

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

**Die Entwicklung des V_k-Immunglobulinrepertoire in Keimzentren der
Tonsille**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Carron Claire Elizabeth Johnson
aus Lohr am Main

Würzburg, März 2004

Referent: Privatdozent Dr. H. Girschick

Korreferentin: Professor Dr. A. Schimpl

Dekan: Professor Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2004

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine schottische Großmutter und Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Wittstadt (+ 2003),
die zwar nichts von Immunologie, aber viel vom Leben verstehen.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Einführung in die Grundstruktur des menschlichen Immunsystems	1
1.2 Der Aufbau des κ -Locus	2
1.3 Die Variabilität der V-J-Schnittstelle in Rearrangements	4
1.4 Grundlagen über die Tonsille	9
2. Materialien und Methoden	11
2.1 Allgemeine Vorgehensweise bei der Datengewinnung für die vorliegende Arbeit	11
2.2 Die PCR-Vermehrung der DNA aus den einzelnen Zellen	12
2.3 Die PCR-Vermehrung der RNA aus den einzelnen Zellen	13
2.4 Die Gensequenzanalyse	13
2.5 Die Auswertungsstrategie	14
2.6 Die statistischen Methoden	16
3. Ergebnisse	17
3.1 Erläuterung der prinzipiellen Art der Darstellung	17
3.2 V_{κ} -Familien	17
3.3 J_{κ} -Verteilung	19
3.4 CDR3-Länge	21
3.5 Vergleich der Mutationsfrequenzen von der V_{κ} -Kette in B-Zellen der Keimzentrumsentwicklung mit den Mutationsfrequenzen von RAG und Beta-Aktin	22
3.6 Regression in den verschiedenen Reifestadien, Replacement-mutationen im Vergleich zwischen den CDR-Regionen und dem Framework	24

3.7 Mutationsraten der einzelnen Nukleotide in den CDRs und in den FRs	27
3.8 Transitionen und Transversionen	29
4. Diskussion	31
4.1 V _κ -Familien	31
4.2 J _κ -Verteilung	35
4.3 CDR3-Länge	37
4.4 Vergleich der Mutationsfrequenzen von der V _κ -Kette in B-Zellen der Keimzentrumsentwicklung mit den Mutationsfrequenzen von RAG1 und Beta-Aktin	39
4.5 Regression in den verschiedenen Reifestadien, Replacement-mutationen im Vergleich zwischen den CDR-Regionen und dem Framework	41
4.6 Mutationsraten der einzelnen Nukleotide in den CDRs und in den FRs	44
4.7 Transitionen und Transversionen	46
5. Zusammenfassung	49
6. Figuren und ihre Legenden	52
6.1 Figur 1	52
6.2 Figur 2	53
6.3 Figur 3	54
6.4 Figur 4	55
6.5 Figur 5	57
6.6 Figur 6	58
6.7 Figur 7	59
6.8 Figur 8	61

6.9 Figur 9	63
6.10 Figur 10	65
6.11 Figur 11	67
6.12 Figur 12	69
6.13 Figur 13	71
6.14 Figur 14	73
6.15 Figur 15	75
6.16 Figur 16a – 16c	77
6.17 Figur 17	83
6.18 Figur 18	85
6.19 Figur 19	87
6.20 Figur 20	89
6.21 Figur 21	91
6.22 Figur 22	93
6.23 Figur 23	95
6.24 Figur 24	97
6.25 Figur 25	99
6.26 Figur 26	101
6.27 Figur 27	103
6.28 Figur 28	105
6.29 Figur 29	106
6.30 Figur 30	107
7. Literaturverzeichnis	108

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung in die Grundstruktur des menschlichen Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen dient einem einzigen Zweck: der Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“, „Selbst“ und „Nicht-Selbst“. Durch die Begegnung mit körpereigenen Antigenen werden autoreaktive B-Zellen kurz nach ihrer Entstehung wieder aussortiert. Das Zusammenwirken der zellulären Immunantwort der T-Lymphozyten und des B-Zell-vermittelten humoralen Erkennungssystems erreicht, soweit möglich, den Schutz des Menschen zum Beispiel vor Bakterien, Viren oder Parasiten 1, S.381.

Die humorale Immunität basiert hauptsächlich auf im Blut schwimmenden Antikörpern, die im Wesentlichen von Plasmazellen produziert werden 1, S.381, 2, S.85. Diese Antikörper waren die ersten an der Immunantwort beteiligten Moleküle, die strukturell charakterisiert wurden 2, S.85. Antikörper, deren Gesamtheit unter dem Begriff Immunglobuline zusammengefasst wird 2, S.85, weisen eine typische Grundstruktur auf (Figur 1).

Das typische IgG-Antikörpermolekül setzt sich aus zwei schweren (je 50kd) und zwei leichten (je 25kd) Eiweißketten zusammen 2, S.86, die in der Form eines „Y“ angeordnet sind 2, S.87. Je eine Disulfidbrücke zwischen einer leichten und einer schweren Kette, und zwei Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren Ketten stabilisieren diese Form. Eine Gelenkregion aus einem beweglichen Stück der Polypeptidkette verbindet die drei gleich großen globulären Anteile des Antikörpermoleküls 2, S.87, welche durch die Protease Papain, durch Spaltung des Moleküls in der Gelenkregion, generiert werden können 2, S.87.

Zwei Anteile davon, die „Y“-Arme, auch F_{ab} -Fragment genannt, sind strukturell identisch. Sie bestehen aus einer leichten Kette und der aminoterminalen Hälfte einer schweren Kette. Eine Disulfidbrücke an dem jeweils carboxyterminalen Ende hält diese beiden Ketten zusammen 2, S.87. Die aminoterminalen Hälfte dieser F_{ab} -Untereinheit fällt durch ihre hohe Variabilität auf. Hierbei handelt es sich um die „variable“ V_{heavy} - und die V_{light} - Domäne. Jede Domäne ist eine globuläre Struktur, in der mehrere Polypeptidkettenstränge zusammenlaufen und zwei antiparallele Beta-Faltblätter bilden 2, S.90. Bei jeder Kette ragen durch diese Faltung drei

hypervariable Sequenzen in Schleifen am aminoterminalen Ende hervor. Diese komplementaritätsbestimmenden Regionen (complementary-determining regions: CDR1, 2, 3) ¹, S.288 machen durch ihre dreidimensionale Anordnung die Bindungsstelle des Antikörpers für Antigene aus ¹, S.390, ², S.92. Die dritte Untereinheit des Antikörpers, das Bein des „Y“, besteht aus den zwei carboxyterminalen Hälften der schweren Ketten ², S.87. Sie sind auf der aminoterminalen Seite mit zwei Disulfidbrücken verbunden.

Ihre carboxyterminale Hälfte besteht aus je zwei konservativen, konstanten Domänen C_{H1} und C_{H2} . Sie bestimmt die funktionelle Aktivität eines Antikörpermoleküls und vermittelt die Effektorfunktionen wie zum Beispiel die Komplementbindung, die Bindung an F_c -Rezeptoren und die Fähigkeit, auf Oberflächen sezerniert zu werden ¹, S.385. Die fünf funktionellen Immunglobulinklassen heißen: Immunglobulin M, IgD, IgG, IgA und IgE ². Der Isotyp des IgG ist am einfachsten zu beschreiben, da er dem hier erläuterten Basis-Modell eines Antikörpers entspricht. Die allgemeinen strukturellen Merkmale der anderen Isotypen sind ähnlich, sie kommen zum Beispiel als Dimere oder Pentamere vor ², S.87, 89. Im Gegensatz zu den fünf Isotypen der schweren h-Kette mit unterschiedlichen Eigenschaften gibt es bei der leichten Kette zwei Untertypen, die man als Lambda- (λ -) und Kappa- (κ -) Ketten bezeichnet ², S.86. Zwischen Antikörpern mit λ -Ketten und solchen mit κ -Ketten ließen sich bis jetzt keine funktionellen Unterschiede feststellen ², S.86. Das Verhältnis der beiden Typen von leichten Ketten variiert von Spezies zu Spezies und von Individuum zu Individuum. Bei Mäusen beträgt das Verhältnis von κ zu λ 20:1, beim Menschen etwa 2:1 und bei Rindern 1:20. Der Grund dafür ist nicht bekannt ², S.86.

1.2 Der Aufbau des κ -Locus

Die DNA-Sequenz, die für die leichte κ -Kette der Antikörper kodiert, befindet sich auf Chromosom 2 in der Region 2cen-p11.2 ³. Es gibt zwei in großen Teilen identische Kopien des κ -Locus ⁴, die zueinander invertiert sind und deren 5'-3' Polarität entsprechend gegenläufig ist (Figur 2 ⁵, S. 174). Diese werden auch als J-distale und

J-proximale Kasette bezeichnet. Man hat sie in je drei Regionen Od, Ad, Ld, und Op, Ap, Lp eingeteilt ⁶, S.49. Zusätzlich existiert noch eine einzelne Region B, die nur an der proximalen Kasette hängt. Die proximale Kasette des Locus beinhaltet in einem Kontingent von 600kb neben der J_κ- und der C_κ-Region auch 40 V_κ-Gene. Die distale Kasette besteht aus 440kb und kodiert für 36 V_κ-Gene. Pseudogene sind darin jeweils auch nachweisbar ⁵, S.174 (Figur 3 ⁵, S.176). Insgesamt gesehen sind zehn Gene singulär vorhanden und nur in einer Kasette vertreten, während 33 Gene paarweise (je einmal pro Kasette) auftreten ⁵, S.175. Letztere sind in der Evolution durch Kopie entstanden.

Von den V_κ-Genen sind 40 potentiell funktionell ^{7,8,9}, 16 haben kleinere Defekte und 25 sind Pseudogene. Drei Gene können potentiell funktionell oder mit leichtem Defekt vorkommen ⁶, S.50. Außerdem wurden auch außerhalb des κ-Locus V_κ-Gene gefunden. Sie werden als Orphans (Waisen) bezeichnet. Bislang wurden 24 dieser Orphans entdeckt, eines auf Chromosom 1, 13 auf Chromosom 2 und fünf auf Chromosom 22. Viele Orphans sind Pseudogene, obwohl auch einige der Orphans potentiell funktionell sind und nicht weiter von C_κ entfernt liegen, als die V_κ-Gene aus dem distalen Bereich des κ-Locus. Bisher wurde noch kein Orphan in einem produktiven Rearrangement gefunden ⁵.

Heute ist man der Ansicht, inzwischen alle oder doch zumindest die meisten V_κ-Gene des Locus entdeckt zu haben ^{10, 11, 12}. Sofern man noch nicht alle V_κ-Gene gefunden haben sollte, ist es wahrscheinlich, dass diese keine wesentliche Rolle in der Transkription des κ-Locus spielen.

Die 800kb große Region zwischen den beiden Kassetten scheint keine weiteren V_κ-Gene zu beinhalten ⁶, S.49. Geht man von einem Zentrum in dieser Verbindungsregion aus, so stellt sich der κ-Locus weitgehend symmetrisch dar. 850kb in beide Richtungen bis zu dem Genpaar L10/L25 sind auffallend ähnlich ⁵, S.179. Diese invertierte, verdoppelte Struktur des κ-Locus ist vielleicht durch Vorgänge in der Evolution entstanden, wie sie in Modellen über innerchromosomale Genamplifizierung beschrieben werden ¹³. In der Arbeit von Weichhold et al. wird die Aktivität von Rekombinationsenzymen (RAG) dafür verantwortlich gemacht ¹³.

Einige Regionen zwischen den V_{κ} -Genen erscheinen nur in einer der beiden Kassetten. Sie sind vermutlich im Laufe der Evolution, nach der Verdopplung des Locus, in einer der beiden Kassetten verloren gegangen 5, S.179.

Die V_{κ} -Gene wurden in sieben Untergruppen / Familien 1 bis 7 aufgeteilt, wobei die Zugehörigkeit zu einer Untergruppe durch die Bedingung festgelegt wurde, dass die Gene einer Untergruppe sich zu mindestens 80% genetisch ähneln sollten 5, S.177. Damit verbunden ist auch die Erkennung von Antigenen mit verwandten Dominanten. Die Zugehörigkeit zu einer κ -Untergruppe spiegelt sich nicht in der Anordnung auf dem Chromosom wider 5, S.176, 177, Figur 2.

1.3 Die Variabilität der V-J-Schnittstelle in Rearrangements

Um den menschlichen Körper vor möglichst vielen Fremdan antigenen (Ag) warnen und schützen zu können, muss die verfügbare Anzahl an unterschiedlichen Antikörpern und vor allem ihrer Ag-Bindungsstellen möglichst hoch ($>10^6$) sein 1, S.393. Um diese notwendige Vielfalt zu erreichen ohne gleichzeitig sehr viel „Speicherplatz“ im menschlichen Genom zu verbrauchen, hat die Evolution ein System von Genrekombinationen entwickelt. Die Antikörpervielfalt entsteht vor allem durch vier Mechanismen, wovon drei Folgen der Rekombination verschiedener Gensegmente sind 2, S.100. Diese dient der Herstellung der variablen Bereiche der Immunglobuline durch die Umlagerung und die Verknüpfung einer variablen V_{κ} - und einer verbindenden (joining) J_{κ} -Sequenz im Falle der leichten κ -Kette, beziehungsweise die Verknüpfung einer variablen V_{H} -, einer determinierenden D_{H} - und einer verbindenden (joining) J_{H} -Sequenz für die variable Region der schweren Kette 14, S.3834. Die genetische Information auf den Exons, die für die jeweilige konstante Region codieren, wird im Laufe der sogenannten Switch-rekombination durch Spleißen der mRNA mit der variablen Region verknüpft 2, S.97. Da hier vor allem die leichte κ -Kette untersucht werden soll, wird auch bei der Erläuterung der Rekombinationsmechanismen der Schwerpunkt auf die Abläufe bei der κ -Kette gelegt. Folgende Vorgänge tragen zur Vielfältigkeit der variablen Antikörper-Region bei:

Von jedem der Gensegmente, aus denen eine variable Region eines Antikörpers gebildet wird, existieren zahlreiche Varianten. Durch Rekombination dieser verschiedenen Gene können unterschiedliche Zusammenstellungen der Genabschnitte entstehen 2, S.100. Betrachtet man die Gensequenzen der κ -Kette auf Chromosom 2, so gibt es 40 funktionelle V_{κ} - und fünf unterschiedliche J_{κ} -Sequenzen. Rein kombinatorisch sind also allein 200 verschiedene κ -Ketten möglich. Hinzu kommen noch 116 weitere Möglichkeiten für die leichte λ -Kette auf Chromosom 22, die sich aus 29 V_{λ} - und vier J_{λ} -Sequenzen ergeben.

Im Falle der schweren Kette setzen sich aus 51 V_H -, 27 D_H - und sechs J_H -Sequenzen (Chromosom 14) insgesamt 8.262 mögliche Kombinationen zusammen 2, S.98-101. Auf diese Weise entsteht ein beträchtlicher Teil der Vielfalt von Antigenbindungsstellen.

Lagert man nun je eine variable Region der schweren und der leichten Kette paarweise in unterschiedlichen Kombinationen zusammen, so erhält man theoretisch eine kombinatorische Vielfalt von etwa $2,5 \times 10^6$ verschiedenen Antigenbindungsstellen 2, S.101.

Selbst wenn nicht alle diese Kombinationsmöglichkeiten wirklich realisiert werden 2, S.101, so ist doch beeindruckend, welche Variabilität aus einem kleinen Pool an DNA-Sequenzen potentiell hervorgehen kann. Zusätzlich zur reinen Rekombination kommen noch zwei weitere Variationsmechanismen ins Spiel:

An den Verknüpfungsstellen zwischen den verschiedenen Gensegmenten kommt es als Ergebnis der Rekombination zu Modifikationen der Schnittstellen und damit zu einer weiteren Erhöhung der Variabilität, die sich besonders effektiv bemerkbar macht, da die Verbindungsstelle im CDR3 liegt 15, 16, S.3.

Außerdem kommen in den rearrangierten Genen der variablen Regionen Punktmutationen vor. Dieser Mechanismus der somatischen Hypermutation ermöglicht, dass sich die Spezifität eines Immunglobulins auch nach der Rekombination noch ändern kann 2, S.101.

Anhand der κ -Kette soll der Vorgang der Rekombination verdeutlicht werden. Wird ein V_{κ} -Gensegment mit einem J_{κ} -Gensegment verknüpft, müssen die sogenannten Signalsequenzen, die jeweils die betroffenen Gensegmente flankieren, zueinander passen und zusammengeführt werden 16, S.6. Eine derartige Signalsequenz ist aus je einem Heptamer und einem Nonamer zusammengesetzt, zwischen welchen sich

aus statischen Gründen entweder zwölf oder 23 Basenpaare befinden. Die 12/23-Regel besagt, dass sich zwei Signalsequenzen nur dann aneinander anlagern können, wenn eine von beiden einen zwölf Basenpaare langen „Spacer“ aufweist und die andere einen „Spacer“ von 23 Basenpaaren Länge 2, S.99. Vorausgesetzt, dass die, im Wesentlichen durch Zufall ausgewählten V_{κ} - und J_{κ} -Segmente bei der Transkription die gleiche Orientierung haben, erfolgt die Rekombination durch Deletion 14, S.3838. Dazu werden zunächst die jeweiligen Heptamere der Rekombinationssequenzen nebeneinander gelegt, so dass sich die dazwischenliegende DNA als Schleife ausstülpt und schließlich als geschlossenes zirkuläres Fragment durch die DNA-schneidende Aktivität der Rekombinationsenzyme RAG1 und RAG2 entfernt wird 2, S.100.

Unterscheiden sich die ursprünglichen Transkriptionsrichtungen des V_{κ} - und des J_{κ} -Segmentes, wie das beim κ -Locus zum Teil der Fall ist, so erfordert der Rekombinationsvorgang eine Inversion der zwischen den Signalsequenzen der betroffenen V_{κ} - und J_{κ} -Segmente gelegenen DNA 14, S.3838. Bei dieser letzteren Verknüpfungstechnik bleibt ein zusammenhängender DNA-Strang bestehen, ohne dass ein Fragment abgespaltet wird 2, S.100. Bei der leichten λ -Kette sind die somatischen Rekombinationsvorgänge sehr ähnlich wie bei der κ -Kette. Bei der schweren Kette hingegen gibt es nicht nur 6 J- (joining-) Segmente, sondern auch zusätzlich noch etwa 27 D- (diversity-) Segmente, die im DNA-Strang zwischen den V_h - und den J_h -Segmenten liegen 17, S.752. Zunächst findet eine Rekombination zwischen einem D_h und einem J_h statt. Dieses D_h - J_h -Segment wird dann mit einem V_h verbunden. Die zwölf beziehungsweise 23 Basenpaare zwischen den Heptameren und Nonameren der Signalsequenzen verhindern im Regelfall durch die 12/23-Regel eine Verknüpfung zwischen V_h und J_h unter Auslassen von D_h 2, S.99.

Die Verknüpfungsregion von V_{κ} mit J_{κ} bildet die CDR3-Region, also eine Antigenbindende Region, deren Variabilität von besonderem Interesse für die spätere Antigenbindungsfähigkeit ist 1, S.393.

Der Beginn der Rekombination wird von einem RAG1 / RAG2-Komplex initiiert 16, S.1, 9, 10, der die Rekombinationssequenzen erkennt und einen Strang der DNA-Doppelhelix am Ende der Heptamersequenz schneidet. Durch eine Reaktion innerhalb des Doppelstranges wird dann der komplementäre Strang ebenfalls durchtrennt. Das Ergebnis ist ein Doppelstrangbruch am Ende der V-

beziehungsweise J-Heptamersequenzen 2, S.102. Durch eine Verknüpfung der beiden jeweils komplementären Stränge entsteht an dieser Stelle dann eine Haarnadelstruktur. Aus dem herausgeschnittenen Zwischenstück entsteht durch die Verknüpfung der beiden Heptamere die sogenannte Signalverknüpfungssequenz, die in der Folge dann abgebaut wird 18, S.683. Die verbundenen Komplementärstränge werden durch eine Endonuklease, die die DNA-Haarnadelstruktur an einer zufälligen Position spalten kann, aufgetrennt, so dass ein längerer und ein kürzerer DNA-Einzelstrang entstehen kann. Da die DNA im Doppelstrang komplementär zueinander war, kann nun, je nach Lage der Schnittstelle, im längeren Einzelstrang ein Palindrom vorliegen 19, S.3098. Derartige palindromische Nukleotide werden als P-Nukleotide bezeichnet 2, S.102. Geschieht die anschließende Rekombination unter Anwesenheit des Enzyms „terminale Desoxynucleotidyltransferase“ (TdT), können an die Enden der Einzelstränge bis zu 20 beliebige Nukleotide angehängt werden 2, S.103. Die jeweils längeren Einzelstränge der V_{κ} - beziehungsweise der J_{κ} -Sequenz lagern sich danach so gut es geht zusammen. Ungepaarte Nukleotide werden von einer Exonuklease entfernt oder fehlende Nukleotide werden von einer DNA-Synthase ergänzt und die zwei Stränge V und J werden dann schließlich zu einer fortlaufenden Sequenz verknüpft 2, S.102. Am Ende dieser Prozedur kann die kodierende Verknüpfungssequenz somit sowohl P- als auch N-Nukleotide enthalten. Allerdings kann die Exonuklease auch Nukleotide vom Ende des V_{κ} - beziehungsweise des J_{κ} -Segmentes abtrennen und dadurch die Länge der CDR3-Region also auch verkürzen 15. Durch das Herausschneiden von Nukleotiden durch Exonuklease oder im Gegenteil dazu durch das wahllose Einfügen von bis zu 20 N-Nukleotiden durch TdT ist die Länge des CDR3 sehr variabel 19, S.3094. Da es auf Zufall beruht, wie viele Nukleotide durch diese Mechanismen herausgetrennt oder angefügt werden, kann dadurch auch das Leseraster unterbrochen werden 20, S.3468. Eine derartige Rekombination wird dann als **nicht-produktiv** bezeichnet, weil sie nicht in ein funktionsfähiges Protein translatiert werden kann 12, S.3260, 20, S.3468. Man schätzt, dass circa zwei Drittel aller ersten Umlagerungen nicht-produktiv sind 2, S.103. Daran erkennt man indirekt die enorme Wichtigkeit der junktionalen Vielfalt, welche durch ein großes Maß an Rekombinationsvorgängen und somit „Energieverbrauch“ von Zellen gewährleistet wird. Die Evolution scheint

das Prinzip der Variabilität der CDR3-Region vor den Aspekt des Energieverbrauches zu stellen 2, S.103.

Ein weiterer Mechanismus, der in der gesamten variablen Domäne für Vielfalt sorgt, aber soweit bekannt erst nach der Rekombination abläuft, ist die somatische Hypermutation. In die variablen Anteile der leichten und der schweren Ketten können in großem Umfang Punktmutationen eingeführt werden. Das menschliche Genom wird normalerweise vor Mutationen geschützt, aber in der variablen Region der Antikörpersequenzen sind Mutationen erwünscht und erforderlich. Sie erhöhen zum Einen die Vielfalt des Antikörperrepertoires und sind zum Zweiten für die Affinitätsreifung von Immunglobulinen verantwortlich. Eine Punktmutation kann dazu führen, dass das mutierte Immunglobulin das Antigen noch besser bindet als das ursprüngliche. Diese B-Zelle wird dann positiv selektiert und kann zu einer Antikörper sezernierenden Plasmazelle heranreifen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, in welchem Stadium der B-Lymphozyten-Entwicklung im Keimzentrum die Mutationsaktivität beginnt.

Die Mutationen betreffen „ausschließlich“ die variablen Regionen der Immunglobuline. Gewisse Bereiche darin werden bevorzugt mit Mutationen versehen. Dazu zählen Motive, die Basen in sogenannten „hotspot“ Motiven enthalten, wie z.B. RGYW und WRCY. (R steht für A oder G, G steht für sich selbst, Y steht für C oder T, W steht für A oder T, C steht für sich selbst). Man vermutet, dass vor allem Replacement-Mutationen, das heißt Mutationen, die zum Austausch von Aminosäuren führen, gehäuft in den CDR1-, 2-, und 3-Regionen vorkommen. Wohingegen silente Mutationen, die zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führen, sich wohl eher gleichmäßig verteilen 2, S.104. Um die Mutationsrate der V_k -Sequenzen überhaupt einordnen zu können und zu belegen, dass eine eventuell erhöhte Mutationsrate nicht lediglich auf Fehlern bei der PCR oder der Sequenzanalyse beruhen, wurden zum Vergleich auch die Mutationsraten der exprimierten Gene RAG1 und Beta-Aktin (jeweils mRNA) in den gleichen Zellpopulationen bestimmt. Wird das RAG1-Gen mutiert, dann führt dies in der Regel zum Tod der betroffenen B-Zelle, sofern eine Mutation mit Funktionsverlust von RAG vorliegt. Daher wurde cDNA, welche von RAG-mRNA gewonnen worden war, als interne Kontrolle herangezogen. Die Funktion von RAG als Initiator der Rekombination wurde bereits erwähnt. Beta-Aktin wird als sogenanntes „house-keeping“ Gen bezeichnet und ist für die strukturelle Organisation der Zelle

verantwortlich. Beide genannten Gene gelten als sehr stabile Proteine ²¹, deren Strukturformel und damit RNA-Sequenz möglichst nicht verändert sein sollte, um die optimale Funktion zu bewahren. Geht man davon aus, dass der Organismus es möglichst vermeidet, diese „house-keeping“ Gene zu mutieren, dann kann der Schluss gezogen werden, dass die Fehler von PCR und Sequenzanalyse allenfalls so hoch sind, wie die Mutationsrate der RAG- oder Beta-Aktin-Gene. Prinzipiell ist bei beiden Genen in der vorliegenden Analyse aus technischen Gründen eine etwas höhere Mutationsrate als die Fehlerrate von PCR und Sequenzanalyse zu erwarten, da für die Sequenzierung cDNA verwendet wurde, die aus mRNA gewonnen wurde. Da mRNA wesentlich mehr mutierenden „Umwelteinflüssen“ ausgeliefert ist, ergibt sich zumindest theoretisch eine höhere Mutationsrate.

1.4 Grundlagen über die Tonsille

Da die Tonsille als Quelle für die im Rahmen dieser Studie untersuchten B-Lymphozyten diente, soll auch ihre Funktionsweise kurz erläutert werden. Die Tonsilla palatina ist ein Teil des Waldeyerschen Rachenringes und dient der immunologischen Abwehr, indem sie Lymphozyten „ausbildet“ ²², S.357. Tiefe Krypten vergrößern ihre Oberfläche, so dass eine möglichst große Kontaktfläche zwischen den Lymphozyten in der Tonsille und den Antigenen aus der Mundhöhle entsteht. In der Tonsille ist der Anteil der B-Lymphozyten an mononukleären Zellen etwa 50%, im Vergleich zu den üblichen 20 - 40% im Blut. In der Tonsille steht die Antikörperbildung im Vordergrund ²², S.359. Aus dem Schleimhautbereich eingedrungene Antigene werden in der Durchdringungszone der Tonsille von follikulär-dendritischen Zellen verdaut und anschließend den lokalen T-Helferzellen präsentiert. Dadurch kommt es zur Aktivierung der T-Helferzellen, die daraufhin Interleukine ausschütten. Zusammen mit den follikulär-dendritischen Zellen stimuliert das Zytokinmilieu diejenigen B-Zellen, die das eingedrungene Antigen mit ihrem auf der Zelloberfläche sitzenden Antikörper (B-Zellrezeptor) ebenfalls erkennen. Diese B-Zellen werden dadurch aktiviert. Aus einem naiven B-Lymphozyten wird dann ein „Germinal-center-founder“-Lymphozyt (keimzentrumsbildender Lymphozyt). Dieser wandert vom Rand in ein Keimzentrum ein, oder lässt durch seine eigene Proliferation ein Keimzentrum entstehen. Die B-Zelle reift weiter über das Stadium

des Zentroblasten (CB) zum Zentrozyten (CC) und proliferiert dabei stark. Zu diesem Zeitpunkt vermutet man den Einsatz der Switch-Rekombination von IgG zu IgM, IgD, IgE oder IgA 2, S.293ff, 23, 24. Die Zelle kann dann die Tonsille als antikörperbildende, reife Plasmazelle verlassen, oder aber zur Memory-B-Zelle heranreifen und über lange Zeit die Information über diese einmal aktivierte Antikörperstruktur speichern und bei Bedarf auch abrufen. Bei erneutem Kontakt mit diesem Antigen stehen dann passende Antikörper in der Regel noch schneller als beim ersten Mal zur Verfügung. Nicht produktiv rearrangierte Sequenzen unterliegen keiner derartigen Selektion, da sie nicht als mRNA abgeschrieben werden. Sie vermitteln den unmittelbaren Blick auf den Rearrangementprozeß und seine molekularen oder strukturellen Präferenzen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Allgemeine Vorgehensweise bei der Datengewinnung für die vorliegende Arbeit

Aus sechs kindlichen Probanden im Alter von vier bis sieben Jahren wurde die Tonsilla palatina aufgrund im früheren Vorfeld abgelaufener rezidivierender Tonsillitiden entfernt. Aus einem Teil des Gewebes wurden mononukleäre Zellen gewonnen. Durch FACS-Sortierung (Fluoreszent activated Cell Sorting) wurden die mononukleären Zellen aufgetrennt, nachdem sie mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen IgD, CD19 und CD38 markiert worden waren. Es wurden je nach Oberflächeneigenschaften der B-Zellen in der FACS-Analyse folgende Familien identifiziert und in der Folge als Einzelzellen in 96-Loch-Platten einzeln abgelegt: naive (CD19+, IgD+, CD38-), keimzentrumbildende B-Zellen (CD19+, IgD+, CD38+/CD38++), Zentroblasten (CD19+, IgD-, CD38++), Zentrozyten (CD19+, IgD-, CD38+) und Gedächtnis-B-Zellen (CD19+, IgD-, CD38-) ^{24, 25}.

Mit dem „FACStarPlus Durchflußzytometer“ (Becton Dickinson) ²⁰ wurde je eine Zelle in eine Mulde auf einer 96-Loch-Platte (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA) einzeln abgelegt. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die gesuchten Gene vervielfältigt und so der Sequenzierung zugänglich gemacht. Für die vorliegende Arbeit wurden zwei prinzipielle Vorgehensweisen gewählt.

Da das Immunglobulinrepertoire aus einem produktiv und einem nicht-produktiv rearrangierten Repertoire besteht, war es von Interesse, die genomische DNA von einzelnen Zellen zu amplifizieren. Dadurch konnte auch das nicht-produktiv rearrangierte Repertoire, welches im Wesentlichen nur genomisch vorliegt, analysiert werden. Denn exprimiert und translatiert, das heißt in mRNA abgeschrieben und in Eiweißmoleküle umgebaut, wird lediglich das produktiv rearrangierte Immunglobulinrepertoire. Um die DNA einer einzelnen Zelle, in welcher in der Regel zwei Genkopien von produktiv rearrangierten Immunglobulingenen auf dem Doppelstrang vorliegen (sense und antisense Strang), amplifizieren zu können, wurde eine zufällige Amplifikation der genomischen DNA vorgeschaltet. Die sortierten Einzelzellen wurden in einer Zellen-lysisierenden Lösung für zehn Minuten bei 65°C inkubiert, danach wurde die Lösung neutralisiert. Durch das Zugabe einer Reaktionsmischung in die untere Ebene, die unter anderem die einzelnen Nukleotide

dATP, dGTP, dTTP und dCTP enthielt, und einer Reaktionsmischung in die durch Wachs abgetrennte obere Ebene, die hier hingegen 15-basige Oligonukleotide mit zufälliger Sequenz und Taq-DNA-Polymerase enthielt, waren nach 60 Amplifikationszyklen zufällig ausgewählte Anteile der Zell-DNA und somit auch V_{κ} -Gene in großer Anzahl amplifiziert vorhanden. Die anschließende V_{κ} spezifische PCR wurde als sogenannte zweischichtige („nested“) PCR durchgeführt. Zunächst erfolgte eine PCR mit externen Primern, die zum einen in der Leit-Leader-sequenz der V_{κ} -Gene und zum anderen in den 3'Anteilen der J-Sequenzen binden. Nach 30 Zyklen wurde mit Hilfe von Primern, die an das 5'Ende von Framework 1 (FR 1) und innerhalb der J_{κ} -Gene binden, die zweite Stufe der „nested“ PCR eingeleitet. Der einzig weitere Unterschied zwischen den beiden PCR-Stufen war eine etwas höhere Anlagerungstemperatur in den Zyklen der zweiten Stufe, um eine höhere Spezifität dieser Stufe zu erreichen. Das Ergebnis war eine starke Vermehrung der genomisch lokalisierten und rearrangierten V_{κ} -Gene 26, S.1615.

Da aus einer anderen Analyse der gleichen Zellpopulationen einzelne Zellen auf die Expression (mRNA-Gehalt) von RAG1 und Beta-Aktin hin analysiert worden waren, lag es nahe, die bereits vorhandenen Amplifikate zu sequenzieren, um so zwei „Kontrollgene“ aus dem Strukturgenbereich (Beta-Aktin) und eines weiteren für die B-Zellen lebenswichtigen Gens (RAG1) für die Analyse der Mutationsaktivität im Vergleich vorliegen zu haben.

2.2 Die PCR-Vermehrung der DNA aus den einzelnen Zellen

Das Prinzip der PCR wurde 1984 von Kary Mullis erfunden 1, S.138. Indem man flankierende Sequenzen des zu untersuchenden Gens als Primer zur Verfügung stellt, ausreichende Mengen der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase hinzufügt und bestimmte Temperaturänderungen durchführt, initiiert man folgenden Reaktionszyklus 27: Dieser besteht aus der Strangtrennung der DNA, die durch 15 Sekunden andauerndes Erhitzen auf 95°C erreicht wird. Durch ein schnelles Abkühlen der Lösung auf etwa 60°C gelingt die Anlagerung/Hybridisierung der Primer. Bei 72°C findet dann mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase und der dNTPs die DNA-Synthese statt 27, 28. Durch mehrmaliges

Durchführen des Polymerasekettenreaktionszyklus kommt es zur exponentiellen Vermehrung der gesuchten Gensequenz.

2.3 Die PCR-Vermehrung der RNA aus den einzelnen Zellen

Der Unterschied bei der RNA-Polymerasekettenreaktion besteht darin, dass aus der zu sequenzierenden mRNA zunächst eine komplementäre (c)DNA gemacht werden muss, da mRNA nicht ausreichend hitzestabil ist und daher einer PCR nicht direkt zugänglich ist ²⁹. In die Mulden, in die die Zellen wie bereits beschrieben einzeln sortiert werden, wird ein Ribonuklease-Inhibitor sowie die einzelnen Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP gegeben. Der RNA-reverse Polymerasekettenreaktionszyklus beginnt mit der Primeranheftung (oligo dT) für eine Minute bei 65°C, nach einer kurzen Inkubationszeit wird mit Hilfe der Superscript™ II RNase H-Reversen Transcriptase (Life Technologies) in 50 Minuten bei 42°C die mRNA in cDNA übersetzt. Um die noch am neu synthetisierten cDNA-Strang befindliche mRNA zu entfernen, wird Rnase H verwendet ²⁹. Anschließend kann durch die gebildete cDNA eine PCR-Vermehrung, zum Beispiel nach dem Muster einer geschachtelten („nested“) PCR, durchgeführt werden.

2.4 Die Gensequenzanalyse

Auf diese Weise erlangt man die nötige große Anzahl an Kopien dieser DNA / RNA, um sie zu sequenzieren. Dies geschieht heutzutage „routinemäßig“ mit Hilfe der Didesoxymethode nach Sanger ¹, S.127. Man verwendet erneut das Enzym DNA-Polymerase und passende Primer, um die zu sequenzierende DNA zu kopieren. Allerdings werden diesmal sowohl herkömmliche Desoxyribonukleosidtriphosphate zur Verfügung gestellt als auch ein radioaktiv oder fluoreszenz-markiertes 2'3'-Didesoxyanalogon eines dieser Nukleotidtriphosphate. Durch dessen Einbau wird der Kopiervorgang der Polymerase abgebrochen, da das 3'Hydroxylende für die Phosphodiesterbindung fehlt. Dadurch kommt es zur Entstehung von unterschiedlich langen DNA-Sequenzen, die jeweils mit dem markierten „Abbruch“-Nukleotid enden. Durch Gelelektrophorese dieser Abbruchfragmente kann zum Beispiel ein

Autoradiogramm erstellt werden, an dem man die Basensequenz ablesen kann, vorausgesetzt man hat für jedes radioaktiv markierte Didesoxyanalogon einen separaten Ansatz gemacht ¹, S.128. Alternativ kann durch eine kontinuierliche Fluoreszenzablesung der Gelfront in einem DNA-Sequenzierer die Sequenz fortlaufend abgelesen werden. Diese Basensequenz wurde im vorliegenden Fall als blaue (für das Nukleotid C), als grüne (für A), als schwarze (für G) beziehungsweise als rote Fluoreszenzintensitäts-Peaks (für das Nukleotid T) in einer Kurve dargestellt und auch mit den jeweiligen Buchstaben C, A, G und T notiert (Figur 4). Um die erhaltene Sequenz dem passenden V_{κ} -Gen zuzuordnen, wurden die Sequenzen zur Identifikation mit dem V BASE Sequenzverzeichnis der κ -Keimbahngene verglichen. Dazu wurde das Softwareprogramm Sequencher (Gene codes, Ann Arbor, MI, USA) verwendet. Die Bezeichnungen der V_{κ} - und der J_{κ} -Gene wurden entsprechend dieser V Base Datenbank nach Tomlinson benutzt ³⁰.

2.5 Die Auswertungsstrategie

Nach der Zuordnung der Prüfsequenz zur entsprechenden V_{κ} -Genfamilie und „Einzelgenvergleich“ wurde die Sequenz Base für Base mit der Nukleotidfolge der Keimbahn verglichen und eventuell abweichende Nukleotide dahingehend untersucht, ob es sich dabei um eine Mutation oder einen Polymorphismus handelte, oder ob ein eventueller Lesefehler des Sequenzierers vorlag. Beispielsweise ist von dem verwendeten DNA-Sequenzierer ABI 377 bekannt, dass ein in vier A Basen eingebettetes T nur schwer als solches von der Software des ABI 377 erkannt wird, da die umgebenden Basen das Herauslesen erschweren. Mutationen wurden auf dem Ausdruck als solche markiert (Figur 4). Nachdem J_{κ} am 3'Ende der Sequenz identifiziert worden war, wurde die Position der drei CDRs eingezeichnet und die Länge des CDR3 bestimmt (Figur 4). Dazu wurde vom 5'Anfang des CDR3 im V_{κ} -Gen in Dreier-Schritten in Richtung J_{κ} markiert und ebenso in Dreier-Schritten rückwärts vom J_{κ} Kodon 97 ausgehend in Richtung V_{κ} analysiert. War die Länge des CDR3 durch drei teilbar, so wurde die Sequenz den produktiven Rearrangements zugeordnet (P, n=375), solange in der übrigen Sequenz keine anderen Stopp-kodons oder Leserasterverschiebungen nachweisbar waren. Wurde das Leseraster durch die

V_{κ} - J_{κ} -Verbindung im CDR3 verschoben, wurde die Sequenz den nicht-produktiven Rekombinationen zugeteilt, ebenso wie Verbindungen, die Pseudogene enthielten oder durch Mutationen verursachte Stopp-kodons aufwiesen (NP, n=219). Zusätzlich wurden Informationen über die Verknüpfungsstelle im CDR3 gesammelt und folgende Fragen gestellt: Welche Nukleotide gehörten noch der Keimbahn an? Welche waren sekundär eingefügte, palindromisch zur Keimbahn konfigurierte Nukleotide (P-Nukleotid), oder welche waren willkürlich ohne Vorbild (non-templated) durch die Aktivität des Enzyms Terminale Desoxynukleotidyltransferase (Tdt) eingefügt worden (N-Nukleotide)? Zum Schluss wurde auch noch die Gesamtlänge der analysierten Sequenz bestimmt. Im Prinzip wurde dadurch der Abstand zwischen den beiden PCR-Primern am Anfang und am Ende gemessen (Beginn der Lesbarkeit der Sequenz bis inklusive Kodon 98). Diese Zahl wurde für die Ermittlung der Mutationsrate herangezogen. Die Daten wurden in einer Datenbank im Softwareprogramm Microsoft Excel[®] gesammelt (Figur 5). Diese Datenbank enthielt Informationen über Familienzugehörigkeit der B-Zellen (naive, keimzentrumbildende, zentroblastische, zentrozytische und Gedächtnis-B-Zellen), Position auf dem Gel und der 96-Loch-Platte (Beschickungsreihe), Name des identifizierten V_{κ} -Gens, Anzahl an Mutationen im V_{κ} -Gen, Länge der Sequenz von und bis zu bestimmten Referenzpunkten, Zugehörigkeit zum produktiven oder zum nicht-produktiven Repertoire, Name des J_{κ} -Gens, CDR-Länge, Anzahl an Nukleotiden, die vom Ende von V_{κ} beziehungsweise dem Anfang von J_{κ} in der Schnittstelle im Vergleich zur sogenannten Keimbahn fehlen (Exonukleaseaktivität), Anzahl an N-Nukleotiden und Anzahl an P-Nukleotiden mit jeweiliger palindromischer Zugehörigkeit.

In einer weiteren Datenbank (Figur 6) wurde speziell auf die Analyse der Mutationen eingegangen, wobei vor der Analyse Sequenzen, die als Klone mehrfach vorhanden waren, sorgfältig aussortiert worden waren, so dass jede Mutation tatsächlich nur einmal mit ihren Eigenschaften ausgewertet wurde. In dieser zweiten Datenbank wurden insgesamt 1508 Mutationen analysiert: die V_{κ} -Gene wurden ihren Familien zugeordnet, die Positionen der Mutationen in den Sequenzen wurden auf die Position im Kodon (1, 2, 3) genau angegeben und den jeweiligen CDR- oder FR-Bereichen zugeordnet. Es wurde auch festgehalten, welche Nukleotide am häufigsten mutiert werden und welche Art von Nukleotiden die mutierten dann ersetzt. Es wurde untersucht, ob die Mutation zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führt (Replacement-mutation=R), oder nicht (silent=S).

Außerdem wurde festgehalten, ob Purine bevorzugt durch Purine oder durch Pyrimidine ersetzt werden und umgekehrt. Mit Hilfe des Datenfilters des Programms wurden diese Daten auf unterschiedliche Fragestellungen hin sortiert und in weitere kleinere Tabellen zu den einzelnen Themen übertragen.

2.6 Die statistischen Methoden

Die absoluten Werte wurden, wenn es die Darstellung erforderte, in Prozent umgerechnet, und aus der neuen Prozenttabelle entstanden die Diagramme. Waren die Datenmengen groß genug, was leider in den einzelnen Familien und kleineren Untersuchungen oft nicht der Fall war, wurden durch den χ^2 -Test (Chi-Square-Test) die einzelnen Werte untereinander verglichen und die Signifikanz der Unterschiede berechnet. Galt es die gewonnenen Daten mit der zu erwarteten Wahrscheinlichkeit ihrer Häufigkeit zu vergleichen, wurde der „Goodness-of-fit“ χ^2 -Test verwendet. Werte, bei denen p mit $\leq 0,05$ bestimmt wurde, wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Erläuterung der prinzipiellen Art der Darstellung

Um Informationen über die Entwicklung der V_{κ} -Verteilung in unterschiedlichen Altersstufen zu erlangen, wurden die Ergebnisse der Verteilungsstruktur des Immunglobulinrepertoires der Tonsille (Kleinkindalter) mit dem von B-Zellen (IgD+) aus Nabelschnurblut beziehungsweise aus peripherem Blut (IgM+) von Erwachsenen gewonnenen „Referenz“-Daten verglichen. Die entsprechenden Vergleichsdaten wurden aus der Literatur und früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe übernommen ^{31, 26}.

3.2 V_{κ} -Familien

Nachdem die Immunglobulinsequenzen mit Hilfe der Tomlinson Gendatenbank den bekannten V_{κ} zugeordnet worden waren, konnten sie auch den sieben bestehenden V_{κ} -Familien zugeordnet werden. Insgesamt sind 40 funktionelle V_{κ} -Gene bekannt. Davon gehören 19 zur Familie 1 (47,5%), neun zur Familie 2 (22,5%), sieben zur 3. Familie (17,5%), jeweils ein bekanntes V_{κ} -Gen gehören zur Familie 4 und 5 (je 2,5%), drei zur Familie 6 (7,5%), wohingegen der V_{κ} -Familie 7 kein funktionstüchtiges V_{κ} -Gen angehört (0%) ³². Bei den 219 analysierten nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen waren 79 aus V_{κ} -Familie 1 (36%), 39 aus Familie 2 (18%), 40 aus Familie 3 (18%) nachweisbar. Zur V_{κ} -Familie 4 konnten 46 (21%), zur Familie 5 zehn (5%), zu Familie 6 drei (1%) und zu Familie 7 zwei Sequenzen (1%) zugeteilt werden (Figur 7). Bei den 375 produktiv rearrangierten Immunglobulinsequenzen ergab sich folgende Verteilung: 143 gehörten zu Familie 1 (38%), 22 zu Familie 2 (6%), 127 zu Familie 3 (34%), 76 zu V_{κ} -Familie 4 (20%), zwei zu Familie 5 (0,5%) und fünf Sequenzen zu Familie 6 (1%). Familie 7 stellte per Definition kein produktives Rearrangement (Figur 7). Im Vergleich zwischen der Häufigkeit des tatsächlichen Auftretens von V_{κ} aus den jeweiligen Familien und der statistisch erwarteten Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens, die sich durch Verteilung der bekannten Gene auf die Familien ergibt, wurde bei den meisten Gruppen ein

signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$, χ^2 goodness of fit-Test) - jeweils gekennzeichnet durch ein **X** – erkennbar. Die Unterschiede der Häufigkeitsverteilung von produktiv und nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen werden in Figur 7 veranschaulicht und zeigen den Prozess der positiven oder negativen Antigen-abhängigen Selektion von bestimmten Immunglobulinen an.

Bei den V_{κ} -Familien 2, 3 und 5 war ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Verwendung bei den nicht-produktiven und den produktiven Rearrangements festzustellen. Die Klammern über den jeweiligen Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Figur 7).

Beim Vergleich der Häufigkeiten der Genverwendung im Immunglobulinrepertoire zwischen Nabelschnur, Tonsille des Kleinkindes und peripheren B-Zellen (IgM+) des adulten Menschen waren einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede feststellbar (Figur 8 und 9). Die V_{κ} -Familie 1 wurde in allen Altersstufen am häufigsten verwendet. Beim Erwachsenen waren nicht-produktiv rearrangierte $V_{\kappa}1$ -Gensequenzen häufiger (47%) als beim Kleinkind (36%) oder beim Neugeborenen (41%) (Figur 8). Genau umgekehrt verhielt es sich bei $V_{\kappa}4$. Es kam in den Tonsillenrearrangements deutlich häufiger (21%) vor als im Nabelschnurblut (14%) oder gar bei den Adulten (6%). Bei $V_{\kappa}2$ war der Einsatz am Anfang des Lebens noch recht gering (11%). Dann war eine starke Steigerung festzustellen mit 18% bei den Tonsillen-Daten und schließlich 29% bei den Erwachsenen. Eine fallende Kurve war bei $V_{\kappa}3$ zu erkennen, das umso seltener erschien, je älter der Datenspender war. Die Unterschiede erreichten jedoch bei $V_{\kappa}3$ das Signifikanzniveau $p \leq 0,05$ nicht. Bei $V_{\kappa}5$, $V_{\kappa}6$ und $V_{\kappa}7$ waren die Häufigkeiten der nicht-produktiven Rearrangements zu gering, so dass Aussagen nur eingeschränkt möglich waren. Da Häufigkeiten der Genverwendung der Tonsille und die adulten Werte aus einer relativ großen Anzahl an Werten ermittelt wurden, erreichten Unterschiede zwischen diesen beiden Altersstufen statistische Signifikanz. Im Vergleich mit der kleinen Anzahl an Nabelschnurproben waren Unterschiede aufgrund des Stichprobenumfanges nur dann signifikant, wenn deutliche Abweichungen in der Häufigkeit der V_{κ} -Verwendung bestanden, so wie das lediglich bei den Werten aus den Nabelschnurblutproben im Vergleich zu den adulten Proben gegeben war.

Bei den Daten der produktiv rearrangierten Sequenzen verhielt es sich ähnlich (Figur 9), doch waren die meisten Entwicklungen und Differenzen ausgeprägter. Bei $V_{\kappa}1$ hatte die Frequenz in der Tonsille vor allem im Vergleich zum Nabelschnurblut stark

abgenommen (38% versus 63%). Beim Erwachsenen hat die Verwendung von $V_{\kappa}1$ dann wieder etwas zugenommen und lag bei 44%. Auch bei den produktiv rearrangierten Sequenzen sah die altersabhängige Anwendungsverteilung von $V_{\kappa}4$ -zugehörigen Genen genau umgekehrt aus. $V_{\kappa}4$ hatte bei Kindern also ein deutliches Hoch zu verzeichnen. In der Gruppe $V_{\kappa}2$ nahm die Verwendung wiederum mit dem Alter zu: Während der Wert im Nabelschnurblut noch bei 2% lag, stieg er über 6% in der Tonsille auf 19% in der adulten Probe an. Die Untergruppe $V_{\kappa}3$ fand in allen untersuchten Altersabschnitten am zweithäufigsten Verwendung. Dabei fiel ein signifikanter Anstieg von 22% im Nabelschnurblut auf 34% in der Tonsille auf. Bis zum Erwachsenenalter war der Wert dann wieder etwas auf 29% gesunken. Bei $V_{\kappa}5$ fiel bei den produktiven Rearrangements der relativ hohe Wert bei der Nabelschnurblutprobe auf. Mit zunehmendem Alter wurde $B2$ ($V_{\kappa}5$) nur selten verwendet. Vertreter der Familie 6 kamen insgesamt selten vor. Familie 7 konnte, da sie nur Pseudogene enthält, in keinem produktiven Rearrangement enthalten sein.

3.3 J_{κ} -Verteilung

Es existieren im menschlichen Genom fünf J_{κ} -Gene. Demnach wäre die Wahrscheinlichkeit ihres jeweiligen Auftretens bei zufälliger Verteilung genau 20%. Die tatsächliche Verteilung der Anwendung der fünf verschiedenen J_{κ} s ergab ein anderes Ergebnis. $J_{\kappa}2$ wurde in allen Entwicklungsstufen der B-Zellen deutlich bevorzugt (Figur 10 - 16).

$J_{\kappa}2$ dominierte zu 80% bei den nicht-produktiven Rekombinationen in der Tonsille und war mit 76% bei den produktiven Rekombinationen ebenso verstärkt exprimiert (jeweils $p \leq 0,00001$ beziehungsweise $p \leq 0,00001$ gegenüber der statistischen Erwartung; χ^2 goodness of fit-Test). Die anderen vier J_{κ} s waren in Bezug auf die statistische Erwartung deutlich unterrepräsentiert ($J_{\kappa}1$: $p \leq 0,0005$, $J_{\kappa}3$: $p \leq 0,00001$, $J_{\kappa}4$: $p \leq 0,00001$, $J_{\kappa}5$: $p \leq 0,00001$; χ^2 goodness of fit-Test). Die Unterschiede zwischen dem nicht-produktiven und dem produktiven Repertoire waren gering ausgeprägt und nur bei $J_{\kappa}1$ in der Betrachtung der gesamten Werte signifikant, was hier auf eine positive Selektion schließen ließ ($p \leq 0,005$; χ^2 -Test) (Figur 10). Die Häufigkeit der Anwendung von $J_{\kappa}1$ lag insgesamt bei 5% der nicht-produktiven und 12% der

produktiven Rekombinationen. $J_{\kappa}3$ kam nur zu 0,5% beziehungsweise 0,8% vor. Auch $J_{\kappa}4$ war mit 3% in nicht-produktiven Rearrangements und 0,8% in produktiven Rearrangements nur selten vertreten. $J_{\kappa}5$ gehörte mit 12% der nicht-produktiv und 11% der produktiv rearrangierten Sequenzen zu den in der Tonsille noch häufiger angewandten Genen.

Die Analyse nach dem Entwicklungsstand der B-Zellen der Tonsille ergab: In naiven (N) B-Zellen, keimzentrumbildenden (GCF) B-Zellen, Zentroblasten (CB), Zentrozyten (CC) und Gedächtnis-B-Zellen (MB) (Figur 11 bis 15) bestanden lediglich in den Familien GCF und MB Unterschiede zu der Verteilung in allen Sequenzen oder zu den anderen Familien. Die zur Verfügung stehenden Datensätze in diesen beiden Familien waren jedoch gering. In der Familie GCF kam $J_{\kappa}1$ bei keinem nicht-produktiven Rearrangement vor und $J_{\kappa}3$ und 4 wurden weder bei nicht-produktiven noch bei produktiven Rekombinationen verwendet, was zu einer noch stärkeren Dominanz der $J_{\kappa}2$ -Verwendung als in den anderen Familien führte. Allerdings konnten in der Familie GCF auch nur 24 nicht-produktive und 51 produktive Rearrangements analysiert werden. In der Familie MB fiel ebenfalls eine Dominanz der Verwendung von $J_{\kappa}2$ auf, jedoch erschienen hier $J_{\kappa}3$ bei den nicht-produktiven Rearrangements mit 10% und $J_{\kappa}4$ und $J_{\kappa}5$ bei den produktiven Rearrangements mit je 11% überrepräsentiert. Aufgrund der geringen Anzahl an analysierten Gedächtniszellen entsprachen diese im Vergleich zu den anderen Familien hohen prozentualen Werte für $J_{\kappa}3$ beziehungsweise $J_{\kappa}4$ und $J_{\kappa}5$ in absoluten Zahlen allerdings je nur einer Sequenz, so dass die Begrenztheit der Kohorten hier die Ursache zu sein scheint.

Die Häufigkeit der Anwendung der fünf J_{κ} wurde interessant, als man die Häufigkeitsverteilung aus der Tonsille mit den J_{κ} -Verteilungen in Nabelschnurblut und bei adulten Spendern verglich (Figur 16). Im adulten Stadium wurden $J_{\kappa}1$, $J_{\kappa}3$ und $J_{\kappa}4$ bei den produktiven Rearrangements signifikant häufiger verwendet als bei Kleinkindern ($p \leq 0,00001$, $p \leq 0,0005$, beziehungsweise $p \leq 0,00001$; χ^2 -Test) oder Neugeborenen ($p \leq 0,00001$, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,00005$; χ^2 -Test). Bei nicht-produktiven Rearrangements wurde $J_{\kappa}1$ bei den adulten Proben signifikant häufiger verwendet als bei den Proben des Kleinkindalters ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test), ebenso wie $J_{\kappa}3$ ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test) und $J_{\kappa}4$ ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test). Bei der $J_{\kappa}4$ -Verwendung in den nicht-produktiven Rekombinationen war auch im Vergleich von den Nabelschnurproben zu

den Adulten eine signifikante Steigerung feststellbar ($p \leq 0,00005$; χ^2 -Test). Dahingegen zeigte die Benutzung von $J_{\kappa 2}$ mit 80% bei den nicht-produktiv und 76% bei den produktiv rearrangierten Sequenzen in der kindlichen Tonsille ein deutliches Hoch auf, wenn man sie mit den lediglich 40% ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test) beziehungsweise 36% ($p \leq 0,0001$; χ^2 -Test) beim Erwachsenen und den ebenfalls etwas niedrigeren Werten für die $J_{\kappa 2}$ -Verwendung in nicht-produktiven (65% ($p \leq 0,01$; χ^2 -Test)) und in produktiven Rearrangements des Nabelschnurblutes (71%) verglich. $J_{\kappa 5}$ war im Neugeborenenstadium mit 20% bei den nicht-produktiv und 18% bei den produktiv rearrangierten Sequenzen häufiger vertreten, als in den späteren Altersstufen mit 12% ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test) beziehungsweise 11% ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test) im Kleinkindalter und 15% beziehungsweise 11% ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test) bei den Erwachsenen. Der Unterschied zwischen der $J_{\kappa 5}$ -Verwendung bei der Analyse der Tonsille und der adulten Proben war gering.

3.4 CDR3-Länge

Die CDR3-Länge ist sehr variabel, da sie sich aus dem eventuell gekürzten Ende von V_{κ} (Beginn Kodon 89), P- oder N-Nukleotiden und dem eventuell verkürzten Anfang von J_{κ} (inklusive Kodon 97) zusammensetzt. Während des Rekombinationsvorganges können produktive oder nicht-produktive Rearrangements entstehen. Sollte sich das Leseraster verschieben, wenn die Anzahl der Nukleotide in CDR3 nicht durch drei teilbar ist, dann liegt ein nicht-produktives Rearrangement vor. In den Werten aus der Tonsille fiel auf, dass die Verteilungskurve der CDR3-Länge zwischen elf und 35 zwar relativ breit war, aber die meisten Rekombinationen eine CDR3-Länge zwischen 24 und 33 hatten (Figur 17 und 18). Der Verknüpfungsmechanismus schien ganz besonders Kombinationen mit einer Länge von 27 Nukleotiden zu bevorzugen. Die nicht-produktiven Varianten kamen nur selten in durch drei teilbarer Länge vor (Figur 17). Ausnahmen waren die Verwendung eines Pseudogens, die Entstehung eines Stopp-kodons oder zum Beispiel die Exzision eines Nukleotids im variablen Anteil des V_{κ} -Gens, welche Gründe für die gestörte oder fehlende Transkription sein können.

Im Vergleich der CDR3-Länge zwischen der Untersuchung der Tonsille, den Ergebnissen aus dem Nabelschnurblut ³¹ und den adulten Werten aus den Experimenten von Foster ²⁶ war die Längenverteilung beim nicht-produktiven Repertoire sehr ähnlich. Sie erinnerte an eine Gauß'sche Normalverteilung, bei der das Zentrum zu den größeren Werten hin verschoben war. Das bedeutete, dass die CDR3-Länge durch das Einsetzen von P- oder N-Nukleotiden zwar verlängert werden konnte, dies jedoch nicht so umfangreich passierte, wie Nukleotide herausgeschnitten wurden. Die am häufigsten aufgetretenen CDR3-Längen (Querschnitt (Q) NSB NP: 27,884; Q Tonsille NP: 27,808; Q adult NP: 26,543) entstanden durch geringe Insertions- oder Exonuklease-Aktivität.

Auch bei den produktiven Verbindungen (Figur 18) lag der Durchschnitt der adulten CDR3-Länge niedriger als der entsprechende Wert der Tonsille oder des Nabelschnurblutes (Q NSB P: 27,552, Q Tonsille P: 27,552, Q adult P: 27,181). Allerdings waren die Unterschiede gering und die Diagramme ähnelten einander.

3.5 Vergleich der Mutationsfrequenzen von der V_{κ} -Kette in B-Zellen der Keimzentrumsentwicklung mit den Mutationsfrequenzen von RAG und Beta-Aktin

RAG und Beta-Aktin wurden in die Untersuchung miteinbezogen, um zu untersuchen, ob die in den V_{κ} -Ketten der Tonsille gemessenen Mutationen auf Ungenauigkeiten der Taq-Polymerase-Amplifikation in den Experimenten oder auf Fehler bei der Auswertung zurückzuführen waren. In der Regel sind RAG und Beta-Aktin Gene nicht mutiert, da der Körper großes Interesse an der Stabilität ihrer Struktur hat. Somatische RAG Mutationen führen in der Regel zur Entfernung dieser B-Zelle aus dem Repertoire, da eine Rekombination des B-Zell-Rezeptors dann nicht möglich ist. Deletäre Beta-Aktin Mutationen sollten auch eine negative Selektion begünstigen. Da jedoch als Datenquelle RNA gedient hat und nicht wie bei der V_{κ} -Kette DNA, wäre ein gewisser Grad an nicht mit der Genvorlage übereinstimmender Nukleotide (Pseudo-Mutationen) gegebenenfalls zu erwarten gewesen, die wohl eher als Transkriptionsfehler als als wirkliche Mutationen angesehen werden könnten. Tatsächlich wurden bei dem Gen RAG1 nur zwei eventuelle Mutationen, die jeweils zu einem „Replacement“ geführt hätten, in zwei verschiedenen von insgesamt 117

Sequenzen gefunden, die insgesamt eine Länge von 17.108 Nukleotiden hatten. Die Mutationsfrequenz lag folglich bei 0,0001 Mutationen/Basenpaar (Figur 19).

Bei Beta-Aktin lag die errechnete Mutationsfrequenz bei 0,0025 Mutationen/Basenpaar. In sechs von 100 untersuchten Beta-Aktin Sequenzen war es zu eventuellen Mutationen gekommen. Drei davon waren jeweils acht eventuelle Mutationen pro Sequenz, eine wies sechs eventuelle Mutationen auf. Bei diesen vier Sequenzen könnte man diskutieren, ob es hier zum Beispiel bei der Umsetzung in RNA zu Ablesefehlern gekommen ist, oder ob die Taq-Polymerase fehlerhaft war, oder ob das Gen selbst tatsächlich einem derart hohen Grad an Mutationen ausgesetzt war. In zwei Sequenzen fehlten je fünf Nukleotide hintereinander, in einer anderen Sequenz zwei Nukleotide an unterschiedlichen Stellen. Dadurch kam es jedoch bei diesen drei untersuchten Sequenzen zu Verschiebungen des Codes und damit nicht nur zu einem Replacement, sondern die gesamte Aminosäuresequenz nach diesen „Mutationen“ war verändert. In einer Sequenz war das Kodon „TGA“ herausgeschnitten. Hierbei handelte es sich jedoch lediglich um eine Wiederholung, da es zwei Mal in der Sequenz vorhanden gewesen wäre. „TGA“ steht für „Stopp“ und sollte auch einmal genügen, so dass diese eventuelle Mutation als „silent“ einzustufen war. 17 eventuelle Mutationen führten zu „Replacements“, eine zu einem Stopp-kodon und lediglich zwei Veränderungen sind „silent“ abgelaufen.

Eine Prüfung auf das Vorliegen von Pseudogenen oder Polymorphismen erfolgte. Insgesamt lag die Mutationsfrequenz in RAG1 Genen und Beta-Aktin Genen im Bereich der Taq-Polymerase-Fehlerrate von 7/10000 Basen ³³.

Bei den V_κ-Ketten erkannte man deutliche Unterschiede in der Mutationsfrequenz, je nach Entwicklungsstufe. Die Frequenz lag bei den naiven B-Zellen und bei den keimzentrumsbildenden Zellen zwischen 0,0083 und 0,0019 Mutationen/Basenpaar. Die Mutationsfrequenzen von RAG waren 20fach niedriger. Die Beta-Aktin Mutationen lagen am Unterrand dieses Frequenzbereiches. In der weiteren Entwicklung der B-Zelle war ein deutlicher sprunghafter Anstieg der Mutationsfrequenz der κ-Kette festzustellen. Bei den Zentroblasten betrug die Frequenz 0,014 Mutationen/Basenpaar, bei den Zentrozyten 0,012 und bei den Gedächtniszellen 0,015 Mutationen/Basenpaar. Die Entwicklung wurde bei getrennter Betrachtung von produktiven und nicht-produktiven Rearrangements noch deutlicher erkennbar. Bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen sind Mutationen nicht Ausdruck eines Selektionsprozesses, da diese Rearrangements

nicht auf der Oberfläche exprimiert werden können. Dort stieg die Mutationsfrequenz nur etwas an (von 0,0015 Mutationen/Basenpaar bei NB auf 0,0093 Mutationen/Basenpaar bei CB), um dann bis zu den Gedächtniszellen wieder auf 0,0027 Mutationen/Basenpaar abzusinken. Bei den produktiv rearrangierten Sequenzen hingegen stieg die Frequenz zwischen GCF und CB um eine Zehnerpotenz an (von 0,0017 Mutationen/Basenpaar auf 0,017 Mutationen/Basenpaar). Bei den produktiv rearrangierten Sequenzen in Gedächtnis-B-Zellen betrug die Mutationsfrequenz sogar 0,029 Mutationen/Basenpaar.

3.6 Regression in den verschiedenen Reifestadien, Replacementmutationen im Vergleich zwischen den CDR-Regionen und dem Framework

Da nachgewiesen werden sollte, in welchem Entwicklungsstadium der B-Zellen in der Tonsille der Mutationsprozess einsetzt, und wie viele der Mutationen tatsächlich zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führen (Replacement), wurde die Anzahl von Mutationen für jede Familie getrennt beobachtet. Auch von der Unterteilung in Mutationen in CDR oder in FR wurde eine Aussage erhofft, da nur die CDR für die Antigen-Haftung interessant ist. Mutationen im FR sind jedoch ebenso von Bedeutung, da Strukturänderungen im „Rückrad“ des Antikörpers (FR) zu einer signifikanten Strukturänderung führen können, und dadurch indirekt auch die Antigenbindung beeinflusst werden kann. Da CDR und FR unterschiedlich lang sind und deshalb die alleinige Anzahl an Mutationen oder Replacements nicht vergleichbar gewesen wäre, wurde hier die Frequenz beider errechnet.

Die Diagramme zeigten besonders bei den produktiven Rekombinationen (Figur 20), dass die Rate an Mutationen bei den Zentroblasten sprunghaft anstieg und kontinuierlich bis zu den Gedächtniszellen weiterhin zunahm. Bei den naiven B-Zellen lag die Frequenz der Mutationen in CDR, wie auch schon in der vorhergehenden Betrachtung, noch relativ hoch (0,0197 Mutationen/Basenpaar), da unter den 215 untersuchten naiven Sequenzen eine Gruppe von 40 Sequenzen war, die im Schnitt 8,225 Mutationen aufwiesen. Die keimzentrumbildenden Zellen wiesen eine Mutationsfrequenz von 0,0026 Mutationen/Basenpaar auf. Dann stieg die Mutationsfrequenz in produktiven „CDRs“ bei Zentroblasten um eine ganze Zehnerpotenz auf 0,0282 Mutationen/Basenpaar. Über die Mutationsfrequenz von

0,0302 Mutationen/Basenpaar bei Zentrozyten erreichte die Mutationsfrequenz schließlich im CDR der Gedächtniszellen mit 0,0458 Mutationen/Basenpaar ihren Maximalwert. Die Mutationsfrequenz in FR lag immer deutlich unter den CDR-Werten und lag im Bereich zwischen 0,0011 Mutationen/Basenpaar (GCF) und 0,0191 Mutationen/Basenpaar (MB).

Unter der Voraussetzung, dass eine Mutation stattgefunden hat, ist statistisch gesehen die Wahrscheinlichkeit, dass es dadurch zu einem Replacement kommt, nur 48,61%. Dieser Prozentsatz wurde berechnet, indem die Anzahl aller möglichen Mutationen an den Nukleotiden des genetischen Codes zu der Anzahl der Aminosäure-Änderungen in Beziehung gesetzt wurden. Bei den produktiv rearrangierten Sequenzen der Untersuchung der CDR erreichten die Gedächtniszellen eine Replacementrate von 89%, was für eine enorme Effektivität der Mutationen oder einen positiven Selektionsdruck spricht. Die Replacementfrequenz betrug bei den naiven B-Zellen 0,0154 Replacements/Basenpaar (78% Replacements/Mutationen), bei den GCF 0,0014 Replacements/Basenpaar (54% Replacements/Mutationen), bei den Zentroblasten 0,0222 Replacements/Basenpaar (79% Replacements/Mutationen), bei den Zentrozyten 0,0254 Replacements/Basenpaar (84% Replacements/Mutationen) und bei den Gedächtniszellen 0,0407 Replacements/Basenpaar (89% Replacements/Mutationen). Im Vergleich dazu erlangten die Replacements durch Mutationen im FR-Bereich der produktiven Rearrangements nur maximal einen Anteil von 69% (CC). In Zahlen lag die Mutationsfrequenz bei den naiven B-Zellen bei 0,0043 Mutationen/Basenpaar (62% Replacements/Mutationen), bei den GCF bei 0,0007 Mutationen/Basenpaar (64% Replacements/Mutationen), bei den Zentroblasten bei 0,0068 Mutationen/Basenpaar (67% Replacements/Mutationen), bei den Zentrozyten bei 0,0051 Mutationen/Basenpaar (69% Replacements/Mutationen) und bei den Gedächtniszellen bei 0,0127 Mutationen/Basenpaar (66% Replacements/Mutationen). Anhand der Diagramme (Figur 19 und 20) ist zu erkennen, dass die Zunahme an Mutationen bei den produktiven Verbindungen im Vergleich der Entwicklungsstufen ähnlich ausfiel, ob man in CDR- und FR-Bereiche unterteilte, oder die Frequenz insgesamt betrachtete. Relativ nahmen jedoch die Mutationen in CDR stärker zu als die Mutationen in FR. Die Replacements im CDR nahmen einen wesentlich höheren Anteil der Mutationen ein, als im FR-Bereich (Ausnahme GCF).

Bei den nicht-produktiven Rekombinationen waren Mutations- und Replacementfrequenz von Anfang an geringer, jedoch war die „Effektivität“ der Mutationen bei den naiven B-Zellen und GCF-Zellen noch mit den Werten der produktiven Rearrangements vergleichbar, dann aber sanken die Werte im CDR-Bereich der nicht-produktiven Rekombinationen bis auf 47,83%, also auf den statistisch zu erwartenden Wert ab (Figur 21). Die Effektivität der Mutation, also der Anteil der Replacementmutationen an den Gesamtmutationen, nahm bei nicht-produktiven Rearrangements mit der Reife der B-Zellen in FR im Gegensatz zu CDR zu. Die Werte steigerten sich von 50% bei GCF-Zellen auf 79% bei MB-Zellen. Dahingegen schwankte der Effektivitätswert der Mutationen in FR bei produktiven Rekombinationen lediglich leicht um einen Wert von 65%. Diese Unterschiede zwischen der Effektivität der Mutationen in CDR und FR war, bedingt durch die größere Datenmenge, nur bei den produktiven Rearrangements meist signifikant ($p \leq 0,005$ bei N, $p \leq 0,005$ bei CB, $p \leq 0,05$ bei CC und $p \leq 0,05$ bei MB (χ^2 -Test)).

Während bei den produktiven Rearrangements zwischen CDR und FR in den Mutations- beziehungsweise Replacementfrequenzen enorm große, hoch signifikante Unterschiede zu messen waren (Figur 20), fielen diese Differenzen bei den nicht-produktiven Rekombinationen lediglich gering und meist nicht signifikant aus (Figur 22). Bei den naiven B-Zellen betrug die Differenz der Mutationsfrequenzen in CDR und FR 0,0128 Mutationen/Basenpaar bei den produktiv rearrangierten Sequenzen und 0,0027 Mutationen/Basenpaar bei den nicht-produktiv rearrangierten. Bei den Replacementfrequenzen verhielt es sich ähnlich: ein Unterschied von CDR zu FR von 0,0111 Replacements/Basenpaar bei den produktiven Rearrangements im Vergleich zu 0,0026 Replacements/Basenpaar bei den nicht-produktiven. Bei den GCF-Zellen waren insgesamt geringe Unterschiede zu verzeichnen und lediglich der Unterschied zwischen der Mutationsfrequenz in CDR und FR von produktiven Rearrangements war signifikant. Bei den Zentroblasten wurde eine Differenz von 0,018 Mutationen/Basenpaar bei den produktiv rearrangierten Sequenzen und eine Differenz von 0,0005 Mutationen/Basenpaar bei der Mutationsfrequenz der nicht-produktiven Rearrangements festgestellt. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich hier für die Replacementfrequenz: 0,0154 Replacements/Basenpaar gegenüber 0,0029 Replacements/Basenpaar. Bei den Zentrozyten waren nur die Unterschiede bei den produktiven Rearrangements signifikant. Die Mutationsfrequenz-Differenz zwischen

CDR und FR betrug 0,0228 Mutationen/Basenpaar im Vergleich zu 0,0023 Mutationen/Basenpaar bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen. Bei den produktiven Rearrangements ist der Unterschied zwischen der Replacementfrequenz von CDR und der von FR (0,0203 Replacements/Basenpaar) im Gegensatz zu dem Unterschied bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen (0,0011 Replacements/Basenpaar) signifikant. Ebenso verhält es sich bei den Gedächtnis-B-Zellen. Die Frequenzunterschiede (0,0267 Mutationen/Basenpaar und 0,028 Replacements/Basenpaar) sind bei den produktiv rearrangierten Sequenzen signifikant, bei den nicht-produktiven Rearrangements (-0,0005 Mutationen/Basenpaar und -0,0011 Replacements/Basenpaar) jedoch nicht. Sowohl bei der Mutationsfrequenz als auch bei der Replacementfrequenz der nicht-produktiv rearrangierten Gedächtnis-B-Zellen fällt allerdings auf, dass die Frequenzen im Gegensatz zu allen anderen Untergruppen hier in FR größer sind als in CDR. Bei den produktiven Rearrangements wurden scheinbar Mutationen in CDR stark gefördert und besonders auch deren Effektivität, da bis zu 89% der Mutationen in CDR Replacementmutationen waren. Dadurch wurde die Aminosäuresequenz verändert und die Vielfalt der Antikörperstrukturen wurde weiter erhöht.

3.7 Mutationsraten der einzelnen Nukleotide in den CDRs und in den FRs

Es wurde untersucht, welche Nukleotide bevorzugt mutiert werden. Dabei fanden sich bei Betrachtung des CDR-Bereiches unterschiedliche Verteilungsmuster zwischen den produktiv und den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen (Figur 23). Jedoch war die Verteilung ähnlich, wenn es um die Mutationen in FR ging (Figur 24). In den CDR der produktiv rearrangierten Verbindungen stieg der Anteil der Mutationen von 14% beim T-Nukleotid über 20% bei C und 29% beim Nukleotid A zu 38% der Mutationen beim Nukleotid G an (Figur 23). Diese Unterschiede waren alle untereinander signifikant, wobei die geringste Signifikanz mit $p \leq 0,005$ (χ^2 -Test) zwischen der Mutation von T und C bestand und alle anderen Signifikanzniveaus noch höher lagen (T-A: $p \leq 0,000001$; T-G: $p \leq 0,000001$; C-A: $p \leq 0,0001$; C-G: $p \leq 0,000001$; A-G: $p \leq 0,0005$; χ^2 -Test).

Bei den nicht-produktiv rearrangierten Verbindungen lag das Maximum der Mutationen beim Nukleotid A (32%) und fiel dann bei G auf 26% ab. Die Werte von T

und C lagen bei 19% beziehungsweise 23%. Ein signifikanter Unterschied lag nur zwischen der Häufigkeit der Mutation von T und A vor ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test). Bei T, C und A lagen die Mutationsanteile bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen etwas über denen der produktiven Rekombinationen, die Häufigkeit ähnelte sich jedoch in diesem Bereich. Im Vergleich zwischen nicht-produktiven und produktiven Rearrangements wurde lediglich beim Nukleotid G ein Signifikanzniveau erreicht ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

Im FR-Bereich (Figur 24) ähnelten sich die Werte der produktiven und der nicht-produktiven Rearrangements und im Unterschied wurde kein Signifikanzniveau erreicht. Das Maximum an Mutationen lag beide Male bei A. Allerdings war der Anteil des Nukleotids G an den mutierten Nukleotiden nicht signifikant geringer. Zwischen allen anderen Werten konnten ähnlich wie im CDR-Bereich bei den produktiven Rearrangements Unterschiede als signifikant gewertet werden (T-C: $p \leq 0,0005$; T-A: $p \leq 0,000001$; T-G: $p \leq 0,000001$; C-A: $p \leq 0,001$; C-G: $p \leq 0,05$; χ^2 -Test). Bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen konnten nur die Anteile an den Mutationen zwischen den Nukleotiden T und A als signifikant festgestellt werden ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test). Die Differenzen innerhalb der Nukleotide zwischen den Ergebnissen bei nicht-produktiven und bei produktiven Rekombinationen waren alle nicht signifikant.

Die auf die verschiedenen B-Zellpopulationen aufgetrennten Untersuchungen der Anteile der einzelnen Nukleotide an den mutierten Nukleotiden ergaben ähnliche Aussagen wie die Analyse der Gesamtdaten. Die Werte der Familie der GCF-Zellen waren nur bedingt aussagekräftig, da die Anzahl an Mutationen gering war. Ansonsten unterschieden sich die Häufigkeiten der Nukleotidmutationen nicht signifikant. Nur im CDR der produktiven Rekombinationen nahm der Anteil der Mutationen stetig von T über C über A bis zu G zu (Figur 25). Bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen und im FR-Bereich der produktiven Rekombinationen war dies nicht der Fall, egal welche Reifestufe der B-Zell-Entwicklung man betrachtete. Meist lag das Maximum dann bei dem Nukleotid A, wobei auch unregelmäßigere Verteilungen vorkamen (Daten nicht als Figur gezeigt).

3.8 Transitionen und Transversionen

Die Nukleotide stellen Pyrimidine (C und T) beziehungsweise Purine (A und G) dar. Dadurch, dass Purine und Pyrimidine unterschiedlich groß sind und eine andere räumliche Gestalt annehmen, ist eine Mutation, die ein Purin durch das andere Purin (R-Transition) oder ein Pyrimidin durch das andere Pyrimidin (Y-Transition) ersetzt, mit geringeren Folgen für die DNA-Struktur und deren räumliche Anordnung verbunden, als eine Transversion. Bei der Y-Transversion wird ein Pyrimidin (C oder T) durch eine Mutation von einem Purin (A oder G) ersetzt. Bei der R-Transversion verhält es sich umgekehrt: an die Stelle eines Purins gelangt ein Pyrimidin. Durch die Untersuchung der genauen Folgen von Mutationen auf diesem Gebiet sollte versucht werden, die Funktionsweise des Mutationsmechanismus besser zu verstehen. Es sollte untersucht werden, wann Purine zu Pyrimidinen werden und umgekehrt, oder ob sich Mutationen eher innerhalb der chemischen „Klasse“ verändern. Zunächst wurden dazu die Gesamtwerte betrachtet. Die Werte der R-Aktionen lagen immer höher, da insgesamt mehr Purine mutiert wurden. Die statistische Wahrscheinlichkeit ließ erwarten, dass es mit 66,67% häufiger zu Transversionen kommt als zu Transitionen (33,33%). Zum Beispiel kann A zu G werden (Transition), aber auch zu C oder T (Transversion). Daher ergibt sich obige statistische Verteilung. Diese Erwartung wurde jedoch weder von den produktiven, noch von den nicht-produktiven Elementen in CDR oder FR erfüllt (Figur 26). Bei der Zusammenfassung der Entwicklungsstufen nahmen die Transversionen sogar immer geringere Werte an als die Transitionen. Die Y-Transitionen machten im CDR 19% aus und die Y-Transversionen nur 15,5%. Bei den R-Mutationen fiel die Differenz geringer aus: 33% Transitionen versus 32% Transversionen. In FR verhielten sich die Y-Transitionen zu den Y-Transversionen wie 24% zu 16%, die R-Transitionen zu den R-Transversionen wie 33% zu 27%. Auch bei der Auftrennung in produktive und nicht-produktive Rearrangements blieb diese Tendenz deutlich: obwohl man mehr Transversionen hätte erwarten müssen, waren sie durchweg seltener als die Transitionen. Figur 26 bis Figur 30 zeigen die Verteilungen in den nach Reifegrad aufgetrennten Familien. Bei Betrachtung der Unterschiede der R- und Y-Aktionen, aufgetrennt in Mutationen in CDR und FR und nach produktiven und nicht-produktiven Rearrangements, fiel auf, dass nur in zehn von 32 möglichen Analysen zu den Subgruppen der Wert der Transversionen größer war als der Wert der

Transitionen. Jedoch betrug der Unterschied maximal 6% (bei den R-Mutationen in FR der nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen der Gedächtniszellen). Auch wenn man die Ergebnisse der Untergruppen genau studiert, erreichten die Transversionen nie die statistisch zu erwartenden Dimensionen. Das Stadium der keimzentraubildenden Zellen wurde im Übrigen nicht berücksichtigt, da die geringe Anzahl an Mutationen keine aussagekräftige Analyse ermöglichte.

4. DISKUSSION

4.1 V_{κ} -Familien (Figuren 7-9)

Das nicht-produktive Rearrangement ermöglicht einen Einblick in die durch Selektion noch unveränderte Verteilung der V_{κ} -Familien nach der Rekombination³⁴. Bisherige Studien haben ergeben, dass man keine zufällige Verteilung der V_{κ} -Familien im Repertoire erwarten kann^{34, 12, 35}. Da die Zuordnung zu den Familien aufgrund der Übereinstimmung oder Ähnlichkeit des Genoms erfolgt, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass manche Immunglobulinleichtketten bessere Antigen-Haftung zu den putativen Antigenen aufweisen, als andere und deshalb bereits von Anfang an bevorzugt abgeschrieben werden. Allerdings findet die Antigenbindung nur bei den produktiv rearrangierten Sequenzen statt. Die molekulare Präferenz beispielsweise für $V_{\kappa}1$ bei nicht-produktiven Rearrangements ist damit nicht erklärt. Die Tatsache, dass der Unterschied zwischen den produktiven und den nicht-produktiven Rearrangements nur in drei von sieben Untergruppen signifikant ist, könnte ein Indiz dafür sein, dass im Laufe der Evolution übersetzungsanregende Stellen / Introns so im Genom verteilt wurden, dass zu erwartende produktive Sequenzen mit vorteilhafter Antikörperstruktur bevorzugt im Repertoire auftauchen und Sequenzen, deren Genprodukte womöglich gegen körpereigene Strukturen gerichtet sein könnten, nur selten genutzt werden.

Weit verbreitete Hypothesen für die Überrepräsentation bestimmter V_{κ} -Gene sind zum Beispiel ihre Position auf dem Chromosom und ihr Verhältnis zu J_{κ} , die Anzahl ihrer Genkopien, genspezifische Regulatorsysteme, Paarungspräferenzen mit der schweren Kette, Selektion auf der Basis von Antikörper-Bindung oder idiotypische Besonderheiten³⁶. Als bewiesen kann man ansehen, dass die V_{κ} -Gene aus der J_{κ} -distalen Kasette sehr selten Verwendung finden (nur 3% der von Tomlinson³⁷ gefundenen V_{κ} -Gene stammten aus der distalen Kasette). Da diese aber „nur“ eine inverse Kopie der proximalen Kasette darstellt, sind alle V_{κ} -Familien in der proximalen Kasette vertreten. Außerdem entfällt die Position auf dem Chromosom als Ursache für die nicht zufällige Verteilung der V_{κ} -Verwendung, da sich die Verteilung mit dem Alter deutlich verändert, die Positionen der V_{κ} -Gene auf dem Chromosom aber bestehen bleiben. Gleiches gilt für die Anzahl der Genkopien. Ein

genspezifisches Regulatorsystem könnte je nach Alter unterschiedlich aktiv sein. Paarungspräferenzen mit der schweren Kette könnten nur ausschlaggebend sein, wenn es dort zum Beispiel ein Regulatorsystem gäbe, das mit dem Alter Veränderungen bewirkt.

Antigen-Kontakt spielt in Form der negativen oder positiven Selektion mit Sicherheit eine bedeutende Rolle, besonders für die Unterschiede zwischen der V_{κ} -Verwendung bei nicht-produktiven und bei produktiven Rearrangements. Unterschiedliche Verteilungsmuster bei verschiedenen Völkern können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dazu müsste man zum Beispiel die V_{κ} -Verteilung einer ganzen Familie vom Neugeborenen, über Kleinkinder und Eltern bis zu den Großeltern mit möglichst geringen Importen aus den Genpools anderer Völker untersuchen. Wenn auch dort die V_{κ} -Verteilungen sich mit dem Alter verändern, könnte man derartige Vermutungen über Unterschiede je nach genetischer Herkunft zumindest abschwächen.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Studie haben gezeigt, dass $V_{\kappa}1$ bei Kleinkindern in den nicht-produktiven Rearrangements seltener eingesetzt wurde, als erwartet (36%). Da $V_{\kappa}1$ auch in den produktiven Rearrangements unterrepräsentiert ist (38%), wird es also auch nicht positiv selektioniert. Der Bedarf an Antikörpern mit $V_{\kappa}1$ -Beteiligung scheint im Kleinkindalter zumindest in der Tonsille nicht besonders ausgeprägt zu sein. In dieser Studie wurden V_{κ} -Sequenzen aus der Tonsille von Kleinkindern mit Untersuchungen des Nabelschnur-Blutes von neugeborenen und dem peripheren Blut von adulten Probanden verglichen. Deshalb könnte die abweichende V_{κ} -Verwendung in der Tonsille auch darin begründet sein, dass es sich bei der Tonsille um ein lokales Immunsystem handelt, wohingegen im Blut Immunzellen zirkulieren, die Kontakt zu allen Körperteilen haben. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass der Bedarf an $V_{\kappa}1$ im Kleinkindalter gedrosselt ist, und dass entwicklungsgeschichtlich Regulatorsysteme entstanden sind, die bereits die Umsetzung von $V_{\kappa}1$ an die geringere Nachfrage angepasst haben. Bei den Neugeborenen ist die Verwendung von $V_{\kappa}1$ bei den produktiven Rearrangements noch sehr hoch (63%)³¹, während sie im nicht-produktiv rearrangierten Repertoire noch mit den Werten aus der Tonsille vergleichbar ist (41%). Neugeborene scheinen einen deutlich höheren Bedarf an $V_{\kappa}1$ -Sequenzen zu haben als Kleinkinder und selektionieren deshalb diese Sequenzen positiv. Bei den Erwachsenen hat sich dann

Angebot und Nachfrage eingependelt. Die $V_{\kappa}1$ -Verwendung ist bei den nicht-produktiven Rearrangements der Erwachsenen signifikant höher (47%)²⁶ als bei den Kleinkindern (36%)³¹, so dass die primäre Auswahl von $V_{\kappa}1$ -Genen in ausreichendem Maße zu erfolgen scheint, und keine weitere positive oder negative Selektion in das produktive Repertoire stattfinden muss²⁶.

$V_{\kappa}2$ findet in den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen der Kleinkinder häufiger Verwendung als bei Neugeborenen, noch öfter jedoch bei Erwachsenen (18%, 11%, 29%, respektive). In allen drei Altersstufen kommt es jedoch zu einer negativen Selektion. Die von Genen aus der $V_{\kappa}2$ -Familie kodierte Aminosäurestruktur scheint auf den heutigen Antigen-pool nicht besonders gut anzusprechen. Vielleicht sind heutzutage weniger dazu passende Antigene in der Umwelt vorhanden als früher. Allerdings ist das wohl noch nicht lang genug der Fall, dass die Evolution bereits die primäre Verwendung des $V_{\kappa}2$ -Gens vermindert hätte.

Bei den nicht-produktiven Rearrangements der Tonsille kommen die $V_{\kappa}3$ -Gene so häufig wie erwartet vor (18%), bei den produktiven Rekombinationen ist ihr Anteil aber fast doppelt so groß (34%). Das bedeutet, dass Sequenzen mit $V_{\kappa}3$ sehr positiv selektioniert werden. Sie scheinen besonders „reaktionsfreudige“ Antikörper zu ergeben, ohne dass sie das Risiko zu bergen scheinen, auf körpereigene Strukturen zu reagieren. Während sich bei dem Einsatz von $V_{\kappa}3$ in nicht-produktiven Rearrangements keine signifikante Altersentwicklung nachweisen ließ^{36, 34}, war bei den produktiven Rekombinationen ein signifikanter Unterschied zwischen der $V_{\kappa}3$ -Verwendung bei Neugeborenen (21%) und Kleinkindern (34%) erkennbar. $V_{\kappa}3$ -Sequenzen werden positiv selektioniert und scheinen vor allem im Kleinkindalter, aber auch bei Erwachsenen eine besondere Bedeutung in deren Immunlage zu haben.

$V_{\kappa}4$ wurde in den Sequenzen aus der kindlichen Tonsille bedeutend häufiger eingesetzt, als erwartet (21%) und ebenfalls häufiger als dies bei den erwachsenen Testpersonen der Fall war (6%). Es weist im Kleinkindalter ein deutliches Maximum auf, wird aber weder positiv noch negativ selektioniert. Das spricht dafür, dass im Kleinkindalter ein höherer Bedarf an $V_{\kappa}4$ Antikörper-Strukturen besteht, der aber bereits evolutionär in die chromosomale Auswahl integriert worden ist. Die $V_{\kappa}4$ -Familie besteht ausschließlich aus dem Gen B3. Es ist dem J_{κ} -Genlokus am nächsten gelegen. Dadurch hat es eventuell strukturelle Vorteile bei der

Rekombination. Kommt es jedoch zum Receptor-editing, was bei Erwachsenen eventuell häufiger stattfindet als in jüngeren Altersstufen, wird das Gen B3 mit Sicherheit aus dem Genom herausgeschnitten und kann nicht mehr in einem neuen Rekombinationsprozeß verwendet werden³⁴. Eventuell ist das auch ein Grund für den signifikanten Unterschied zwischen der $V_{\kappa}4$ -Verwendung bei Kleinkindern und bei Erwachsenen. Auf die im Vergleich zu den anderen Altersgruppen signifikant häufigere Nutzung von $V_{\kappa}4$ wurde bereits hingewiesen. Es scheint im Kleinkindalter ein deutlicher Bedarf an $V_{\kappa}4$ -Antikörpern zu herrschen. Man könnte postulieren, dass die Antigene, die auf Kinderkrankheitserregern zu finden sind, eine Struktur aufweisen, mit der Antikörper mit V_{κ} -Ketten auf $V_{\kappa}4$ -Basis besonders gut interagieren.

$V_{\kappa}5$ wird insgesamt selten eingesetzt. Lediglich in den produktiven Rearrangements der B-Zellen des Nabelschnurblutes fällt eine Häufung auf (8%). Diese ist zwar auch in den nicht-produktiv rearrangierten Nabelschnur-Sequenzen enthalten (8%). In dem nicht-produktiv rearrangierten Repertoire ist der Unterschied zu den Werten aus der kindlichen Tonsille (5%) jedoch noch nicht signifikant. Bei Neugeborenen wird $V_{\kappa}5$ offensichtlich noch so häufig benötigt, wie es in Sequenzen eingebaut wird. Mit zunehmendem Alter wird es jedoch seltener verwendet und zusätzlich negativ selektioniert.

Gene aus der $V_{\kappa}6$ -Familie wurden seltener in Sequenzen eingebaut, als man auf Grund ihrer Anzahl hätte erwarten können. Insgesamt spielt diese Familie, ebenso wie die $V_{\kappa}7$ -Familie, eine sehr geringe Rolle. Bei $V_{\kappa}7$ ist außerdem zu berücksichtigen, dass dieser Familie von vorneherein nur Gene angehören, die zu nicht-produktiven Sequenzen führen und somit für die Antikörper-Produktion irrelevant sind.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Untersuchung dieses Zwischenschrittes in der Entwicklung zwischen Neugeborenen und Erwachsenen von großer Bedeutung war. Die V_{κ} -Verteilung entwickelt sich durchaus nicht linear vom Neugeborenen zu Erwachsenen, sondern weist im Kleinkindalter eine deutlich andere Verteilung auf, die auf die speziellen immunologischen Bedürfnisse eines Kleinkindes hinweisen. Das Spektrum der V_{κ} -Verwendung ist bei Kleinkindern noch breiter, während es sich bei den Adulten auf die Familien $V_{\kappa}1$, $V_{\kappa}2$ und $V_{\kappa}3$ (in absteigendem Maße) konzentriert.

Interessant zu untersuchen wäre auch, ob sich die V_{κ} -Verteilung bei Kleinkindern mit oder ohne Impfungen unterscheidet. Derartige Untersuchungen könnte man, mit den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit als Basis, als fortführende Projekte planen.

4.2 J_{κ} -Verteilung (Figuren 10-16)

Bei der Betrachtung der J_{κ} -Verteilung in den nicht-produktiv und den produktiv rearrangierten Sequenzen der kindlichen Tonsille, fällt auf, dass lediglich bei $J_{\kappa}1$ eine positive Selektion stattfindet. Alle anderen J_{κ} scheinen entsprechend dem notwendigen Ausmaß primär bereits adäquate Verwendung zu finden. Bei den von uns gewonnenen Daten spielt $J_{\kappa}2$ mit fast 80% der kombinierten J_{κ} die dominierende Rolle. Die Analyse der J_{κ} -Verteilung in den einzelnen Reifestadien der B-Zelle zeigt keine großen Abweichungen untereinander, besonders wenn man berücksichtigt, dass in den Gruppen der keimzentrumsbildenden B-Zellen und der Gedächtnis-B-Zellen weniger Sequenzen untersucht wurden als bei den naiven B-Zellen, den Zentroblasten und den Zentrozyten. Deren J_{κ} -Verteilungen kann man somit als repräsentativer ansehen als die der keimzentrumsbildenden und der naiven B-Zellen. Im Vergleich zwischen den Altersstufen Neugeborene (Nabelschnurblut), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (periphere B-Zellen) konnten viele signifikante Unterschiede festgestellt werden. Während Neugeborene viel $J_{\kappa}2$, aber auch durchaus etwas $J_{\kappa}1$ und $J_{\kappa}5$ in ihren V_{κ} - J_{κ} -Kombinationen aufweisen, wird im Kleinkindalter vorwiegend $J_{\kappa}2$ eingebaut. $J_{\kappa}1$ und $J_{\kappa}5$ spielen bei Kleinkindern nur eine kleinere Rolle, $J_{\kappa}3$ und $J_{\kappa}4$ sind letztendlich ebenso wie bei Neugeborenen vernachlässigbar. Bei den adulten Werten wurde jedoch eine viel ausgeglichene J_{κ} -Verteilung gefunden. Zwar liegt auch hier das Maximum bei $J_{\kappa}2$, aber die Verwendung aller J_{κ} nähert sich den stochastisch erwartbaren 20% an. Ob die Ursache dafür in der Antigen-Exposition zu finden ist, oder ob bestimmte regulatorische Enzyme, die für die Verwendung von anderen J_{κ} als $J_{\kappa}2$ notwendig sind, erst bei Erwachsenen ihrer Aufgabe vollständig gerecht werden, muss mit weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Die Tatsache, dass in den unterschiedlichen Reifestadien der B-Zellen in der Keimzentrumsentwicklung eine unterschiedliche Häufigkeit von Mutationen, aber keine unterschiedliche J_{κ} -Verteilung gefunden wurde, deckt sich mit den Ergebnissen von Foster 1999 ³⁸. Der Prozentsatz an V_{κ} -Rearrangements mit und ohne Mutationen, der jede der J_{κ} -Segments einbaute, war sowohl bei den nicht-produktiven als auch bei den produktiven Rearrangements vergleichbar. Folglich scheint es keinerlei Rolle zu spielen, ob V_{κ} mutiert ist oder nicht. Die J_{κ} -Verteilung bleibt gleich, unabhängig vom Grad der Mutation.

Wie in der vorliegenden Studie, hat Weber in seiner Untersuchung über J_{κ} ebenfalls V_{κ} - J_{κ} -Rearrangements aus Nabelschnurblut-B-Zellen und adulten B-Zellen mit einander verglichen ³⁶. Er hat bei den Neugeborenen allerdings nur 38 Sequenzen (Vergleichsdaten dieser Studie: n=92 bei den nicht-produktiven und n=102 bei den produktiven Rekombinationen) und bei den Erwachsenen lediglich 46 Sequenzen (Vergleichsdaten dieser Studie: n=232 bei den nicht-produktiven und n=321 bei den produktiven Rekombinationen) analysiert. Dabei fand er, dass bei den adulten Werten der Schwerpunkt mit 35% auf $J_{\kappa}2$ lag, 24% $J_{\kappa}1$ verwendet wurde und der Rest sich recht gleichmäßig auf $J_{\kappa}3$, $J_{\kappa}4$ und $J_{\kappa}5$ verteilte. Das stimmt mit den Vergleichsdaten von Foster gut überein ²⁶.

Webers Neugeborenenwerte weisen jedoch ein Maximum von 40% bei $J_{\kappa}1$ auf. Das ist beim Nabelschnurblut aus der Datenbank von Girschick's Arbeitsgruppe nicht der Fall ³¹. Beim Vergleich von Webers Werten aus dem Nabelschnurblut und den adulten B-Zellen mit den Tonsillenwerten ist keinerlei Altersentwicklung auszumachen. Die Weber-Werte erscheinen, wenn man die Tonsillen-Werte als J_{κ} -Verteilung im Kleinkindalter dazwischen einfügt, nicht harmonisch, da sich die J_{κ} -Verteilung bei Neugeborenen und Erwachsenen ähnlicher sind als die J_{κ} -Verteilung bei Kleinkindern zu einer der beiden anderen Altersgruppen. Deshalb erscheinen die Schlussfolgerungen aus dem Datenvergleich mit den Werten von Foster ²⁶ und Girschick ³¹ für die Entwicklung des B-Zell-Repertoires von größerer Bedeutung, insbesondere weil sie auf einem umfangreicheren Datensatz beruhen.

Eine Vermutung für den Grund der ungleichmäßigen Verwendung der fünf J_{κ} kommt von Gorman. Er ist der Ansicht, dass eines der fünf J_{κ} -Segmente (er nennt leider nicht, welches) eventuell durch eine mutierte Auftrennungsposition, die verhindert,

dass das J_{κ} - C_{κ} -Intron entfernt werden kann, nicht funktionstüchtig sein könnte ³⁹. Selbst wenn diese Mutation nicht oft auftritt, könnte sie doch ein Grund für den verminderten Einsatz von $J_{\kappa}3$, $J_{\kappa}4$ oder $J_{\kappa}5$ sein.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich die J_{κ} -Verteilung von der naiven B-Zelle zur Gedächtnis-B-Zelle kaum verändert. Bei der individuellen B-Zell-Reifung scheinen alle fünf J_{κ} immer in vergleichbarem Maße zur Verfügung zu stehen. Es kommen keine besonderen Abweichungen in den Reifestadien vor, sondern die J_{κ} -Präferenzen bleiben bestehen.

Durch Selektion besteht nur bei $J_{\kappa}1$ ein signifikanter Unterschied zwischen der Häufigkeit bei nicht-produktiven und bei produktiven Rearrangements. Bei allen anderen scheinen genetische Verfügbarkeit, Verwendung und Bedarf aneinander angepasst zu sein.

Eine altersabhängige Veränderung ist deutlich erkennbar. $J_{\kappa}1$ wird bei Kleinkindern seltener verwendet als bei Neugeborenen und Erwachsenen, $J_{\kappa}2$ wird hingegen in Tonsillen von Kleinkindern sehr viel häufiger verwendet als bei Erwachsenen. Bei diesen ist die Verteilung der J_{κ} -Verwendung wesentlich ausgeglichener als bei Neugeborenen oder Kleinkindern. Die Ursache dafür konnte durch diese Untersuchung allerdings nicht geklärt werden.

4.3 CDR3-Länge (Figuren 17-18)

Über die Anzahl der Nukleotide in CDR3 ergaben die neuen Forschungen in kindlichen Tonsillen keine von den bisherigen Erkenntnissen abweichenden Ergebnisse. Betrachtet man die Verteilung der unselektionierten CDR3-Längen im nicht-produktiven Repertoire (Figur 17), so erkennt man eine Verteilung, die an eine Gauß'sche Normalverteilung erinnert. Lediglich bei drittelbaren Nukleotidanzahlen sind starke Einbrüche in dem Verteilungsmuster feststellbar. Die Tatsache, dass eine nicht durch drei teilbare CDR3-Länge zu einer Leserasterverschiebung führt und daraus die Zuordnung zum nicht-produktiven Repertoire folgt, erklärt, weshalb bei den nicht-produktiven Rearrangements auf Werte wie 24, 27 und 30 weniger Sequenzen entfallen sind: Die Hauptursache für die Zuordnung zum nicht-produktiven Repertoire, eine nicht drittelbare Nukleotidanzahl in CDR3, ist bei jedem dritten Wert nicht gegeben.

Die durchschnittlichen CDR3-Längen betragen 27,6 Nukleotide bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen von Nabelschnurblut, 27,8 Nukleotide bei den nicht-produktiven Rearrangements aus den kindlichen Tonsillen und 26,5 Nukleotide bei den nicht-produktiven Rekombinationen des peripheren Blutes Erwachsener. Die CDR3-Längenverteilungen in den drei Altersstufen ähneln einander sehr. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die CDR3-Längen scheinen jedoch bei den erwachsenen Probanden eine größere Vielfalt aufzuweisen, doch der Querschnitt bleibt, wie in den früheren Altersstufen, in etwa bei 27 Nukleotiden. Allerdings fällt im nicht-produktiven Repertoire die CDR3-Länge von 26 Nukleotiden auf. Sie ist nicht durch drei teilbar, liegt sehr nahe am Querschnittswert und sollte demzufolge häufig vorkommen. Jedoch trat die CDR3-Länge von 26 Nukleotiden in den Werten der peripheren B-Zellen aus dem Blut von adulten Probanden nicht ein einziges Mal auf, während sie bei den CDR3-Längen aus der Tonsille von Kleinkindern gut vertreten und in den B-Zellen aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen ausgesprochen häufig war. Diese Feststellung ist durch die bisherigen Analysen nicht erklärt. Ansonsten waren keine ausgeprägten Veränderungen zwischen den drei Altersstufen Neugeborene, Kleinkinder und Adulte feststellbar.

Die Anzahl der Nukleotide in CDR3 war bei den produktiven Rearrangements (Figur 18) natürlich ausschließlich auf durch drei teilbare Werte verteilt und des Weiteren auf den Wert 27 konzentriert. Der Anteil der CDR3-Längen an der Verteilung war umso geringer, je weiter der Wert von den 27 Nukleotiden entfernt war. Während sich die Häufigkeiten von den CDR3-Längen 24 und 30 bei den produktiven Rearrangements durchaus harmonisch in die Gauß'sche Normalverteilung der CDR3-Längen der nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen einfügen ließen, hält die CDR3-Länge von 27 Nukleotiden bei den produktiven Rearrangements mit circa 60% die eindeutige Spitzenposition inne. Andere Forschungsgruppen kamen in ihren Untersuchungen zu sehr ähnlichen Ergebnissen: Ann J. Feeney ³⁴, Jonathan Cox ³⁵ und Ralph Klein ¹².

Eine CDR3-Länge von 27 Nukleotiden wird bei den meisten V_{κ} - J_{κ} -Kombinationen am leichtesten erreicht, wenn lediglich genau die Nukleotide der Keimbahn vollständig für das Rearrangement verwendet werden und keinerlei Zusatz oder Entfernung von Nukleotiden stattfindet. Somit ist diese CDR3-Länge besonders einfach zu erhalten.

Außerdem wird die Dominanz der CDR3-Länge von 27 Nukleotiden auch durch eine positive Selektionierung von Rearrangements von Sequenzen dieser Länge erklärt. Die CDR3-Längenverteilung war in den drei untersuchten Altersstufen erstaunlich ähnlich. Die für die CDR3-Länge verantwortlichen Mechanismen wie z.B. die Enzyme Exonuklease und TdT scheinen bereits bei Neugeborenen und auch bei Kleinkindern wie bei den untersuchten Erwachsenen zu funktionieren. Auch Jean-Christophe Weber postuliert dies in seiner Diskussion auf der Basis seiner Ergebnisse ³⁶.

4.4 Vergleich der Mutationsfrequenzen von der V_κ-Kette in B-Zellen der Keimzentrumsentwicklung mit den Mutationsfrequenzen von RAG1 und Beta-Aktin (Figur 19)

Ziel des Vergleiches der Mutationsfrequenzen war zum Einen, sicherzustellen, dass es sich um tatsächliche, echte Mutationen handelt und nicht etwa um Ungenauigkeiten in den Versuchen und Messungen und zum Anderen, um einen Einblick in den zeitlichen Ablauf der Mutationsvorgänge im Reifungsprozess der menschlichen B-Zelle zu gewinnen.

Um zu belegen, dass die hier gefundenen Mutationen auch wirklich Mutationen sind, wurden als Vergleich Sequenzen untersucht, von denen man sicher weiß, dass Mutationen dort so gut wie nicht vorhanden sind, da es sonst zu einer Vernichtung der Zelle käme. Dazu bestens geeignet sind RAG1 und Beta-Aktin. Da beide Kontroll-Sequenzreihen neben den V_κ-Sequenzen in den gleichen Untersuchungsreihen analysiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Untersuchungsbedingungen identisch waren. Auch die Auswertung erfolgte nach den gleichen Methoden, wobei bei RAG und Beta-Aktin bei einer fragwürdigen Mutation diese als Mutation markiert wurde, während bei einer unklaren Mutation in der V_κ-Sequenz diese nicht als Mutation sondern lediglich als Leseungenauigkeit des Sequenzanalysers gewertet wurde. Somit wurde die Analyse verschärft und die Mutationsfrequenzen von RAG und Beta-Aktin gegebenenfalls erhöht gemessen und die der V_κ-J_κ-Rearrangements gegebenenfalls erniedrigt. Ein weiterer Faktor, durch den man etwas höhere Mutationsfrequenzen für RAG und Beta-Aktin geradezu erwarten müsste, ist die Tatsache, dass für deren Sequenzanalyse mRNA verwendet wurde, die in einem Transskriptionsprozeß von der DNA abgeschrieben wird. Fehler,

die bei diesem Vorgang entstanden, wurden zwangsläufig ebenfalls als Mutationen gewertet. Deshalb sprechen die durchweg niedrigen Mutationswerte, die als Mutationsfrequenzen für RAG (0,0001 Mutationen/Basenpaar) und Beta-Aktin (0,0025 Mutationen/Basenpaar) ermittelt wurden und die in etwa mit der bereits früher ermittelten Taq-Polymerase-Fehlerrate (0,0007 Mutationen/Basenpaar) ³³ übereinstimmen, für die Präzision der Sequenzanalyse der vorgelegten Arbeit. Außerdem lassen sie die Vermutung zu, dass die Mutationen, die in den unterschiedlichen Keimzentrumsreifestadien der kindlichen B-Zellen gefunden wurden, zumindest zum größten Teil tatsächlich echte Mutationen darstellen. Die Mutationsfrequenzen von naiven B-Zellen und keimzentrumsbildenden B-Zellen sind mit den Frequenzen zu RAG und Beta-Aktin noch vergleichbar. Das bedeutet, dass Mutationen in diesen beiden Entwicklungsstadien nur in sehr geringen Ausmaßen auftreten. Beim Übergang zum Reifestadium der Zentroblasten jedoch ist ein Anstieg der Mutationsfrequenz um etwa den Faktor zehn erkennbar! Beim Betrachten der nicht-produktiven Rearrangements fällt auf, dass nach dem Stadium der Zentroblasten die Mutationsfrequenz wieder stark abnimmt und bei den Gedächtnis-B-Zellen dann ungefähr wieder das Anfangsniveau erreicht. Offenbar wird mit zunehmender Reife immer klarer, dass aus dieser Zelle kein produktives Rearrangement mehr kommt, und der Mutationsmechanismus wird in dieser Zelle wieder abgeschaltet, um nicht unnötig Energie zu verschwenden. Bei den produktiv rearrangierten Sequenzen hingegen verdoppelt sich die Mutationsfrequenz von den Zentroblasten zu den Gedächtnis-B-Zellen nahezu. In diesen Reifestadien scheint es einmal zu einer starken positiven Selektion von mutierten Sequenzen zu kommen, aber wohl auch zum Einsatz eines Mechanismus, der nach Antigen-Kontakt gezielt Mutationen herbeiführt, um die Antigen-Antikörper-Passung zu verbessern. Das bedeutet wohl, dass die passenden Antikörper nach einem ersten Antigen-Kontakt zur Bildung eines Keimzentrums herangezogen werden und danach erst versucht wird, aus dem bereits guten Antikörper einen noch besseren zu gewinnen, indem Mutationen die Sequenzen leicht verändern. Vermutlich durch stetige Antigen-Kontakt-Kontrolle werden dann diejenigen Sequenzen besonders positiv selektioniert, denen es gelungen ist, durch besonders viele und effektive Mutationen die Passung zum Antigen zu optimieren. Dazu passt auch die Tatsache, dass im Nabelschnurblut so gut wie keine signifikanten Anzeichen für somatische Mutationen

gefunden wurden, da Neugeborene noch keinen bedeutenden Antigenkontakt aufweisen können^{34, 36}.

4.5 Regression in den verschiedenen Reifestadien, Replacementmutationen im Vergleich zwischen den CDR-Regionen und dem Framework (Figuren 20-22)

In den Diagrammen 20 und 22 ist die Entwicklung der Mutationsfrequenzen und der Replacementfrequenzen im Verlauf der Reifung erkennbar. Während bei den produktiven Rekombinationen die Frequenzen besonders von Mutationen und Replacements in den drei CDR-Regionen mit zunehmender Reife immer höher werden, nehmen die Frequenzen bei den nicht-produktiven Rearrangements nach dem Stadium der Zentroblasten wieder ab. Diese Abnahme kann daher resultieren, dass es nach dem Stadium der Zentroblasten zu vermehrtem Rezeptor-Editing von B-Zellen sowohl mit nicht-produktivem als auch mit produktivem Rearrangement gekommen ist. Das würde zu einer Verringerung der Mutationsfrequenz in der Population führen, da die neuen Sequenzen erst „frisch“ aus dem Genom geschnitten worden sind und noch keine Mutationen stattfinden konnten. Eine andere Vermutung wäre, dass Reparaturmechanismen, die vorher unterdrückt wurden, um möglichst viele Mutationen entstehen, aber auch bestehen zu lassen, nun wieder normal arbeiten. Die Mutationsmechanismen scheinen in der Lage zu sein, zu bemerken, dass aus B-Zellen mit nicht-produktivem Rearrangement nach dem Stadium der Zentroblasten kein produktives Ergebnis mehr gewonnen werden kann und „vernachlässigen“ diese Zellen dann.

Wenn das der Fall wäre, so kann man vermuten, dass die starke Zunahme der Mutations- und Replacementfrequenzen bei den produktiv rearrangierten Sequenzen nicht nur auf positiver Selektion beruht, sondern hier eine gesteigerte Aktivität der Mutationsmechanismen zu der Steigerung beiträgt.

Der Unterschied zwischen CDRs und FRs ist bei den nicht-produktiven Rearrangements bei Weitem nicht so ausgeprägt, wie bei den produktiv rekombinierten Sequenzen. Sandra Foster beschreibt die Ergebnisse ihrer Untersuchung von 1999 sehr ähnlich³⁸. Foster und auch Saskia Ebeling machen für den Unterschied zwischen den Mutationen in den CDRs und in den FRs von produktiv rearrangierten Sequenzen alleine die positive Selektion nach Antigen-

Kontakt verantwortlich ^{38, 40}. Dass eine Kombination aus positiver Selektion und gesteigerter Aktivität des Mutationsmechanismus in den CDRs zu den signifikanten Unterschieden zwischen den Frequenzen in den CDRs und in den FRs führt, kann durch diese Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Die Vermutung von Ursula Storb, dass die Unterschiede zwischen den Mutationsfrequenzen in den CDRs und in den FRs von Sequenzunterschieden und der Verwendung spezieller Kodons in den CDRs herrühre, muss ebenfalls zumindest als Teil-Ursache in Betracht gezogen werden ⁴¹. Denn diese Unterschiede bestehen auch bei den nicht-produktiven und damit unselektionierten Rearrangements, wenngleich sie nur bei den naiven B-Zellen und bei den Zentroblasten Signifikanzniveau erreichten.

Bei dem starken Anstieg der Mutationsfrequenzen und der Replacementfrequenzen in den CDRs von produktiven Rearrangements ist bemerkenswert, dass die Differenz dieser Frequenzen in den Reifestadien beinahe gleich bleibt. Das heißt, es nehmen lediglich die Replacementmutationen zu, nicht aber solche Mutationen, die silent, also ohne Konsequenzen ablaufen. Durch diese, die Aminosäuresequenz verändernden Mutationen in den CDRs wird die Antigen-Haftung scheinbar verbessert. Bei derartigen Mutationen in den FRs, die über die strukturelle Veränderung des Rückgrates der Antigen-Antikörper-Kontaktstelle die Antigen-Haftung beeinflussen können, scheinen nur ausgewählte Mutationen von Vorteil zu sein. Deshalb sind die Mutationsfrequenzen und die Replacementfrequenzen in den FRs signifikant niedriger. Die Wirkung einer Replacementmutation in den FRs könnte unerwünscht umfassende Folgen haben, wenn es zum Beispiel dadurch zu einer anderen Faltung der Aminosäurekette kommt als zuvor ³⁶. Eine negative Selektion von Sequenzen mit Mutationen in den FRs wurde zwar nicht beobachtet, aber die positive Selektion und die Aktivitätssteigerung der Mutationsmechanismen sind geringer als in den CDRs.

Um die Effektivität der Mutationen zu überprüfen, wurde der Anteil der Replacements an den Mutationen bestimmt (Figur 21). 100% würden bedeuten, dass jede Mutation ein Replacement zur Folge gehabt hätte. Statistisch erwartbar wären 48,61% Replacements/Mutationen gewesen. Die Tatsache, dass auch bei den unselektionierten, nicht-produktiven Rearrangements bei der Hälfte der Werte die Mutationen signifikant effektiver waren, als erwartet, verhärtet die Vermutung, dass die Mutationen nicht nur durch zufällige Aktionen oder als nicht reparierte Fehler entstehen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es Mutationsmechanismen geben

muss, die Replacements bevorzugen. Die molekulare Abfolge der Ereignisse bleibt jedoch weiter unklar.

Beim Vergleich der Mutationseffektivität von nicht-produktiven Rearrangements in den CDRs und in den FRs fiel eine Veränderung im Reifungsprozess auf. Bei den naiven B-Zellen war der Anteil der Replacements an den Mutationen noch mit 81% in den CDRs höher als in den FRs mit 67%. Bei den keimzentrumsbildenden B-Zellen waren die Mutationseffektivitäten in den CDRs und in den FRs beinahe gleich. Im Stadium der Zentroblasten kehrte sich das Verhältnis zwischen der Effektivität in den CDRs und in den FRs von den nicht-produktiven Rekombinationen interessanterweise um. Bei den Zentroblasten wurde in den CDRs ein Anteil von 70% Replacements/Mutationen gefunden und in den FRs ein Anteil von 79% Replacements/Mutationen. In den Reifestadien der Zentrozyten und der Gedächtnis-B-Zellen wurde dieser Unterschied bei den nicht-produktiven Rearrangements zwischen den Replacements/Mutationen in den CDRs und in den FRs noch größer. Auf Grund der niedrigeren Datenmenge bei den nicht-produktiv rekombinierten Sequenzen, sind diese Unterschiede leider nicht signifikant. Aber sie sind so konstant, dass durchaus eine Interpretation nahe liegt. Im Gegensatz zu den nicht-produktiven Rearrangements ist nämlich die Mutationseffektivität bei den produktiven Rearrangements stets in den CDRs höher als in den FRs, und diese Unterschiede sind, außer im Stadium mit der geringsten Datenmenge, den keimzentrumsbildenden B-Zellen, signifikant. Nachdem herausgefunden wurde, dass die Mutationen in den nicht-produktiven Rearrangements nach dem Stadium der Zentroblasten abnehmen, und zu diesem Zeitpunkt auch die Umstellung der Mutationseffektivität von den CDRs zu den FRs erfolgt, kann man vermuten, dass zumindest bei den nicht-produktiven Rearrangements zu diesem Zeitraum eine Veränderung auftritt. Eventuell wird ein anderer, zusätzlicher Mutationsmechanismus eingesetzt, oder versuchtes Rezeptor-Editing hat eine Veränderung des Mutationsmechanismus zur Folge. Ob diese Veränderung in der Mutationscharakteristik ein Ziel verfolgt, wie zum Beispiel doch noch die Umwandlung in ein produktives Rearrangement zu erreichen, oder rein zufällig ist, konnte nicht festgestellt werden.

Die gefundenen Unterschiede lassen des weiteren vermuten, dass der Mutationsmechanismus zwischen CDRs und FRs unterscheiden kann. Bei den produktiven Rearrangements werden Sequenzen mit effektiven Replacementmutationen positiv selektioniert und der Mutationsmechanismus arbeitet

eventuell effektiver. Dagegen mutiert der Mutationsmechanismus bei den nicht-produktiven Rearrangements effektiver in den FRs als in den CDRs. Das ist ein anderes Ergebnis, als erwartet, da es bedeuten kann, dass der Mutationsmechanismus nicht nur zwischen CDR und FR unterscheiden kann, sondern auch zwischen produktiven und nicht-produktiven Rearrangements. Dies legt den Schluss nahe, dass dieser Mutationsmechanismus in seiner Gesamtheit jedoch nicht, wie von anderen vermutet ^{41, 42, 43}, mit dem Transkriptionsmechanismus gekoppelt ist, da vor der Transkription noch nicht feststeht, ob ein Rearrangement produktiv oder nicht-produktiv sein wird. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass auch nicht-produktiv rearrangierte Immunglobuline versuchsweise als sogenannte sterile Transkripte abgeschrieben werden. In diesem Rahmen könnte ein in zwei Etappen arbeitender Mutationsprozess nach der ersten Stufe abbrechen, sollte sich ein Rearrangement als nicht-produktiv erweisen.

4.6 Mutationsraten der einzelnen Nukleotide in den CDRs und in den FRs (Figuren 23-25)

Um weitere Informationen über die Funktionsweise des Mutationsmechanismus zu erhalten, wurde die Aufteilung der mutierten Nukleotide analysiert. Die nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen ermöglichten den Einblick in die unselektionierte Verteilung, und die Differenzierung von CDR-Regionen und FRs ließ den Vergleich des Verhaltens des Mutationsmechanismus in den unterschiedlichen Sequenzabschnitten zu. Auf Grund der geringen Mutationsanzahl bei den nicht-produktiven Rearrangements war sowohl in den CDRs als auch in den FRs lediglich der Unterschied zwischen den Mutationen des Nukleotids T und denen des Nukleotids A signifikant. Aber bereits dieser eine signifikante Unterschied bei den nicht-produktiven Rearrangements reicht aus, um eine wichtige Erkenntnis über den Mutationsmechanismus zu gewinnen. Mit Hilfe der Verwendung des Primers war stets der gleiche Strang der DNA-Doppelhelix in 5'3'-Richtung sequenziert worden. Aus sterischen Gründen muss das Nukleotid A immer mit dem Nukleotid T, und das Nukleotid G immer mit dem Nukleotid C über zwei beziehungsweise drei Wasserstoffbrückenbindungen ein Paar bilden ¹. Wenn das Nukleotid A nun auf beiden DNA-Strängen in gleichem Maß mutiert werden könnte, so müsste

demzufolge das Nukleotid T ebenso häufig mutiert sein. Denn als Partner eines mutierten Nukleotids A würde es die Gestalt des zur Mutation passenden Nukleotids annehmen und wäre ebenfalls als Mutation in die Datenbank aufgenommen worden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es besteht sogar bei den wenigen Mutationen der nicht-produktiven Rearrangements ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Mutationen des Nukleotids A und der des Nukleotids T. Daraus kann man schließen, dass der Mutationsmechanismus lediglich auf einem der beiden Stränge der DNA-Doppelhelix aktiv ist. Durch ähnliche Forschungsergebnisse kommen auch Wagner/Neubauer und Betz zu dieser Schlussfolgerung ^{42, 44}.

Die Anteile der einzelnen Nukleotide an den Mutationen sind in den CDRs und in den FRs von nicht-produktiven Rearrangements, aber auch in den FRs von produktiv rearrangierten Sequenzen ähnlich (Figur 23 und 24). Stets wird das Nukleotid A am häufigsten mutiert, und der Anteil der Purine (Nukleotide A und G) an den Mutationen ist mit 58%, beziehungsweise 54% und 62% überdurchschnittlich hoch. Der Mutationsmechanismus scheint die vier Nukleotide unterscheiden zu können und Purine den Pyrimidinen T und C bei der Durchführung einer Mutation vorzuziehen.

In den CDRs der produktiven Rearrangements sieht die Verteilung der Mutationen auf die Nukleotide anders aus. Der Hauptteil der Mutationen entfällt mit 38% auf das Nukleotid G. Da der Unterschied zu den nicht-produktiven Rearrangements signifikant ist ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test), wurden Sequenzen mit besonders vielen Mutationen des Nukleotids G in den CDRs nach Antigen-Kontakt positiv selektioniert, oder der Mutationsmechanismus erkennt das produktive Rearrangement und seine Lokalisation in einer der drei CDR-Regionen und legt seinen Mutationsschwerpunkt auf das Nukleotid G. Es ist bekannt, dass die meisten RGYW/WRCY-Nukleotid-Kombinationen in den CDRs häufiger auftreten als erwartet und auch als in den FRs ⁴⁵. Da jedoch in diesen acht Nukleotid-Kombinationen jedes der Nukleotide insgesamt 16 Mal enthalten ist, kann die besonders häufige Mutation der RGYW/WRCY-hotspots in den CDRs von produktiven Rearrangements nicht zu der übermäßigen Mutation des Nukleotids G führen. Ein weiteres Argument gegen diese Theorie ist die Tatsache, dass bei den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen in den CDRs keine Tendenz zu einer ausgeprägteren Mutation des Nukleotids G im Vergleich zu in den FRs erkennbar ist. So können lediglich eine positive Selektion und eventuell eine veränderte Funktionsweise des Mutationsmechanismus die Ursache der anderen Aufteilung der Mutationen auf die Nukleotide sein.

Betrachtet man die Veränderung der mutierten Nukleotide in den CDRs produktiver Rearrangements im Verlauf des Reifungsprozesses (Figur 25), so lässt sich kein sprunghafter Anstieg der Mutation des Nukleotids G feststellen, sondern es besteht bereits im Stadium der naiven B-Zellen eine Häufung der Mutation des Nukleotids G. (Das Stadium der keimzentrums-bildenden B-Zellen sollte auf Grund der geringen Anzahl an Mutationen außer Betracht gelassen werden.) Demnach kann keine Veränderung im Sinne einer positiven Selektion von Sequenzen mit vielen Mutationen des Nukleotids G festgestellt werden. Diese Tatsache spricht dafür, dass bereits der Mutationsmechanismus selbst in den CDRs von produktiv rearrangierten Sequenzen vermehrt Mutationen des Nukleotids G einführt. Auch wenn zum Beispiel bei den Ergebnissen des letzten Kapitels eine Veränderung der Aktivität und der Effektivität des Mutationsmechanismus nach dem Reifestadium der Zentroblasten erkennbar war, bleibt die Verteilung der Nukleotide, die der Mechanismus mutiert, während des Reifungsprozesses annähernd konstant.

4.7 Transitionen und Transversionen (Figuren 26-30)

Eine Verbesserung der Antikörper-Antigen-Haftung können lediglich Replacementmutationen mit der Veränderung der Aminosäure-Sequenz als Konsequenz bewirken. Die Tatsache, ob diese Mutation ein Purin durch ein Pyrimidin ersetzt, oder umgekehrt, oder ob nur eine Transition stattfindet, hat auf die Antigen-Haftung keinen Einfluss. Es ist allerdings von sterischem Interesse für die Doppelhelix, so dass man sich eine Auskunft über die Funktionsweise des Mutationsmechanismus versprach, aber keine ausgeprägte positive oder negative Selektion erwartete.

Beim Vergleich der in der Tonsille gefundenen Y- oder R-Transitionen mit den entsprechenden Transversionen, fand man in den CDRs eine Dominanz der Transitionen. Bei den Pyrimidinen wurde ein Wert von 1,24 (Anteil Transitionen / Transversionen) an Stelle der statistisch zu erwartenden 0,5 (33,3% Transitionen und 66,7% Transversionen) ermittelt. Bei den Purinen in den CDRs lag der Wert bei 1,03, was für ein beinahe gleiches Auftreten von Transitionen und Transversionen spricht. In den FRs waren bei den untersuchten Kleinkindtonsillen die Werte noch höher (1,5 bei den Pyrimidinen und 1,21 bei den Purinen). Das bedeutet, dass der

Anteil der Transitionen an den Mutationen in den FRs noch höher war als in den CDRs. Wagner und Wilson beschreiben beide, dass auch sie in ihren Mutationsdaten eine Präferenz für Transitionen im Gegensatz zu Transversionen ausmachen konnten 42, 46. Weil all diese Ergebnisse so sehr von der statistischen Erwartung abweichen, muss es einen Mutationsmechanismus geben, der bei den Mutationsvorgängen gezielt die sterisch günstigeren, aber unwahrscheinlicheren Transitionen durchführt. Außerdem liefert die vorliegende Untersuchung Beweise dafür, dass der postulierte Mutationsmechanismus zwischen CDR-Regionen und Framework differenzieren kann. Denn die unterschiedlichen Verhältnisse zwischen Transitionen und Transversionen belegen, dass der untersuchte Mechanismus in den FRs den Mutationsschwerpunkt auf Transitionen setzt, aber in den CDRs häufiger die sterisch komplexeren Transversionen durchführt. Zu einem vergleichbaren Ergebnis gelangen Klein und Zachau, obwohl sie nur CDR3 und nicht alle drei CDRs untersuchten 47.

Von der Aufteilung dieser Untersuchung auf die einzelnen Reifestadien erhoffte man sich Auskunft darüber, ob der Mutationsmechanismus in den CDRs bereits bei den naiven B-Zellen anders arbeitet als in den FRs, oder ob ein Zeitpunkt erkennbar wird, in dem eine Veränderung stattfindet. Beim Vergleich der Y- beziehungsweise R-Transversionen mit den Y- beziehungsweise R-Transitionen fiel auf, dass in den CDRs eine deutlich stärkere Tendenz zu Transversionen bestand, als in den FRs. Vor allem in den Stadien der Zentroblasten und der Zentrozyten kam der Anteil der Transversionen an den Mutationen in den CDRs dem statistisch erwarteten Wert näher, als in den FRs oder als in den anderen Entwicklungsstadien. Da in den Stadien der Zentroblasten und der Zentrozyten besonders viele Mutationen in den CDRs entstehen, liegt die Vermutung nahe, dass der Mutationsmechanismus in diesen Stadien der Entwicklung schneller arbeiten muss. Deshalb kann er zum Beispiel die für die Mutation zur Verfügung stehenden Nukleotide nicht auf ihre Purin- oder Pyrimidin-Zugehörigkeit prüfen, sondern muss die Nukleotide verwenden, die gegebenenfalls vorhanden sind, auch wenn das zu sterisch ungünstigeren Veränderungen führt, und die Mutation mehr Energie verbraucht. Die Tatsache, dass sich die Stadien der Zentroblasten und der Zentrozyten durch ihr von den anderen Stadien unterschiedliches Mutationsverhalten im Hinblick auf das Auftreten von Transversionen und Transitionen so hervorheben, legt die Vermutung nahe, dass zum Beispiel bedingt durch engen Antigen-Kontakt der Mutationsmechanismus in

diesen beiden Stadien besonders aktiv ist. Durch die gesteigerte Aktivität verringert sich die Fähigkeit des Mutationsmechanismus, die zufällige Verwendung von Ersatznukleotiden zu vermeiden und aus sterischen Gründen gezielt Transitionen vorzuziehen. So ist die Annäherung der Verteilung auf Transversionen und Transitionen in den besonders mutations-aktiven Reifestadien der Zentroblasten und der Zentrozyten an die zu erwartenden 66,7% beziehungsweise 33,3% nachvollziehbar.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Mutationsmechanismus bevorzugt – jedoch nicht ausschließlich - Purine durch Purine und Pyrimidine durch Pyrimidine ersetzt, so dass die dreidimensionale Struktur der DNA seltener verändert wird, als es die Wahrscheinlichkeit suggeriert. Lediglich in den CDRs von häufig mutierten Sequenzen, wie zum Beispiel in den Reifestadien der Zentroblasten und der Zentrozyten, arbeitet der Mutationsmechanismus nicht so gezielt und energetisch günstig, sondern vermutlich durch die vermehrte Aktivität verändert sich die Arbeitsweise, und die Anteile an den Transitionen und Transversionen nähern sich den statistisch erwartbaren Werten an.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung des V_{κ} -Immunglobulin-Repertoires in Keimzentren der Tonsille zu untersuchen. Dazu wurden von sechs Probanden im Kleinkindalter B-Zellen aus Tonsillen in Einzelzellen getrennt und deren V_{κ} -Ketten von genomischen Rearrangements amplifiziert. Insgesamt konnten 594 Sequenzen mit Hilfe von Zellsortierung, zufälliger DNA-Amplifizierung, PCR-Vermehrung der DNA und anschließender Gensequenzanalyse analysiert werden. Die Sequenzen wurden anhand von Oberflächeneigenschaften der B-Zellen in fünf verschiedene Reifestadien (N, GCF, CB, CC und MB) eingeteilt. Durch den Vergleich mit der Datenbank von Tomlinson ³⁰ wurde jede Sequenz demjenigen Gen zugeordnet, mit dem sie von der Nukleotidabfolge her am exaktesten übereinstimmte. Des Weiteren erfolgte eine Mutationsanalyse. Es wurde ermittelt, ob die zusammengesetzte Sequenz produktiv oder nicht-produktiv arrangiert war. Alle Ergebnisse wurden in Datenbanken im Softwareprogramm Microsoft Excel[®] gesammelt, ausgewertet und mit der statistischen Erwartung verglichen. Neben einem Vergleich der verschiedenen Reifestadien der B-Zellen in der Tonsille wurde auch ein Vergleich mit IgD⁺ B-Zellen von Neugeborenen ³¹ und IgM⁺ B-Zellen von Erwachsenen ²⁶ durchgeführt.

Bei der Zuordnung der analysierten Sequenzen zu ihren V_{κ} -Familien fiel in den von Kleinkindern gewonnenen Daten eine verminderte Verwendung von $V_{\kappa}1$, $V_{\kappa}2$ und $V_{\kappa}6$ und ein gesteigerter Einsatz von $V_{\kappa}3$ und $V_{\kappa}4$ gegenüber der statistisch zu erwartenden Häufigkeitsverteilung auf. Die signifikanten Unterschiede sowohl zwischen dem nicht-produktiven und dem produktiven Repertoire, als auch im Vergleich zwischen den Altersstufen Neugeborenen, Kleinkind und Adult weisen darauf hin, dass einige V_{κ} -Gene aufgrund einer stärkeren Antigenbindung positiv selektioniert werden. Die verschiedenen Altersstufen weisen ein signifikant unterschiedliches Antikörperspektrum auf.

Für die Verwendung der fünf verschiedenen J_{κ} hat diese Untersuchung ergeben, dass $J_{\kappa}2$ mit 80% die dominierende Rolle beim Kleinkind spielt. Dabei ändert weder das Reifestadium der B-Zelle, noch die Mutationsfrequenz der Sequenz etwas an dieser Präferenz von $J_{\kappa}2$. $J_{\kappa}2$ muss in B-Zellen der Tonsille im Kleinkindalter entweder von besonderem Nutzen sein, oder die Verwendung von $J_{\kappa}2$ wird im

Gegensatz zu den anderen vier J_{κ} speziell gefördert. Besonders in B-Zellen von Erwachsenen ist die Häufigkeit der Verwendung der fünf verschiedenen J_{κ} deutlich ausgeglichener.

Bei der CDR3-Länge der untersuchten Gensequenzen gab es eine große Vielfalt, die von elf bis 35 Nukleotiden reichte. Die meisten Sequenzen aus der Tonsille, ähnlich wie die Gensequenzen aus dem Nabelschnurblut ³¹ und aus dem peripheren Blut adulter Spender ²⁶, wiesen eine CDR3-Länge von 27 Nukleotiden auf. Diese CDR3-Länge erfordert den „geringsten energetischen“ Aufwand, da sie am einfachsten durch keine, beziehungsweise geringe Insertions- oder Exonuklease-Aktivität entsteht.

Um zu gewährleisten, dass die angewandten Methoden verlässliche Ergebnisse hervorgebracht haben, und die gefundenen Mutationen tatsächlich als solche angesehen werden können und nicht etwa als Lesefehler der verwendeten, molekularbiologischen Instrumente, wurden in den Testreihen gleichzeitig auch die sequenz-stabilen Gene RAG1 (n=117) und Beta-Aktin (n=100) analysiert. Die gefundene Mutationsfrequenz lag in RAG1 Genen und in Beta-Aktin Genen im Bereich der Taq-Polymerase-Fehlerrate von 4-7 Fehler/10000 Basen ³³.

Die Mutationsfrequenz lag bereits bei den naiven B-Zellen und den keimzentrum-bildenden Zellen 20-fach höher als bei RAG-Genen. In der weiteren Reifung der B-Zelle war ein sprunghafter Anstieg in der Mutationsfrequenz der κ -Kette von GCF zu CB festzustellen. Während sie bei nicht-produktiven Rearrangements nur etwas anstieg und zum Ende des Reifeprozesses eher wieder abfiel, war die Veränderung der Mutationsfrequenz bei den produktiven Rearrangements markant und signifikant. Die Mutationsfrequenz von 0,029 Mutationen/Basenpaar bei produktiv rearrangierten Sequenzen in Gedächtnis-B-Zellen ist mehr als 40 Mal höher als die Taq-Polymerase-Fehlerrate. Dies führt die überragende Bedeutung von Mutationen zur Generierung von Variabilität für die Antigenbindung für unser Immunsystem vor Augen und gibt wichtige Einblicke in den Zeitpunkt und die örtlichen Gegebenheiten während der Entwicklung des V_{κ} -Immunglobulin-Repertoires in der kindlichen Tonsille.

Da lediglich derartige Mutationen zu einer verbesserten Antigen-Antikörper-Haftung führen können, die tatsächlich Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz bewirken, wurden die gefundenen Mutationen auf ihren Anteil an Replacement-Mutationen untersucht. Die Unterschiede zwischen dieser „Effektivität“ der Mutationen der nicht-

produktiven Rearrangements und derjenigen der produktiven Rearrangements und insbesondere auch die „Effektivitätsunterschiede“ zwischen den Mutationen in den CDR-Regionen und denjenigen im Framework weisen auf eine positive Selektion von Replacement-Mutationen in die CDRs hin. Gleichzeitig legen sie aber auch die Vermutung nahe, dass ein spezifischer Mutationsmechanismus zumindest anteilig für die Unterschiede zwischen CDR- und FR-Mutationen und zwischen nicht-produktiv und produktiv rearrangierten Sequenzen verantwortlich sein könnte.

Die Analyse, wie häufig die vier verschiedenen Nukleotide T, C, A und G von Mutationen betroffen sind, zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Mutationshäufigkeiten der sterischen Partner A und T. Dieser Unterschied könnte durch eine unterschiedliche Aktivität des Mutationsmechanismus präferentiell auf einem der beiden Stränge der DNA-Doppelhelix begründet sein. Die Verteilung der Nukleotide, die der Mutationsmechanismus mutiert, bleibt während der Keimzentrumsbildung annähernd konstant.

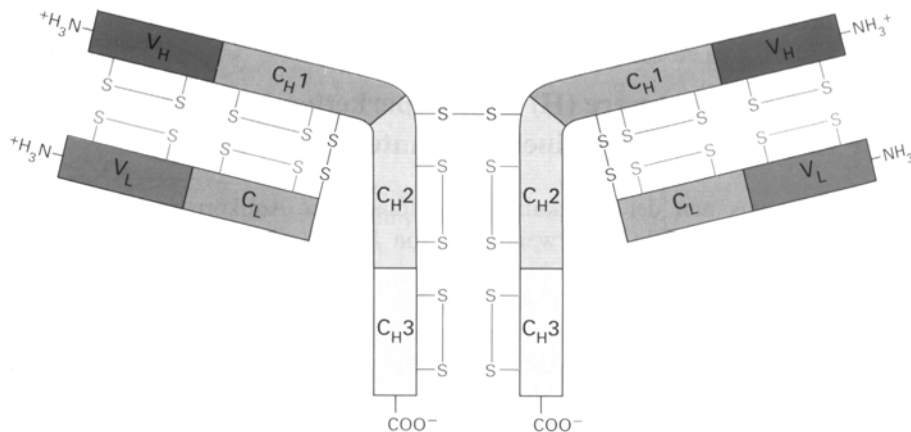
Als die Mutationen in Transitionen und Transversionen aufgetrennt analysiert wurden, konnte festgestellt werden, dass die gefundenen Daten von den statistisch zu erwartenden 33,3% Transitionen zu 66,7% Transversionen durchweg so stark abweichen, dass man das Vorhandensein eines Mutationsmechanismus postulieren muss, der gezielt die sterisch günstigeren, aber statistisch unwahrscheinlicheren Transitionen bevorzugt. Des Weiteren führen die durchgeführten Untersuchungen zu dem Schluss, dass der Mutationsmechanismus in der Lage ist, zwischen CDR-Regionen und Framework zu differenzieren.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Wichtigkeit der Evolution des V_k -Immunglobulin-Repertoires im Kleinkindalter. Die ermittelten Daten weisen im Vergleich zu Datenbanken der Altersstufen Neugeborenen³¹ und Adult²⁶ durchaus ähnliche Werte auf, deuten jedoch auch daraufhin, dass im Kleinkindalter besondere Anforderungen an die Präsenz von Leichtketten-Immunglobulinen gestellt werden. Es ergaben sich Hinweise für eine graduelle Entwicklung ausgehend vom Neugeborenen hin zum Erwachsenen.

Die Aufgliederung in die fünf verschiedenen Reifestadien der B-Zellen gab unter anderem Aufschluss darüber, dass in den Stadien der Zentroblasten und der Zentrozyten Mutationen stattfinden. Die Analyse der Mutationen führte zu der Konklusion, dass ein differentieller Mutationsmechanismus existieren muss, der gezielt B-Zellen aus späteren Entwicklungsstufen in den Keimzentren erfasst.

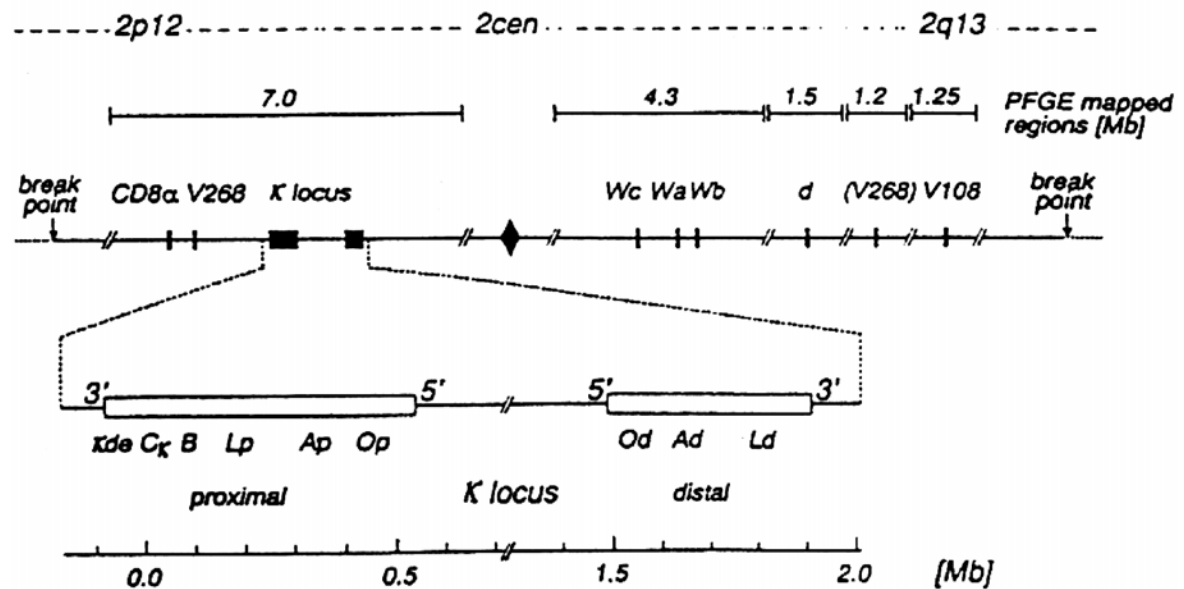
6. FIGUREN UND IHRE LEGENDEN

FIGUR1: Grundstruktur eines Antikörpers



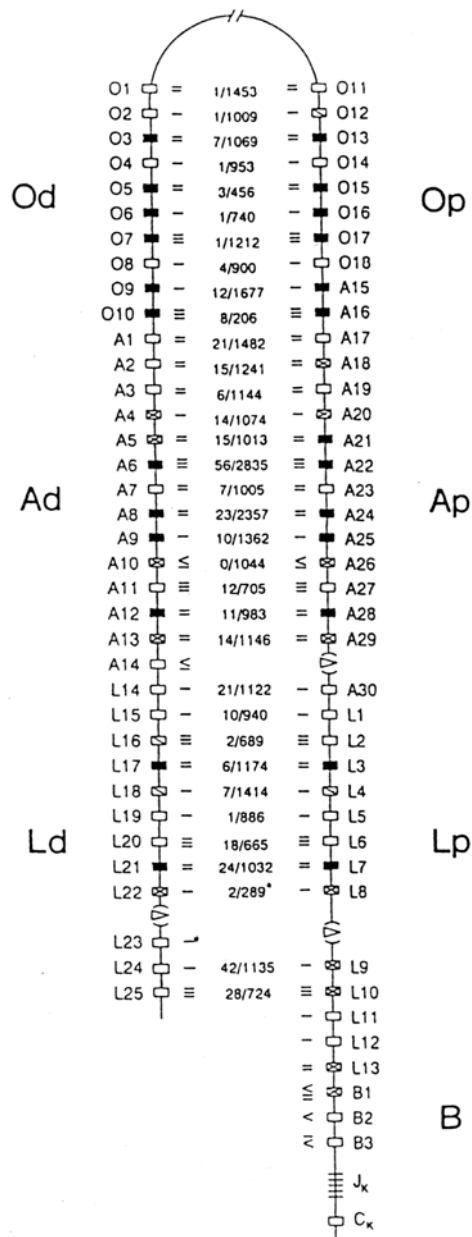
nach 1, S. 388

Dargestellt ist die Grundstruktur eines IgG-Antikörpers. Die beiden schweren Ketten in der Mitte werden über eine Disulfidbrücke zusammengehalten. Ebenfalls über Disulfidbrücken funktioniert der Verbund zu den außen liegenden leichten Ketten. Das aminoternale Ende umfasst die variablen Regionen und ist für die Antigenbindung zuständig, während die konstanten Regionen am carboxyterminalen Ende die Zugehörigkeit zu den einzelnen Antikörper-Klasse IgG, IgA, IgM, IgE oder IgD und deren spezifischen Eigenschaften determinieren.

FIGUR 2: Der Aufbau des κ -Lokus

nach 5

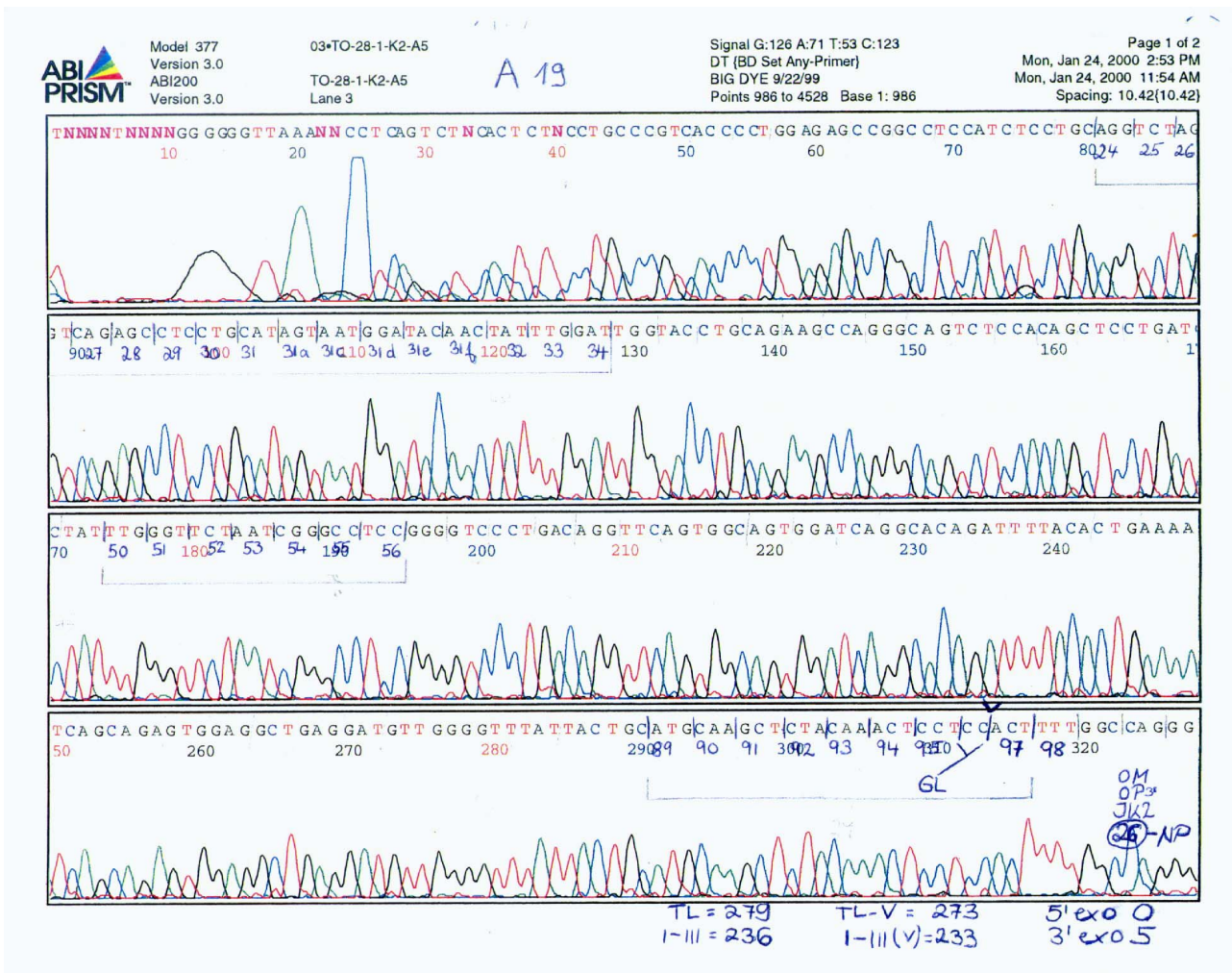
Zu sehen ist der zentrale Anteil von Chromosom 2 auf dem sich der κ -Lokus befindet. Die geklonten Regionen des κ -Lokus sind einmal als schwarze und in dem vergrößerten Ausschnitt als umrandete Kästen dargestellt. Rechts des κ -Lokus sind verstreute κ -Gene, sogenannte Orphons zu erkennen.

FIGUR 3: Die Gene des menschlichen κ -Lokus

Nach 8, S. 1002

Die Darstellung zeigt die distalen und die proximalen Teile des κ -Lokus. Umrandete Kästchen stellen potentiell funktionstüchtige Gene dar, durchgekennzeichnete Kästchen Gene mit kleineren Defekten und schwarze Kästchen Pseudogene. Am Ende der proximalen Kasette liegen die 5 J_κs und dann die Gene für die konstanten Teile der leichten κ -Kette.

FIGUR 4: Beispiel einer ausgewerteten Sequenz



FIGUR 4: Beispiel einer ausgewerteten Sequenz

Zu erkennen sind die farbigen Kurven und die Buchstaben der Nukleotide, die der Sequencher gelesen hat. Handschriftlich ergänzt sind der Name des V_{κ} -Gens und die Lokalisation von CDR1, 2 und 3. In CDR3 ist die Nummerierung der Kodons erfolgt, und GL- (Keimbahn-) Nukleotide sind gekennzeichnet. J_{κ} ist als $J_{\kappa}2$ identifiziert worden. Die CDR3-Länge ergab 26, woraufhin die Sortierung zu den nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen erfolgte. Außerdem wurden verschiedene Längen der untersuchten Sequenz bestimmt und notiert.

FIGUR 5: Die allgemeine Datenbank

	<u>Familienzugehörigkeit der B-Zelle</u>	<u>Name der Zelle</u>	<u>Position auf dem Gel</u>	<u>Beschickungsreihe</u>	<u>Name des V_k Gens</u>	<u>Anzahl der Mutationen</u>	<u>Länge inklusive FR1 exklusive J (TL-V)</u>	<u>Länge ohne FR1 exklusive J (L-III(V))</u>	<u>Gesamtlänge (TL - 98)</u>	<u>Produktiv oder Nicht Produktiv</u>	<u>Name des J_k Gens</u>	<u>CDR3 Länge</u>	<u>Exonukleaseaktivität am 5'Ende</u>	<u>Exonukleaseaktivität am 3'Ende</u>	<u>Anzahl an Keimbahnukleotiden am 5'Ende</u>	<u>Anzahl an N-Nukleotiden</u>	<u>Anzahl an Keimbahnukleotiden am 3'Ende</u>	<u>Anzahl an P-Nukleotiden am 5'Ende</u>	<u>Anzahl an P-Nukleotiden am 3'Ende</u>
1	CB	TO-28-3-K3-A1	1/29/200#1	19	L6	0	232	218	243	NP	2	31	0	5	2	4	0	1	0
2	CB	TO-28-3-K3-A2	1/29/200#1	20	L20	0	233	218	244	NP	2	31	0	5	2	1	0	2	2
3	CB	TO-28-3-K3-A3	1/29/200#1	21	A27	3	233	219	243	P	1	27	3	0	0	0	1	0	0
4	CB	TO-28-3-K3-A4	1/29/200#1	22	L6	4	225	211	230	P	2	18	7	6	0	0	0	0	0
5	CB	TO-28-3-K3-A5	1/29/200#1	23	A27	1	234	220	245	P	2	30	1	1	1	1	1	0	0
6	CB	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	24	A27	14	235	221	245	P	1	30	0	0	2	0	1	0	0
7	CB	TO-28-3-K3-A10	1/29/200#1	26	A27	0	232	218	245	P	2	30	3	0	0	2	2	0	0
8	CB	TO-28-3-K3-B2	1/29/200#1	29	A27	1	223	219	232	P	1	27	2	4	0	2	0	0	0
9	CB	TO-28-3-K3-B3	1/29/200#1	30	A27	0	231	219	240	P	2	27	2	2	0	0	0	0	0
10	CB	TO-28-3-K3-B5	1/29/200#1	32	L2	8	231	217	239	P	1	27	1	4	1	1	0	1	0
11	CB	TO-28-3-K3-B9	1/29/200#1	34	A27	0	224	218	237	P	4	30	3	0	0	1	1	2	0
12	CB	TO-28-3-K3-C2	1/29/200#1	35	Vh	4	230	218	236	NP	5	23	3	7	0	3	0	0	0

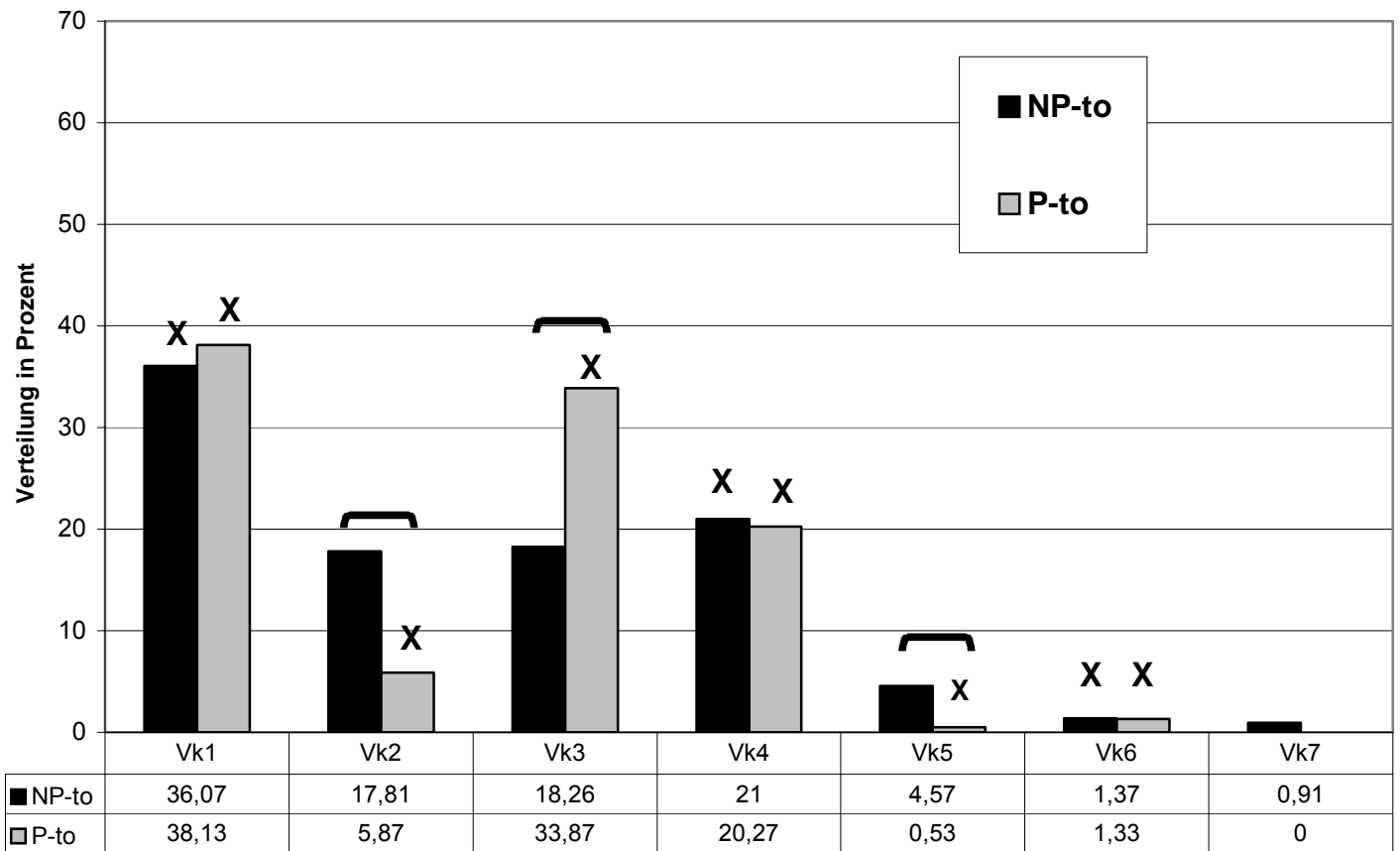
Die Sequenzen wurden in Excel[®] Dateien mit den Informationen, wie sie in der ersten Reihe beschrieben sind, gesammelt.

FIGUR 6: Die Mutations-Datenbank


	Name der Zelle	Position auf dem Gel	Name der Vk Familie	Familienzugehörigkeit der B-Zelle	Name des Vκ Gens	Produktiv oder Nicht Produktiv	Position des mutierten Kodons	Position der Mutation in einem CDR-Kodon	Position der Mutation in einem FR-Kodon	Ursprüngliches Nukleotid	Durch Mutation entstandenes Nukleotid	Replacement- oder Silent-Mutation	Aminosäureveränderung	Mutationsposition in einem RGYW	Mutationsposition in einem WRCY
1	TO-28-3-K3-A3	1/29/200#1	3	CB	A27	P	31	1		A	G	R	SER >GLY	30/1-31/1	
2	TO-28-3-K3-A3	1/29/200#1	3	CB	A27	P	31a	1		G	C	R	SER>THR	31a/1-32/1	
3	TO-28-3-K3-A3	1/29/200#1	3	CB	A27	P	53	2		G	T	R	SER>ILE	53/1-54/1	
4	TO-28-3-K3-A4	1/29/200#1	3	CB	L6	P	30	1		G	A	R	SER>ASN	30/1-31/1	
5	TO-28-3-K3-A4	1/29/200#1	3	CB	L6	P	31	1		G	A	R	SER>ASN	31/1-32/1	
6	TO-28-3-K3-A4	1/29/200#1	3	CB	L6	P	53	2		C	G	R	ASN>LYS		
7	TO-28-3-K3-A4	1/29/200#1	3	CB	L6	P	69		3	A	G	R	THR>ALA		
8	TO-28-3-K3-A5	1/29/200#1	3	CB	A27	P	40		2	C	T	R	PRO>SER		39/2-40/2
9	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	30	1		A	C	R	SER>ARG	30/1-31/1	
10	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	30	1		G	A	R	SER>ASN	30/1-31/1	
11	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	31	1		G	C	R	SER>THR	31/1-31a/1	
12	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	31a	1		G	A	R	SER>ASN	31a/1-32/1	
13	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	33	1		A	G	S	LEU		33/3-34/3
14	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	45		2	G	A	R	ARG>LYS	45/2-46/2	
15	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	45		2	G	A	S	ARG	45/2-46/2	
16	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	51	2		G	A	R	ALA>THR		
17	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	52	2		C	G	S	SER	53/1-54/1	
18	TO-28-3-K3-A6	1/29/200#1	3	CB	A27	P	67		3	T	A	S	SER		

In dieser zweiten Datenbank wurden, nach Aussortierung von eventuellen Klonen, die in der obersten Tabellenzeile beschriebenen Daten über die gefundenen Mutationen gespeichert.

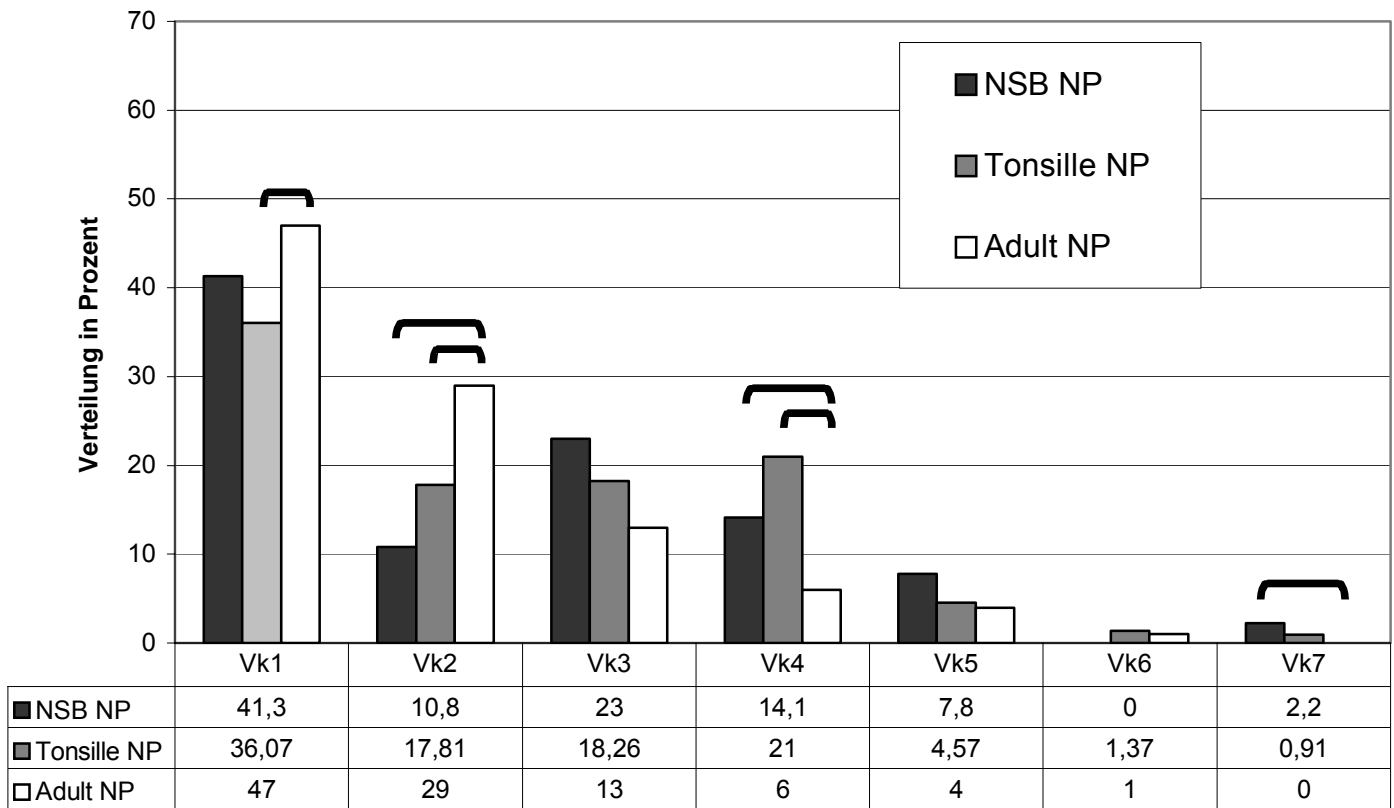
FIGUR 7: Häufigkeitsverteilung von Vk-Familien bei nicht-produktiven (NP) versus produktiven (P) Rearrangements in allen Sequenzen unabhängig vom Reifestadium



FIGUR 7: Häufigkeitsverteilung von V_{κ} -Familien bei nicht-produktiven versus produktiven Rearrangements in allen Sequenzen unabhängig vom Reifestadium

Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten von den V_{κ} -Genfamilien 1-7 im Vergleich von nicht-produktiv (NP-to: n=219) zu produktiv (P-to: n=375) rearrangierten Gensequenzen. Der statistische Unterschied der Häufigkeit der jeweiligen V_{κ} -Familie gegenüber der statistischen, zufälligen Erwartung (100% : 7 = 14,28%) wurde mit **X** markiert ($V_{\kappa}1$ NP $p \leq 0,001$; $V_{\kappa}1$ P $p \leq 0,005$; $V_{\kappa}2$ P $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}3$ P $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}4$ NP $p \leq 0,0001$; $V_{\kappa}4$ P $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}5$ P $p \leq 0,05$; $V_{\kappa}6$ NP $p \leq 0,001$; $V_{\kappa}6$ P $p \leq 0,00001$; χ^2 goodness of fit-Test). Unterschiede zwischen den Häufigkeiten von nicht-produktiv (NP) und produktiv (P) rearrangierten κ -Genfamilien wurden mit einer Klammer () markiert ($V_{\kappa}2$ NP versus P $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}3$ NP versus P $p \leq 0,00005$; $V_{\kappa}5$ NP versus P $p \leq 0,001$; χ^2 -Test).

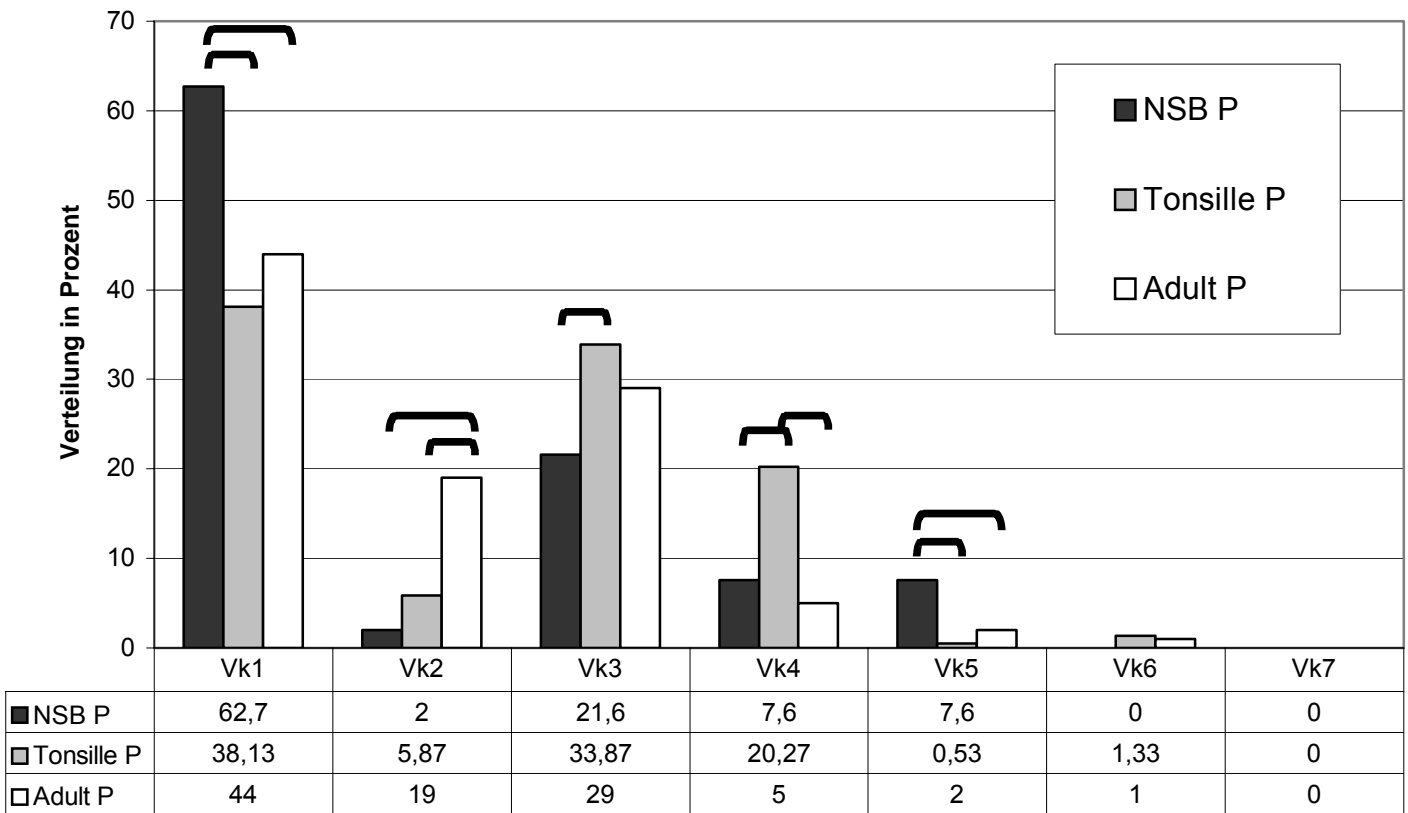
FIGUR 8: Häufigkeitsverteilung von Vk-Familien bei nicht-produktiven Immunglobulin-Rearrangements im Vergleich zwischen den Altersstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)



FIGUR 8: Häufigkeitsverteilung von V_{κ} -Familien bei nicht-produktiven Immunglobulin-Rearrangements im Vergleich zwischen den Altersstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)

Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der V_{κ} -Genfamilien 1-7 bei nicht-produktiv rearrangierten Immunglobulin-Sequenzen im Vergleich zwischen den Altersstufen Neugeborene (n=92), Kleinkinder (n=219) und adult (n=232). Signifikante Unterschiede zwischen den Häufigkeiten der V_{κ} -Familien im Nabelschnurblut, in der Tonsille und im adulten Blut wurden mit einer Klammer markiert ($V_{\kappa}1$ NP To versus Ad $p \leq 0,05$; $V_{\kappa}2$ NP NSB versus Ad $p \leq 0,001$; $V_{\kappa}2$ NP To versus Ad $p \leq 0,01$; $V_{\kappa}4$ NP NSB versus Ad $p \leq 0,05$; $V_{\kappa}4$ NP To versus Ad $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}7$ NP NSB versus Ad $p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

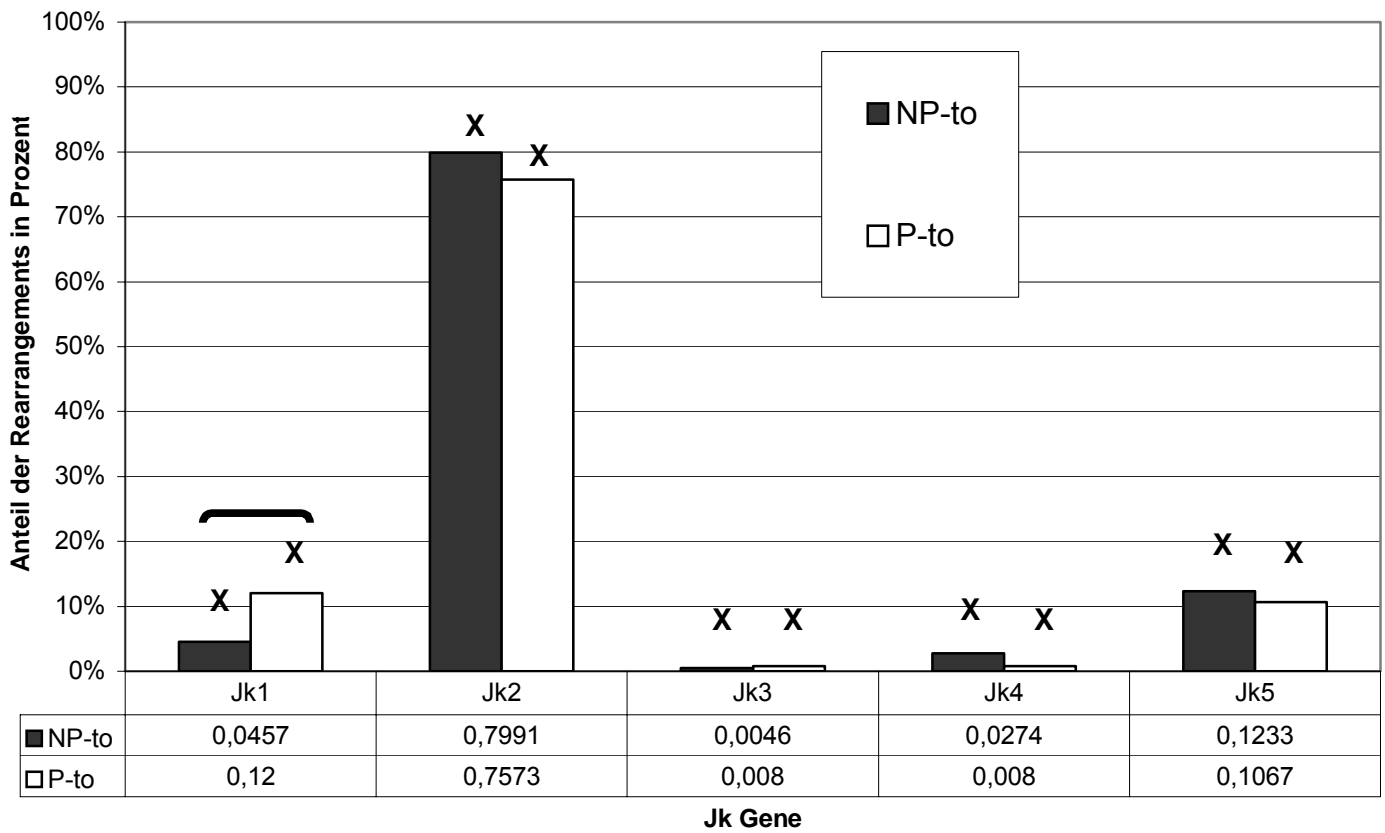
FIGUR 9: Häufigkeitsverteilung von Vk-Familien in produktiven Immunglobulin-Rearrangements im Vergleich zwischen den Altersstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)



FIGUR 9: Häufigkeitsverteilung von V_{κ} -Familien in produktiven Immunglobulin-Rearrangements im Vergleich zwischen den Altersstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)

Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der V_{κ} -Genfamilien 1-7 bei produktiv rearrangierten Sequenzen im Vergleich zwischen den Altersstufen Neugeborene (n=102), Kleinkinder (n=375) und Adult (n=321). Signifikante Unterschiede zwischen den Häufigkeiten der V_{κ} -Familien im Nabelschnurblut, in der Tonsille und im adulten Blut wurden mit einer Klammer markiert ($V_{\kappa}1$ P NSB versus To $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}1$ P NSB versus Ad $p \leq 0,001$; $V_{\kappa}2$ P NSB versus Ad $p \leq 0,00005$; $V_{\kappa}2$ P To versus Ad $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}3$ P NSB versus To $p \leq 0,05$; $V_{\kappa}4$ P NSB versus To $p \leq 0,005$; $V_{\kappa}4$ P To versus Ad $p \leq 0,00001$; $V_{\kappa}5$ P NSB versus To $p \leq 0,00005$; $V_{\kappa}5$ P NSB versus Ad $p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

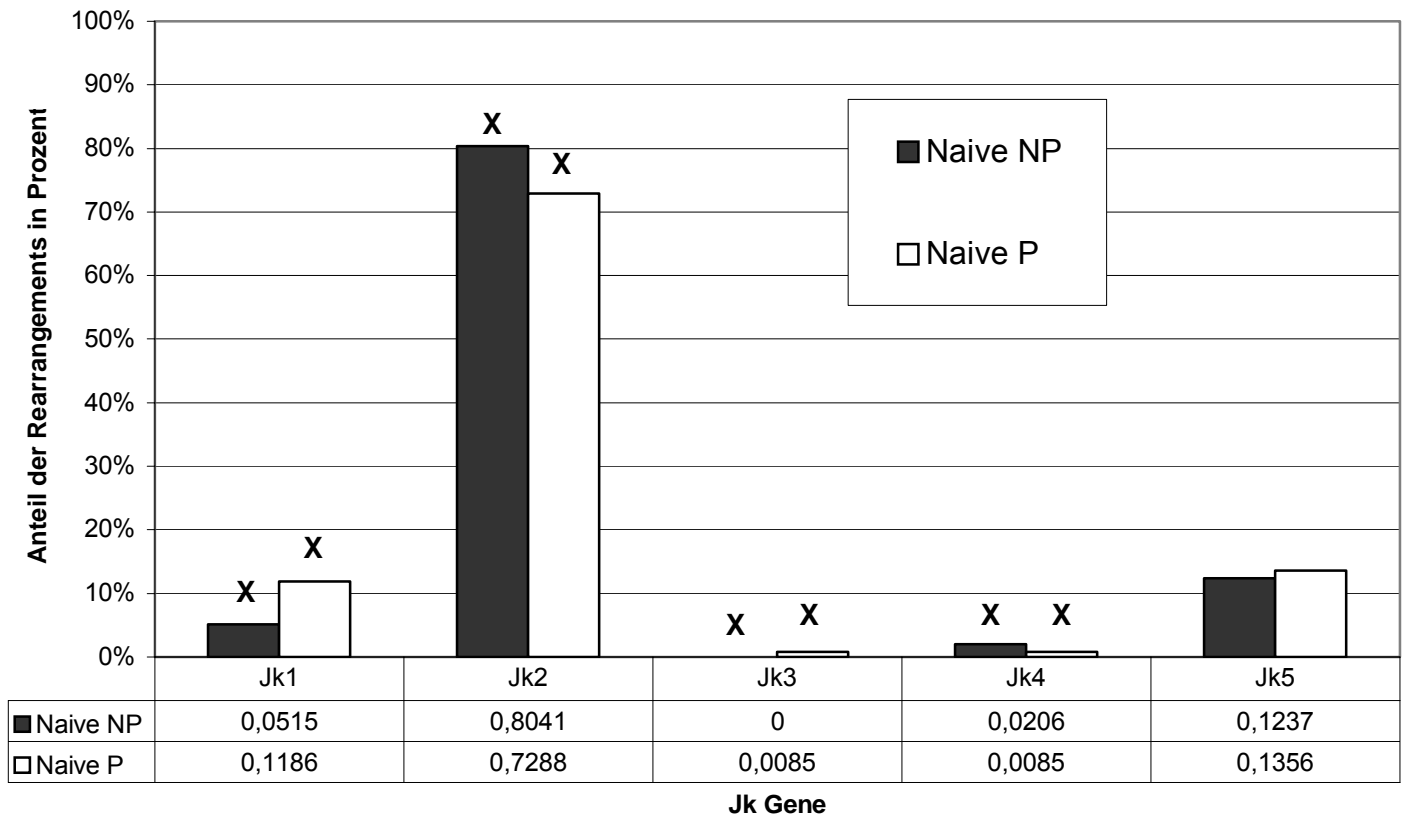
FIGUR 10: Jk Verteilung in nicht-produktiven (NP) und produktiven (P) Rearrangements in der Tonsille von Kleinkindern



FIGUR 10: J_k Verteilung in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements in der Tonsille von Kleinkindern

In diesem Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der fünf J_k Gene im Vergleich zwischen den nicht-produktiv und den produktiv rearrangierten Sequenzen dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-produktiven und produktiven Rearrangements bestand lediglich bei J_k1 ($p \leq 0,005$; χ^2 -Test), was durch eine Klammer gekennzeichnet ist. Die Differenzen zum statistisch erwartbaren Wert waren bei allen J_k-Genen signifikant (J_k1 NP $p \leq 0,00001$; J_k1 P $p \leq 0,0005$; J_k2 NP $p \leq 0,00001$; J_k2 P $p \leq 0,00001$; J_k3 NP $p \leq 0,00001$; J_k3 P $p \leq 0,00001$; J_k4 NP $p \leq 0,00001$; J_k4 P $p \leq 0,00001$; J_k5 NP $p \leq 0,005$; J_k5 P $p \leq 0,00001$; χ^2 goodness of fit-Test) und wurden mit einem **X** markiert.

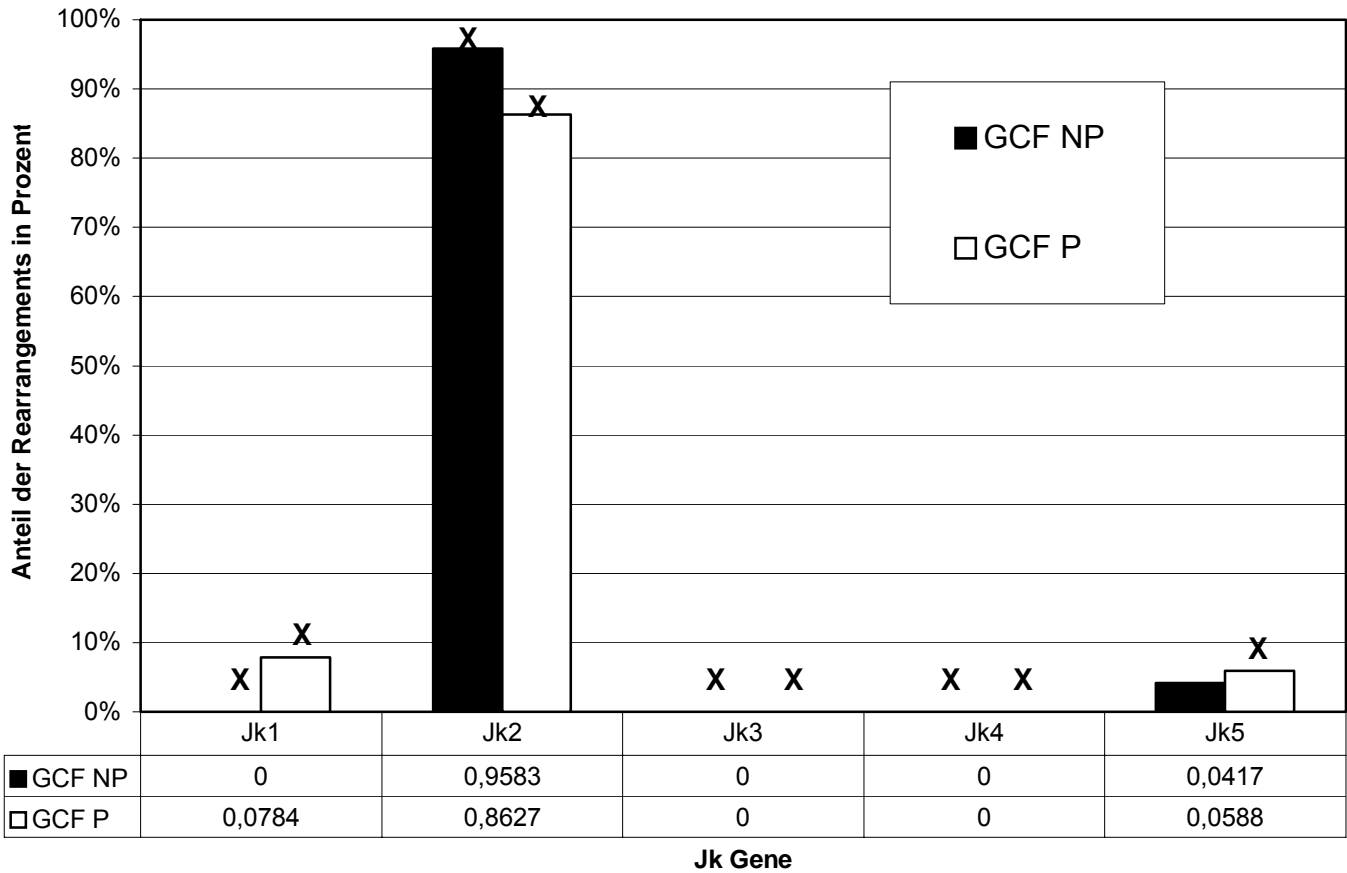
FIGUR 11: Jk Verteilung in nicht-produktiven (NP) und produktiven (P) Rearrangements in naiven B-Zellen der Tonsille von Kleinkindern



FIGUR 11: J_κ Verteilung in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements in naiven B-Zellen der Tonsille von Kleinkindern

In diesem Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der fünf J_κ Gene im Vergleich zwischen den nicht-produktiv und den produktiv rearrangierten Sequenzen der naiven B-Zellen dargestellt. Die Differenzen, die zum statistisch erwartbaren Wert signifikant waren, wurden mit einem **X** gekennzeichnet (J_κ1 NP p≤0,0005; J_κ1 P p≤0,05; J_κ2 NP p≤0,00001; J_κ2 P p≤0,00001; J_κ3 NP p≤0,00001; J_κ3 P p≤0,00001; J_κ4 NP p≤0,00005; J_κ4 P p≤0,00001; χ^2 goodness of fit-Test).

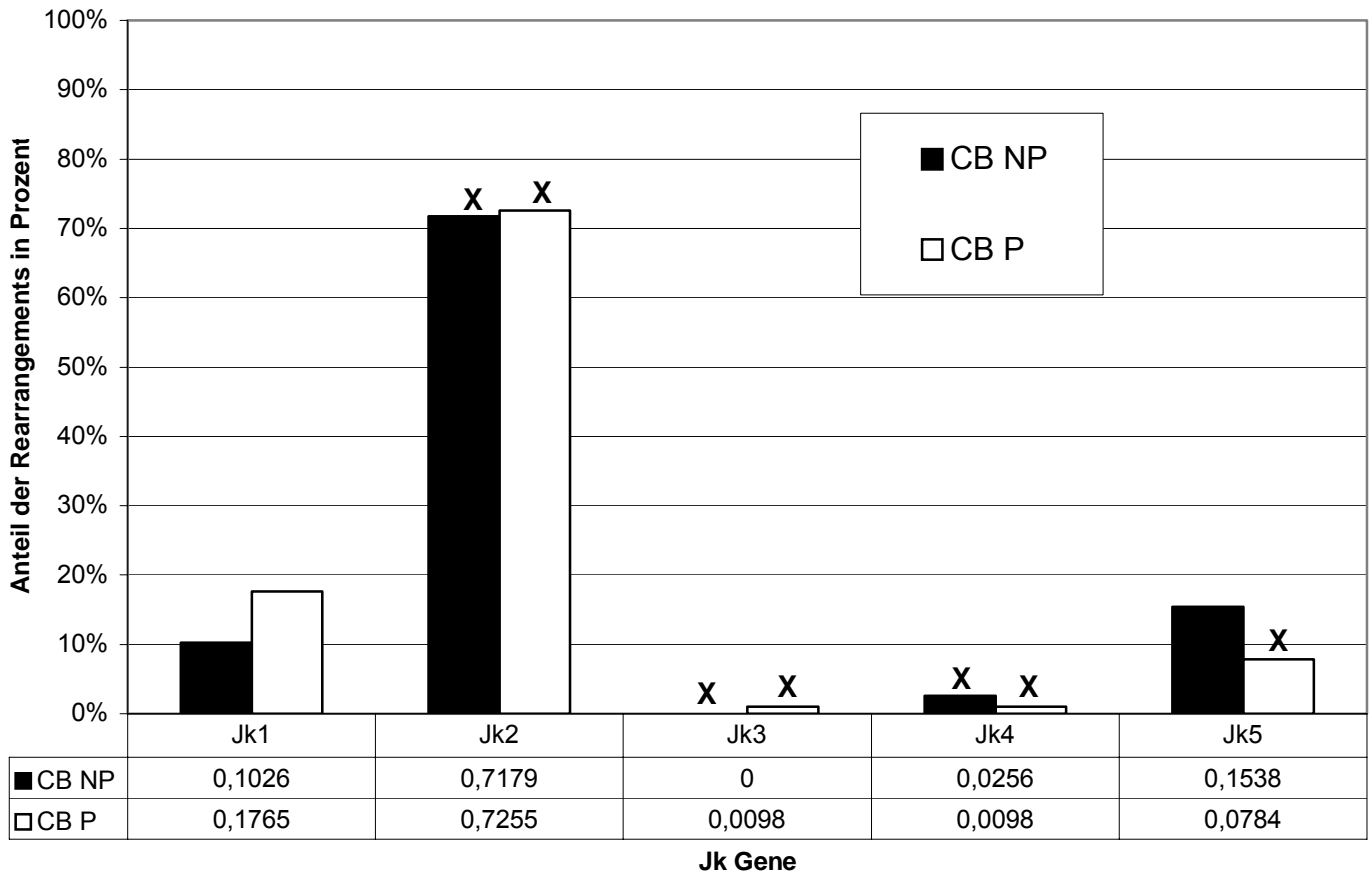
FIGUR 12: Jk Verteilung in nicht-produktiven (NP) und produktiven (P) Rearrangements in keimzentrumbildenden B-Zellen der Tonsille von Kleinkindern



FIGUR 12: J_κ Verteilung in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements in keimzentrumbildenden B-Zellen der Tonsille von Kleinkindern

In diesem Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der fünf J_κ Gene im Vergleich zwischen den nicht-produktiv und den produktiv rearrangierten Sequenzen der keimzentrumbildenden B-Zellen dargestellt. Die Differenzen, die zum statistisch erwartbaren Wert signifikant waren, wurden mit einem **X** gekennzeichnet (J_κ1 NP p≤0,05; J_κ1 P p≤0,05; J_κ2 NP p≤0,00001; J_κ2 P p≤0,00001; J_κ3 NP p≤0,005; J_κ3 P p≤0,0005; J_κ4 NP p≤0,05; J_κ4 P p≤0,0005; J_κ5 P p≤0,05; χ^2 goodness of fit-Test).

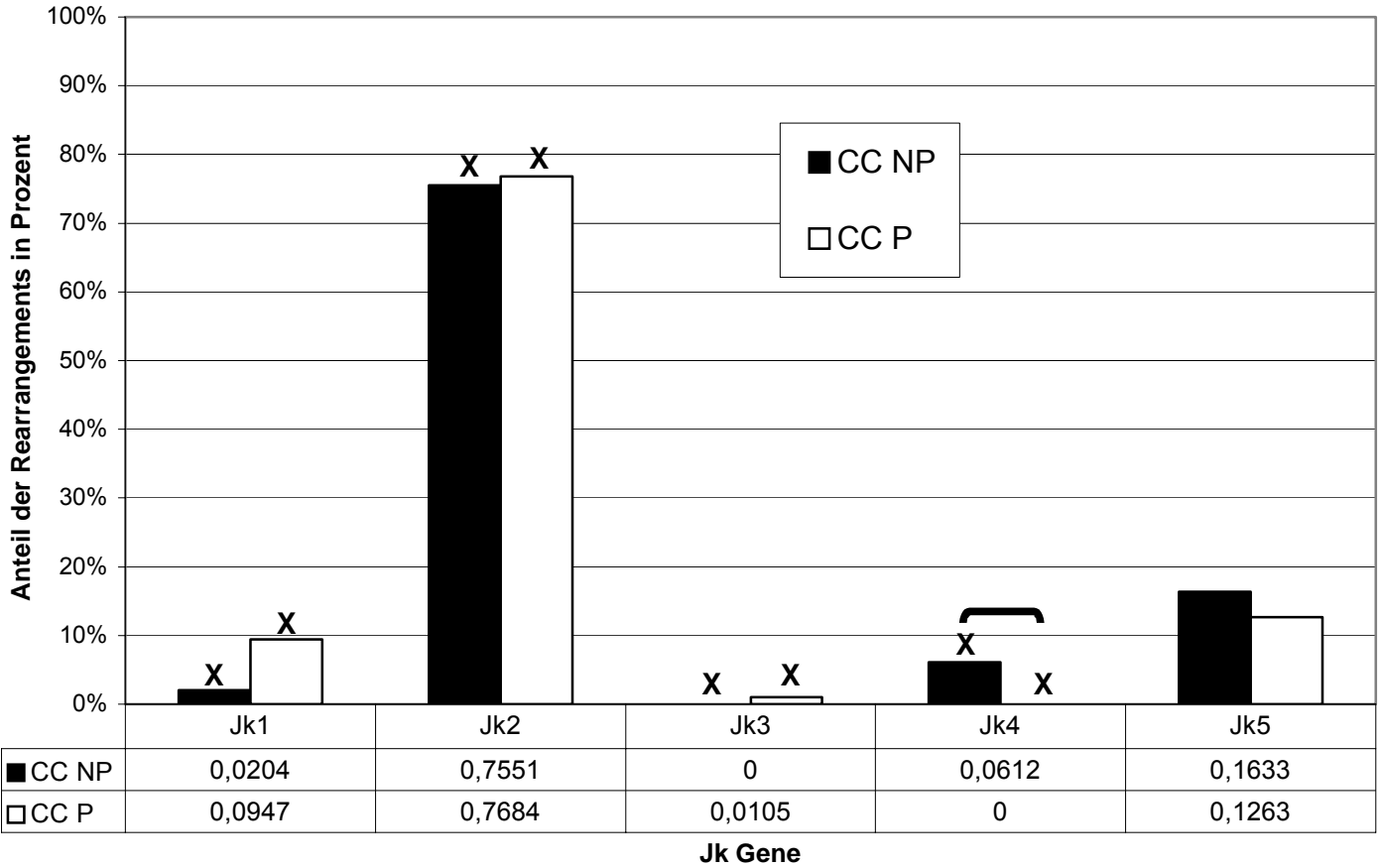
FIGUR 13: Jk Verteilung in nicht-produktiven (NP) und produktiven (P) Rearrangements in Zentroblasten der Tonsille von Kleinkindern



FIGUR 13: J_k Verteilung in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements in Zentroblasten der Tonsille von Kleinkindern

In diesem Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der fünf J_k Gene im Vergleich zwischen den nicht-produktiv und den produktiv rearrangierten Sequenzen der Zentroblasten dargestellt. Die Differenzen, die zum statistisch erwartbaren Wert signifikant waren, wurden mit einem **X** gekennzeichnet (J_k2 NP p≤0,00001; J_k2 P p≤0,00001; J_k3 NP p≤0,005; J_k3 P p≤0,00001; J_k4 NP p≤0,01; J_k4 P p≤0,00001; J_k5 P p≤0,05; χ^2 goodness of fit-Test).

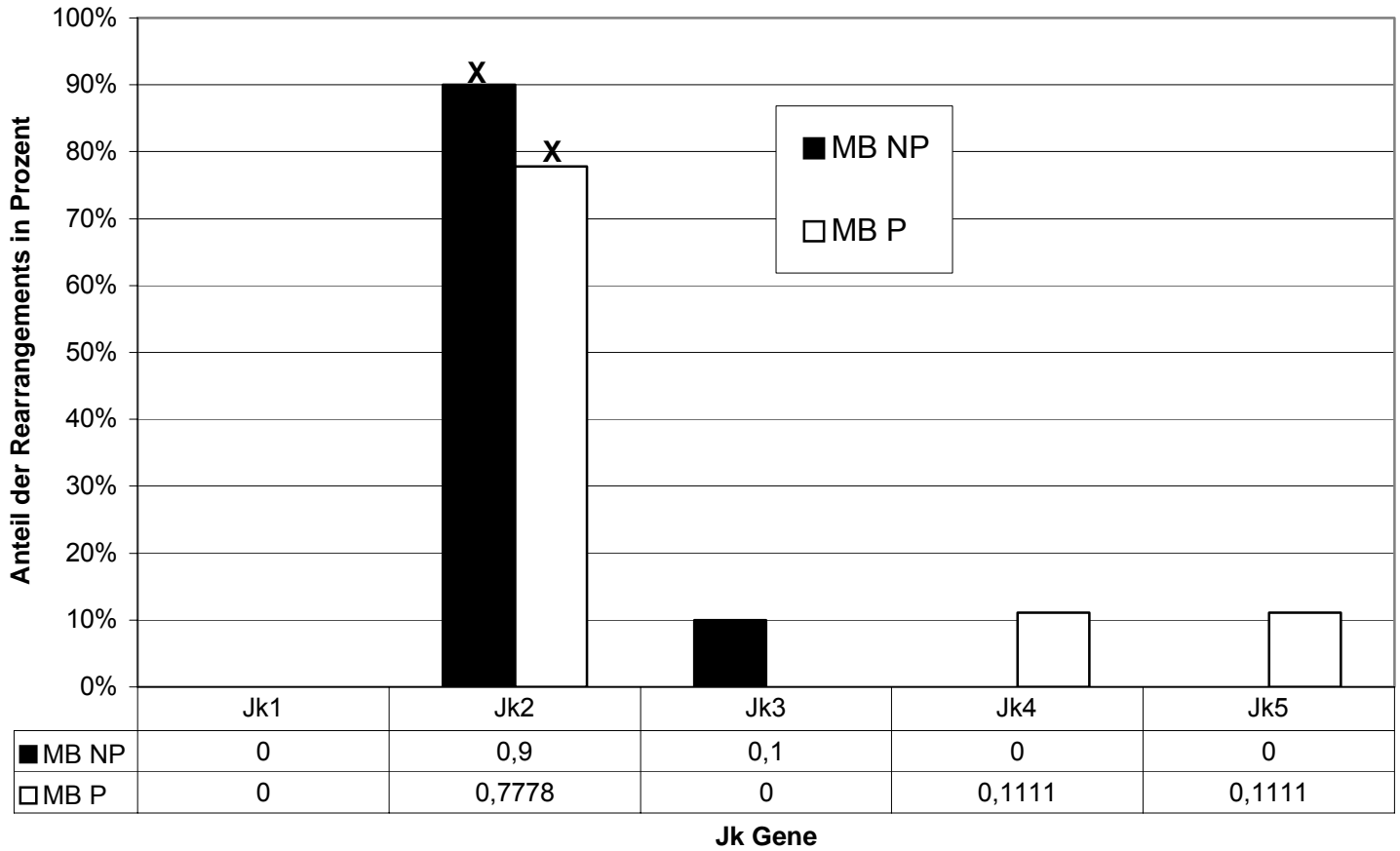
FIGUR 14: Jk Verteilung in nicht-produktiven (NP) und produktiven (P) Rearrangements in Zentrozyten der Tonsille von Kleinkindern



FIGUR 14: J_k Verteilung in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements in Zentrozyten der Tonsille von Kleinkindern

In diesem Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der fünf J_k Gene im Vergleich zwischen den nicht-produktiv und den produktiv rearrangierten Sequenzen der Zentrozyten dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-produktiven und produktiven Rearrangements bestand lediglich bei J_k4 ($p \leq 0,05$), was durch eine Klammer gekennzeichnet ist. Die Differenzen, die zum statistisch erwartbaren Wert signifikant waren, wurden mit einem **X** gekennzeichnet (J_k1 NP $p \leq 0,005$; J_k1 P $p \leq 0,05$; J_k2 NP $p \leq 0,00001$; J_k2 P $p \leq 0,00001$; J_k3 NP $p \leq 0,005$; J_k3 P $p \leq 0,00001$; J_k4 NP $p \leq 0,05$; J_k4 P $p \leq 0,00001$; χ^2 goodness of fit-Test).

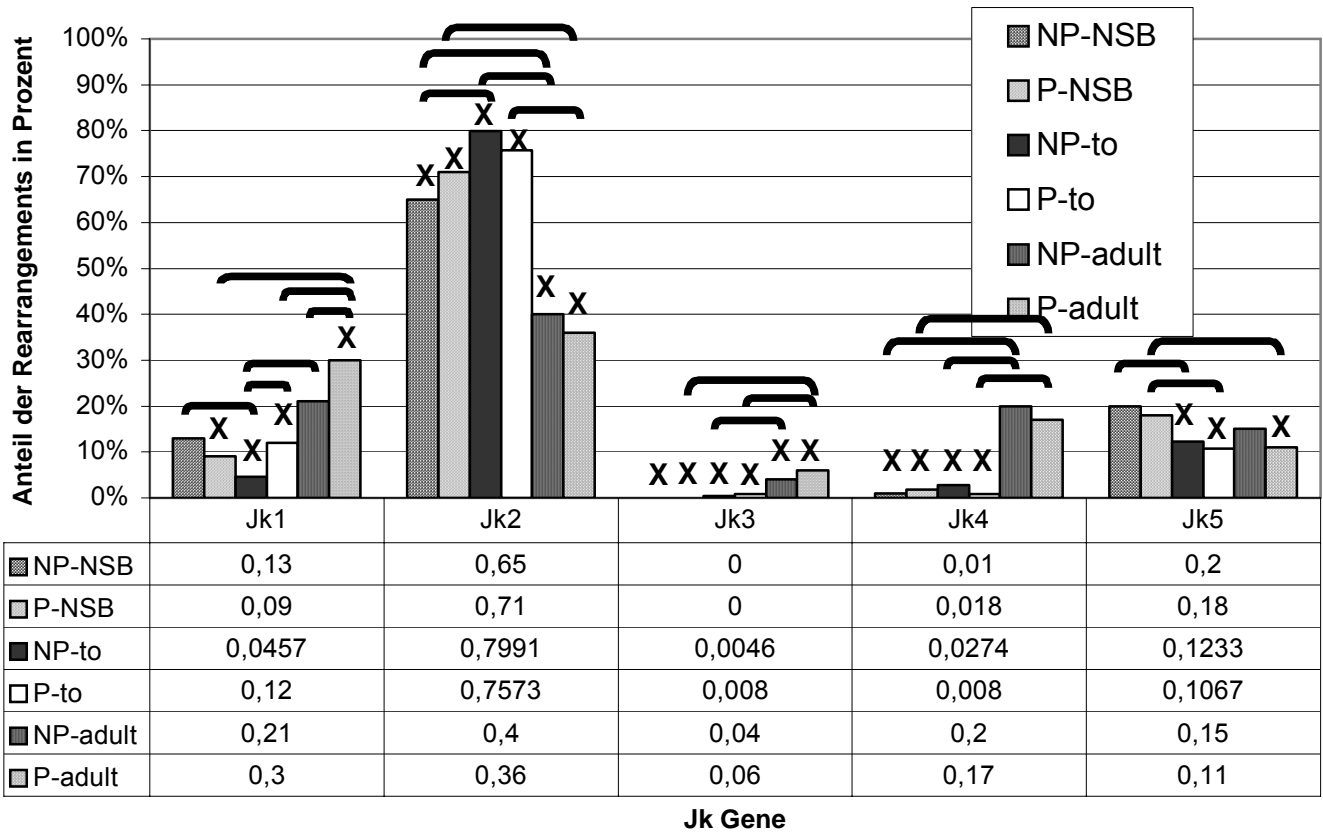
FIGUR 15: Jk Verteilung in nicht-produktiven (NP) und produktiven (P) Rearrangements in Gedächtnis-B-Zellen der Tonsille von Kleinkindern



FIGUR 15: J_κ Verteilung in nicht-produktiven und produktiven Rearrangements in Gedächtnis-B-Zellen der Tonsille von Kleinkindern

In diesem Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der fünf J_κ Gene im Vergleich zwischen den nicht-produktiv und den produktiv rearrangierten Sequenzen der Gedächtnis-B-Zellen dargestellt. Die Differenzen, die zum statistisch erwartbaren Wert signifikant waren, wurden mit einem **X** gekennzeichnet (J_κ2 NP p≤0,00001; J_κ2 P p≤0,00005; χ^2 goodness of fit-Test).

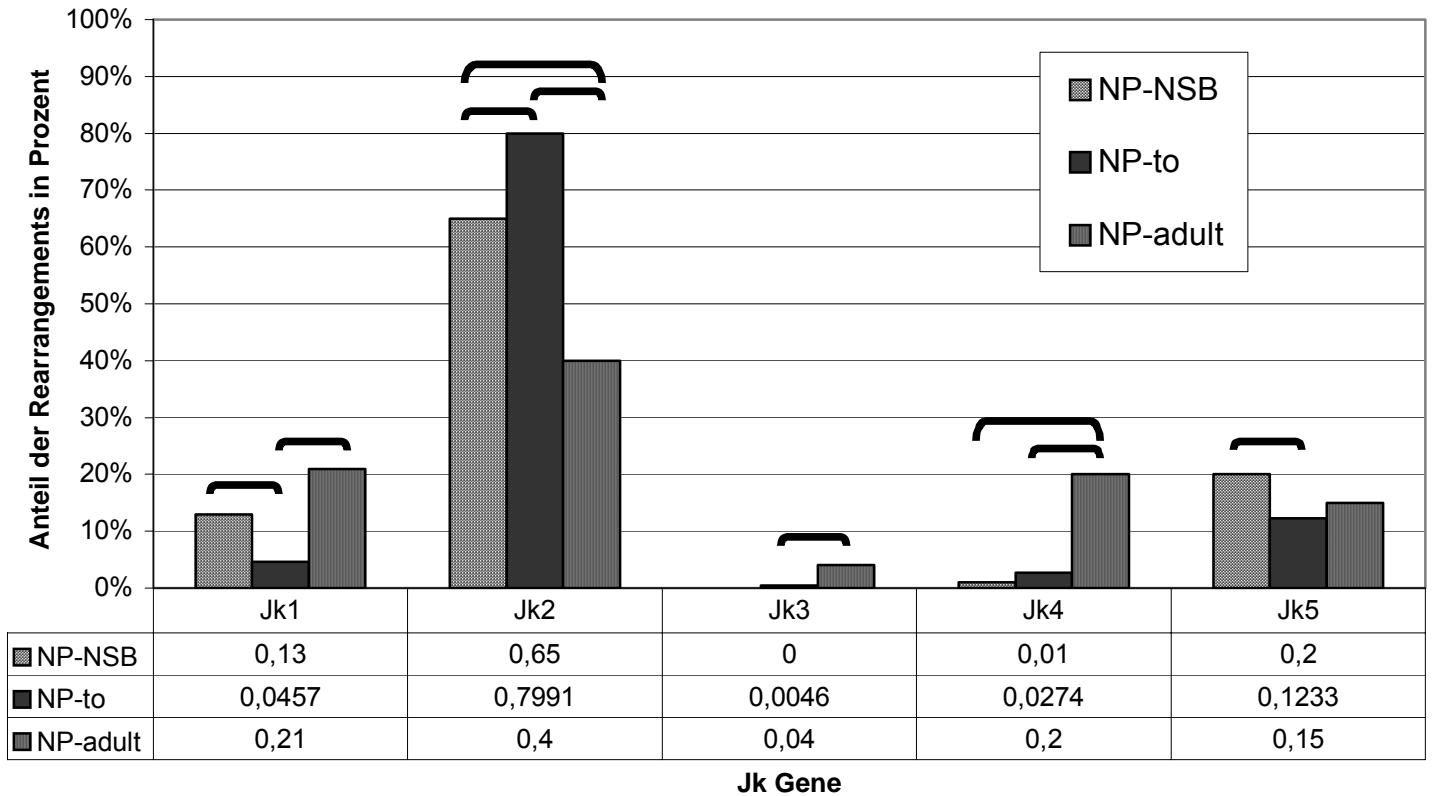
FIGUR 16a: Vergleich der Jk Verteilung im Vergleich der verschiedenen Altersstufen: Neugeborene (NSB NP und P), Kleinkinder (To NP und P) und Erwachsene (Adult NP und P)



FIGUR 16a: Vergleich der J_k Verteilung im Vergleich der verschiedenen Altersstufen: Neugeborene (NSB NP und P), Kleinkinder (Tonsille NP und P) und Erwachsene (Adult NP und P):

Das Diagramm zeigt die Veränderung der J_k Verteilung sowohl bei nicht-produktiven, als auch bei produktiven Rearrangements mit zunehmendem Alter der Probanden. Waren die Unterschiede zum statistisch erwartbaren Wert der J_k Verteilung signifikant, wurden sie mit einem **X** markiert (J_{k1} NSB P $p \leq 0,005$; J_{k1} To NP $p \leq 0,00001$; J_{k1} To P $p \leq 0,0005$; J_{k1} Ad P $p \leq 0,00005$; J_{k2} NSB NP $p \leq 0,00001$; J_{k2} NSB P $p \leq 0,00001$; J_{k2} To NP $p \leq 0,00001$; J_{k2} To P $p \leq 0,00001$; J_{k2} Ad NP $p \leq 0,00001$; J_{k2} Ad P $p \leq 0,00001$; J_{k3} NSB NP $p \leq 0,00001$; J_{k3} NSB P $p \leq 0,00001$; J_{k3} To NP $p \leq 0,00001$; J_{k3} To P $p \leq 0,00001$; J_{k3} Ad NP $p \leq 0,00001$; J_{k3} Ad P $p \leq 0,00001$; J_{k4} NSB NP $p \leq 0,00001$; J_{k4} NSB P $p \leq 0,00001$; J_{k4} To NP $p \leq 0,00001$; J_{k4} To P $p \leq 0,00001$; J_{k5} To NP $p \leq 0,005$; J_{k5} To P $p \leq 0,00001$; J_{k5} Ad P $p \leq 0,00005$; χ^2 goodness of fit-Test). Signifikante Unterschiede zwischen den Altersstufen wurden mit einer Klammer gekennzeichnet (Bei J_{k1} : To NP-P $p \leq 0,005$; Ad NP-P $p \leq 0,05$; NSB NP-To NP $p \leq 0,05$; To NP-Ad NP $p \leq 0,00001$; NSB P-Ad P $p \leq 0,00001$; To P-Ad P $p \leq 0,00001$; bei J_{k2} : NSB NP-To NP $p \leq 0,01$; NSB NP-Ad NP $p \leq 0,00005$; To NP-Ad NP $p \leq 0,00001$; NSB P-Ad P $p \leq 0,00001$; To P-Ad P $p \leq 0,00001$; bei J_{k3} : To NP-Ad NP $p \leq 0,05$; NSB P-Ad P $p \leq 0,05$; To P-Ad P $p \leq 0,0005$; bei J_{k4} : NSB NP-Ad NP $p \leq 0,00005$; To NP-Ad NP $p \leq 0,00001$; NSB P-Ad P $p \leq 0,00005$; To P-Ad P $p \leq 0,00005$; bei J_{k5} : NSB NP-To NP $p \leq 0,05$; NSB P-To P $p \leq 0,05$; NSB P-Ad P $p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

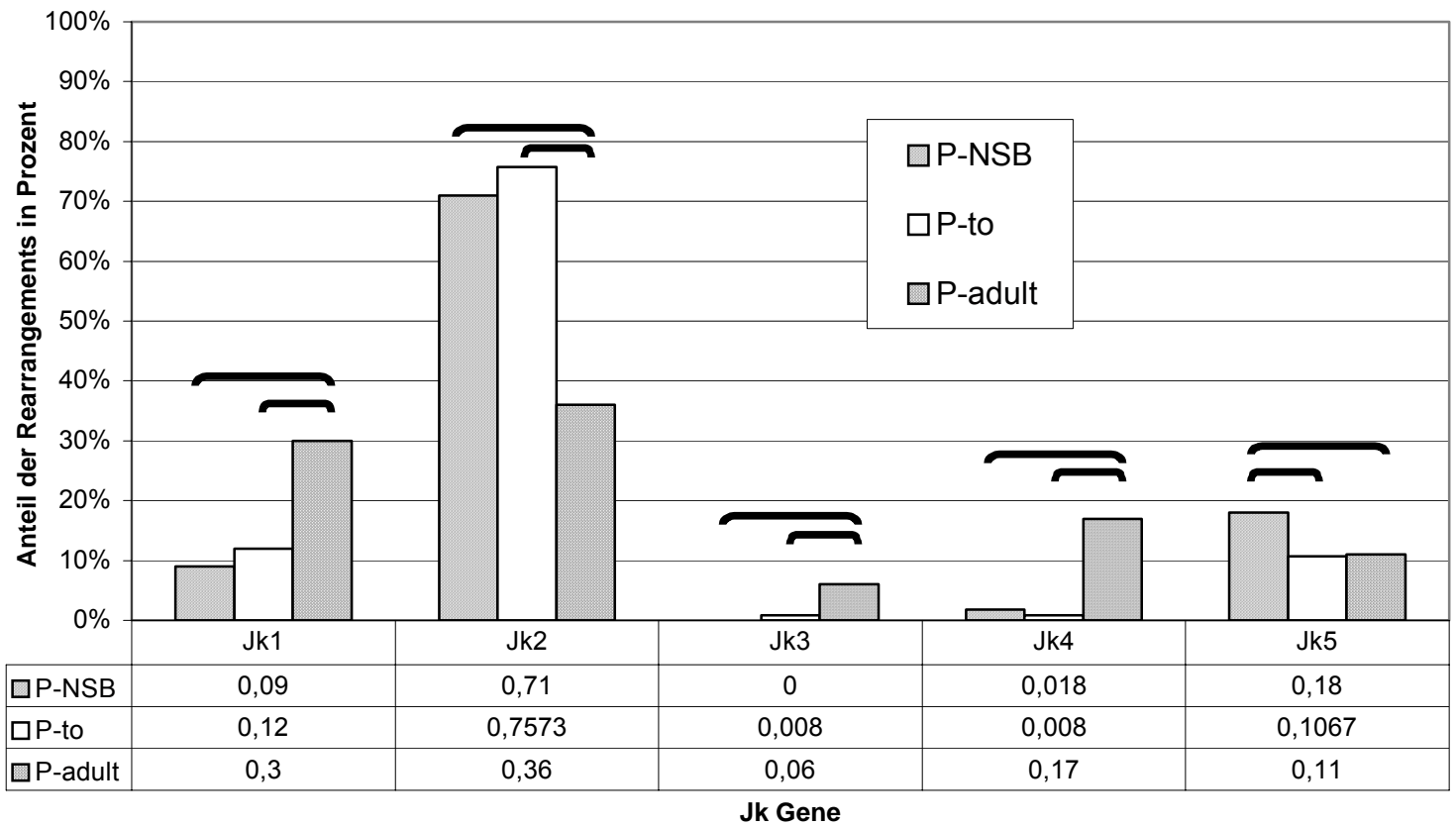
FIGUR 16b: Vergleich der Jk Verteilung bei nicht-produktiven Rearrangements im Vergleich der verschiedenen Altersstufen: Neugeborene (NP-NSB), Kleinkinder (NP-to) und Erwachsene (NP-adult)



FIGUR 16b: Vergleich der J_{κ} Verteilung bei nicht-produktiven Rearrangements im Vergleich der verschiedenen Altersstufen: Neugeborene (NP-NSB), Kleinkinder (NP-to) und Erwachsene (NP-adult):

Das Diagramm zeigt die Veränderung der J_{κ} Verteilung bei nicht-produktiven Rearrangements mit zunehmendem Alter der Probanden. Signifikante Unterschiede zwischen den Altersstufen wurden mit einer Klammer gekennzeichnet (Bei $J_{\kappa}1$: NP-NSB versus NP-to $p \leq 0,05$; NP-to versus NP-adult $p \leq 0,00001$; bei $J_{\kappa}2$: NP-NSB versus NP-to $p \leq 0,01$; NP-NSB versus NP-adult $p \leq 0,00005$; NP-to versus NP-adult $p \leq 0,00001$; bei $J_{\kappa}3$: NP-to versus NP-adult $p \leq 0,05$; bei $J_{\kappa}4$: NP-NSB versus NP-adult $p \leq 0,00005$; NP-to versus NP-adult $p \leq 0,00001$; bei $J_{\kappa}5$: NP-NSB versus NP-to $p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

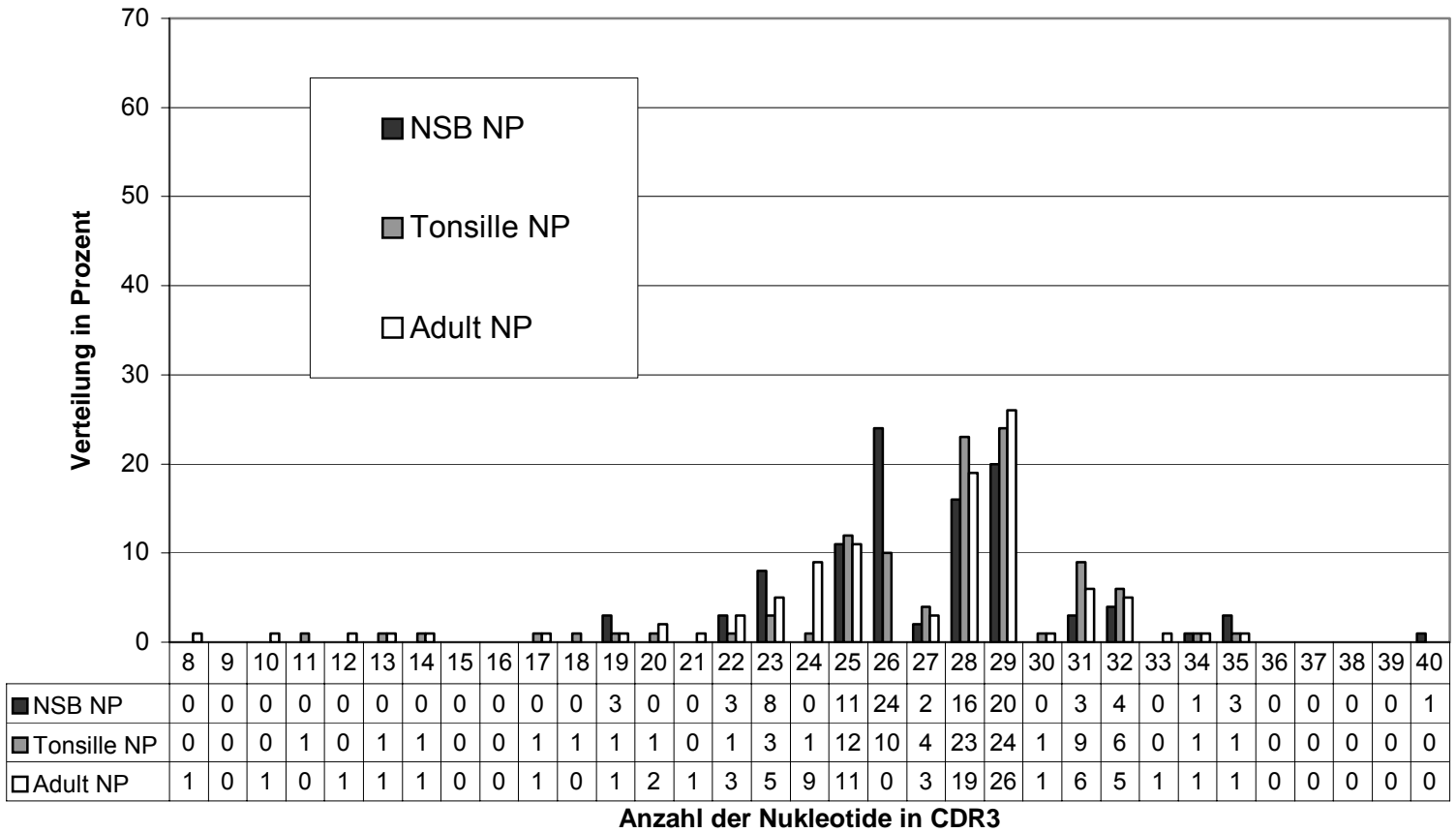
FIGUR 16c: Vergleich der Jk Verteilung bei produktiven Rearrangements im Vergleich der verschiedenen Altersstufen: Neugeborene (P-NSB), Kleinkinder (P-to) und Erwachsene (P-adult)



FIGUR 16c: Vergleich der J_{κ} Verteilung bei produktiven Rearrangements im Vergleich der verschiedenen Altersstufen: Neugeborene (P-NSB), Kleinkinder (P-to) und Erwachsene (P-adult):

Das Diagramm zeigt die Veränderung der J_{κ} Verteilung bei produktiven Rearrangements mit zunehmendem Alter der Probanden. Signifikante Unterschiede zwischen den Altersstufen wurden mit einer Klammer gekennzeichnet (Bei $J_{\kappa}1$: P-NSB versus P-adult $p \leq 0,00001$; P-to versus P-adult $p \leq 0,00001$; bei $J_{\kappa}2$: P-NSB versus P-adult $p \leq 0,00001$; P-to versus P-adult $p \leq 0,00001$; bei $J_{\kappa}3$: P-NSB versus P-adult $p \leq 0,05$; P-to versus P-adult $p \leq 0,0005$; bei $J_{\kappa}4$: P-NSB versus P-adult $p \leq 0,00005$; P-to versus P-adult $p \leq 0,00005$; bei $J_{\kappa}5$: P-NSB versus P-to $p \leq 0,05$; P-NSB versus P-adult $p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

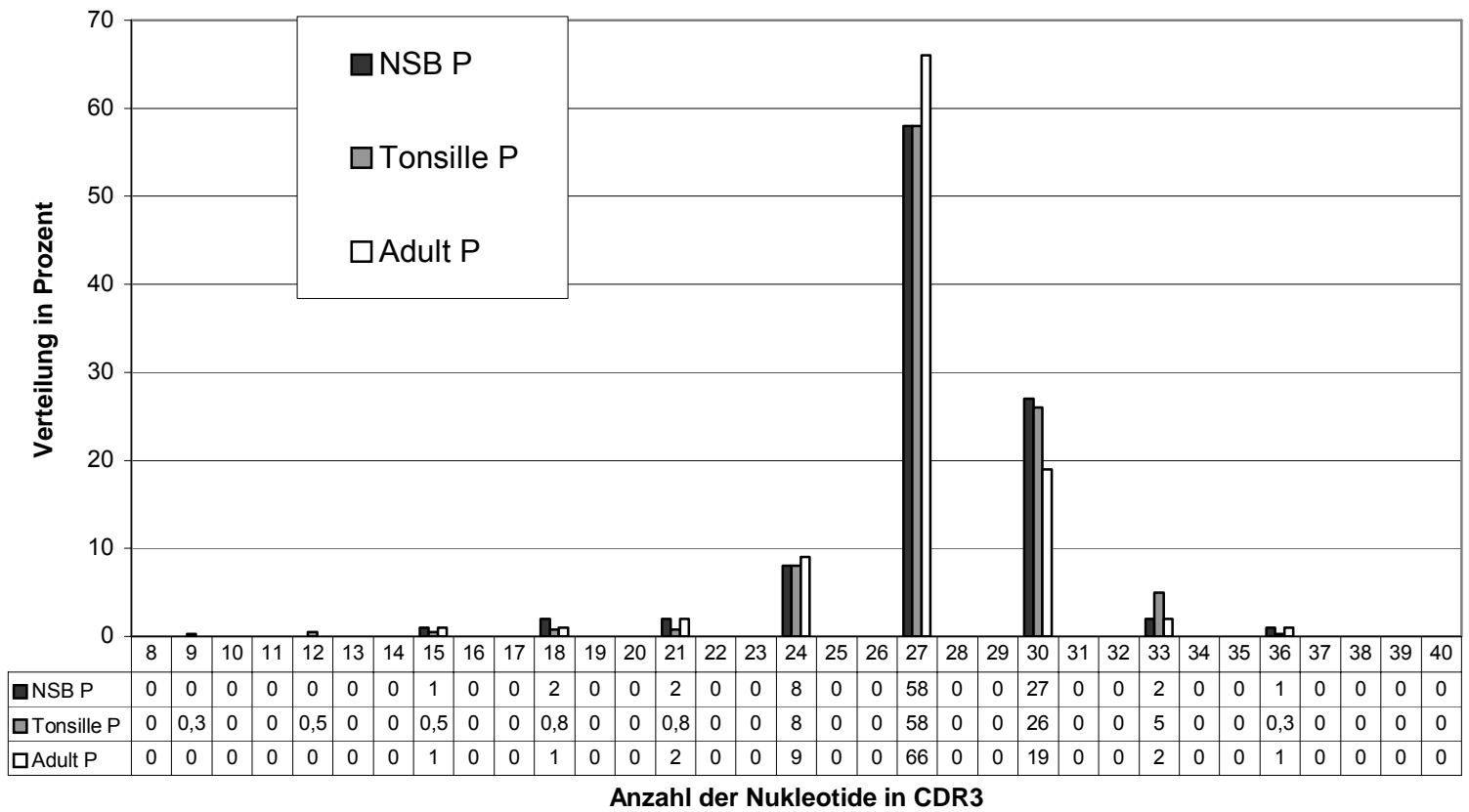
FIGUR 17: CDR3-Länge im nicht-produktiven Repertoire im Vergleich zwischen den Altersstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)



FIGUR 17: CDR3-Länge im nicht-produktiven Repertoire im Vergleich zwischen den Altersstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)

Das Diagramm zeigt die Verteilung der CDR3-Längen bei nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen in den drei Altersgruppen: Neugeborene (Nabelschnurblut), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult). Durch drei teilbare Länge kommen in allen Altersstufen deutlich seltener vor, wohingegen die Verteilung ansonsten einer Gauß'schen Normalverteilung ähnelt.

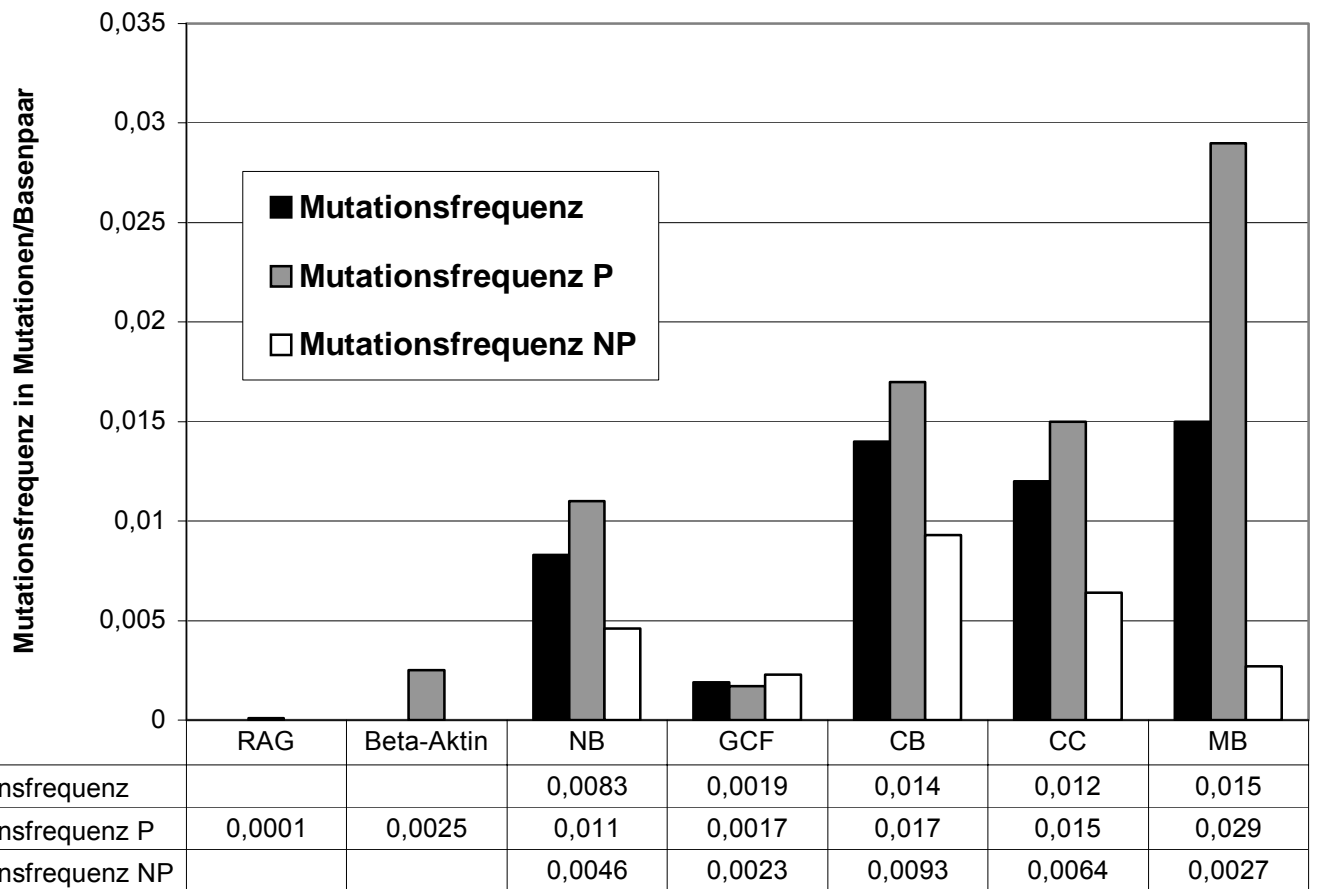
FIGUR 18: CDR3-Länge im produktiven Repertoire im Vergleich zwischen den Alterstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)



FIGUR 18: CDR3-Länge im produktiven Repertoire im Vergleich zwischen den Altersstufen: Neugeborene (NSB), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult)

Dieses Diagramm zeigt die Verteilung der CDR3 Längen bei produktiv rearrangierten Sequenzen in den drei Altersgruppen: Neugeborene (Nabelschnurblut), Kleinkinder (Tonsille) und Erwachsene (Adult). Auf Grund der Notwendigkeit, das Leseraster zu erhalten, kommen ausschließlich durch drei teilbare Längen vor, wobei eine starke Konzentration auf die CDR3-Länge 27 feststellbar ist.

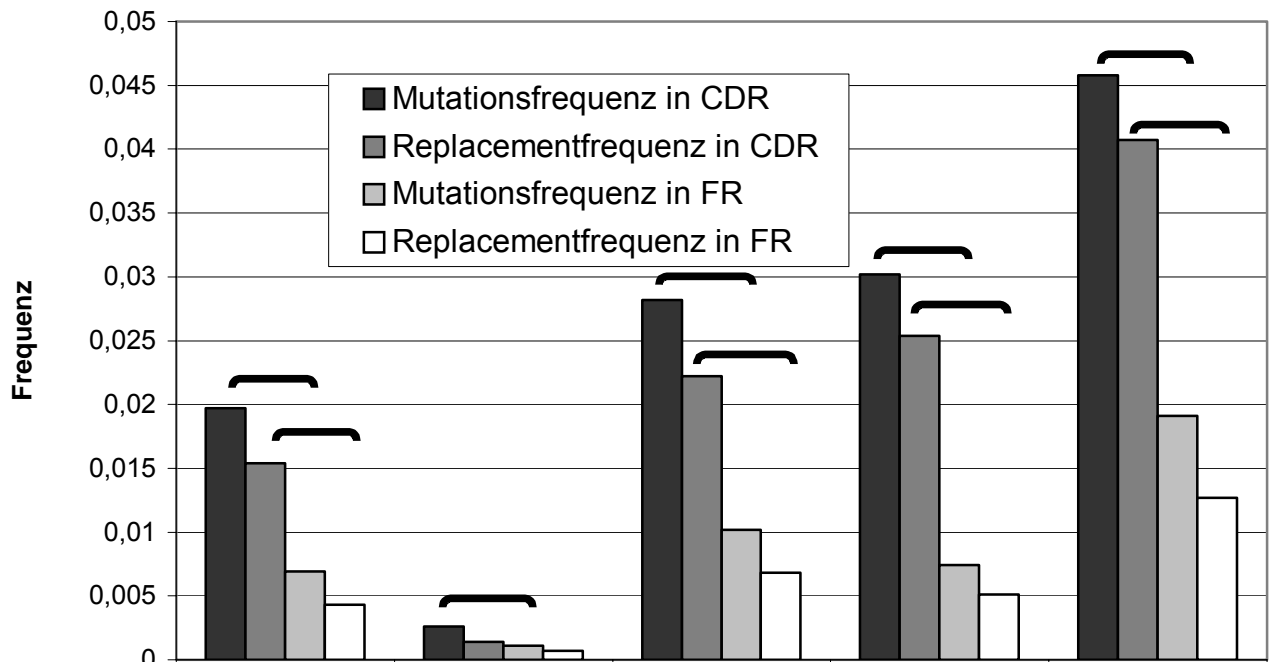
FIGUR 19: Vergleich der Mutationsfrequenzen zwischen RAG1, Beta-Aktin und der Vk-Kette der Tonsille



FIGUR 19: Vergleich der Mutationsfrequenzen zwischen RAG1, Beta-Aktin und der V_k-Kette der Tonsille

Das Diagramm zeigt die gefundenen Mutationsfrequenzen im Vergleich zwischen dem „Haushaltsgen“ Beta-Aktin, dem Rekombination aktivierenden Gen 1 und den verschiedenen Reifestufen der B-Zellen in der kindlichen Tonsille. Bei den Werten der Tonsille sind neben der Gesamtmutationsfrequenz auch die Mutationsfrequenzen für die produktiv und die nicht-produktiv rearrangierten Immunglobulin-Sequenzen dargestellt.

FIGUR 20: Mutations- und Replacementfrequenz je nach Entwicklungsgrad der produktiv rearrangierten Sequenzen in CDR beziehungsweise FR

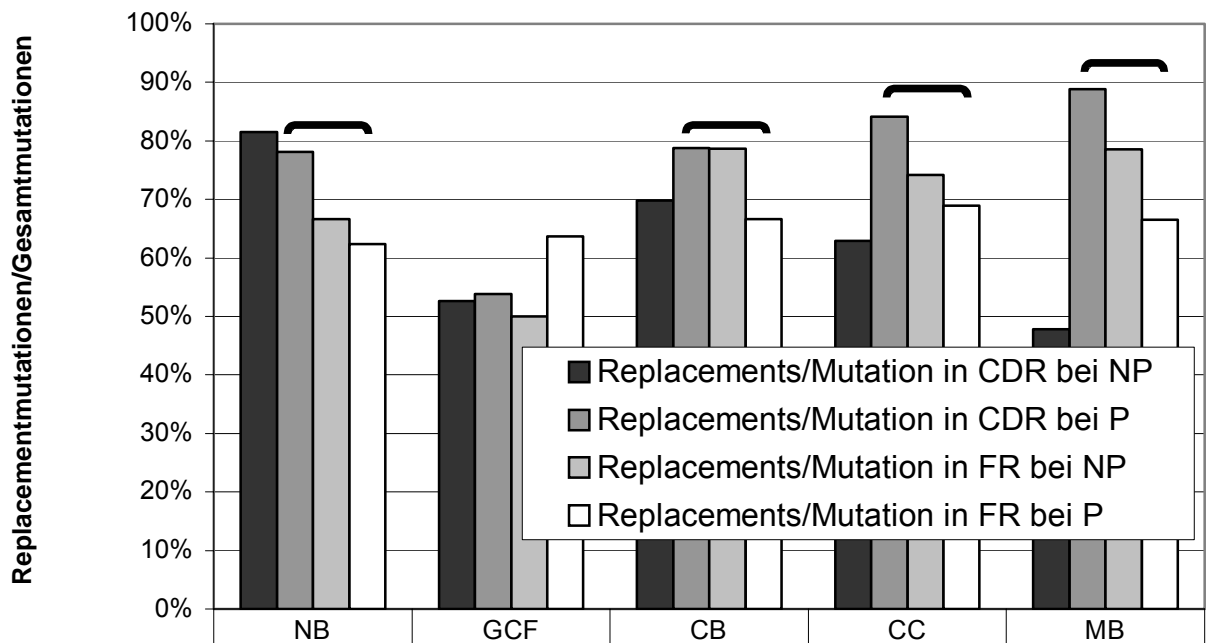


	NB	GCF	CB	CC	MB
■ Mutationsfrequenz in CDR	0,0197	0,0026	0,0282	0,0302	0,0458
■ Replacementfrequenz in CDR	0,0154	0,0014	0,0222	0,0254	0,0407
■ Mutationsfrequenz in FR	0,0069	0,0011	0,0102	0,0074	0,0191
□ Replacementfrequenz in FR	0,0043	0,0007	0,0068	0,0051	0,0127

FIGUR 20: Mutations- und Replacementfrequenz je nach Entwicklungsgrad der produktiv rearrangierten Sequenzen in CDR beziehungsweise FR

Dargestellt sind die Mutationsfrequenzen der fünf Entwicklungsstufen der B-Zellen in der Tonsille und im Vergleich dazu die Frequenz der Replacements, also derjenigen Mutationen, die bei Translation des Gens zum Austausch einer Aminosäure führen würden. Außerdem wurden die Frequenzen der CDR und des FR getrennt abgebildet. Somit wird ein Vergleich der Effektivität der Mutationen in der CDR und im FR ermöglicht. Signifikante Unterschiede zwischen den Mutationsfrequenzen in den CDRs und in FRs wurden in allen Reifestadien der B-Zellen gefunden: NB: $p \leq 0,000001$; GCF: $p \leq 0,05$; CB: $p \leq 0,000001$; CC: $p \leq 0,000001$; MB: $p \leq 0,0005$; χ^2 -Test. Auch der Unterschied zwischen den Replacementfrequenzen in den CDRs und in den FRs erreichte meist Signifikanzniveau: NB: $p \leq 0,000001$; CB: $p \leq 0,000001$; CC: $p \leq 0,000001$; MB: $p \leq 0,00005$; χ^2 -Test.

FIGUR 21: Relativer Anteil der Replacementmutationen an den Gesamtmutationen im Vergleich zwischen CDR und FR bei nicht-produktiven und bei produktiven Rearrangements

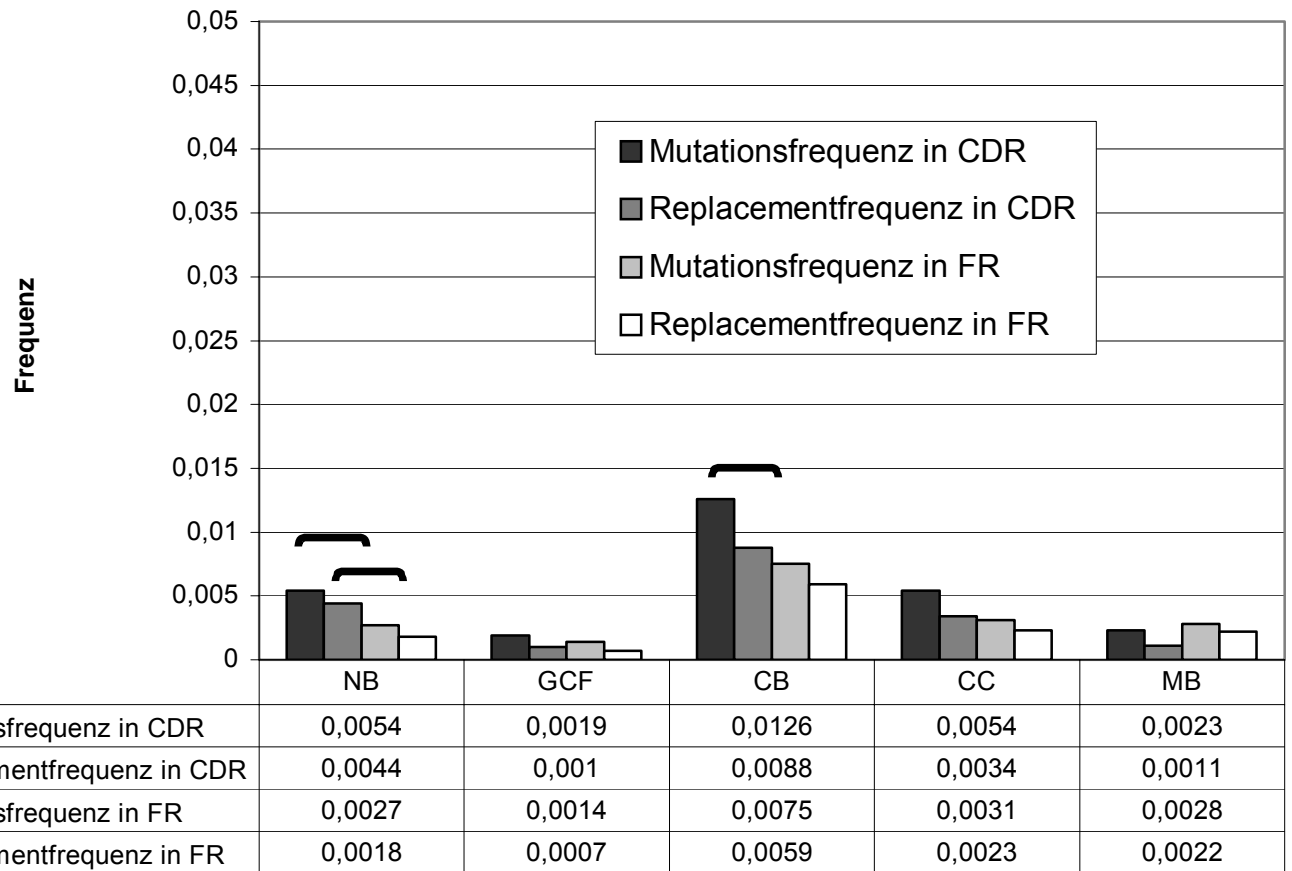


	NB	GCF	CB	CC	MB
■ Replacements/Mutation in CDR bei NP	0,8148	0,5263	0,6984	0,6296	0,4783
■ Replacements/Mutation in CDR bei P	0,7817	0,5385	0,7872	0,8411	0,8886
■ Replacements/Mutation in FR bei NP	0,6667	0,5	0,7867	0,7419	0,7857
□ Replacements/Mutation in FR bei P	0,6232	0,6364	0,6667	0,6892	0,6649

FIGUR 21: Relativer Anteil der Replacementmutationen an den Gesamtmutationen im Vergleich zwischen CDR und FR bei nicht-produktiven und bei produktiven Rearrangements

Um die Effektivität der Mutationen und den positiven Selektionsdruck für Replacementmutationen in der CDR noch besser zu veranschaulichen, wurde in diesem Diagramm der Anteil der Replacementmutationen an den Gesamtmutationen prozentual dargestellt. Von der Aufteilung in nicht-produktiv rearrangierte und produktiv rearrangierte Sequenzen und der Trennung von der CDR und dem FR lassen sich Aussagen über den Funktionsmechanismus des Mutationsprozesses ableiten. Signifikante Unterschiede sind bei den produktiven Rekombinationen im Vergleich zwischen den Replacements/Mutation in den CDRs und in FRs vorhanden (NB: $p \leq 0,005$; CB: $p \leq 0,005$; CC: $p \leq 0,05$; MB: $p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

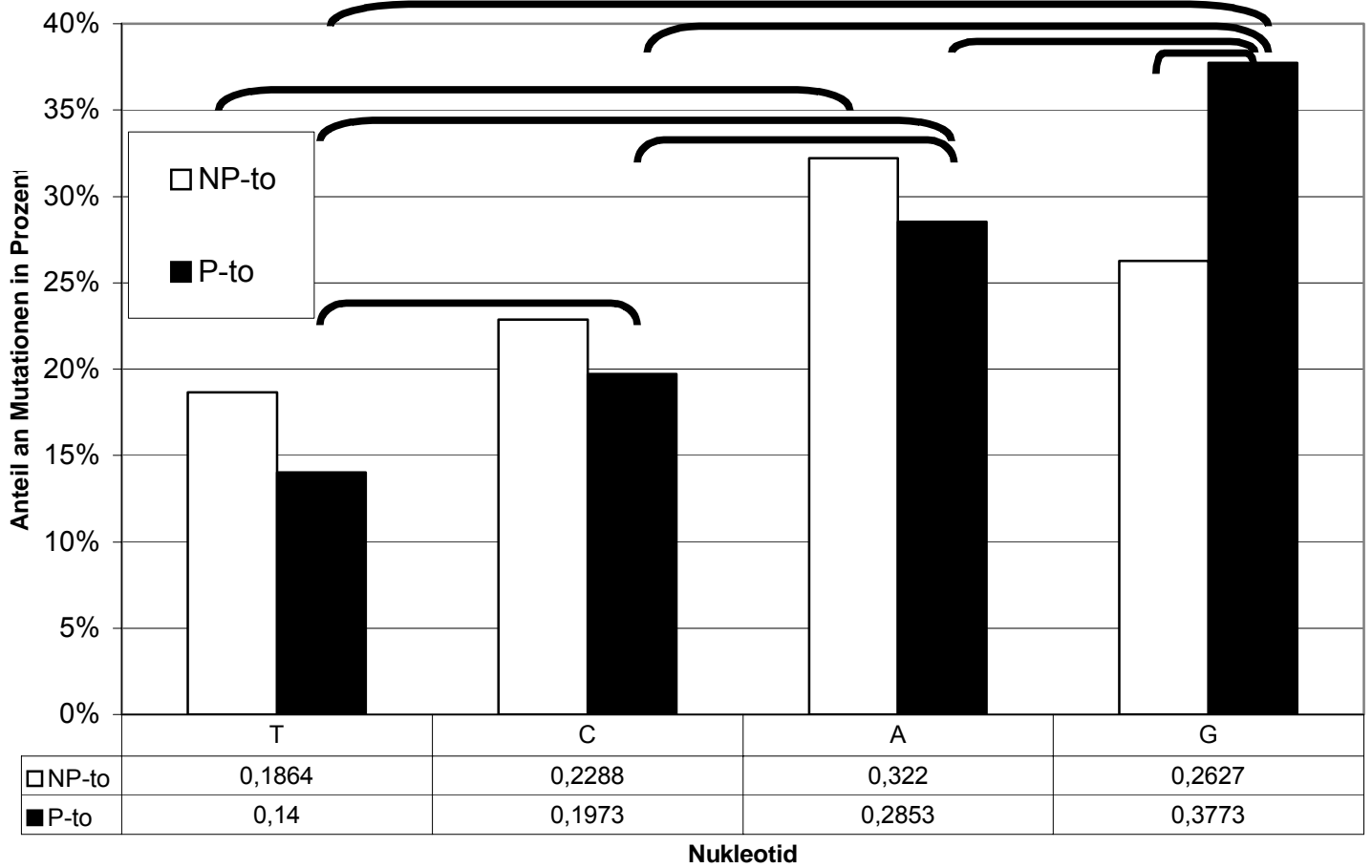
FIGUR 22: Mutations- und Replacementfrequenz je nach Entwicklungsgrad der nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen in CDR beziehungsweise FR



FIGUR 22: Mutations- und Replacementfrequenz je nach Entwicklungsgrad der nicht-produktiv rearrangierten Sequenzen in CDR beziehungsweise FR

Dargestellt sind die Mutationsfrequenzen in den nicht-produktiven Rekombinationen der fünf Entwicklungsstufen der B-Zellen in der Tonsille und im Vergleich dazu die Frequenz der Replacements, also derjenigen Mutationen, die bei Translation des Gens zum Austausch einer Aminosäure führen würden. Außerdem wurden die Frequenzen der CDR und des FR getrennt abgebildet. Somit wird ein Vergleich der Effektivität der Mutationen in der CDR und im FR ermöglicht. Signifikante Unterschiede zwischen den Mutationsfrequenzen in den CDRs und in FRs wurden nur bei den naiven B-Zellen ($p \leq 0,001$; χ^2 -Test) und bei den Zentroblasten ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test) festgestellt. Ein Signifikanzniveau erreichte auch der Unterschied zwischen den Replacementfrequenzen in den CDRs und in den FRs der naiven B-Zellen ($p \leq 0,001$; χ^2 -Test).

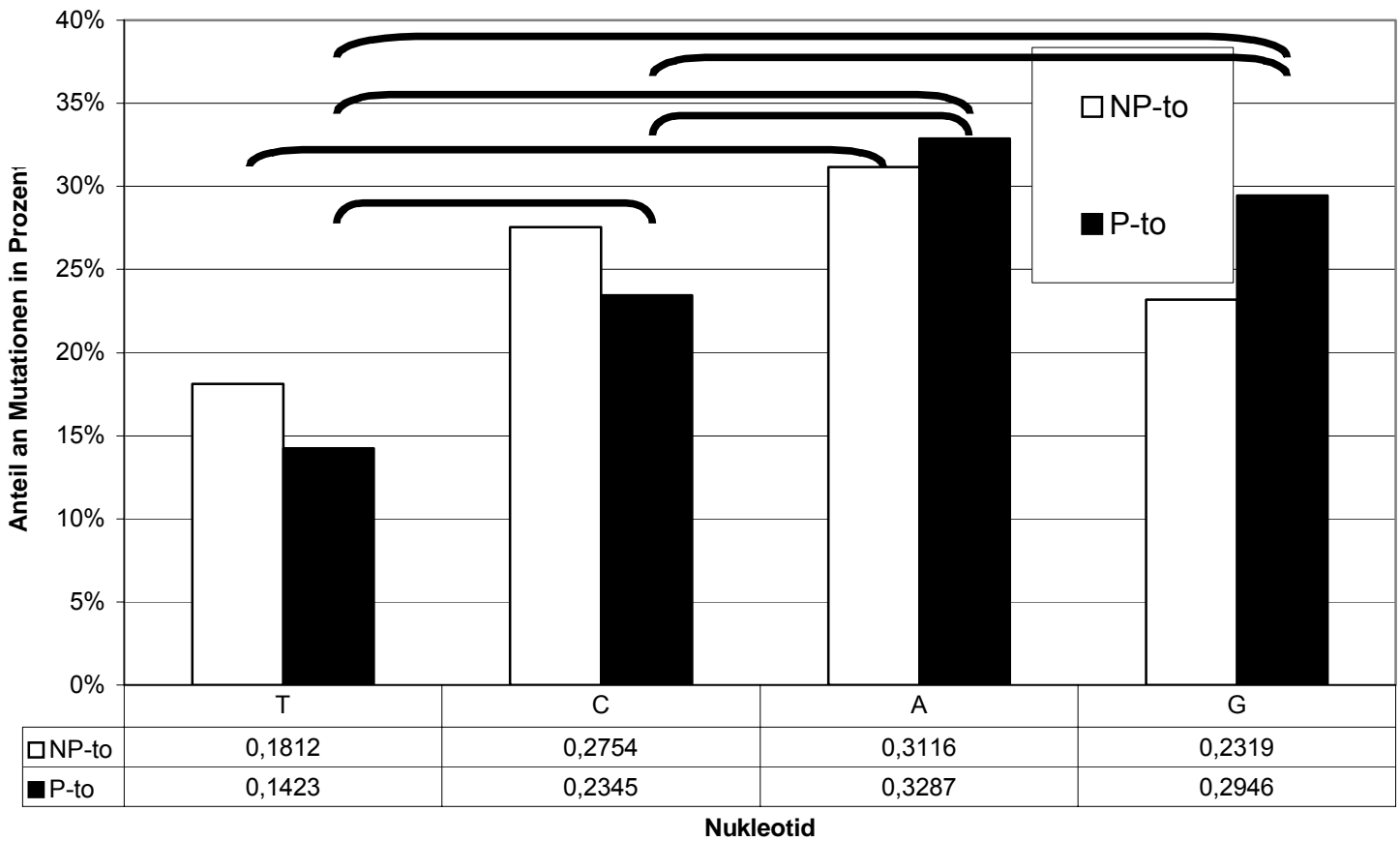
FIGUR 23: Anteil der vier verschiedenen Nukleotide an den Mutationen in den CDR-Regionen 1, 2 und 3



FIGUR 23: Anteil der vier verschiedenen Nukleotide an den Mutationen in den CDR-Regionen 1, 2 und 3

Das Diagramm stellt im Vergleich zwischen den nicht-produktiven und den produktiven Rekombinationen die unterschiedliche Verteilung der Mutationen in den CDR-Regionen 1, 2 und 3 auf die einzelnen Nukleotide dar. Signifikante Unterschiede lagen bei den produktiven Rearrangements zwischen den Nukleotiden T und C ($p \leq 0,005$; χ^2 -Test), T und A ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test), T und G ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test) und zwischen den Nukleotiden C und A ($p \leq 0,0001$; χ^2 -Test), C und G ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test) und zwischen A und G ($p \leq 0,0005$; χ^2 -Test) vor. Bei den nicht-produktiven Rekombinationen war nur der Unterschied zwischen dem Anteil an Mutationen des Nukleotids T und des Nukleotids A signifikant ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test). Lediglich zwischen den Anteilen der nicht-produktiven und der produktiven Rearrangements in den CDRs des Nukleotids G gab es einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test).

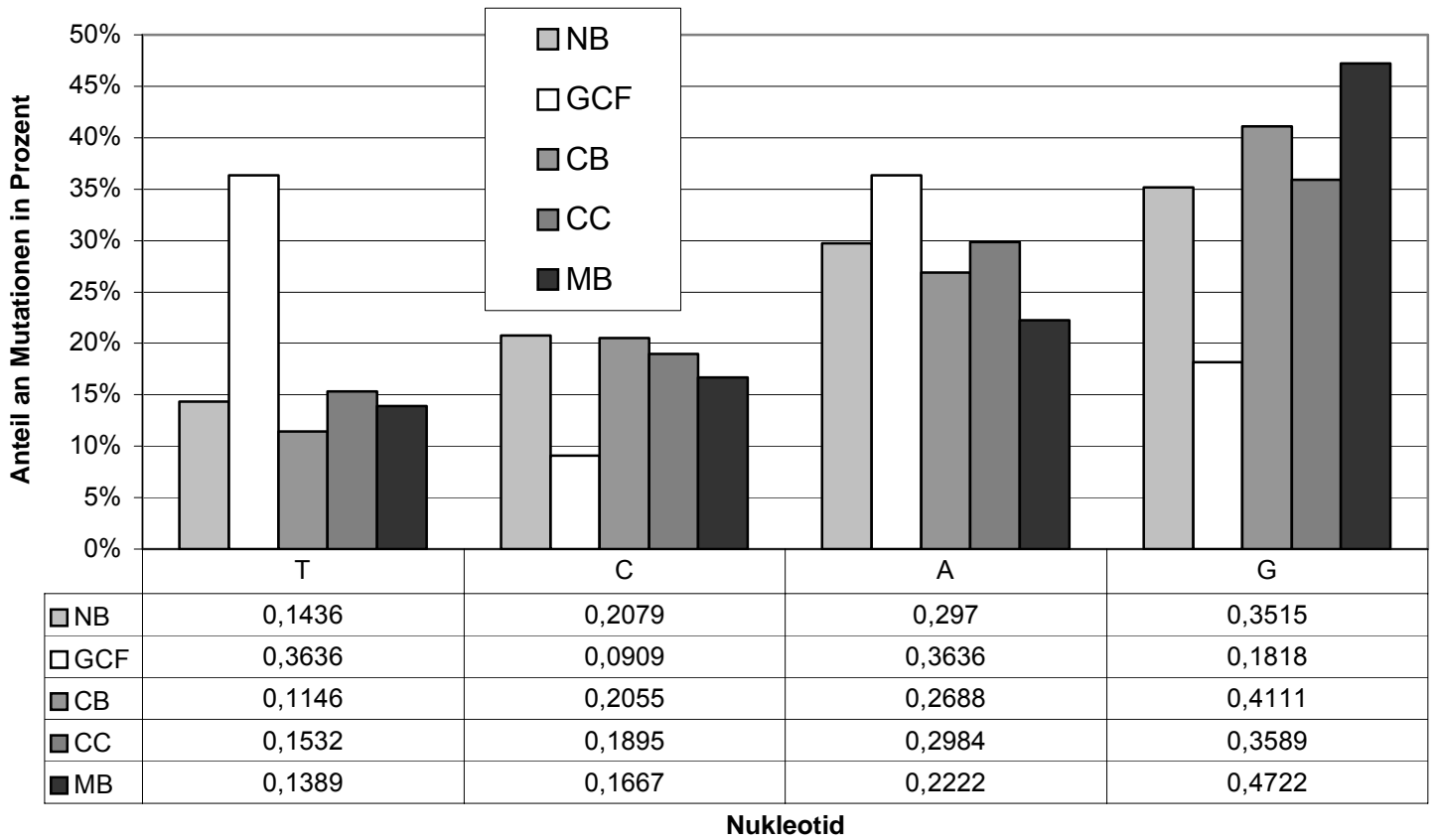
FIGUR 24: Anteil der vier verschiedenen Nukleotide an den Mutationen in den FRs



FIGUR 24: Anteil der vier verschiedenen Nukleotide an den Mutationen in den FRs

Das Diagramm stellt im Vergleich zwischen den nicht-produktiven und den produktiven Rekombinationen die unterschiedliche Verteilung der Mutationen im FR auf die einzelnen Nukleotide dar. Signifikante Unterschiede lagen bei den produktiven Rekombinationen zwischen den Nukleotiden T und C ($p \leq 0,0005$; χ^2 -Test), T und A ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test), T und G ($p \leq 0,00001$; χ^2 -Test) und zwischen den Nukleotiden C und A ($p \leq 0,001$; χ^2 -Test), C und G ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test) jedoch nicht zwischen A und G vor. Bei den nicht-produktiven Rearrangements war nur der Unterschied zwischen dem Anteil an Mutationen des Nukleotids T und des Nukleotids A signifikant ($p \leq 0,05$; χ^2 -Test). Die Unterschiede zwischen den Anteilen der nicht-produktiven und der produktiven Rearrangements im FR waren bei keinem Nukleotid signifikant.

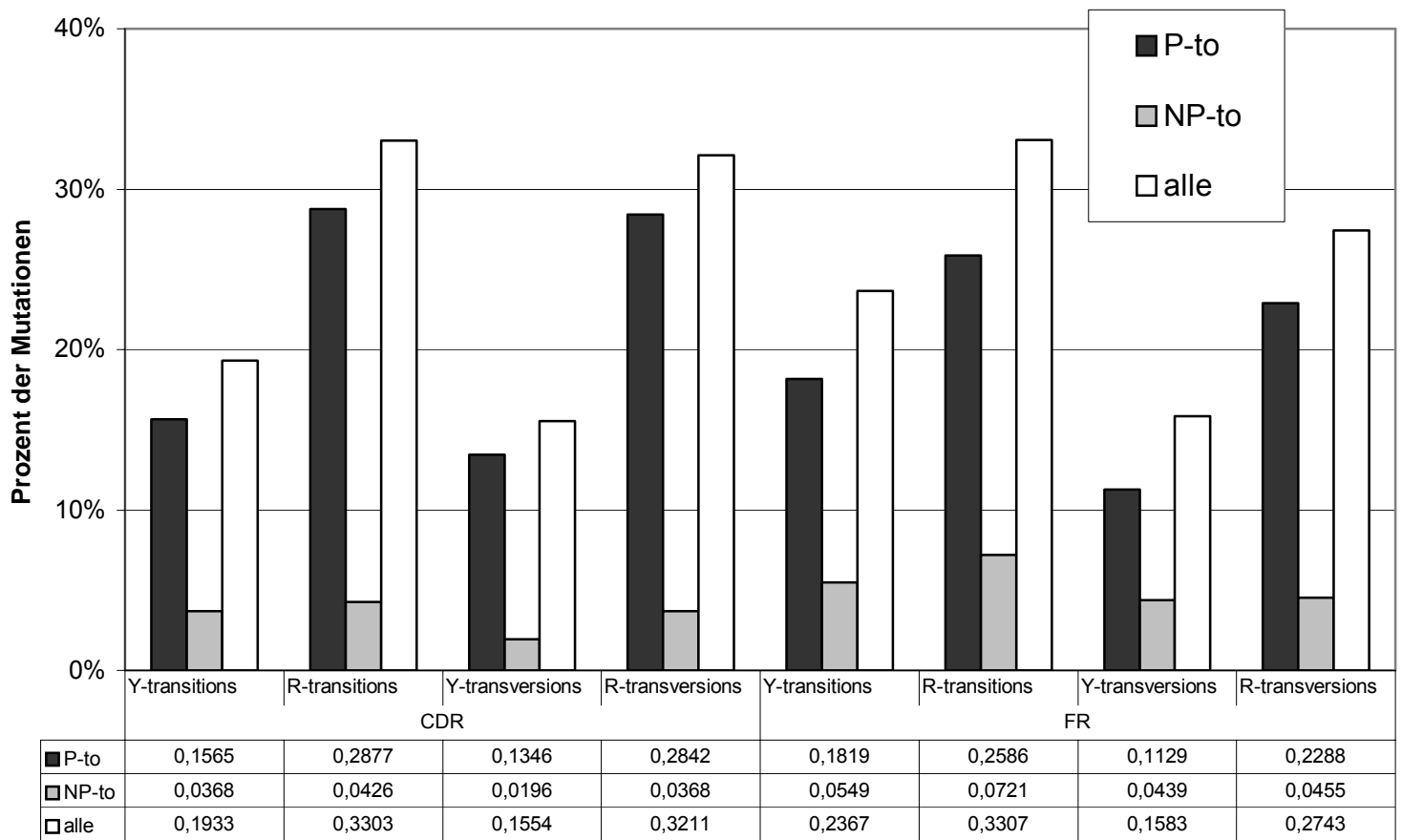
FIGUR 25: Anteil der vier verschiedenen Nukleotide an den Mutationen in den CDRs von produktiven Rearrangements in den unterschiedlichen Reifestadien



FIGUR 25: Anteil der vier verschiedenen Nukleotide an den Mutationen in den CDRs von produktiven Rearrangements in den unterschiedlichen Reifestadien

Die Aufteilung in die unterschiedlichen Reifestadien soll Aufschluss über eine eventuelle Veränderung des Mutatorsystems je nach Keimzentrumsentwicklung aufzeigen. Das Stadium der keimzentrumsbildenden B-Zellen (GCF) hebt sich als einziges von den Verteilungen in den anderen Reifestadien ab, was aber durch die geringe Anzahl an untersuchten Mutationen in diesem Stadium zu erklären ist. Es wurden gezielt die Mutationen in den CDRs von produktiven Rearrangements zur Darstellung ausgewählt, da hier eine große Anzahl an Mutationen untersucht werden konnte und somit die Veränderungen zwischen den Reifestadien am repräsentativsten sind. Durch die Reifung entstanden in der Verteilung der mutierten Nukleotide keine signifikanten Unterschiede.

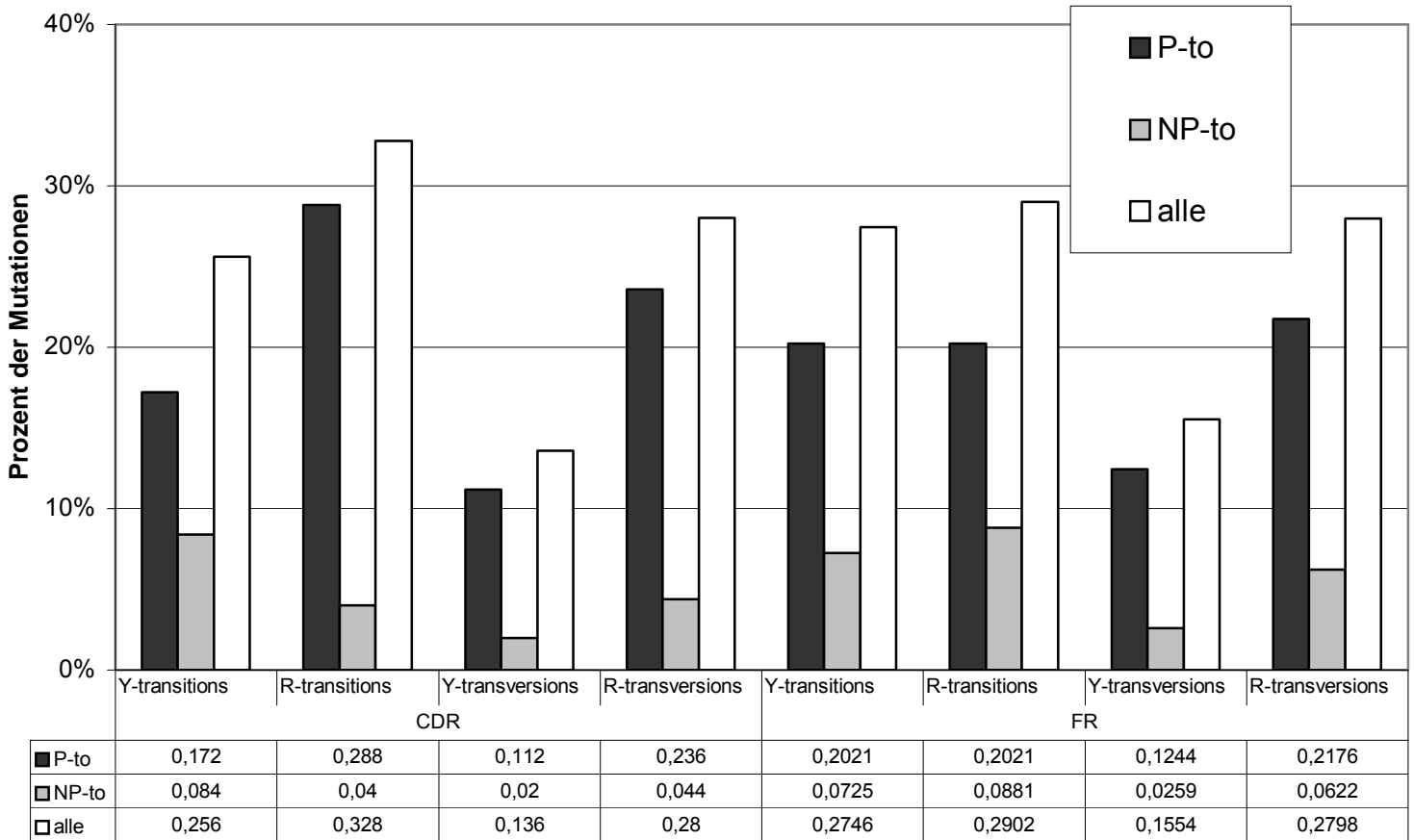
FIGUR 26: Y- und R-Transitionen und Transversionen in den CDRs und in FRs



FIGUR 26: Y- und R-Transitionen und Transversionen in den CDRs und in FRs

In diesem Diagramm wird dargestellt, inwiefern die geschehenen Mutationen die räumliche Struktur der DNA verändern, indem Purin- und Pyrimidin-Bausteine ausgetauscht werden. Y-Transition heißt Pyrimidin C oder T wird durch die Mutation zu Pyrimidin T oder C. R-Transition heißt Purin A oder G wird zu Purin G oder A. Y-Transversion heißt Pyrimidin C oder T wird zu Purin A oder G. R-Transversion heißt Purin A oder G wird zu Pyrimidin C oder T. Transversionen sind für die räumliche Struktur der DNA gravierender als die Transitionen. Außerdem wären sie rein statistisch gesehen mit 67% wahrscheinlicher als die Transitionen. Die Verhältnisse in den CDRs und diejenigen in FRs wurden getrennt dargestellt.

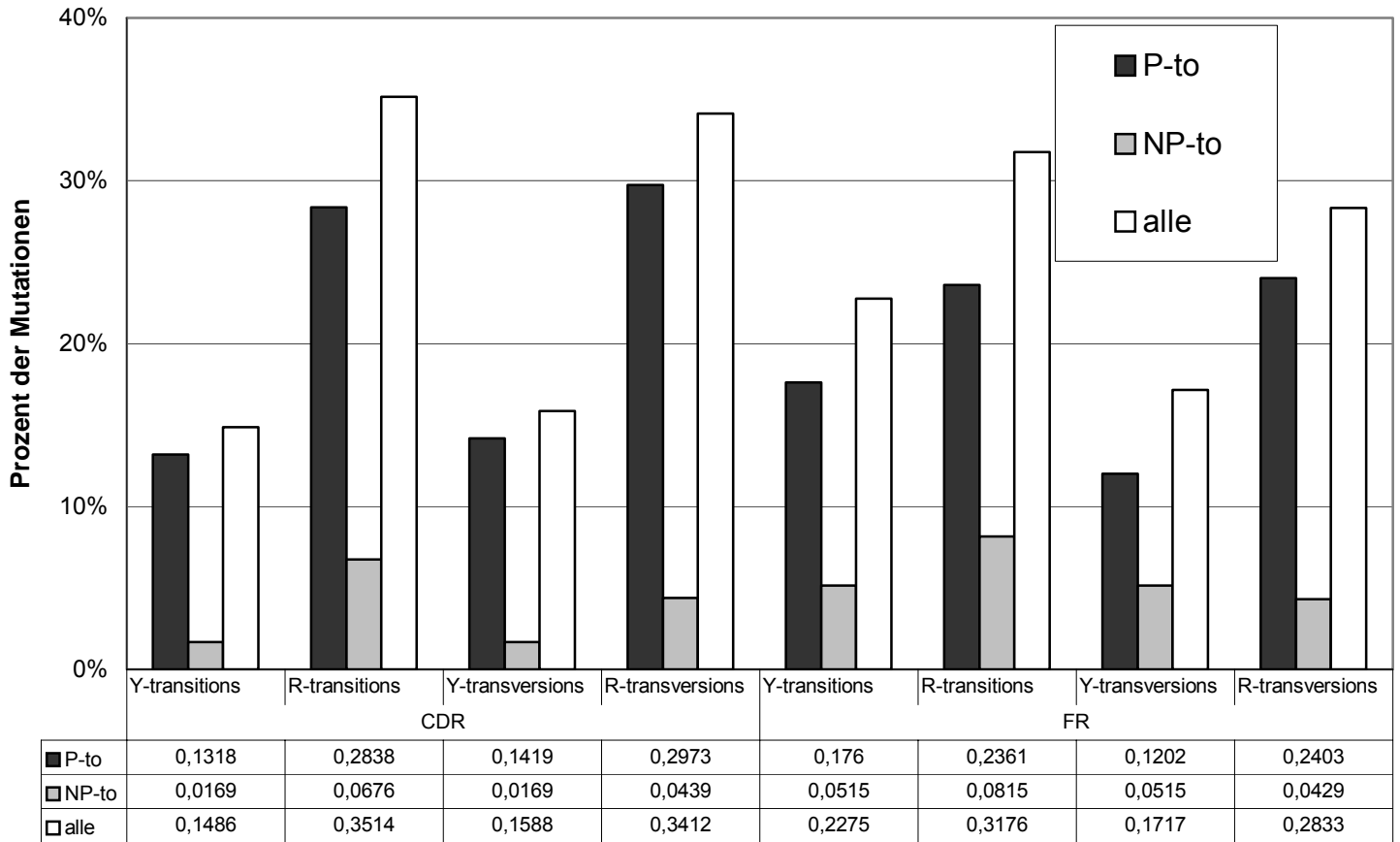
FIGUR 27: Y- und R-Transitionen und Transversionen in den CDRs und in FRs der naiven B-Zellen der Tonsille



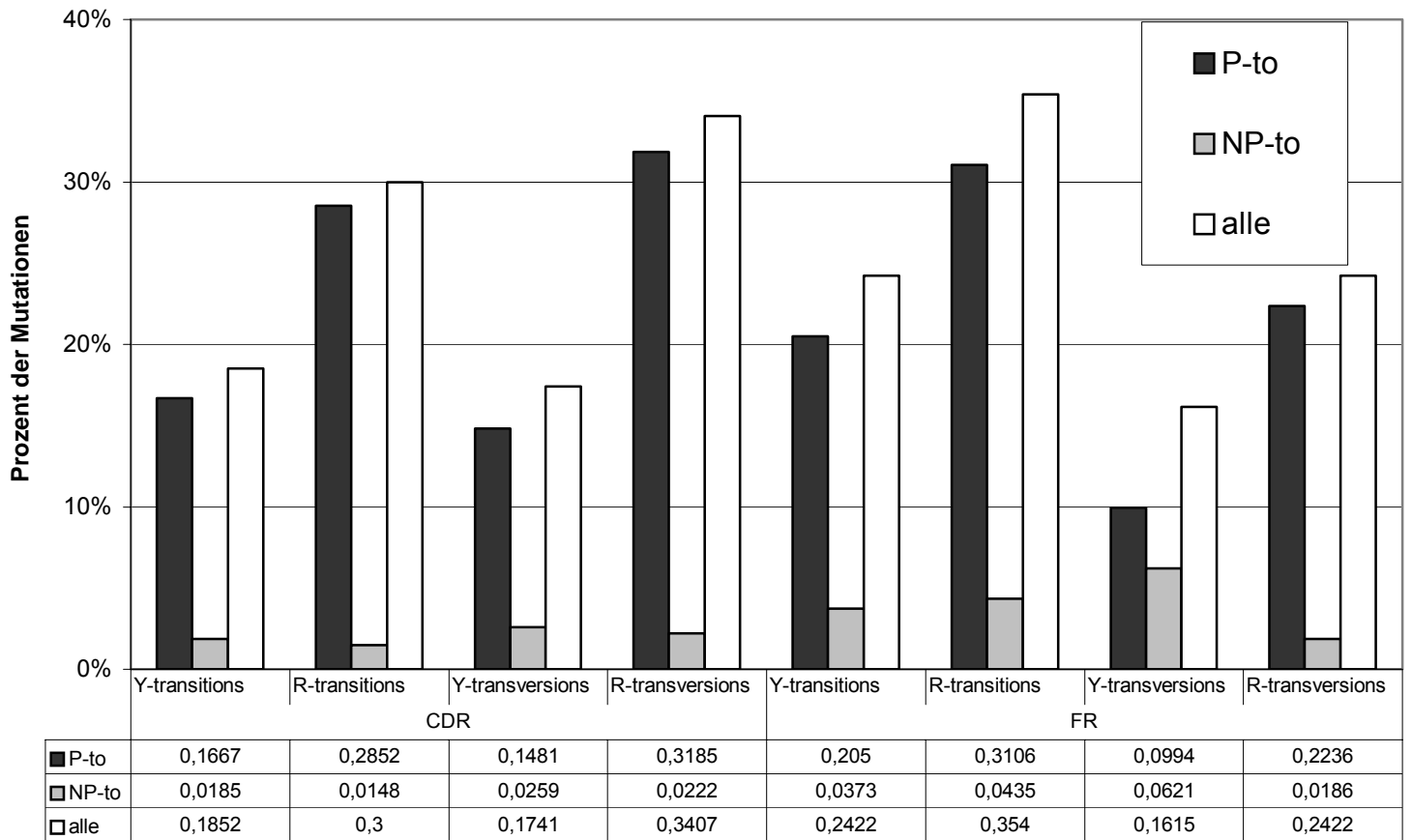
FIGUR 27-30: Y- und R-Transitionen und Transversionen in den CDRs und in FRs in den unterschiedlichen Reifestadien der B-Zelle der Tonsille

Die Diagramme sollen die Entwicklung der Auswirkungen von Mutationen verdeutlichen. Dazu können die Diagramme der Y- und R- Transitionen und Transversionen vom Stadium der naiven B-Zellen, der Zentroblasten, der Zentrozyten und der Gedächtnis-B-Zellen verglichen werden (Das Reifestadium der keimzentrumbildenden B-Zelle fehlt auf Grund der geringen Anzahl an Mutationen). Y-Transition heißt Pyrimidin C oder T wird durch die Mutation zu Pyrimidin T oder C. R-Transition heißt Purin A oder G wird zu Purin G oder A. Y-Transversion heißt Pyrimidin C oder T wird zu Purin A oder G. R-Transversion heißt Purin A oder G wird zu Pyrimidin C oder T. Transversionen sind für die räumliche Struktur der DNA gravierender als die Transitionen. Außerdem wären sie rein statistisch gesehen mit 67% wahrscheinlicher als die Transitionen. Die Verhältnisse in den CDRs und diejenigen in FRs wurden getrennt dargestellt.

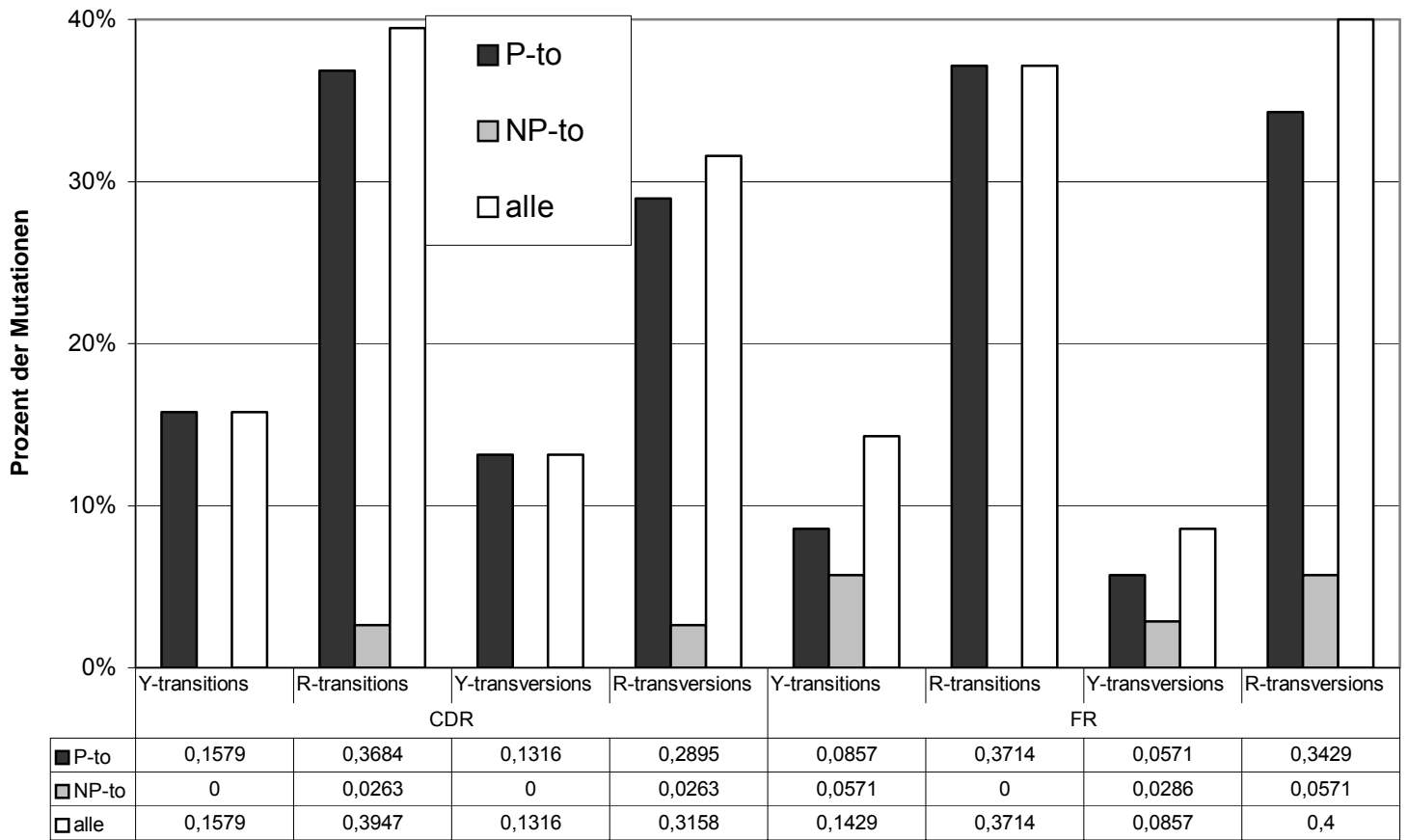
FIGUR 28: Y- und R-Transitionen und Transversionen in den CDRs und in FRs der Zentroblasten der Tonsille



FIGUR 29: Y- und R-Transitionen und Transversionen in den CDRs und in FRs der Zentrozyten der Tonsille



FIGUR 30: Y- und R-Transitionen und Transversionen in den CDRs und in FRs der Gedächtnis-B-Zellen der Tonsille



7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Stryer L. Biochemie: Spektrum, akademischer Verlag, 1996; 288-393.
2. Janeway CA, Travers P. Immunologie: Spektrum, akademischer Verlag, 1997; 85-104.
3. Lautner-Rieske A, Hameister H, Barbi G, Zachau HG. Mapping immunoglobulin gene-related DNA probes to the central region of normal and pericentrically inverted human chromosome 2. *Genomics* 1993; 16:497-502.
4. Bentley DL, Rabbitts TH. Evolution of immunoglobulin V genes: Evidence indicating that recently duplicated human V kappa sequences have diverged by gene conversion. *Cell* 1983; 32:613-623.
5. Zachau HG. The human immunoglobulin kappa genes. In: Honjo T, Alt F, eds. *Immunoglobulin genes*. New York: Academic Press, 1995:173-191.
6. Zachau HG. The human immunoglobulin k genes. *The Immunologist* 1996; 4:49-54.
7. Straubinger B, Huber E, Lorenz W, et al. The human Vk locus: Characterisation of a duplicated region encoding 28 different immunoglobulin genes. *Journal of Molecular Biology* 1988; 199:23-34.
8. Schable KF, Zachau HG. The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* 1993; 374:1001-22.
9. Schable KF, Thiebe R, Flugel A, Meindl A, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus: pseudogenes, unique and repetitive sequences. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* 1994; 375:189-199.
10. Meindl A, Klobeck H-G, Ohnheiser R, Zachau HG. The Vk gene repertoire in the human germline. *European Journal of Immunology* 1990; 20:1855-1863.
11. Huber C, Huber E, Lautner-Rieske A, Schäble KF, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus. Characterisation of the partially duplicated L regions. *European Journal of Immunology* 1993; 23:2860-2867.
12. Klein R, Jaenichen R, Zachau HG. Expressed human immunoglobulin kappa genes and their hypermutation. *European Journal of Immunology* 1993; 23:3248-3271.
13. Weichhold GM, Ohnheiser R, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics* 1993; 16:503-511.

14. Shapiro MA, Weigert M. How immunoglobulin V κ genes rearrange. *The Journal of Immunology* 1987; 139:3834-3838.
15. Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *The nobel lectures* 1987; 87:305-317.
16. Fanning LJ, Connor AM, Wu GE. Short Analytical Review: Development of the immunoglobulin repertoire. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996; 79:1-14.
17. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, et al. Insertions of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 1984; 311:752-755.
18. Lewis S, Gifford A, Baltimore D. DNA elements are asymmetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes. *Science* 1985; 228:677-685.
19. Feeney AJ. Junctional diversity in the absence of N regions. *The Journal of Immunology* 1993; 151:3094-3099.
20. Victor KD, Vu K, Feeney AJ. Limited junctional diversity in kappa light chains. *The Journal of Immunology* 1994; 152:3467-3475.
21. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 1989; 59:1035-1048.
22. Schiebler TH, Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*: Springer, 1996; 357-360.
23. Brandtzaeg P, Surjan L, Berdal P. Immunoglobulin systems of human tonsils. *Clinical and Experimental Immunology* 1978; 31:367-381.
24. Feuillard J, Taylor D, Casamayor-Pallejy M, Johnson GD, MacLennan ICM. Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with references to Ig class switching. *International Immunology* 1994; 1:121-130.
25. Wilson PC, Wilson K, Liu Y-J, Banchereau J, Pascual V, Capra JD. Receptor revision of immunoglobulin heavy chain variable region genes in normal human B lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 191:1881-1894.
26. Foster S, Brezinschek H-P, Brezinschek R, Lipsky P. Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM⁺ B cells. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99:1614-1627.
27. Biochemiepraktikum Würzburg. *Anleitung zum Biochemischen Praktikum*. Würzburg, 1996.

28. Küppers R, Zhao M, Hansmann M-L, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *The EMBO Journal* 1993; 12:4955-4967.
29. Girschick HJ, Grammer AC, Nanki T, Mayo M, Lipsky PE. RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood. *The Journal of Immunology* 2001; 166:377-386.
30. Tomlinson IM, Williams SC, Ignatovich O, Corbett SJ, Winter G. V Base Gold; Catalogue of human V gene segments and alleles. Internet 1996.
31. Girschick HJ, Lipsky PE. The kappa gene repertoire of human neonatal B cells. *Molecular Immunology* 2001; 38:1113-1127.
32. Lorenz W, Schable KF, Thiebe R, Stavnezer J, Zachau HG. The J kappa proximal region of the human K locus contains three uncommon V kappa genes which are arranged in opposite transcriptional polarities. *Molecular Immunology* 1988; 25:479-84.
33. Betz AG, Milstein C, Gonzalez-Fernandez A, Pannell R, Larsson T, Neuberger MS. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene. *Cell* 1994; 77:239-248.
34. Feeney AJ, Lugo G, Escuro G. The human cord blood repertoire. *The Journal of Immunology* 1997; 158:3761-3768.
35. Cox JP, Tomlinson IM, Winter G. A directory of human germ-line Vk segments. *European Journal of Immunology* 1994; 24:827-836.
36. Weber J-C, Blaison G, Thierry M, Knapp A-M, Pasquali J-L. Evidence that the VkIII gene usage is nonstochastic in both adult and newborn peripheral B cells and that peripheral CD5+ adult B cells are oligoclonal. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93:2093-2105.
37. Tomlinson IM, Cox JPL, Ermanno G, Lesk AM, Chothia C. The structural repertoire of the human Vk domain. *The EMBO Journal* 1995; 14:4628-4638.
38. Foster SJ, Dörner T, Lipsky PE. Targeting and subsequent selection of somatic hypermutations in the human Vk repertoire. *European Journal of Immunology* 1999; 29:3122-3132.
39. Gorman JR, Alt FW. Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Advances in Immunology* 1998; 69:113-181.

40. Ebeling SB, Schutte MEM, Logtenberg T. The majority of human tonsillar CD5+ B cells express somatically mutated V κ 4 genes. *European Journal of Immunology* 1993; 23:1405-1408.
41. Storb U. The molecular basis of somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Current Opinion in Immunology* 1996; 8:206-214.
42. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annual Review of Immunology* 1996; 14:441-457.
43. Rogerson B, Hackett J, Peters A, Haasch D, Storb U. Mutation pattern of immunoglobulin transgenes is compatible with a model of somatic hypermutation in which targeting of the mutator is linked to the direction of DNA replication. *The EMBO Journal* 1991; 10:4331-4341.
44. Betz AG, Rada C, Pannell R, Milstein C, Neuberger MS. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity and specific hotspots. *Proceedings of the national Academy of Science* 1993; 90:2385-2388.
45. Foster SJ, Dörner T, Lipsky PE. Somatic hypermutation of V κ J κ -rearrangements: Targeting of RGYW motifs on both DNA strands and preferential selection of mutated codons within RGYW motifs. *European Journal of Immunology* 1999; 29:4011-4021.
46. Wilson PC, de Bouteillier O, Liu YJ, Potter K, Banchemereau J, Capra JD, Pascual V. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187:59-70.
47. Klein R, Zachau HG. Expression and hypermutation of human immunoglobulin k genes. *Annals New York Academy of Science* 1995; 764:74-83.

Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. Hermann Girschick möchte ich sehr für dieses ansprechende Thema danken. Es war hochinteressant und hat viel Spaß gemacht. Vielen Dank für das unermüdliche Engagement, die nette Betreuung und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Frau Professor Dr. A. Schimpl danke ich für die Übernahme des Korreferates und für die freundliche Durchführung meiner mündlichen Prüfung.

Bei meinen Mitstreitern Yvonne, Carina und Julian möchte ich mich für den fachlichen Austausch auf dem Gebiet der Immunologie bedanken.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich meinen Dank für die Förderung aussprechen. Die wissenschaftlichen Angebote und besonders der intensive Austausch mit anderen Stipendiaten war sehr prägend.

Bei meinen Brüdern möchte ich mich für die zahlreichen Tipps und Tricks bedanken, die sie mir zukommen ließen, sobald sie sie an ihren eigenen Doktorarbeiten erarbeitet hatten.

Meinem Freund, Alexander Brede danke ich für die Unterstützung in akuten Computerkrisen, sowie beim Scannen, Drucken und Vermeiden von zu saloppen Formulierungen.

Meinen Eltern Frau Dr. Morven E. L. Johnson und Herrn Dr. Uwe Johnson möchte ich ganz besonders danken.

Danke für Eure lebenslange Hilfe und Unterstützung – ohne Euch hätte ich dies alles nicht geschafft.

Danke

CURRICULUM VITAE

Carron Claire Elizabeth Johnson

Persönliche Daten

Geburt: 07.12.1978, in Lohr am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. med. Uwe Johnson, Facharzt für Allgemeinmedizin
Dr. phil. Morven E.L. Johnson, Philologin
Geschwister: Dr. med. dent. Errick Johnson, * 03.02.1975, Zahnarzt
Dr. med. Björn Johnson, * 17.07.1976, Arzt
Thorsten Johnson, * 17.07.1976, Arzt

Bildung

Schule: 1984 - 1988 Grundschule Lohr-Sendelbach
1988 - 1997 Franz-Ludwig-von-Erthal-Gymnasium Lohr
1997 Abitur

Studium: 1997 - 2002: Zahnmedizinstudium in Würzburg
Sommer 2002: zahnmedizinisches Staatsexamen nach dem 10. Fachsemester, Note 1,07

Promotion: am Institut für Kinderheilkunde der Universität Würzburg,
Fachabteilung Immunologie, zum Thema
„Die Entwicklung des V_K-Immunglobulinrepertoire in Keimzentren der Tonsille“.
Doktorvater Privatdozent Dr. med. Girschick

1998 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes

2002 Auszeichnung mit dem Adolf-und-Inka-Lübeck-Preis

Berufserfahrung

08.04. - 30.06.2003: Tätigkeit in einer Zahnarztpraxis in Volkach am Main

seit 01.07.2003: Tätigkeit in einer Zahnarztpraxis in Marktbreit
