als bei den produktiven (32,9%) Rearrangements, gegensätzlich dazu wurden im nichtproduktiven Repertoire (33,3% versus 13,4%;  $p < 0,0005$ ) Mutationen ohne Bezug zu einem Motiv signifikant häufiger gezählt. Außerdem wurden im nichtproduktiven Repertoire signifikant ( $p < 0,0005$ ) mehr Mutationen in den Nicht-RGYW/WRCY-Motiven gefunden. ( $X^2$ -Test)

**Figur 40: Vergleich der mutierten Motive in den FR-Regionen nichtproduktiver und produktiver  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

In den FR-Regionen der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements wurden beim Vergleich der mutierten Motive keine signifikanten Unterschiede beobachtet. In beiden Repertoires bestätigte sich die Tatsache, dass die Mutationen signifikant ( $p < 0,04$ ) mehr in den Nicht-RGYW/WRCY-Motiven zu finden sind. ( $X^2$ -Test)

**Figur 41: Lokation der Mutationen in den RGYW- und WRCY-Motiven nichtproduktiver und produktiver  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Die Position der Mutationen in den RGYW- und WRCY-Motiven wurde zwischen den nichtproduktiven und produktiven Rearrangements verglichen. Signifikanzunterschiede wurde nur für das Gesamtrepertoire dargestellt, indem über die beiden vergleichenden signifikanten Positionen eine Klammer mit Stern gesetzt wurde. Am häufigsten wurde die Position zwei (40,1%) mutiert. Beim Vergleich der nichtproduktiven und produktiven Rearrangements ergaben sich keine signifikante Unterschiede.

**Figur 42: Lokation der Replacement- und Silent-Mutationen in den RGYW- und WRCY-Motiven nichtproduktiver (a) und produktiver (b)  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Im nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Repertoire wurde die Position der Replacement- und Silent-Mutationen in den RGYW- und WRCY-Motiven analysiert.

Die Position drei wurde im nichtproduktiven Repertoire (6,1%) vom Mutator bevorzugt und die Position zwei im produktiven Repertoire (34,6%). Auf allen Positionen dominierten die Replacement signifikant (&) über den Silent-Mutationen ( $X^2$ -Test). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Positionen wurden nur für die Gesamtanzahl des nichtproduktiven und produktiven Repertoires berechnet.

**Figur 43: Lokation der Mutationen im RGYW-Motiv nichtproduktiver und produktiver  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Die Lokation der Mutationen nur im RGYW-Motiv wurde analysiert. Sowohl im nichtproduktiven (5,3%) als auch im produktiven (42%) Repertoire war die Position zwei der häufigste Mutationsort. Die im Gesamtrepertoire (47,3%) sehr häufige Position zwei wies gegenüber allen anderen Positionen Signifikanzunterschiede auf ( $X^2$ -Test).

**Figur 44: Lokation der Replacement- und Silent-Mutationen im RGYW-Motiv nichtproduktiver (a) und produktiver (b)  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

Im nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Repertoire wurde die Position der Replacement- und Silent-Mutationen im RGYW-Motiv analysiert. Dabei war die Position zwei im nichtproduktiven Bereich mit 5,3% und im produktiven Bereich mit 42% als beliebteste Mutationsstelle nachweisbar ( $X^2$ -Test).

**Figur 45: Lokation der Mutationen im WRCY-Motiv nichtproduktiver und produktiver  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

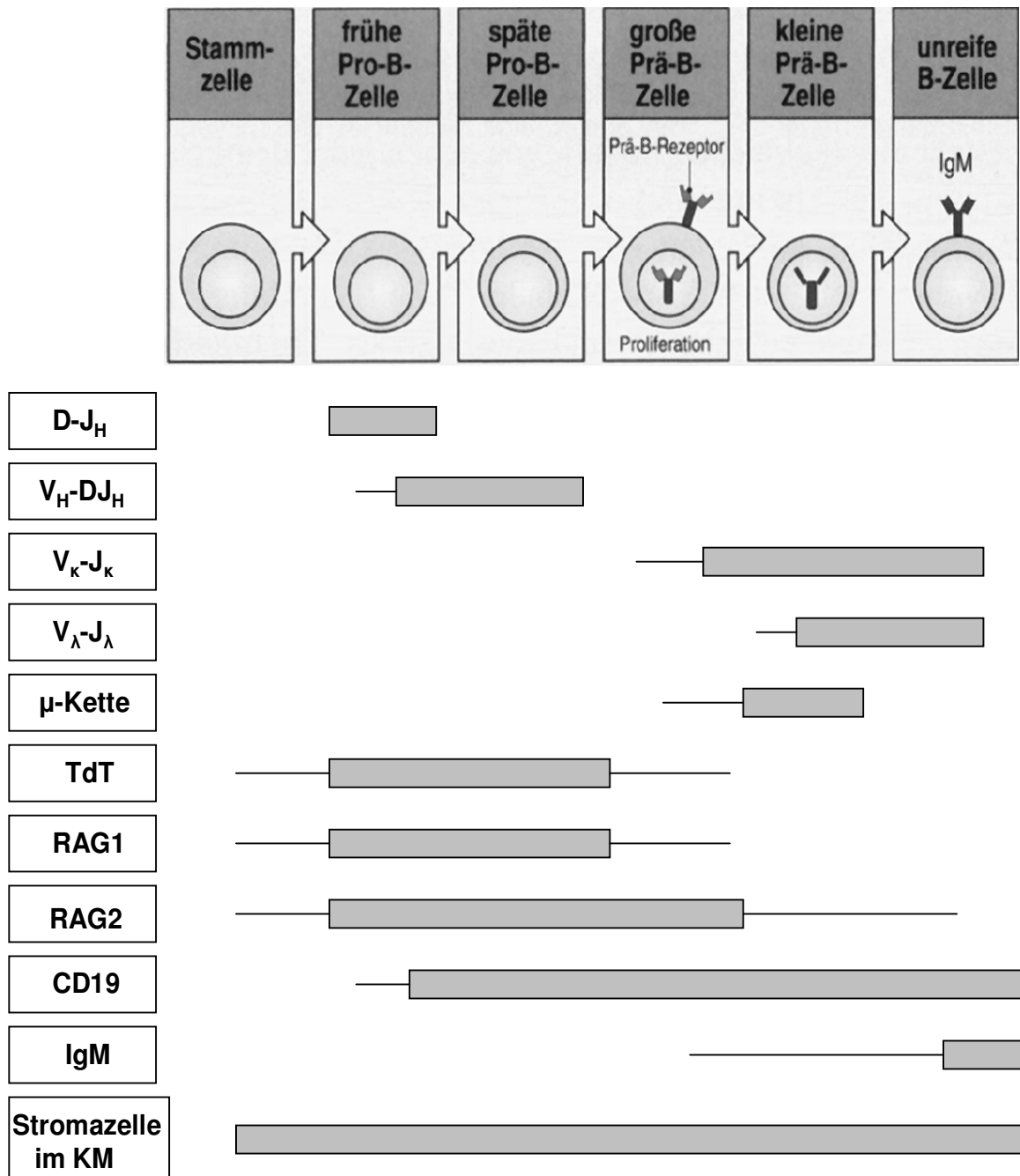
Die Lokation der Mutationen im WRCY wurde für das nichtproduktive, produktive und für das Gesamtrepertoire dargestellt. In allen drei Gruppen bevorzugte der Mutator die dritte Position, für die dadurch zu den anderen Positionen signifikante Unterschiede berechnet werden konnten. Zweit häufig mutierte Position war die zweite Base im WRCY ( $X^2$ -Test).

**Figur 46: Lokation der Replacement- und Silent-Mutationen im WRCY-Motiv nichtproduktiver (a) und produktiver (b)  $V_{\kappa}$ -Rearrangements**

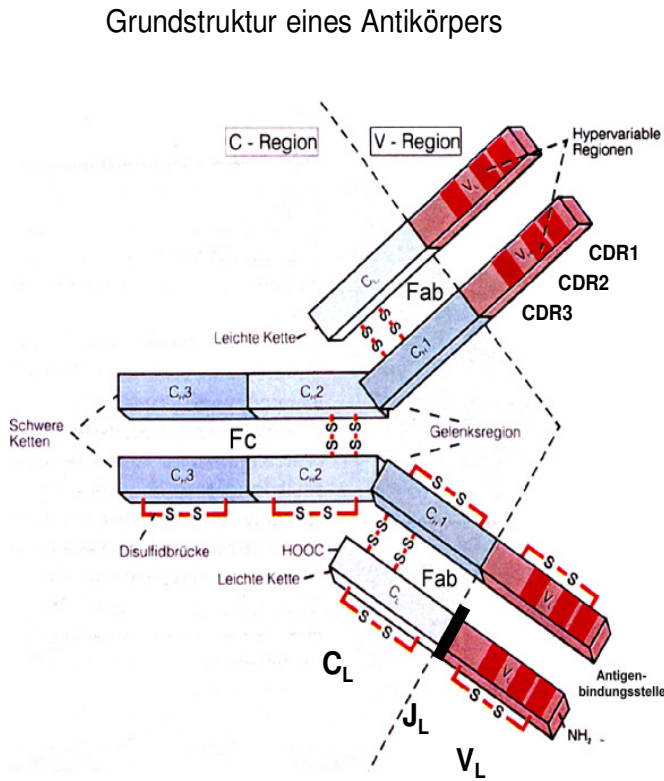
Die Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen im WRCY-Motiv wurde für die nichtproduktiven (a) und produktiven (b) Rearrangements dargestellt. Dabei bestätigte sich im WRCY-Motiv wie im Gesamtrepertoire die Vorliebe vor allem der Replacement-Mutationen für die Position drei ( $X^2$ -Test).

8.2 Figuren

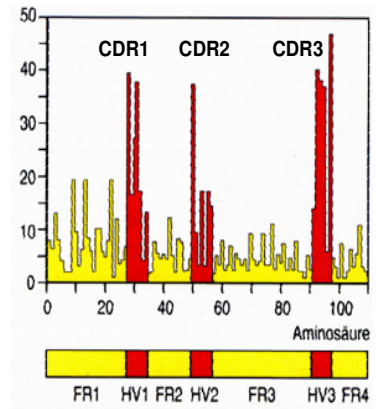
Figur 1: B-Zell-Entwicklung im Knochenmark des Menschen



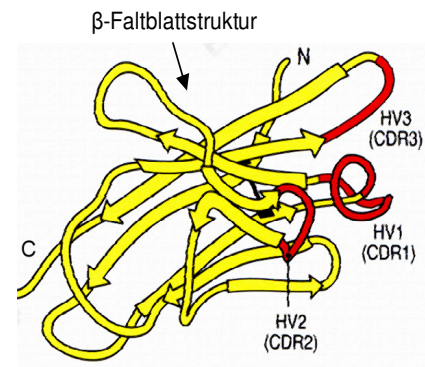
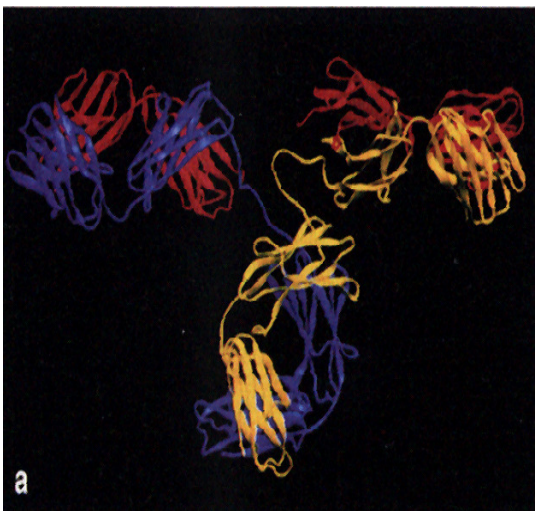
**Figur 2: Struktur eines Antikörpermoleküls**



Sequenzvariabilität der V-Region einer leichten Kette:  
**hypervariable Regionen**

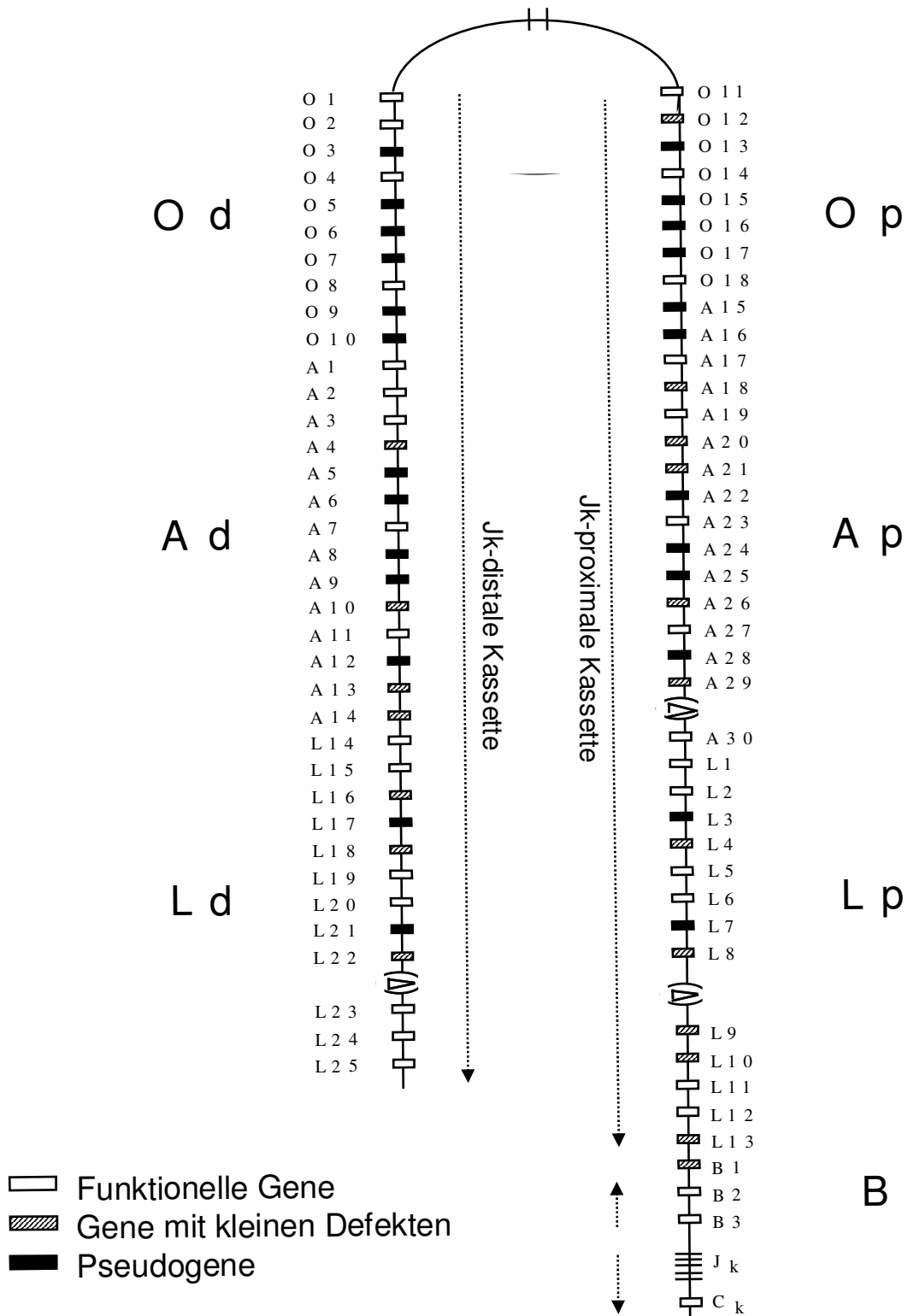


Dreidimensionale Struktur eines Antikörpers



Räumliche Anordnung der hypervariablen Regionen  
**Bildung der Antigenbindungsstelle**

Figur 3: Immunoglobulin kappa Lokus



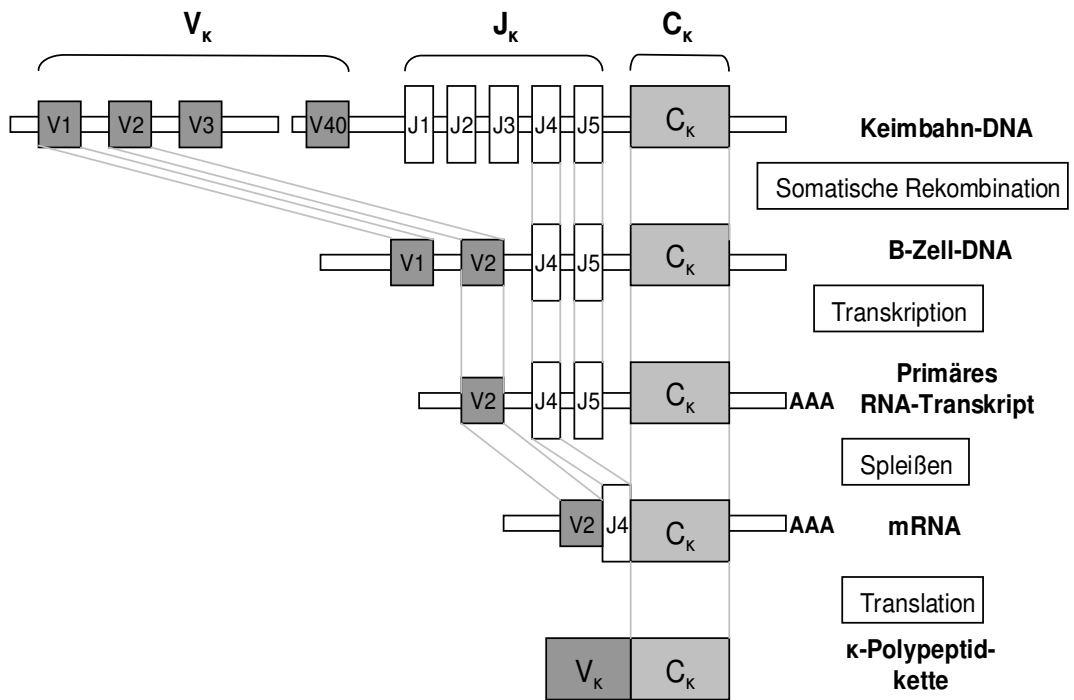
**Figur 4: Entstehung der Antikörperdiversität**

**Erbliche Grundlagen für die Diversität**

Zahl der funktionsfähigen  
Genelemente für die variable  
Region

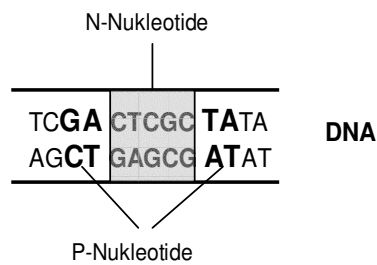
	leichte Kette		schwere Kette
	Kappa	Lambda	Heavy
V-Gene	40	30	65
D-Gene	0	0	27
J-Gene	5	4	6

**Kombinatorische Diversität durch VJ-Rearrangements: kappa-Kette**



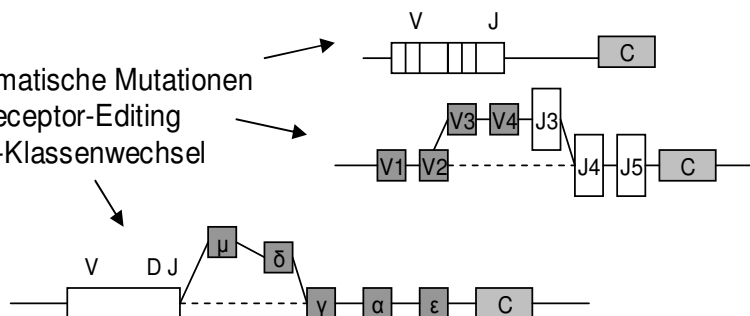
**Junktionale Diversität**

- P-Nukleotide
- N-Nukleotide
- Exonukleasen



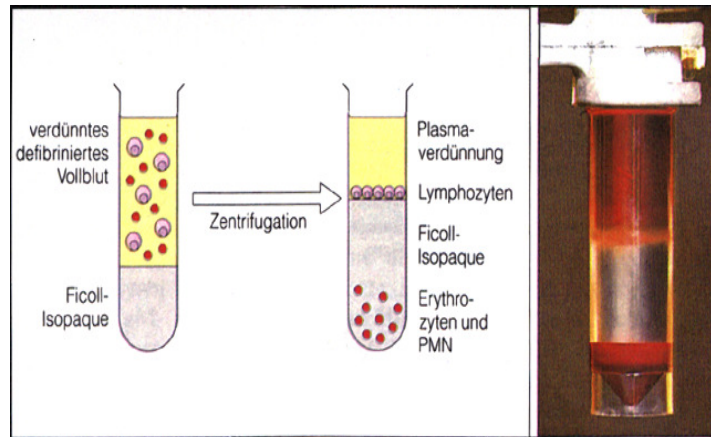
**Diversität durch**

- somatische Mutationen
- Receptor-Editing
- Ig-Klassenwechsel

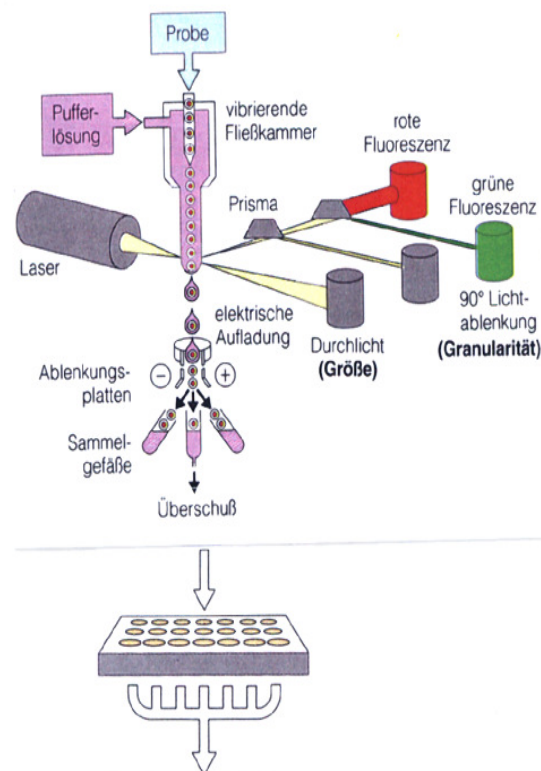


**Figur 5: Schematische Darstellung von Isolierung (a) und Sortierung (b) der CD19+ B-Zellen aus dem peripheren Blut von SLE-Patienten**

(a) Abtrennung der B-Zellen  
mittels Ficoll-Hypaque®  
Gradientenzentrifugation



(b) Einzelzell-Sortierung  
der CD19+ B-Zellen mittels  
FACs Star<sup>Plus</sup> Durchfluss-  
zytometers



Einzelzell-Sort in 96 well  
PCR-Platten

Unspezifische PCR-Vervielfachung unter unspezifischen Oligonukleotiden

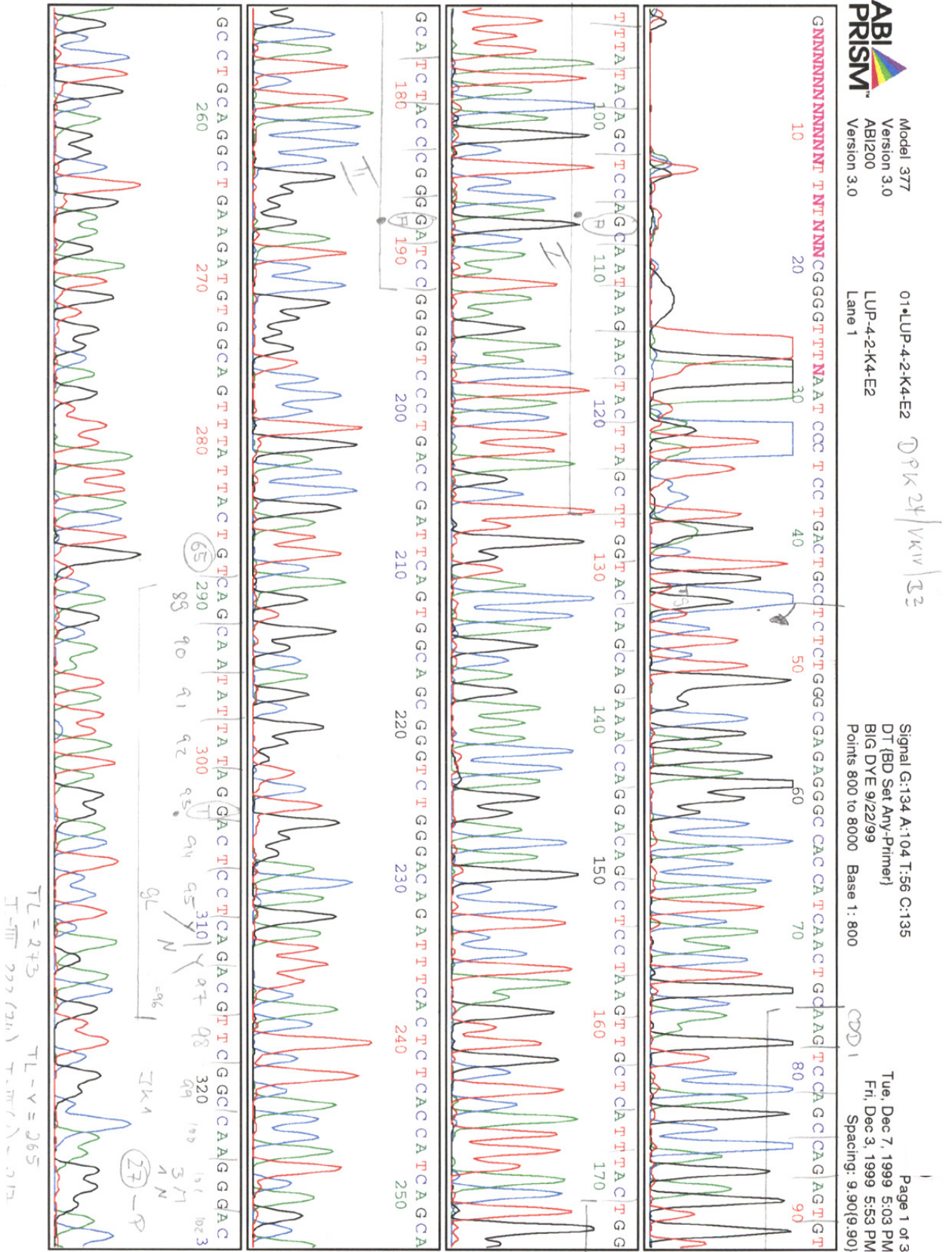
Spezifische Nested PCR unter  $V_k$ -spezifischen Primern

Auftrennung mittels Agarose-Gel

Sequenzierung der DNA mittels ABI 377 Sequenzierer



Figur 6: Sequenzierung mittels ABI Prism 377 Sequenzierungsgerät

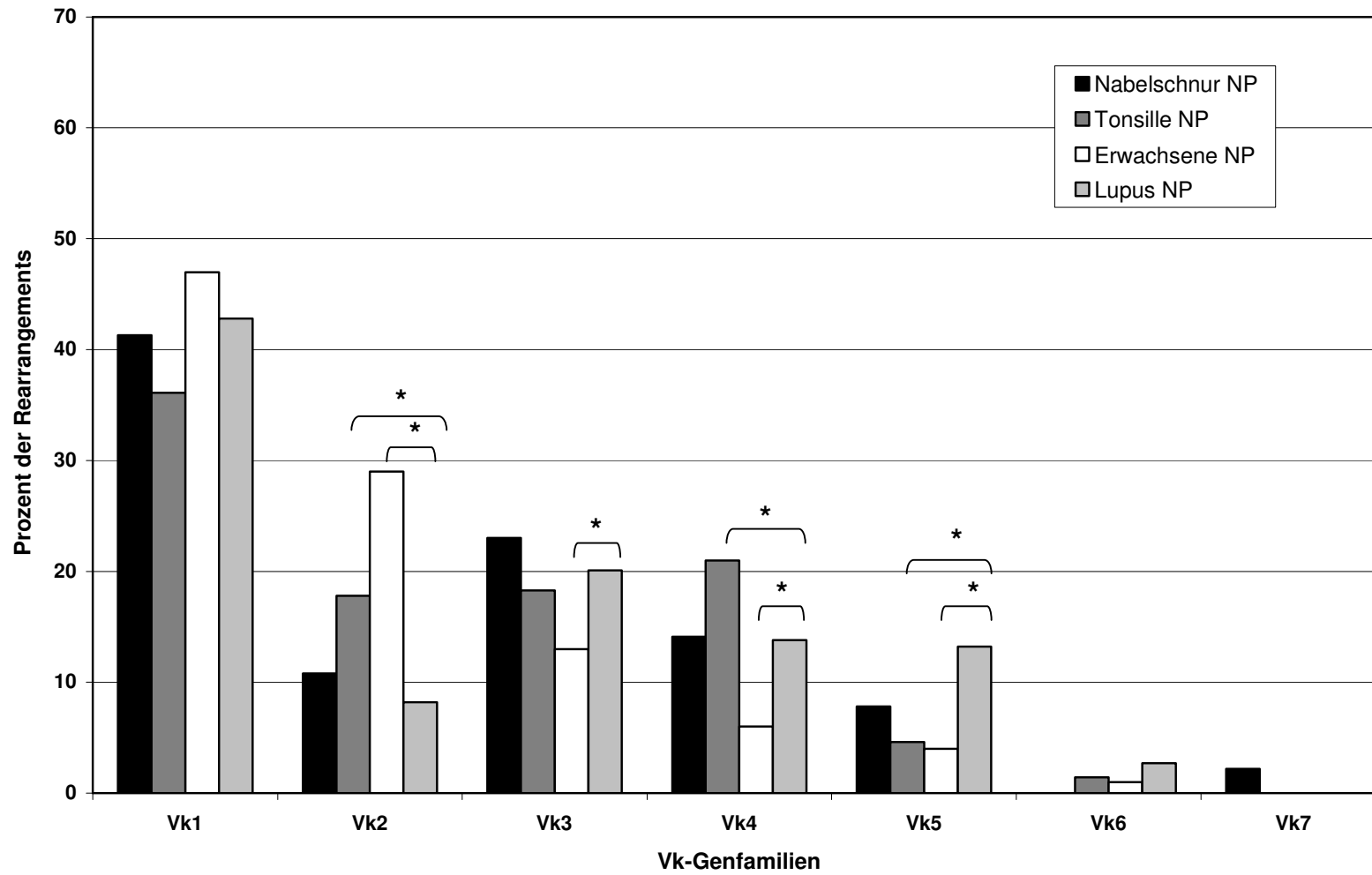




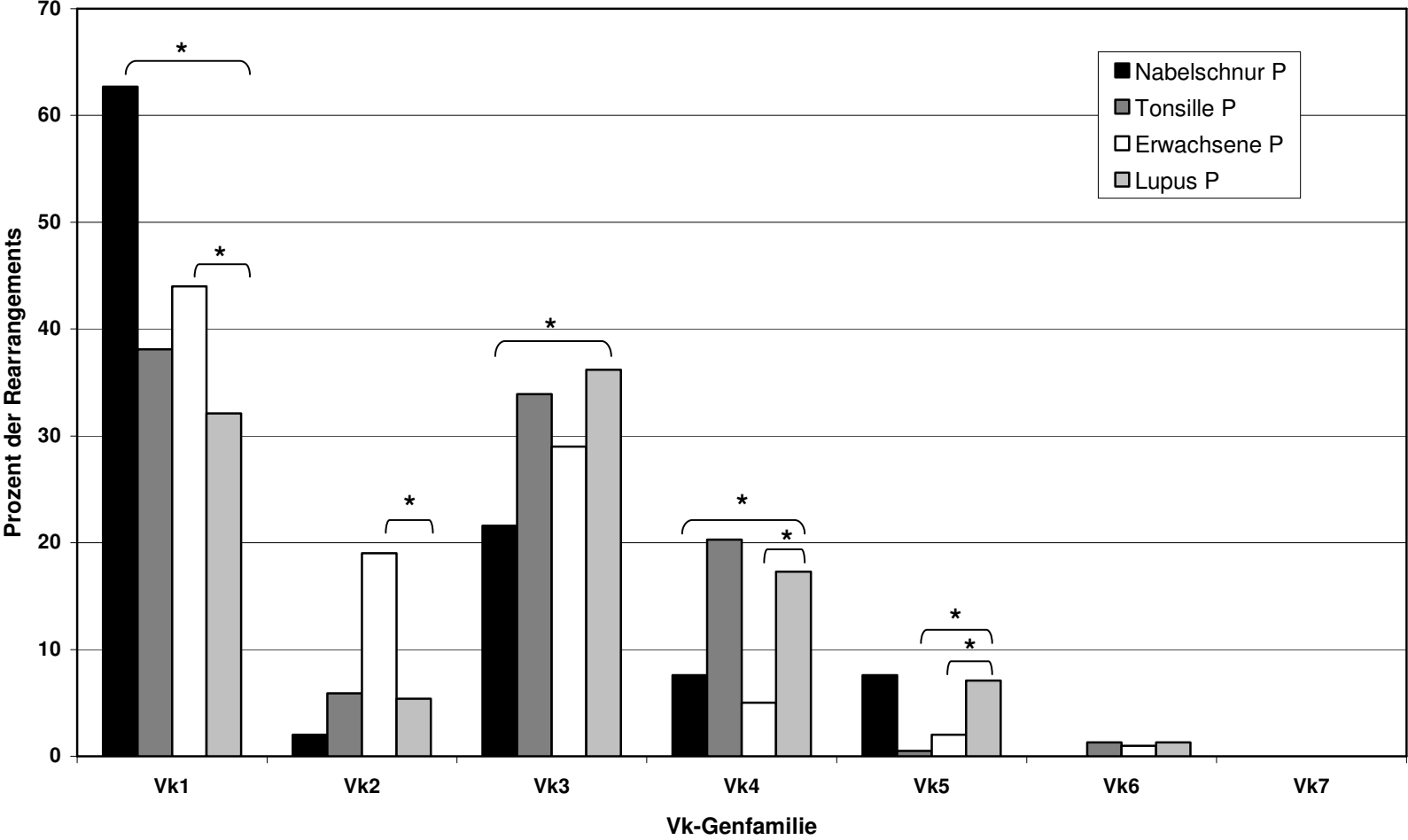
Figur 7: Verteilung der Vk-Gene in nichtproduktiven und produktiven Rearrangements

Vk Familie	Funktionelle Vk Gene		Nichtproduktiv			Produktiv			p-Wert
	Anzahl	Häufigkeit	Anzahl	Häufigkeit	p-Wert	Anzahl	Häufigkeit	p-Wert	
			(n = 194)			(n = 221)			
Vk I	19	(47,5 %)	83	(42,8%)	n.s.	71	(32,1%)	<0,0001	<0,05
Vk II	9	(22,5%)	16	(8,2%)	<0,0001	12	(5,4%)	<0,0001	n.s.
Vk III	7	(17,5%)	39	(20,1%)	n.s.	80	(36,2%)	<0,0001	<0,0005
Vk IV	1	(2,5%)	26	(13,8%)	<0,0001	39	(17,3%)	<0,0001	n.s.
Vk V	1	(2,5%)	25	(13,2%)	<0,0001	16	(7,1%)	<0,0001	n.s.
Vk VI	3	(7,5%)	5	(2,7%)	<0,01	3	(1,3%)	<0,001	n.s.
Vk VII	0		0		n.a.	0		n.a.	n.a.

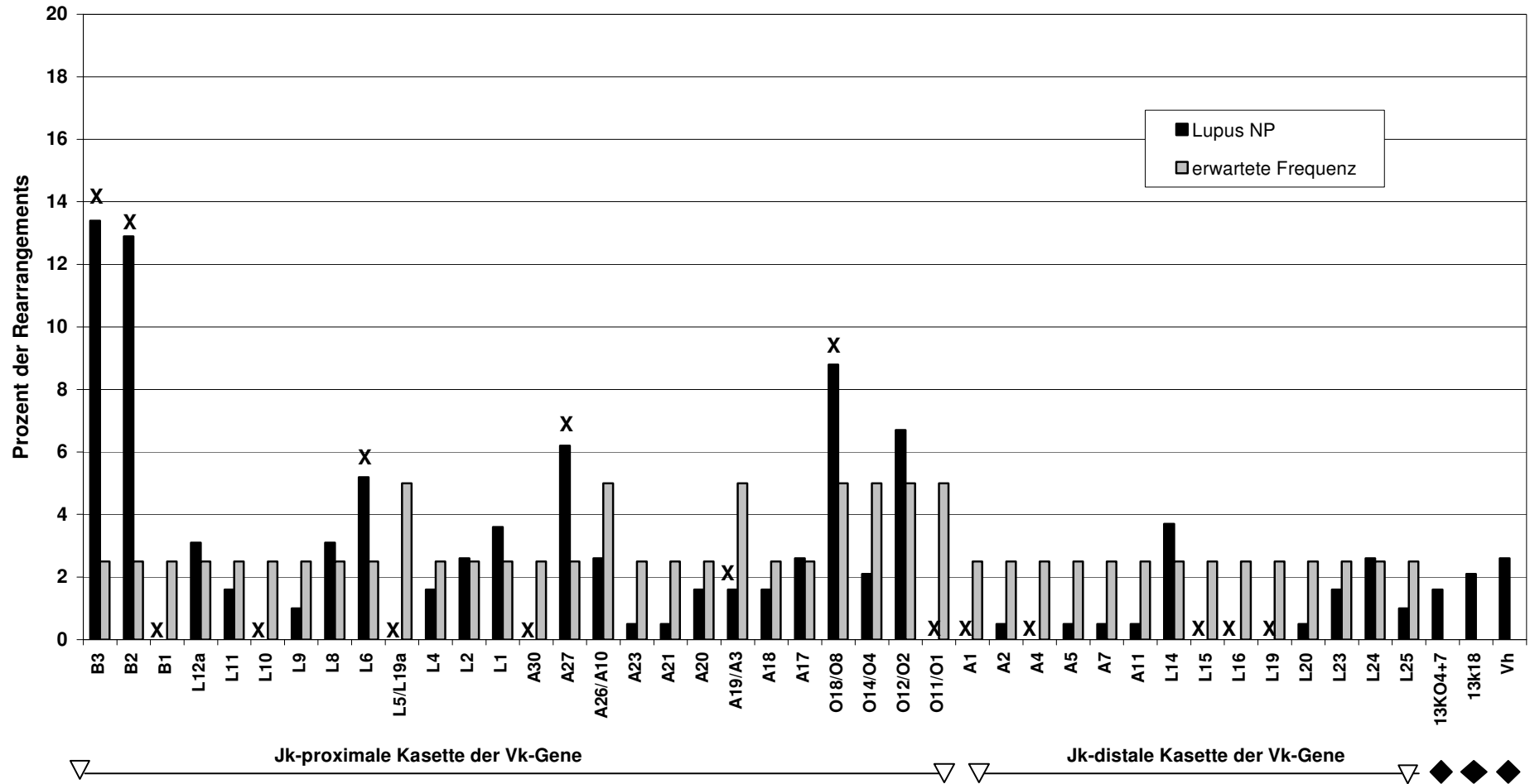
**Figur 8a: Vergleich der Verteilung der Vk-Genfamilien in nichtproduktiven Rearrangements zwischen B-Zellen des Nabelschnurblutes, der Tonsille, von Erwachsenen und von SLE-Patienten**



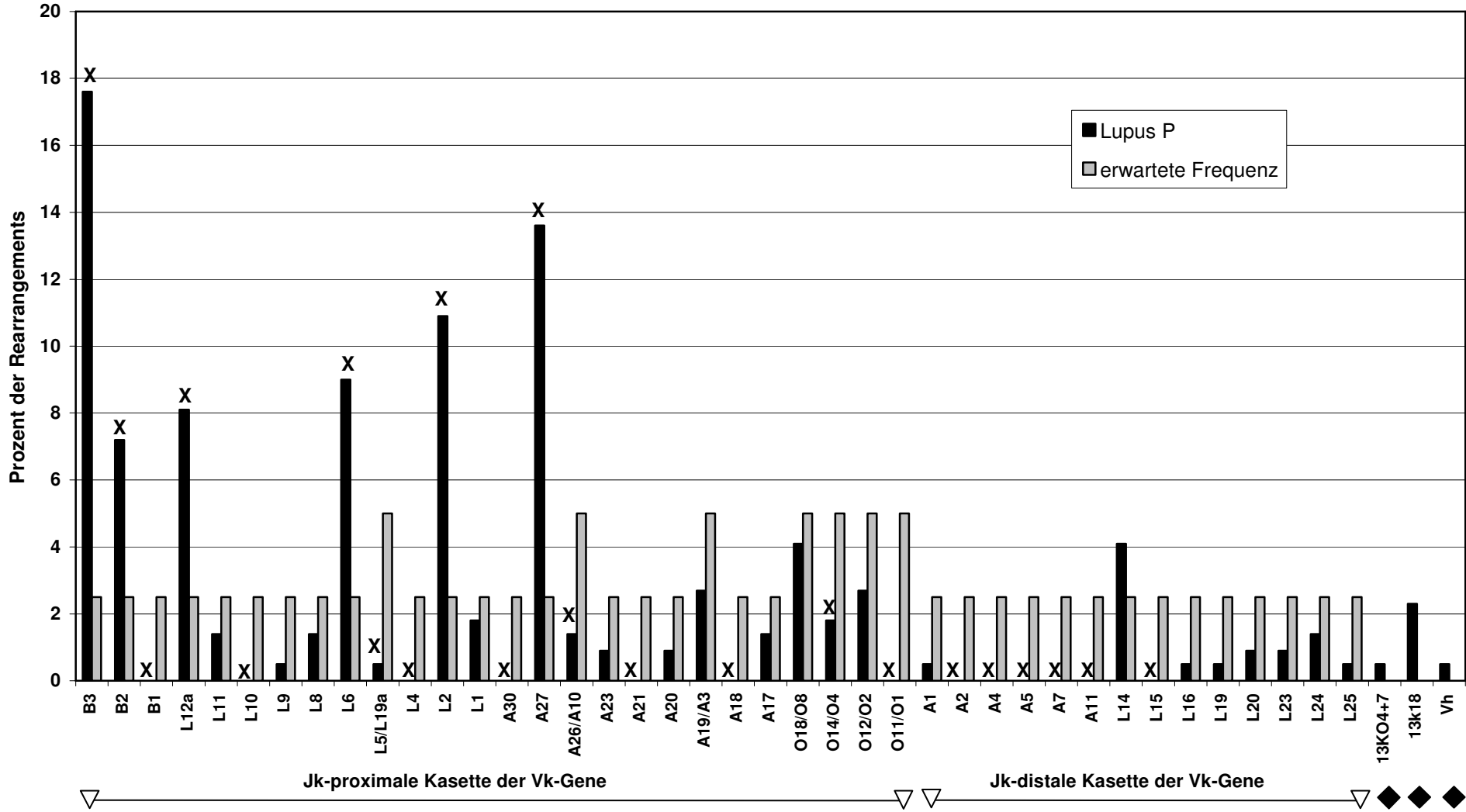
Figur 8b: Vergleich der Verteilung der Vk-Genfamilien in produktiven Rearrangements zwischen B-Zellen des Nabelschnurblutes, der Tonsille, von Erwachsenen und von SLE-Patienten



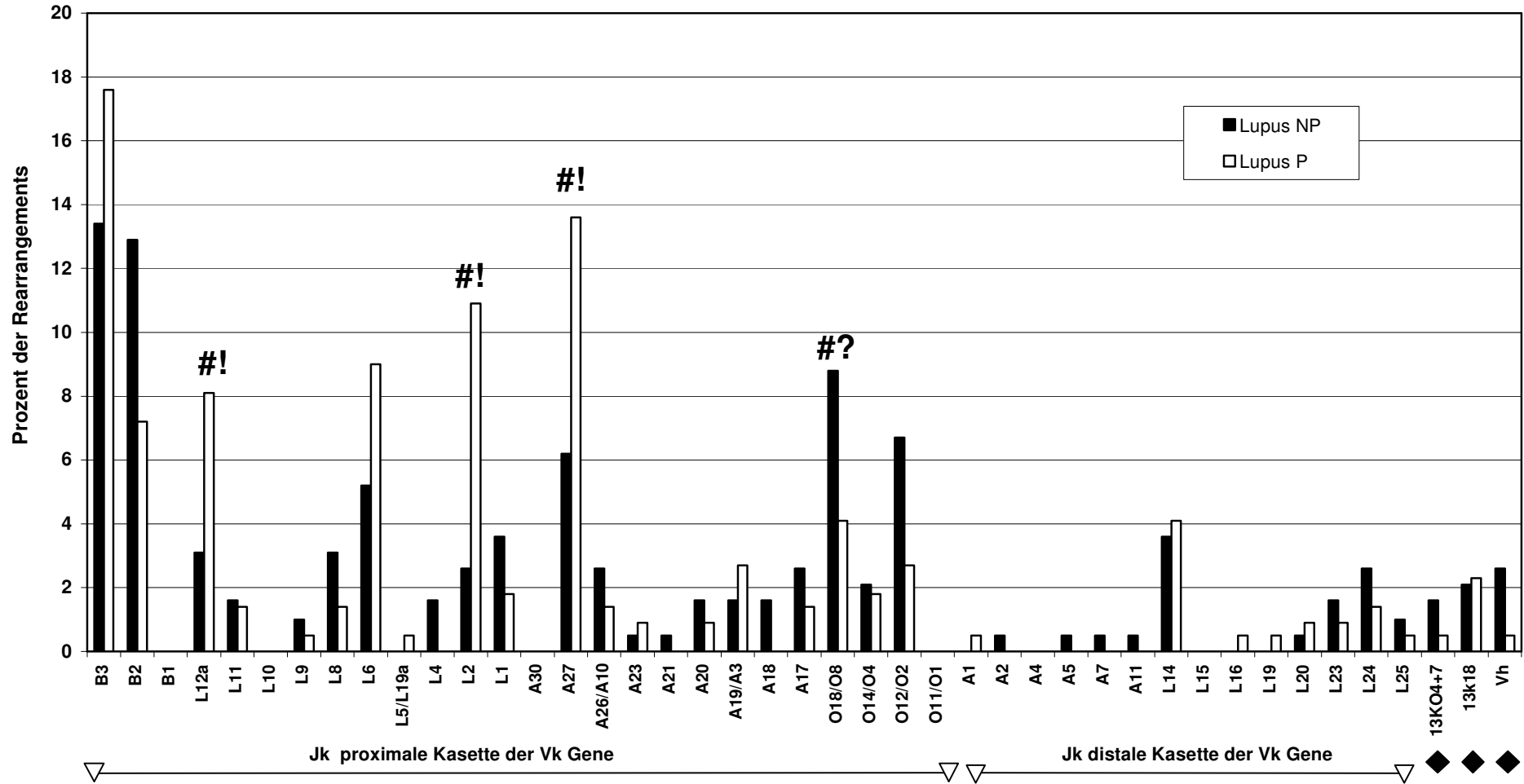
Figur 9a: Vergleich der Häufigkeiten von Vk-Genen in nicht-produktiven Rearrangements der peripheren Lupus B-Zellen mit der erwarteten Frequenz



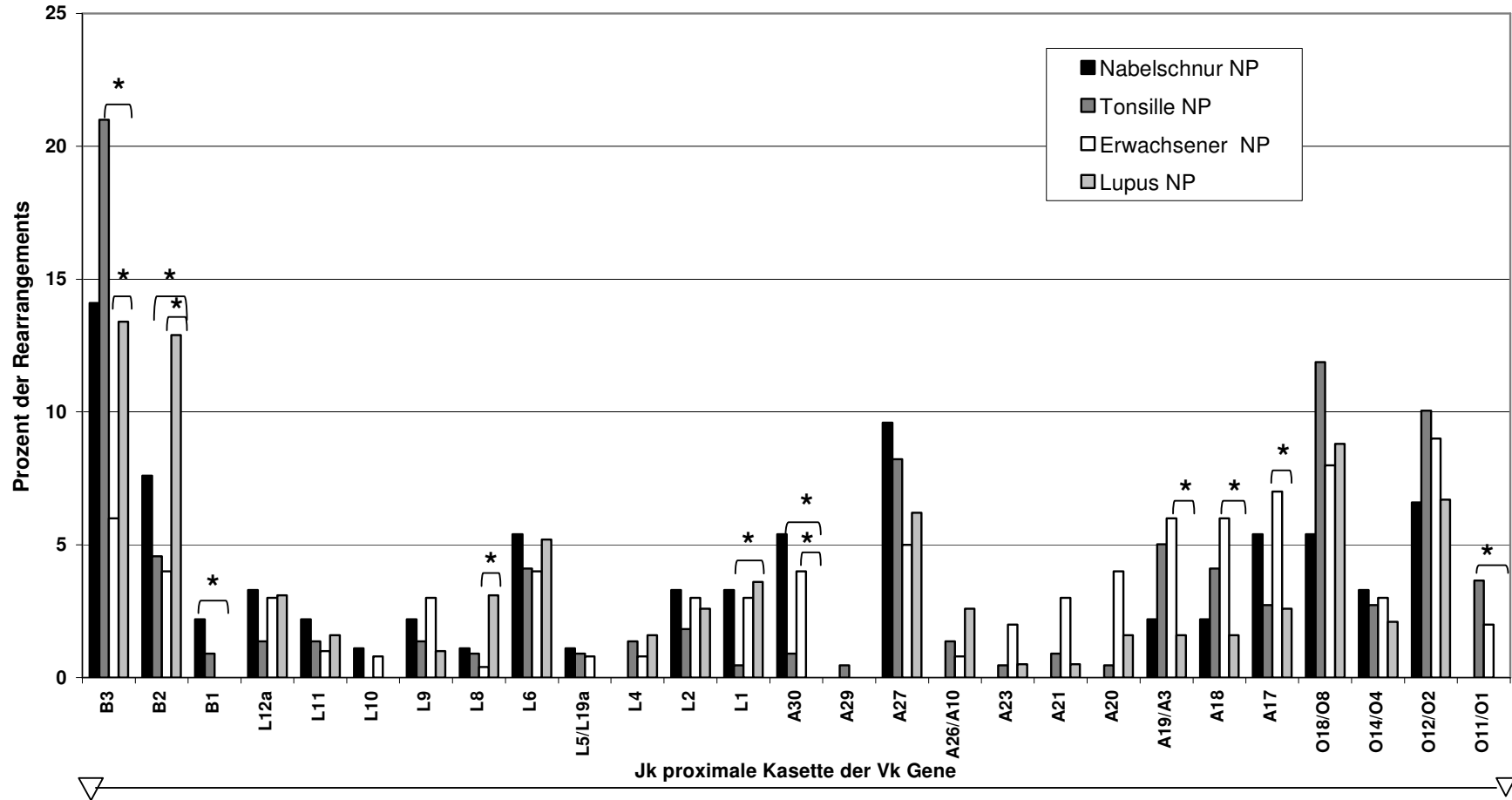
Figur 9b: Vergleich der Häufigkeiten von Vk-Genen in produktiven Rearrangements der peripheren Lupus B-Zellen mit der erwarteten Frequenz



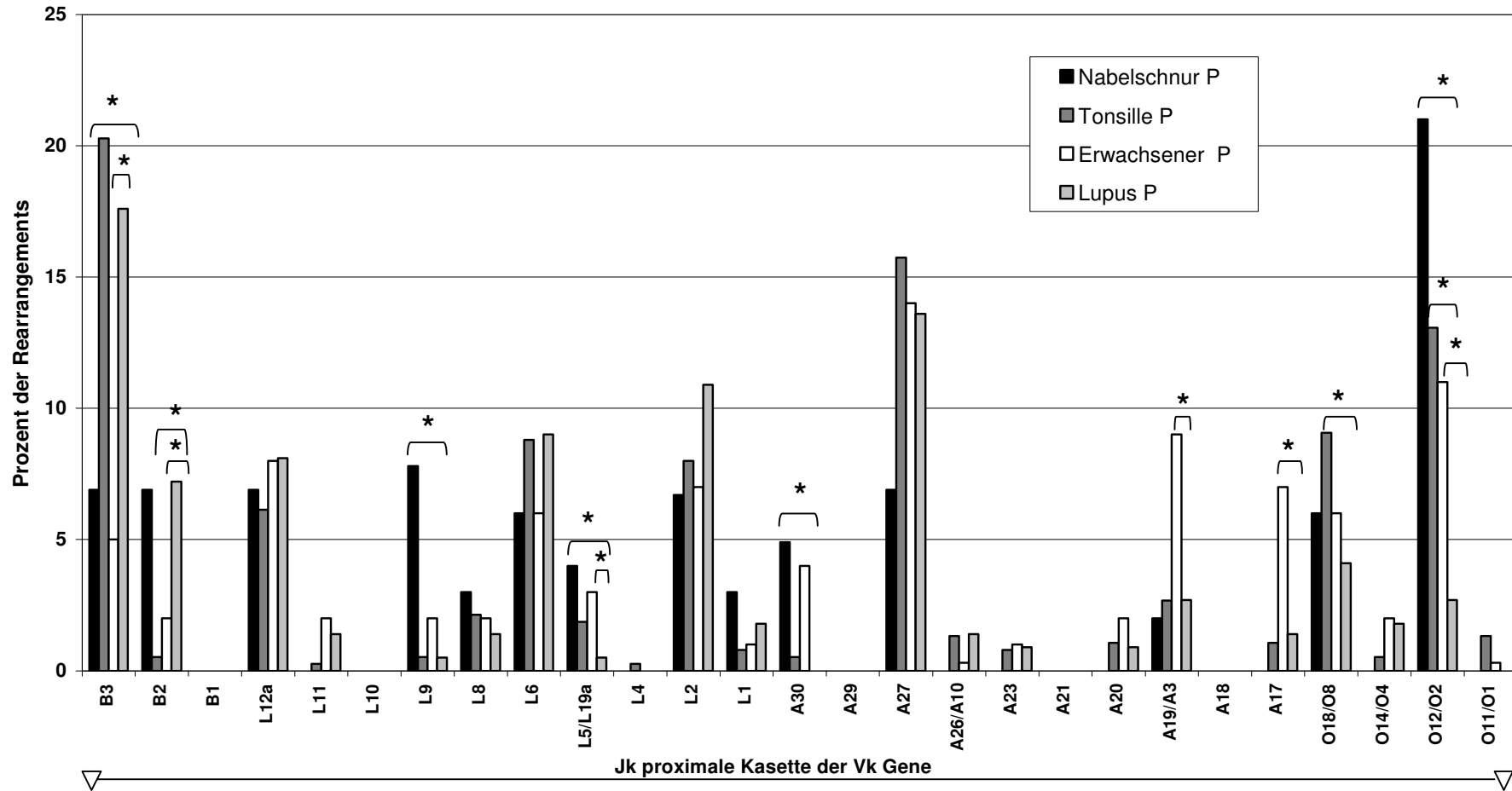
Figur 10: Vergleich der Häufigkeiten von Vk Genen zwischen nicht-produktiven und produktiven Rearrangements



**Figur 11a: Vergleich der Häufigkeiten der proximalen Vk Gene von nicht-produktiven SLE B-Zellen mit B-Zellen des Nabelschnurblutes, des Erwachsenen und der Tonsille**

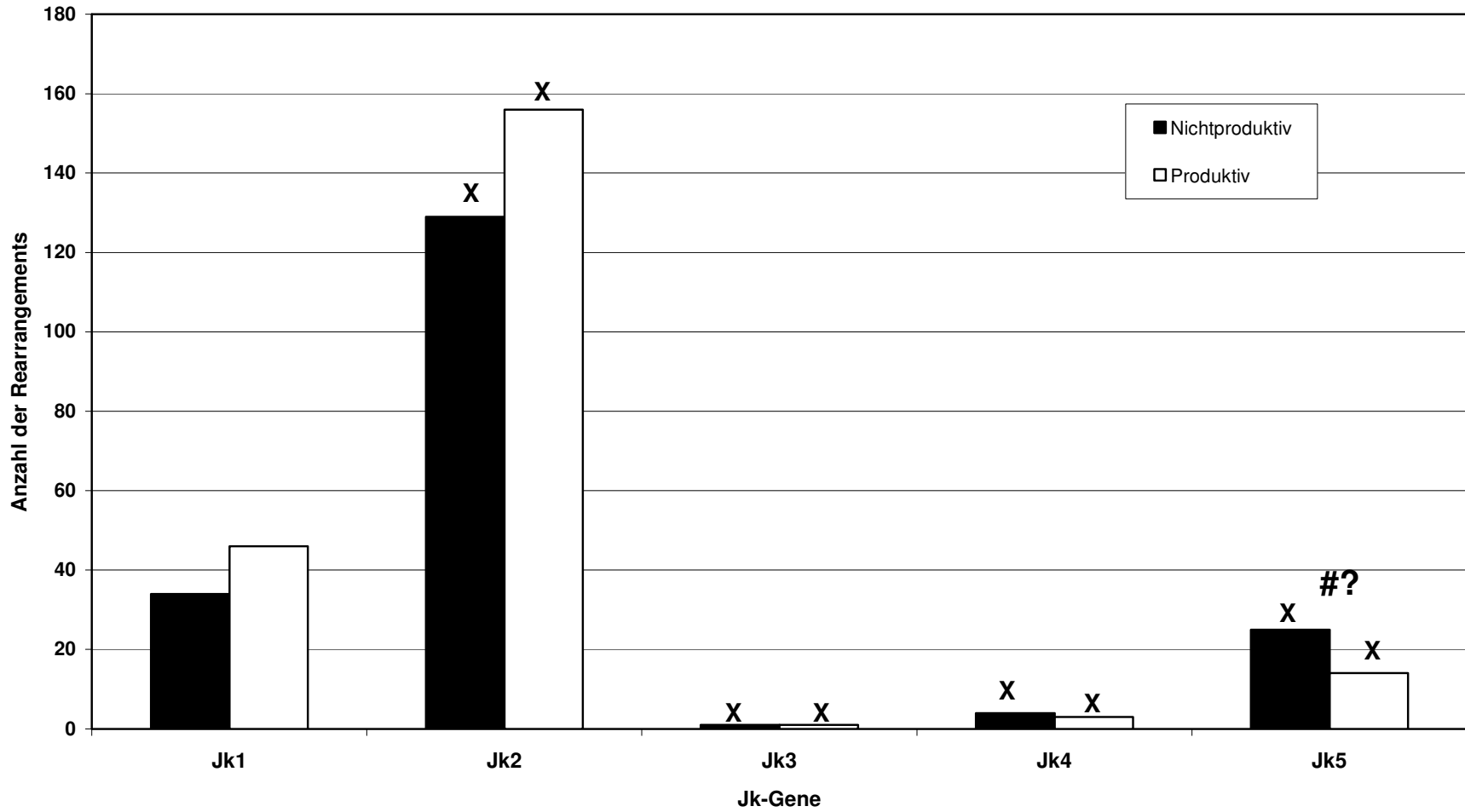


Figur 11b: Vergleich der Häufigkeiten der proximalen Vk Gene von produktiven SLE B-Zellen mit B-Zellen des Nabelschnurblutes, des Erwachsenen und der Tonsille

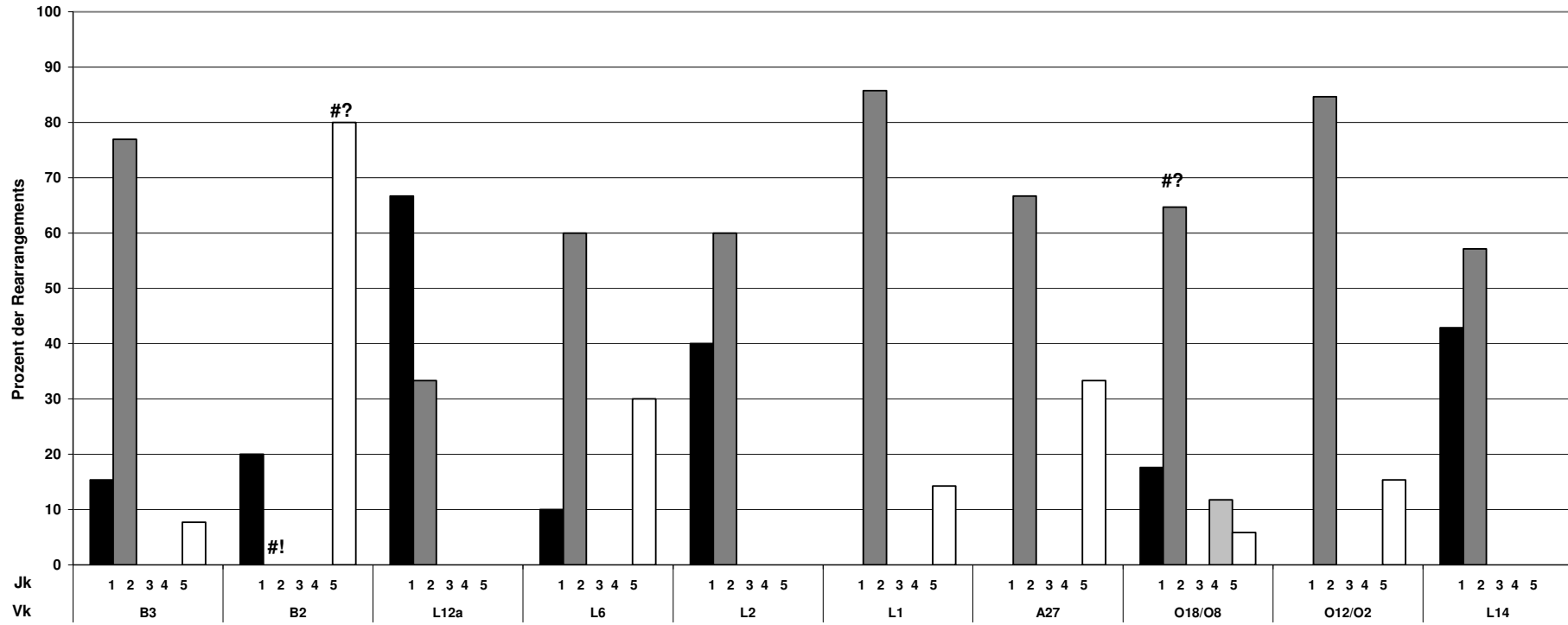




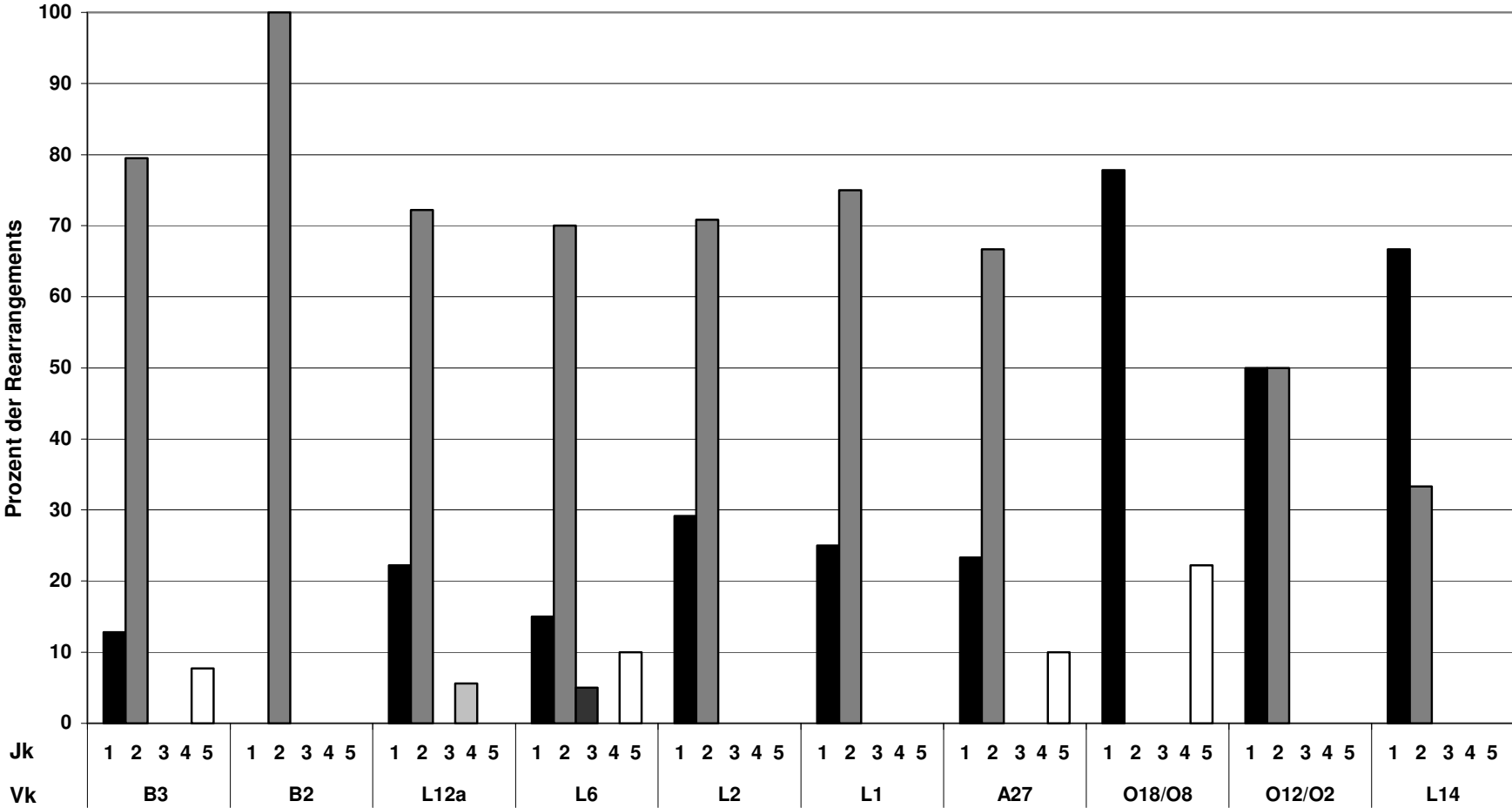
Figur 12: Jk-Utilisation in produktiven und nicht-produktiven Rearrangements der peripheren Lupus B-Zellen



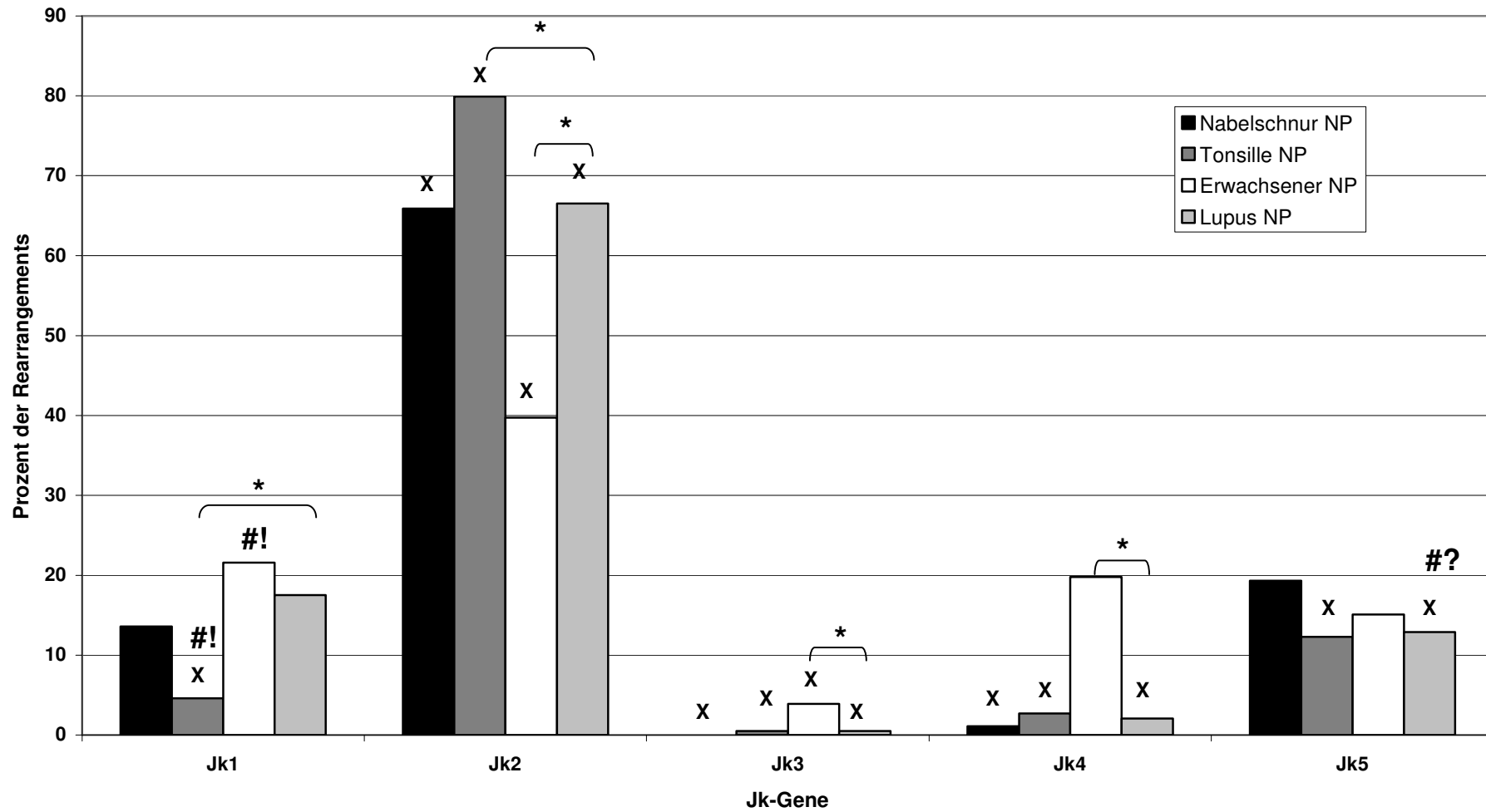
Figur 13a: Verwendung von Jk-Genen durch häufig rearrangierte Vk-Gene in nichtproduktiven Rearrangements



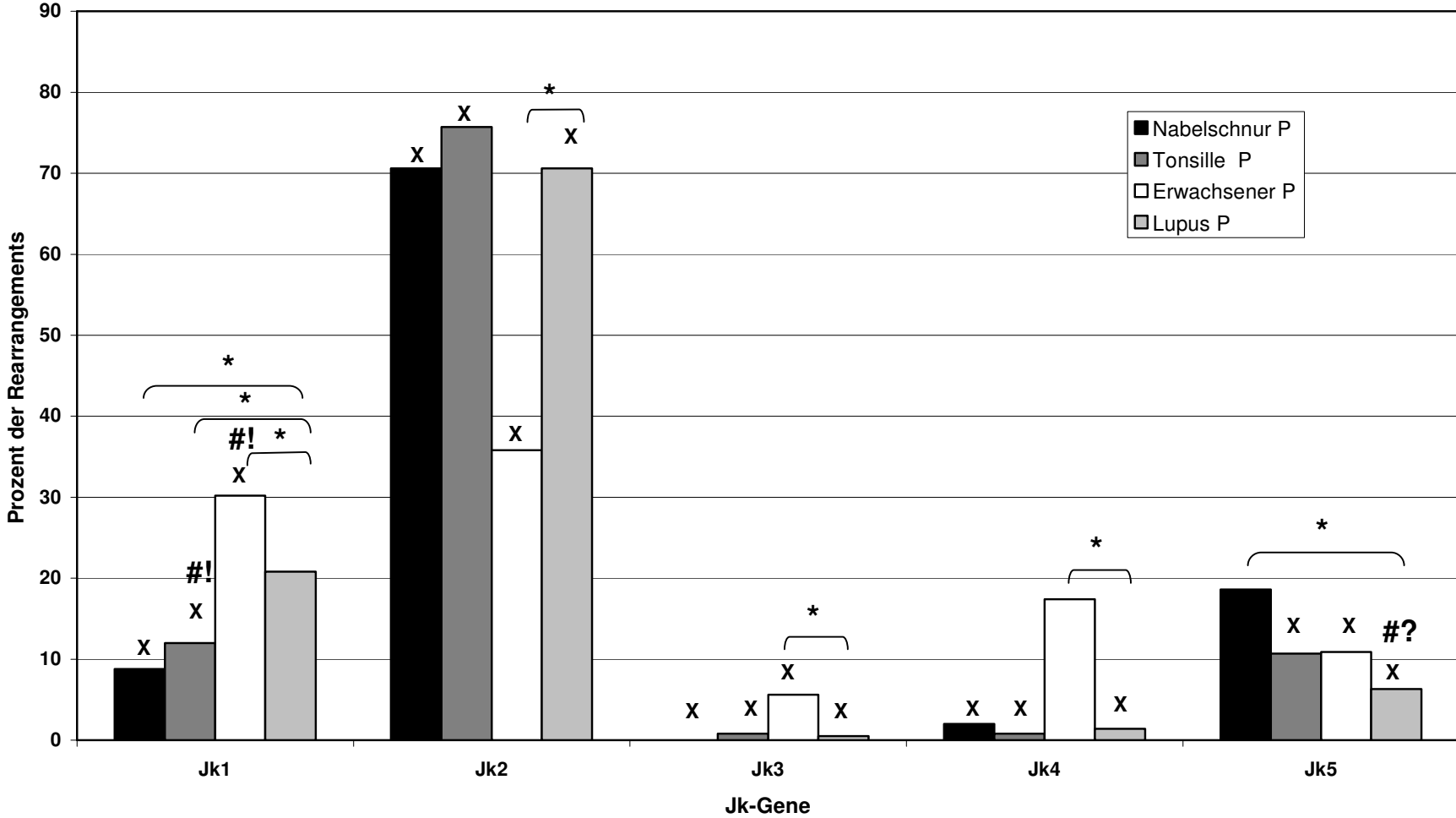
**Figur 13b: Verwendung von Jk-Genen durch häufig rearrangierte Vk-Gene in produktiven Rearrangements**



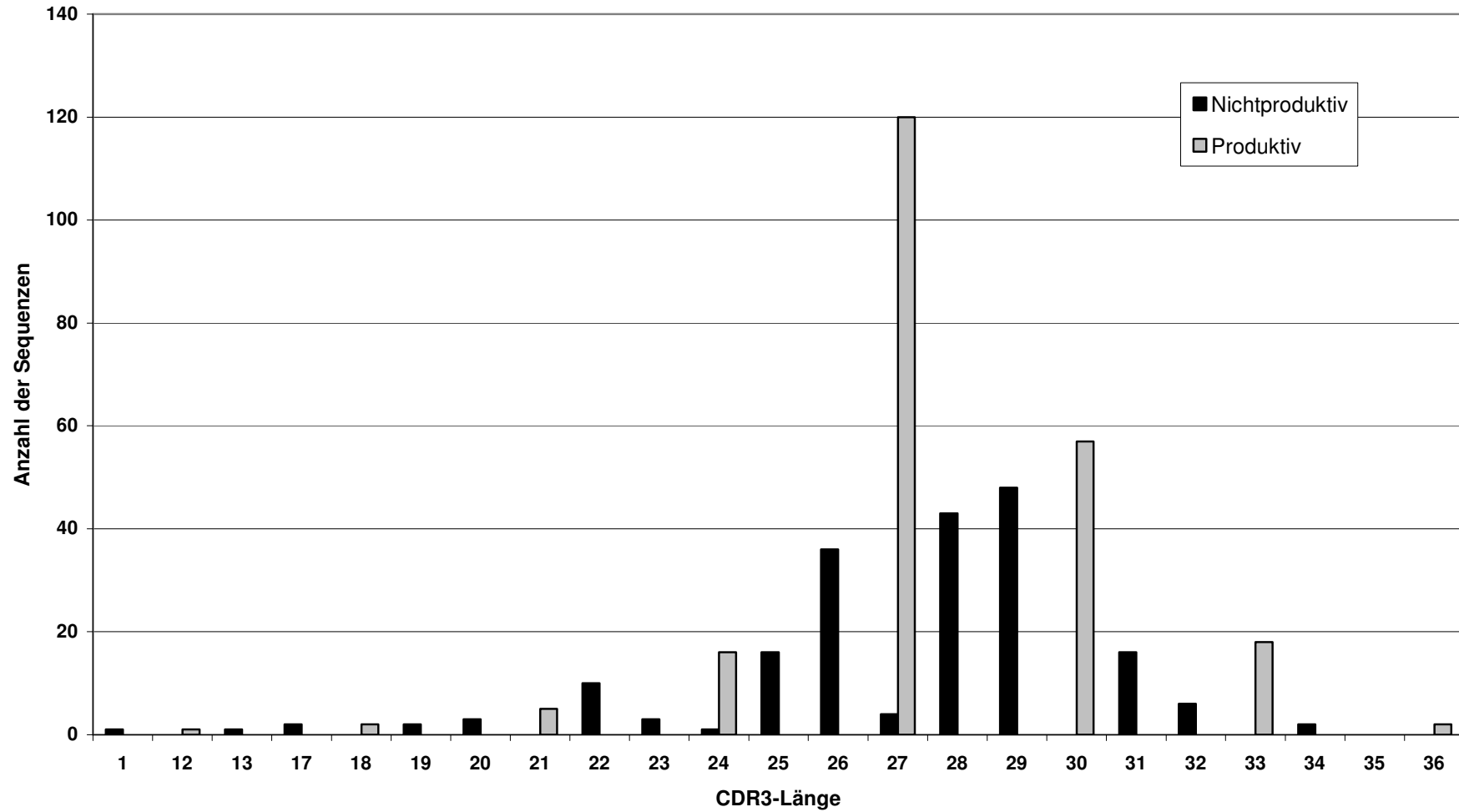
**Figur 14a: Vergleich der Jk-Utilisation von nicht-produktiven SLE B-Zellen mit B-Zellen des Nabelschnurblutes, des Erwachsenen und der Tonsille**



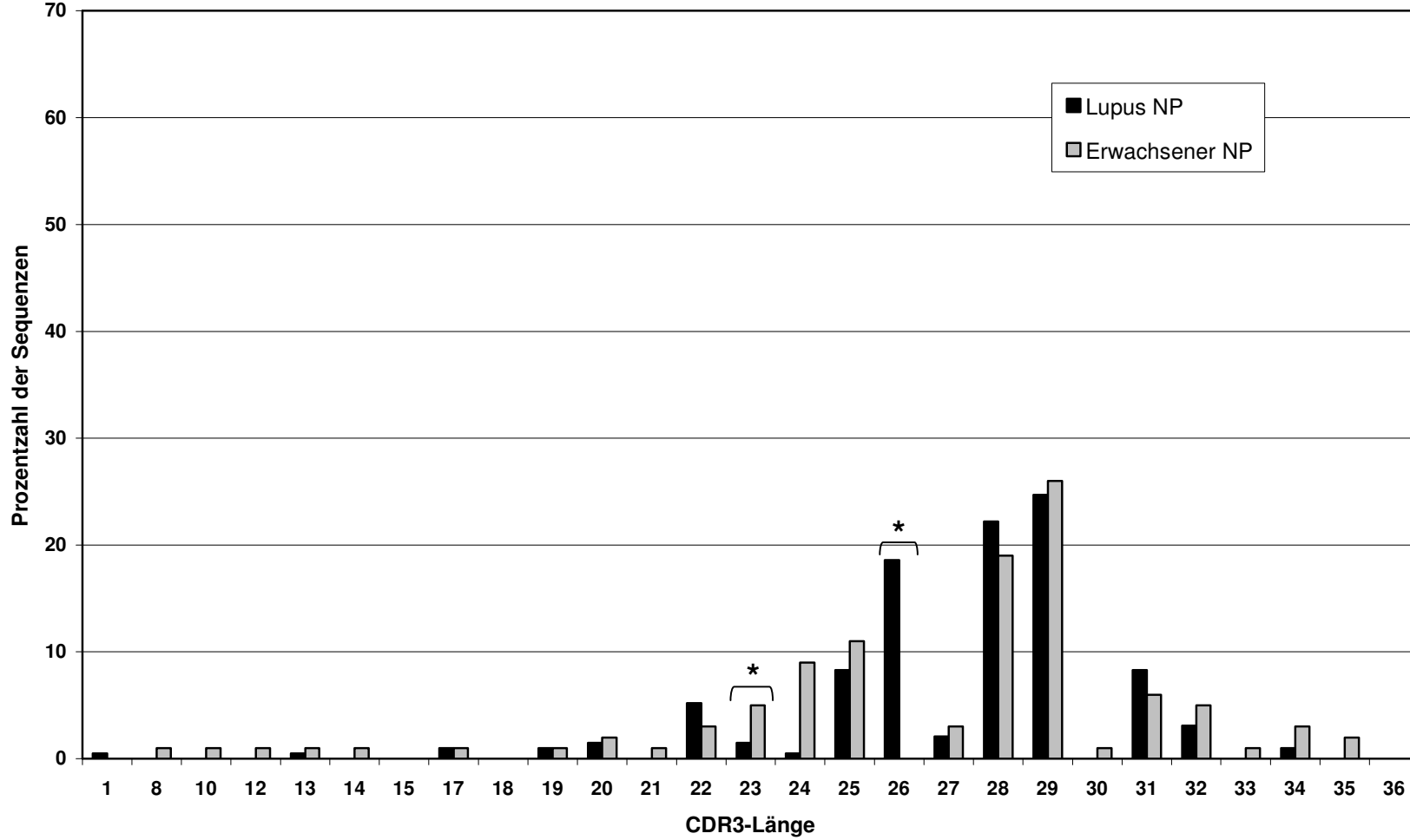
Figur 14b: Vergleich der Jk-Utilisation von produktiven SLE B-Zellen mit B-Zellen des Nabelschnurblutes, des Erwachsenen und der Tonsille



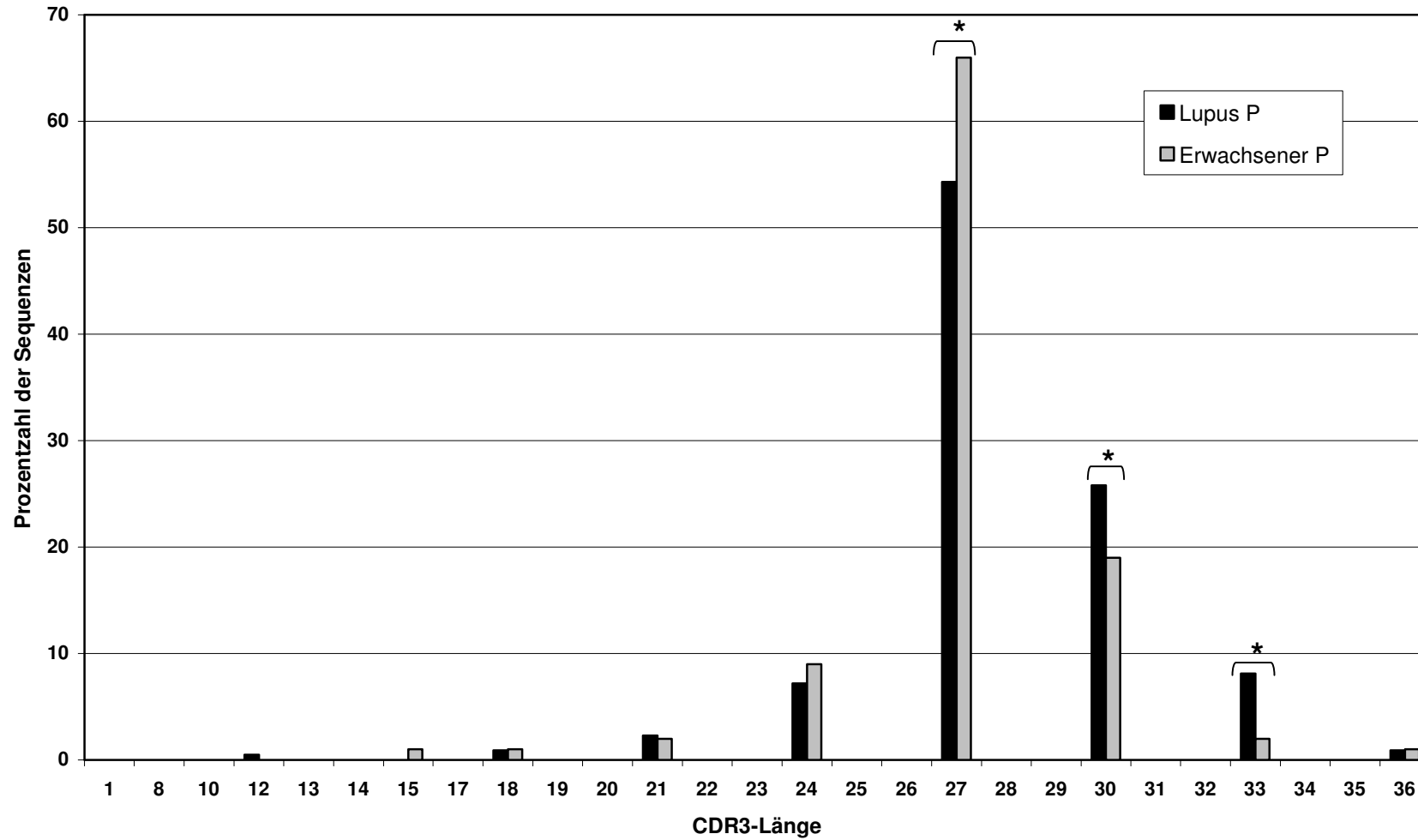
**Figur 15: CDR3-Länge in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements von peripheren SLE B-Zellen**



Figur 16a: Vergleich der CDR3-Länge zwischen SLE B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen in den nicht-produktiven Rearrangements

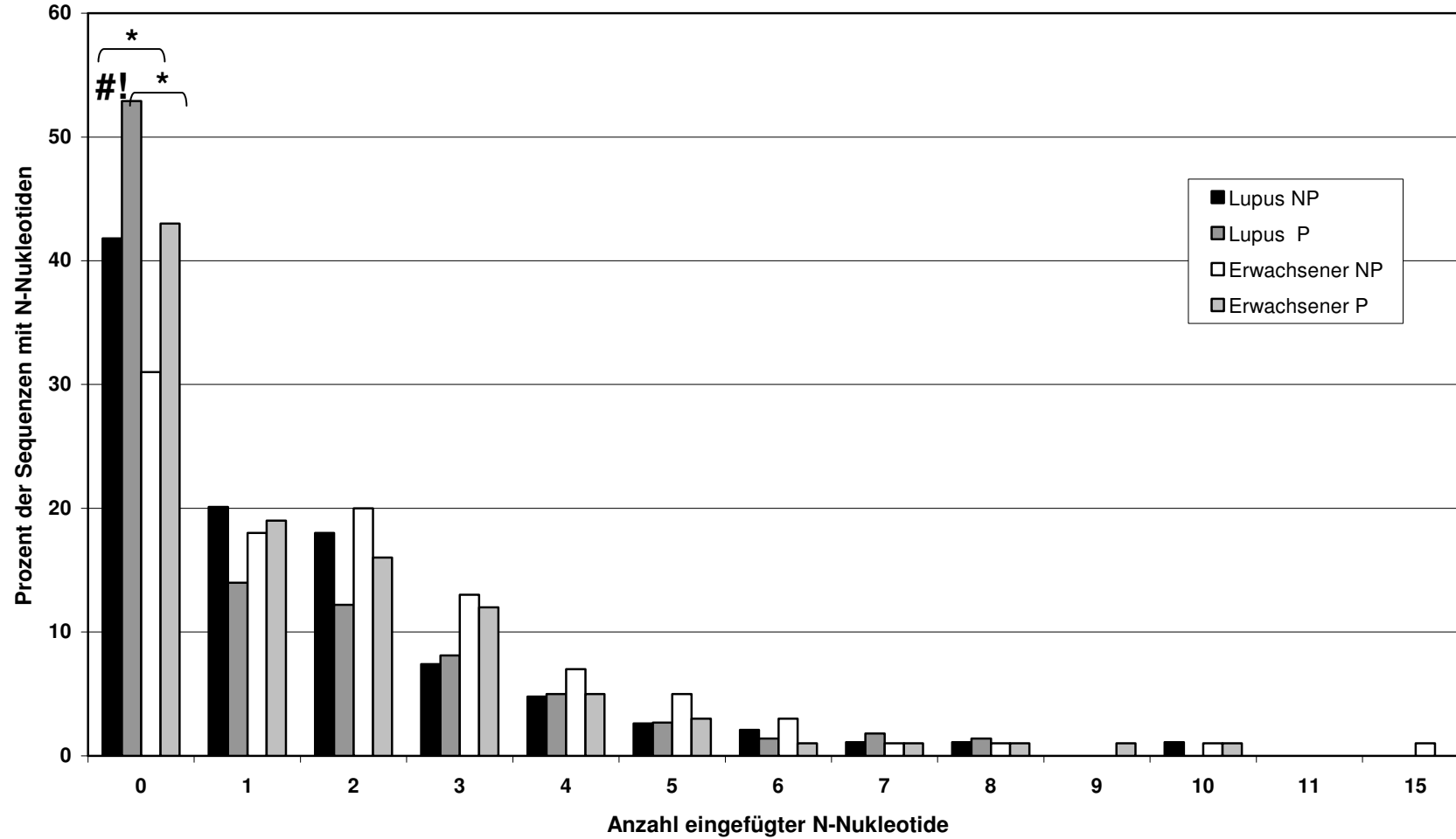


Figur 16b: Vergleich der CDR3-Länge zwischen SLE B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen in den produktiven Rearrangements

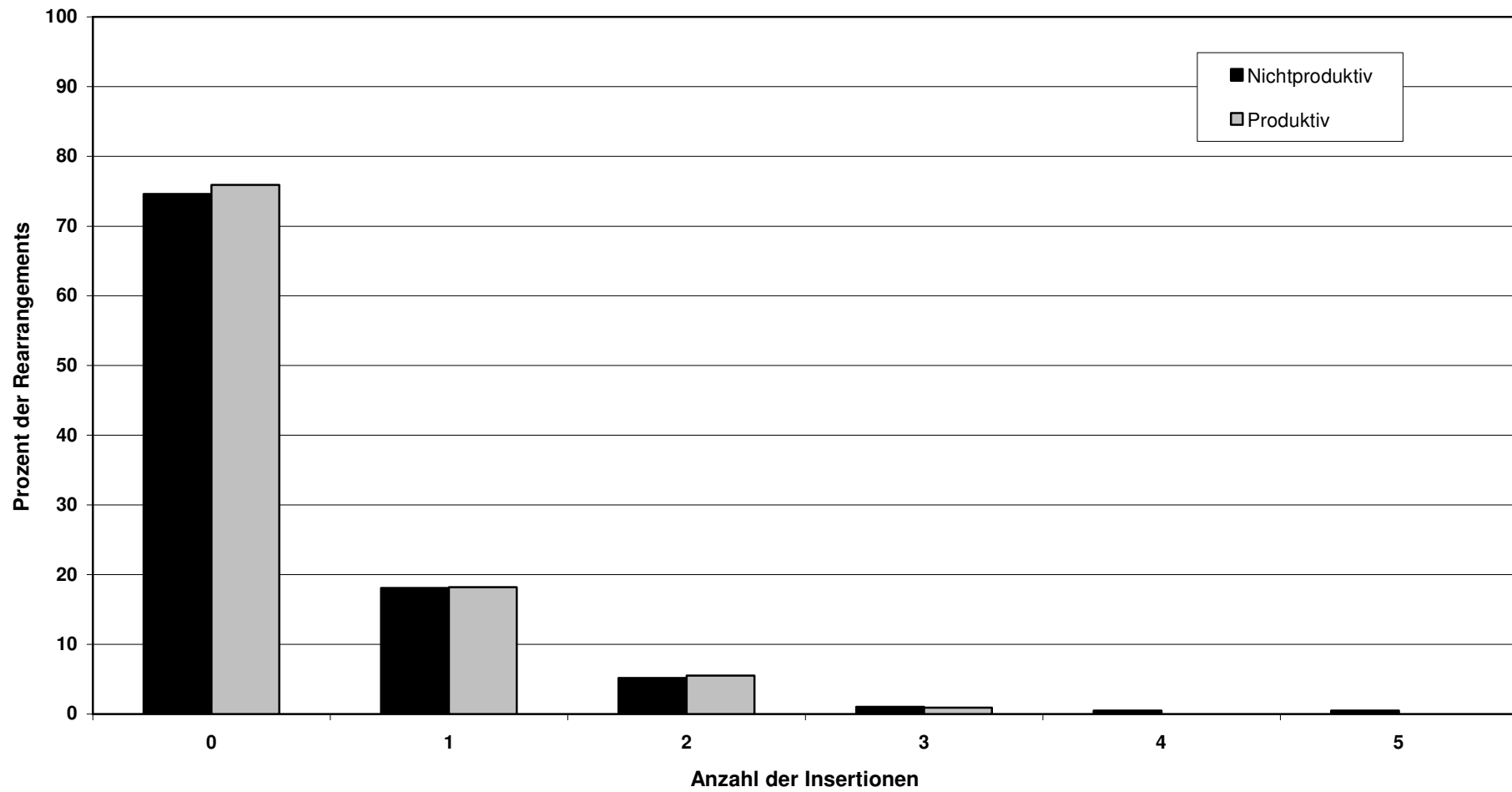




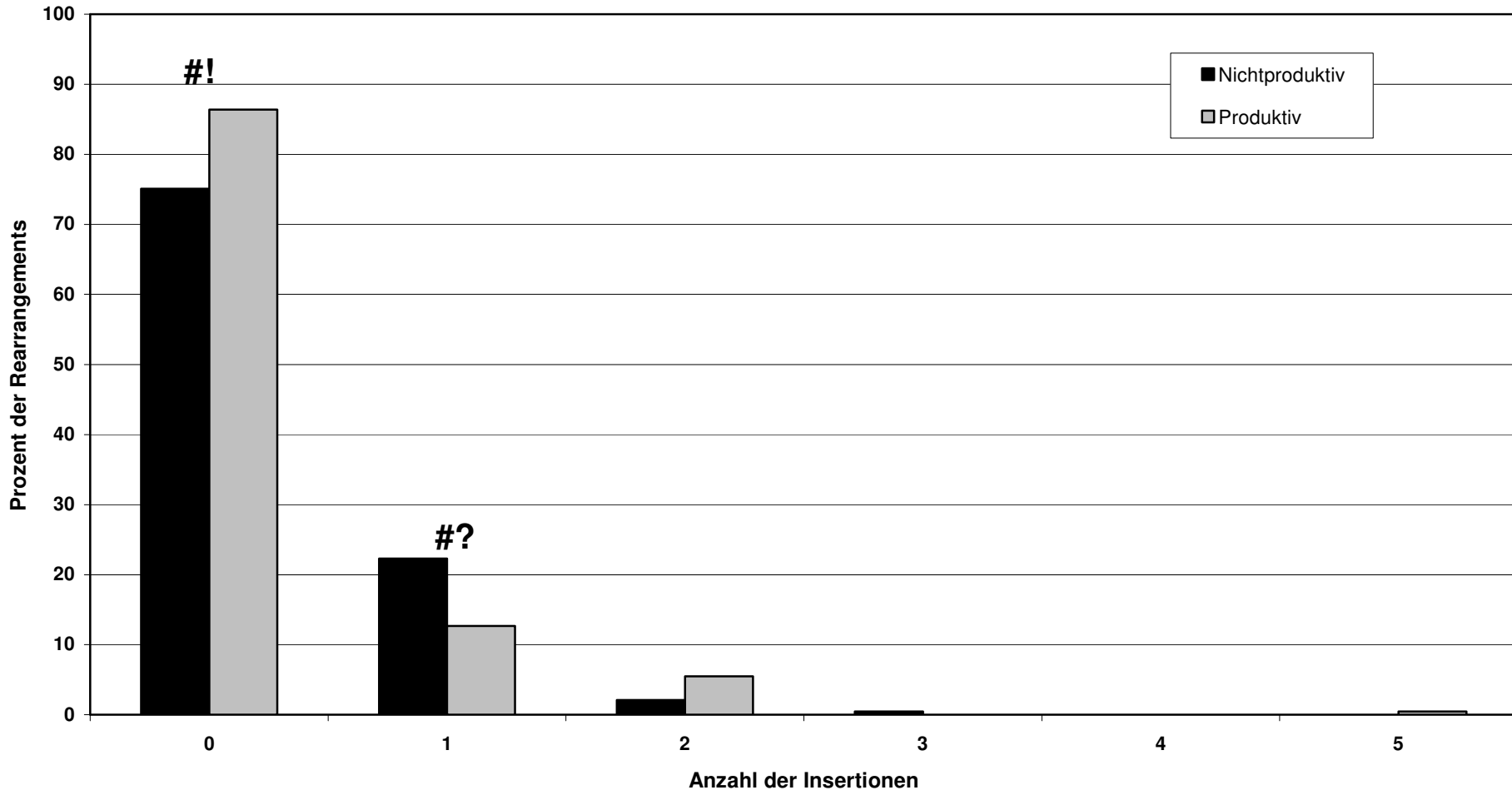
Figur 17: Vergleich der TdT Aktivität in SLE B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen



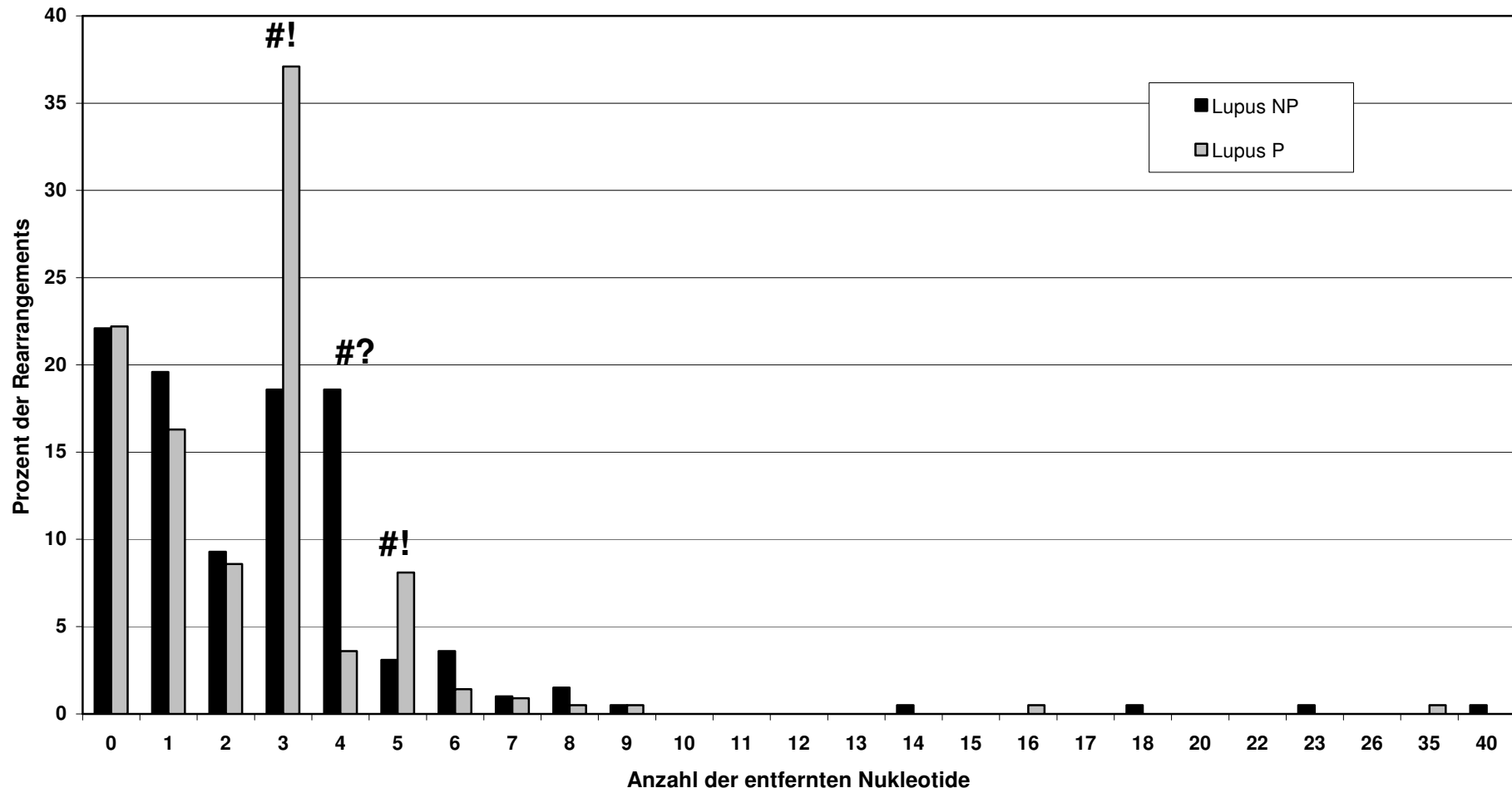
**Figur 18a: Insertionen palindromischer Nukleotide am 5`-Ende der VkJk-Schnittstelle in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements**



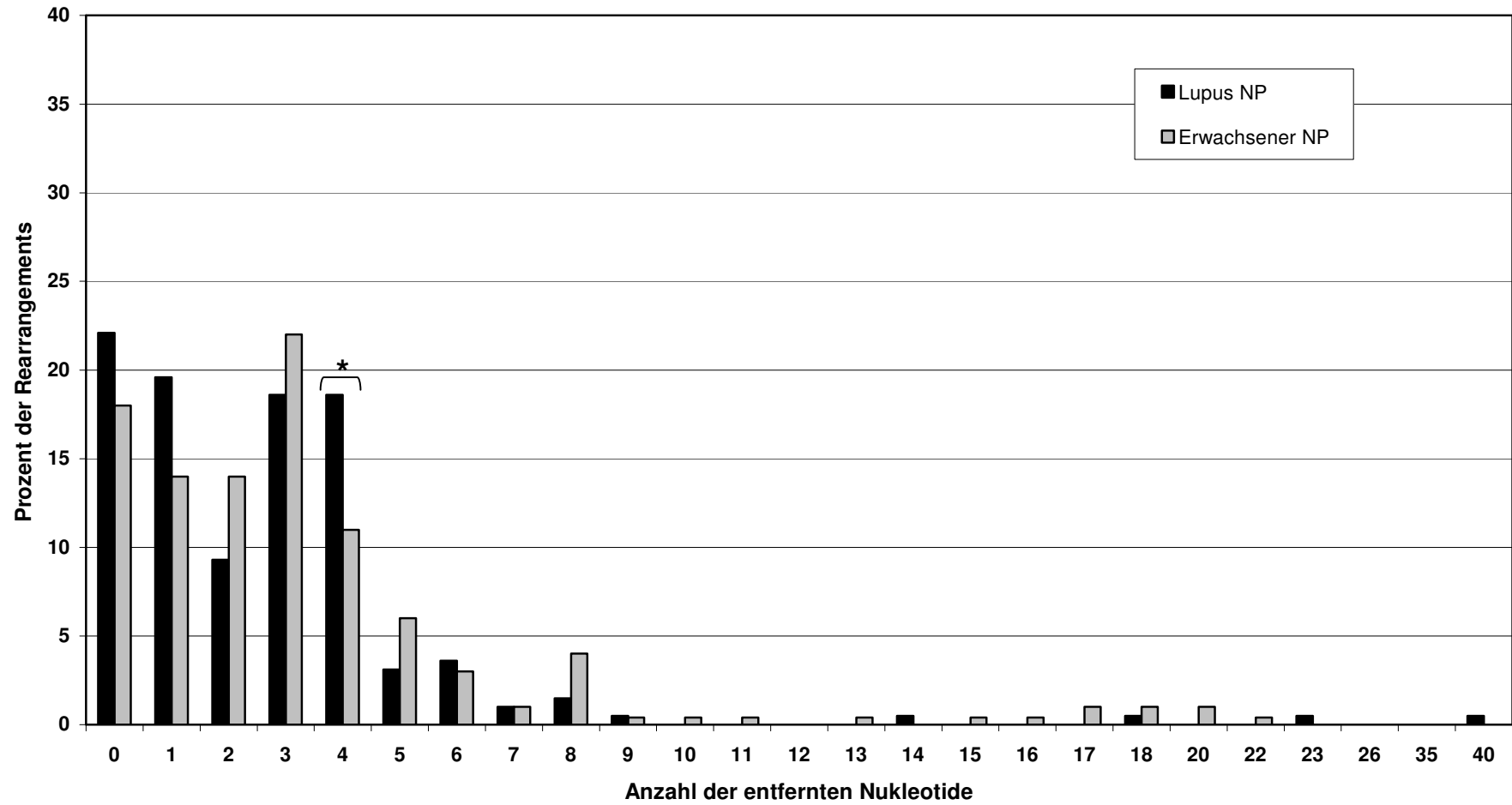
Figur 18b: Insertionen palindromischer Nukleotide am 3'-Ende der VkJk-Schnittstelle in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements



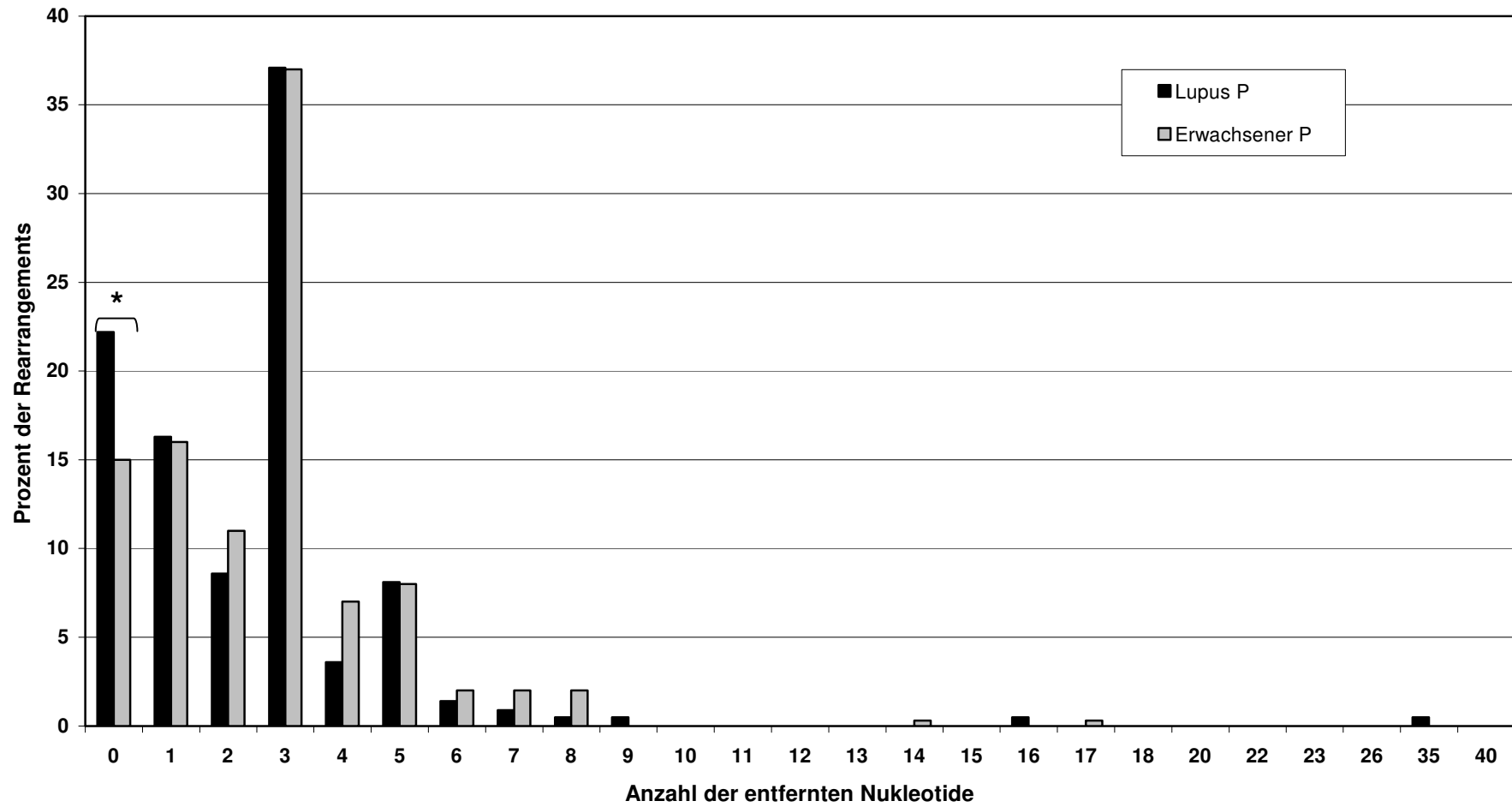
**Figur 19: Vergleich der 5'Exonuklease Aktivität an der VkJk-Schnittstelle zwischen nicht-produktiven und produktiven rearrangierten Rearrangements in peripheren Lupus B-Zellen**



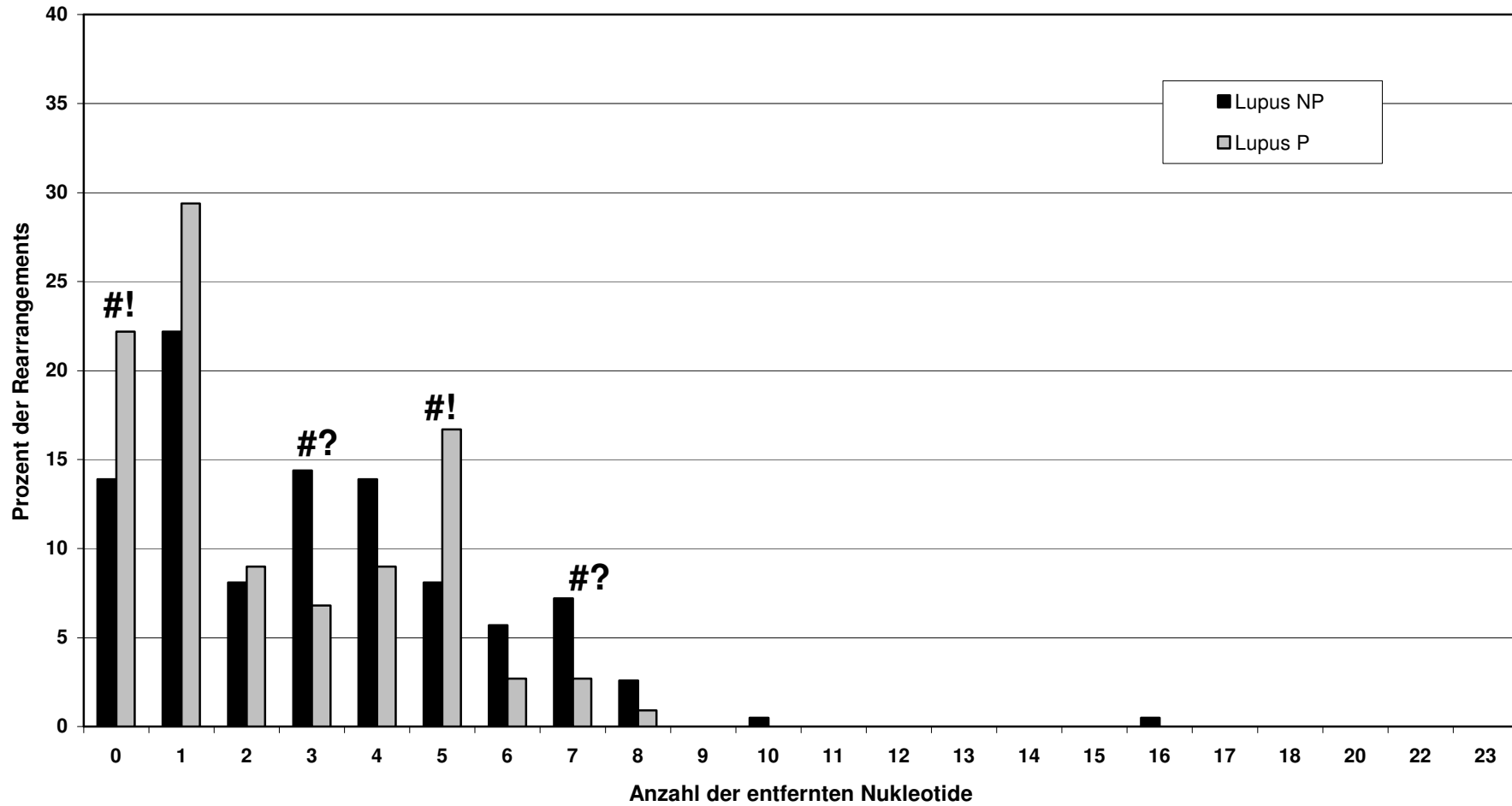
Figur 20a: Vergleich der 5' Exonuklease Aktivität in nicht-produktiven Rearrangements zwischen peripheren Lupus B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen



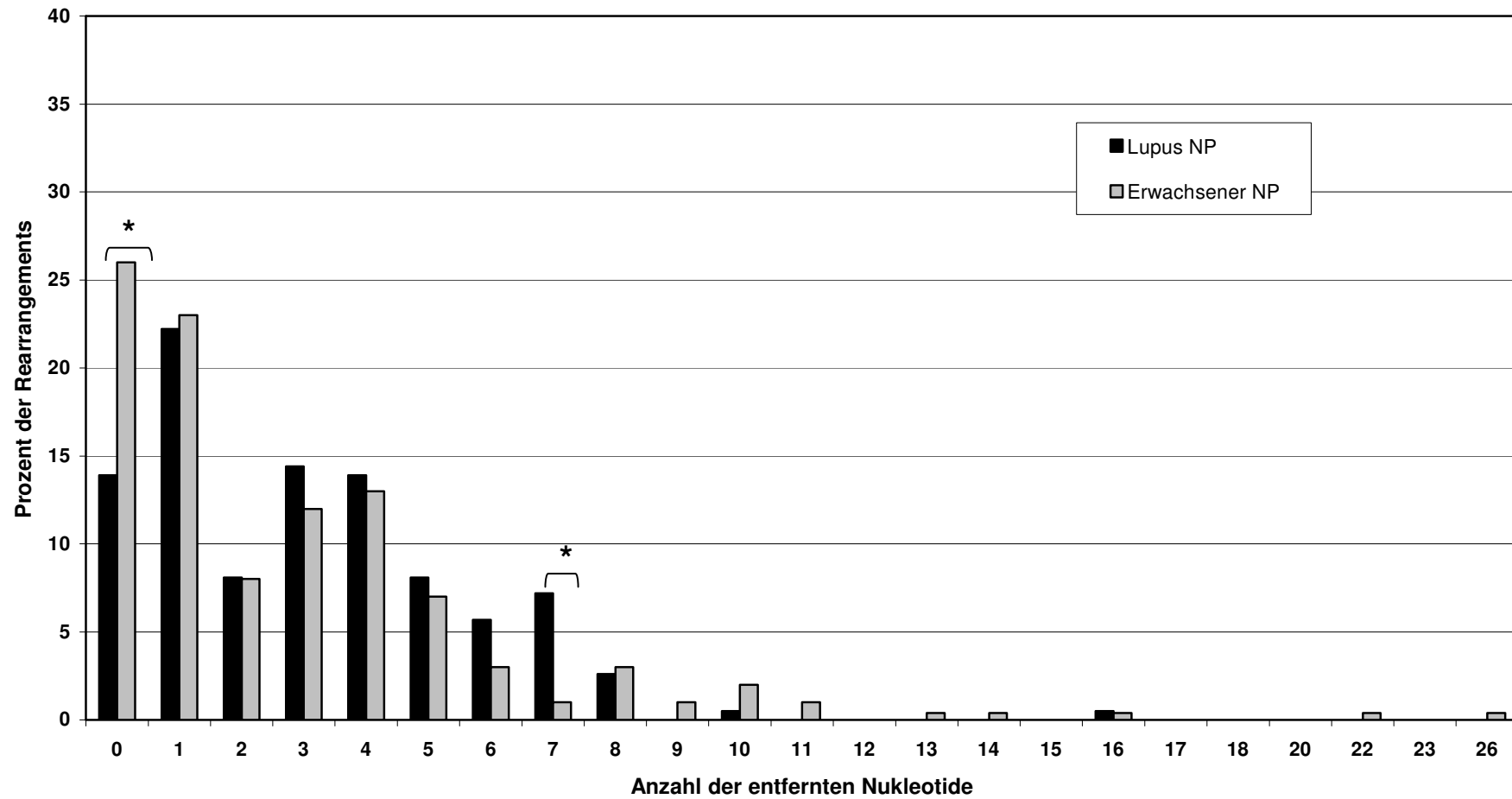
Figur 20b: Vergleich der 5' Exonuklease Aktivität in produktiven Rearrangements zwischen peripheren Lupus B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen



Figur 21: Vergleich der 3' Exonuklease Aktivität an der VkJk-Schnittstelle zwischen nicht-produktiven und produktiven rearrangierten Rearrangements in peripheren Lupus B-Zellen

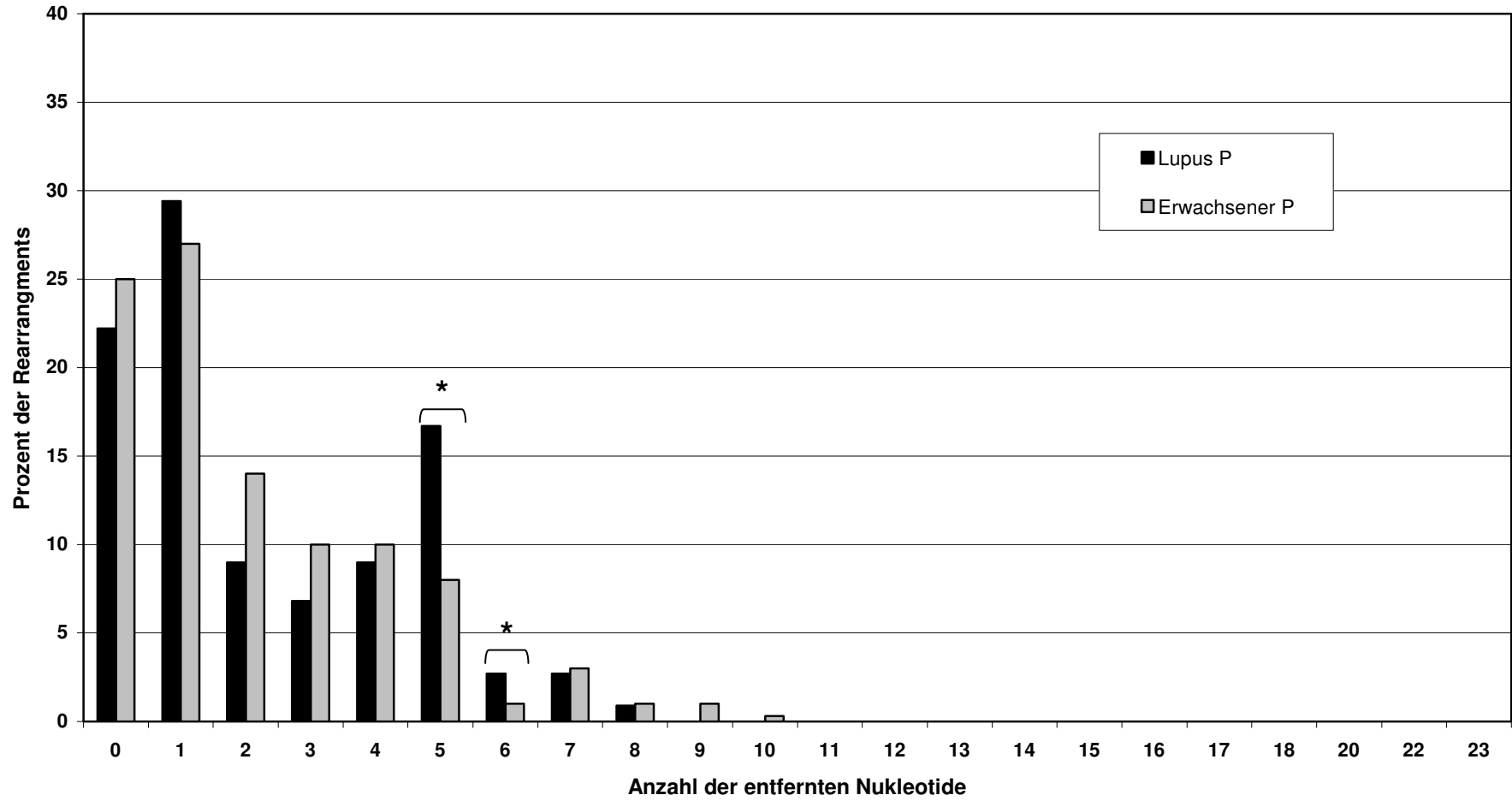


Figur 22a: Vergleich der 3' Exonuklease Aktivität in nicht-produktiven Rearrangements zwischen peripheren Lupus B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen





Figur 22b: Vergleich der 3' Exonuklease Aktivität in produktiven Rearrangements zwischen peripheren Lupus B-Zellen und IgM+ peripheren B-Zellen des Erwachsenen



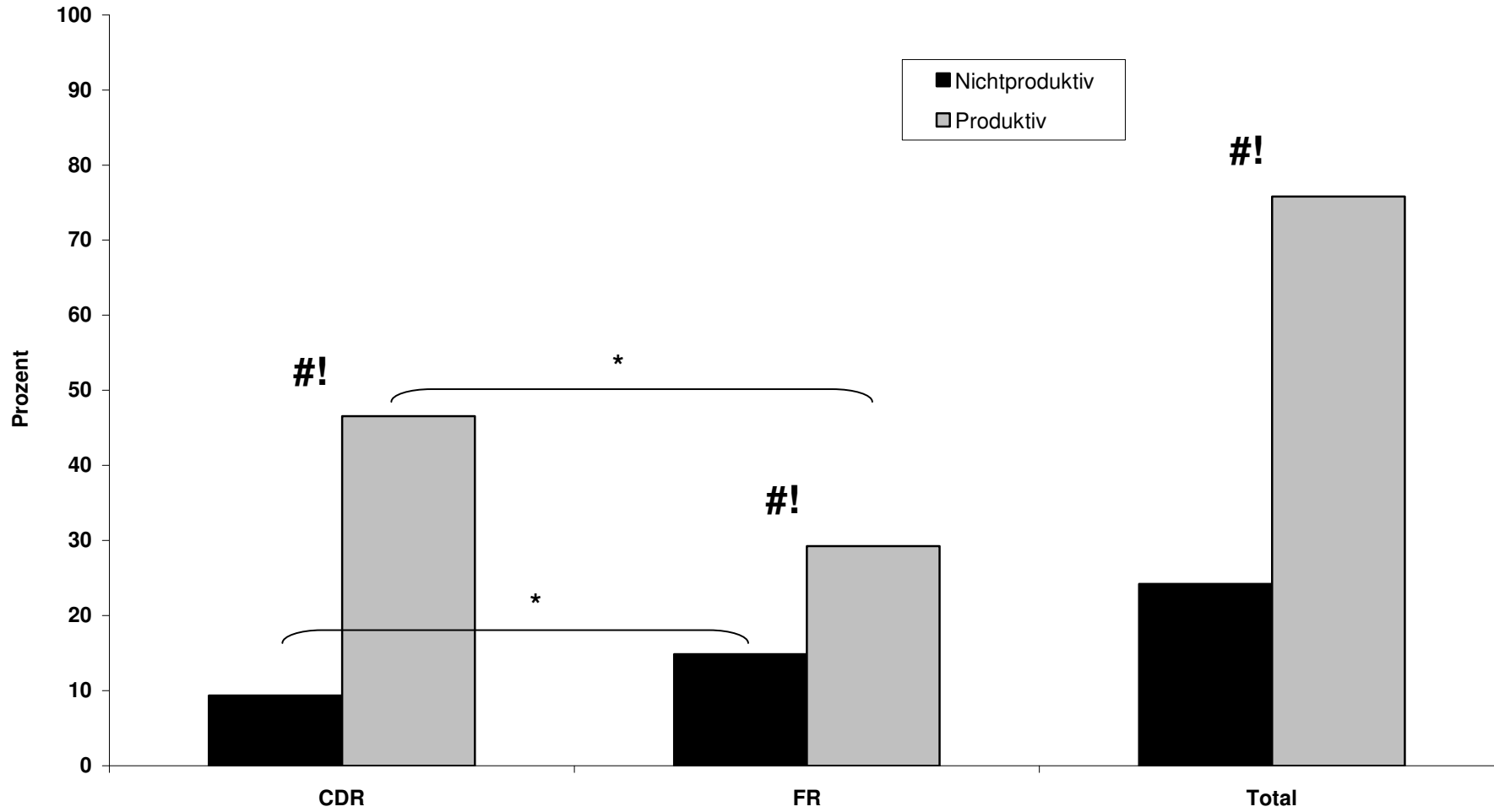
Figur 23: Mutationsfrequenzen der nicht-produktiven und produktiven VkJk-Rearrangements

	<b>Gesamt</b> (n = 415)	<b>Nicht-produktiv</b> (n = 194)	<b>Produktiv</b> (n = 221)	<b>p-value</b>
<b>N=0 Mutationen</b>	306 (73,7%)	156 (80,4%)	150 (67,9%)	<0,005
<b>N 1-3 Mutationen</b>	67 (16,1%)	32 (16,5%)	35 (15,8%)	n.s.
<b>N &gt;4 Mutationen</b>	42 (29,0%)	6 (3,1%)	36 (16,3%)	<0,0001
<b>N Mutationen</b>	109 (26,3%)	38 (19,6%)	71 (32,1%)	<0,005
<b>Absolute Anzahl der Vk-Nukleotide</b>	104261	49121	55140	
<b>Absolute Anzahl der Vk-Nukleotide in mutierten Sequenzen</b>	27119	9499	17620	
<b>Absolute Anzahl an Mutationen</b>	492	116	376	<0,0001
<b>Anzahl der Codons mit Mutationen</b>	470 (1,4%)	112 (0,7%)	358 (1,9%)	<0,0001
<b>Mutationsfrequenz aller VkJk-Rearrangements</b>	$0,47 \times 10^{-2}$	$0,24 \times 10^{-2}$	$0,68 \times 10^{-2}$	<0,0001
<b>Mutationsfrequenz aller mutierter VkJk-Rearrangements</b>	$1,81 \times 10^{-2}$	$1,22 \times 10^{-2}$	$2,13 \times 10^{-2}$	<0,0001

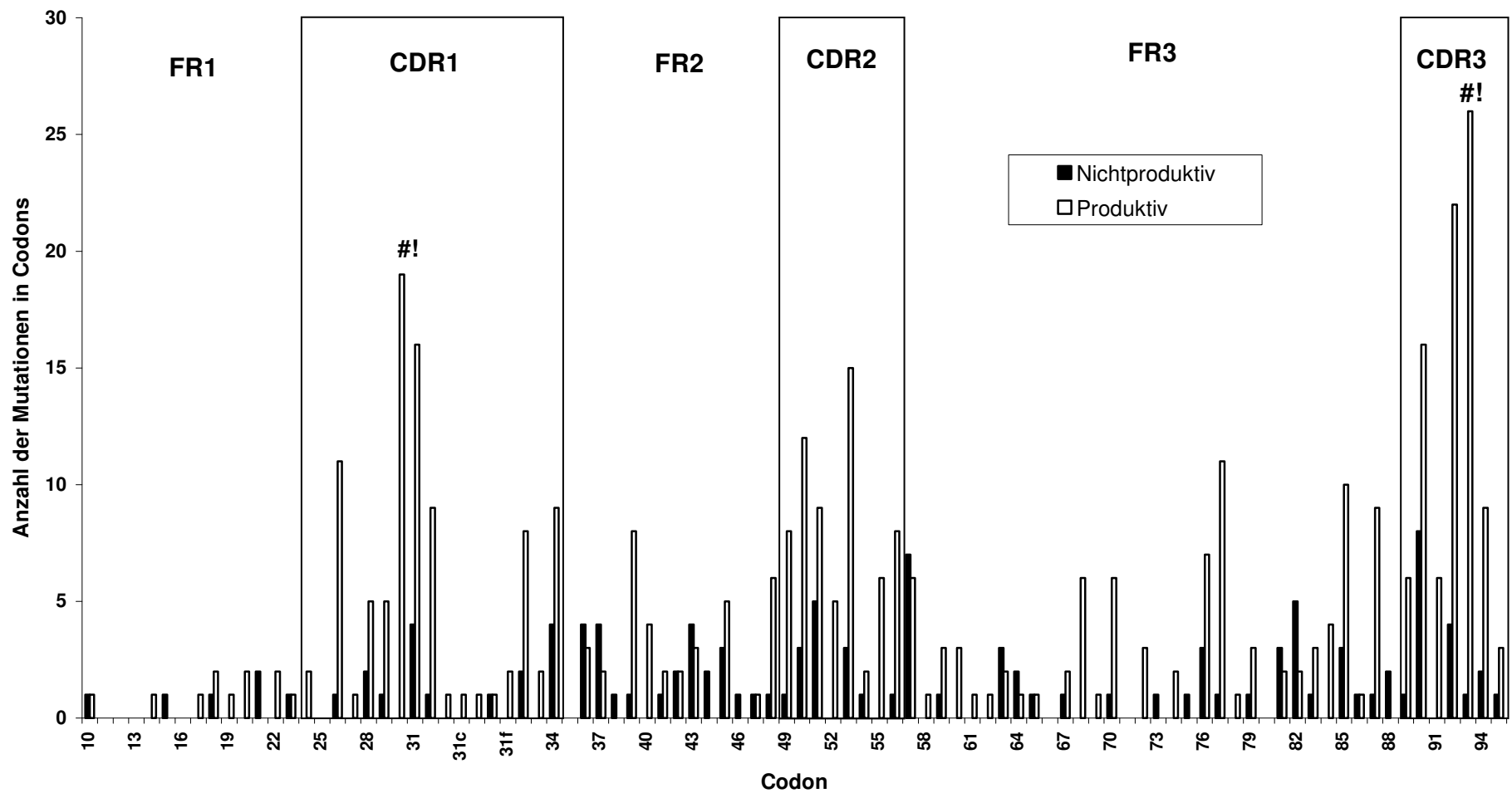
Figur 24: Vergleich der Mutationsfrequenzen nicht-produktiver und produktiver VkJk-Rearrangements

	Prozent der mutierten VkJk-Rearrangements		Mutationsfrequenz aller VkJk-Rearrangements		Mutationsfrequenz aller mutierten VkJk-Rearrangements	
	Nichtproduktiv	Produktiv	Nichtproduktiv	Produktiv	Nichtproduktiv	Produktiv
Nabelschnurblut IgD+ B-Zellen (Girschick et al., 2001)	12%	6%	$4,7 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-4}$		
Tonsillen B-Zellen						
B-Zellen des Keimzentrums (GCF)	42%	26%	$2,3 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$		
Gedächtnis-B-Zellen (MB)	30%	78%	$2,7 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-2}$		
(Girschick et al., 2002)						
Erwachsene IgM+ B-Zellen (Foster et al., 1997)	24%	41%	$0,48 \times 10^{-2}$	$1,08 \times 10^{-2}$	$2,03 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$
SLE Patient (Dörner et al., 1999)	82%	75%	$3,7 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-2}$	$4,5 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$
Lupus CD19+ B-Zellen	20%	32%	$0,24 \times 10^{-2}$	$0,68 \times 10^{-2}$	$1,22 \times 10^{-2}$	$2,13 \times 10^{-2}$

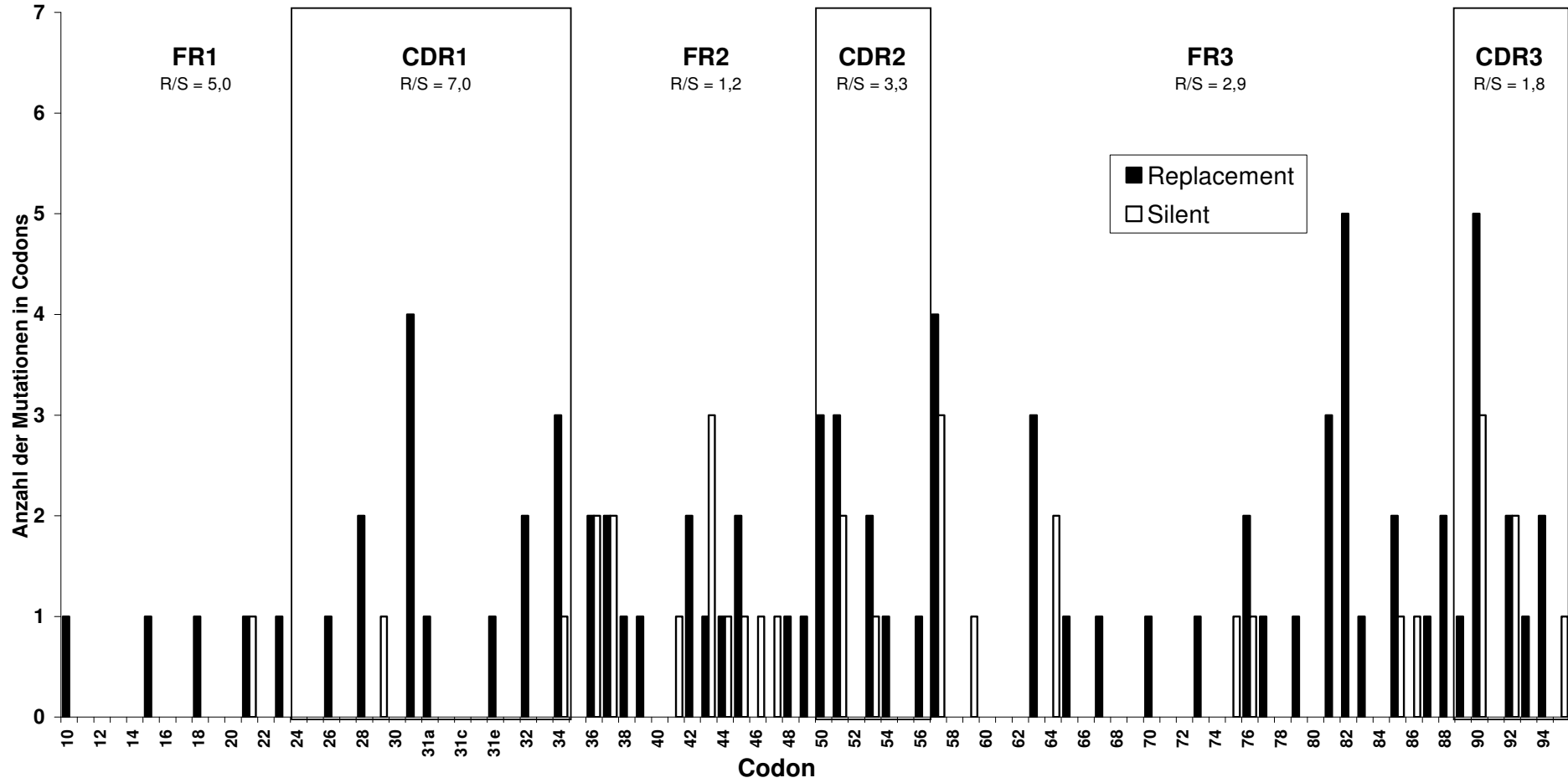
Figur 25: Verteilung der Mutationen auf CDR und FR in nicht-produktiven und produktiven Vk-Rearrangements



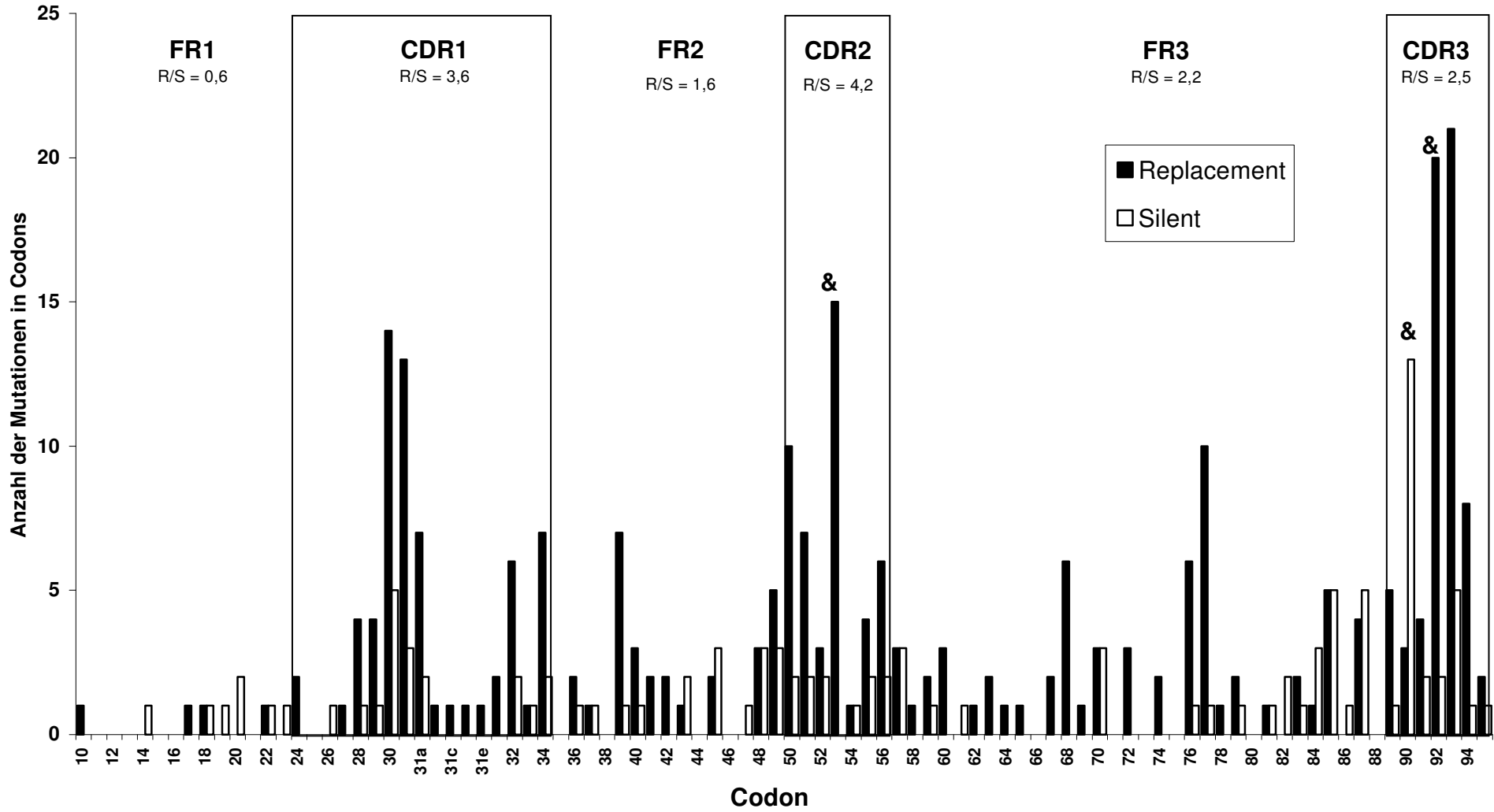
Figur 26: Verteilung der Mutationen auf Codons in nicht-produktiven und produktiven Vk Rearrangements von SLE B-Zellen



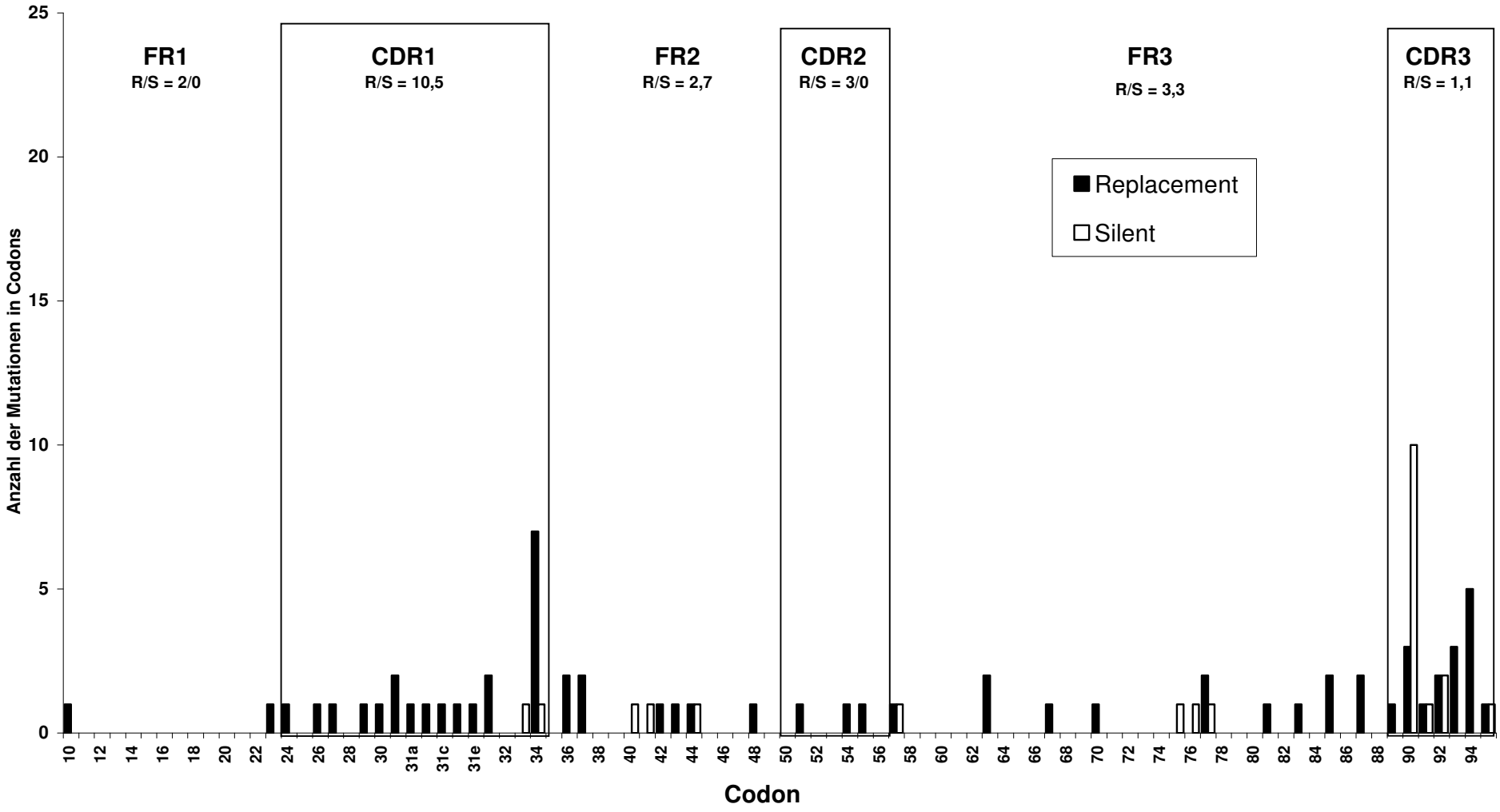
**Figur 27a: Verteilung der Mutationen auf Codons in nicht-produktiven Vk-Rearrangements von SLE-B-Zellen**



Figur 27b: Verteilung der Mutationen auf Codons in produktiven Vk-Rearrangements von SLE-B-Zellen

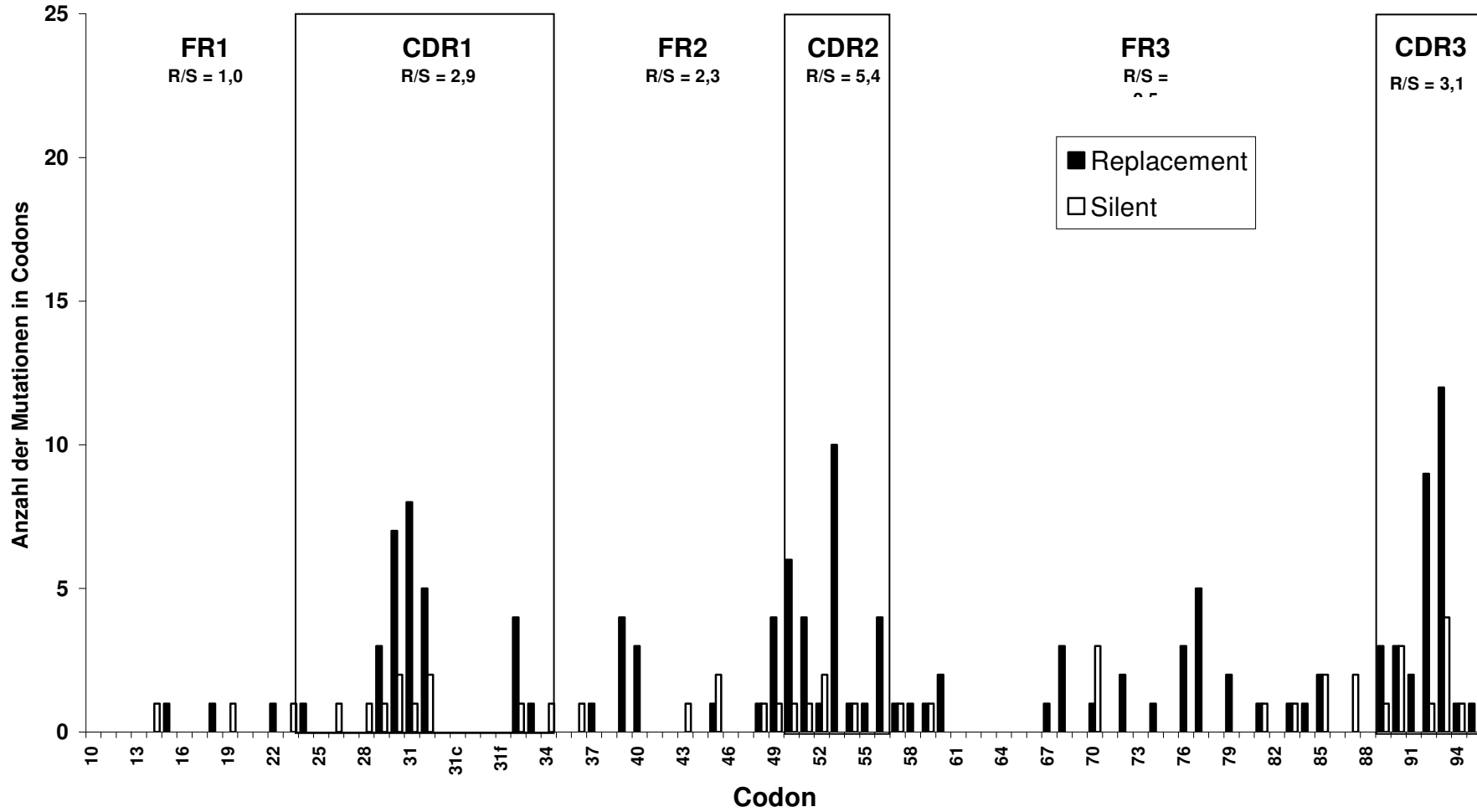


**Figur 28a: Verteilung der Mutationen in den Jk-nahen Genen B3-B2 der proximalen Kasette in produktiven Vk-Rearrangements von SLE-B-Zellen**

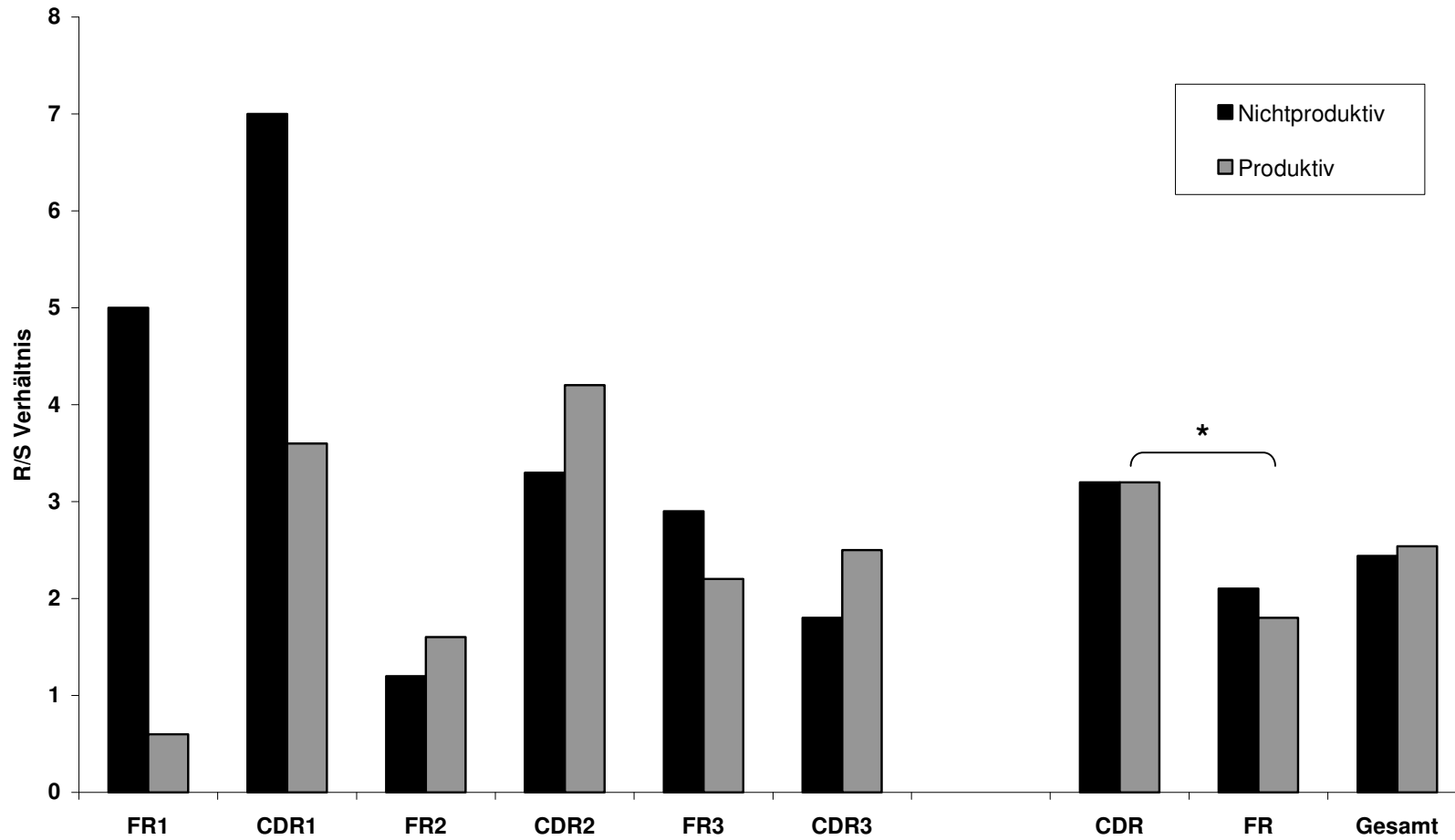




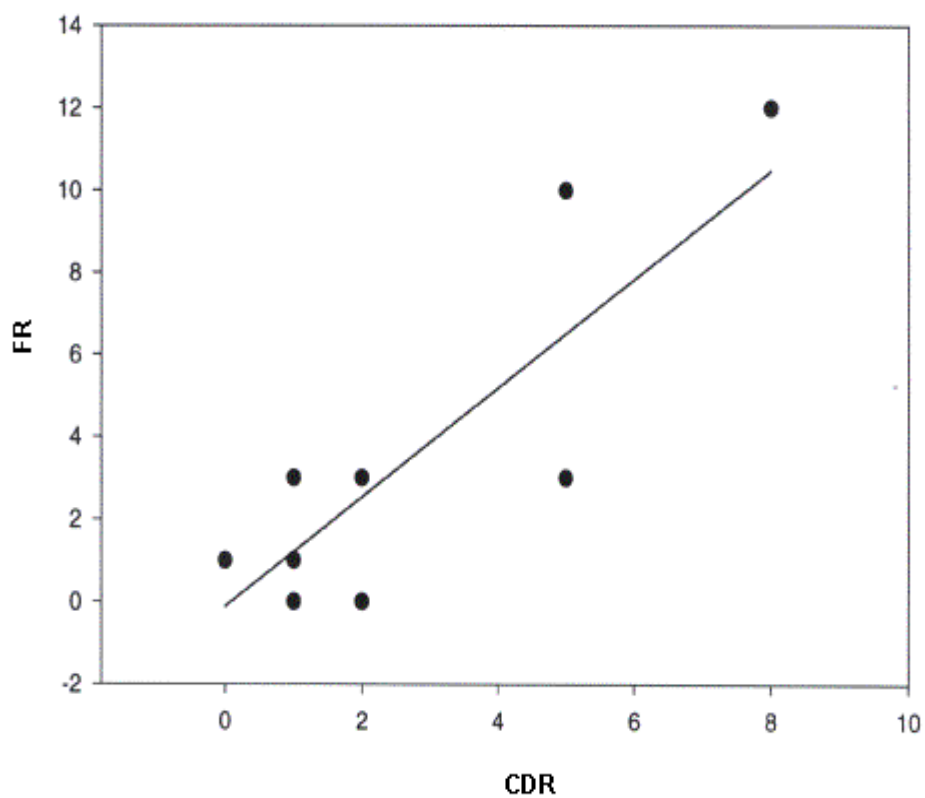
**Figur 28b: Verteilung der Mutationen in den Jk-ferneren Genen A27, L2, L12a der proximalen Kasette in produktiven Vk-Rearrangements von SLE-B-Zellen**



**Figur 29: Vergleich der R/S-Verhältnisse in speziellen und in zusammengefassten Regionen nicht-produktiver und produktiver Vk-Rearrangements**



**Figur 30a: Darstellung der Replacements in CDR- und FR-Regionen nichtproduktiver Vk-Rearrangements als Funktion (Regression)**

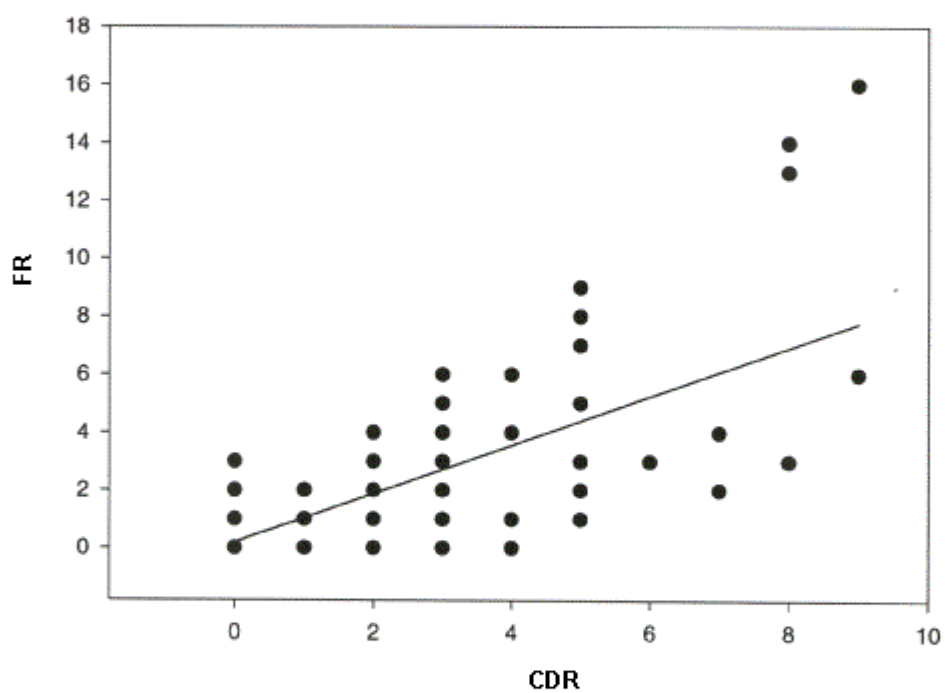


$$y = 1,32x - 0,11$$

Korrelationskoeffizient  $R = 0,85$

$p < 0,0001$

**Figur 30b: Darstellung der Replacements in CDR- und FR-Regionen produktiver Vk-Rearrangements als Funktion (Regression)**

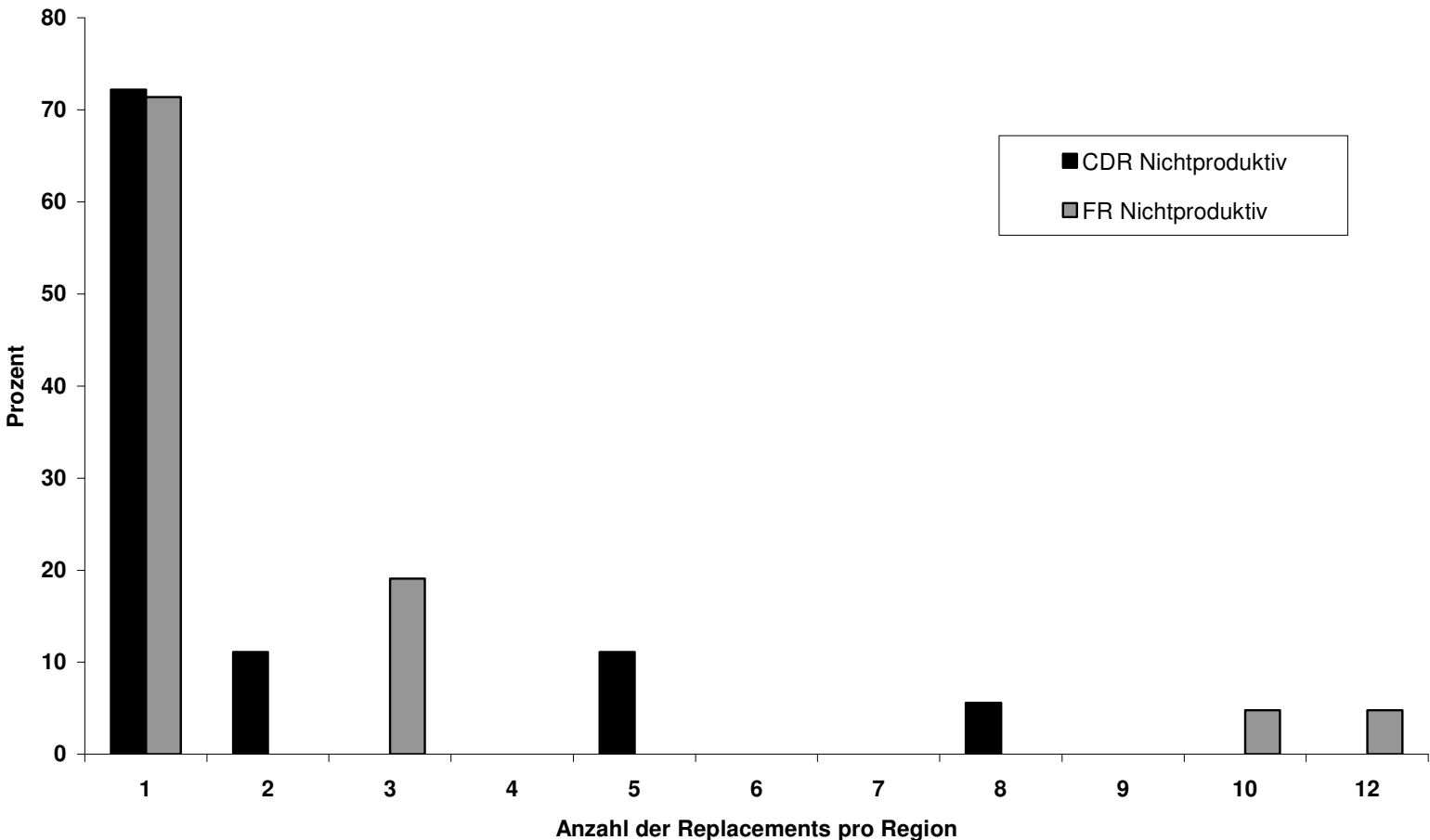


$$y = 0,84x + 0,197$$

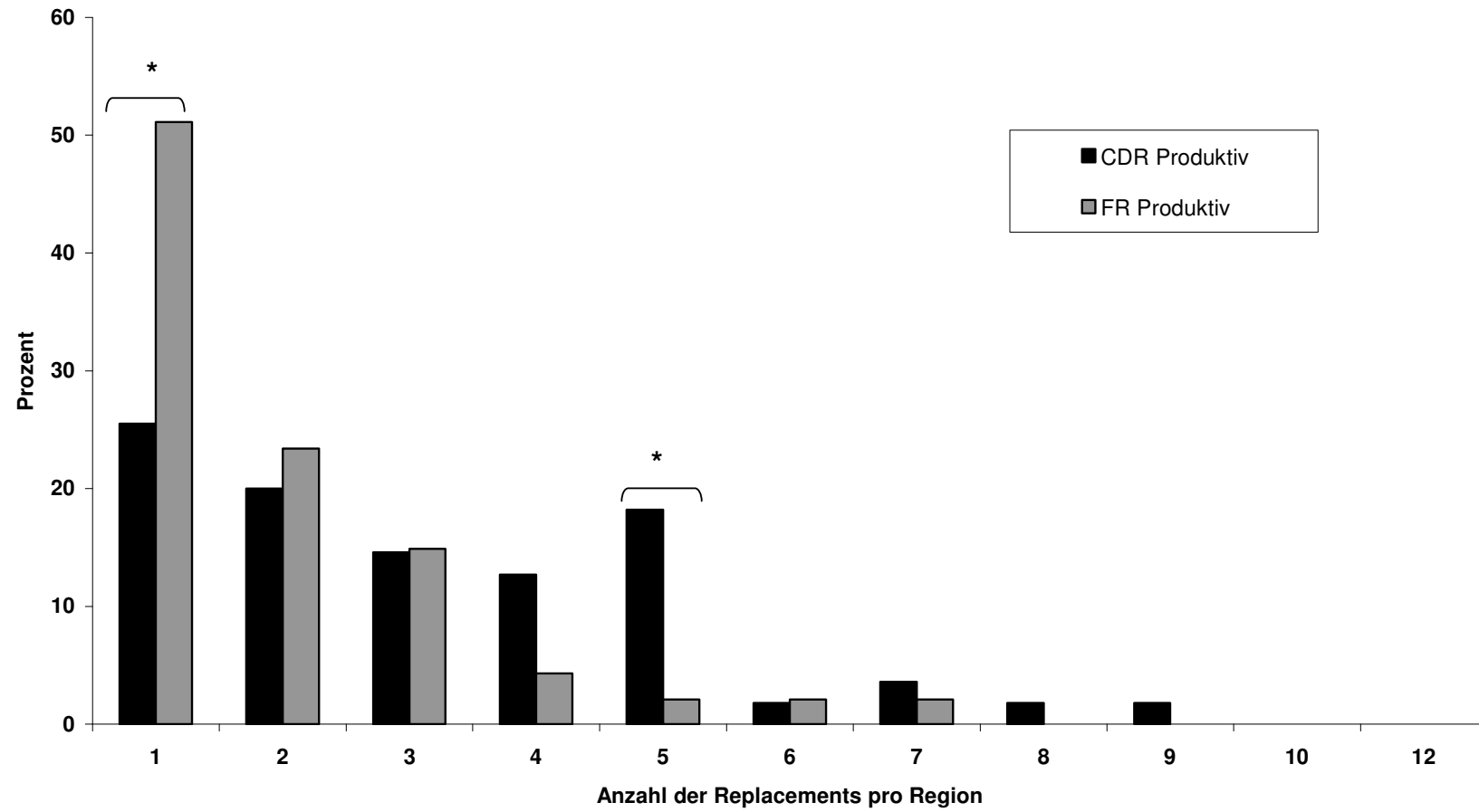
Korrelationskoeffizient  $R = 0,63$

$p < 0,0001$

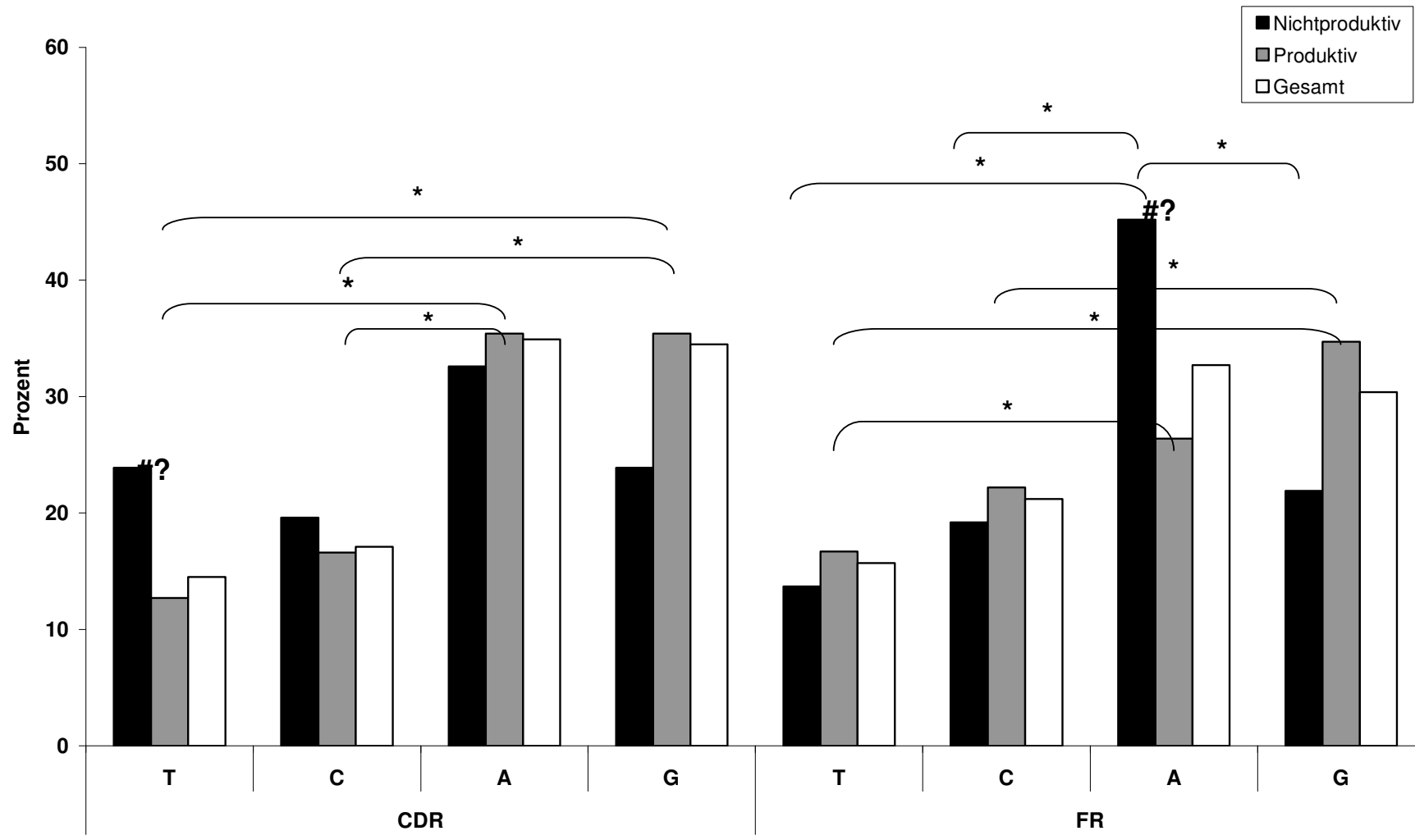
**Figur 31a: Vergleich der Häufigkeiten von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Replacements in der CDR- und FR-Region nicht-produktiver Vk-Rearrangements**



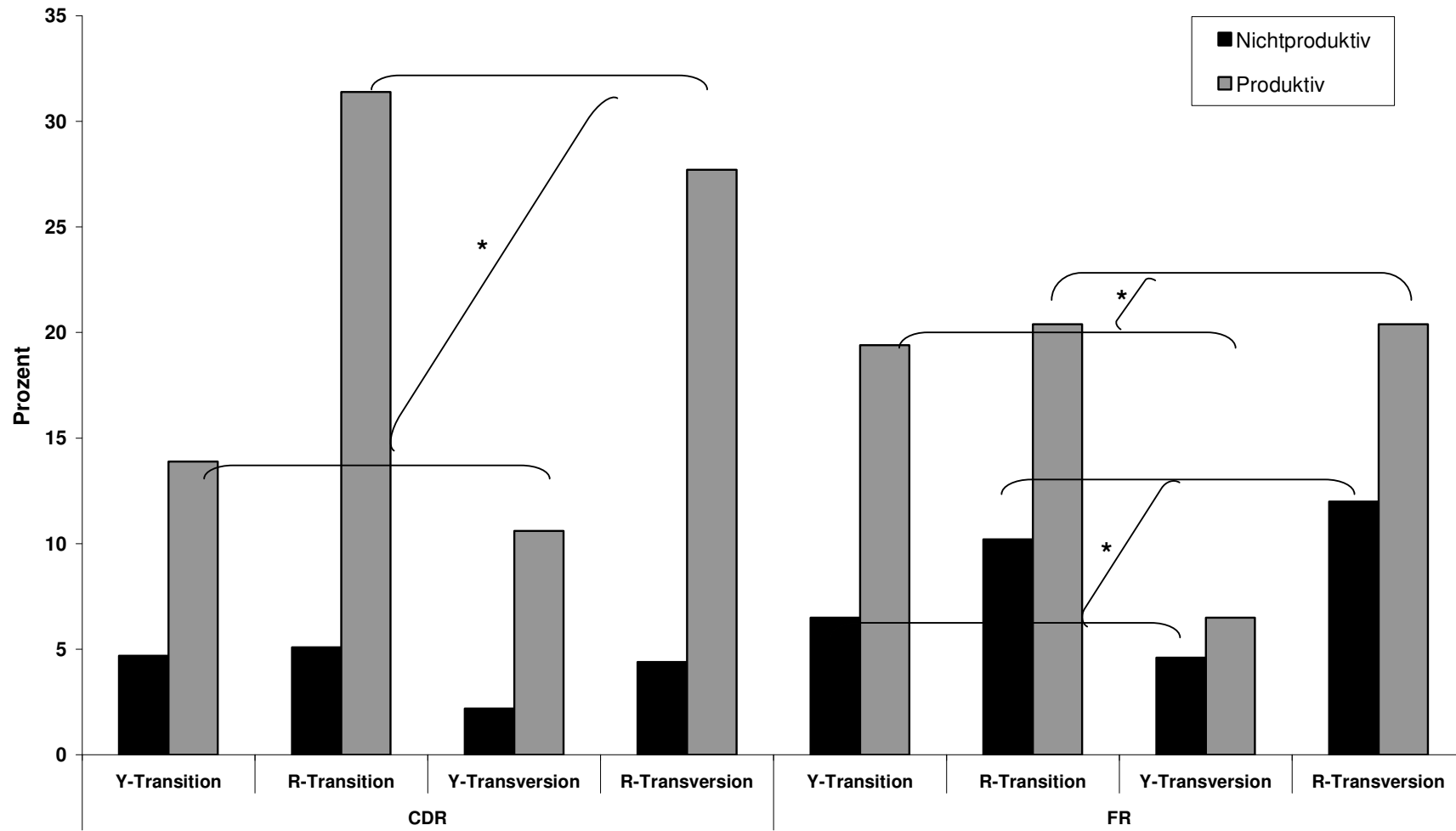
**Figur 31b: Vergleich der Häufigkeiten von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Replacements in der CDR- und FR-Region produktiver Vk-Rearrangements**



Figur 32: Vergleich mutierter Nukleotide in nicht-produktiven und produktiven Vk-Rearrangements

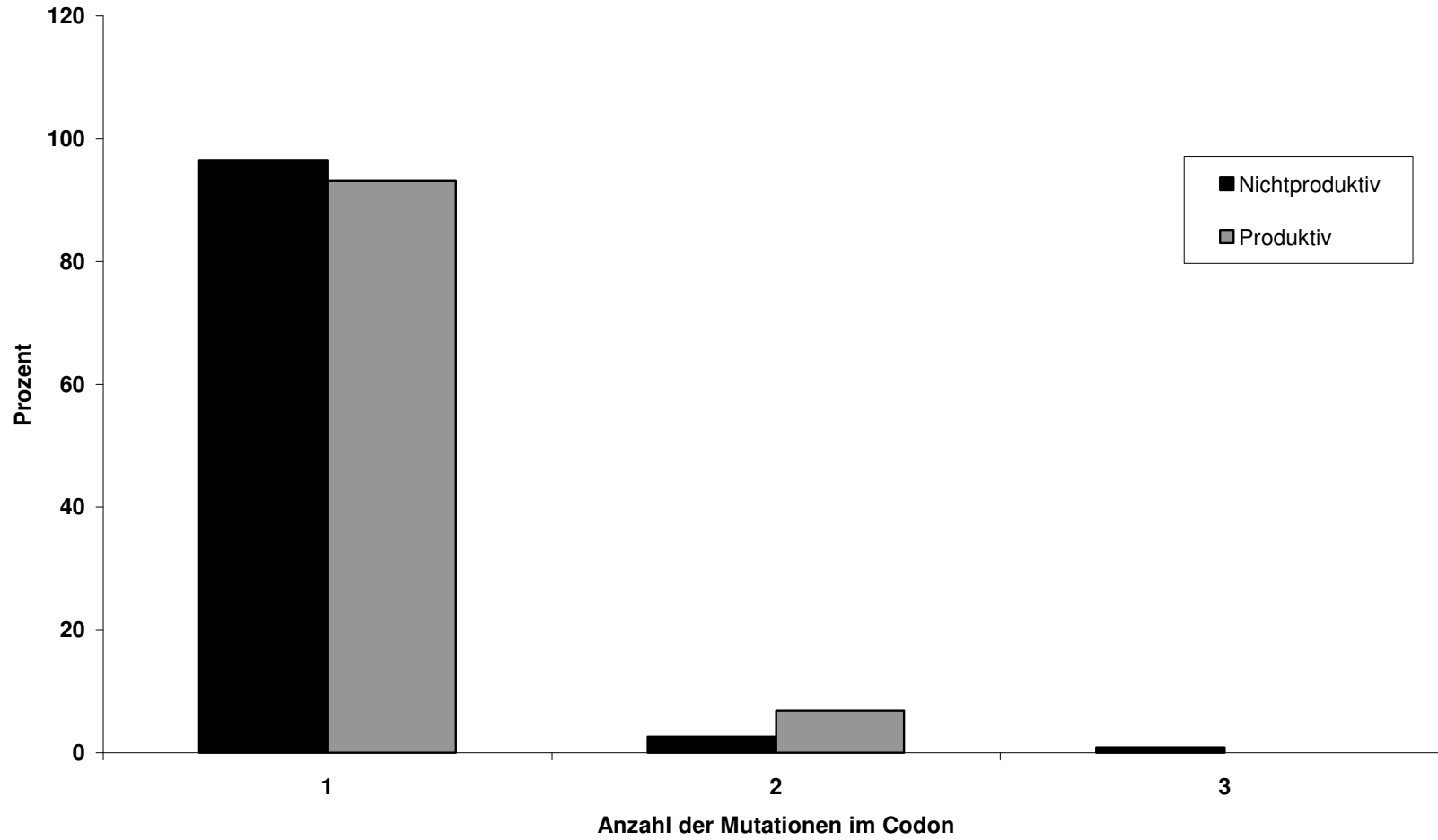


**Figur 33: Vergleich der Häufigkeiten von Transversion und Transition in der CDR- und FR-Region nicht-produktiver und produktiver Vk-Rearrangements**

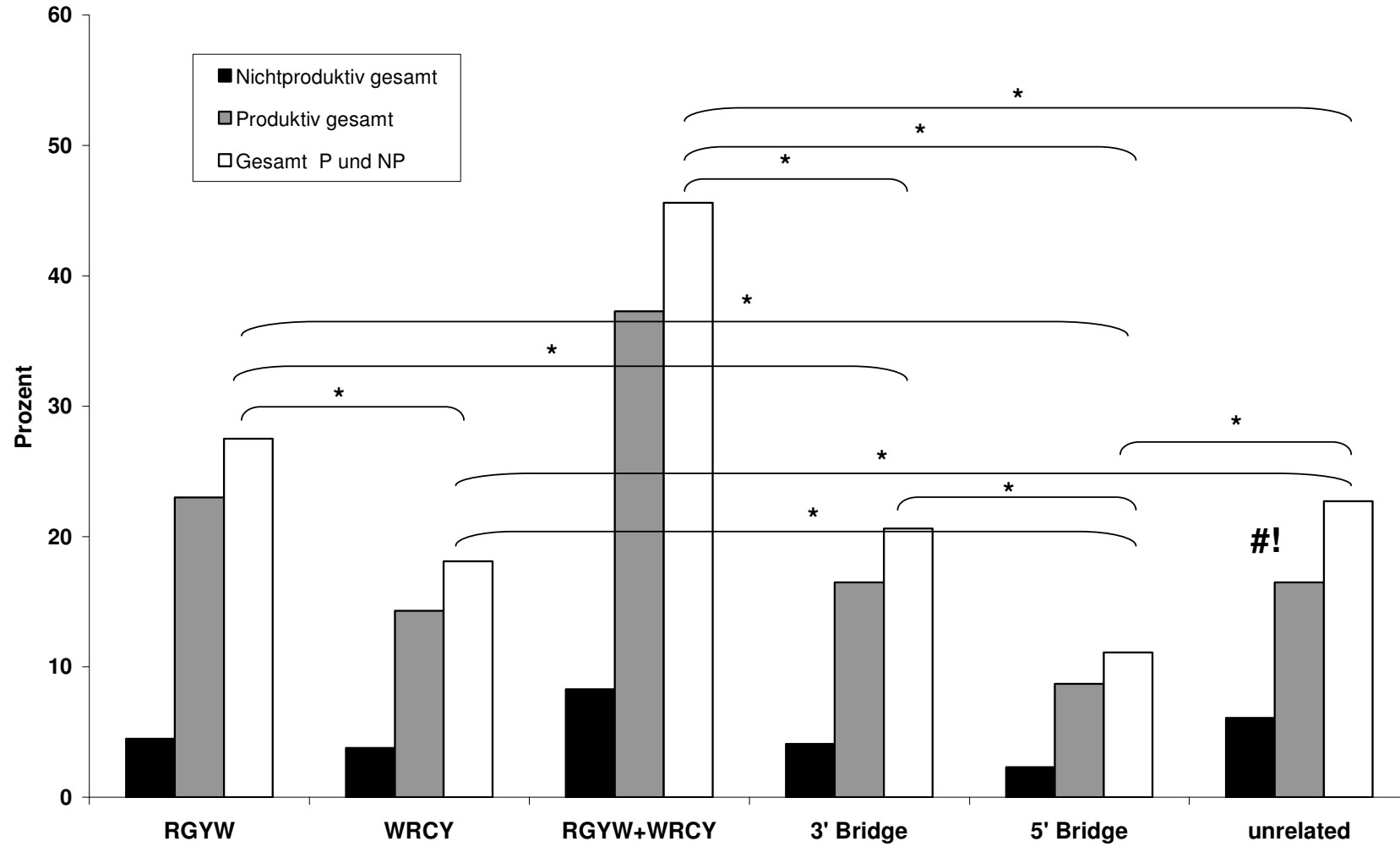




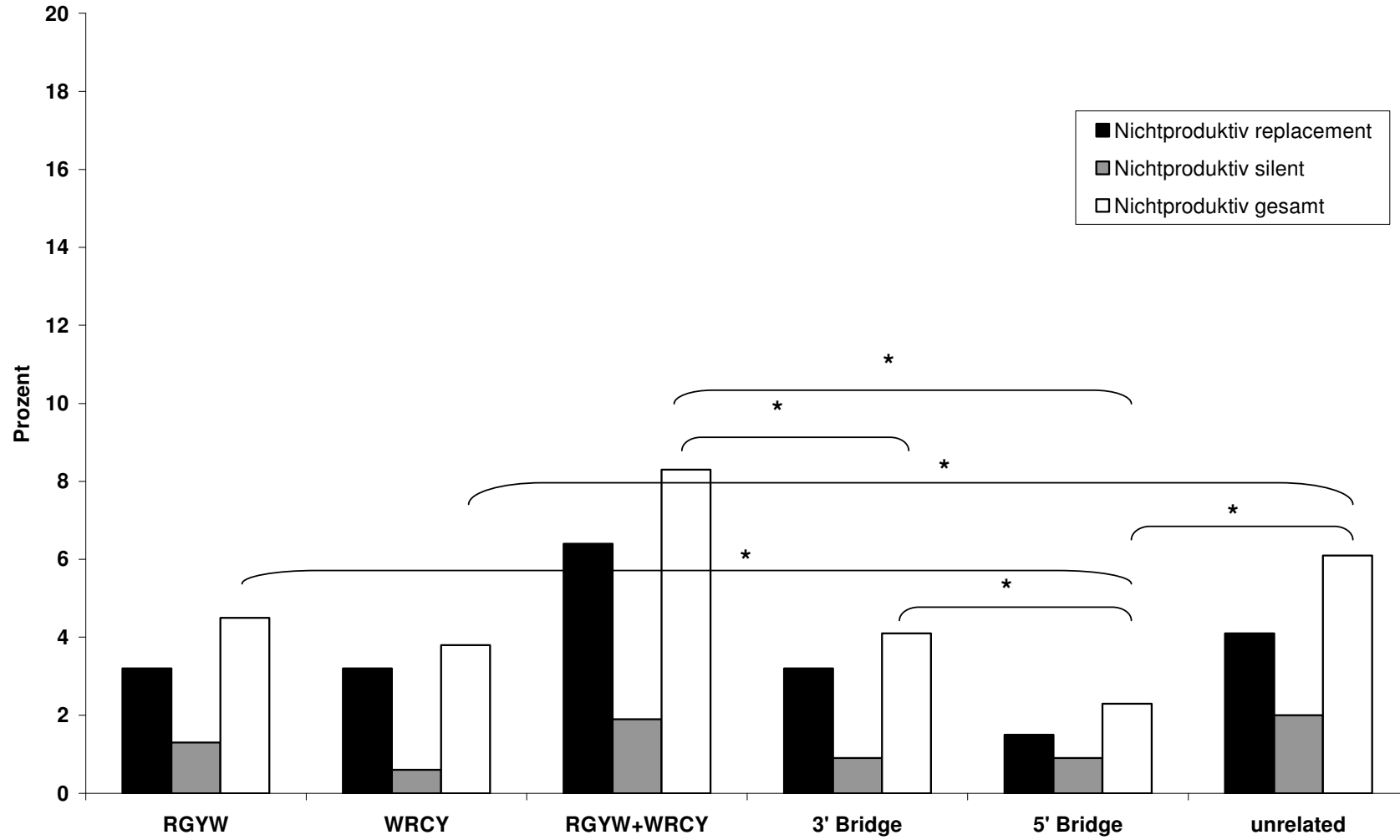
**Figur 34: Häufigkeit multipler Mutationen in einem Codon nicht-produktiver und produktiver V<sub>k</sub>-Rearrangements**



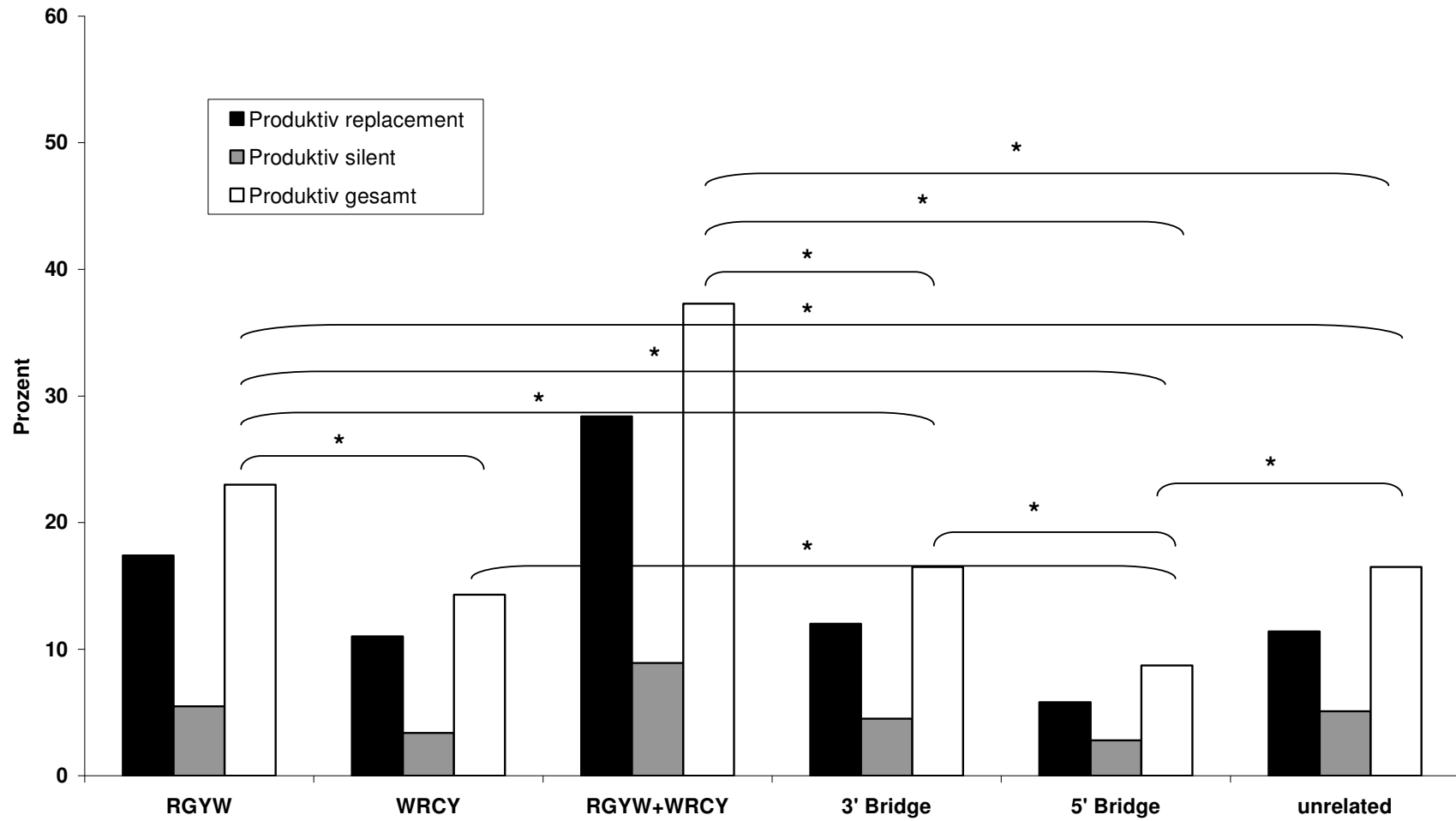
**Figur 35: Verteilung der Mutationen auf die Motive in nicht-produktiven und produktiven V<sub>k</sub>-Rearrangements**



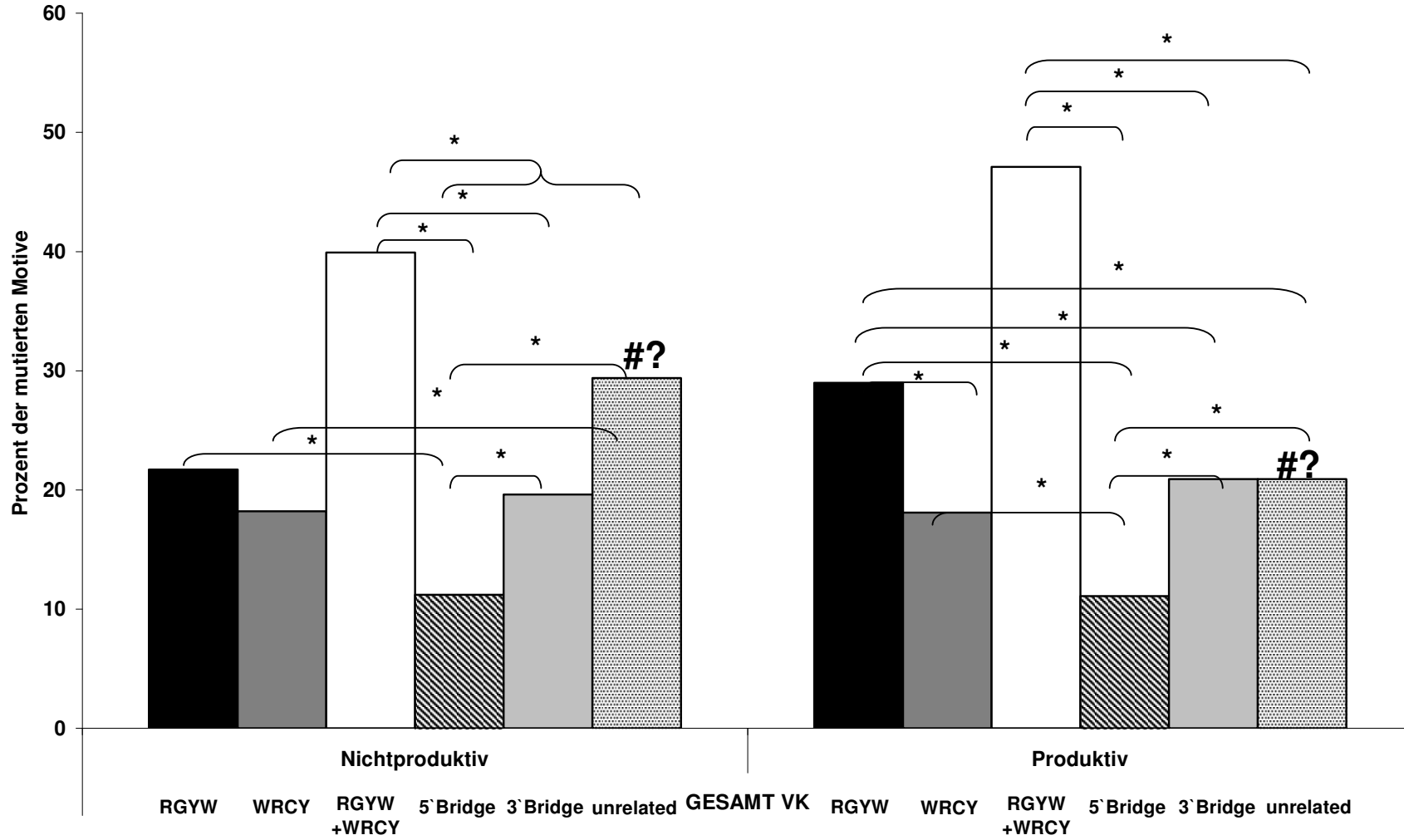
Figur 36: Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen auf die Motive in nicht-produktiven V<sub>k</sub>-Rearrangements



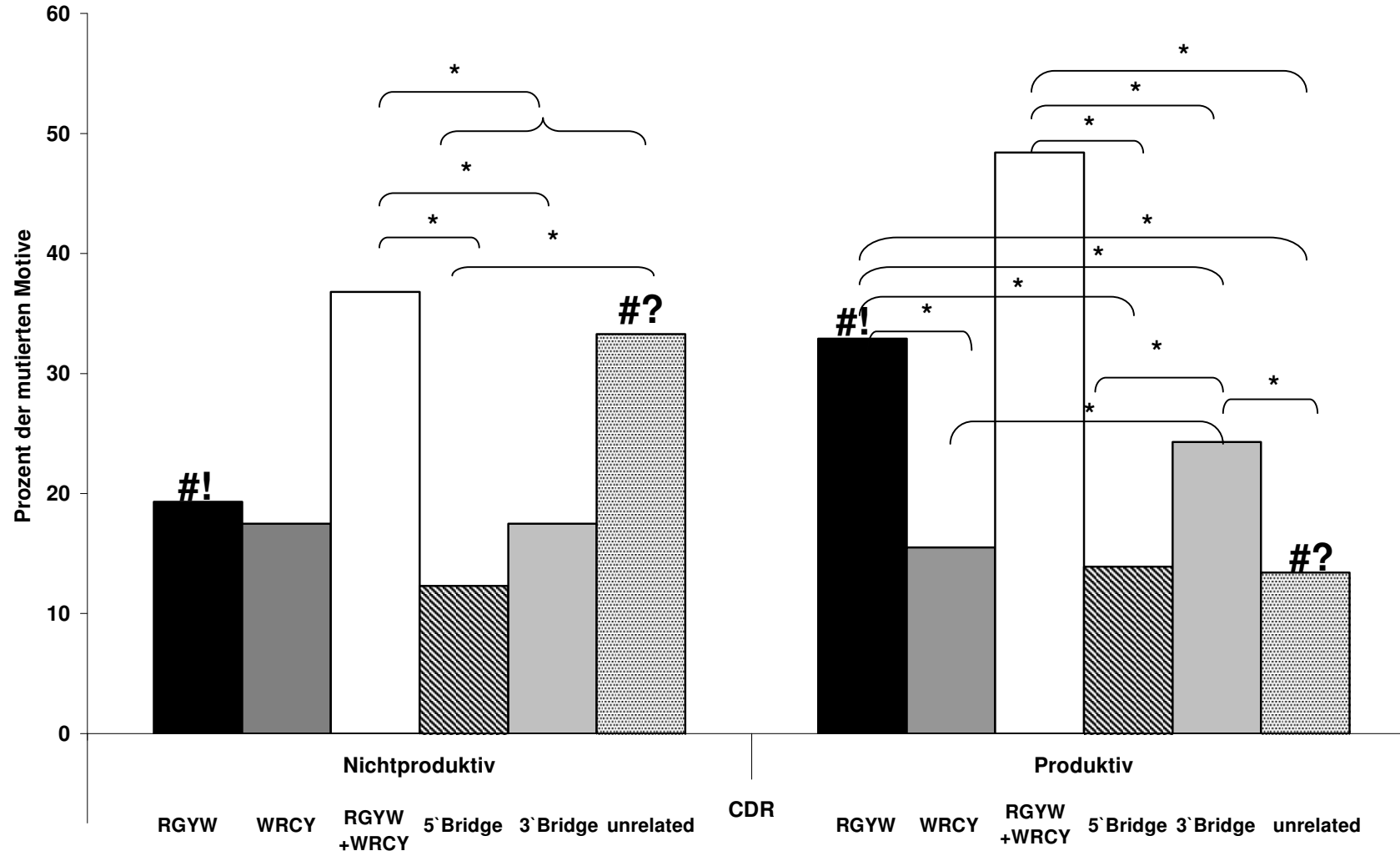
**Figur 37: Verteilung der Replacement- und Silent-Mutationen auf die Motive in produktiven V<sub>k</sub>-Rearrangements**



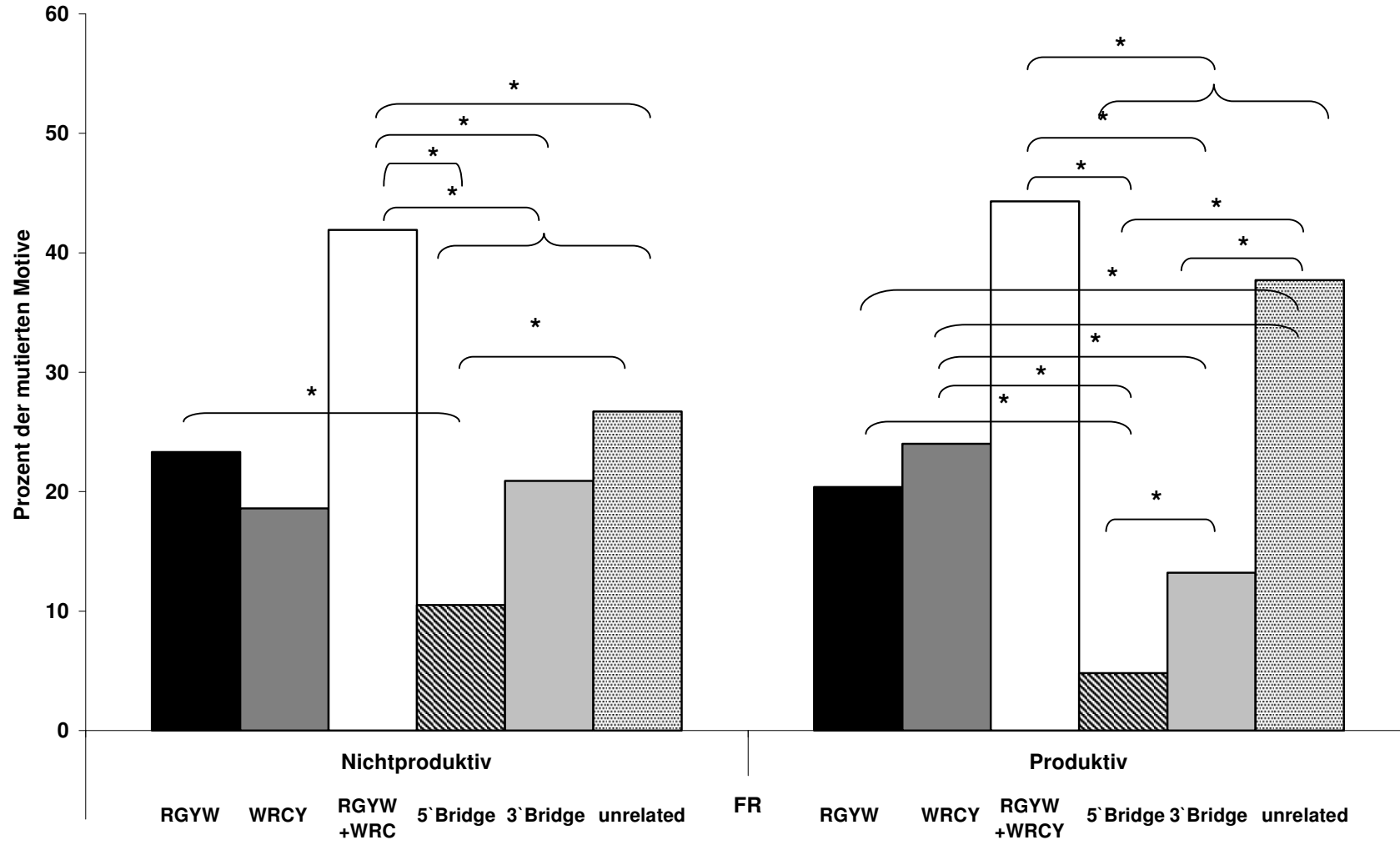
Figur 38: Vergleich aller mutierter Motive in nicht-produktiven und produktiven Vk-Rearrangements



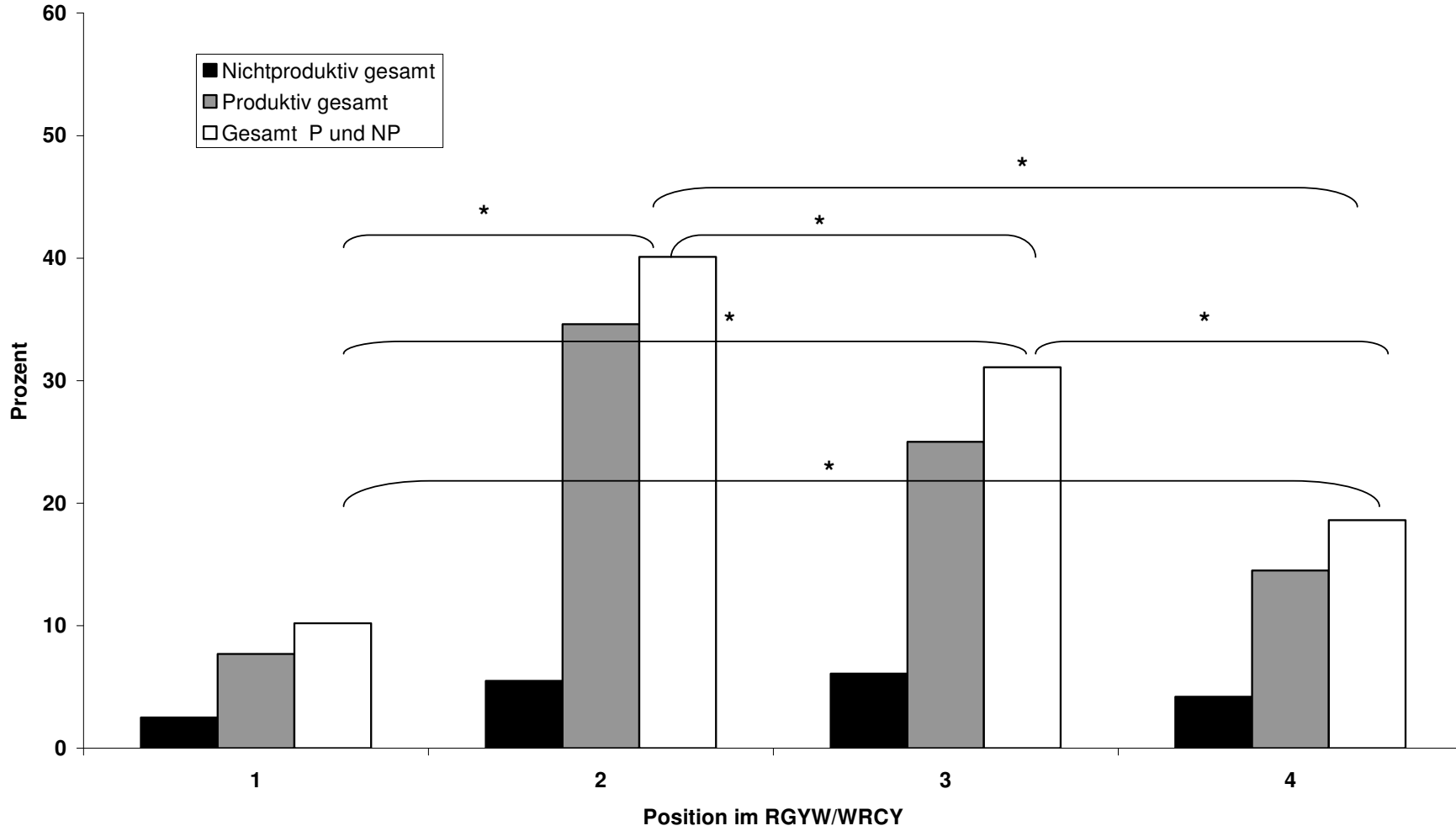
**Figur 39: Vergleich von mutierten Motiven im CDR nicht-produktiver und produktiver V<sub>k</sub>-Rearrangements**



Figur 40: Vergleich von mutierten Motiven im FR nicht-produktiver und produktiver V<sub>k</sub>-Rearrangements

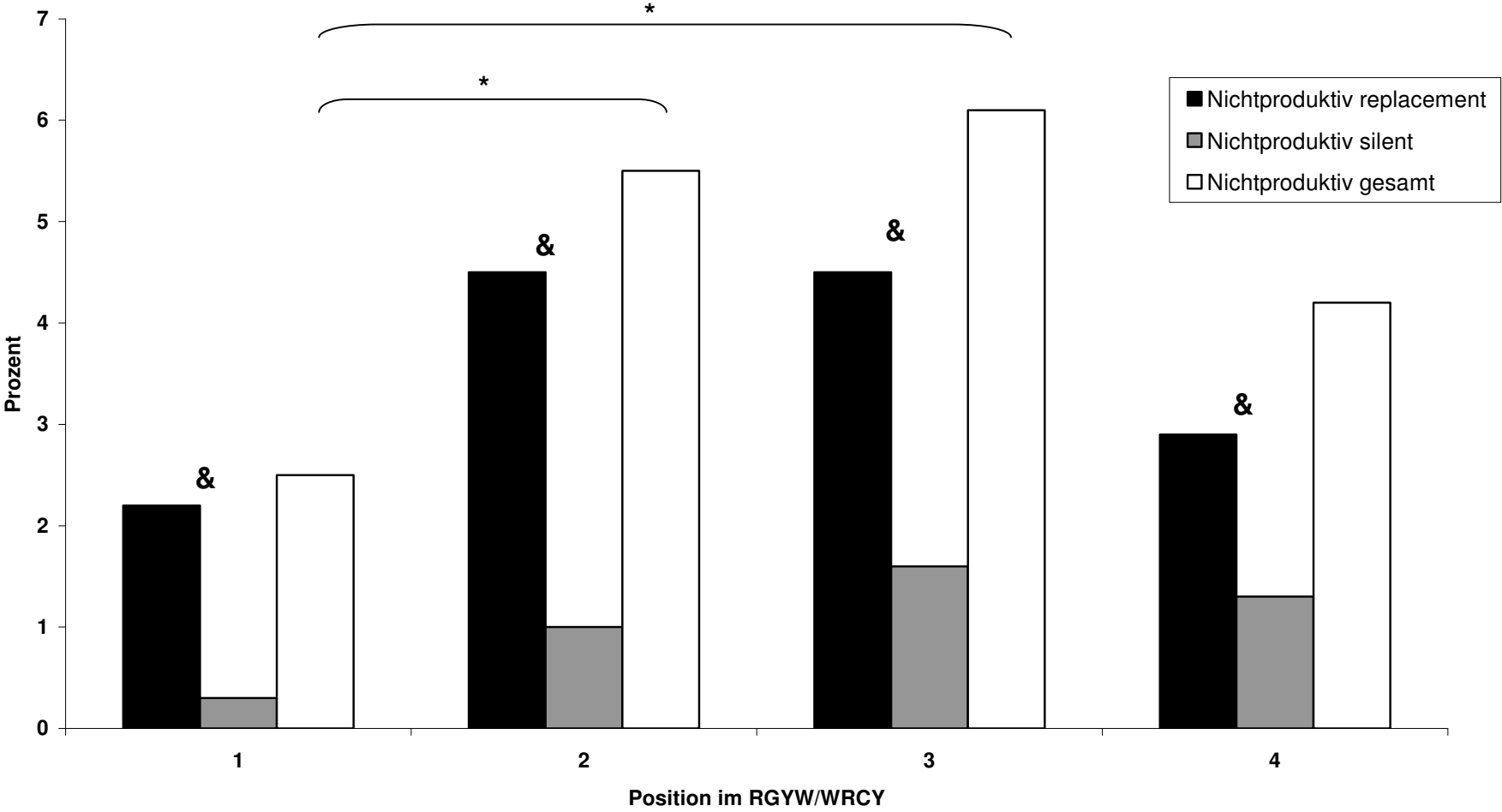


**Figur 41: Lokation der Mutation im RGYW und WRCY nicht-produktiver und produktiver V<sub>k</sub>-Rearrangements**

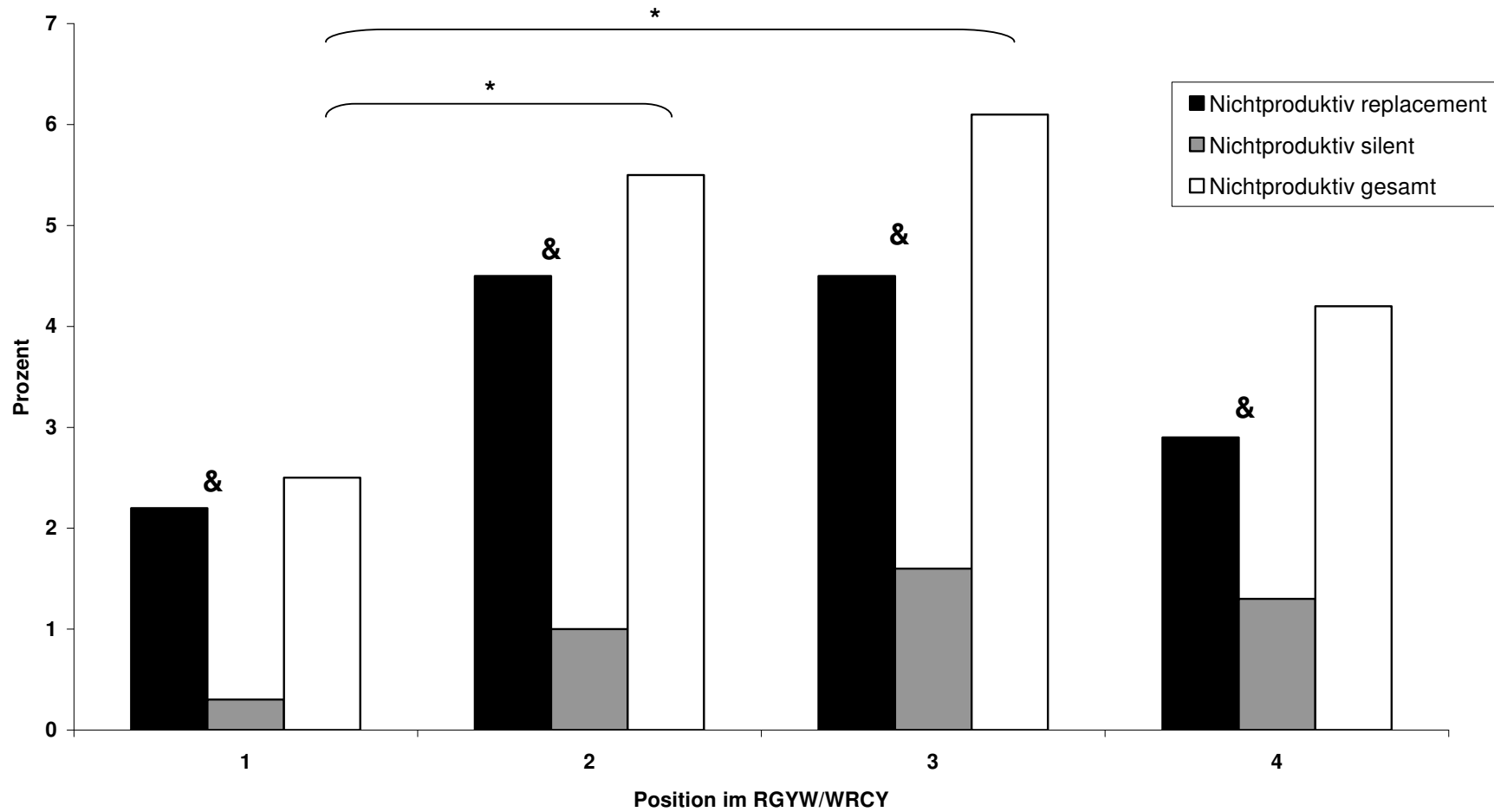




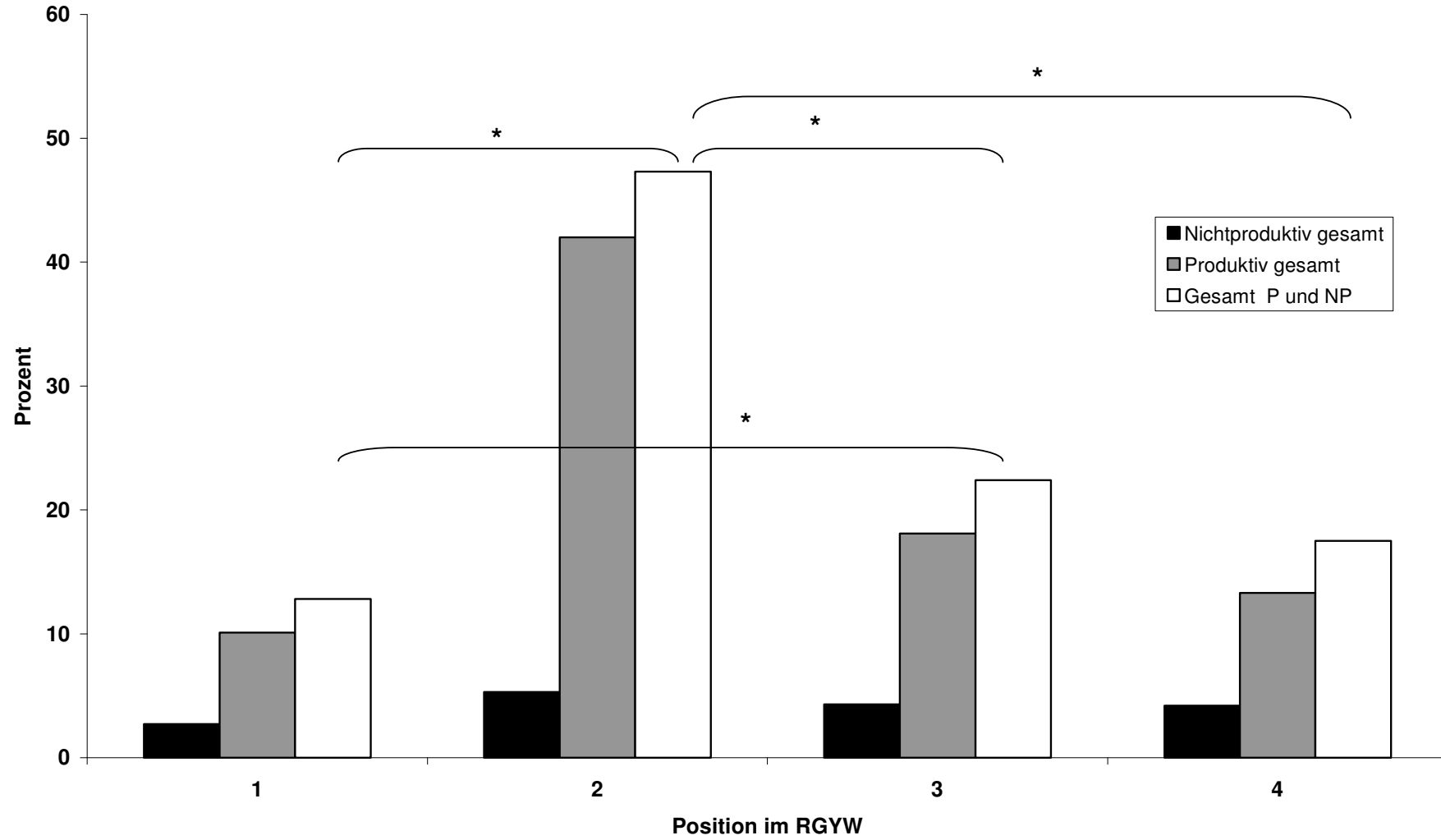
Figur 42a: Lokation der Mutation im RGYW und WRCY nicht-produktiver Vk-Rearrangements



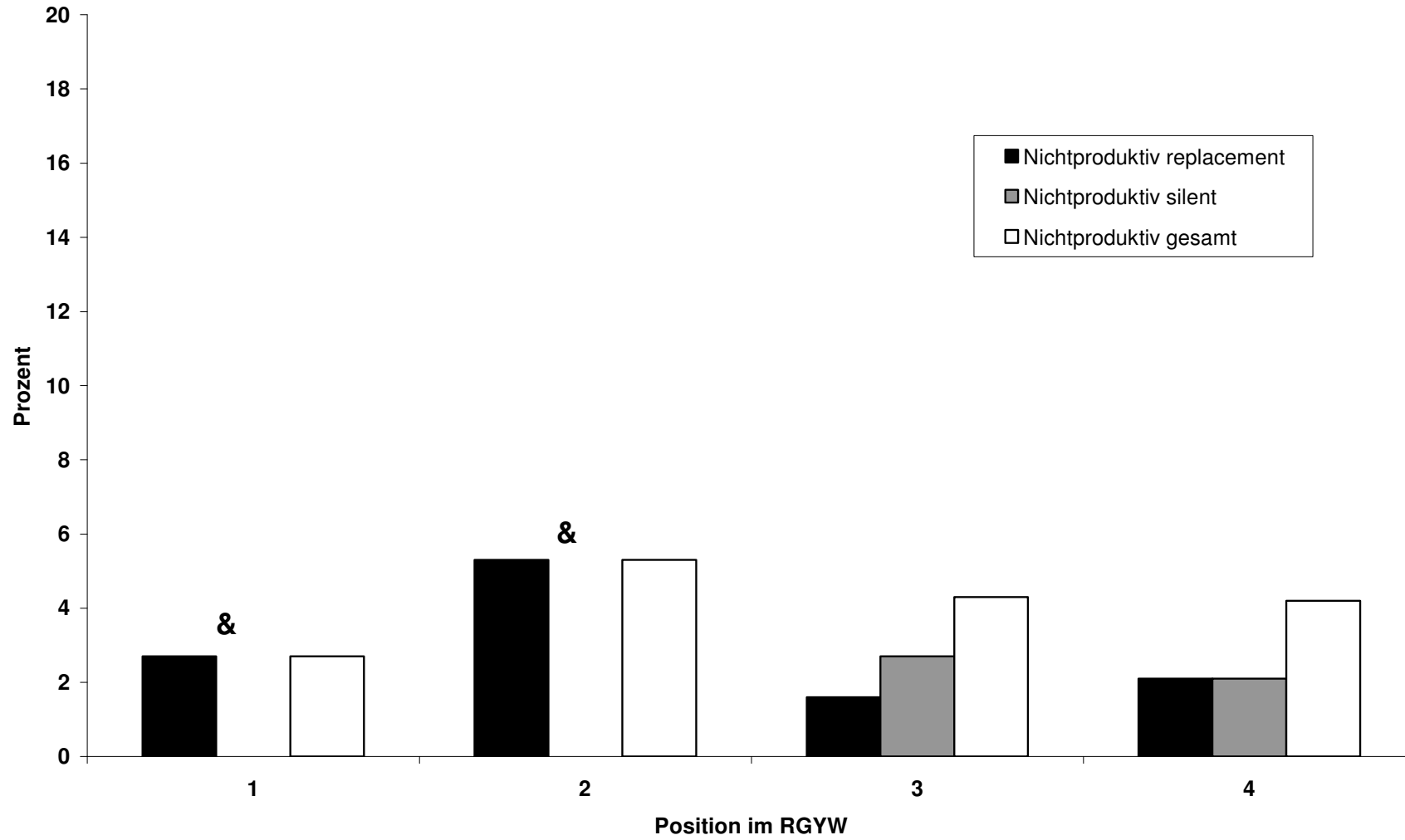
Figur 42a: Lokation der Mutation im RGYW und WRCY nicht-produktiver Vk-Rearrangements



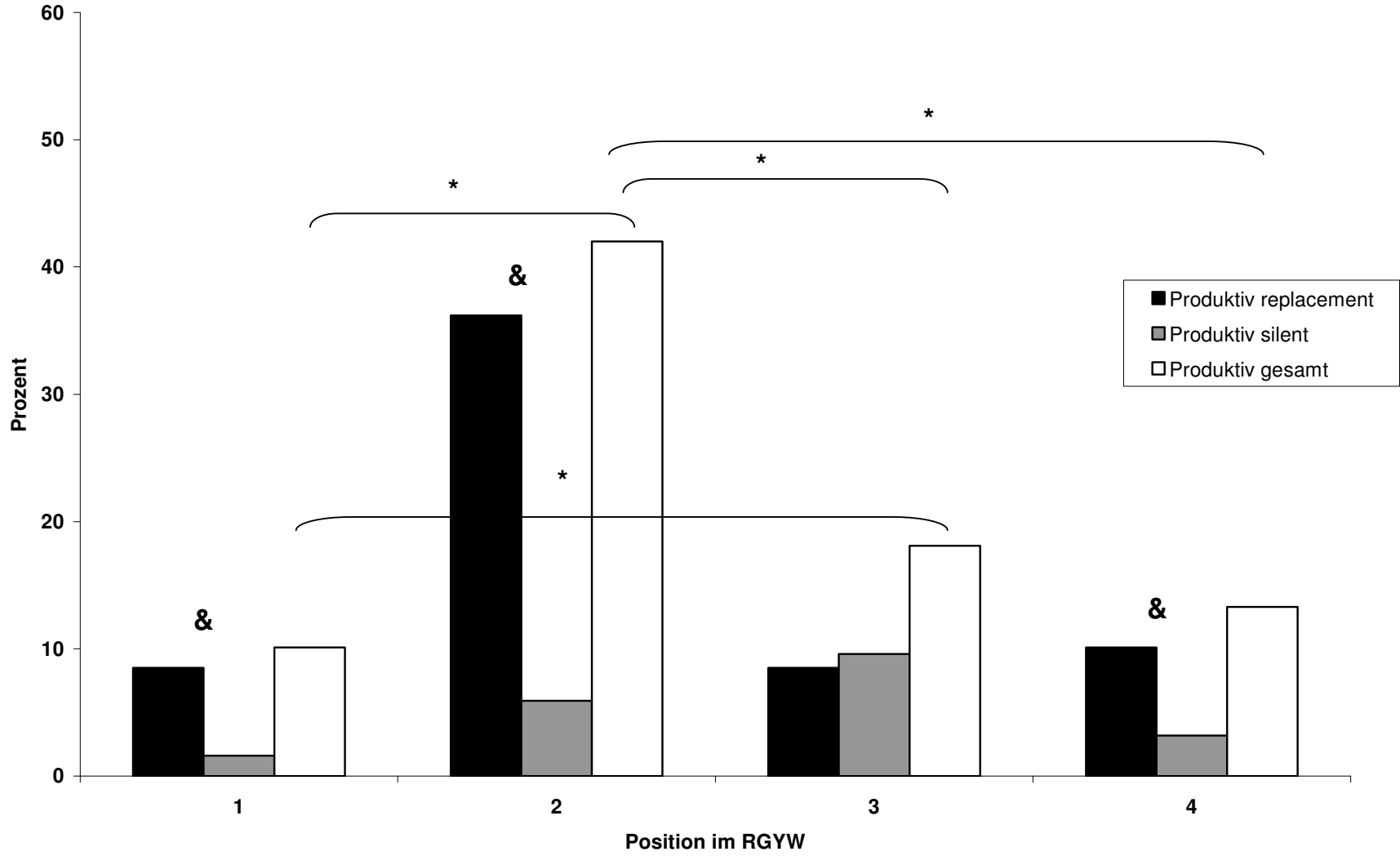
Figur 43: Lokation der Mutation im RGYW nicht-produktiver und produktiver Vk-Rearrangements



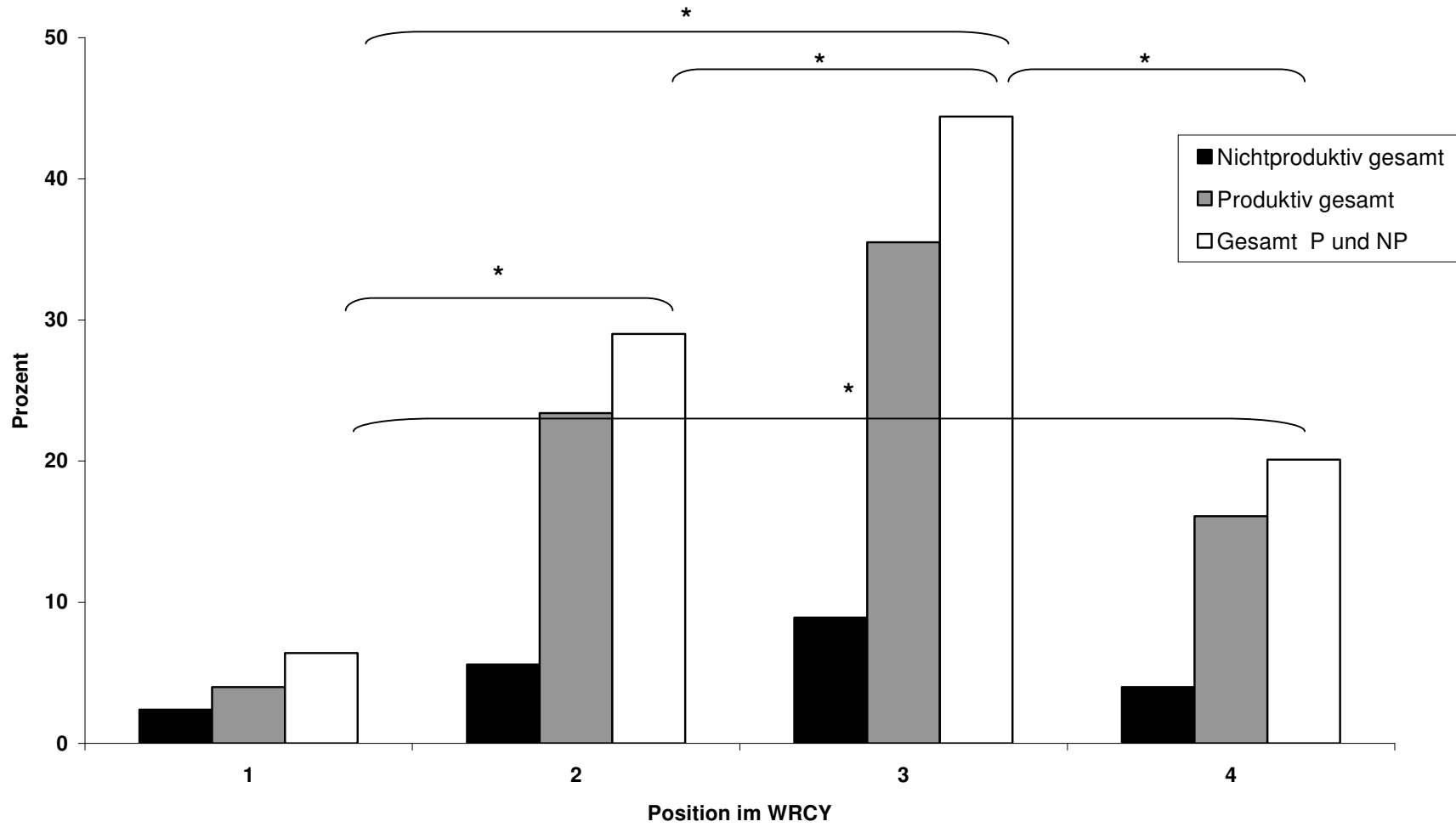
Figur 44a: Lokation der Mutation im RGYW nicht-produktiver Vk-Rearrangements



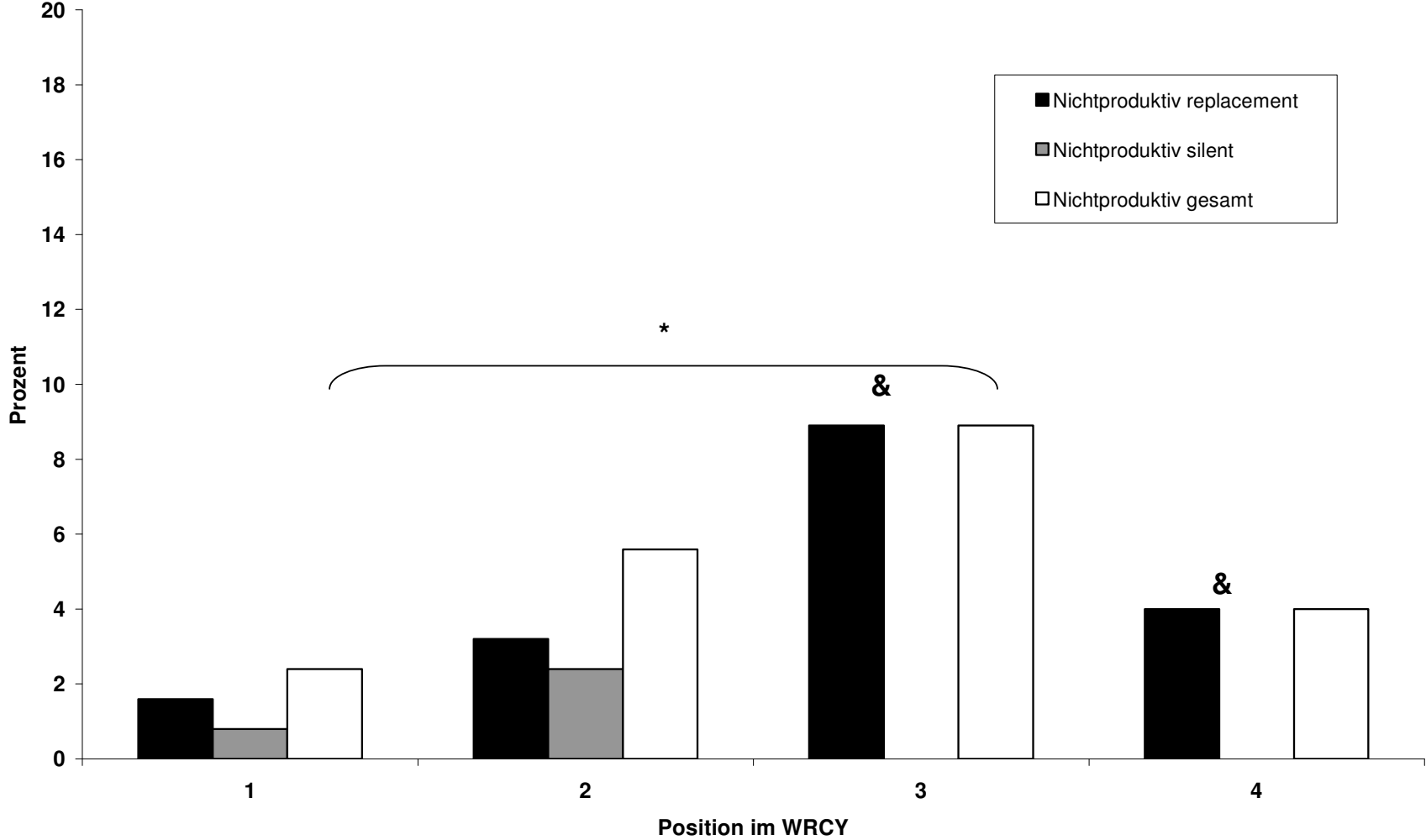
Figur 44b: Lokation der Mutation im RGYW produktiver Vk-Rearrangements



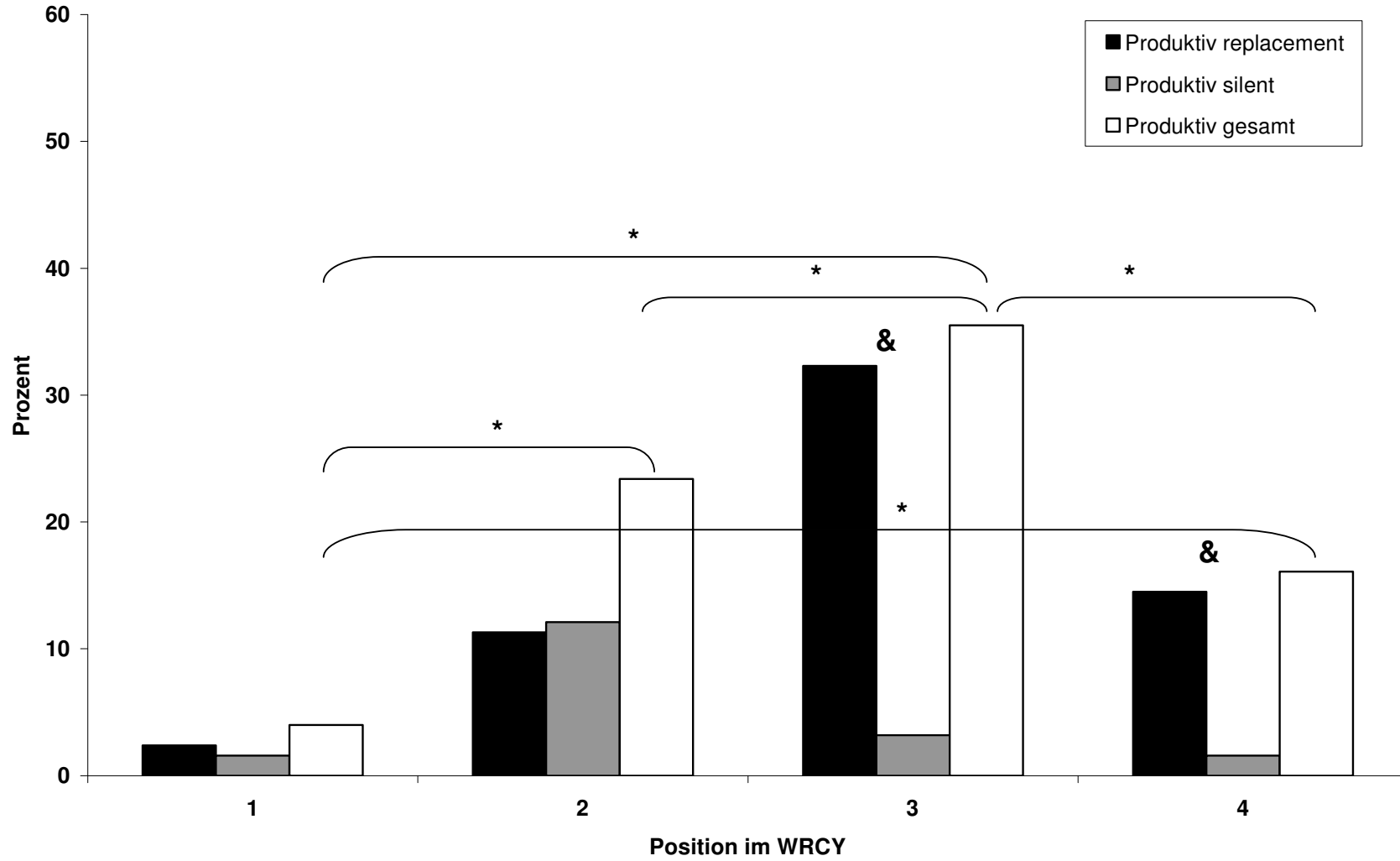
Figur 45: Lokation der Mutation im WRCY nicht-produktiver und produktiver Vk-Rearrangements



Figur 46a: Lokation der Mutation im WRCY nicht-produktiver Vk-Rearrangements



Figur 46b: Lokation der Mutation im WRCY produktiver Vk-Rearrangements





## **Besonders danken möchte ich**

Herrn Professor Dr. med. Hermann Girschick für die Überlassung des Themas.  
Besonders seine aufgebrachte Geduld, seine fachliche Unterstützung sowie seine Hilfsbereitschaft haben mir bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit sehr geholfen.

Herrn Professor Dr. med. Christian Kneitz für die Übernahme des Korreferates.

## Lebenslauf

Name: Kränzle, Heidi  
Geburtsdatum: 21. März 1977  
Geburtsort: Lauingen/Donau  
Wohnort: Auf der Leiten 10b, 89407 Dillingen/Donau  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung

1983 – 1987 Grundsschule Lauingen  
1987 – 1996 Albertus-Magnus-Gymnasium Lauingen  
6/1996 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Studium

5/1997 - 3/2002 Studium der Humanmedizin an der Universität  
Würzburg  
3/1999 Ärztliche Vorprüfung  
3/2000 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
3/2002 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
4/2002 Hochschulwechsel an die Universität Ulm  
4/2002 – 4/2003 3. klinischer Abschnitt / praktisches Jahr  
4/02 – 8/02 Fach Chirurgie, Klinikum Heidenheim  
8/02 – 12/02 Fach Innere Medizin, Klinikum Heidenheim  
12/02 – 3/03 Fach Anästhesie, Klinikum Heidenheim  
5/2003 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
5/03 – 9/03 Promotionssemester  
10/2003 Ärztin im Praktikum/ Anästhesie  
1/04 – 10/04 Ärztin im Praktikum/ Ophthalmologie,  
Seit 10/04 Assistenzärztin Ophthalmologie  
1/04 - 2/07 Augenzentrum Dillingen  
3/07 - 8/07 MVZ Fürth: Des.Ober/Scharrer  
seit 09/07 Augenklinik Zentralklinikum Augsburg

Dillingen, im März 2008

Heidi Kränzle