

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

**Untersuchung des B-Zell Immunglobulinrepertoires
bei Juveniler Idiopathischer Arthritis
im Hinblick auf Selektion und Klonalität**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Nadine Suffa
aus Sonneberg

Würzburg, März 2010

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

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. M. Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2010

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Kindliches Rheuma/ Juvenile Idiopathische Arthritis | 1 |
| 1.2 | B-Lymphozyten | 3 |
| 1.2.1 | Die Funktion von B-Lymphozyten und ihre Entwicklung im Knochenmark | 3 |
| 1.2.2 | Bildung von Immunglobulinen | 3 |
| 1.2.2.1 | Allgemeines und Aufbau | 3 |
| 1.2.2.2 | Entstehung der Antikörpervielfalt und Bedeutung für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen/ Autoantikörper | 6 |
| 1.2.2.2.1 | Molekularer Mechanismus der V(D)J Rekombination im Knochenmark in zeitlicher Korrelation zu den B-Zell-Reifungsstadien | 6 |
| 1.2.2.2.2 | Palindrome | 9 |
| 1.2.2.2.3 | Terminale Desoxynukleotidyltransferase und Exonuklease Aktivität | 10 |
| 1.2.2.2.4 | Somatische Hypermutation | 10 |
| 1.2.2.3 | Der kappa Lokus | 11 |
| 1.2.2.4 | Der Lokus der schweren Kette | 12 |
| 1.2.3 | Toleranzmechanismen | 12 |
| 1.2.4 | Aktivierung von B-Zellen und klonale Expansion | 13 |
| 1.2.4.1 | T-Zell abhängige Aktivierung, Keimzentrumsreaktion | 13 |
| 1.2.4.2 | T-Zell unabhängige Aktivierung | 14 |
| 1.2.4.3 | Klonale Expansion | 14 |
| 1.3 | Die Rolle der B-Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen | 15 |
| 1.4 | Ektope Keimzentren bei Autoimmunerkrankungen/Rheumatoider Arthritis | 15 |
| 1.5 | Fragestellungen | 16 |
| 2 | Material und Methoden | 17 |
| 2.1 | Herkunft der Proben | 17 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2 | Isolierung mononukleärer Zellen | 17 |
| 2.3 | Charakterisierung und Sortierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie | 18 |
| 2.3.1 | Allgemeines | 18 |
| 2.3.2 | Verwendete Antikörper und Geräte | 20 |
| 2.4 | Analyse der Immunglobulin-Genexpression durchflusszytometrisch separierter Einzelzellen | 21 |
| 2.4.1 | Zelllyse und Reverse Transkription | 21 |
| 2.4.2 | Polymerase Kettenreaktion | 23 |
| 2.4.2.1 | Amplifikation der Immunglobulin VJ kappa Leichtkettenrearrangements | 24 |
| 2.4.2.2 | Amplifikation der Immunglobulin VDJ Rearrangements der schweren Kette | 28 |
| 2.4.3 | Aufreinigung, Sequenzierung und Analyse der PCR Produkte | 32 |
| 2.4.3.1 | Gelelektrophorese | 32 |
| 2.4.3.2 | Extraktion der DNA aus dem Agarosegel und Aufreinigung | 32 |
| 2.4.3.3 | Sequenzierung der PCR Produkte | 33 |
| 2.4.3.4 | Sequenzanalyse des VJ sowie VDJ Rearrangements von Einzelzellen | 33 |
| 2.5 | Statistische Methoden | 33 |
| 3 | Ergebnisse | 35 |
| 3.1 | Gesamtüberblick über die gewonnenen Sequenzdaten | 35 |
| 3.2 | Mutationsanalyse | 36 |
| 3.2.1 | Mutationen der kappa Leichtkette | 36 |
| 3.2.1.1 | Mutationsraten innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen | 36 |
| 3.2.1.2 | R/S Ratio | 38 |
| 3.2.1.3 | Verteilung der Austausch- und stillen Mutationen auf die CDR und FR Regionen | 39 |
| 3.2.2 | Mutationen innerhalb der schweren Kette | 43 |
| 3.2.2.1 | Mutationsraten innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen | 43 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.2.2 | R/S Ratio | 45 |
| 3.2.2.3 | Verteilung der Austausch- und stillen Mutationen auf die CDR und FR Regionen | 45 |
| 3.3 | Sequenzhomologien der B-Zellen | 50 |
| 3.3.1 | Identische V(D)J Genrearrangements von B-Zellen innerhalb der einzelnen B-Zell Populationen | 51 |
| 3.3.2 | Populations-übergreifende identische VJ Genrearrangements von B-Zellen | 51 |
| 4 | Diskussion | 56 |
| 5 | Zusammenfassung | 64 |
| 6 | Abkürzungen | 66 |
| 7 | Literatur | 69 |
| 8 | Tabellen | 77 |

1 Einleitung

1.1 Kindliches Rheuma / Juvenile Idiopathische Arthritis

„Rheuma“ lässt in erster Linie an ein Krankheitsbild des älteren Menschen denken. Doch bereits Säuglinge und Kleinkinder/Kinder können betroffen sein und über die Jahre hinweg in ihrer körperlichen sowie ihrer psychischen Entwicklung beeinträchtigt werden.

Eine der häufigsten Ursachen von Gelenkbeschwerden im Kindesalter stellt die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) dar. Die jährliche Inzidenz dieses Krankheitsbildes wird international unterschiedlich zwischen 0,8 und 22 Neuerkrankungen pro 100.000 Kinder angegeben (1).

Im Vordergrund der Erkrankung steht eine Synovitis mit klinischen Zeichen einer Gelenkentzündung (Rötung, Schwellung, Schmerz, Überwärmung, Bewegungseinschränkung), doch das Krankheitsbild kann ebenso zu einer Beteiligung innerer Organe oder der Augen führen und präsentiert sich daher klinisch mannigfach.

Die Definition der JIA beinhaltet das Vorhandensein einer mindestens 6 Wochen persistierenden Arthritis mit einem Beginn im Alter von unter 16 Jahren (2). Je nach Befallsmuster und Progression innerhalb der ersten sechs Monate, Serologie, genetischem Hintergrund, Alter und Geschlecht werden im Zuge der International League of Associations for Rheumatology (ILAR) Klassifikation sieben verschiedene Subtypen unterschieden (2) (Tab. 1).

Eine der häufigsten Unterformen ist die Oligoarthritis (3) (frühkindliche Oligoarthritis/ Early Onset Pauciarticular Arthritis/EOPA nach der EULAR Klassifikation), die mit einem Gelenkbefall von maximal vier Gelenken in den ersten sechs Krankheitsmonaten einhergeht und vor allem Mädchen im frühen Kindesalter betrifft.

Das Krankheitsbild der JIA wurde 1864 durch Cornil erstmals beschrieben (4). Bis heute ist die eigentliche Ursache der JIA wenig verstanden. Sie gilt als Autoimmunerkrankung, die wahrscheinlich durch externe Faktoren angestoßen wird und auf genetisch prädisponierender Basis einen chronischen Verlauf nimmt (5, 6). Die Rolle von B-Zellen bei der Pathogenese der JIA ist bisher wenig erforscht, doch da sich in ca. 70% der Oligoarthritis-Fälle Antinukleäre Antikörper (ANA) als serologisch wichtiger Parameter nachweisen lassen, liegt eine Beteiligung von B-Lymphozyten nahe (7).

| Subtypen der JIA | Anzahl der betroffenen Gelenke (in den ersten 6 Monaten) und extraartikuläre Manifestationen | Geschlecht | Durchschnittsalter bei Krankheitsbeginn | Serologie und wichtigste HLA Assoziationen |
|---|--|------------|---|--|
| Systemische Arthritis (Morbus Still) | Anzahl beliebig Intermittierendes Fieber > 2 Wo, Exanthem, Myokarditis, Perikarditis, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Anämie, u.v.a. | m = w | 4 Jahre | - |
| Seronegative Polyarthritits | ≥ 5 Gelenke selten: Leichtes Fieber, Lymphadenopathie | w > m | 5 Jahre | ANA (25%) HLA DR 8 |
| Seropositive Polyarthritits | ≥ 5 Gelenke Rheumknötchen an Druckstellen, Vaskulitis | w >> m | 12 Jahre | RF ANA (75%) HLA DR 4 |
| Oligoarthritits (*) a) persistierend | 1-4 Gelenke Wachstumsstörungen, chron. Uveitis | w >> m | 2 Jahre | ANA (70%) HLA DR 5 HLA DR 8 |
| b) erweitert | 1-4 Gelenke ≥ 5 nach den ersten 6 Monaten | | | |
| Enthesitis assoziierte Arthritis | Enthesitis, Uveitis | m > w | 10 Jahre | HLA B 27 |
| Psoriasis Arthritis | Psoriasis, Uveitis, Daktylitis, Onycholyse | w > m | 6 Jahre | ANA (50%) |
| Nicht klassifizierbare Arthritiden | 1. erfüllt die Kriterien keiner Kategorie oder 2. erfüllt die Kriterien von mehr als einer Kategorie | | | |

Tabelle 1: Subtypen der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIA) nach der ILAR Klassifikation (kombiniert und modifiziert aus 2, 8-12)

m: männlich, w: weiblich, ANA: Antinukleäre Antikörper, RF: Rheumafaktor, HLA: Humanes Leukozytenantigen, (*) entspricht der Frühkindlichen Oligoarthritits (Early Onset Pauciarticular Arthritis, EOPA) nach der EULAR (European League Against Rheumatism) Klassifikation

1.2 B-Lymphozyten

1.2.1 Die Funktion von B-Lymphozyten und ihre Entwicklung im Knochenmark

B-Lymphozyten sind zusammen mit T-Lymphozyten die wichtigsten zellulären Träger des adaptiven Immunsystems und werden kontinuierlich in der fetalen Leber bzw. im Knochenmark gebildet.

Die Funktion als Vorläufer von Antikörper-produzierenden Plasmazellen stellt die bislang am besten bekannte Rolle der B-Zellen dar.

Daneben scheint die B-Zelle jedoch auch Antikörper-unabhängige Effektormechanismen zu besitzen: Über MHCII Moleküle ist eine Prozession und Präsentation von Antigenen möglich, die zu einer T-Zell Aktivierung führen kann und somit eine enge Verknüpfung zwischen der humoralen und zellulären Immunantwort darstellt.

Durch die Freisetzung immunmodulatorischer Zytokine (u.a. IL-10, IL-4, IFN- γ) können B-Zellen die Funktion von T-Zellen sowie von Antigen-präsentierenden Zellen beeinflussen (13,14). Sie scheinen außerdem an der Organisation und Neubildung lymphatischen Gewebes (15) und an der Wundheilung beteiligt zu sein (16).

Mehrere Entwicklungsschritte werden während der Genese der Zellen im Knochenmark durchlaufen bis, - ausgehend von einer pluripotenten Stammzelle, das reife B-Zell-Stadium erreicht ist:

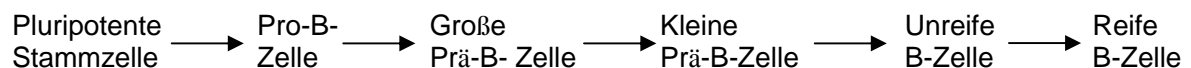


Abbildung 1: Entwicklungsschritte in der Entstehung von B-Zellen

Reife B-Zellen, die noch keinen Kontakt zu einem für sie spezifischen Antigen hatten, werden als „naive“ B-Zellen bezeichnet. Diese zirkulieren im Blut und den lymphatischen Organen. Nach Kontakt mit einem Antigen im Kontext einer immunologischen Synapse kann sich die reife B-Zelle in eine Gedächtnis-B-Zelle oder eine Antikörper-produzierende Plasmazelle differenzieren.

1.2.2 Bildung von Immunglobulinen

1.2.2.1 Allgemeines und Aufbau

Immunglobuline/Antikörper werden durch Plasmazellen (17, 18) als sezernierte Proteine im Zuge einer Reaktion auf ein Antigen gebildet und sind wichtiger

Bestandteil der humoralen Immunabwehr. Dabei bildet jede B-Zelle Antikörper nur einer Spezifität.

Es werden fünf Immunglobulin (Ig) -Isotypen unterschieden (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) (19), die sich durch ihr Molekulargewicht und ihr Vorkommen als Monomere, Dimere oder Pentamere, Schleimhaut-assoziiert oder frei zirkulierend unterscheiden. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit werden im Nachfolgenden beispielhaft Aufbau und Struktur des Immunglobulins G beschrieben (Abb. 2).

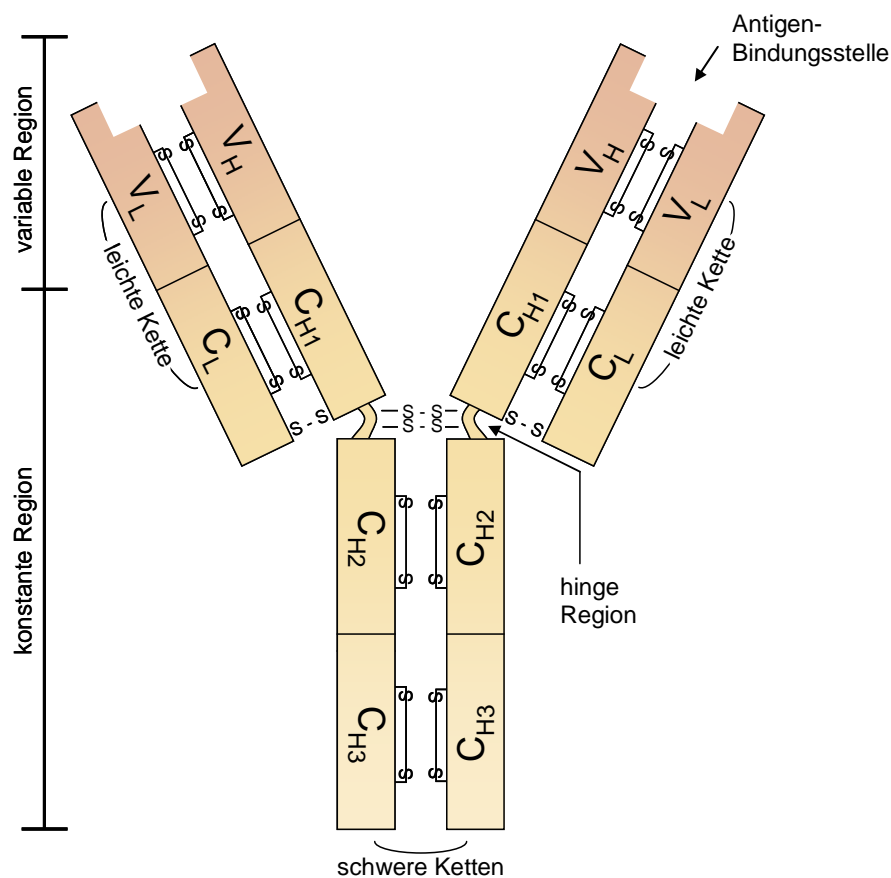


Abbildung 2: Aufbau eines Antikörpers am Beispiel des Immunglobulins G

C_{H1-H3} : konstante Region der schweren Kette, C_L : konstante Region der leichten Kette

V_H : variable Region der schweren Kette, V_L : variable Region der leichten Kette

S – S: Disulfidbrücken

Ein Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (Heavy Chains, H) und zwei identischen leichten Ketten (Light Chains, L) (20). Durch nicht-kovalente Bindungen sowie kovalente Disulfidbrücken (21) sind diese Strukturen miteinander in Form eines Ypsilon verknüpft (Abb. 2).

Die leichten Ketten bestehen jeweils aus einer variablen (V_L) und einer konstanten Region (C_L), während sich die schweren Ketten aus je einer variablen (V_H) und mehreren (im Falle von IgG drei) konstanten Regionen (C_H) zusammensetzen. Der variable Abschnitt im Zusammenspiel der leichten und schweren Kette dient als Komplementärstruktur der Bindung von spezifischen Antigenen. Innerhalb dieser variablen Domänen der schweren und der leichten Kette befinden sich jeweils drei „hochvariable“ schleifenförmige Regionen, die für die eigentliche Antigenerkennung und -bindung verantwortlich sind und als „Complementary Determining Regions“ (CDR 1-3) bezeichnet werden (22) (Abb. 3). Der konstante Teil der schweren Kette bestimmt den Isotyp des Antikörpers (23).

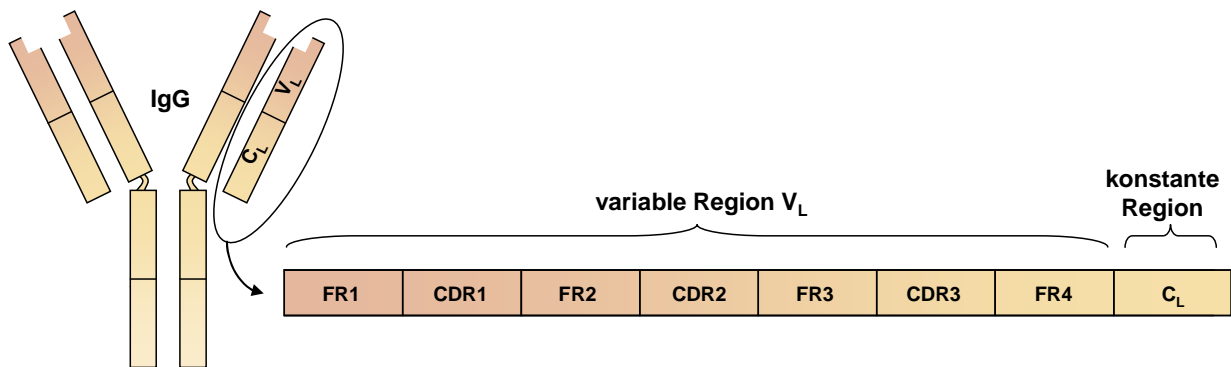


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Complementary Determining Regions (CDR 1-3) und Framework Regions (FR 1-4) am Beispiel der leichten Kette eines IgG

Der B-Zell-Rezeptor (BZR) ist die membranständige Form des sezernierten Antikörpers.

Antikörper können durch Neutralisierung der spezifischen Antigene wirken oder diese opsonisieren und damit den Phagozyten zugänglich machen. Des Weiteren aktivieren sie das Komplementsystem sowie natürliche Killerzellen (19) oder führen über eine Quervernetzung von Strukturen zu deren Agglutination und machen sie damit unschädlich. Diese unterschiedlichen biologischen Funktionen sind abhängig vom jeweiligen Isotyp des Antikörpers.

1.2.2.2 Entstehung der Antikörpervielfalt und Bedeutung für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen/ Autoantikörper

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage auf eine große Anzahl spezifischer Antigene zu reagieren. Das theoretische Antikörperrepertoire wird auf etwa 10^{11} verschiedene Spezifitäten geschätzt (22). Die Kapazität des Genoms, jeden Antikörper durch ein bestimmtes Gen zu kodieren, würde bei dieser Vielfalt überschritten werden und so wird eine Reihe anderer spezieller Mechanismen notwendig:

1.2.2.2.1 Molekularer Mechanismus der V(D)J Rekombination im Knochenmark in zeitlicher Korrelation zu den B-Zell-Reifungsstadien

Für die Antigenbindung ist die variable Region des Immunglobulins/B-Zell-Rezeptors bedeutend (19). Diese setzt sich aus der variablen Region der leichten sowie der schweren Kette zusammen. Das für die variable Region der leichten bzw. schweren Kette kodierende Gen wird erst während der Entwicklung der frühen B-Zelle im Knochenmark aus verschiedenen Gensegmenten zusammengesetzt.

Die variable Region der schweren Kette wird mit Variablen Gensegmenten (V), Diversity (D) und Joining (J) Gensegmenten auf Chromosom 14 kodiert (24), während sich die variable Region der leichten Kette rein aus V und J Segmenten zusammensetzt und auf Chromosom 2 (kappa Leichtkette) und 22 (lambda Leichtkette) zu finden ist.

Während der B-Zell Entwicklung im Knochenmark lagern sich jeweils ein V, ein D und ein J Segment (schwere Kette) (25) bzw. ein V und J Segment (leichte Kette) durch einen Prozess, der „V(D)J Rekombination“ genannt wird, aneinander. Die Zusammenlagerung erfolgt zufällig, so dass auf diese Weise bereits viele Antikörperspezifitäten entstehen.

Wichtigster Initiator dieses Umlagerungsprozesses ist die sog. VDJ Rekombinase, ein Heterodimer mit Endonukleaseaktivität, das aus den Proteinen RAG1 und RAG2 besteht (26). Die Rekombinase erkennt spezifische Rekombinationssignalsequenzen (RSS), die aus einem konservierten Heptamer und Nonamer bestehen, welche von einem 12 oder 23 Basenpaar langen Platzhalter (12 oder 23 bp Spacer) voneinander getrennt sind (27). Die Rekombination wird für gewöhnlich dort eingeleitet, wo sich eine RSS Sequenz mit 23 bp Spacer und eine RSS Sequenz mit

12 bp Spacer gegenüber stehen (12/23 Regel) (28,25) und gewährleistet dadurch die Reihenfolge der Rekombinationsvorgänge.

Im Pro-B-Zell-Stadium beginnt die VDJ Rekombination der schweren Ig-Kette, wobei die Kombination eines D mit einem J Segment erfolgt. Erst daran schließt sich die Kopplung eines V Segmentes an die entstandene DJ Genkassette an (29) (Abb. 4).

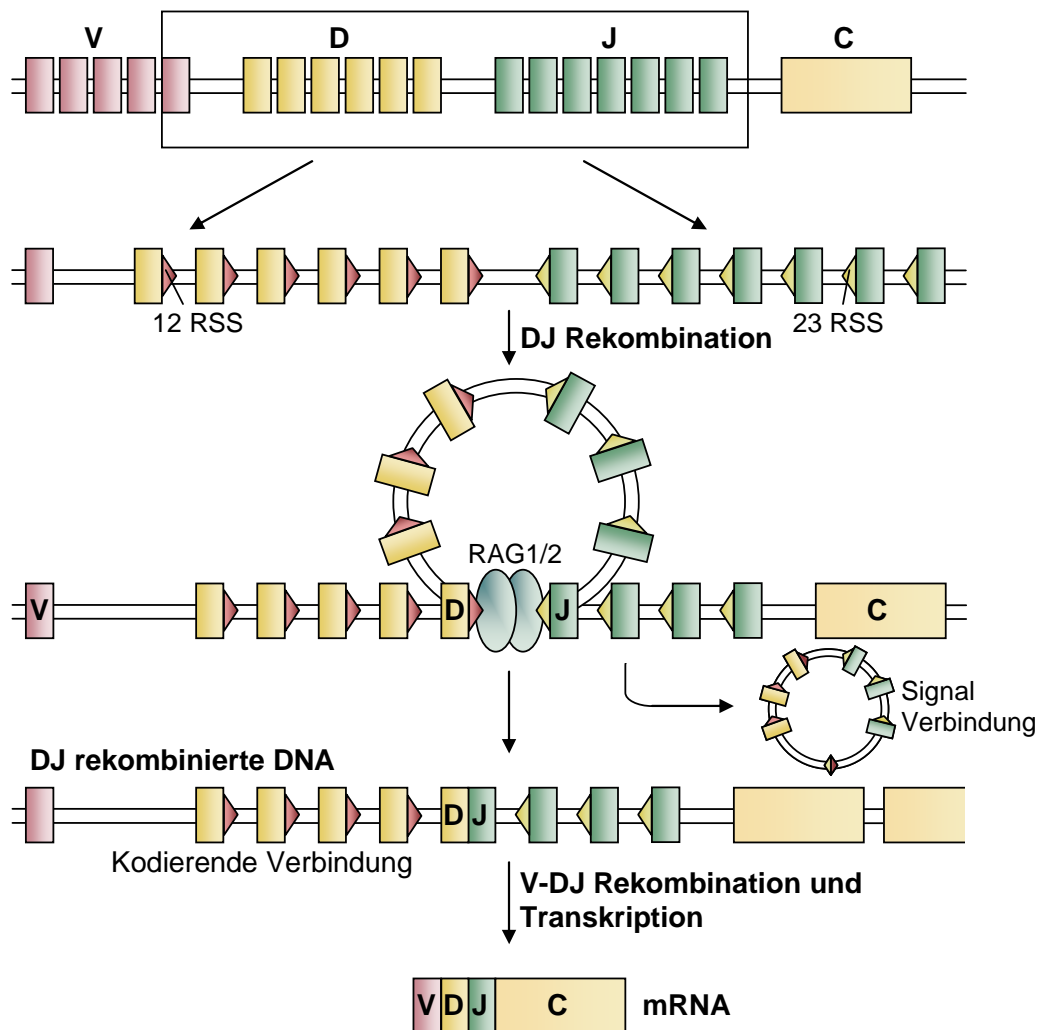


Abbildung 4: Molekularer Mechanismus der V(D)J Rekombination am Beispiel der DJ Rekombination

V: Variable Gensegmente, D: Diversity Gensegmente, J: Joining Gensegmente, C: Konstante Gensegmente

12 RSS und 23 RSS: Rekombinationssignalsequenzen, RAG1/2: VDJ Rekombinase

Im Falle eines produktiven Rearrangements kommt es zur Bildung einer sogenannten μ -Kette und damit zum Übergang in das Stadium der Prä-B-Zelle (Abb. 5). Im Stadium der „großen Prä-B-Zelle“ wird die schwere Immunglobulin μ - Kette mit

einem Leichtkettenkorrelat kombiniert (30) und zusammen mit den Signalkomponenten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ (31) als Prä-B-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert.

Im Falle eines unproduktiven VDJ Rearrangements während des Pro-B-Zell Stadiums kann ein erneuter Rekombinationsvorgang auf dem zweiten vorhandenen Allel stattfinden. Sollte auch hier die Rekombination unproduktiv bleiben, geht die Zelle durch Apoptose unter.

Das produktive Rearrangement eines Allels und im Weiteren die damit verbundene Bildung eines Prä-B-Zell Rezeptors führt zur Unterdrückung der Kopplungsvorgänge auf dem anderen Allel und stellt somit sicher, dass nur eine spezifische schwere Kette exprimiert wird. Diesen Prozess, bei dem ein Allel exprimiert und das andere gleichzeitig unterdrückt wird, bezeichnet man als allelische Exklusion (32,33).

Es erfolgt schließlich eine mehrmalige Zellteilung und der Übergang in das „kleine Prä-B-Zell“ Stadium. Diese Entwicklungsstufe der B-Lymphozyten exprimiert keinen Oberflächenrezeptor mehr, stattdessen beginnt hier die VJ Rekombination der leichten Immunglobulin-Kette, die der der schweren Kette ähnlich ist, nur dass hier kein zusätzliches D Segment vorhanden ist. Darauf folgt der Eintritt der B-Zelle in das unreife B-Zell Stadium (Abb. 5).

Nun wird ein kompletter IgM Rezeptor auf der Oberfläche exprimiert. Durch alternatives Spleißen wird schließlich auch die Bildung eines zusätzlichen IgD Rezeptors möglich und die Zelle geht in das Stadium der reifen, naiven B-Zelle über (Abb. 5).

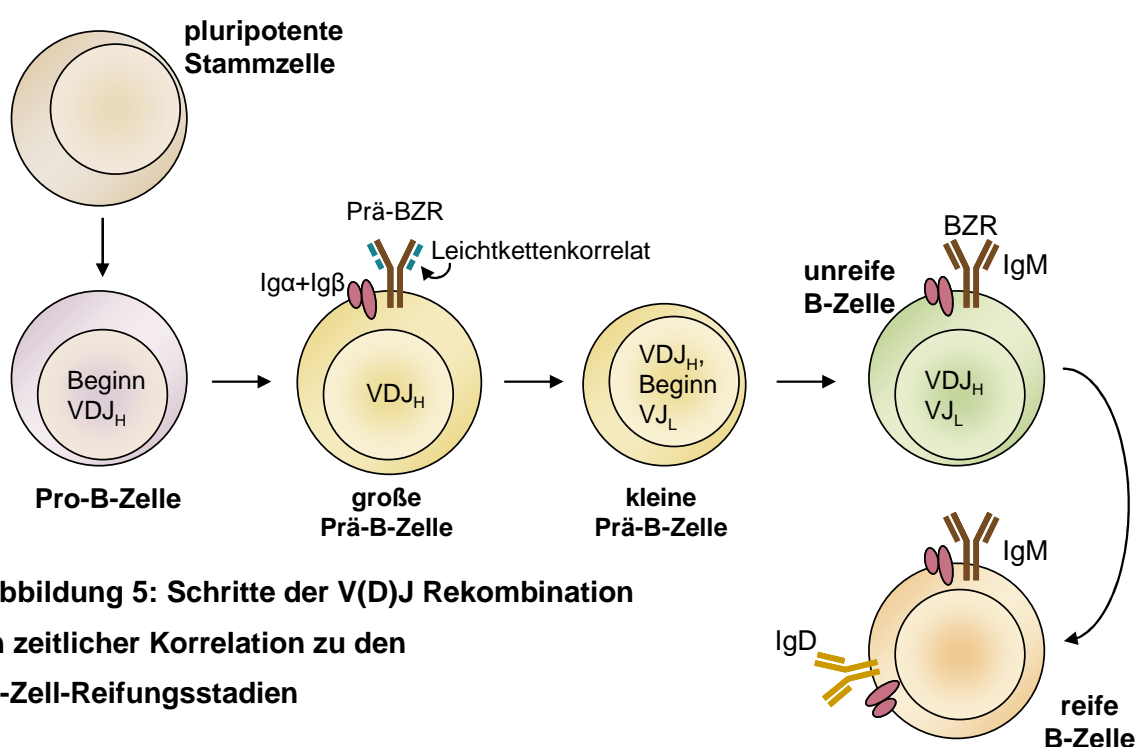


Abbildung 5: Schritte der V(D)J Rekombination in zeitlicher Korrelation zu den B-Zell-Reifungsstadien

Die V(D)J Kopplungsvorgänge laufen an den Grenzen der Segmente nicht immer präzise ab, so dass auch durch das ungenaue Verknüpfen der einzelnen Gensegmente eine zusätzliche Diversität der generierten Sequenzen entsteht (34).

1.2.2.2.2 Palindrome

Während der V(D)J Rekombination können zwischen den Segmentverknüpfungsstellen sogenannte „Palindrome“ entstehen (35), das heißt Nukleotidabfolgen, die in beide Richtungen gelesen die gleiche Sequenz ergeben. Ausgangspunkt hierfür ist die Spaltung der Phosphatesterbindung zwischen dem letzten Nukleotid des kodierenden Gensegments und dem ersten Nukleotid des RSS-Heptamers. An der Schnittstelle der beiden komplementären Einzelstränge bildet sich eine Haarnadelstruktur aus (Abb. 6). Diese wird durch eine Endonuklease erneut geöffnet. Dabei kann der Schnitt den Scheitelpunkt der Haarnadel verfehlen, womit ein überhängender Einzelstrang entsteht, der an seinem Ende die ursprünglich komplementären Nukleotide des anderen Stranges trägt (36). Diese palindromischen Sequenzen werden schließlich am anderen Strang durch komplementäre Nukleotide ergänzt (P-Nukleotide) (Abb. 6).

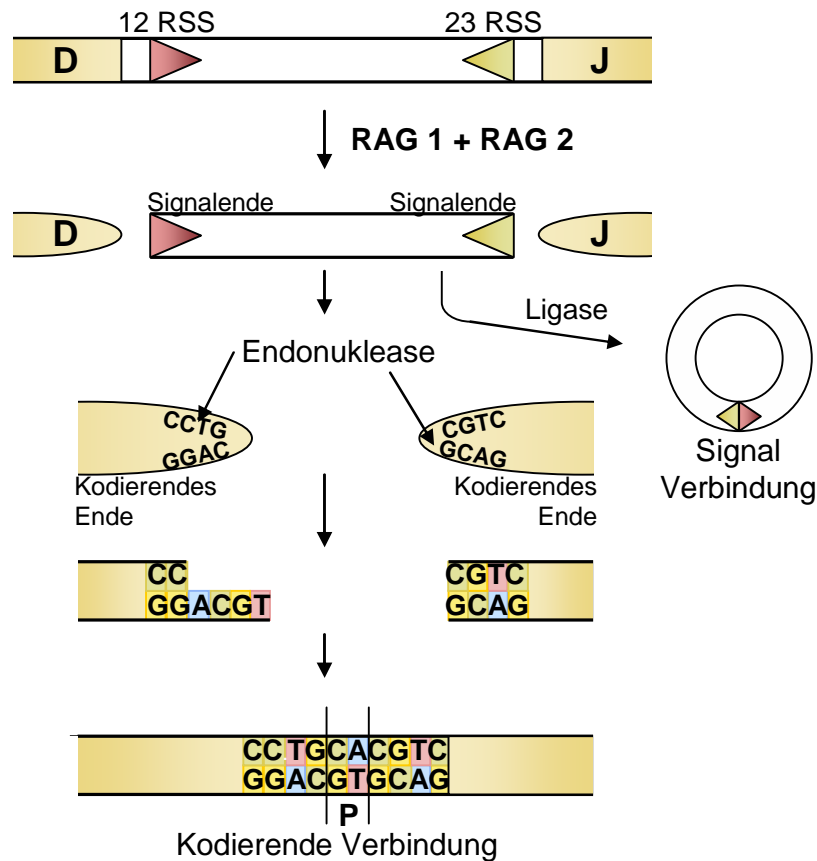


Abbildung 6: Molekularer Mechanismus der Palindromentstehung

12 RSS und 23 RSS: Rekombinationssignalsequenzen

D: Diversity Gensegment, J: Joining Gensegment

C: Cytosin, G: Guanin, A: Adenin, T: Thymin

RAG 1 + RAG 2: VDJ Rekombinase

1.2.2.2.3 Terminale Desoxynukleotidyltransferase und Exonuklease Aktivität

Die Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) ist ein Enzym, das beliebig sogenannte „N-Nukleotide“ (non-templated) in die Rekombinationsverbindungsstellen einbringen und die Vielfalt der Rearrangements damit erhöhen kann (34,37,38).

Über eine Exonuklease sind auch Sequenzveränderungen durch Nukleotidverluste an den V(D)J Verknüpfungsstellen möglich (22).

1.2.2.2.4 Somatische Hypermutation

Die genetische Vorlage der variablen Region eines Immunglobulins kann durch einen Prozess, der als Somatische Hypermutation bezeichnet wird auch in einer reifen B-Zelle noch verändert werden. Hierbei aquirieren Antigen-aktivierte B-Zellen diverse Punktmutationen in ihrer Immunglobulingensequenz. Dieser Prozess ist Enzym-

abhängig und bedarf der Aktivität der sogenannten „Aktivierungsinduzierten Cytidin-Deaminase“ (AID) (39). Da die Mutationsrate ca. 1Mio mal über der sporadischen Mutationsrate liegt, wird sie als „Hypermutation“ bezeichnet.

Vornehmlicher Zweck dieses Vorgangs, der mit Ausnahme sporadischer extrafollikulärer Ereignisse normalerweise immer in den Keimzentren sekundär lymphatischer Organe stattfindet, liegt in der möglichen Erhöhung der Affinität eines B-Zell-Rezeptors/Antikörpers gegenüber seinem spezifischen Antigen. Jedoch sind auch Affinitätsminderung oder Verlust der Funktionalität möglich.

Mutationen, die im Zuge der Somatischen Hypermutation in die Gensequenz eingefügt werden, geschehen nicht rein zufällig. Es wurden „hot spots“ beschrieben (39), Sequenzabschnitte, in denen Mutationen gehäuft auftreten. Bevorzugt finden sich Mutationen auch in den CDR Bereichen. Wie zuvor beschrieben stellen diese Regionen die eigentlichen Antigenbindungsstellen des Immunglobulins dar, so dass deren Veränderung mit hoher Wahrscheinlichkeit Auswirkungen auf die Affinität des Antikörpers zeigt.

All diese Mechanismen gewährleisten die hohe Diversität des Immunglobulin-repertoires.

1.2.2.3 Der kappa Lokus

Der Ort der genetischen Information für die leichten kappa Ketten liegt auf Chromosom 2 (2q11.2) (40). Auch außerhalb dieser Region wurden einige Sequenzen gefunden, die den V kappa (V_k) Gensegmenten zuzuordnen sind. Man bezeichnet diese als Orphons und hat sie größtenteils neben wenigen potentiell funktionstüchtigen Genen als Pseudogene identifiziert. Der kappa Lokus besteht aus insgesamt 76 V_k Genen (31 bis 35 werden den funktionellen Genen zugeordnet) bzw. Pseudogenen, gefolgt von fünf J kappa (J_k) Genen (41) und nur einem einzigen konstanten (C-) Segment. Die 76 V_k Gensegmente werden in Bezug zur J Region in zwei Genkassetten aufgeteilt, welche durch eine 800kb lange Sequenz voneinander getrennt sind und invertiert mit gegenläufiger Polarität zueinander liegen (42). Die J_k proximale Kasette besteht aus 40 V_k Genen/Pseudogenen, während sich die distale Kasette aus 36 V_k Genen/ Pseudogenen zusammensetzt.

Ein großer Teil der V_k Gensegmente liegt durch starke Homologien beider Kassetten in doppelter Ausführung vor. Aufgrund solcher Homologien erfolgt eine Einteilung der

Gensegmente in insgesamt sieben V_k Familien, wobei jede Familie Sequenzübereinstimmungen von mehr als 80% zeigt.

Eine weitere Einteilung des kappa Lokus erfolgt nach der räumlichen Anordnung der Gensegmente auf der Kassette. So gliedert sich die proximale Kassette in die Regionen B, Lp, Ap, Op und die distale Kassette in Od, Ad und Ld (43-45).

Nach erfolgreicher VJ Rekombination sind besonders die CDR Regionen wichtig für die spätere Antigenerkennung. Diese CDR liegen innerhalb der Framework Regionen (FR1-4) (Abb. 3), welche die Gerüstregion des Proteins kodieren. Bei der leichten Kette liegen die drei CDR zwischen den Basentriplets 24-34, 50-56, sowie 89-97. Die Verknüpfungsstelle der V und J Gensegmente liegt innerhalb der CDR3 Region.

1.2.2.4 Der Lokus der schweren Kette

Die Organisation des Genlokus für die schwere Kette auf Chromosom 14q32.33 (24) ähnelt der des kappa Lokus und besteht aus 123-129 aneinander gereihten V_H Segmenten (38-46 werden den funktionellen Genen zugeordnet), 27 D_H Segmenten (davon 23 funktionelle) und 9 J_H Segmenten (davon 6 funktionell) (46). Auch auf den Chromosomen 9, 15 und 16 sind einige V_H und J_H Segmente gefunden worden. Ein entscheidender Unterschied zum kappa Lokus besteht im Vorhandensein nicht nur eines C Segmentes, sondern einer Serie von aneinander gereihten C Abschnitten, von denen jedes einen Isotyp repräsentiert (22).

Sowohl die V als auch die D Segmente werden aufgrund von Homologien in jeweils sieben verschiedene Familien eingeteilt (47).

Die drei für die Antigenbindung zuständigen CDR Regionen der schweren Kette liegen zwischen den Basentriplets 27-38, 56-65 sowie 105-117, wobei die CDR1 und CDR2 durch das V_H Segment kodiert werden und die CDR3 die Fusionsstelle zwischen der V, D und J Region beinhaltet.

1.2.3 Toleranzmechanismen

Die wahllose Generierung der Antikörpervielfalt bringt die Gefahr der Entstehung eines gegen körpereigene Strukturen gerichteten B-Zell-Rezeptors mit sich. Für diese „autoreaktiven“ B-Zellen sind drei Hauptmechanismen bekannt, die der Aufrechterhaltung der körpereigenen Toleranz dienen.

Autoreaktive B-Zellen können in Apoptose gehen (48) und werden im Zuge der „klonalen Deletion“ eliminiert oder unterliegen der „klonalen Anergie“ (49), d.h. der

Unfähigkeit einer „adäquaten“ immunologischen Reaktion auf ein spezifisches Antigen. Der dritte und wahrscheinlich zentrale Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz nennt sich „Rezeptor Editing“ (50) und erlaubt autoreaktiven B-Zellen möglicherweise die Umgehung ihres programmierten Zelltodes. Dies wird durch einen erneuten (sekundären) V(D)J Rekombinationsvorgang weiter distal gelegener Gensegmente bewerkstelligt, was zur Generierung eines neuen Immunglobulins bzw. B-Zell-Rezeptors führt und damit die Ursache der Autoreaktivität eventuell beseitigt. Der Mechanismus des „Rezeptor Editing“ wurde v.a. beim kappa Leichtketten Locus beschrieben.

Ein ähnlicher Mechanismus, der ein „neues“ V_H Segment mit bereits rekombinierten VDJ-Rearrangements verknüpft und dabei das „alte“ V_H Segment deletiert, wurde als „ V_H Replacement“ beschrieben (51).

Rezeptor Editing findet in den unreifen B-Zellen des Knochenmarks statt. Kürzlich wurde eine sekundäre V(D)J Rekombination in reifen B Zellen sekundär lymphatischer Organe beschrieben und als „Rezeptor Revision“ bezeichnet (52, 53). Inwieweit dieser Mechanismus zur Toleranzentwicklung beiträgt oder möglicherweise sogar ein autoreaktives Repertoire bedingt, ist unklar.

1.2.4 Aktivierung von B-Zellen und klonale Expansion

Die alleinige Bindung eines Antigens reicht nicht immer aus, um eine B-Zelle zu aktivieren. Es gibt unterschiedliche Wege, die in einer Aktivierung resultieren:

1.2.4.1 T-Zell abhängige Aktivierung, Keimzentrumsreaktion

Naive B-Zellen gelangen über das Blut in die T-Zell reichen Regionen der sekundär lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz, Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe). Trifft eine B-Zelle auf ihr spezifisches Antigen wird dieses mittels B-Zell-Rezeptor gebunden und inklusive Rezeptor ins Zellinnere aufgenommen (rezeptorvermittelte Endozytose). Die Antigene werden hier durch Proteasen in einzelne Peptide aufgespalten und über ein MHCII Molekül an die Oberfläche der B-Zelle transportiert um sie dort zu präsentieren (54).

Für die Aktivierung der B-Zelle sind nun zwei weitere Signale notwendig. Zuerst muss eine antigenspezifische T-Helferzelle über ihren T-Zell-Rezeptor an den MHCII-Peptid-Komplex binden (54). Ein Signal über Bindung an das kostimulatorische Molekül CD40, welches ebenso auf der Oberfläche der B-Zellen exprimiert wird, ist

außerdem notwendig (55). Die T-Zelle aktiviert nun über die Ausschüttung bestimmter Zytokine (IL-4 und andere) die entsprechende B-Zelle und initiiert damit ihre Proliferation als Auftakt der sogenannten „Keimzentrumsreaktion“ in den sekundär lymphatischen Organen (55).

Keimzentren zeigen einen spezifischen Aufbau (54). Sie gliedern sich in eine dunkle Zone, die vornehmlich aus den aktivierten, sich teilenden B-Lymphozyten, den sogenannten Zentroblasten (56) besteht. In dieser dunklen Zone findet der Prozess der Somatischen Hypermutation statt (54,57-59).

Als Zentrozyten (56) durchlaufen die Zellen nun die sogenannte helle Zone und treffen hier auf follikulär dendritische Zellen, die Antigene präsentieren.

Haben die B-Zellen durch die zuvor stattgefundene Somatische Hypermutation das Gen für die Antigenbindungsstelle modifiziert und veränderte Bindungseigenschaften ihres BZR gegenüber ihrem spezifischen Antigen erfahren, können sie dieses möglicherweise besser binden. Nach erneuter Präsentation des Antigens an T-Helfer Zellen werden diese B-Zellen nun positiv selektioniert indem sie ein Überlebenssignal durch die T-Helfer Zellen erhalten (Affinitätsreifung) (56).

Zellen, deren Affinität sich verschlechtert hat, können sich in der Competition um die Bindung der T-Helferzellen nicht durchsetzen, erhalten damit kein Überlebenssignal und sterben.

Es kommt zu einer Ausdifferenzierung der positiv selektionierten B-Zellen zu Plasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen (56). In der umgebenden Mantelzone finden sich verdrängte naive B-Zellen, die nicht an der Reaktion teilnehmen.

1.2.4.2 T-Zell unabhängige Aktivierung

Einige Antigene (z.B. Lipopolysaccharide) vermögen ohne zusätzliche T-Zell-Hilfe B-Lymphozyten durch Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors (60) oder Bindung an „andersweitige“ Rezeptoren zu aktivieren. Diese Reaktion läuft wesentlich schneller als die T-Zell vermittelte ab, aber es scheint die Differenzierung zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen zu unterbleiben.

1.2.4.3 Klonale Expansion

Jede B-Zelle produziert ihren eigenen spezifischen Antikörper (61). Die Vervielfältigung einer solchen B-Zelle mit bestimmter Spezifität wird als Klon bezeichnet. Polyklonale Expansion bedeutet, dass viele Antikörper unterschiedlicher

Spezifität entstehen, was die Beteiligung vieler verschiedener B-Zellen voraussetzt. Sind nur wenige Klone, das heißt wenige B-Lymphozyten unterschiedlicher Spezifität beteiligt, spricht man von „oligoklonal“, während „monoklonal“ das Vorhandensein nur eines einzigen Klons beschreibt (62,19).

1.3 Die Rolle der B-Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen

Die hohe Diversität des Repertoires an B-Zellen mit unterschiedlichen Spezifitäten gewährleistet einerseits die Erkennung einer großen Anzahl von Fremdartigenen, birgt jedoch auch das potentielle Risiko einer Produktion von Antikörpern, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind (22).

Diese „Autoantikörper“ stellen eine der bekanntesten Möglichkeiten einer pathogenetischen Beteiligung von B-Lymphozyten an Autoimmunerkrankungen dar. Die produzierten Autoantikörper können über eine direkte Bindung an körpereigene Strukturen oder über die Ablagerung von Immunkomplexen zur Zerstörung des Gewebes führen. Der Nachweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen Autoantikörper und Organpathologie konnte jedoch nur bei wenigen Erkrankungen erbracht werden.

Desweiteren fungieren B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen und haben damit weitreichenden Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen (63) sowie konsekutiver Produktion von Zytokinen, die Entzündungsreaktionen beeinflussen können.

1.4 Ektope Keimzentren bei Autoimmunerkrankungen/Rheumatoider Arthritis

Im Zuge chronisch entzündlicher Prozesse kann es zu einer massiven Infiltration von mononukleären Zellen in das entzündete Gewebe kommen (64).

Diese Infiltrate sind zum Großteil diffus und unstrukturiert, im Falle einiger Autoimmunerkrankungen (u.a. Rheumatoide Arthritis (64), Sjögren Syndrom (65), Hashimoto Thyreoiditis (66) und Myasthenia gravis (67)) konnte jedoch gezeigt werden, dass sich auch Strukturen im entzündeten Gewebe formieren, die den Follikeln sekundär lymphatischer Organe ähneln.

Proinflammatorische Zytokine wie TNF α und insbesondere die Lymphotoxine alpha (68) und beta (69) sind an der Ausbildung dieses sogenannten ektopen/tertiären lymphatischen Gewebes essentiell beteiligt.

Die Frage, ob B-Zellen in ektopen Keimzentren eine Antigen-abhängige Differenzierung durchlaufen oder ob es sich bei den dort akkumulierenden B-Zellen

um unspezifisch eingewanderte B-Zellen handelt, war Mittelpunkt zahlreicher Forschungsprojekte in den letzten Jahren.

Dass solche Keimzentrums-ähnlichen Strukturen an einer Antigen-abhängigen B-Zell Expansion sowie dem Prozess einer Somatischen Hypermutation beteiligt sein können wurde erstmals an Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) gezeigt (64) und später durch weitere Arbeiten bestätigt.

Immunhistochemische Analysen der mononukleären Infiltrate im Synovialgewebe bei Rheumatoider Arthritis zeigten einen Halo von Plasmazellen um die in den Follikelstrukturen zentral gelegenen CD20⁺ B-Zellen (64) und ließen eine Differenzierung der B-Zellen innerhalb der ektopen lymphatischen Strukturen hin zu Plasmazellen vermuten (70). Identisch rearrangierte B-Zellen der Plasmazell-Population, die sich lediglich in der Mutationsfrequenz unterschieden, jedoch identische Mutationen als Ausgangsbasis eines genealogischen Stammbaums zeigten, unterstützten diese These (70). Eine klonale Verwandtschaft zwischen den CD20⁺ B-Zellen im Zentrum und den umgebenden Plasmazellen konnte aber bisher nicht gezeigt werden (70).

1.5 Fragestellungen

Die Rheumatoide Arthritis stellt eine Krankheit dar, die viele klinische und pathologische Charakteristika mit der JIA teilt (71,8).

Wenn es im Zuge der Rheumatoiden Arthritis zu nachweislichen Ansammlungen von Plasmazellen kommt und eine Ausdifferenzierung dieser innerhalb des Gelenkes angenommen wird, stellt sich die Frage, ob dies auch auf die Juvenile Idiopathische Arthritis übertragbar ist.

Finden sich also Plasmazellen im Gelenk bei Juveniler Idiopathischer Arthritis?

Und bestehen Hinweise auf eine Differenzierung von Vorläuferzellen zu Plasmazellen innerhalb des Gelenkes?

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der Proben

Die zu untersuchenden Zellen wurden aus der Synovialflüssigkeit zweier Patientinnen mit Juveniler Idiopathischer Arthritis gewonnen. Die Probenentnahme war im Zuge therapeutischer Gelenkspunktionen erfolgt. Eine Einverständnisklärung der Patientinnen bzw. deren Erziehungsberechtigten lag vor. Das experimentelle Vorhaben wurde von der lokalen Ethikkommission begutachtet.

| Patient | JIA Unterform | Ort der Probenentnahme | ANA Titer* | Aktuelle Therapie bei Probenentnahme | Krankheitsdauer (Jahre) |
|---------|----------------|------------------------|------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 1 | Oligoarthritis | Kniegelenk | 1:320 | Ibuprofen | 3,8 |
| 2 | Oligoarthritis | Kniegelenk | 1:160 | - | 8,0 |

Tabelle 2: Patientencharakteristik

ANA: Antinukleäre Antikörper, * Norm: < 1:80

2.2 Isolierung mononukleärer Zellen

Die Isolierung der gewünschten mononukleären Zellen erfolgte aus heparinierter Synovialflüssigkeit mittels flüssiger Dichtegradientenzentrifugation, wobei als Trennmedium Ficoll-Paque (FicoLiteH, Linaris, Wertheim-Bettingen) mit einer Dichte von 1,077 g/ml verwendet wurde.

Zuerst wurde die Spendersynovialflüssigkeit in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt und 1:2 mit isotonischem NaCl verdünnt.

10ml der Ficoll-Paque Solution wurden in ein weiteres 50ml Röhrchen überführt und hierauf vorsichtig das Synovialflüssigkeits-NaCl Gemisch geschichtet (Abb. 7).

Die nachfolgende Zentrifugation bei Raumtemperatur (25min bei 1500rpm, ohne Bremse) führte zur Ablagerung der mononukleären Zellen als milchig-trüber Saum zwischen Ficoll-Paque und zellfreiem Überstand (Abb. 7). Diese Schicht wurde vorsichtig mittels Glaspipette aufgenommen um sie anschließend in ein 50ml Röhrchen zu überführen und erneut mit NaCl zu verdünnen.

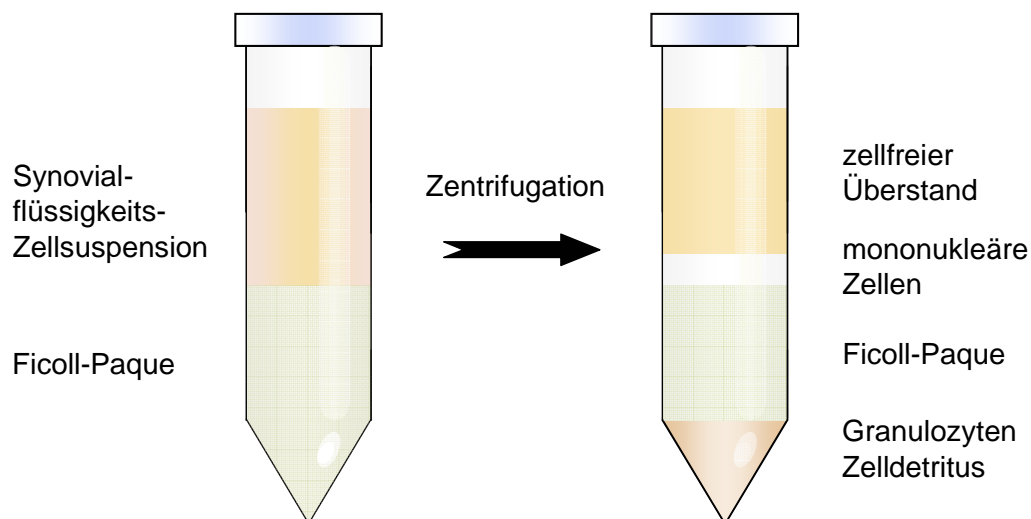


Abbildung 7: Ficoll Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung mononukleärer Zellen aus Synovialflüssigkeit

Bei der nachfolgenden Zentrifugation (10min bei 1500rpm, ohne Bremse) zur kompletten Entfernung der Ficoll-Paque Lösung setzten sich die gesuchten Zellen am Boden des Röhrchens als kleine weiße kreisrunde Struktur (Pellet) ab. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) plus 1% BSA (Rinder Serumalbumin) resuspendiert.

Nach Trypanblau-Färbung eines Teils der Zellsuspension konnte die Zellzahl sowie die Vitalität in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop bestimmt werden. Jetzt waren die Zellen weiteren Schritten der Sortierung zugänglich. Bis zu diesem Zeitpunkt jedoch erfolgte die Aufbewahrung in einer Einfrierlösung (50% RPMI Medium, 30% Fetales Kälberserum (FCS), 20% Dimethylsulfoxid (DMSO)) in flüssigem Stickstoff.

2.3 Charakterisierung und Sortierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie

2.3.1 Allgemeines

Zur weiteren Charakterisierung und Sortierung der zuvor gewonnenen mononukleären Zellen wurde die Durchflusszytometrie angewandt.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Erfassung charakteristischer optischer Signale von Zellen. Die Zellen passieren hierbei hintereinander eine schmale Messkammer, was die Analyse auf Einzelzellniveau ermöglicht und treffen auf einen Laser (Abb. 8). Dabei entsteht ein für den jeweiligen Zelltyp charakteristisches Streulicht. Das bei Auftreffen des Laserstrahls in unterschiedliche Winkel gestreute

Licht wird von Detektoren erfasst, so dass eine Auftrennung der Zellen nach Größe und Granulierung erfolgt. Neben Streulichtmessung erlaubt das Durchflusszytometer ebenso die Messung eines Fluoreszenzlichtes und ermöglicht damit die Untersuchung der eingespeisten Zellen auf eine Vielzahl von Merkmalen. Hierzu werden die Zellen zuvor mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern für das zu untersuchende Merkmal markiert. Die von den Fluorochromen ausgesandten Lichtimpulse einer für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge treffen auf vorher zugeordnete Detektoren (Abb. 8). Es erfolgt eine Umwandlung in Spannungsimpulse, welche eine graphische Darstellung am Computer ermöglichen (Abb. 9).

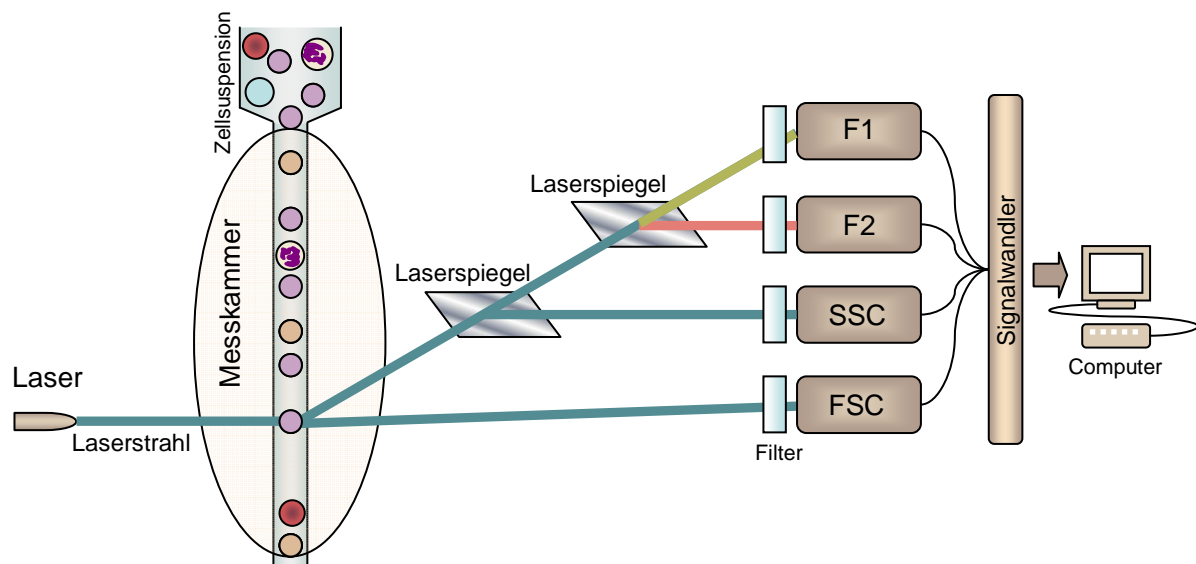


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie

F1: Fluoreszenzsignal-Detektor 1

F2: Fluoreszenzsignal-Detektor 2

SSC: Side Scatter (Seitwärtsstreulicht) zur Erfassung der Granularität einer Zelle

FSC: Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht) zur Erfassung der Zellgröße

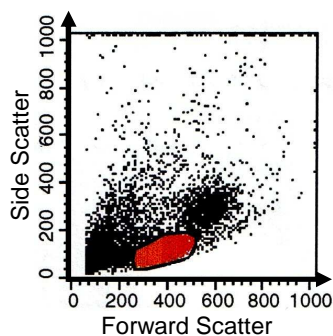


Abbildung 9: Auswertung am Computer - Dotplot mit Auftragung der einzelnen Zellen nach Größe (Forward Scatter) und Granularität (Side Scatter)

Markierung (rotes Gate): Lympozytenfraktion

2.3.2 Verwendete Antikörper und Geräte

Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse mussten die Zellen zuerst mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern markiert werden.

| Bindungsstelle | Fluorochrom | Klon | Isotyp | Verdünnung | Hersteller |
|----------------|-------------|---------|---------------|------------|----------------|
| CD19 | TC | SJ25-C1 | Maus IgG1, mk | 1:50 | Caltag |
| CD27 | FITC | M-T271 | Maus IgG1, mk | 1 :50 | BD Biosciences |
| CD38 | PE | HIT2 | Maus IgG1, mk | 1 :50 | Caltag |

Tabelle 3: verwendete Antikörper

TC: Tri-Color (= PE-Cyan5), FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, PE: Phycoerythrin
mk: monoklonal

Hierzu wurde ein monoklonaler anti-human CD19 Antikörper als B-Lymphozyten Marker verwendet. Zur Differenzierung der B-Zell Subpopulationen dienten Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD27 (Gedächtniszellmarker) sowie gegen CD38 (zur Identifikation von Plasmazellen).

Die zur Aufbewahrung eingefrorenen Zellen wurden in 5ml 4°C kaltem RPMI Medium aufgetaut, mit FACS Puffer (PBS + 1% BSA) gewaschen und 2 Minuten bei 5°C mit 1500rpm zentrifugiert.

Um die Aggregation oder Aktivierung der Zellen zu verhindern wurden die nachfolgenden Schritte alle auf Eis durchgeführt.

Das nach der Zentrifugation erhaltene Zell-Pellet wurde wieder in FACS Puffer resuspendiert und 1:10 mit humaner IgG-Lösung (Flebogamma[®], 50 mg/ml, Grifols, Langen) inkubiert. Das verwendete IgG sollte über eine Blockade der Fc-Membranrezeptoren unspezifische Bindungen der Antikörper verhindern.

Die Zellsuspension wurde schließlich in Eppendorf-Tubes pipettiert, welche zuvor mit den oben aufgeführten Antikörpern befüllt worden waren. Es erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei 5°C, in deren Anschluss die Zellen zur Entfernung ungebundener Antikörper nochmals gewaschen und zentrifugiert (5min, 1500 x g) wurden.

Danach wurden 500µl FACS Puffer hinzugegeben und die Zellen über einen Filter in ein FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) pipettiert.

Als Durchflusszytometer kam ein FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) zur Anwendung. Die hiermit ermittelten Daten wurden mit der Software Cellquest (Version 3.1, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

Mittels eines Durchflusszytometers mit Zellsortiereinrichtung (FACSVantage, Becton Dickinson, Heidelberg) konnten Zellen mit spezifischem Streulicht- und Fluoreszenzmuster einzeln selektiert werden. Hierzu wurde im Gerät der Probenstrahl in einzelne Tröpfchen mit spezifischer elektrischer Ladung aufgespalten und diese, -abgelenkt über ein elektrisches Feld, in die einzelnen Löcher einer 96-Loch-Platte gebracht.

2.4 Analyse der Immunglobulin-Genexpression durchflusszytometrisch separierter Einzelzellen

2.4.1 Zellyse und Reverse Transkription

Vor der Einzelzellsortierung waren die 96-Loch-Platten mit jeweils 10µl einer Lyselösung befüllt worden (Tab. 4). Dies war notwendig um die in den B-Lymphozyten enthaltene messenger RNA (mRNA) nun durch Zellyse freizusetzen.

| Komponente | Volumen für 10µl Ansatz | Endkonzentration |
|----------------------------------|-------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 4,85 | |
| 5 x First Strand Buffer | 2 | 1X |
| Igepal CA-630 | 1 | 1% |
| RNAsin RNase Inhibitor 40U/µl | 0,25 | 1U/µl |
| Desoxynukleotid Mix (dNTPs) 10mM | 0,8 | 0,8mM |
| Oligo dT 1 µg/µl | 0,1 | 0,01µg/µl |
| D'TT 0,1M | 1 | 0,01M |

Tabelle 4: Zusammensetzung der Lyselösung

Die mit Lymphozyten und Lyselösung befüllten Lochplatten wurden bei 5°C für 2 Minuten bei 780 x g zentrifugiert und anschließend für 1 Minute bei 65°C sowie für 2 Minuten bei 20°C inkubiert. Hierbei bildeten die Poly-A Schwänze der messenger RNA (mRNA) Basenpaarungen mit Oligo-Desoxythymidin (Oligo dT) aus, was eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende reverse Transkription war.

Um im weiteren Versuchsablauf eine stabilere Ausgangsbasis als mRNA sowie insbesondere die Möglichkeit zur Amplifikation der genetischen Information mittels DNA-abhängigen Enzymen zu erhalten, wurde eine Reverse Transkription (RT) angeschlossen.

Ausgehend vom Oligo-dT Primer kann durch das Enzym Reverse Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Die mRNA diente hier als Matrize für die weitere Kettenverlängerung der cDNA unter Verwendung von Desoxyribonukleotid-triphosphaten (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

Der entsprechend benötigte Mastermix für die Reverse Transkription wurde zu je 3µl in die einzelnen Löcher der Lochplatten pipettiert, anschließend nochmals zentrifugiert und mit je 25µl Mineralöl überschichtet (Tab. 5). Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 50 Minuten bei 42°C, dann für 10 Minuten bei 65°C.

| Komponente | Volumen für 3µl Ansatz | Endkonzentration |
|--------------------------------|------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 2µl | |
| 5X First Strand Buffer | 0,6µl | 1X |
| RNAasin RNase Inhibitor 40U/µl | 0,05µl | 0,66U/µl |
| DTT 0,1M | 0,3µl | 0,01M |
| Superscript II RNaseH RT | 0,05µl | 20U/µl |

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermixes für die Reverse Transkription

Um die zuvor als Matrize dienende mRNA vollends aufzulösen wurde ein Ribonuklease (RNase) -Mix angesetzt und hiervon jeweils 2µl pro Loch hinzupipettiert (Tab. 6).

| Komponente | Volumen für 2µl Ansatz | Endkonzentration |
|--------------------------|------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 1,384µl | |
| 5X First Strand Buffer | 0,4µl | 1X |
| DTT 0,1M | 0,2µl | 10mM |
| Ribonuclease H 1000 U/µl | 0,016µl | 8U/µl |

Tabelle 6: Zusammensetzung des RNase-Mixes

Es erfolgte eine abermalige Zentrifugation bei 5°C und 780 x g, dieses Mal für 7 Minuten. Während der nachfolgenden Inkubation bei 37°C für 20 Minuten und 65°C für 10 Minuten fand der RNA Verdau statt.

Alle Arbeitsschritte wurden auch hier auf Eis durchgeführt und die erhaltene cDNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.2 Polymerase Kettenreaktion

Zur raschen Vervielfältigung und damit besseren Nachweisbarkeit bzw. Analyse definierter Abschnitte eines DNA Stranges nutzt man die Methode der Polymerasekettenreaktion. Grundprinzip ist das Kopieren einer DNA Sequenz durch eine DNA Polymerase. Als Startpfeiler dieser Polymerase dienen kurze künstlich synthetisierte einzelsträngige Nukleotidsequenzen (Primer), welche sich komplementär an die Enden des gesuchten Abschnittes anlagern und diesen somit eingrenzen.

Unter Zugabe von Desoxynukleotidtriphosphaten kann die Polymerase nun, - ausgehend von den Primersequenzen, den Matrizenstrang und damit die gesuchte Sequenz komplementär ergänzen. In mehreren Zyklen ergibt sich somit eine exponentielle Vermehrung des zu analysierenden Genabschnittes (Abb. 10).

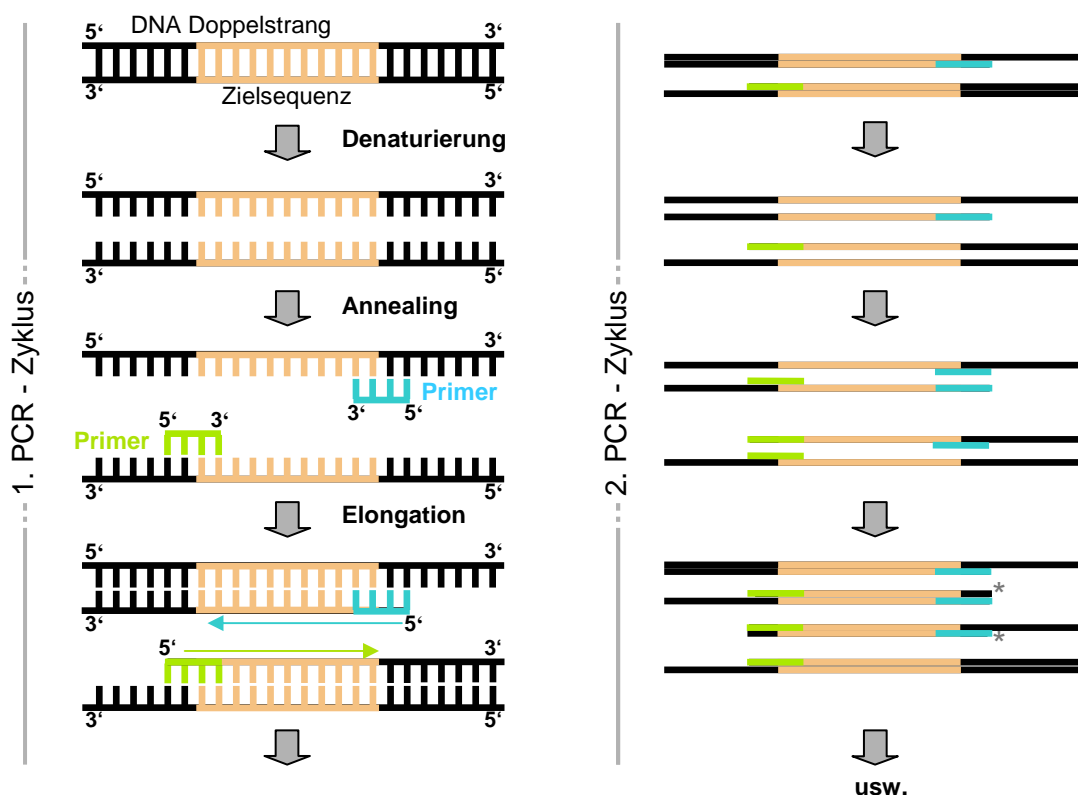


Abbildung 10: PCR Methode (extern) – Exponentielle DNA- Vermehrung

* Einzelstrang der Sequenz, die in den weiteren Schritten exponentiell vermehrt wird

Mittels Einzelzell-PCR lässt sich die Genexpression individueller Zellen untersuchen, so auch der aus der Synovialflüssigkeit isolierten Lymphozyten.

2.4.2.1 Amplifikation der Immunglobulin VJ kappa Leichtkettenrearrangements

Zur Amplifikation des rearrangierten Leichtketten-Immunglobulins wurde eine zweischrittige PCR gewählt. In der ersten Runde (externe PCR) diente die zuvor gewonnene cDNA als Matrize.

Der für die jeweilige kappa-PCR erforderliche Mastermix wurde pipettiert und zu jeweils 18µl in die Löcher einer 96-Loch-Platte überführt (Tab. 7-10).

Für die Analyse der Gensegmente der Familien Vkappa1 und Vkappa2 wurden Primer verwendet, die die Gensegmente beider Familien erkennen. Selbiges traf für die Familien Vkappa6 und 7 sowie Vkappa4 und Vkappa5 zu (Tab. 12). Als reverse Primer kamen 2 Primer (Jkappa2 und Jkappa5) zum Einsatz, welche die Bindung an alle Jkappa Gensegmente ermöglichten (Tab. 7-10,12).

Zum Mastermix wurden je 3µl der Einzelzell-spezifischen cDNA pipettiert. Zur Kontrolle einer etwaigen Kontamination des Mastermixes enthielten die letzten beiden Löcher der Lochplatten stets nur PCR-Mix, sowie die dritt- und viertletzten Löcher zum Beweis der Tauglichkeit des Mixes die aus einer Tonsille gewonnene cDNA.

Der Reaktionsansatz wurde mit 25µl Mineralöl überschichtet um ein Verdampfen des Inhaltes während der folgenden Inkubationsschritte zu vermeiden. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 780 x g. Zur Inkubation der Lochplatten wurde eine PCR-Maschine (Mastercycler bzw. Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit einem standardisiertem Programm eingesetzt.

Nach dem Durchlaufen der externen PCR schloss sich als zweite Stufe die „nested“ PCR an. Als Matrize diente das in der ersten Runde entstandene PCR-Produkt.

Es wurden 18µl Mastermix in einer 96-Loch-Platte vorgelegt, wobei nun „nested“ Primer zur Anwendung kamen (Tab. 7-10,12). Diese binden komplementär an Sequenzen, die innerhalb der vom ersten Primerpaar begrenzten Sequenz liegen oder zumindest weiter in die zu amplifizierende Sequenz eingerückt sind. Dem Mastermix wurden je 5µl des externen PCR Produktes hinzugefügt und die Reaktionsansätze mit 25µl Mineralöl überschichtet.

| Komponente | Volumen für 18,75µl Ansatz | Endkonzentration |
|--|----------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 11,15µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 4,0µl | 0,92X |
| MgCl ₂ 25mM | 2,8µl | 3,21mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,4µl | 0,18mM |
| 5' Forward Primer Vk1+2 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk2 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk5 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,1µl | 0,023U/µl |

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermixes für die externe und nested PCR Vk1 und Vk2

| Komponente | Volumen für 18,75µl Ansatz | Endkonzentration |
|--|----------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 11,95µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 4,0µl | 0,92X |
| MgCl ₂ 25mM | 2,0µl | 2,29mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,4µl | 0,18mM |
| 5' Forward Primer Vk3 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk2 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk5 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,1µl | 0,023U/µl |

Tabelle 8: Zusammensetzung des Mastermixes für die externe und nested PCR Vk 3

| Komponente | Volumen für 18,75µl Ansatz | Endkonzentration |
|---|----------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 12,35µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 4,0µl | 0,92X |
| MgCl ₂ 25mM | 1,6µl | 1,84mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,4µl | 0,18mM |
| 5' Forward Primer Vk4+5 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk2 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk5 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,1µl | 0,023U/µl |

Tabelle 9: Zusammensetzung des Mastermixes für die externe und nested PCR Vk 4 und Vk 5

| Komponente | Volumen für 18,75µl Ansatz | Endkonzentration |
|---|----------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 12,75µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 4,0µl | 0,92X |
| MgCl ₂ 25mM | 1,2µl | 1,38mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,4µl | 0,18mM |
| 5' Forward Primer Vk6+7 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk2 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| 3' Reverse Primer Jk5 100mM | 0,1µl | 0,46mM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,1µl | 0,023U/µl |

Tabelle 10: Zusammensetzung des Mastermixes für die externe und nested PCR Vk6 und Vk7

Das PCR-Programm für die nested und externe PCR unterschied sich hinsichtlich der Annealing Temperatur (Tab. 11). Insgesamt wurden die Schritte 1 bis 3 in 42 Zyklen durchlaufen und schlossen mit dem letzten und damit 43. Zyklus ab.

Die cDNA war jetzt exponentiell vermehrt und den weiteren Schritten der Genexpressionsanalyse des kappa-Leichtkettenrearrangements zugänglich.

| PCR - Schritte | Temperatur | Dauer |
|---------------------------------|---|------------|
| 1. Denaturierung | 94°C | 1min |
| 2. Annealing | 56°C (externe PCR) 65°C (nested PCR) | 30sek |
| 3. Elongation | 72°C | 1min 30sek |
| 42 mal Schritt 1 bis 3, dann | | |
| Letzter Zyklus | | |
| Denaturierung | 94°C | 1min |
| Annealing | 56°C (externe PCR) 65°C (nested PCR) | 30sek |
| Elongation | 72°C | 5min |

Tabelle 11: Reaktionsschritte der externen und nested kappa-PCR

| Primer | | Primersequenz |
|--------|------------|--|
| extern | Vkappa 1+2 | 5` - GCTCAGCTCCTGGGGCT - 3` |
| | Vkappa 3 | 5` - GGAA(AG)CCCCAGC(AGT)CAGC - 3` |
| | Vkappa 4+5 | 5` - CT(CG)TT(GC)CT(CT)TGGATCTCTG - 3` |
| | Vkappa 6+7 | 5` - CT(GC)CTGCTCTGGG(CT)TCC - 3` |
| | Jkappa 2 | 5` - ACGTTTGATCTCCAGCTTG - 3` |
| | Jkappa 5 | 5` - CTTACGTTTAATCTCCAGTC - 3` |
| nested | Vkappa 1 | 5` - CATCCAG(AT)TGACCCAGTCTCC - 3` |
| | Vkappa 2 | 5` - TCCAGTGGGGATATTGTGATGAC - 3` |
| | Vkappa 3 | 5` - GTCT(GT)TGTCTCCAGGGGAAAGAG - 3` |
| | Vkappa 4 | 5` - GACATCGTGATGACCCAGTCTC - 3` |
| | Vkappa 5 | 5` - GGGCAGAAACGACACTCACGCA - 3` |
| | Vkappa 6 | 5` - TCCAGGGGTGAAATTGTG(AC)TGAC - 3` |
| | Vkappa 7 | 5` - GCTGCAATGGGGACATTGTGCT - 3` |
| | Jkappa 2 | 5` - CAGCTTGGTCCCCTGGCCAAA - 3` |
| | Jkappa 5 | 5` - CCAGTCGTGTCCCTTGGCCG - 3` |

Tabelle 12: Nukleotidsequenzen der PCR Primer für die leichte Kette

Die eingeklammerten Nukleotide stellen gemischte Basen an dieser Position dar.

2.4.2.2 Amplifikation der Immunglobulin VDJ Rearrangements der schweren Kette

Zur Amplifikation des kodierenden Gens für die schwere Kette (Heavy Chain) des Immunglobulins kam auch hier eine zweischrittige PCR zum Einsatz, die dem Prinzip der vorher beschriebenen Leichtketten-PCR gleicht.

Der benötigte Mastermix wurde in 96-Loch-Platten zu 23,5µl je Loch vorgelegt (Tab.13). Für die Analyse der Gensegmente der Familien VH1 und VH2 konnten die notwendigen forward Primer zusammen in einem Reaktionsansatz verwendet werden, ebenso bei VH3 und VH4 (Tab. 13,14). Auf die Anwendung von spezifischen Primern für die Familien VH5 bis VH7 wurde verzichtet, da die eingesetzten Primer zum Teil unspezifisch auch in anderen VH-Familien binden und somit Gensegmente aus anderen Familien mitamplifizieren konnten.

Je 1,5µl Einzellzell-spezifische cDNA wurden aus den Löchern der 96-Loch-Platten als Matritze dem Mix zugefügt und der Ansatz für 5 Minuten bei 3000rpm abzentrifugiert. Nach Überschichtung mit Mineralöl erfolgte die Inkubation im Mastercycler.

| Komponente | Volumen für 23,5µl Ansatz | Endkonzentration |
|---|---------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 15,525µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 5,0µl | 1X |
| MgCl ₂ 25mM | 2,0µl | 2mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,5µl | 0,2mM |
| 5' Forward Primer VH1 100µM | 0,1µl | 0,4µM |
| 5' Forward Primer VH2 100µM | 0,125µl | 0,5µM |
| 3' Reverse Primer JH 100µM | 0,125µl | 0,5µM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,125µl | 0,025U/µl |

Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermixes für die externe PCR der schweren Kette (VH1 und VH2)

| Komponente | Volumen für 23,5µl Ansatz | Endkonzentration |
|---|---------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 16,025µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 5,0µl | 1X |
| MgCl ₂ 25mM | 1,5µl | 1,5mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,5µl | 0,2mM |
| 5' Forward Primer VH3 100µM | 0,1µl | 0,4µM |
| 5' Forward Primer VH4 100µM | 0,125µl | 0,5µM |
| 3' Reverse Primer JH 100µM | 0,125µl | 0,5µM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,125µl | 0,025U/µl |

Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermixes für die externe PCR der schweren Kette (VH3 und VH4)

Im zweiten PCR Schritt (nested PCR) wurden vier familienspezifische Ansätze (VH1 bis VH4) mit jeweils einem 5'-Primer sowie einem Gemisch aus sechs nested JH-Primern angesetzt und zu je 22µl in 96-Loch-Platten vorgelegt (Tab. 15-17,19). Anschließend wurden je 3µl des externen PCR Produktes hinzu gegeben, dann die Reaktionsansätze für 5 Minuten bei 3000rpm abzentrifugiert und schließlich in einer PCR-Maschine inkubiert (Tab. 18).

| Komponente | Volumen für 22µl Ansatz | Endkonzentration |
|---|-------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 14,725µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 5,0µl | 1X |
| MgCl ₂ 25mM | 1,5µl | 1,5mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,5µl | 0,2mM |
| 5' Forward Primer VH1 oder VH3 100µM | 0,05µl | 0,2µM |
| 3' Reverse Primer JH1245 100µM | 0,05µl | 0,2µM |
| 3' Reverse Primer JH36 100µM | 0,05µl | 0,2µM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,125µl | 0,025U/µl |

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die nested PCR der schweren Kette (VH1 und VH3)

| Komponente | Volumen für 22µl Ansatz | Endkonzentration |
|--|-------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 14,575µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 5,0µl | 1X |
| MgCl ₂ 25mM | 1,5µl | 1,5mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,5µl | 0,2mM |
| 5' Forward Primer VH2 100µM | 0,1µl | 0,4µM |
| 3' Reverse Primer JH1245 100µM | 0,1µl | 0,4µM |
| 3' Reverse Primer JH36 100µM | 0,1µl | 0,4µM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,125µl | 0,025U/µl |

Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermixes für die nested PCR der schweren Kette (VH2)

| Komponente | Volumen für 22µl Ansatz | Endkonzentration |
|--|-------------------------|------------------|
| Molecular Grade Water | 14,65µl | |
| Thermophilic DNA 5X Buffer | 5,0µl | 1X |
| MgCl ₂ 25mM | 1,5µl | 1,5mM |
| Desoxynukleotid Mix (dNTP) 10mM | 0,5µl | 0,2mM |
| 5' Forward Primer VH1 oder VH3 100µM | 0,075µl | 0,3µM |
| 3' Reverse Primer JH1245 100µM | 0,075µl | 0,3µM |
| 3' Reverse Primer JH36 100µM | 0,075µl | 0,3µM |
| Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A 5U/µl | 0,125µl | 0,025U/µl |

Tabelle 17: Zusammensetzung des Mastermixes für die nested PCR der schweren Kette (VH4)

| PCR - Schritte | Temperatur | Dauer |
|----------------------------------|---|-------|
| 1. Denaturierung | 95°C | 1min |
| 2. Annealing | 56,5°C (externe PCR) 55,5°C (nested PCR VH1 o. VH3) 60,5°C (nested PCR VH2 o. VH4)) | 1min |
| 3. Elongation | 72°C | 1min |
| 30 mal Schritte 1 bis 3, dann | | |
| Letzter Zyklus | | |
| Denaturierung | 95°C | 1min |
| Annealing | 56,5°C (externe PCR) 55,5°C (nested PCR VH1 o. VH3) 60,5°C (nested PCR VH2 o. VH4) | 1min |
| Elongation | 72°C | 5min |

Tabelle 18: Reaktionsschritte der externen und nested PCR der schweren Kette

| | Primer | Primersequenz |
|--------|-------------|---|
| extern | VHeavy 1 | 5` - CAGCT(GT)GT(AG)CAGTCTGG - 3` |
| | VHeavy 2 | 5` - CAG(AG)TCACCTTGAAGGA - 3` |
| | VHeavy 3 | 5` - GTGCAGCTG(GT)TGGAG - 3` |
| | VHeavy 4 | 5` - CAG(GC)AGT(GC)GGGC(CGT)CA - 3` |
| | JHeavy | 5` - CTGA(AG)GAGAC(AG)GTGAC - 3` |
| nested | VHeavy 1 | 5` - GTCTGG(AG)(GC)CTGAGGTGAAGAAG - 3` |
| | VHeavy 2 | 5` - CTGGTCCT(AG)(CT)GCTGGTGAAACC - 3` |
| | VHeavy 3 | 5` - CCCT(GT)A(AG)ACTCTCCTGT(AG)CAGC - 3` |
| | VHeavy 4 | 5` - GGC(CGT)CAGGACTG(GT)TGAAGCCTT - 3` |
| | JHeavy 1245 | 5` - TGACCAGGGT(GT)CC(AC)(CT)GGCCC - 3` |
| | JHeavy 36 | 5` - GTGACC(AG)T(GT)GTCCCTTGGCCC - 3` |

Tabelle 19: Nukleotidsequenzen der PCR Primer für die schwere Kette

Die eingeklammerten Nukleotide stellen gemischte Basen an dieser Position dar.

2.4.3 Aufreinigung, Sequenzierung und Analyse der PCR Produkte

2.4.3.1 Gelelektrophorese

Um das erhaltene PCR Produkt, d.h. die Leichtketten- sowie die Schwerekettenrearrangements in der Nukleotidsequenz entschlüsseln zu können, mussten die entsprechenden DNA Fragmente von den übrigen Bestandteilen der PCR Reaktion getrennt werden. Dies geschah mittels einer Agarose-Gelelektrophorese.

Hierbei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle durch eine vernetzte Gelmatrix entlang eines elektrischen Feldes, wobei die kleineren Moleküle durch schnellere Passage der Poren pro Zeiteinheit weiter wandern und somit eine Aufteilung der DNA Fragmente nach Größe erreicht wird.

Es kam ein 1,5%iges (1,5g Agarose in 0,5% TBE Puffer), mit Ethidiumbromid (ETBR) gefärbtes Agarosegel zum Einsatz. Ethidiumbromid interkaliert dabei mit Nukleinsäuren, so dass die aufgetrennten DNA-Stücke mittels UV-Licht als Banden sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden konnten.

2.4.3.2 Extraktion der DNA aus dem Agarosegel und Aufreinigung

Zur Entfernung des Agarosegels erfolgte eine Aufreinigung der DNA mittels QIAquick Gel Extractions Kit (Qiagen, Hilden). Die ausgeschnittenen Gelblöcke wurden in 300µl eines Puffers (QG Puffer) überführt und für 10 Minuten in einem Heizblock bei 50°C unter regelmäßigem Vortexen inkubiert. Nach Zugabe von 100µl Isopropanol (100%) wurde die Lösung auf eine Gelextraktionssäule (QIAquick spin column) aufgetragen und für 1 Minute bei 8000rpm zentrifugiert.

Die Nukleinsäurestränge binden unter Zufuhr der Puffer an eine Silika-Gel-Membran in der Säule. In zwei weiteren Waschungen (mit QG und PE Puffer) und nach weiterem gründlichem Abzentrifugieren konnte die DNA mittels 50µl eines DNA stabilisierenden Puffers (EB Puffer, 10mM Tris-Cl; pH8,5) aus der Gelsäule unter Zentrifugation herausgelöst werden.

Danach wurde die aufgereinigte DNA bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und im Kühlfach bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.3.3 Sequenzierung der PCR Produkte

Mittels Dideoxysequenzierung nach Sanger durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) konnten die Nukleotidsequenzen der gewonnenen DNA ermittelt werden. Grundprinzip der Sanger-Methode ist die komplementäre Verlängerung eines DNA Matrizenstranges durch eine DNA Polymerase unter Verwendung eines Primers als Synthesestartpunkt. In vier Ansätzen werden zur DNA jeweils alle vier dNTPs hinzugegeben, wobei jedem Ansatz jeweils ein bestimmtes Dideoxytriphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) zugefügt wird. Diese ddNTP unterbinden ein Anknüpfen eines weiteren Nukleotides an den synthetisierten Strang und führen damit zu einem Kettenabbruch. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Durch Verwendung verschieden fluoreszenzmarkierter ddNTPs und Kapillarelektrophorese der Kettenabbruchprodukte kann die Basensequenz aus der Abfolge der entstehenden Farbsignale ermittelt werden.

2.4.3.4 Sequenzanalyse des VJ sowie VDJ Rearrangements von Einzelzellen

Zur Identifizierung der V, (D) und J Gensegmente wurden die Sequenzen mit den Keimbahnsequenzen des V base Verzeichnisses (Tomlinson et al.) verglichen. Hierzu kamen das Softwareprogramm Sequencher (V. 4.6, Gene codes, Ann Arbor, MI, USA) für die Analyse der kappa Leichtketten Sequenzen, sowie IMGT/V-QUEST (Version 3.2.7, Lefranc, Montpellier, France) für die Analyse der Sequenzen der schweren Kette zur Anwendung. Bestimmt wurden die Länge der CDR3-Regionen, die Exonuklease Aktivität und die Anzahl der N- und P-Nukleotide. Veränderungen der Sequenz im Vergleich zur Keimbahnsequenz galten als Mutation.

2.5 Statistische Methoden

Der Chi-Square Test diente der Datenauswertung. Werte mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$ galten als statistisch signifikant.

2.6 Verwendete Materialien und Gerätschaften

| | |
|--|---|
| Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva Feinchemie, Heidelberg, Deutschland |
| Ethanol | Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande |
| Ethidiumbromid (ETBR) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ethylendiamintetraacetessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Gibco/invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropranolol | Apotheke Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, Deutschland |
| Isotonische Kochsalzlösung | Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Promega, Mannheim, Deutschland |
| Mineral Öl | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland |
| Molecular Grade Water | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| peqGOLD Universal Agarose | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland |
| RPMI Kulturmedium + L-Glutamine | Gibco/invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Taq Polymerase in Storage Buffer A | Promega, Mannheim, Deutschland |
| TBE-Puffer (0,45 M Trissäure; 0,1 M EDTA) | Selbsterstellung |
| Tris Base | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Verbrauchsmaterialien | |
| Falcon Röhrchen 15ml und 50ml | Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| PCR-Platten 96-Loch | Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| Reaktionsgefäße 1,5ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Geräte | |
| Lichtmikroskop | Hund, Wetzlar, Deutschland |
| Mastercycler Gradient PCR Maschine | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mastercycler PCR Maschine | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mastercycler Personal PCR Maschine | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| UV-Crosslinker UV Stratalinker 1880 | Stratagene, La Jolla, USA |

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtüberblick über die gewonnenen Sequenzdaten (Tab. 20)

Mittels durchflusszytometrischer Einzelzellsortierung wurden individuelle B-Zellen aus der Synovialflüssigkeit der beiden JIA Patientinnen sortiert. Dabei wurden entsprechend den Oberflächenmarkern drei B-Zell-Populationen unterschieden:

CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} („Naive B-Zellen“), CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ („Plasmablasten“) und CD19⁺CD27⁺CD38⁻ („Gedächtnis B-Zellen“).

Pro Population wurden je Patient 96 Zellen sortiert und aus diesen das V(D)J Genrearrangement der leichten kappa Kette sowie der schweren Kette amplifiziert und sequenziert.

Von den sortierten B-Lymphozyten ließen sich für insgesamt 219 B-Zellen die V(D)J Genrearrangements der leichten kappa und/oder schweren Kette bestimmen (Tab. 21).

| Population | Anzahl sortierter Zellen | Anzahl der Zellen mit ermitteltem Genrearrangement (kappa und/oder schwere Kette) | Anzahl der erhaltenen Sequenzen | |
|---|--------------------------|---|---------------------------------|---------------|
| | | | leichte Kette (kappa) | schwere Kette |
| CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD38 ^{+/-} | 192 | 71 | 59 | 17 |
| CD19 ⁺ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ | 192 | 86 | 42 | 74 |
| CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁻ | 192 | 62 | 56 | 10 |
| Gesamt | 576 | 219 | 157 | 101 |

Tabelle 21: Überblick über die Anzahl der gewonnenen Zellen und Sequenzen

Dargestellt ist die Anzahl der insgesamt sortierten Zellen (aller Patienten) sowie die Zahl der Zellen, deren Genrearrangements ermittelt werden konnten und die Anzahl der aus diesen Zellen erhaltenen Gensequenzen.

Bei 39 B-Zellen war am Ende sowohl das V(D)J Genrearrangement der leichten kappa Kette als auch der schweren Kette bekannt, bei 180 B-Zellen jeweils nur eines der beiden Rearrangements (leichte kappa Kette oder schwere Kette).

3.2 Mutationsanalyse

3.2.1 Mutationen der kappa Leichtkette

3.2.1.1 Mutationsraten innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen

Für die Analyse der Mutationshäufigkeit wurden die Sequenzen beider Patientinnen zusammengefasst. 124 der detektierten 157 Leichtkettensequenzen (79,0%) enthielten Punktmutationen im Vergleich zu den Nukleotidabfolgen der Keimbahn. Damit ergab sich eine Gesamtanzahl von 899 Mutationen für die leichte Kette.

72,9% aller Sequenzen der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ hatten ≥ 1 Mutation. Bei den $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ lag der Anteil der Sequenzen mit ≥ 1 Mutation bei 83,3% und in der $CD19^+CD27^+CD38^-$ bei 82,1%.

Bei 234 Mutationen innerhalb der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ B-Zellen bezogen auf eine Gesamtsequenzlänge von 12699 Nukleotiden ergab sich eine Mutationsrate von 1,84% für die $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ Population (Abb. 11).

Die Mutationsrate der $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ Zellen lag mit 286 Mutationen auf 9140 Nukleotiden bei 3,13%, sowie bei 3,14% für die $CD19^+CD27^+CD38^-$ Population, die insgesamt 379 Mutationen innerhalb von 12051 Nukleotiden zeigte (Abb. 11). Die Mutationsrate der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ Population bezüglich der kappa Leichtkette war signifikant niedriger als die der beiden anderen Populationen, während sich kein signifikanter Unterschied in der Mutationsrate der $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ und $CD19^+CD27^+CD38^-$ Population ergab (Abb. 11).

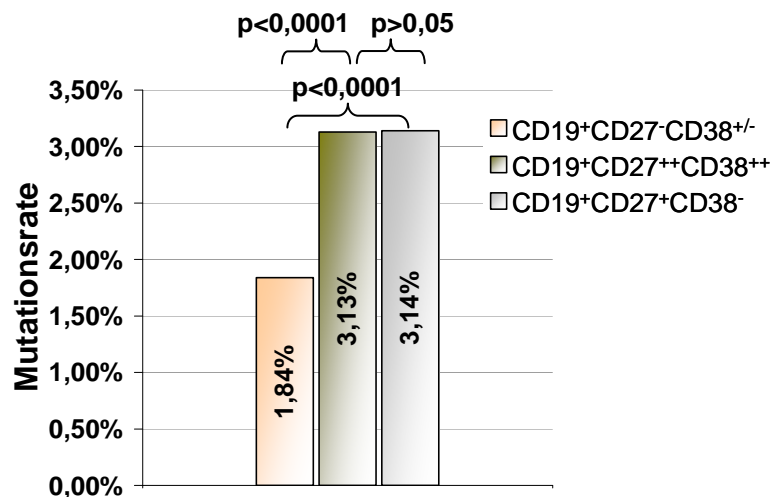


Abbildung 11: Leichte Kette - Mutationsrate der einzelnen B-Zell-Populationen

Dargestellt ist die Mutationsrate (Anzahl der zur Keimbahn veränderten Nukleotide/Gesamtzahl der Nukleotide der Sequenz) der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Die Mutationsraten der einzelnen Zellpopulationen wurden mittels chi-square Test verglichen. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sowie nicht-signifikante Ergebnisse ($p > 0,05$) wurden über den geschweiften Klammern angegeben, wobei Anfang und Ende der jeweiligen Klammer auf die miteinander verglichenen Zellpopulationen zeigen.

Die Gesamtsequenzlänge aller mutierten Sequenzen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} Population lag bei 9261 Nukleotiden, womit sich bei 234 Mutationen eine Mutationsrate von 2,53% innerhalb der mutierten Sequenzen ergab (Abb. 12). Bei der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Population betrug die entsprechende Mutationsrate 3,76% und bei den CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen 3,83% (7602 bzw. 9890 Nukleotide Gesamtsequenzlänge der mutierten Sequenzen) (Abb. 12). Die höhere Mutationsrate innerhalb der mutierten Sequenzen der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Zellen und der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ Zellen im Vergleich zur CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} war signifikant (Abb. 12). CD19⁺CD27⁺CD38⁻ und CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Zellen unterschieden sich nicht bezüglich ihrer Mutationsrate in der kappa Leichtkette (Abb. 12).

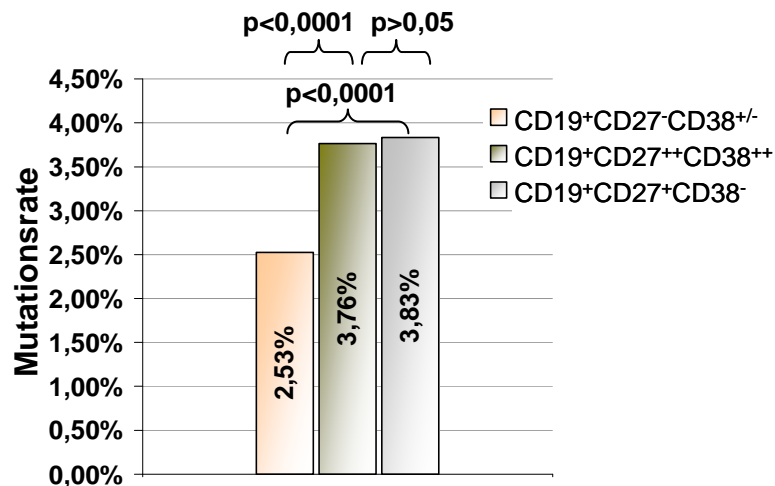


Abbildung 12: Leichte Kette - Mutationsrate innerhalb der mutierten Sequenzen der drei unterschiedlichen Zellpopulationen

Dargestellt ist die Mutationsrate (Anzahl der zur Keimbahn veränderten Nukleotide/Gesamtzahl der Nukleotide der Sequenz) der mutierten Sequenzen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Der Vergleich der Mutationsraten erfolgte mittels chi-square Test. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sowie nicht-signifikante Ergebnisse ($p > 0,05$) wurden über den geschweiften Klammern angegeben, wobei Anfang und Ende der jeweiligen Klammer auf die miteinander verglichenen Zellpopulationen zeigen.

3.2.1.2 R/S Ratio

Mutationen der Nukleotidabfolge einer Sequenz können zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen (Replacement-/ Austauschmutationen). Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass eine Mutation nicht zu einer Änderung der ursprünglich kodierten Aminosäure führt und damit in der Expression stumm bleibt (Silent/ stumme Mutation).

Ein Vergleich der Anzahl der Austauschmutationen sowie der stummen Mutationen ergibt die sogenannte R/S Ratio (Replacement/ Silent Ratio).

596 der in den Sequenzen der leichten Kette detektierten Mutationen waren Austauschmutationen und 232 stille Mutationen.

3.2.1.3 Verteilung der Austausch- und stillen Mutationen auf die CDR und FR Regionen

In allen drei Zellpopulationen war die R/S Ratio innerhalb der CDR Region höher als in den FR Regionen (Abb. 13).

In der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ Zellpopulation bedeutete dies, dass auf 1 stille Mutation in den CDR Regionen 4,19 Austauschmutationen kamen, während sich auf 1 stille Mutation innerhalb der Framework Regionen nur 1,58 Austauschmutationen ergaben. Der Anteil der R Mutationen an der Gesamtzahl der Mutationen innerhalb der CDR Regionen war somit signifikant höher als der Anteil der R Mutationen der Framework Regionen (Abb. 13). Umgekehrt verhielt es sich mit den stillen Mutationen, deren Anteil in den CDR signifikant niedriger war als in den FR Regionen (chi-square Test, $p < 0,01$). Entsprechend ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei den $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ und den $CD19^+CD27^+CD38^-$ B-Zellen (Abb. 13).

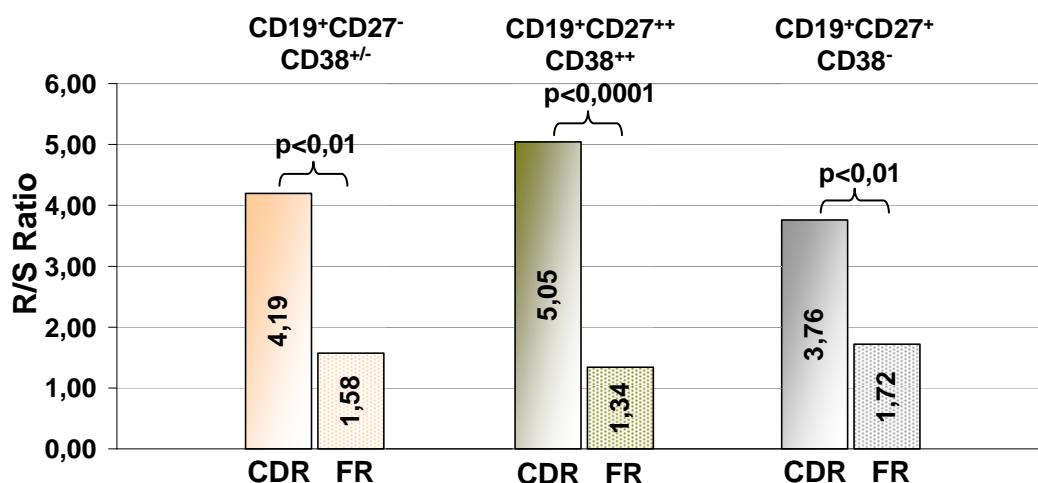


Abbildung 13: Leichte Kette - Vergleich der R/S Ratio in den CDR und FR Regionen innerhalb der drei Zellpopulationen

Dargestellt ist die R/S Ratio (Verhältnis von Austauschmutationen zu stillen Mutationen) in den CDR (CDR1-3 zusammengefasst) und FR Regionen (FR2-3 zusammengefasst) der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$, der $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ sowie der $CD19^+CD27^+CD38^-$ B-Zellen. Es wurde die R/S Ratio der CDR mit der R/S Ratio der FR innerhalb einer jeden Population mittels chi-square Test verglichen. Signifikante Unterschiede fanden sich für jede einzelne Population. Die entsprechenden Signifikanzwerte wurden über den geschweiften Klammern angegeben.

| | CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD38 ^{+/-} | | CD19 ⁺ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ | | CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁻ | |
|---------------|---|----|---|----|---|----|
| | R | S | R | S | R | S |
| CDR 1 | 40 | 9 | 44 | 9 | 63 | 17 |
| FR 2 | 20 | 17 | 33 | 22 | 38 | 25 |
| CDR2 | 24 | 7 | 28 | 7 | 39 | 5 |
| FR3 | 32 | 16 | 42 | 34 | 53 | 28 |
| CDR3 | 45 | 10 | 39 | 6 | 56 | 20 |
| Gesamt | 220 | | 264 | | 344 | |

Tabelle 22: Leichte Kette - Anzahl der Austausch- (R) und stillen (S) Mutationen in den CDR und FR Regionen der drei Zellpopulationen

Zur Übersicht ist die Anzahl der einzelnen Austauschmutationen (Mutationen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen) und stillen Mutationen (Mutationen, die keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirken) für die unterschiedlichen CDR und FR Bereiche der drei Zellpopulationen dargestellt. Die Summe der R und S Mutationen einer jeweiligen Zellpopulation ist angegeben.

Die jeweilige R/S Ratio der CDR Regionen (CDR1-CDR3 zusammengefasst) zeigte im Vergleich zwischen den drei Zellpopulationen keine signifikante Veränderung von Population zu Population (Abb. 14).

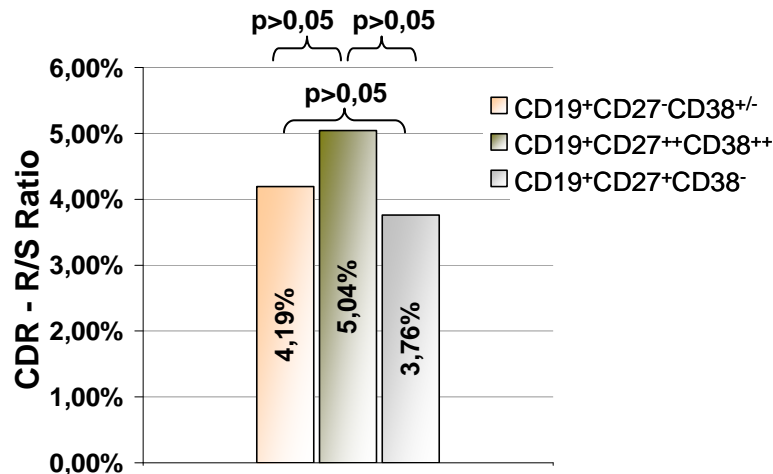


Abbildung 14: Leichte Kette - Vergleich der R/S Ratio der CDR Regionen (CDR1-CDR3 zusammengefasst) in den unterschiedlichen Zellpopulationen

Die Abbildung zeigt die R/S Ratio (Verhältnis von Austauschmutationen zu stillen Mutationen) für die CDR Bereiche der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Die R/S Ratio wurde dabei für CDR1, CDR2 und CDR3 zu einem Wert zusammengefasst und zwischen den drei Populationen mittels chi-square Test verglichen. Die entsprechenden p-Werte des Signifikanztestes sind über geschweiften Klammern abgebildet, wobei Anfang und Ende der Klammern auf die miteinander verglichenen Populationen zeigen.

Auch die Einzelbetrachtung von CDR1, CDR2 und CDR3 ergab im Hinblick auf die jeweilige R/S Ratio keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Zellpopulationen (Abb. 15).

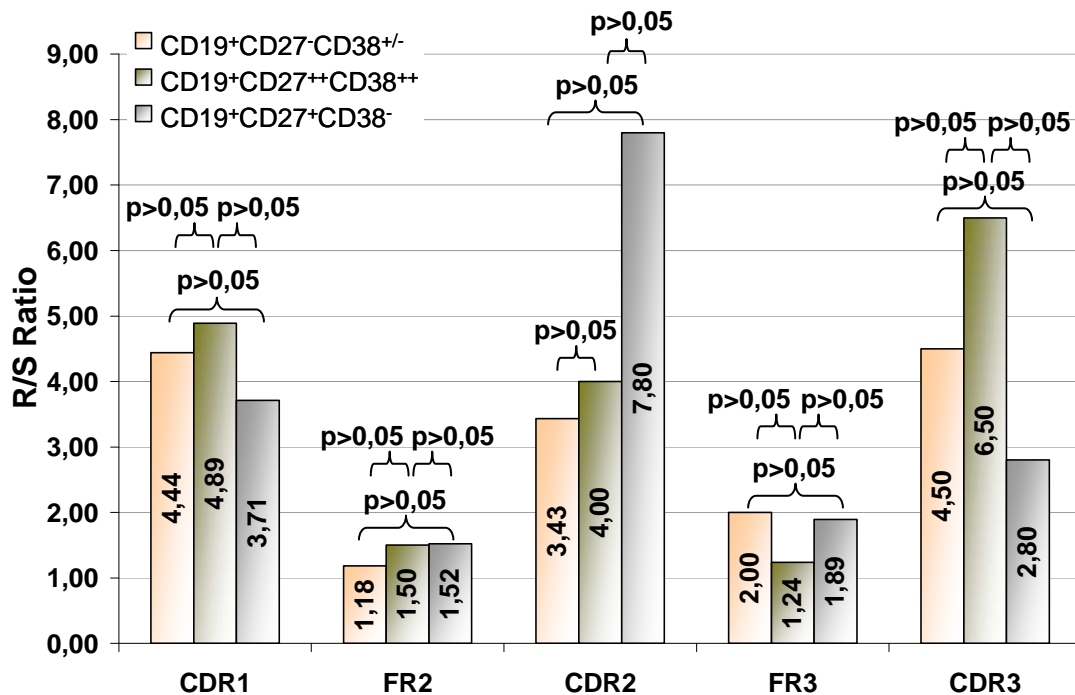


Abbildung 15: Leichte Kette - R/S Ratio der CDR1, CDR2 und CDR3 sowie der FR Regionen im Vergleich der drei Zellpopulationen

Dargestellt ist die R/S Ratio (Verhältnis von Austauschmutationen zu stillen Mutationen) innerhalb der einzelnen CDR Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Zur Übersicht und Vollständigkeit sind auch die R/S Ratios der FR Regionen abgebildet. Die R/S Ratios der CDR (und FR) Regionen wurden zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen mittels chi-square Test verglichen. Signifikante Unterschiede blieben aus. Die entsprechenden p-Werte des Signifikanztestes sind über geschweiften Klammern abgebildet, wobei Anfang und Ende der Klammern auf die miteinander verglichenen Populationen zeigen.

3.2.2 Mutationen innerhalb der schweren Kette

3.2.2.1 Mutationsraten innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen

Insgesamt fanden sich in den Sequenzen der schweren Kette 996 Mutationen. Diese waren auf 90 der insgesamt 101 erhaltenen Sequenzen (89,1%) der schweren Kette verteilt.

82,4% der Sequenzen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zellen wiesen ≥ 1 Mutation auf. Bei den CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen waren es 90,5% sowie 90,0% bei den CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen.

Bei 92 Mutationen bezogen auf eine Gesamtsequenzlänge von 3585 Nukleotiden innerhalb der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} Population ergab sich eine Mutationsrate von 2,57% (Abb. 16). Die der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Population lag bei 5,01% (774 Mutationen bei 15454 Nukleotiden Gesamt-Sequenzlänge) und die der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ Population ergab mit 130 Mutationen auf 2081 Nukleotiden eine Mutationsrate von 6,25% (Abb. 16). Analog den Ergebnissen der leichten Kette ließ sich auch hier eine signifikant niedrigere Mutationsrate in der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} gegenüber den beiden anderen Populationen erkennen. Die CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen waren signifikant stärker mutiert als die CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen (Abb. 16).

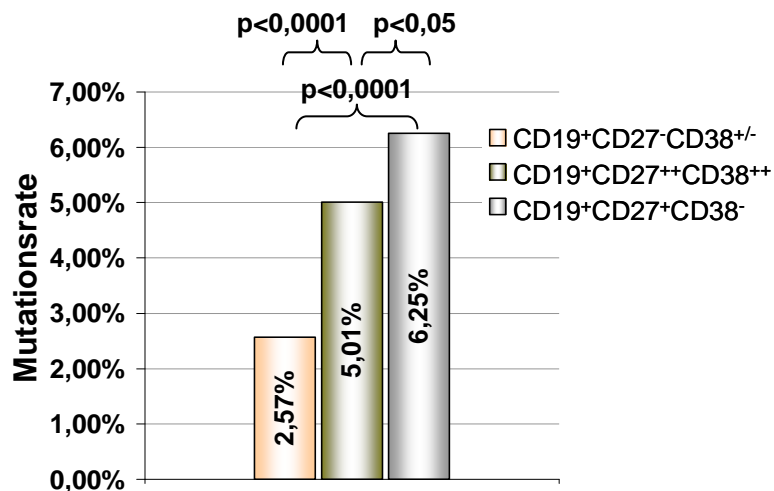


Abbildung 16: Schwere Kette - Mutationsrate der einzelnen B-Zell-Populationen

Dargestellt ist die Mutationsrate (Anzahl der zur Keimbahn veränderten Nukleotide/Gesamtzahl der Nukleotide der Sequenz) für die schwere Kette der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Die Mutationsrate der einzelnen Zellpopulationen wurde mittels chi-square Test verglichen. Die p-Werte des Signifikanztests sind über den geschweiften Klammern angegeben. Anfang und Ende der jeweiligen Klammer zeigen auf die miteinander verglichenen Zellpopulationen.

Die mutierten Sequenzen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} Population lieferten eine Gesamtsequenzlänge von 2954 Nukleotiden, womit sich bei 92 Mutationen eine Mutationsrate von 3,11% innerhalb der mutierten Sequenzen ergab (Abb. 17). Bei den CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen betrug die entsprechende Mutationsrate 5,53% und bei den CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen 6,93% (14001 bzw. 1875 Nukleotide Gesamtsequenzlänge der mutierten Sequenzen) (Abb. 17). Die höhere Mutationsrate innerhalb der mutierten Sequenzen der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen im Vergleich zur CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} Population war signifikant (Abb. 17). Auch der Unterschied zwischen CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} und CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen erreichte ein signifikantes Niveau (Abb. 17).

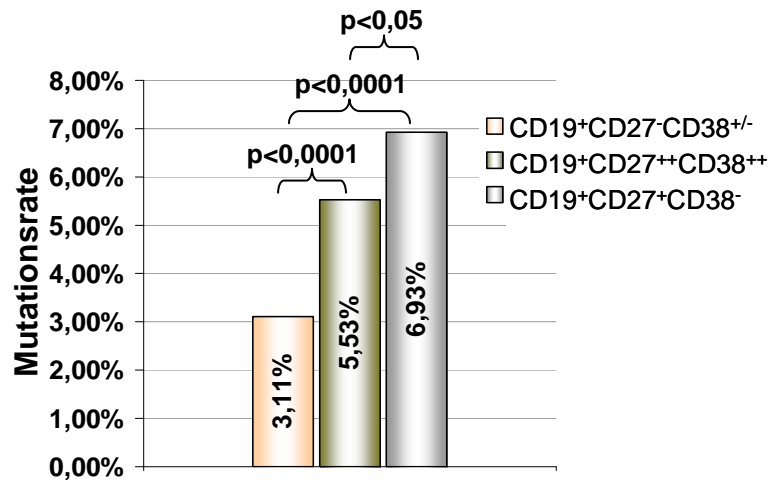


Abbildung 17: Schwere Kette - Mutationsrate innerhalb der mutierten Sequenzen der drei unterschiedlichen Zellpopulationen

Dargestellt ist die Mutationsrate (Anzahl der zur Keimbahn veränderten Nukleotide/Gesamtzahl der Nukleotide der Sequenz) der mutierten Sequenzen für die schwere Kette der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Der Vergleich der Mutationsraten erfolgte mittels chi-square Test. Die p-Werte des Signifikanztests sind über den geschweiften Klammern angegeben. Anfang und Ende der jeweiligen Klammer weisen auf die miteinander verglichenen Zellpopulationen.

3.2.2.2 R/S Ratio

Von den insgesamt 996 Mutationen der Sequenzen der schweren Kette führten 581 zu Austausch- und 308 zu stillen Mutationen.

3.2.2.3 Verteilung der Austausch- und stillen Mutationen auf die CDR und FR Regionen

Die separate Betrachtung der Verteilung von Austausch- und stillen Mutationen auf die unterschiedlichen CDR und FR Regionen (Tab. 23) erbrachte analog den Ergebnissen der leichten Kette ein Überwiegen der Austauschmutationen in den CDR Bereichen innerhalb der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen (Abb. 18). Innerhalb dieser Population bedeutete das signifikante Überwiegen der R Mutationen in den CDR Bereichen ein Aufkommen von 3,37 R Mutationen auf 1 stille Mutation. Hingegen trafen 1,54 R Mutationen auf 1 S Mutation in den FR Bereichen (chi-square Test, p<0,0001).

Bei den CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zellen kamen in den CDR Regionen auf eine stille Mutation 1,50 Austauschmutationen und in den FR Bereichen 1,57 R Mutationen. Damit lag hier kein signifikanter Unterschied vor (Abb. 18). Auch bei den CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen ergab sich kein signifikantes Ergebnis, obgleich eine Tendenz zum Überwiegen der Austauschmutationen in den CDR Regionen zu sehen war: 2,42 R Mutationen fielen in den CDR auf 1 stille Mutation und 1,45 R Mutationen auf 1 stille Mutation innerhalb der FR Bereiche (Abb. 18).

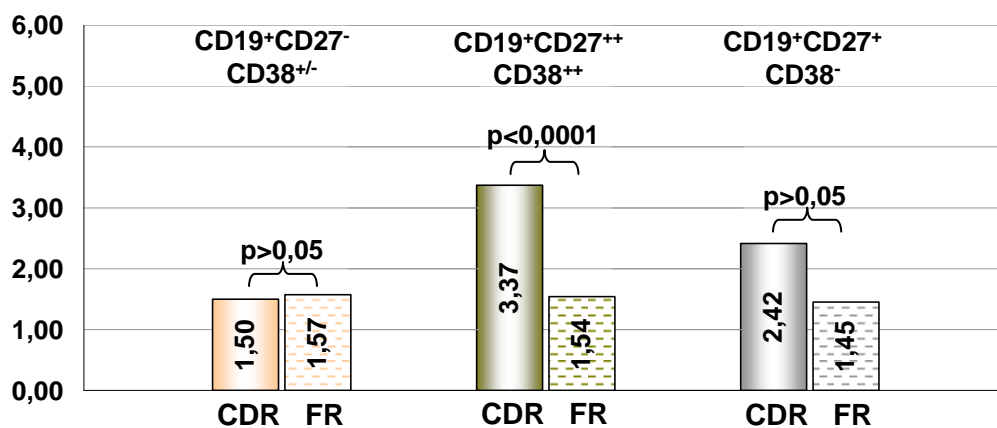


Abbildung 18: Schwere Kette - Vergleich der R/S Ratio in den CDR und FR Regionen innerhalb der drei Zellpopulationen

Dargestellt ist die R/S Ratio (Verhältnis von Austauschmutationen zu stillen Mutationen) in den CDR (CDR1-3 zusammengefasst) und FR Regionen (FR2-3 zusammengefasst) der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Die R/S Ratio der CDR wurde mit der R/S Ratio der FR innerhalb einer jeden Population mittels chi-square Test verglichen. Signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05) sowie nicht-signifikante Ergebnisse (p > 0,05) sind über den geschweiften Klammern angegeben. Anfang und Ende der jeweiligen Klammer weisen auf die miteinander verglichenen Zellpopulationen.

| | CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD38 ^{+/-} | | CD19 ⁺ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ | | CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁻ | |
|---------------|---|----|---|-----|---|----|
| | R | S | R | S | R | S |
| CDR 1 | 8 | 5 | 66 | 23 | 12 | 3 |
| FR 2 | 6 | 6 | 54 | 54 | 11 | 5 |
| CDR2 | 8 | 6 | 102 | 22 | 16 | 9 |
| FR3 | 27 | 15 | 220 | 124 | 34 | 26 |
| CDR3 | 2 | 1 | 14 | 9 | 1 | . |
| Gesamt | 84 | | 688 | | 117 | |

Tabelle 23: Schwere Kette - Anzahl der Austausch- (R) und stillen (S) Mutationen in den CDR und FR Regionen der drei Zellpopulationen

Zur Übersicht ist die Anzahl der einzelnen Austauschmutationen (Mutationen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen) und stillen Mutationen (Mutationen, die keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirken) für die unterschiedlichen CDR und FR Bereiche der drei Zellpopulationen dargestellt. Die Summe der R und S Mutationen einer jeweiligen Zellpopulation ist angegeben.

Der Vergleich der drei Zell-Populationen im Hinblick auf die R/S Ratio innerhalb der CDR Regionen zeigte eine signifikante Zunahme der Ratio zwischen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zell-Population und der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Population (Abb. 19). Hingegen blieb ein signifikantes Ergebnis im Vergleich der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} Zellen und der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen sowie im Vergleich zwischen CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ und CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen aus (Abb. 19).

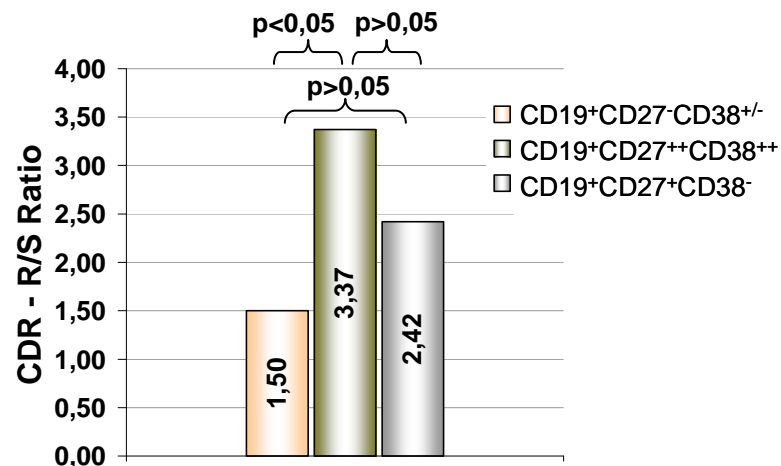


Abbildung 19: Schwere Kette - Vergleich der R/S Ratio der CDR Regionen in den unterschiedlichen Zellpopulationen

Die Abbildung zeigt die R/S Ratio (Verhältnis von Austauschmutationen zu stillen Mutationen) innerhalb der CDR Bereiche für die schwere Kette der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. Die R/S Ratio wurde dabei für CDR1, CDR2 und CDR3 zu einem Wert zusammengefasst und zwischen den drei Populationen mittels chi-square Test verglichen. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sowie nicht-signifikante Ergebnisse ($p > 0,05$) sind über den geschweiften Klammern angegeben. Anfang und Ende der Klammern weisen auf die miteinander verglichenen Populationen.

Zusätzlich wurde die R/S Ratio der CDR1, CDR2 und CDR3 Region gesondert zwischen den einzelnen Zellpopulationen verglichen (Abb. 20). Signifikante Unterschiede zeigten sich in der R/S Ratio innerhalb der CDR2 Region im Vergleich zwischen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} und der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Population. Die CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen hatten deutlich mehr Austauschmutationen in der CDR2 Region als die CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zellen (Abb. 20). Ebenso verhielt es sich mit den CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen im Vergleich zur CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Population, wobei die CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen signifikant mehr

Austauschmutationen innerhalb der CDR2 Region zeigten als die $CD19^+CD27^+CD38^-$ B-Zellen (Abb. 20). Eine signifikante Veränderung der R/S Ratio innerhalb der CDR2 Region im Vergleich zwischen $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ B-Zellen und $CD19^+CD27^+CD38^-$ B-Zellen blieb aus. Auch alle anderen Vergleiche (CDR1 und CDR3) der R/S Ratio zwischen den drei Populationen zeigten keine nennenswerten Auffälligkeiten und waren statistisch nicht signifikant (Abb. 20).

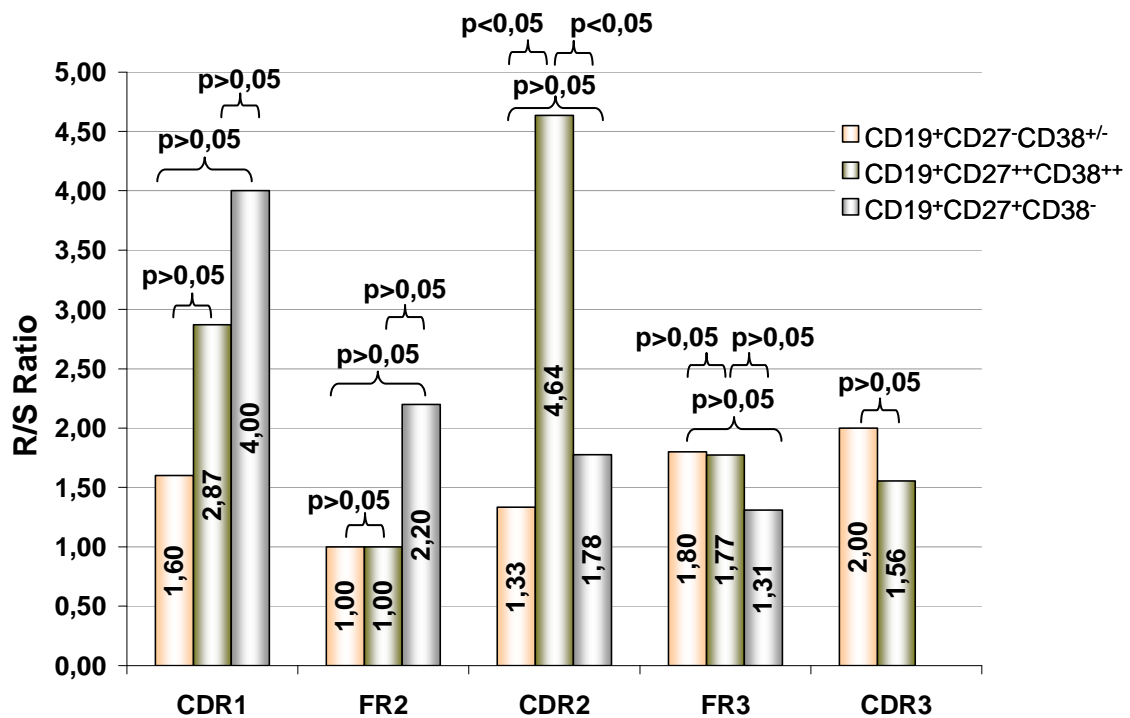


Abbildung 20: Schwere Kette - R/S Ratio der CDR1, CDR2 und CDR3 sowie der FR Regionen im Vergleich der drei Zellpopulationen

Dargestellt ist die R/S Ratio (Verhältnis von Austauschmutationen zu stillen Mutationen) innerhalb der einzelnen CDR Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) für die schwere Kette der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$, der $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ und der $CD19^+CD27^+CD38^-$ B-Zellen. Zur Übersicht und Vollständigkeit sind auch die R/S Ratios der FR Regionen abgebildet. Die R/S Ratios der CDR (und FR) Regionen wurden zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen mittels chi-square Test verglichen. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sowie nicht-signifikante Ergebnisse ($p > 0,05$) sind über den geschweiften Klammern angegeben. Anfang und Ende der Klammern zeigen auf die miteinander verglichenen Populationen.

3.3 Sequenzhomologien der B-Zellen

Die einzelnen B-Zellen wurden anhand der CDR3 Region auf Homologien ihrer Nukleotidsequenzen hin untersucht. Eine identische CDR3 Länge, identische V(D)J Verknüpfungsstellen und damit die Verwendung gleicher Gensegmente sowie das Vorkommen von P und N Nukleotiden dienten hierbei als Vergleichsreferenzen. Zur Gruppe der Zellen mit Sequenzhomologien wurden alle Zellen gerechnet, die ihre V(D)J Rearrangements mit einer oder mehreren anderen B-Zellen teilten (Abb. 21).

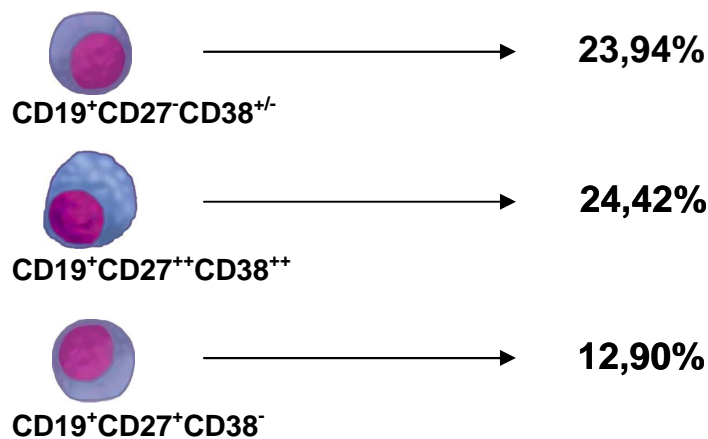


Abbildung 21: Anteil der Zellen mit Sequenzhomologien am Gesamtgut der pro Population analysierten B-Lymphozyten

Aufgezeigt ist der prozentuale Anteil der Zellen mit Sequenzhomologien an der Gesamtheit der Zellen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen. 17 von 71 Zellen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zellen, 21 von 86 Zellen der der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen und 8 von 62 Zellen der CD19⁺CD27⁺CD38^{+/-} Population zählten jeweils zur Gruppe der Zellen mit Sequenzhomologien.

Für die CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zellen ergaben sich die Sequenzhomologien in allen Fällen aus dem Vergleich der kappa Leichtkette. Bei der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Population ließen sich die Sequenzhomologien für 5 Zellen aus der kappa Leichtkette und für 6 Zellen aus der schweren Kette bestimmen. Für 10 Zellen wurden die Sequenzhomologien sowohl aus der kappa Leichtkette als auch aus der schweren Kette bestimmt. Im Falle der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen ergaben sich die Sequenzhomologien für 6 Zellen aus der kappa Leichtkette und für 2 Zellen aus der schweren Kette.

3.3.1 Identische V(D)J Genrearrangements von B-Zellen innerhalb der einzelnen B-Zell-Populationen (Tab. 24)

13 Zellen der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zell-Population, 16 CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zellen und 4 CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen zählten innerhalb ihrer eigenen Population zur Gruppe der Zellen mit Sequenzhomologien und damit identischen V(D)J Genrearrangements. Die Sequenzhomologien konnten an identischen CDR3 Regionen der leichten Kette (15 Zellen) oder der schweren Kette (8 Zellen) festgemacht werden (Tab. 24).

In 10 Fällen standen für die Untersuchung auf gleiche V(D)J Genrearrangements sowohl die leichte Kette als auch die schwere Kette einer Einzelzelle zur Verfügung. Hierbei fanden sich für beide Ketten jeweils identische V(D)J Genrearrangements der entsprechenden B-Zellen (Tab. 24).

Die CDR3 Regionen der Sequenzen dieser identisch rearrangierten B-Zellen zeigten die jeweils gleichen Mutationen. Lediglich in 1 Zelle der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zell-Population unterschied sich die sonst identische CDR3 in der Mutationszahl um 1 Punktmutation (Tab. 24).

3.3.2 Populations-übergreifende identische VJ Genrearrangements von B-Zellen (Tab. 25)

Weiter wurden die Sequenzen zwischen den einzelnen Zellpopulationen auf Sequenzhomologien untersucht, um die Frage einer möglichen klonalen Differenzierung von Vorläuferzellen (z.B. CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}) zu weiter differenzierten Zellen (z.B. CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ und CD19⁺CD27⁺CD38⁻) zu untersuchen.

Ein Populations-übergreifender Vergleich der CDR3 Regionen der einzelnen Zellen konnte zeigen, dass sich die Homologien der Sequenzen einiger B-Zellen über die Populationsgrenze hinaus auf eine andere Population erstreckten (Tab. 25).

Insgesamt wurden 7 solcher Populations-übergreifenden „Zellgruppen“ gefunden (Tab. 25). Deren Sequenzhomologien ergaben sich aus den VJ Genrearrangements der leichten Kette, die entsprechenden Genrearrangements der schweren Kette dieser Zellen konnten präanalytisch nicht gewonnen werden.

Zellgruppe 1 bestand aus 3 Zellen, deren VJ Genrearrangements identisch waren, wobei jede Zelle einer anderen Population entstammte (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ und CD19⁺CD27⁺CD38⁻) (Tab. 25). Sowohl CDR3 als auch die

restliche Nukleotidabfolge der Gensequenzen der drei Zellen waren identisch (Tab. 25).

Aus der phänotypischen Information der sortierten Zellen (Oberflächenmarker/ Differenzierungsstadium), den Sequenzhomologien der unterschiedlich differenzierten B-Zellen sowie den Unterschieden in der Anzahl somatischer Mutationen in den jeweiligen Sequenzen ließ sich ein hypothetischer Differenzierungsweg des vermuteten B-Zell Klons erstellen, welcher als genealogischer Stammbaum dargestellt wurde (Abb. 22):

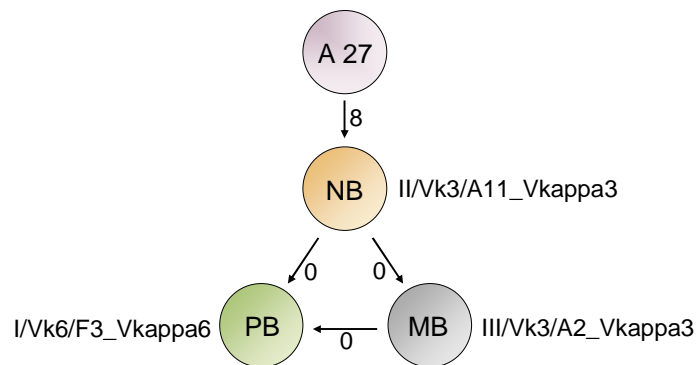


Abbildung 22: Zellgruppe 1 (Klon1) – genealogischer Stammbaum

A27: Keimbahngensequenz, NB: „Naive B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}), PB: „Plasmablast“ (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺), MB: „Gedächtnis-B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁺CD38⁻)

Die Pfeile verbinden die potentiell aus einander entstandenen B-Zellen. Am Pfeilende liegt die Zelle, aus der sich die Zelle an der Pfeilspitze entwickelt hat. Zahlen entlang der Pfeile: Anzahl der Mutationen, in denen sich die Gensequenzen zweier Zellen unterscheiden

Die jeweiligen Sequenzhomologien (Tab. 25) der anderen 6 Zellgruppen erstreckten sich vornehmlich über zwei verschiedene Populationen (Tab. 25) und ergaben folgende genealogische Stammbäume:

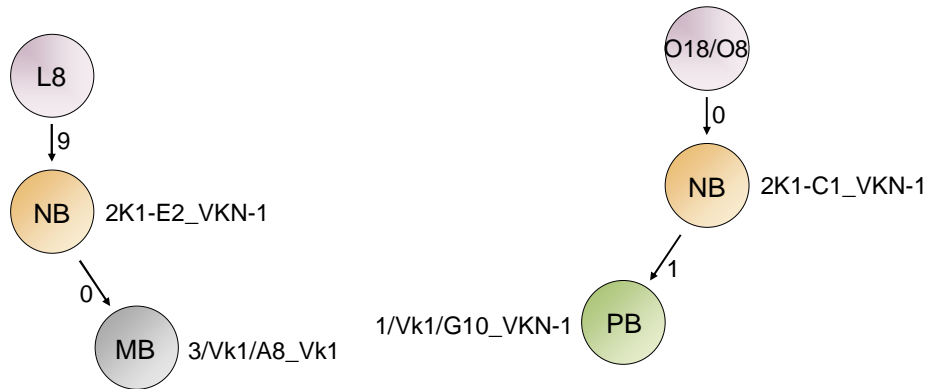


Abbildung 23: Zellgruppe 2 und 3 (Klon 2 und Klon 3) – genealogischer Stammbaum

L8, O18/O8: Keimbahngensequenzen, NB: „Naive B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}), PB: „Plasmablast“ (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺), MB: „Gedächtnis-B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁺CD38⁻)

Die Pfeile verbinden die potentiell aus einander entstandenen B-Zellen. Am Pfeilende liegt die Zelle, aus der sich die Zelle an der Pfeilspitze entwickelt hat. Zahlen entlang der Pfeile: Anzahl der Mutationen, in denen sich die Gensequenzen zweier Zellen unterscheiden

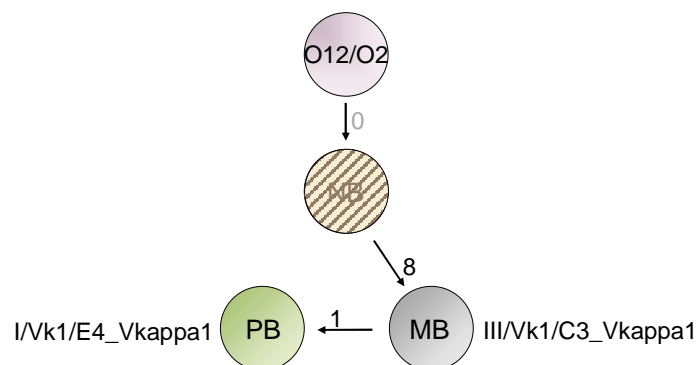


Abbildung 24: Zellgruppe 4 (Klon 4) – genealogischer Stammbaum

O12/O2: Keimbahngensequenz

NB: „Naive B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}), PB: „Plasmablast“ (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺), MB: „Gedächtnis-B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁺CD38⁻)

Die Pfeile verbinden die potentiell aus einander entstandenen B-Zellen. Am Pfeilende liegt die Zelle, aus der sich die Zelle an der Pfeilspitze entwickelt hat. Zahlen entlang der Pfeile: Anzahl der Mutationen, in denen sich die Gensequenzen zweier Zellen unterscheiden
Zelle mit Schraffur: hypothetische Zwischenzelle

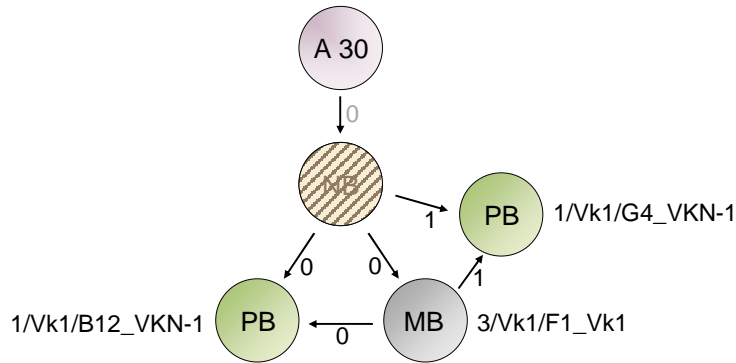


Abbildung 25: Zellgruppe 5 (Klon 5) – genealogischer Stammbaum

A30: Keimbahngensequenz, NB: „Naive B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}), PB: „Plasmablast“ (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺), MB: „Gedächtnis-B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁺CD38⁻)

Die Pfeile verbinden die potentiell aus einander entstandenen B-Zellen. Am Pfeilende liegt die Zelle, aus der sich die Zelle an der Pfeilspitze entwickelt hat.

Zahlen entlang der Pfeile: Anzahl der Mutationen, in denen sich die Gensequenzen zweier Zellen unterscheiden

Zelle mit Schraffur: hypothetische Zwischenzelle



Abbildung 26: Zellgruppe 6 und 7 (Klon 6 und Klon 7) – genealogischer Stammbaum

A30: Keimbahngensequenz, NB: „Naive B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}), PB: „Plasmablast“ (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺), MB: „Gedächtnis-B-Zelle“ (CD19⁺CD27⁺CD38⁻)

Die Pfeile verbinden die potentiell aus einander entstandenen B-Zellen. Am Pfeilende liegt die Zelle, aus der sich die Zelle an der Pfeilspitze entwickelt hat.

Zahlen entlang der Pfeile: Anzahl der Mutationen, in denen sich die Gensequenzen zweier Zellen unterscheiden

Zelle mit Schraffur: hypothetische Zwischenzelle

Mit Ausnahme von 3 Zellgruppen (Zellgruppe 3, 4 und 6) war die Zahl der Mutationen der Genrearrangements der einzelnen Zellen einer Gruppe stets identisch (Tab. 25). *Zellgruppe 3* ergab eine zusätzliche Mutation in der Sequenz der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zelle („Plasmablast“) im Vergleich zur CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zelle („Naive B-Zelle“) (Tab. 25, Abb. 23). Ein ähnliches Phänomen ließ sich für *Zellgruppe 4* beschreiben: Während sich innerhalb der Sequenz der CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zelle („Gedächtnis-B-Zelle“) 8 Mutationen fanden, zeigte die CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Zelle eine Mutation mehr (Tab. 25, Abb. 24).

Zellgruppe 6 enthielt trotz des gleichen VJ Genrearrangements der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} und der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zelle nur 1 gemeinsame Mutation innerhalb der CDR3 Region (Abb. 27). Sonst gab es keine Überschneidungen in den Mutationen (Tab. 25).

Aufgrund der gemeinsamen Mutation und des identischen VJ Genrearrangements beider Zellen ließ sich für *Zellgruppe 6* jedoch eine gemeinsame Vorläuferzelle annehmen, deren Expansion und Differenzierung zu den beiden genannten B-Zellen führte (Abb. 26).



Abbildung 27: Nukleotidsequenz der CDR3 Region für Zellgruppe 6

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der kompletten CDR3 Region (V_k und J_k Segment) für die CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zelle (2/Vk4/A11_Vk4) im Vergleich zur CDR3 Region der CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B-Zelle (1K4-C2_VKN-4). Mutationen als Abweichungen von der Keimbahnsequenz sind durch Ellipsen markiert. Die ursprünglichen Nukleotide der Keimbahnsequenz stehen als schwarze Lettern innerhalb der Ellipsen.

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

4 Diskussion

Die Pathogenese der Juvenilen Idiopathischen Arthritis ist bislang wenig verstanden. Eine Beteiligung von B-Zellen scheint jedoch möglich, da bei einigen Subtypen der JIA als serologisch wichtiger Parameter Antinukleäre Antikörper auftreten (7). Bei der Oligoarthritis, -einem der häufigsten Subtypen der JIA, finden sich ANA in annähernd 70% der Fälle (72).

B-Zellen können auf unterschiedliche Art und Weise an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen teilhaben. Am längsten bekannt ist der Mechanismus der (Auto)antikörper Produktion. Hierbei differenzieren sich B-Zellen nach vorheriger Aktivierung zu Plasmazellen, die besagte Antikörper sezernieren. Neben der Antikörper Produktion scheinen B-Zellen auch eine wichtige Rolle als Antigen-präsentierende Zellen in der T-Zell Aktivierung (63) und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungsreaktionen zu spielen. All diesen Möglichkeiten geht eine vorherige Aktivierung und teils auch Differenzierung der B-Zellen zu Effektorzellen voraus.

Die B-Zell Aktivierung und Differenzierung im physiologischen Kontext findet in den Keimzentren sekundär lymphatischer Organe statt. Ähnlich zu diesen Keimzentren treten annähernd gleich organisierte Strukturen auch im entzündeten Gewebe von Patienten mit Autoimmunerkrankungen auf („tertiär lymphatisches Gewebe“, „lymphoide Neogenese“) (64-67,69). Inwieweit in solchen Keimzentrum-ähnlichen Strukturen auch eine B-Zell Aktivierung und B-Zell Differenzierung sowie möglicherweise eine Generierung von Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen *in situ* stattfindet ist Gegenstand derzeitiger Diskussion.

Arbeiten über die Rheumatoide Arthritis (und andere der JIA klinisch und pathologisch ähnliche Krankheiten) haben Ansammlungen von mononukleären Zellen, insbesondere auch von B-Lymphozyten im entzündeten Synovialgewebe der betroffenen Gelenke beschrieben (64). Ein Halo von Plasmazellen umgab die mononukleären Infiltrate, welche morphologisch an Follikel-ähnliche Strukturen (Keimzentren) erinnerten (64). Es wurden Hinweise auf eine Differenzierung der Plasmazellen aus den zentral gelegenen Vorläuferzellen gesucht (64). Man vermutete eine Verwandtschaft zwischen den Vorläuferzellen im Zentrum der Follikel und den umgebenden Plasmazellen, konnte diese aber bisher nicht explizit

aufzeigen. Auch für die JIA wurden mononukleäre Infiltrate mit Keimzentrums-Charakter in der Synovia betroffener Gelenke beschrieben (73).

In einer vorherigen Dissertation konnte gezeigt werden, dass Plasmazellen im Gelenk von Patienten mit JIA akkumulieren (74). Diese Plasmazellen zeigten den Phänotyp einer kürzlich entstandenen, aktivierten Zelle („Plasmablast“), so dass die Hypothese aufgestellt wurde, diese Zellen seien direkt im Gelenk entstanden (74).

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dieser Hypothese. Mittels einer Kombination aus phänotypischer Zuordnung bestimmter B-Zell Differenzierungsstadien (Durchflusszytometrie) sowie Einzelzellsortierung, Amplifikation und Sequenzierung des rearrangierten Immunglobulins individueller B-Zellen wurde der Frage nach klonaler Verwandtschaft unterschiedlich differenzierter B-Zell Stadien innerhalb des Gelenkes nachgegangen.

Mittels Durchflusszytometrie und Einzelzellsortierung wurden 576 B-Zellen aus den Synovialflüssigkeitsproben zweier Patientinnen mit JIA gewonnen.

Durch die Markierung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD19, CD27, und CD38 konnten die Zellen unterschiedlichen Zellpopulationen zugeordnet werden: $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$, $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ und $CD19^+CD27^+CD38^-$ B-Zellen. CD19 diene als Marker zur Abgrenzung von B-Zellen gegenüber anderen lymphozytären Zellen. Durch die Expression von CD27 können innerhalb der B-Zellen Gedächtnis B-Zellen von naiven B-Zellen unterschieden werden (75). Die Kombination aus starker Expression von CD27 und CD38 kann innerhalb der $CD19^+$ B-Zellen Plasmablasten/Plasmazellen abgrenzen (76,77). Neben der Expression von Oberflächenmolekülen können weiter differenzierte B-Zellen (Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen) durch das Vorhandensein somatisch hypermutierter Immunglobulingene identifiziert werden.

Im Zuge der Somatischen Hypermutation können während einer Keimzentrumsreaktion Punktmutationen in die Gensequenz einer B-Zelle eingefügt werden. Diese Mutationen dienen vornehmlich der Affinitätszunahme einer B-Zelle gegenüber ihrem spezifischen Antigen, können deren Funktionalität jedoch auch negativ beeinträchtigen und sogar zum Funktionsverlust führen (11).

Wie bereits von der phänotypischen Charakterisierung anzunehmen, konnte in den V(D)J-Rearrangements der $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ Plasmablasten sowie der $CD19^+CD27^+CD38^-$ Gedächtnis B-Zellen eine hohe Mutationsrate im Sinne von

Somatischer Hypermutation detektiert werden. Jedoch zeigte auch ein Großteil der CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} („naiven“) B-Zellen Anzeichen Somatischer Hypermutation. Die Mutationsrate dieser Zellen war niedriger als die der anderen beiden Zellpopulationen (sowohl bezogen auf die Analyse aller Sequenzen als auch die der mutierten Sequenzen).

Somit zeigten CD27⁺ als auch CD27⁻ B-Zellen im Gelenk dieser Patienten ein molekulares Muster einer Gedächtnis B-Zelle, wobei jedoch die Mutationsrate der CD27⁻ B-Zelle niedriger als die der CD27⁺ B-Zelle erschien.

Bislang wurden B-Zellen, auf deren Oberfläche sich kein CD27 nachweisen ließ als naive B-Zellen eingestuft. Aktuelle Arbeiten konnten aber Gedächtnis B-Zellen charakterisieren, die ebenfalls negativ für CD27 waren, jedoch somatische Hypermutationsereignisse und einen Immunglobulinklassenwechsel aufwiesen (78). Diese Zellen scheinen im Blut von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen sowie chronischen Virusinfektionen expandiert zu sein. Zudem konnte diese B-Zell Population in der Tonsille nachgewiesen werden (79-81). Möglicherweise deutet die hohe Mutationsrate der in dieser Arbeit sortierten CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} B-Zellen auf die Zugehörigkeit zu einer solchen CD27 negativen Gedächtnis B-Zell-Population hin.

Das Vorhandensein von somatischen Hypermutationsereignissen in den drei untersuchten Zellpopulationen des Gelenkes von Kindern mit JIA ließ vermuten, dass diese Zellen bereits Antigenkontakt hatten und möglicherweise durch eine Keimzentrumsreaktion gelaufen sind, da hier hauptsächlich Somatische Hypermutation stattfindet. In den Keimzentren findet eine Affinitätsreifung der Zellen im Zuge einer Antigen-abhängigen Immunantwort statt (82), in deren Folge sich als molekulares Muster eine erhöhte Ratio von Austausch- zu stillen Mutationen in den CDR Regionen nachweisen lässt. Daher wurde in den drei Zellpopulationen das Verhältnis zwischen Austauschmutationen und stillen Mutationen untersucht, insbesondere im Hinblick auf ihre Verteilung in den unterschiedlichen CDR und FR Bereichen. Die CDR Regionen stellen die hypervariablen Bereiche des Immunglobulins dar und sind damit die Areale, die vornehmlich für die Antigenbindung zuständig sind (22). Veränderungen durch Austauschmutationen in den CDR Regionen führen also mit großer Wahrscheinlichkeit zu Veränderungen der Affinität eines Antikörpers gegenüber seinem Antigen. Austauschmutationen in den

FR Regionen der Immunglobulingensequenzen hingegen modifizieren die Affinität kaum bis gar nicht (83).

In allen drei Zellpopulationen ließen sich höhere R/S Ratios in den CDR Regionen gegenüber den FR Regionen nachweisen. Die vornehmliche Modifikation von CDR Regionen könnte also bedeuten, dass während der Aktivierung der B-Zellen ein Selektionsprozess stattgefunden hat und vor allem Zellen überlebt haben, die ihre Affinität zu einem bestimmten Antigen verändert und mutmaßlich verbessert haben. Um welches Antigen es sich hierbei jedoch handelt, bleibt offen.

B-Zellen können im Rahmen ihrer Differenzierung mehrmalig aktiviert werden und mehrfach durch Keimzentren sekundär lymphatischer Organe wandern. Hierbei kommt es zu einer Zunahme von somatischen Hypermutationsereignissen und möglicherweise auch zu einer Zunahme der R/S Ratios in den CDR Regionen im Rahmen der Affinitätsreifung.

Es wurde deshalb verglichen, ob sich die einzelnen Zellpopulationen in den R/S Ratios ihrer CDR Regionen unterscheiden. Fasste man alle CDR Regionen zusammen, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bei separater Betrachtung der CDR Regionen (CDR 1 bis CDR3) konnte für die CDR2 Region eine Zunahme der R/S Ratio von der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ bzw. $CD19^+CD27^+CD38^-$ zur $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ B-Zell-Population beobachtet werden. Dass dieser Trend vor allem und nur in der CDR2 Region im Vergleich der drei Zellpopulationen auftrat, könnte Zufall sein, deutet möglicherweise aber auch auf ein spezifisches Antigen hin, was insbesondere über Modifikation der CDR2 Region besser an das Immunglobulin gebunden werden könnte. Allerdings war dieses Phänomen nur für die Gensequenzen der schweren Kette zu beobachten und trat bei Betrachtung der leichten Kette nicht auf.

Anhand der Analyse von Somatischer Hypermutation in den Immunglobulingenen der drei sortierten B-Zell Populationen ließ sich somit zeigen, dass diese molekulare Muster einer Antigen-aktivierten Zelle aufweisen. Zudem ließ die erhöhte R/S Ratio der CDR2 Region in den $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ Zellen („Plasmablasten“) gegenüber den anderen beiden Zellpopulationen vermuten, dass in diesen Zellen vermehrt Affinitätsreifung und Selektion stattgefunden haben. Ob dies in den Keimzentren sekundär lymphatischer Organe geschehen ist oder in der entzündeten Synovia selbst, lässt sich aus den Daten der somatischen Hypermutationsereignisse allein nicht feststellen.

Der Nachweis von Plasmazellen (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺) in den betroffenen Gelenken implizierte zwei potentielle Erklärungen für ihr Vorhandensein: Einerseits könnten B-Zellen in der Peripherie (in den Keimzentren sekundär lymphatischer Organe) nach Kontakt zu einem spezifischen Antigen zu Plasmazellen differenzieren, welche als Plasmablasten, - fähig zur Migration, aufgrund noch unbekannter Faktoren in die betroffenen Gelenke wandern und dort akkumulieren. Proinflammatorische Zytokine wie TNF-, und Lymphotoxin sowie Chemokine (CXCL13) wurden vermehrt in der entzündeten Synovia nachgewiesen und könnten das Einwandern von B-Zellen begünstigen (70).

Die zweite mögliche Erklärung für das Vorhandensein der Plasmazellen könnte ein Prozess der Ausdifferenzierung innerhalb des Gelenkes sein.

Bei der RA waren die mononukleären Infiltrate der Synovia auf klonal expandierte B-Zellen hin untersucht worden. Das Vorhandensein von B-Zellen mit gleichem VDJ Rearrangement, jedoch unterschiedlichen Mutationen innerhalb einer Population ließ eine klonale Expansion und möglicherweise Differenzierung innerhalb des entzündeten Synovialgewebes vermuten (64). In einer weiteren Analyse konnten jedoch keine identischen VDJ Rearrangements zwischen Vorläuferzellen (CD20⁺ B-Zellen) und weiter differenzierten B-Zell Stadien (Wue1⁺ Plasmazellen) gefunden werden (70).

Somit konnte ein Nachweis klonaler Verwandtschaft zwischen diesen B-Zell Stadien und damit auch der Nachweis von klonaler Differenzierung der Plasmazellen *in situ* nicht eindeutig erbracht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit JIA gewonnenen B-Lymphozyten durch Vergleich ihrer V(D)J Genrearrangements der leichten Kette und der schweren Kette ebenfalls auf Sequenzhomologien und mögliche Anzeichen klonaler Expansion bzw. klonaler Differenzierung hin untersucht. Es ergaben sich 21 Zellgruppen, die aus Zellen mit pro Gruppe jeweils identischen V(D)J Rearrangements, insbesondere identischen CDR3 Regionen bestanden. Die CDR3 vereint die Verknüpfungsstellen der einzelnen Gensegmente (V, (D) und J). Ein zufälliges Auftreten des exakt gleichen V(D)J Genrearrangements bei unterschiedlichen Zellen ist aufgrund der immens großen Anzahl von 10¹¹ theoretisch möglichen Antikörperspezifitäten (22) sehr unwahrscheinlich. Somit lassen identische

V(D)J Genrearrangements eine Verwandtschaft im Sinne einer klonalen Expansion der entsprechenden B-Zellen annehmen.

14 der 21 in dieser Arbeit detektierten Klone, also Zellgruppen mit Sequenzhomologien, bestanden aus Zellen, die ihre homologen Sequenzen jeweils innerhalb einer Population trugen und somit als innerhalb einer Population klonal expandierte Zellen gedeutet wurden.

Diese Zellklone könnten einen Hinweis auf eine Expansion und Differenzierung von B-Zellen innerhalb des betroffenen Gelenkes darstellen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass in 14 Fällen Zellen mit gleichen oder durch Mutationen gering modifizierten Genrearrangements innerhalb des gleichen Entzündungsortes anzutreffen sind.

Der eigentlichen Fragestellung näher brachte die Detektion von 7 populationsübergreifenden Klonen.

Insbesondere Klon 1 lieferte Hinweise auf eine terminale Differenzierung von B-Zellen innerhalb des Gelenkes. Klon 1 bestand aus 3 Einzelzellen, deren identische Immunglobulinrearrangements von der Vorläuferzelle (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}) zu weiteren Differenzierungsstufen (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ sowie CD19⁺CD27⁺CD38⁻) verfolgt werden konnten. Das bedeutete, dass der Differenzierungsweg einer B-Zelle von der Naiven B-Zelle zum Plasmablasten bzw. zur Gedächtnis-B-Zelle nachvollziehbar wurde, und zwar innerhalb eines Gelenkes. Gesetzt Falls die klonale Expansion der Zelle hätte auch in diesem Fall außerhalb des Gelenkes stattgefunden, dann wäre die Wahrscheinlichkeit einer Detektion aller drei Differenzierungsstufen in einem einzigen Gelenk verschwindend gering gewesen.

Es ließ sich also eine klonale Verwandtschaft von Vorläufer-B-Zellen hin zu weiteren Differenzierungsstufen zeigen, wobei alle drei Differenzierungsstufen innerhalb des betroffenen Gelenkes detektiert wurden.

Klon 1 umfasste drei Zellpopulationen, die anderen 6 Populationsübergreifenden Klone umspannten jeweils zwei unterschiedliche Populationen.

Die Detektion dieser Populationsübergreifenden Klone zeigte, dass die Expansion und Differenzierung der B-Zellen zumindest teilweise im Entzündungsort selbst abzulaufen scheint. In welchem Ausmaß dies geschieht bleibt jedoch Gegenstand der Forschung. Einschränkend ist jedoch festzustellen, dass die Hypothese der klonalen Differenzierung nur auf der Analyse der kappa Leichtkette beruht, da die

Rearrangements der schweren Kette in diesen Zellen aus technischen Gründen nicht amplifiziert werden konnten.

Einige der im Synovialgewebe von RA oder JIA Patienten gezeigten mononukleären Zellinfiltrate ähnelten morphologisch Follikelstrukturen (64, 73), so dass man eine Entwicklung der B-Zellen im Sinne einer Keimzentrumsreaktion für möglich hielt. Im Falle der RA ergaben die Daten Hinweise auf klonal expandierte B-Zellen. Diese zeigten identische Genrearrangements, jedoch mit unterschiedlicher Anzahl somatischer Mutationen, was auf eine klonale Diversifizierung der B-Zellen im Sinne einer Keimzentrumsreaktion innerhalb des Synovialgewebes schließen ließ (70). Während der angenommenen Ausdifferenzierung akquirierten diese als klon expandierenden Zellen im Zuge der Somatischen Hypermutation Punktmutationen, so dass die Funktion der Keimzentrums-ähnlichen Infiltrate als tatsächliches Keimzentrum plausibel schien (70). Auch bei der JIA wurden Strukturen mit Follikelcharakter gefunden (73). Aus der Analyse der somatischen Hypermutationereignisse in den klonal expandierten Zellen der von uns untersuchten Patienten mit JIA ließ sich jedoch kein Hinweis auf intraklonale Diversifizierung finden. Lediglich bei wenigen Klonen (Klon 3, 4 und 6) konnte eine Zunahme der Mutationereignisse von einer Vorläuferzelle bis hin zur Plasmazelle/Plasmablasten postuliert werden. Somit ist davon auszugehen, dass innerhalb des Gelenkes zwar eine klonale Expansion und auch klonale Differenzierung von B-Zellen stattfindet. Eine klonale Diversifizierung des Immunglobulin-Repertoires scheint jedoch – im Unterschied zu einer klassischen Keimzentrumsreaktion – entweder schwer nachweisbar oder nicht signifikant vorhanden zu sein. Möglicherweise sind die B-Zellen im Gelenk Antigen-unspezifisch aktiviert worden. Hier käme z.B. die Aktivierung über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (Toll-like Rezeptoren) oder über Zytokinrezeptoren (BAFF-Rezeptor) in Frage (84, 85).

B-Zellen könnten so aktiviert werden und zu kurzlebigen Plasmablasten differenzieren. Eine Affinitätsreifung im Sinne einer klassischen, durch Antigen ausgelösten Keimzentrumsreaktion würde jedoch ausbleiben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die CD27⁺ als auch die CD27⁻ B-Zellen des Gelenkes von Patienten mit JIA aufgrund des Vorhandenseins

von somatischen Hypermutationseignissen einer Gedächtnis B-Zell Population zuordnen lassen. Sowohl die Gedächtnis B-Zell Population als auch die Plasma-blasten zeigten molekulare Muster, die auf eine abgelaufene Antigen-Selektion/Affinitätsreifung hinwiesen.

Aus dem Vergleich der V(D)J Rearrangements ergaben sich Hinweise auf eine klonale Expansion und klonale Differenzierung von B-Zellen *in situ*. Eine intraklonale Diversifizierung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, so dass sich keine Hinweise auf eine im Gelenk ablaufende Affinitätsreifung der B-Zellen ergaben.

Inwieweit die klonale Expansion und Differenzierung der B-Zellen mit Toleranzbruch und Entstehung von Autoimmunität assoziiert ist, lässt sich aus den vorhandenen Daten nicht eindeutig klären.

Interessant erscheint jedoch, dass sich ähnliche Muster der B-Zell Differenzierung auch im Gelenk von Patienten mit RA fanden, diese jedoch nicht mit dem Vorhandensein von Autoantikörpern assoziiert war (86). In einer anderen Arbeit ließen sich jedoch Hinweise auf eine Autoantikörperproduktion im Gelenk finden (87). Zur Beantwortung dieser Fragestellung könnte für weitere Projekte die Methode der rekombinanten Antikörperherstellung aus individuellen B-Zellen herangezogen werden (88).

5 Zusammenfassung

Die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) ist eine der häufigsten Ursachen von Gelenkbeschwerden im Kindesalter. Die Pathogenese der Erkrankung ist bisher wenig verstanden. Da sich jedoch bei einigen Subtypen der JIA Antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisen lassen, liegt eine Beteiligung von B-Lymphozyten nahe.

Bei vielen Autoimmunerkrankungen lässt sich an dem Ort der Entzündung ektopes lymphatisches Gewebe mit Keimzentrums-ähnlichen Strukturen finden. Somit stellte sich die Frage, ob auch in dem Gelenk der Patienten mit JIA eine Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen stattfindet.

B-Zellen wurden über eine Dichtegradientenzentrifugation aus der Synovialflüssigkeit zweier an JIA erkrankter Patientinnen gewonnen und anschließend mittels Durchflusszytometrie anhand von spezifischen Fluoreszenzmarkierungen einzeln sortiert und drei verschiedenen Zellpopulationen zugeordnet: $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ („Naive B-Zellen“), $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ (Plasmablasten) und $CD19^+CD27^+CD38^-$ (Gedächtnis B-Zellen). Über die PCR konnten die Immunglobulin-V(D)J Genrearrangements der einzelnen B-Zellen amplifiziert und sequenziert werden. Somit lag die genetische Information des spezifischen Immunglobulins einer jeden Zelle einzeln vor.

Mutationsanalysen der einzelnen Sequenzen ergaben eine hohe Mutationsrate der $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$ Plasmablasten sowie der $CD19^+CD27^+CD38^-$ Gedächtnis B-Zellen im Sinne von Somatischer Hypermutation. Aber auch ein Großteil der $CD19^+CD27^-CD38^{+/-}$ („naiven“) B-Zellen lieferte Anzeichen Somatischer Hypermutation. Diese $CD27^-$ Zellen galten stets als naive B-Zellen, sind jedoch wahrscheinlich einer erst kürzlich beschriebenen $CD27^-$ Gedächtnis B-Zell-Population zuzuordnen, was die Hypermutationen erklären könnte.

Folglich ließen sich also sowohl die $CD27^+$ als auch die $CD27^-$ B-Zellen des Gelenkes von Patienten mit JIA aufgrund des Vorhandenseins von somatischen Hypermutationereignissen einer Gedächtnis B-Zell Population zuordnen. Sowohl die Gedächtnis B-Zell Population als auch die Plasmablasten zeigten molekulare Muster, die auf eine abgelaufene Antigen-Selektion/Affinitätsreifung hinwiesen.

Anhand identischer V(D)J Genrearrangements, insbesondere identisch rearrangierter CDR3 Regionen wurden die einzelnen Zellen auf klonale Verwandtschaft untersucht. In den Analysen ergaben sich insgesamt 21 Klone, das heißt Gruppen von Zellen mit Sequenzhomologien. 14 hiervon bestanden aus Zellen, die innerhalb einer einzelnen Zell-Population klonal expandiert waren. 7 jedoch zeigten eine Populationsübergreifende Präsenz und machten den Differenzierungsweg einer B-Zelle im Gelenk nachvollziehbar. Es ergaben sich also Hinweise auf eine klonale Expansion und klonale Differenzierung von B-Zellen *in situ*. Anhalt für eine im Gelenk ablaufende Affinitätsreifung besagter B-Zellen im Sinne einer Keimzentrumsreaktion fand sich jedoch aufgrund fehlender intraklonaler Diversifizierung der klonal expandierten B-Zellen nicht.

Inwieweit die klonale Expansion und Differenzierung der B-Zellen mit Toleranzbruch und Entstehung von Autoimmunität assoziiert ist, lässt sich aus den vorhandenen Daten nicht eindeutig klären. Zur Beantwortung dieser Fragestellung könnte für weitere Projekte die Methode der rekombinanten Antikörperherstellung aus individuellen B-Zellen herangezogen werden.

6 Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| AID | Aktivierungsinduzierte Cytidin Deaminase |
| ANA | Antinukleäre Antikörper |
| BAFF | B Cell Activating Factor |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| BZR | B-Zell Rezeptor |
| C | Cytosin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| cDNA | complementary DNA |
| CDR | Complementary Determining Region |
| C _H | konstante Region der schweren Kette |
| C _L | konstante Region der leichten Kette |
| D | Diversity Segment der schweren Kette |
| ddNTP | Didesoxynukleotidtriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetatessigsäure |
| EOPA | Early Onset Pauciarticular Arthritis |
| ETBR | Ethidiumbromid |
| EULAR | European League Against Rheumatism |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| Fig | Figur |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FR | Framework Region |
| FSC | Forward Scatter |
| G | Guanosin |
| H | schwere Kette |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| Igα/Igβ | Signaltransduktionseinheit des B-Zell Rezeptors |

| | |
|-------------------|---|
| IL | Interleukin |
| ILAR | International League of Associations for Rheumatology |
| J _H | Joining Segment der schweren Kette |
| JIA | Juvenile Idiopathische Arthritis |
| J _κ | Joining Segment der kappa Leichtkette |
| J _L | Joining Segment der leichten Kette |
| kb | Kilo-Basenpaare |
| L | leichte Kette |
| M | Mol |
| m | männlich |
| MB | Gedächtnis B-Zelle |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| min | Minute |
| mk | monoklonal |
| μl | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| mRNA | messenger RNA |
| N-Nukleotid | non-templated Nukleotid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NB | Naive B-Zelle |
| Oligo-dT | Oligo- Desoxythymidin |
| P-Nukleotid | palindromisches Nukleotid |
| PB | Plasmablast |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PE | Phycoerythrin |
| R | Replacement-/ Austauschmutation |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RAG | Rekombination Aktivierendes Gen |
| RF | Rheumafaktor |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | Rosewell Park Memorial Institute |

| | |
|----------------|--|
| RSS | Rekombinationssignalsequenz |
| RT | Reverse Transkription |
| S | Silent/ stumme Mutation |
| S-S | Disulfidbrücke |
| SSC | Side Scatter |
| T | Thymin |
| Tab | Tabelle |
| TBE Puffer | Tris Borate EDTA Puffer |
| TC | Tri-Color |
| TdT | Terminale Desoxynukleotidyltransferase |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| U | Unit |
| V _H | variable Region der schweren Kette |
| V _κ | variable Region der kappa Leichtkette |
| V _L | variable Region der leichten Kette |
| w | weiblich |
| x g | Vielfaches der Erdbeschleunigung |

7 Literatur

- 1) Martínez Mengual L, Fernández Ménéndez JM, Solís Sánchez G, Fernández Días M, Fernández Gonzáles M, Málaga Guerra S. 2007. Epidemiological study of juvenile idiopathic arthritis in the last 16 years in Asturias (Spain). *An Paediatr (Barc)* 66: 24-30
- 2) Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, He X, Maldonado-Cocco J, Orozco Alcala J, Priour AM, Suarez-Almazor ME, Woo P. 2004. International League of Associations for Rheumatology Classification of Juvenile Idiopathic Arthritis: Second Revision, Edmonton, 2001. *J Immunol* 31:2
- 3) Huppertz HJ. 2002. Oligoarthritis im Kindes- und Jugendalter. *Monatsschr Kinderheilkd* 150: 437-44
- 4) Alarcón-Segovia D, Laffón A, Alcocer-Varela J. 2005. Probable depiction of juvenile arthritis by Sandro Botticelli. *Arthritis Rheum* 26: 1266-68
- 5) Ravelli A, Martini A. 2007. Juvenile Idiopathic Arthritis. *Lancet* 369 : 767-78
- 6) Prahalad S. 2004. Genetics of Juvenile Idiopathic Arthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol* 16: 588-94
- 7) Morbach H, Girschick H. 2009. Do B cells play a role in the pathogenesis of Juvenile Idiopathic Arthritis? *Autoimmunity* 42: 373-5
- 8) Prahalad S, Glass DN. 2002. Is juvenile rheumatoid arthritis/ juvenile idiopathic arthritis different from rheumatoid arthritis? *Arthritis Res* 11:303-10
- 9) Prahalad S, Glass DN. 2008. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Paediatr Rheumatol Online J* 6:11
- 10) Speer CP, Gahr M. 2009. Pädiatrie. 3. Auflage. *Springer*. Seite 324-325
- 11) Wagner N, Dannecker G. 2007. Pädiatrische Rheumatologie. 1. Auflage. *Springer*. Seite 177-221
- 12) Wahn U, Seger R, Wahn V, Holländer GA. 2005. Pädiatrische Allergologie und Immunologie. 4. Auflage. *Urban & Fischer*. Seite 768-772
- 13) Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1: 475- 82
- 14) Mizoguchi A, Bhan AK. 2006. A case for regulatory B-cells. *J Immunol* 176: 705-10

- 15) Golovkina TV, Shlomchik M, Hannum L, Chervonsky A. 1999. Organogenic role of B-lymphocytes in mucosal immunity. *Science* 286: 1965-8
- 16) Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Bae S, Takenaka M, Yukami T, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Tedder TF, Sato S. 2009. CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR 4 signaling. *Am J Pathol* 175: 649- 60
- 17) Fagraeus A. 1948. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vivo. *J Immunol* 58: 1-13
- 18) Ehrlich WE, Drabkin DL, Forman C. 1949. Nucleic acids and the production of antibody by plasma cells. *J Exp Med* 90: 157- 68
- 19) Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications and information resources. *ILAR J* 46: 258- 86
- 20) Holländer GA. 2006. Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Auflage. *Urban & Fischer* Seite 39-43
- 21) Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 78-85
- 22) Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M. 2008. Janeway's Immunobiology. Seventh Edition. *Garland Science*. Seite 119,144,155,822
- 23) Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. 2006. Immunology. Seventh Edition. *Mosby Elsevier*. Seite 60
- 24) Hobart MJ, Rabbitts TH, Goodfellow PN, Solomon E, Chambers S, Spurr N, Povey S. 1981. Immunoglobulin heavy chain genes in humans are located on chromosome. *Ann Hum Genet* 45: 331-5
- 25) Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from the segments of DNA: VH, D, JH. *Cell* 19: 981-92
- 26) Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-23
- 27) Akamatsu Y, Tsurushita N, Nagawa F, Matsuoka M, Okazaki K, Imai M, Sakano H. 1994. Essential residues in V(D)J recombination signals. *J Immunol* 153: 4520-9

- 28) Tonegawa S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-81
- 29) Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, Coffman R, Rosenberg N, Tonegawa S, Baltimore D. 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *Embo J* 3: 1209-19
- 30) Nishimoto N, Kubagawa H, Ohno T, Gartland GL, Stankovic AK, Cooper MD. 1991. Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6284-8
- 31) Reth M. 1992. Antigen receptors on B- lymphocytes. *Anu Rev Immunol* 10: 97-121
- 32) Pernis B, Chiappino G, Kelus AS, Gell PGH. 1965. Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissue. *J exp med* 122: 853-76
- 33) Nussenzweig MC, Shaw AC, Sinn E, Danner DB, Holmes KL, Morse HC 3rd, Leder P. 1987. Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* 236: 816-9
- 34) Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. 1992. V(D)J Recombination: Molecular Biology and Regulation. *Annu Rev Immunol* 10: 359-83
- 35) Lafaille JJ, DeCloux A, Bonneville M, Takagi Y, Tonegawa S. 1989. Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59: 859-70
- 36) Lewis SM. 1994. P nucleotides, hairpin DNA and V(D)J joining: making the connection. *Semin Immunol* 6: 131-41
- 37) Komori T, Okada A, Stewart V, Alt FW. 1993. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of Tdt deficient lymphocytes. *Science* 261: 1171-5
- 38) Landau NR, Schatz DG, Rosa M, Baltimore D. 1987. Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol Cell Biol* 7: 3237-43
- 39) MacCarthy T, Kalis SL, Roa S, Pham P, Goodman MF, Scharff MD, Bergmann A. 2009. V-region mutation in vitro, in vivo, and in silico reveal the importance of the enzymatic properties of AID and the sequence environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8629-34

- 40) Adolph S, Hameister H, Zimmer FJ, Zachau HG. 1988. The Vk genes on human chromosome 22 are located at 22q11. *Nucleic Acids Res* 16: 6241
- 41) Barbié V, Lefranc MP. 1998. The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments. *Exp Clin Immunogenet* 15: 171-83
- 42) Weichhold GM, Ohnheiser R, Zachau HG. 1993. The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics* 16: 503-11
- 43) Huber C, Huber E, Lautner-Rieske A, Schäble KF, Zachau HG. 1993. The human immunoglobulin kappa locus. Characterization of the partially duplicated L regions. *Eur J Immunol* 23: 2860-7
- 44) Lautner-Rieske A, Huber C, Heindl A, Pargent W, Schäble KF, Thiebe R, Zocker I, Zachau HG. 1992. The human immunoglobulin kappa locus. Characterization of the duplicated A regions. *Eur J Immunol* 22: 1023-9
- 45) Pargent W, Meindl A, Thiebe R, Mitzel S, Zachau HG. 1991. The human immunoglobulin kappa locus characterization of the duplicated O regions. 1991. *Eu J Immunol* 21: 1821-7
- 46) Lefranc MP, Lefranc G. 2001. The Immunoglobulin Facts Book. *Academic Press*. Seite 46
- 47) Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y. 1988. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J* 13: 4141- 4150
- 48) Nossal GJ. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76: 229-39
- 49) Nossal GJV, Beverley LP. 1980. Clonal anergy: Persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1602-6
- 50) Halverson R, Torres RM, Pelanda R. 2004. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance towards membrane antigens. *Nat Immunol* 5: 645-50
- 51) Liu Y, Fan R, Zhou S, Yu Z, Zhang Z. 2005. Potential contribution of VH gene replacement in immunity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1062: 175-81
- 52) Meffre E, Papavasiliou F, Cohen P, de Bouteiller O, Bell D, Karasuyama H, Schiff C, Banchereau J, Liu YJ, Nussenzweig MC. 1998. Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J Exp Med* 188: 765-72

- 53) Girschick HJ, Grammer AC, Nanki T, Mayo M, Lipsky PE. 2001. RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood. *J Immunol* 166: 377-86
- 54) Allen CDC, Okada T, Cyster JG. 2007. Germinal center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27: 190-202
- 55) Siegenthaler W, Blum HE. 2006. Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage. *Thieme*.
- 56) Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. 1992. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T-cell dependent and T-cell independent antigens. *Eur J Immunol* 22: 615
- 57) Kroese FG, Timeus W, Nieuwenhuis P. 1990. Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol* 84: 103-48
- 58) Berek C, Berger A, Apel M. 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67: 1121-9
- 59) Jacob J, Kelsoe G, Rajewski K, Weiss U. 1991. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centers. *Nature* 354: 352-3
- 60) Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. 2000. B cell activation by T-cell independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenetic microorganisms. *Immunol Rev* 176: 154-70
- 61) Burnet FM. 1976. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin* 26: 119-21
- 62) Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S. 2008. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6. Auflage. *Springer*. Seite 53
- 63) Foreman AL, Van de Water J, Gougeon ML, Gershwin ME. 2007. B cells in autoimmune diseases: Insights from analyses of immunoglobulin variable (Ig V) gene usage. *Autoimmun Rev* 6: 387-401
- 64) Schröder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. 1996. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 221-5
- 65) Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C. 1998. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 102: 938-46

- 66) Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, Fernández- Fiqueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, Pujol-Borrell R. 2001. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol* 159: 861- 73
- 67) Sims GP, Shiono H, Willcox N, Scott DI. 2001. Somatic hypermutation and selection of B cells in thymic germinal centers responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *J Immunol* 167: 1935-44
- 68) Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. 1996. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 183: 1461- 72
- 69) Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. 2001. Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis. *J Immunol* 167: 1072- 80
- 70) Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. 1999. Plasma Cell Development in Synovial Germinal Centers in Patients with Rheumatoid and Reactive Arthritis. *J Immunol* 162: 3053-62
- 71) Hinks A, Eyre S, Ke X, Barton A, Martin P, Flynn E, Packham J, Worthington J, Thomson W. 2009. Overlap of disease susceptibility loci for rheumatoid arthritis (RA) and juvenile idiopathic arthritis (JIA). *Ann Rheum Dis. Epub* 2009 Aug 11
- 72) Robertson D, South M. 2007. Practical paediatrics. 6th Edition. *Elsevier Limited*.
- 73) Gregorio A, Gambini C, Gerloni V, Parafioriti A, Sormani MP, Gregorio S, De Marco G, Rossi F, Martini A Gattorno M. 2007. Lymphoid neogenesis in juvenile idiopathic arthritis correlates with ANA positivity and plasma cells infiltration. *Rheumatology* 46: 308-13
- 74) Morbach H. 2006. Analyse der Immunglobulinrepertoire-Veränderungen in B-Zellen von Kindern mit Autoimmunerkrankungen. URL: <http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2007/2535/>
- 75) Klein U, Rajewski A, Küppers R. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood b cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) b cells. *J Exp Med* 188: 1679-89
- 76) Avery DT, Ellyard JI, Mackay F, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tangye SG. 2005. Increased expression of CD27 on activated human memory b cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *J Immunol* 174: 4034-42

- 77) Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. 1990. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high resolution flow cytometry. *Blood* 76: 1739-47
- 78) Fecteau JF, Côté G, Néron S. 2006. A new memory Cd27-IgG⁺ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 177: 3728-36
- 79) Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, Lee EH, Milner EC, Sanz I. 2007. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178: 6624-33
- 80) Ehrhardt GRA, Hsu JT, Gartland L, Leu CM, Zhang S, Davis RS Cooper MD. 2005. Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J Exp Med* 202: 783-91
- 81) Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, Roby G, Kottlilil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW, Fauci AS. 2008. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 205: 1797-805.
- 82) Ganten D, Ruckpaul K, Gay S, Kalden JR. 2003. Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen. 1. Auflage. *Springer*. Seite 171-172
- 83) Foster S, Dörner T, Lipsky P. 1999. Targeting and subsequent selection of somatic hypermutations in the human V kappa repertoire. *Eur J Immunol* 29: 3122-32
- 84) Ettinger R, Sims GP, Robbins R, Withers D, Fischer RT, Grammer AC, Kuchen S, Lipsky PE. 2007. IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* 178: 2872-82.
- 85) Lanzavecchia A, Sallusto F. 2007. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol* 19: 268-74.
- 86) Cantaert T, Kolln J, Timmer T, van der Pouw Kraan TC, Vandooren B, Thurlings RM, Canete JD, Catrina AI, Out T, Verweij CL, Zhang Y, Tak PP, Baeten D. 2008. B lymphocyte autoimmunity in rheumatoid synovitis is independent of ectopic lymphoid neogenesis. *J Immunol* 181: 785-794

- 87) Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, Spencer J, Pitzalis C. 2009. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-Switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med* 6: 59-75
- 88) Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301: 1374-7.

8 Tabellen

Tabelle 20 (Seite 79): Patientin 1 und 2 – Gesamtübersicht der einzelnen Sequenzen innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen

Die Figur stellt eine Übersicht über die aus den Synovialflüssigkeitsproben zweier Patientinnen mit JIA gewonnenen Sequenzdaten dar. Aufgelistet sind die Sequenzen, die aus den CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ und CD19⁺CD27⁺CD38⁻ B-Zellen ermittelt werden konnten. Die Position der jeweiligen B-Zelle, deren Gensequenz ermittelt wurde, ist als Lochkoordinate einer 96-Loch-Platte angegeben. Es kann außerdem abgelesen werden, für welche Zellen die Sequenz der kappa Leichtkette, der schweren Kette oder für welche Zellen beide Gensequenzen ermittelt werden konnten. Aufgeführt sind außerdem die V, (D) und J Gensegmente der entsprechenden Sequenzen der leichten bzw. schweren Kette, sowie die Anzahl der Mutationen und die Länge der CDR3 Region der jeweiligen Sequenz.

Tabelle 24 (Seite 88): Übersicht über die B-Zellen mit Sequenzhomologien innerhalb einer Zellpopulation durch graphischen Vergleich der CDR3 Regionen

Dargestellt sind die Nukleotidabfolgen der CDR3 Regionen der B-Zellen, für die Sequenzhomologien innerhalb einer Zellpopulation gefunden werden konnten. Die Zellen mit Sequenzhomologien wurden einander innerhalb ihrer Zellpopulation (CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-}, CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ und CD19⁺CD27⁺CD38⁻) gegenübergestellt und so vergleichbar gemacht. Elliptische Markierungen stellen Mutationen der Nukleotidsequenz dar. Die ursprünglichen Nukleotide der Keimbahnsequenz sind als schwarze Lettern innerhalb der Ellipsen angegeben.

Tabelle 25 (Seite 91): Gensequenzen der Zellen mit Populations-übergreifenden Sequenzhomologien im Vergleich zur Keimbahngensequenz

Aufgeführt sind die Nukleotidabfolgen der Gensequenzen der B-Zellen, deren Sequenzhomologien mehrere Populationen umspannten. Die Gensequenzen der einzelnen Zellen wurden einander gegenübergestellt und mit der jeweilig zugrunde liegenden Keimbahnsequenz verglichen. Zur Keimbahnsequenz identische

Nukleotidabfolgen sind als Punkte dargestellt. Mutationen wurden durch die entsprechenden Nukleobasen (A,C,G,T) kenntlich gemacht.

Tabelle 20: Patientin 1 - Gesamtübersicht der einzelnen Sequenzen innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen

| Position in der 96-Loch Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|---|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} | | | | | | | | | |
| A3 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| A5 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 9 | 27 | . | . | . | . | . |
| A6 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 7 | 27 | . | . | . | . | . |
| A11 | B3 (Vk 4) | Jk 5 | 6 | 27 | . | . | . | . | . |
| B9 | . | . | . | . | 3-23*01 | 3-22*01 | 4*01 | 5 | 57 |
| C1 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| C2 | L8 (Vk 1) | Jk 2 | 1 | 27 | . | . | . | . | . |
| C10 | . | . | . | . | 3-30*03 | 3-22*01 | 4*03 | 1 | 69 |
| D1 | A30 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| D3 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 18 | 30 | . | . | . | . | . |
| D4 | . | . | . | . | 3-30*03 | 6-13*01 | 2*01 | 1 | 51 |
| E2 | L8 (Vk 1) | Jk 5 | 9 | 33 | . | . | . | . | . |
| E3 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 0 | 24 | . | . | . | . | . |
| E4 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 3 | 27 | . | . | . | . | . |
| E5 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| E11 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 0 | 27 | 3-49*03 | 6-13*01 | 6*02 | 0 | 54 |
| F1 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| F3 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 1 | 30 | . | . | . | . | . |
| F4 | L8 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| F7 | . | . | . | . | 3-30*04 | 6-13*01 | 5*02 | 0 | 54 |
| F8 | L2 (Vk 3) | Jk 5 | 3 | 30 | . | . | . | . | . |
| F11 | L5/L19 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| G3 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 1 | 30 | . | . | . | . | . |
| G6 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| G7 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| G9 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 0 | 33 | . | . | . | . | . |

| Position in der 96-Loch Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|---|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| G11 | L8 (Vk 1) | Jk 5 | 1 | 33 | . | . | . | . | . |
| H3 | A27 (Vk 3) | Jk2 | 1 | 30 | 3-30*03 | 6-13*01 | 4*03 | 3 | 42 |
| H4 | L8 (Vk 1) | Jk 4 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| H5 | L8 (Vk 1) | Jk 1 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| H11 | A 27 (Vk 3) | Jk 2 | 2 | 24 | . | . | . | . | . |
| CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ | | | | | | | | | |
| A2 | L12 (Vk 1) | Jk 5 | 13 | 24 | 5-51*01 | 3-22*01 | 4*01 | 13 | 54 |
| A3 | . | . | . | . | 3-53*01 | 6-13*01 | 5*02 | 1 | 36 |
| A4 | . | . | . | . | 1-46*01 | 2-02*01 | 6*02 | 0 | 81 |
| A5 | . | . | . | . | 3-23*01 | 3-10*01 | 6*02 | 5 | 60 |
| A6 | A17 (Vk 2) | Jk 5 | 0 | 27 | 3-64*01 | 3-22*01 | 4*01 | 0 | 69 |
| A7 | . | . | . | . | 4-04*01 | 2-21*02 | 5*02 | 1 | 42 |
| A8 | . | . | . | . | 3-48*03 | 6-13*01 | 4*01 | 20 | 54 |
| A10 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 3 | 0 | 21 | 3-33*01 | 7-27*01 | 6*02 | 10 | 45 |
| A11 | L5 (Vk 1) | Jk 4 | 14 | 27 | 3-07*01 | 5-24*01 | 6*02 | 15 | 81 |
| A12 | . | . | . | . | 3-23*01 | 3-22*01 | 6*02 | 4 | 63 |
| B1 | . | . | . | . | 3-23*01 | 5-12*01R | 3*02 | 5 | 39 |
| B2 | L1 (Vk 1) | Jk 5 | 6 | 27 | 3-21*01 | 2-02*02 | 6*02 | 5 | 69 |
| B3 | L2 (Vk 3) | Jk 2 | 0 | 33 | 3-74*01 | 3-22*01 | 3*02 | 10 | 48 |
| B4 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 1 | 6 | 27 | 3-21*01 | 4/OR15-4 | 4*03 | 13 | 42 |
| B5 | L5 (Vk 1) | Jk 4 | 14 | 27 | 3-07*01 | 5-24*01 | 6*02 | 15 | 81 |
| B6 | . | . | . | . | 4-39*06 | 6-06*01 | 6*02 | 1 | 45 |
| B8 | L5 (Vk 1) | Jk 4 | 14 | 27 | 3-07*01 | 5-24*01 | 6*02 | 15 | 81 |
| B9 | . | . | . | . | 3-43*01 | 2-21*02 | 4*01 | 2 | 42 |
| B10 | . | . | . | . | 4-59*01 | 5-12*01R | 4*01 | 13 | 33 |
| B11 | L1 (Vk 1) | Jk 4 | 11 | 27 | 4-34*01 | 6-19*01 | 4*03 | 20 | 57 |
| B12 | A30 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 27 | 3-49*03 | 6-19*DIR | 4*01 | 0 | 27 |
| C1 | . | . | . | . | 1-18*01 | 3-16*02 | 4*01 | 10 | 33 |
| C2 | B3 (Vk 4) | Jk 5 | 11 | 27 | . | . | . | . | . |
| C3 | L5 (Vk 1) | Jk 4 | 14 | 27 | 3-07*01 | 5-24*01 | 6*02 | 15 | 81 |

| Position in der 96-Loch Platte | Vkappa Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| C4 | . | . | . | . | 3-30*3*01 | 6-19*01 | 4*03 | 8 | 45 |
| C6 | . | . | . | . | 1-46*01 | 4-17*01 | 4*01 | 16 | 54 |
| C8 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 1 | 30 | 3-66*01 | 3-10*01 | 6*02 | 2 | 57 |
| C9 | L8 (Vk 1) | Jk 5 | 11 | 27 | 3-30*03 | 2-08*01 | 4*03 | 17 | 30 |
| C10 | . | . | . | . | 3-66*01 | 5/OR15-5 | 2*01 | 5 | 39 |
| C11 | . | . | . | . | 3-23*01 | 1-26*01 | 4*01 | 12 | 45 |
| D2 | . | . | . | . | 2-70*11 | 4-17*01 | 6*02 | 9 | 78 |
| D4 | A30 (Vk 1) | Jk 2 | 1 | 27 | 1-46*01 | 7-27*01 | 4*03 | 12 | 36 |
| D5 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 1 | 30 | 3-30*03 | 2-15*01R | 4*01 | 1 | 33 |
| D6 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 14 | 27 | 3-30*03 | 3-16*02R | 4*01 | 12 | 39 |
| D8 | L1 (Vk 1) | Jk 2 | 1 | 27 | 3-73*01 | DIR*01 | 4*01 | 0 | 36 |
| D9 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 0 | 30 | 3-30*03 | 2-02*01 | 4*03 | 0 | 51 |
| D10 | A19/A3 (Vk 2) | Jk 2 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| E1 | L5 (Vk 1) | Jk 4 | 14 | 27 | 3-07*01 | 5-24*01 | 6*02 | 15 | 81 |
| E2 | . | . | . | . | 5-51*01 | 2-15*01 | 4*01 | 10 | 42 |
| E3 | . | . | . | . | 3-66*01 | 5/OR15-5 | 2*01 | 6 | 39 |
| E4 | . | . | . | . | 3-30*03 | 2-02*02 | 6*02 | 7 | 63 |
| E5 | L5 (Vk 1) | Jk 4 | 14 | 27 | 3-07*01 | 5-24*01 | 6*02 | 15 | 81 |
| E6 | . | . | . | . | 5-51*01 | 2/OF15-2 | 1*01 | 17 | 57 |
| E10 | B3 (Vk 4) | Jk 2 | 7 | 27 | . | . | . | . | . |
| F1 | . | . | . | . | 3-21*01 | 2-02*01 | 4*02 | 0 | 45 |
| F2 | . | . | . | . | 1-03*01 | 1-20*01R | 5*02 | 14 | 48 |
| F3 | . | . | . | . | 1-18*01 | DIR1*01R | 4*01 | 31 | 51 |
| F4 | . | . | . | . | 4-59*01 | 4-23*01 | 4*01 | 25 | 33 |
| F6 | . | . | . | . | 4-b*02 | 5-24*01 | 1*01 | 21 | 27 |
| F7 | . | . | . | . | 3-33*03 | 3-22*01 | 4*01 | 8 | 78 |
| F8 | . | . | . | . | 1-69*04 | 3-03*01R | 6*02 | 5 | 42 |
| F9 | . | . | . | . | 3-30*03 | 3-09*01 | 3*02 | 2 | 51 |
| F10 | . | . | . | . | 4-61*02 | 2-21*02 | 6*02 | 22 | 51 |
| F11 | . | . | . | . | 3-23*01 | 3-10*01 | 6*02 | 5 | 60 |
| G2 | L5 (Vk 1) | Jk 4 | 8 | 27 | 1-03*01 | 3-03*01 | 3*02 | 17 | 51 |

| Position in der 96-Loch Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|---|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| G3 | . | . | . | . | 3-30*03 | 6-13*01 | 3*02 | 8 | 45 |
| G4 | A30 (Vk 1) | Jk 2 | 1 | 27 | 3-49*03 | 6-19*01R | 4*01 | 1 | 27 |
| G5 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| G6 | . | . | . | . | 1-46*01 | 5/0R15-5R | 4*02 | 14 | 45 |
| G7 | . | . | . | . | 5-51*01 | 2/OF15-2 | 1*01 | 17 | 57 |
| G8 | L8 (Vk 1) | Jk 5 | 7 | 27 | 4-34*01 | 6-19*01 | 3*02 | 22 | 57 |
| G9 | . | . | . | . | 4-b*02 | 3-22*01 | 4*01 | 25 | 30 |
| G10 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 1 | 30 | . | . | . | . | . |
| G11 | A30 (Vk 1) | Jk 4 | 8 | 27 | . | . | . | . | . |
| H1 | . | . | . | . | 4-04*01 | 6-13*01 | 5*02 | 21 | 45 |
| H2 | . | . | . | . | 3-74*01 | 1-01*01 | 4*03 | 10 | 33 |
| H4 | . | . | . | . | 4-61*02 | 5-05*01 | 3*02 | 3 | 45 |
| H6 | . | . | . | . | 3-33*01 | 1-01*01 | 4*01 | 3 | 39 |
| H7 | . | . | . | . | 3-21*01 | 5-05*01 | 4*01 | 5 | 45 |
| H8 | L8 (Vk 1) | Jk 5 | 11 | 27 | 3-30*03 | 2-08*01 | 4*03 | 17 | 30 |
| H9 | . | . | . | . | 3-30*03 | 6-13*01 | 4*01 | 0 | 48 |
| H10 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 13 | 27 | 3-21*01 | 4-17*01 | 6*02 | 15 | 63 |
| CD19⁺CD27⁺CD38⁻ | | | | | | | | | |
| A1 | L6 (Vk 3) | Jk 4 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| A2 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 5 | 30 | . | . | . | . | . |
| A5 | A27 (Vk3) | Jk2 | 9 | 30 | . | . | . | . | . |
| A7 | A19/A3 (Vk 2) | Jk 4 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| A8 | L8 (Vk 1) | Jk 5 | 9 | 33 | . | . | . | . | . |
| A9 | L12 (Vk 1) | Jk 4 | 3 | 27 | . | . | . | . | . |
| B2 | B3 (Vk 4) | Jk 5 | 6 | 27 | . | . | . | . | . |
| B7 | B3 (Vk4) | Jk2 | 7 | 27 | . | . | . | . | . |
| B8 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 4 | 27 | . | . | . | . | . |
| C2 | A27 (Vk3) | Jk2 | 6 | 30 | . | . | . | . | . |
| C3 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 6 | 27 | . | . | . | . | . |

| Position in der 96-Loch Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|--------------------------------|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| C8 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| D10 | L12 (Vk 1) | Jk 4 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| E8 | L6 (Vk 3) | Jk 2 | 0 | 33 | . | . | . | . | . |
| F1 | A30 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| G3 | L12 (Vk 1) | Jk 5 | 17 | 27 | . | . | . | . | . |
| G4 | B3 (Vk 4) | Jk 2 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| G7 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 1 | 27 | . | . | . | . | . |
| H5 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| H6 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| H11 | L 2 (Vk 3) | Jk 2 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |

Patientin 2 - Gesamtübersicht der einzelnen Sequenzen innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen

| Position in der 96-Loch Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|---|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| CD19⁺CD27⁻CD38^{+/-} | | | | | | | | | |
| A1 | . | . | . | . | 5-a*01 | 6-25*01 | 4*03 | 2 | 27 |
| A4 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 1 | 12 | 27 | . | . | . | . | . |
| A5 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 1 | 3 | 27 | . | . | . | . | . |
| A8 | . | . | . | . | 4-30-2*01 | 4-17*01 | 2*01 | 0 | 30 |
| A10 | L12 (Vk 1) | Jk2 | 0 | 24 | . | . | . | . | . |
| A11 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 8 | 30 | . | . | . | . | . |
| B3 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| B5 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 6 | 30 | . | . | . | . | . |
| B6 | A 27 (Vk 3) | Jk 2 | 14 | 24 | . | . | . | . | . |
| B9 | A17 (Vk 2) | Jk 4 | 10 | 33 | . | . | . | . | . |
| B12 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| C3 | L6 (Vk 3) | Jk 2 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| C4 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 6 | 27 | . | . | . | . | . |
| C7 | B3 (Vk 4) | Jk 4 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| C8 | L12 (Vk 1) | Jk 5 | 1 | 27 | 5-a*01 | 3-22*01 | 6*02 | 1 | 54 |
| C9 | A30 (Vk 1) | Jk2 | 11 | 27 | . | . | . | . | . |
| D2 | . | . | . | . | 3-23*01 | 3-16*02 | 4*02 | 10 | 51 |
| D5 | L2 (Vk 3) | Jk 5 | 6 | 27 | . | . | . | . | . |
| D7 | . | . | . | . | 1-18*01 | 6-25*01 | 6*03 | 11 | 42 |
| D8 | L12 (Vk 1) | Jk 1 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| D9 | . | . | . | . | 1-03*01 | 5-24*01 | 4*01 | 5 | 48 |
| D11 | L12 (Vk 1) | Jk 4 | 7 | 27 | . | . | . | . | . |
| E1 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| E2 | A20 (Vk 1) | Jk 4 | 6 | 27 | . | . | . | . | . |
| E4 | . | . | . | . | 1-69*01 | 2-08*01 | 4*01 | 21 | 69 |
| E5 | A20 (Vk 1) | Jk 4 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |

| Position in der 96-Loch Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|---|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| E9 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 4 | 30 | . | . | . | . | . |
| F1 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 5 | 12 | 27 | . | . | . | . | . |
| F2 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 1 | 27 | . | . | . | . | . |
| F3 | . | . | . | . | 3-23*01 | 3-03*01 | 4*01 | 20 | 45 |
| F7 | L12 (Vk 1) | Jk 1 | 0 | 33 | 1-18*01 | 2-15*01 | 4*02 | 1 | 54 |
| F10 | . | . | . | . | 5-a*01 | 6-13*01 | 5*01 | 7 | 45 |
| G1 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| G2 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 4 | 30 | . | . | . | . | . |
| G5 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 4 | 30 | . | . | . | . | . |
| G9 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 1 | 12 | 27 | . | . | . | . | . |
| H1 | L16 (Vk 3) | Jk 3 | 1 | 30 | . | . | . | . | . |
| H2 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 3 | 27 | 3-23*01 | 2-15*01 | 4*01 | 4 | 45 |
| H3 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| H7 | A 27 (Vk 3) | Jk 2 | 8 | 27 | . | . | . | . | . |
| CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ | | | | | | | | | |
| B9 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 0 | 27 | . | . | . | . | . |
| C2 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 9 | 27 | 1-69*06 | 2-02*01R | 6*03 | 18 | 57 |
| C3 | . | . | . | . | 3-53*01 | 5-05*01 | 4*03 | 10 | 39 |
| C11 | . | . | . | . | 4-30-2*01 | 2-21*02 | 3*02 | 18 | 60 |
| D2 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 2 | 10 | 30 | . | . | . | . | . |
| E4 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 9 | 27 | . | . | . | . | . |
| E11 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 3 | 24 | . | . | . | . | . |
| F3 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 8 | 30 | 3-30*09 | 6-06*01R | 6*03 | 18 | 60 |
| F6 | . | . | . | . | 4-61*02 | 2-02*03 | 6*03 | 9 | 60 |
| F11 | L6 (Vk 3) | Jk 4 | 11 | 33 | . | . | . | . | . |
| G2 | L5/L19 (Vk 1) | Jk 4 | 10 | 27 | . | . | . | . | . |
| G3 | A19/A3 (Vk 2) | Jk 2 | 4 | 27 | 4-34*01 | 6-19*01 | 4*03 | 23 | 54 |
| G10 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 1 | 27 | 1-69*06 | 3-10*01 | 4*03 | 2 | 42 |
| H6 | . | . | . | . | 1-18*01 | 6-19*01 | 4*01 | 8 | 45 |

| Position in der 96-Loch Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|---|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| CD19⁺CD27⁺CD38⁻ | | | | | | | | | |
| A1 | L6 (Vk 3) | Jk 2 | 4 | 24 | . | . | . | . | . |
| A2 | A27 (Vk 3) | Jk 2 | 8 | 30 | . | . | . | . | . |
| A3 | B3 (Vk 4) | Jk 2 | 18 | 27 | . | . | . | . | . |
| A4 | A27 (Vk 3) | Jk 4 | 16 | 27 | . | . | . | . | . |
| A11 | L6 (Vk 3) | Jk 2 | 4 | 30 | . | . | . | . | . |
| A12 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| B1 | . | . | . | . | 3-07*01 | 3-10*01 | 4*01 | 17 | 45 |
| B3 | . | . | . | . | 3-23*01 | 1-26*01 | 4*03 | 8 | 39 |
| B4 | . | . | . | . | 3-21*01 | 1-26*01 | 3*02 | 17 | 57 |
| B6 | A17 (Vk 2) | Jk 2 | 8 | 27 | . | . | . | . | . |
| C3 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 8 | 27 | 3-23*01 | 1-26*01 | 4*03 | 8 | 39 |
| C4 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| C8 | L6 (Vk 3) | Jk 5 | 9 | 30 | 3-21*01 | 3-22*01 | 4*02 | 25 | 48 |
| C10 | L12 (Vk 1) | Jk 4 | 16 | 27 | . | . | . | . | . |
| D2 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 9 | 27 | . | . | . | . | . |
| D4 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 1 | 20 | 27 | . | . | . | . | . |
| D6 | . | . | . | . | 3-33*01 | DIR1*01 | 5*01 | 0 | 42 |
| D7 | B3 (Vk 4) | Jk 4 | 3 | 27 | . | . | . | . | . |
| D11 | L2 (Vk 3) | Jk 2 | 2 | 27 | 5-51*01 | 6-13*01 | 6*03 | 12 | 69 |
| E6 | . | . | . | . | 1-18*01 | 6-06*01R | 2*01 | 16 | 27 |
| E8 | L2 (Vk 3) | Jk 4 | 5 | 30 | . | . | . | . | . |
| E10 | O18/O8 (Vk 1) | Jk 4 | 12 | 24 | . | . | . | . | . |
| F2 | O14/O4 (Vk 1) | Jk 2 | 0 | 30 | . | . | . | . | . |
| F6 | . | . | . | . | 4-61*01 | 5-05*01 | 6*02 | 15 | 87 |
| F9 | A27 (Vk 3) | Jk2 | 14 | 27 | . | . | . | . | . |
| F10 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 7 | 27 | . | . | . | . | . |
| G1 | A27 (Vk 3) | Jk 1 | 6 | 27 | . | . | . | . | . |
| G2 | L5 /L19 (Vk 1) | Jk 4 | 13 | 27 | . | . | . | . | . |

| Position in der 96-Loch-Platte | V _{kappa} Gensegment (Familie) | J _{kappa} Familie | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge | V _{schwere Kette} Gensegment | D _{schwere Kette} Gensegment | J _{schwere Kette} Gensegment | Anzahl der Mutationen | CDR3 Länge |
|--------------------------------|---|----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| G3 | L2 (Vk 3) | Jk 2 | 12 | 30 | . | . | . | . | . |
| G4 | L2 (Vk 3) | Jk 2 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| G5 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 5 | 27 | . | . | . | . | . |
| G6 | L11 (Vk 1) | Jk 4 | 17 | 27 | 3-23*01 | 3-10*01 | 4*02 | 12 | 54 |
| G7 | L12 (Vk 1) | Jk 1 | 7 | 27 | . | . | . | . | . |
| G8 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| G9 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 2 | 27 | . | . | . | . | . |
| H1 | A27 (Vk 3) | Jk 5 | 19 | 27 | . | . | . | . | . |
| H2 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 4 | 11 | 27 | . | . | . | . | . |
| H3 | L12 (Vk 1) | Jk 2 | 16 | 33 | . | . | . | . | . |
| H7 | O18/O8 (Vk 1) | Jk5 | 1 | 24 | . | . | . | . | . |
| H8 | B3 (Vk 4) | Jk 2 | 8 | 24 | . | . | . | . | . |
| H11 | O12/O2 (Vk 1) | Jk 2 | 10 | 27 | . | . | . | . | . |

Tabelle 24: Übersicht über die B-Zellen mit Sequenzhomologien innerhalb einer Zellpopulation durch graphischen Vergleich der CDR3 Regionen

CD19⁺CD27⁺CD38^{+/-}

| Zelle | leichte Kette | Zelle | schwere Kette |
|--|---|-------|---------------|
| CD27 ⁻ 2K1-A3_VKN-1 | TGT CAA CAG TAT GAT AAT CTG CCT CTC ACT TTC | | |
| CD27 ⁻ 2K1-F1_VKN-1 | TGT CAA CAG TAT GAT AAT CTG CCT CTC ACT TTC | | |
| CD27 ⁻ 2/Vk3/F3_Vk3 | TGT CAG TAT GGT AGC TCA CGT CGG GAC ACT TTT | | |
| CD27 ⁻ 2/Vk3/G3_Vk3 | TGT CAG TAT GGT AGC TCA CGT CGG GAC ACT TTT | | |
| CD27 ⁻ 2/Vk3/H3_Vk3 | TGT CAG TAT GGT AGC TCA CGT CGG GAC ACT TTT | | |
| CD27 ⁻ 2K1-A5_VKN-1 | TGT CAA CAG AGT TAC AGT AGC CCC CTC ACT TTC | | |
| CD27 ⁻ 2K1-G7_VKN-1 | TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCC CTC ACT TTC | | |
| CD27 ⁻ II/Vk1/E5_Vkappa1 | TGT CAA AAG TAT AAC AGT GCC CCG CTC ACT TTC | | |
| CD27 ⁻ II/Vk1/E2_Vkappa1 | TGT CAA AAG TAT AAC AGT GCC CCG CTC ACT TTC | | |
| CD27 ⁻ II/Vk1/A4_Vkappa1 | TGT CAA CAG AGT TTC AGG ACT TCT CGG ACG TTC | | |
| CD27 ⁻ II/Vk1/G9_Vkappa1 | TGT CAA CAG AGT TTC AGG ACT TCT CGG ACG TTC | | |
| CD27 ⁻ II/Vk3/E9_Vkappa3 | TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT CCT CTC ACC TTC | | |
| CD27 ⁻ II/Vk3/G2_Vkappa3 | TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT CCT CTC ACC TTC | | |

∞

Markierungen: Mutationen der Nukleotidsequenz, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, CDR3: Complementary Determining Region 3

CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺

| Zelle | leichte Kette | Zelle | schwere Kette |
|---------------------------------------|--|--|--|
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/A11_VKN-1 | ↗ CDR3 TGT CAA CAG CT AAC AGT TTC CCT CGT TTC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/A11_VHN3 | TGT GCA AGA // TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/B5_VKN-1 | TGT CAA CAG CT AAC AGT TTC CCT CGT TTC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/B5_VHN3 | TGT GCA AGA // TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/B8_VKN-1 | TGT CAA CAG CT AAC AGT TTC CCT CGT TTC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/8B_VHN3 | TGT GCA AGA // TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/C3_VKN-1 | TGT CAA CAG CT AAC AGT TTC CCT CGT TTC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/3C_VHN3 | TGT GCA AGA // TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/E1_VKN-1 | TGT CAA CAG CT AAC AGT TTC CCT CGT TTC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/E1_VHN3 | TGT GCA AGA // TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/E5_VKN-1 | TGT CAA CAG CT AAC AGT TTC CCT CGT TTC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/E5_VHN3 | TGT GCA AGA // TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/B12_VKN-1 | TGT CTA CAG CAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/G4_VHN3 | TGT ACT AGA GTG CGC ACC AGC CCG GGC TAC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/G4_VKN-1 | TGT CTA CAG CAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/B12_VHN3 | TGT ACT AGA GTG CGC ACC AGC CCG GGC TAC TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/C9_VKN-1 | TGT CAA CAG CTT AAT AGT TAT CCG ATA ACC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/9C_VHN3 | TGT GCG AGA // GAT ATT GGC CCT TTT GAC TAT TGG |
| CD27 ⁺⁺ 1/Vk1/H8_VKN-1 | TGT CAA CAG CTT AAT AGT TAT CCG ATA ACC TTC | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/H8_VHN3 | TGT GCG AGA // GAT ATT GGC CCT TTT GAC TAT TGG |
| | | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/C10_VHN3 | TGT GCG AGA // TGG TAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG |
| | | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/3E_VHN3 | TGT GCG AGA // TGG TAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG |
| | | CD27 ⁺⁺ HPB/VH1/E6_VHN1 | TGT GCG AGA // TCG CCT GAG TAC TTC CAA CAC TGG |
| | | CD27 ⁺⁺ HPB/VH1/G7_VHN1 | TGT GCG AGA // TCG CCT GAG TAC TTC CAA CAC TGG |
| | | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/A5_VHN3 | TGT GCG AAG // TTC TAC TAC GGT TTG GAC GTC TGG |
| | | CD27 ⁺⁺ HPB/VH3/F11_VHN3 | TGT GCG AAG // TTC TAC TAC GGT TTG GAC GTC TGG |

68

Markierungen: Mutationen der Nukleotidsequenz, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, CDR3: Complementary Determining Region 3
 //: in der graphischen Darstellung ausgelassene nicht-mutierte Nukleotide

CD19⁺CD27⁺CD38⁻

| Zelle | leichte Kette | Zelle | schwere Kette |
|--|---|--|---|
| <p>CD27⁺ III/Vk3/D11_Vkappa3</p> <p>CD27⁺ III/Vk3/G4_Vkappa3</p> | <p>↗ CDR3</p> <p>TGC CAG CAG TAT AAT AAC TGG CCG TAC ACT TTT</p> <p>CDR3 ↖</p> <p>TGC CAG CAG TAT AAT AAC TGG CCG TAC ACT TTT</p> | <p>CD27⁺ RM/VH3/C3_VH3</p> <p>CD27⁺ RM/VH3/B3_VHN3</p> | <p>TGC GCC TCA // GGG AGC CGA GCT TTA GAG TAC TGG</p> <p>TGC GCC TCA // GGG AGC CGA GCT TTA GAG TAC TGG</p> |

Markierungen: Mutationen der Nukleotidsequenz, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, CDR3: Complementary Determining Region 3
 //: in der graphischen Darstellung ausgelassene nicht-mutierte Nukleotide

Tabelle 25: Gensequenzen der Zellen mit Populations-übergreifenden Sequenzhomologien im Vergleich zur Keimbahngensequenz

Zellgruppe 1 (Klon1):

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 | |
|--------------------|---------------------------------------|--|------------------------------------|--------------------|
| | 30 31 31a 32 33 34 35 36 | 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 | 88 89 90 91 92 93 94 95 96 | |
| A27 | // AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC // | ATC TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC // | TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCT CC | Keimbahnsequenz |
| II/Vk3/A11_Vkappa3 | //A.T. // |A.G. // |C .T.G | Naive B-Zelle |
| I/Vk6/F3_Vkappa6 | //A.T. // |A.G. // |C .T.G | Plasmablast |
| III/Vk3/A2_Vkappa3 | //A.T. // |A.G. // |C .T.G | Gedächtnis B-Zelle |

Zellgruppe 2 (Klon 2):

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 | |
|--------------|---------------------------------------|---|---|--------------------|
| | 29 30 31 32 33 34 35 36 | 42 43 44 45 50 51 52 53 54 55 56 63 | 88 89 90 91 92 93 94 95 96 | |
| L8 | // ATT AGC AGT TAT TTA GCC TGG TAT // | AAA GCC CCT AAG // GCT GCA TCC ACT TTG CAA AGT // | AGC // TGT CAA CAG CTT AAT AGT TAC CCT CC | Keimbahnsequenz |
| 2K1-E2_VKN-1 | // ... GC.G.GC. // |C. // | TA. .C. | Naive B-Zelle |
| 3/Vk1/A8_Vk1 | // ... GC.G.GC. // |C. // | TA. .C. | Gedächtnis B-Zelle |

Zellgruppe 3 (Klon 3):

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 | |
|-----------------|---------------------------------------|---|------------------------------------|-----------------|
| | 27 28 29 30 31 32 33 34 | 39 40 41 42 50 51 52 53 54 55 56 | 88 89 90 91 92 93 94 95 96 | |
| O18/O8 | // CAG GAC ATT AGC AAC TAT TTA AAT // | AAA CCA GGG AAA // GAT GCA TCC AAT TTG GAA ACA // | TGT CAA CAG TAT GAT AAT CTC CCT CC | Keimbahnsequenz |
| 2K1-C1_VKN-1 | //GA // |G..A // |C.. | Naive B-Zelle |
| 1/Vk1/G10_VKN-1 | // ..AA // |G..A // |C.. | Plasmablast |

Zellgruppe 4 (Klon 4):

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 | |
|--------------------|---------------------------------|--|--|--------------------|
| | 29 30 31 32 33 34 38 41 | 50 51 52 53 54 55 56 61 76 | 88 89 90 91 92 93 94 95 96 | |
| O12/O2 | // ATT AGC AGC TAT TTA AAT // | CAG // GGG // GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT // | AGG // AGC // TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CC | Keimbahnsequenz |
| I/Vk1/E4_Vkappa1 | //G ..T .C.A // |G..A // |C.. | Plasmablast |
| III/Vk1/C3_Vkappa1 | //G ..T .C.A // |G..A // |C.. | Gedächtnis-B-Zelle |

Zellgruppe 5 (Klon 5):

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 | |
|-----------------|---|--------------------------------|--|--------------------|
| | 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 | 50 51 52 53 54 55 56 87 88 | 89 90 91 92 93 94 95 96 | |
| A30 | // ATT AGA AAT GAT TTA GCC TGG TAT CAG CAG // | GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT // | TAC TGT CTA CAG CAT AAT AGT TAC CCT CC | Keimbahnsequenz |
| 1/Vk1/G4_VKN-1 | //C // |C // | | Plasmablast |
| 1/Vk1/B12_VKN-1 | //C // |C // | | Plasmablast |
| 3/Vk1/F1_Vk1 | //C // |C // | | Gedächtnis-B-Zelle |

**A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, CDR1-3: Complementary Determining Region 1-3
//: in der graphischen Darstellung ausgelassene nicht-mutierte Nukleotide**

Zellgruppe 6 (Klon 6):

| | ----- CDR1 ----- | | | | | | | | | | ----- CDR2 ----- | | | | | | | | ----- CDR3 ----- | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|------------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|--------------------|----------------------|------------------------|
| | 31 | 31a | 31c | 31d | 31e | 31f | 32 | 45 | 46 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | | | | | | |
| B3 | // | TAC | AGC | // | AAC | AAT | AAG | AAC | TAC | // | AAG | CTG | // | TGG | GCA | TCT | ACC | CGG | GAA | TCC | // | TAC | TGT | CAG | CAA | TAT | TAT | AGT | ACT | CCT | CC | <i>Keimbahnsequenz</i> |
| 2/Vk4/A11_Vk4 | // | .T. | ... | // | .T. | ... | ... | ... | ... | // | ... | T.. | // | ... | ... | ... | ... | ..G | ... | // | C.. | ... | ... | ... | ... | .T. | G.. | ... | ... | .. | <i>Naive B-Zelle</i> | |
| 1K4-C2_VKN-4 | // | .C. | ..A | // | .G. | ... | .G. | .G. | A.. | // | ..A | ... | // | ... | ... | ... | ... | ... | ..T. | // | ... | ... | ..A | ... | ... | ..A | ... | ..T. | .. | <i>Plasmablast</i> | | |

Zellgruppe 7 (Klon 7):

| | ----- CDR1 ----- | | | | | | | | | | ----- CDR2 ----- | | | | | | | | ----- CDR3 ----- | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------|-----|----|------------------------|
| | 31c | 31d | 31e | 31f | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 85 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | | | | | |
| B3 | // | AAC | AAT | AAG | AAC | TAC | TTA | GCT | TGG | TAC | CAG | // | TAC | TGG | GCA | TCT | ACC | CGG | GAA | TCC | // | GTT | // | CAG | CAA | TAT | TAT | AGT | ACT | CCT | CC | <i>Keimbahnsequenz</i> |
| 1K4-E10_VKN-4 | // | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | GT. | // | .C. | ... | ... | ... | ... | ... | ... | // | A.. | // | ... | ... | ... | ... | G.. | C.. | .. | <i>Plasmablast</i> | | | |
| 3/Vk4/B7_Vkappa4 | // | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..T | GT. | // | .C. | ... | ... | ... | ... | ... | ... | // | A.. | // | ... | ... | ... | ... | G.. | C.. | .. | <i>Gedächtnis-B-Zelle</i> | | | |

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T:Thymin, CDR1-3: Complementary Determining Region 1-3
 //: in der graphischen Darstellung ausgelassene nicht-mutierte Nukleotide

Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H. J. Girschick danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und für seinen ansteckenden Enthusiasmus.

Besten Dank auch an Dr. med. H. Morbach für sein stets offenes Ohr, seine konsequente Unterstützung und fachliche Kompetenz.

Die Zusammenarbeit im Labor war mir immer eine willkommene Abwechslung zum Studienalltag und hat viel Freude bereitet! Danke!

Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Lutz bin ich für die Übernahme des Koreferates dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. Ch. P. Speer, dem Direktor der Universitäts-Kinderklinik möchte ich für die Überlassung der Laborräumlichkeiten danken.

Vielen Dank auch an das gesamte Laborteam, dessen Hilfsbereitschaft und Unterstützung ich sehr zu schätzen weiß.