

Molekulare Analyse von humanen Gedächtnis-B-Zell-Populationen

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.**

**des Fachbereichs
Biologie und Geografie**

an der

Universität Duisburg-Essen

**vorgelegt von
Marc Seifert**

**aus Bergisch-Gladbach
Oktober 2009**

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter:	Prof. Dr. Ralf Küppers
2. Gutachter:	Prof. Dr. Astrid Westendorf
Vorsitzender des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr. Michael Ehrmann
Tag der Disputation:	20.01.2010

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
APC (als Farbstoff)	Allophycocyanin
APC (als Zelltyp)	professionelle Antigen präsentierende Zelle
aRNA	amplifizierte Ribonukleinsäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Rinderserum-Albumin
C	konstante Region der Ig-Ketten
CD	Differenzierungs- <i>cluster</i>
cDNA	komplementäre oder Kopie-DNA
CDR	Komplementarität bestimmende Region
CH	konstante Region der schweren Kette
dd H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DH	Diversitäts-Gensegment der schweren Kette
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphate
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure
EMBL	Europäisches Molekularbiologisches Labor
eng.	englisch
ES	Anreicherungs-Spiegel
et al.	et altera (lat. und andere)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
FDR	Erwarteter Anteil fälschlicherweise abgelehnter Null-Hypothesen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Gerüstregion
GC	Keimzentrum
GC-RMA	GC-Gehalt abhängiges Normalisierungsverfahren
GenMAPP	Genmap Annotator and Pathway Profiler Datenbank
GO	Gene Ontology Datenbank
GSEA	Gengruppen Anreicherungs-Analyse
HIGM	Hyper-IgM-Syndrom
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

JH	Verbindungs-Gensegment der schweren Kette
JL	Verbindungs-Gensegment der leichten Kette
kb	Kilobasen
lat.	lateinisch
MACS	Magnetismus-assoziierte Zellsortierung
MAS5	Normalisierungsverfahren für Genexpressionsanalysen
MGZ	Marginalzone
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Protein (Typ I und II)
Min.	Minuten
MMC	Haupt-Mutations- <i>cluster</i>
MSigDB	Molecular Signature Datenbank
MW	Mittelwert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
N-Nukleotid	nicht keimbahnkodiertes Nukleotid
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PB	periphäres Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen aus PB
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Plasmazelle
PCA	Prinzipielle Komponenten-Analyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PRR	Struktur-Erkennungs-Rezeptor
R/S	Verhältnis von Austausch- zu stillen Mutationen
RIN	RNA-Integritäts-Nummer (RNA-Qualität)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDB	Staudts Datenbank
SHM	somatische Hypermutation
SOCR	Speicherabhängiger Kalziumausstrom
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	T-Zell-abhängig
TI	T-Zell-unabhängig
TMC	Tonsilläre Mononukleäre Zellen
Tris	Trisamin (Base)
UTP	Uridintriphosphat
VH	Variables Gensegment der schweren Kette
VL	Variables Gensegment der leichten Kette

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Grundzüge des menschlichen Immunsystems	8
1.2	Die frühe B-Zell-Entwicklung	10
1.3	Die Keimzentrumsreaktion	12
1.4	T-Zell-unabhängige Immunantworten	16
1.5	Das immunologische Gedächtnis	18
1.6	IgD-only B-Zellen	21
1.7	Zielsetzung der Arbeit	22

2. Material und Methoden

2.1	Isolierung von humanen B-Zell-Populationen	23
2.2	Isolierung von humanen IgD ⁺ und IgG ⁺ PC	23
2.3	Analyse von V _H - und V _λ -Genumlagerungen aus Einzelzellen	24
2.4	V-Gen-PCR Protokolle	25
2.5	Kalkulation der Größe von IgD-only B-Zell- und IgD ⁺ PC-Klonen	26
2.6	Analyse von Austauschmutationsmustern in V _H 3-30-Gen- umlagerungen aus IgD-only B-Zellen und IgD ⁺ PC	27
2.7	Messung von Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen	27
2.8	Analyse von Bcl6-Mutationen in humanen B-Zell-Populationen	28
2.9	Detektierung von klonal verwandten B-Zellen aus PB	29
2.9.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und CDRIII- Spektren-Typisierung	29
2.9.2	PCR mit CDRIII-spezifischen Primern	31
2.10	Kalkulation der Größe von Gedächtnis-B-Zell-Klonen im PB	32
2.11	Erstellung und Analyse von Mutationsbäumen	32
2.12	Erstellung von Genausprägungsprofilen von humanen B-Zell-Populationen	33
2.13	Analyse der Genexpressionsprofile humaner B-Zell-Populationen	35
2.13.1	Hierarchische Gliederung	35
2.13.2	Prinzipielle-Komponenten-Analyse	35
2.13.3	Paarweise Vergleiche	36
2.13.4	Gengruppen-Anreicherungs-Analyse	37

2.14	PCR-Primer	38
------	------------	----

3. Ergebnisse

3.1	V-Gen-Analyse von IgD-only B-Zellen und IgD ⁺ PC	40
3.1.1	Klonalität und VH3-30-Frequenz in IgD-only B-Zellen aus PB	40
3.1.2	Klonalität und VH3-30-Frequenz in tonsillären IgD ⁺ PC	42
3.1.3	Die Analyse von Austauschmutationsmustern in den FR funktionaler V _H 3-30-Gensegmente	44
3.2	Molekulare Analyse von humanen B-Zell-Populationen	46
3.2.1	Analyse der Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen	46
3.2.2	Analyse von Bcl6-Mutationen in humanen B-Zell-Populationen	48
3.2.3	Detektion klonal verwandter IgM ⁺ und IgG ⁺ Gedächtnis-B-Zellen	50
3.3	Genexpressionsanalyse humaner B-Zell-Populationen aus PB	58
3.3.1	Bestimmung eines Verwandtschaftsgrades von B-Zell-Populationen anhand hierarchischer Gliederung	59
3.3.2	Bestimmung eines Verwandtschaftsgrades von B-Zell-Populationen anhand PCA	61
3.3.3	Charakterisierung von B-Zell-Populationen aus PB anhand paarweiser Vergleichen	65
3.3.4	Charakterisierung von B-Zell-Populationen aus PB mit GSEA	84

4. Diskussion

4.1	V-Gen-Analyse von IgD-only B-Zellen und IgD ⁺ PC	93
4.1.1	IgD-only B-Zellen und IgD ⁺ PC gehören zu sehr großen Klonen	93
4.1.2	Häufige Nutzung von V _H 3-30 in IgD-only B-Zellen und IgD ⁺ PC	95
4.1.3	Besondere Muster von Austauschmutationen in der V _H 3-30-FR _{III} von IgD-only B-Zellen und IgD ⁺ PC	95
4.1.4	Ein Szenario für die Superantigen-getriebene Entstehung von IgD-only B-Zellen und IgD ⁺ PC	96
4.2	Molekulare Analysen von humanen B-Zell-Populationen	101
4.2.1	Humane mutierte IgM ⁺ B-Zell-Populationen tragen molekulare Spuren einer GC-Reaktion	101
4.2.2	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ und IgG ⁺ CD27 ⁺ B-Zellen stammen aus gemein-	

samen GC-Reaktionen	105
4.2.3 Ist eine Entstehung von somatisch mutierten IgM ⁺ B-Zellen mit dem gegenwärtigen Wissensstand vereinbar?	109
4.2.4 Die Dynamik von Gedächtnis-B-Zellen in primären und sekundären Immunantworten	117
4.3 Genexpressionsanalyse humaner B-Zell-Populationen aus PB	119
4.3.1 Bestimmung eines Verwandtschaftsgrades von B-Zell-Populationen aus PB	120
4.3.2 Identifizierung von Gensignaturen, die eine spezifische Funktion von IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ B-Zellen suggerieren	122
4.3.3 GSEA von humanen PB B-Zell-Populationen	131
5. Zusammenfassung	136
6. Ausblick	137
7. Literatur	139
8. Teilpublikationen	159
9. Anhang	160
Danksagung	
Lebenslauf	
Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Grundzüge des menschlichen Immunsystems

Der Organismus des Menschen ist durch Interaktion mit seiner Umwelt ununterbrochen einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt. Die Epithelien des Menschen bilden eine wirksame Barriere gegen diese Krankheitserreger, können jedoch keine vollständige Abschirmung leisten. Daher können Pathogene in den Körper eindringen, sich vermehren und ausbreiten. Auf eine solche Infektion reagiert der menschliche Organismus mit einer Immunantwort, deren Ziel die Erkennung und Beseitigung der Fremdkörper ist. Das Immunsystem des Menschen ist in zwei Systeme gegliedert, die angeborene und die adaptive Immunität. Die angeborene Immunität ist ein Zusammenspiel von unveränderlichen Mechanismen, die genetisch kodiert sind. Die Hauptfunktionen der angeborenen Immunität werden durch Leukozyten vermittelt. Die Erkennung von Pathogenen wird durch Struktur-Erkennungs-Rezeptoren (engl. pattern recognition receptor, PRR) auf der Oberfläche dieser spezialisierten Zellen gewährleistet. Die PRR binden an Pathogen-Strukturen, z.B. Bestandteile der Bakterienzellwand, virale und bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder doppelsträngige Ribonukleinsäuren (RNA). Leukozyten initiieren eine lokale Entzündungsreaktion, in deren Verlauf Pathogene phagozytiert und weitere Zellen durch Chemoattraktion an den Infektionsherd rekrutiert werden. Eine Vielzahl von spezialisierten Leukozyten ist an diesen Mechanismen beteiligt: Mastzellen sezernieren bei Aktivierung Botenstoffe wie Zytokine, Histamine und Heparin; diese sorgen für eine Erweiterung des Gewebes und der Blutgefäße, unterbinden Blutgerinnung und attrahieren Makrophagen und Granulozyten. Letztere phagozytieren Pathogene und sezernieren antibakteriell wirksame Stoffe. Sie sind ebenfalls an der Rekrutierung von Zellen des Immunsystems beteiligt und aktivieren darüber hinaus das Komplementsystem. Das Komplementsystem ist eine Kaskade von Proteinen, die vornehmlich in der Leber synthetisiert werden und mit dem Blutserum zirkulieren. Die Komplementproteine binden unspezifisch an Pathogene und markieren, opsonisieren und perforieren diese. Makrophagen und die mit ihnen verwandten dendritischen Zellen sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC). Sie präsentieren prozessiertes Antigen auf Typ2 Haupt-Histokompatibilitäts-Proteinen (engl. major histocompatibility complex 2, MHCII) und ermöglichen damit die Aktivierung von Lymphozyten, den Mediatoren der adaptiven Immunität.

Die adaptive Immunität zeichnet sich durch zwei elementare Eigenschaften aus: Spezifität und Gedächtnis. Diese Eigenschaften werden durch T- und B-Zellen vermittelt, die während ihrer Reifung im Thymus bzw. Knochenmark durch genetische Rekombination T-Zell- bzw. B-Zell-Rezeptoren (engl. T cell receptor, TCR, B cell receptor, BCR) mit individueller Spezifität ausbilden. In adaptiven Immunantworten werden Lymphozyten mit Spezifität für ein Antigen selektiert und klonal expandiert. Ein Teil differenziert aus in langlebige Gedächtnis-Lymphozyten, die bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Antigen schneller und besser reagieren können. T-Zellen gliedern sich in T-Helferzellen (T_H1 , T_H2 und T_H17), zytotoxische und regulatorische T-Zellen. T-Helferzellen erkennen mit ihren TCR Antigen-beladene MHCII auf APCs und können durch diese aktiviert werden. Aktivierte T_H1 -Zellen stimulieren hauptsächlich Monozyten (Vorläufer der Makrophagen und dendritischen Zellen), T_H2 -Zellen wirken aktivierend auf B-Zellen und T_H17 -Zellen sezernieren Interleukin 17. Zytotoxische T-Zellen interagieren über ihre TCR mit Typ1 MHC-Molekülen auf somatischen Zellen und können z.B. mit Viren infizierte Zellen erkennen und Zell-Lyse vermitteln. Regulatorische T-Zellen wirken hemmend auf T-Helferzellen und können so eine Toleranz von Selbst-Antigenen (Autoantigenen) unterstützen. B-Zellen binden mit ihren BCR spezifisch an Antigene, internalisieren, prozessieren und präsentieren diese mit MHCII. Bei paralleler Aktivierung durch Antigen und Stimulation von T_H2 -Zellen differenzieren B-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen (PC) und in einem weiteren Schritt zu Keimzentrums- (engl. germinal center, GC) -B-Zellen aus. GC-B-Zellen unterlaufen eine Affinitätsreifung und differenzieren in Gedächtnis-B-Zellen und langlebige PC aus. PC schließlich sezernieren lösliche BCR (Antikörper) und vermitteln so eine hochaffine Erkennung von spezifischen Antigenen (Murphy et al., 2009).

Die Trennung von angeborener und adaptiver Immunität ist oftmals nicht exakt möglich. Zum Beispiel gehören auch natürliche Killer-Zellen zu den Lymphozyten, sie sind ebenfalls zytotoxisch, verfügen jedoch nicht über einen individuellen Rezeptor. Sogenannte $\gamma\delta$ -T-Zellen (deren TCR von γ - und δ -Genlokus kodiert wird) sind oftmals polyreaktiv, d.h. der individuelle Rezeptor erkennt allgemeine Strukturen (siehe PRR). Auch bei den B-Zellen gibt es neben den B2-B-Zellen, die an klassischen adaptiven Immunreaktionen teilnehmen, auch noch B1-B-Zellen, die in Mäusen vornehmlich in den peritonealen Leibeshöhlen angesiedelt sind. Diese B-Zellen sorgen unabhängig von antigenischer Stimulation für einen sogenannten natürlichen

IgM-Antikörpertiter im Blut, der ein Bestandteil der angeborenen Immunität ist (Murphy et al., 2009).

1.2 Die frühe B-Zell-Entwicklung

Der BCR ist ein Homodimer aus je einer schweren und einer leichten Kette (engl. heavy chain, H, und light chain, L). Der Carboxyterminus beider Ketten ist konstant (engl. constant region, C), der Aminoterminus variiert jedoch durch Rekombination von DNA-Segmenten. Diese Genumlagerungen der variablen Bereiche des BCR geschehen schrittweise in lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Mit der Zusammenfügung eines der 25 funktionalen Diversitäts- (engl. diversity, D) und eines der 6 funktionalen Verbindungs- (engl. joining, J) Gensegmente der schweren Kette ist das pro-B-Zell-Stadium erreicht (Blackwell und Alt, 1984). Anschließend wird eines der 40 funktionalen Variabilitäts- (engl. variable, V) Gensegmente 5' angefügt (Murphy et al., 2009). Bei der Rekombination der Gensegmente können durch die Exonukleaseaktivität des Enzyms Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase an der Verknüpfungsstelle Nukleotide entfernt oder angefügt werden. Eine schematische Darstellung dieser Prozesse ist in Abb. 1 gezeigt. Aus einigen Nukleotiden des jeweiligen V_H -Gens, den N-Nukleotiden, dem D_H -Gen und einem kleinen Abschnitt des J_H -Gens resultiert die Komplementarität-bestimmende Region III (engl. complementarity determining region III, CDRIII). Sie ist für die schwere Kette so divers, daß sie als genetischer Marker für einen einzelnen B-Zell-Klon genutzt werden kann (Abb. 1).

Abbildung 1: Schematische Darstellung der VDJ-Rekombination

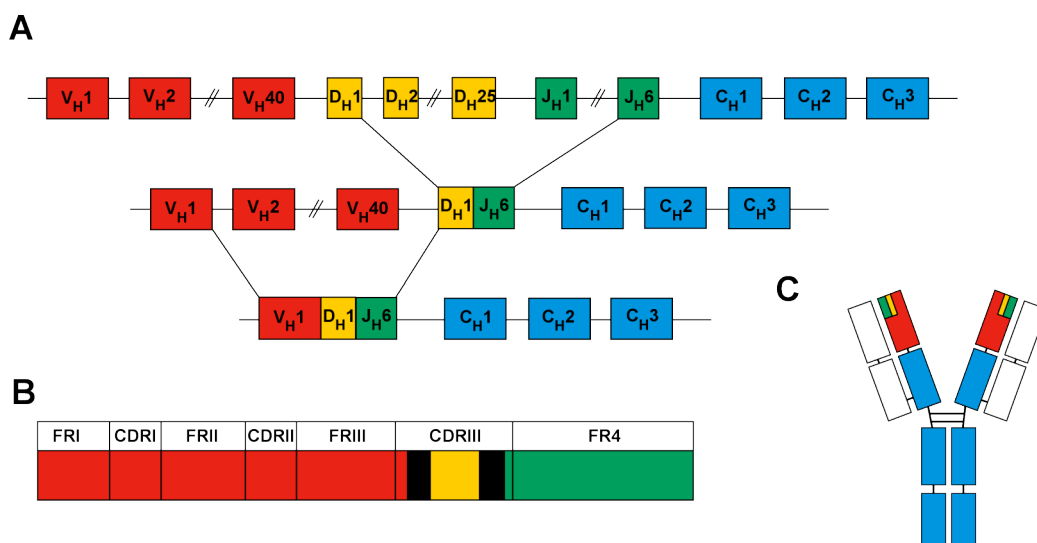


Abb. 1: A: Schematische Darstellung der schrittweisen Genumlagerung des Ig-Schwerkettenlokus. B: Schematische Darstellung einer putativen VDJ-Genumlagerung mit

N-Nukleotiden (schwarz) und einer Einteilung in FR und CDR. C: Farbkodierung der Gensegmente in einem schematischen Antikörper wie unter A. Die leichten Ketten sind in weiß dargestellt, schwere und leichte Ketten verknüpfende Disulfidbrücken sind durch schwarze Querstreben symbolisiert (IgG1-Isotyp).

Die Rekombinationsmechanismen führen in ca. zwei Drittel der Fälle zu einer Verschiebung des Leserasters oder zur Generierung eines Stop-Kodons. Im Falle einer solchen unproduktiven Genumlagerung kann eine Umlagerung auf dem zweiten Allel des Schwerketten-Lokus stattfinden (Feddersen und Van Ness, 1985; Tiegs et al., 1993). Ist die zweite Rekombination ebenfalls unproduktiv, stirbt die Zelle durch Apoptose (Rajewsky, 1996). Ist jedoch eine der Umlagerungen erfolgreich, wird erstens eine Umlagerung des zweiten Allels unterbunden (allelische Exklusion) und zweitens die schwere Kette in Verbindung mit einem Leichtketten-Surrogat exprimiert. In diesem sogenannten prä-B-Zell-Stadium wird die Funktionalität der schweren Kette getestet. Im Fall einer mangelhaften Funktion bieten Genumlagerungen des zweiten Lokus oder *V_H-replacement* (Zhang, 2007) eine weitere Möglichkeit zur Ausbildung einer funktionsfähigen schweren Kette. Ist die schwere Kette funktionstüchtig, proliferiert die prä-B-Zelle und beginnt die Rekombination der V_L- und J_L-Gensegmente der leichten Kette auf dem κ-Lokus (Bräuninger et al., 2001; Rajewsky, 1996). Die Leichtketten-Loci enthalten keine D-Segmente (Rajewsky, 1996). Gelingt auf beiden κ-Genloci keine funktionelle Rekombination, werden diese Loci durch das κ-deletierende Element inaktiviert und eine Umlagerung der λ-Loci wird möglich (Bräuninger et al., 2001). Auf diese Weise exprimiert eine B-Zelle entweder κ-Leichtketten oder λ-Leichtketten, die Frequenzen betragen jeweils etwa 60% bzw. 40% in humanen naiven B-Zellen (Alt et al., 1992; Rajewsky, 1996; Tonegawa, 1983). Unreife B-Zellen mit vollständigem BCR werden auf Autoreaktivität gegenselektiert (Rajewsky, 1996). Im Falle einer Autoreaktivität können B-Zellen ihren BCR verändern, das heißt neue Leichtkettenumlagerungen durchführen und möglicherweise auch durch *V gene replacement* bestehende Genumlagerungen editieren (Nadel et al., 1998; Zhang et al., 2003). Bleibt die B-Zelle autoreaktiv, wird sie durch Anergie oder Apoptose unschädlich gemacht (Goodnow et al., 1988; Tiegs et al., 1993).

Reife B-Lymphozyten mit nicht-autoreaktiven BCR verlassen das Knochenmark als antigenunerfahrene, naive IgM⁺IgD⁺ B-Zellen. Die gleichzeitige Expression von IgM und IgD ist dabei auf alternatives Spleißen zurückzuführen (Preud'homme et al., 2000). Durch die genetische Rekombination der schweren und

leichten Ketten und die möglichen Paarungen wird eine theoretische Diversität von $1,9 \times 10^6$ (Murphy et al., 2009) oder sogar bis zu 10^{14} verschiedenen BCR-Molekülen erreicht (Sanz, 1991).

1.3 Die Keimzentrumsreaktion

Naive B-Zellen migrieren durch das Blut- und Lymphsystem und durch sekundäre lymphoide Organe. Bei Kontakt mit kognitivem Antigen werden sie aktiviert und in den T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe zurückgehalten. Dort treffen sie auf aktivierte T_H2 -Zellen, erfahren zusätzliche Stimulierung und bilden einen primären Fokus. Das bedeutet die B-Zellen beginnen zu proliferieren und ein Teil des Klons differenziert aus in PC, welche in der sogenannten primären Fokus-Reaktion eine erste Welle an Antikörpern sezernieren. Einige der B-Zellen migrieren gemeinsam mit komplementären T-Helferzellen in die angrenzenden primären B-Zell-Follikel und initiieren dort eine Keimzentrumsreaktion (Murphy et al., 2009).

Im Verlauf einer GC-Reaktion (Abb.2) proliferieren GC-B-Zellen sehr stark, interagieren mit T-Helferzellen bzw. follikulären dendritischen Zellen (engl. follicular dendritic cell, FDC) und bilden eine charakteristische histologische Struktur aus (MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996). Ein Geflecht aus FDC, Makrophagen, T_H2 -Zellen und B-Lymphozyten (Zentrozyten) wird als helle Zone, ein dichter Bereich von sehr stark proliferierenden B-Zellen (Zentroblasten) als dunkle Zone erkennbar. Umgeben ist das GC von einer Mantelzone aus verdrängten naiven B-Zellen (Kroese et al., 1990). GC-B-Zellen zirkulieren vor allem in, aber auch zwischen dunkler und heller Zone, um in einem Wechsel aus Mutation und Selektion ihre Affinität zum kognitiven Antigen zu steigern (MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996). Über die zugrundeliegende Dynamik ist zwar ausführlich berichtet worden (Allen et al., 2004; Hauser et al., 2007; Schwickert et al., 2007), jedoch steht eine genaue Klärung des Mechanismus noch aus.

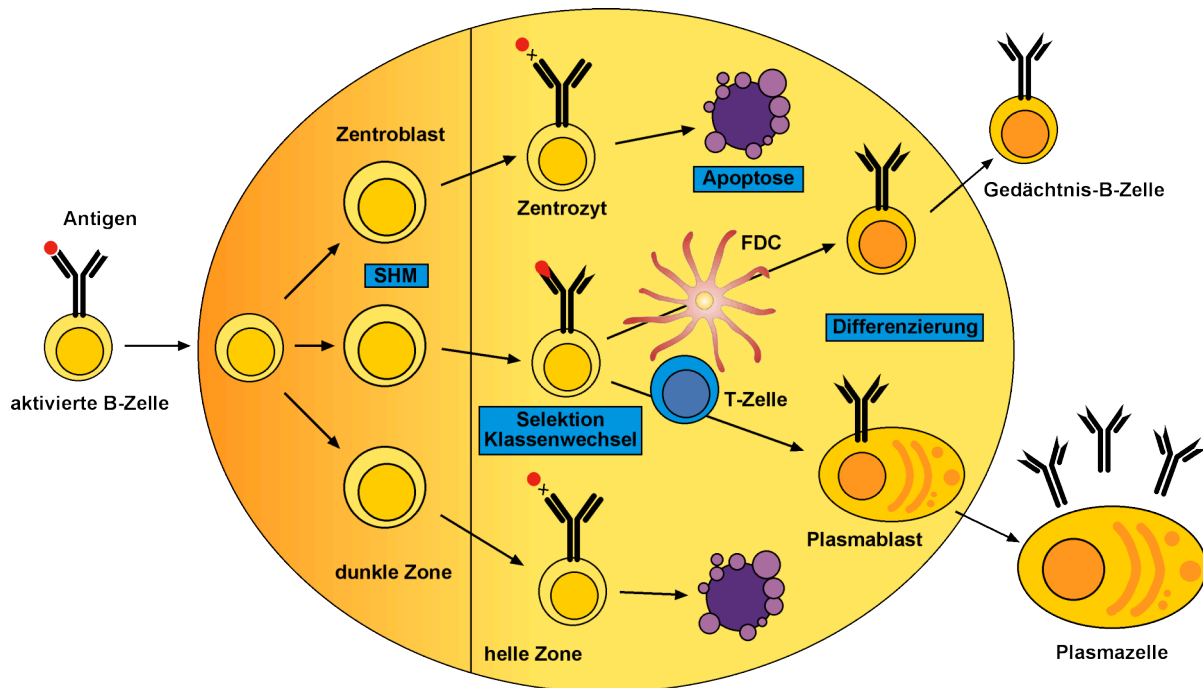
Abbildung 2: Schematische Darstellung der GC-Reaktion

Abb. 2: Schematische Darstellung der GC-Reaktion. Antigen-aktivierte B-Zellen differenzieren in Zentroblasten in der dunklen Zone des GC. Während sie proliferieren, fügen sie somatische Mutationen in ihre V-Gene ein. Anschließend differenzieren sie zu Zentrozyten und migrieren in die helle Zone. Dort werden diejenigen mit erhöhter Affinität mit Hilfe von FDC und T-Zellen selektiert. Zentrozyten mit geringerer Affinität unterlaufen Apoptose. Selektierte Zentrozyten können klassenwechseln und/oder zu Gedächtnis-B-Zellen bzw. Plasmazellen differenzieren. Nachgebildet aus (Klein und Dalla-Favera, 2008).

In der dunklen Zone findet somatische Hypermutation (engl. somatic hypermutation, SHM) statt (Abb. 2), in der die Affinität des BCR für das jeweilige Antigen gesteigert wird (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991; Küppers et al., 1993). Durch SHM werden Punktmutationen, aber auch kleine Deletionen und Duplikationen (Goossens et al., 1998) in die IgV-Gene des BCR eingefügt (Neuberger, 2008; Teng und Papavasiliou, 2007). Der Prozess der SHM ist transkriptionsabhängig (Bachl et al., 2001; Fukita et al., 1998; Yang et al., 2006) und findet hauptsächlich in einem definierten Bereich von 1-2 kb 3' des Transkriptionsstartes statt (Lebecque und Gearhart, 1990; Storb et al., 1998). Darüber hinaus werden bestimmte Sequenzmotive, sogenannte *SHM hotspots*, bevorzugt (Rogozin und Kolchanov, 1992), und die betroffenen Nukleotidaustausche sind häufiger Transitionen als eine unverzerrte Mutationsfrequenz erwarten ließe (Di Noia und Neuberger, 2007). Das Gen *activation induced cytidine deaminase* (AICDA) ist essentiell für SHM (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Sein Genprodukt (AID) deaminiert Deoxycytidine der DNA zu Deoxyuridinen, die kein Bestandteil der DNA sind. Die Base Uracil kann durch das Enzym Uracil-DNA-Glykosylase entfernt und die

entstandenen Läsionen durch die DNA-Reparatur-Maschinerie und bestimmte DNA-Polymerasen fehlerhaft repariert werden (Di Noia und Neuberger, 2007). Ebenso ist es möglich, daß die DNA-Replikationsmaschinerie Deoxyuridine korrekt oder fehlerhaft ersetzt (Di Noia und Neuberger, 2007). In geringem Umfang kann eine aberrante SHM auch in Nicht-Ig-Genen, wie z.B. dem GC-Transkriptionsfaktor Bcl6, Mutationen einführen. Hier ist zwar eine niedrigere Frequenz, jedoch ein identisches Muster von somatischen Mutationen zu finden (Liu et al., 2008; Pasqualucci et al., 1998).

In der hellen Zone (Abb. 2) konkurrieren GC-B-Zellen mit veränderter Affinität (durch somatische Mutationen) um Überlebenssignale von FDC und T-Zellen: bei erhöhter Affinität werden sie positiv selektiert, bei verringerter bzw. verhältnismäßig niedriger Affinität unterlaufen sie Apoptose (Liu et al., 1989; Rajewsky, 1996). Ebenfalls sind die Zentrozyten in der hellen Zone an den Differenzierungsprozessen zu PC- und Gedächtnis-B-Zell-Entwicklung beteiligt (Klein und Dalla-Favera, 2008). Der ständige Wechsel von Mutation und Selektion führt dazu, daß einige GC-B-Zell-Klone mit erhöhter Affinität expandieren, mit gemeinsamen und individuellen somatischen Mutationen ausgestattet zu langlebigen post-GC-B-Zellen ausdifferenzieren und das GC verlassen (Kroese et al., 1990; Kroese et al., 1987; Küppers et al., 1993).

Desweiteren findet der sogenannte Klassenwechsel in den Zentrozyten eines GC statt. Der Carboxyterminus der schweren Kette des BCR ist konstant (engl. constant region, C), jedoch kann er im Menschen von einem C_{μ} -, einem C_{δ} -, zwei C_{α} -, einem C_{ε} - bzw. vier verschiedenen C_{γ} -Genen kodiert werden. Beim Klassenwechsel wird durch genetische Rekombination das C_{μ} -Gensegment durch eines der anderen C_H -Gensegmente ersetzt. Dieser Prozess ist ebenfalls abhängig von AID (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000) und schließt Doppelstrangbrüche in den *switch*-Regionen 5' der C_H -Gensegmente ein, die unter Deletion eines oder mehrerer C_H -Gensegmente ein weiter 3' gelegenes C-Gensegment an den $V_H D_H J_H$ -Lokus knüpft (Hauser et al., 2007; Wuerffel et al., 1997; Zarrin et al., 2007). C_{δ} besitzt keine *switch*-Region, jedoch eine ähnliche, Pentamer-reiche σ/δ -Region und kann ebenfalls in sehr seltenen und besonderen Fällen an einer Klassenwechselrekombination teilnehmen (Arpin et al., 1998). Der Klassenwechsel zu C_{γ} , C_{α} oder C_{ε} führt zu einer veränderten Effektorfunktion des Antikörpers (Manis et al., 2002). Der Klassenwechsel in B-Zellen wurde klassischerweise als Marker für post-GC-Gedächtnis-B-Zellen verwendet (Klein et al., 1998b).

Für die Ausbildung einer GC-Reaktion sind viele spezialisierte Faktoren notwendig, von denen im Folgenden drei besonders hervorgehoben werden sollen: Ein essentieller Faktor für die Ausbildung und Aufrechterhaltung eines GC ist das Protein *B cell lymphoma 6* (Bcl6). Die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu einem GC-B-Zell-Phänotyp wird begleitet – und zentral reguliert – durch die verstärkte Transkription und Expression dieses Transkriptionsfaktors. Die zentrale Funktion dieses Moleküls äußert sich darin, daß Mäuse ohne Bcl6 nicht in der Lage sind GC-Reaktionen durchzuführen (Dent et al., 1997; Ye et al., 1997). Von der Expression dieses transkriptionellen Repressors hängen eine Vielzahl der entscheidenden und speziellen Funktionen von GC-B-Zellen ab, etwa die Inhibierung von PC- und Gedächtnis-B-Zell-Differenzierung, die Repression von Zellzyklus-hemmenden Faktoren und die Induktion von Toleranz gegenüber genotoxischem Stress (Klein und Dalla-Favera, 2008).

Zweitens ist die T-Zell-vermittelte Kreuzvernetzung von CD40 nötig, um die Struktur eines GC aufrechtzuerhalten, wie mit Mausmodellen gezeigt werden konnte (Han et al., 1995), und wie die Abwesenheit solcher Strukturen in Patienten mit gestörter CD40-Kreuzvernetzung suggeriert (de Villartay et al., 2003). Diese Patienten leiden an einer Immundefizienz, dem *hyper IgM syndrome* (HIGM), das durch Defekte in CD40-Ligand (CD40L) (Typ 1) oder CD40 (Typ 3) verursacht wird und sich durch einen erhöhten IgM-Serum-Titer und stark verringerte (bis nicht nachweisbare) Serum-Titer von klassengewechselten Isotypen auszeichnet. Das Typ 2 HIGM-Syndrom, verursacht durch AID-Defizienz, hat einen noch ausgeprägteren Phänotyp, im Gegensatz zu Typ 1 und 3 sind keinerlei Spuren von SHM oder Klassenwechsel-Rekombination nachweisbar (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß aktive CD40-Signaltransduktion nur in Zentrozyten, jedoch nicht in proliferierenden Zentroblasten besteht (Basso et al., 2004; Shaffer et al., 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Kreuzvernetzung von CD40 für die Rezirkulierung von GC-B-Zellen oder den Austritt von post-GC-B-Zellen wichtig ist, aber nicht für eine Initiierung von SHM (Klein und Dalla-Favera, 2008).

Schließlich sei noch die *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) und eine mit diesem Enzym verbundene, extensive Verlängerung von Telomeren in GC-B-Zellen erwähnt (Hu et al., 1997; Norrback et al., 2001). Telomere sind Strukturen an den Enden von Chromosomen, die für den Schutz vor Nukleotidverlust durch semikonservative Replikation der DNA verantwortlich sind (Hug und Lingner, 2006; Weng et al., 1997b). Die Expression von Telomerase bzw. eine Verlängerung von

Telomeren ist in nahezu keinen somatischen Zellen, sondern nur in Stammzellen und GC-B-Zellen nachweisbar (Hug und Lingner, 2006; Weng et al., 1997b). Die Verlängerung von Telomeren verhindert, daß GC-B-Zellen aufgrund ihrer dramatischen Zellproliferationsraten seneszent und apoptotisch werden und darüber hinaus verlängerte Telomere an ausdifferenzierte post-GC-B-Zellen weitergeben, wie an klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen gezeigt werden konnte (Hodes et al., 2002; Martens et al., 2002).

1.4 T-Zell-unabhängige Immunantworten

Im Gegensatz zu T-Zell-abhängigen (engl. T cell dependent, TD) Immunantworten, die zur Ausbildung von GC-Reaktionen führen, können B-Zellen auch in T-Zell-unabhängigen (engl. T cell independent, TI) Immunantworten aktiviert werden und zu PC ausdifferenzieren (Murphy et al., 2009). Bei TI-Immunantworten unterscheidet man zwei Typen: Typ1 (TI-1) wird durch Antigene ausgelöst, die PRR auf B-Zellen stimulieren (z.B. *Toll-like receptors*). Große Mengen von TI-1-Antigenen führen dazu, daß viele B-Zellen gleichzeitig stimuliert und aktiviert werden. Eine solche Immunantwort bedarf keiner Unterstützung durch T-Zellen oder T-Zell-sezernierter Faktoren und verläuft polyklonal. Aus diesem Grund bezeichnet man TI-1-Antigene auch als Mitogene für B-Zellen, da sie ungeachtet deren BCR-vermittelten Spezifität Proliferation und Differenzierung auslösen können (Murphy et al., 2009). Die Grenze von angeborener zu adaptiver Immunität beginnt hier zu verschwimmen, da mit einer polyklonalen Reaktivität der Lymphozyten keine Spezifität (Selektion) mehr gegeben zu sein scheint. Hier muß allerdings in Betracht gezogen werden, daß auch PRR unter Umständen nur auf bestimmten Populationen, z.B. ausschließlich Gedächtnis-B-Lymphozyten, ausgeprägt sind und daher selektiv sein können für einzelne B-Lymphozyten-Subpopulationen (Bernasconi et al., 2003; Bernasconi et al., 2002). Deutlicher wird ihre Rolle in adaptiver Immunität, wenn nur eine geringe Konzentration von TI-1-Antigenen vorliegt. Dann werden ausschließlich diejenigen B-Zellen aktiviert, die neben der Stimulation durch PRR auch noch (durch ein Epitop des TI-1-Antigens) BCR-Kreuzvernetzung erfahren. Solche TI-1-Immunantworten verlaufen mono- bis oligoklonal (Murphy et al., 2009).

Immunantworten gegen T-Zell-unabhängige Antigene vom Typ 2 (TI-2) sind ebenfalls nicht auf eine Kostimulation von T-Zellen angewiesen. Sie zeichnen sich allgemein durch eine repetitive Struktur aus, das heißt sie sind alleine durch ihren dreidimensionalen Aufbau in der Lage, ein so hohes Maß an Kreuzvernetzung von

BCR hervorzurufen, daß das resultierende Signal keiner Kostimulation z.B. durch Mitogene (Han et al., 2007) bedarf, um aktivierend auf die B-Zelle zu wirken. Dennoch konnte gezeigt werden, daß zusätzliche Faktoren, wie zum Beispiel *B cell activating factor* (BAFF)–Signalweitergabe, zu einer deutlich effizienteren TI-2-Immunantwort führen (Mond et al., 1995; Murphy et al., 2009). TI-2-Antigene sind z.B. die repetitiven Oberflächen (Peptidoglykan-Schichten) von kokkalen Bakterien oder isolierte Polysaccharide (Mond et al., 1995), jedoch können auch klassische TD-Antigene eine TI-2-Immunantwort hervorrufen (El Shikh et al., 2009). Immunreaktionen gegen TI-2-Antigene sind auf eine Spezifität des BCR angewiesen und sind daher adaptive Immunantworten.

Neben Spezifität ist auch Gedächtnis ein determinierender Faktor für adaptive Immunität (Zinkernagel, 2000; Zinkernagel und Hengartner, 2004). Es konnte gezeigt werden, daß Mäuse, die mit TI-Antigenen immunisiert wurden, bzw. keine GC-Reaktionen aufbauen können, bei Reimmunisierung eine verbesserte, sekundäre Immunreaktion aufwiesen (Alugupalli et al., 2004; Toyama et al., 2002). Die beteiligten B-Lymphozyten sind jedoch nur wenig bzw. unmutiert und nicht langlebig (Toellner et al., 2002; Toyama et al., 2002) wie es bei klassischen Gedächtnis-B-Lymphozyten der Fall ist (siehe 1.5).

In Mäusen und Menschen sind die Marginalzonen (engl. marginal zone, MGZ) der Milz wichtige histologische Strukturen für die Vermittlung von Immunität gegen TI-Antigene (Carsetti et al., 2004; Pillai et al., 2005; Weill et al., 2009) und auch zirkulierende TD-Antigene (Song und Cerny, 2003). MGZ-ähnliche Strukturen existieren auch in Tonsillen und anderen sekundären lymphatischen Geweben (Dono et al., 2000; Steiniger et al., 2005). MGZ bestehen hauptsächlich aus IgM⁺ B-Zellen sowie aus spezialisierten Stromazellen und Makrophagen (Mebius und Kraal, 2005; Pillai et al., 2005). Sie umschließen die weiße Pulpa (T-Zell-Zone und B-Zell-Follikel), werden kontinuierlich von Blut durchspült und dienen als wichtige Filter für Pathogene aus dem Blut. Der Verlust der Milz korreliert im Menschen mit einer erhöhten Infektiosität gegen *Pneumokokken*, deren Bakterienwände starke TI-2-Immunantworten hervorrufen können (Davidson und Wall, 2001; Kruetzmann et al., 2003). Aus diesem Grund sind MGZ-B-Zellen des Menschen, die aufgrund ihrer somatisch mutierten V-Gene als TD-generiert betrachtet wurden (Dunn-Walters et al., 1995), als natürliche B-Lymphozyten (Kruetzmann et al., 2003) für angeborene Immunität vorgeschlagen worden (siehe 1.6).

1.5 Das immunologische Gedächtnis

Das immunologische Gedächtnis des Menschen besteht aus einer humoralen und einer zellulären Gedächtnisfunktion. Das humorale Gedächtnis bezeichnet affinitätsgereifte Antikörper im Serum, die durch langlebige Plasmazellen in spezialisierten Nischen des Knochenmarks über lange Zeiträume hinweg sezerniert (Höfer et al., 2006; Manz et al., 2002), oder durch polyklonale Stimulation von Gedächtnis-B-Lymphozyten ausgeschüttet werden (Bernasconi et al., 2003; Bernasconi et al., 2002).

Das zelluläre Gedächtnis wird vermittelt durch spezialisierte T- und B-Lymphozyten. Diese Gedächtnis-Lymphozyten entstehen in primären Immunantworten und erlauben eine schnellere und verbesserte (sekundäre) Immunantwort bei Reaktivierung durch Infektion mit gleichem Pathogen. Gedächtnis-B-Zellen sind ruhende B-Lymphozyten, die in Blut und Lymphe zwischen den sekundären lymphatischen Organen migrieren. Sie vermitteln – im Gegensatz zu naiven B-Zellen – schnelle und wirksame Immunantworten bei Aktivierung durch Antigen. Dabei sind sie nicht auf T-Zell-Unterstützung angewiesen (Hebeis et al., 2004). Nach klassischer Definition sind diese Zellen post-GC-B-Zellen mit klassengewechselten B-Zell-Rezeptoren und somatisch mutierten V-Genen als Anzeichen einer Affinitätsreifung in GC-Reaktionen (Rajewsky, 1996). Allerdings konnte gezeigt werden, daß auch IgM-Transkripte somatisch mutiert sein können (Klein et al., 1994; Pascual et al., 1994; van Es et al., 1992). In weiterführenden Arbeiten konnte gezeigt werden, daß diese mutierten Ig-Transkripte auf mindestens zwei B-Zell-Populationen, IgM-only ($\text{IgM}^+\text{IgD}^-\text{CD27}^+$) und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen zurückzuführen sind (Klein et al., 1997; Klein et al., 1998b). Der Mutationsgehalt dieser mutierten IgM^+ B-Zell-Populationen beträgt etwa 50% des Mutationsgehaltes der klassengewechselten B-Zellen (Klein et al., 1997; Klein et al., 1998b). Darüber hinaus exprimieren diese Zellen gemeinsam mit klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen CD27 als Oberflächenmarker (Agematsu et al., 1997; Klein et al., 1998b). Dieser Tumornekrosefaktor-Rezeptor ist wichtig für eine Interaktion mit und Stimulierung durch T-Zellen (Agematsu et al., 1995). Mit diesen beiden IgM -only und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zell-Populationen eingeschlossen war die Fraktion humaner Gedächtnis-B-Zellen beinahe doppelt so groß wie bisher angenommen. Der Anteil der $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen beträgt ca. 25% der B-Zellen in PB (Klein et al., 1998b) und damit annähernd auch in anderen Geweben (Blum und Pabst, 2007). An dieser Stelle sollte ebenfalls erwähnt werden, daß als weitere Möglichkeit zur Identifizierung

von humanen Gedächtnis-B-Zellen die Färbung mit Rhodamin 123 besteht, das von naiven B-Zellen mittels eines *multidrug resistance protein* (ABCB1) aus der Zelle gepumpt wird (Wirhth und Lanzavecchia, 2005). Mit diesem Farbstoff konnte nicht nur gezeigt werden, daß ein Teil der IgG⁺ und möglicherweise auch IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen im humanen PB CD27⁻ ist (Fecteau et al., 2006; Weston-Bell et al., 2009), sondern auch, daß Gedächtnis-B-Zellen häufiger *in vivo* spontan proliferieren als naive B-Zellen (Wirhth und Lanzavecchia, 2005).

Viele weitere Eigenschaften von Gedächtnis-B-Zellen waren sowohl in klassengewechselten als auch in mutierten IgM⁺ B-Zellen nachweisbar. So konnte zum Beispiel in Übereinstimmung zu einer Generierung dieser Zellen in Immunantworten gezeigt werden, daß humane CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen in Nabelschnurblut nur in geringer Frequenz auftreten, mit dem Alter jedoch akkumulieren (Agematsu et al., 1997; Zandvoort et al., 2001). Eine Studie von B-Zellen in Patienten, die mit Ausbruch der Krankheit Peroxisomale Nokturnale Hämoglobinurie bestimmte Oberflächenmoleküle auf neu gebildeten Lymphozyten nicht mehr ausprägen, zeigte, daß hauptsächlich CD27⁺ B-Zellen das Molekül (weiter) ausprägen, demzufolge langlebiger als naive B-Zellen sind (Richards et al., 2000). Ebenso wurde nachgewiesen, daß die für Gedächtnis-B-Zellen wesentliche Bereitschaft zu einer sekundären Immunantwort in den drei CD27⁺ B-Zellen in ähnlichem Maße ausgeprägt ist (Agematsu et al., 1997; Bernasconi et al., 2003; Bernasconi et al., 2002; Shi et al., 2003). Diese Neigung zur PC-Differenzierung konnte ebenfalls durch Stimulierung mit T-Zell-Faktoren *in vitro* rekonstruiert und ausgelöst werden (Good et al., 2006; Good und Tangye, 2007; Tangye et al., 2003a; Tangye et al., 2003b).

Diese gemeinsamen Eigenschaften von IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen waren die Grundlage für ein Szenario, in dem diese drei B-Zell-Populationen in GC-Reaktionen, abhängig von TD-Antigenen gebildet werden. Die niedrigere Mutationsfrequenz von durchschnittlich 2-4% in mutierten IgM⁺ B-Zellen, verglichen mit 3-6% in klassengewechselten B-Zellen wurde als Hinweis interpretiert, daß IgM⁺CD27⁺ B-Zellen frühe Abkömmlinge einer GC-Reaktion darstellen. Solche Lymphozyten würden weniger Zyklen aus Mutation und Selektion durchlaufen haben und hätten das GC vor Einsetzen einer Klassenwechsel-Rekombination verlassen (Klein et al., 1998b; Tangye und Good, 2007).

Ein anderes Szenario zur Entstehung von mutierten IgM⁺ B-Zellen basiert auf der Korrelation von Splenektomie/Asplenie und dem Verlust der mutierten IgM⁺, jedoch nicht der klassengewechselten B-Zellen (Kruetzmann et al., 2003). Auch wenn einige andere Studien eine solche spezifische Korrelation nicht bestätigen konnten (Martinez-Gamboa et al., 2009; Wasserstrom et al., 2008; Weller et al., 2004), wurde dennoch die erhöhte Infektionsgefahr mit kokkalen Bakterien in Patienten ohne Milz und mit niedrigen IgM⁺CD27⁺ B-Zell-Frequenzen als Hinweis darauf interpretiert, daß diese Lymphozytenpopulation in TI-Immunreaktionen (wahrscheinlich in der Milz) entstehen. In diesem Sinne würden IgM⁺IgD⁺CD27⁺ (und IgM-only) B-Zellen ähnlich den B1-B-Zellen der Maus eine Art natürliche Effektor-Zell-Population darstellen, die ausschließlich an TI-Immunantworten teilnehmen (Kruetzmann et al., 2003).

Ein drittes Szenario rückt mutierte IgM⁺ B-Zellen mehr in den Fokus naiver B-Zellen, denn die niedrigeren Mutationsfrequenzen werden als Beitrag zur primären Diversifizierung des BCR-Repertoires interpretiert, unabhängig von Antigenkontakt (Weill et al., 2009). Ein solcher primärer Diversifizierungsmechanismus existiert in anderen Säugetieren wie Schafen und Rindern und auch in Vögeln (Weill et al., 2004). Unterstützt wurde diese Hypothese maßgeblich durch die Entdeckung, daß in Föten und in Nabelschnurblut, d.h. weitgehend abgeschottet von gewöhnlichen Infektionen, bereits eine geringe Frequenz von mutierten IgM⁺ B-Zellen aufzufinden ist (Scheeren et al., 2008; Weller et al., 2001). Ebenso ist die Präsenz solcher mutierter IgM⁺, jedoch nicht klassengewechselter B-Zellen in Typ 1 HIGM-Patienten ein Hinweis darauf, daß IgM⁺CD27⁺ B-Zellen unabhängig von TD-Immunantworten gebildet werden (Scheeren et al., 2008; Weller et al., 2004; Weller et al., 2001).

Eine Analyse der Genexpressionsprofile von naiven, GC- und CD27⁺ B-Zellen suggerierte, daß der Unterschied zueinander auf transkriptioneller Ebene sehr gering ist (Klein et al., 2003). Verglichen mit GC-B-Zellen, die sich sowohl von naiven als auch CD27⁺ B-Zellen deutlich absetzten, waren nur ca. 60 Gene signifikant differentiell exprimiert zwischen CD27⁻ und CD27⁺ B-Zellen (Klein et al., 2003). In einer weiteren Analyse erbrachte ein Vergleich von humanen naiven, IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen aus Milz und PB, daß eine besondere (und gemeinsame) Gensignatur für mutierte IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und MGZ-B-Zellen der Milz existiert, jedoch waren in dieser Analyse ebenfalls nur etwa 50 Gene als signifikant differentiell exprimiert angegeben (Weller et al., 2004). Für sich genommen sind diese Ergebnisse zwar interessant, jedoch erlauben sie keine umfassende

Charakterisierung der einzelnen Populationen und daher auch keine Beurteilung eines Verwandtschaftsgrades oder einer potentiellen Generierung. Das kann dadurch bedingt sein, daß die Auflösung der angewandten Technik zu gering ist um feine Unterschiede zu erfassen, oder weil die einzelnen Populationen (naive, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselte B-Zellen) nicht voneinander getrennt analysiert wurden.

1.6 IgD-only B-Zellen

Es existiert eine weitere, sehr kleine (0,5-2% der Gesamt-B-Zellen) und besondere Population von IgD-only (IgD⁺IgM⁻) Gedächtnis-B-Zellen im PB des Menschen. Hinweise auf eine solche Population in gesunden Erwachsenen wurden ursprünglich in B-Zell-Erkrankungen gefunden: in Multiplen Myelomen und in Haarzell-Leukämien waren 2% bzw. 10% der untersuchten Fälle IgD⁺ ohne IgM-Expression (Fibbe und Jansen, 1984; Fine et al., 1974; Kluin et al., 1995; Rowe und Fahey, 1965; Vaandrager et al., 1998). Wenig später wurde eine Population von IgD-only GC-B-Zellen beschrieben, die eine enorm hohe Mutationsfrequenz der V_H-Gene aufwies, höher als alle bisher beschriebenen Mutationsfrequenzen in B-Zellen (Liu et al., 1996). Diese GC-B-Zellen waren nur in einigen wenigen GC zu detektieren, in denen sie jedoch die Mehrzahl der GC-Mitglieder darstellten (Liu et al., 1996). Als weitere Besonderheiten konnte erstens die Deletion des C_μ-Gensegmentes aufgrund eines ungewöhnlichen Klassenwechsels von *switch-μ* nach einer (*switch*-ähnlichen) Pentamer-reichen σ/δ -Region 5' von C_δ nachgewiesen werden, und darüber hinaus eine präferentielle Nutzung von V_λ in fast 90% der Zellen. Dies steht im Gegensatz zu einer V_λ-Frequenz von ca. 40% in naiven B-Zellen (Arpin et al., 1998). IgD-only GC-B-Zellen können zu post-GC-B-Zellen ausdifferenzieren, da sowohl IgD-sezernierende Plasmazellen (Arpin et al., 1998; Brandtzaeg et al., 1978; Ferrarini et al., 1976; Surjan et al., 1978) als auch IgD-only Gedächtnis-B-Zellen (Chen et al., 2009; Goossens et al., 2001; Klein et al., 1998c) übereinstimmend mit den oben beschriebenen Besonderheiten in der Tonsille und im Blut des Menschen nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise wurden in zwei Studien ebenfalls Hinweise auf einen hohen Grad an klonaler Verwandtschaft in diesen Zellen beschrieben (Goossens et al., 2001; Liu et al., 1996). Abgesehen davon, daß IgD-only B-Zellen vermutlich die einzige Quelle für sezerniertes IgD darstellen (aufgrund der Tatsache, daß Serum-IgD ebenfalls fast nur V_λ nutzt) und in einer Studie gezeigt werden konnte, daß IgD-only B-Zellen im Menschen eine Funktion in der Aktivierung

von basophilen Granulozyten ausüben können (Chen et al., 2009), ist die Funktion einer solchen Population, bzw. die Immunreaktionen in denen sie gebildet wird, weitgehend unbekannt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Laut gegenwärtigem Stand der Wissenschaft sind Herkunft und spezifische Funktionen von ca. einem Viertel der B-Zellen des Menschen unbekannt. Dies schließt nicht nur die in ihrer Herkunft umstrittenen IgM⁺ B-Zellen mit somatisch mutierten V-Genen ein, sondern darüber hinaus eine kleine, ungewöhnliche Population von IgD-only B-Zellen. Abgesehen von einem grundlegenden Interesse, die Herkunft und Funktion aller humanen B-Zellen aufzuklären, hat dies eine Vielzahl von klinischen Implikationen, da mutierte IgM⁺ und auch IgD-only B-Lymphozyten in besonderen Infektionserkrankungen, Immundefizienzen und Neoplasien involviert sind (Küppers et al., 1999; Preud'homme et al., 2000).

In der vorliegenden Dissertationsschrift sollen drei verschiedene Ansätze klärend zu den oben genannten Fragestellungen beitragen. Erstens soll eine V-Gen-Analyse von einzelnen sortierten IgD-only B-Zellen durchgeführt werden. Dies erlaubt eine genauere Aufschlüsselung der klonalen Zusammensetzung und des V-Gen-Repertoires dieser Lymphozyten als sie bisher erfolgt ist. Darüber hinaus können Hinweise auf besondere Funktionen oder Selektionsmechanismen für die Entstehung dieser B-Lymphozyten entschlüsselt werden.

Zweitens sollen molekulare Spuren von GC-Reaktionen in B-Zell-Populationen von humanem PB analysiert werden. Wenn IgM⁺CD27⁺ B-Zellen in TD-Immunantworten generiert werden und somit post-GC-Gedächtnis-B-Zellen sind, müssen solche Spuren einer GC-Reaktion in diesen Zellen nachweisbar sein. Ein weiteres wichtiges Argument dafür wäre der Nachweis von klonal verwandten IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselte B-Zellen aus humanem PB.

Drittens soll mittels einer sensitiven Technik Genexpressionsprofile von naiven, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen erstellt werden. Mit einer umfassenden Transkriptionsanalyse soll ein Verwandtschaftsgrad dieser B-Lymphozyten-Populationen bestimmt werden. Darüber hinaus sollen spezifische Muster in der Genexpression von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen aufgedeckt werden, die Hinweise auf eine mögliche Funktion dieser Lymphozyten liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung von humanen B-Zell-Populationen

Die Isolierung humaner B-Zellen erfolgt aus Vollblutspenden oder Leukozytenfilmen (sedimentierte Leukozyten aus einer Vollblutspende, engl. buffy-coat). Die Entnahme von Vollblut geschieht unter Einwilligung der lokalen Ethikkommission und nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Spender.

Mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Amersham, Freiburg, Deutschland) für 30 Min. bei 400 g werden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) angereichert. Zur Aufreinigung von B-Zellen wird der Pan-B-Zell-Marker CD19 für magnetische Zellseparation (engl. magnetic associated cell sorting, MACS) genutzt. Hierzu werden die PBMC in Puffer (PBS/BSA 0,5%) resuspendiert, 15 Min. mit 1/10 Volumen anti-CD19-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) inkubiert, mit 10-fachem Volumen Puffer gewaschen (Zentrifugation, 5 Min., 250 g) und die B-Zellen über eine LS-MACS-Säule (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben angereichert. Die B-Zell-Suspension wird mit anti-CD27-APC (eBiosciences, San Diego, USA), anti-IgD-PE und anti-IgM-FITC oder anti-IgG-FITC Antikörpern (alle Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) für 15 Min. inkubiert und mit 2 ml PBS/BSA 0,5% gewaschen. Daraus werden die einzelnen B-Zell-Populationen mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (engl. fluorescence activated cell sorting, FACS) mit einem FACS-Diva-Zellsortierer (BD) aufgereinigt. Folgende B-Zell-Populationen werden sortiert: naive ($\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^-$), klassengewechselte ($\text{IgG}^+/\text{IgA}^+\text{CD27}^+$), IgM-only ($\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{low/-}}\text{CD27}^+$) und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen.

Für die Analyse von IgD-only B-Zellen wird zusätzlich $\text{Ig}\lambda$ mit anti- $\text{Ig}\lambda$ -Biotin und Streptavidin-PerCP (beide BD) gefärbt. Vom jeweiligen Spender werden sowohl IgD-only- ($\text{IgD}^+\text{IgM}^-\text{Ig}\lambda^+\text{CD27}^+$) als auch klassengewechselte B-Zellen ($\text{IgG}^+\text{Ig}\lambda^+\text{CD27}^+$) als Einzelzellen sortiert. Die Reinheit der Sortierungen wird mittels Durchflußzytometrie (FACS-Canto Durchflußzytometer, BD) kontrolliert und beträgt >98%. Alle oben genannten Arbeitsschritte erfolgen auf Eis, alle Zentrifugierungen und die Zellsortierung geschehen unter Kühlung (4°C).

2.2 Isolierung von humanen IgD^+ und IgG^+ PC

Die Isolierung humaner PC erfolgt aus Biopsaten von Routine-Tonsillektomien. Zur Gewinnung von tonsillären mononukleären Zellen (engl. tonsillar mononuclear cells,

TMC) wird tonsilläres Gewebe mit einem Skalpell geschreddert und durch ein 100 μm Sieb (BD) gepresst. Gewebsreste werden durch Filtern mit engmaschigen Sieben entfernt. Nach einem Waschschrift mit 40 ml PBS/BSA 0,5% erfolgt eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Amersham). Die gewonnenen TMC werden in PBS/BSA 0,5% resuspendiert, für 15 Min. mit anti-CD38-APC (BD) inkubiert und mit 2 ml PBS/BSA 0,5% gewaschen (Zentrifugation, 5 Min., 250 g). Anschließend erfolgt eine intrazelluläre Färbung von IgD oder IgG (anti-IgD-PE, anti-IgG-PE, beide BD) mit Hilfe des Fix and Perm-kits (Caltag, Hamburg, Deutschland) nach Herstellerangaben. Sortiert werden IgD- (CD38⁺IgD⁺) und IgG-PC (CD38⁺IgG⁺) als Einzelzellen. Alle Arbeitsschritte erfolgen auf Eis bzw. bei 4°C.

2.3 Analyse von V_H- und V _{λ} -Genumlagerungen aus Einzelzellen

Zur molekularen Analyse von IgD-only B-Lymphozyten und IgD⁺ PC werden aus PB und Tonsille Einzelzellen sortiert und deren V-Genumlagerungen mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert und sequenziert. Hierzu werden V-Genfamilien-spezifische Oligonucleotide (engl. primer) kombiniert mit Primermischungen für die entsprechenden J-Gensegmente. In einer ersten PCR wird eine Kombination aus V_HL- und V _{λ} -Primern, komplementär zur Leitpeptidsequenz der V_H-Ig-Ketten bzw. der Gerüstregion I (engl. framework region I, FR1) der V _{λ} -Ig-Ketten, und 3'-J-Gensegment-Primern verwendet. In einer folgenden PCR werden die gleichen (Leitpeptid-) V-Gen-Primer mit einer zweiten Mischung aus J-Gensegment-Primern, komplementär zu Bereichen weiter 5' innerhalb der J-Segmente, verwendet. Die verwendeten V_HL- und V _{λ} -Primer erkennen die am häufigsten benutzten V-Genfamilien. Das Prinzip der eingerückten Primer in der zweiten PCR (engl. seminested PCR) verhindert weitgehend eine gleichzeitige Vervielfältigung von Nebenprodukten. Zur Sequenzanalyse werden die amplifizierten V_HD_HJ_H- und V _{λ} J _{λ} -Genumlagerungen aufgereinigt und mit den entsprechenden V_HL- und V _{λ} -Genfamilien-Primern sequenziert.

Für die V-Gen-PCR werden einzelne Zellen in 20 μl High-fidelity PCR-Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland) sortiert, mit 20 μl Mineralöl überschichtet (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und mit 1 μl Proteinase K (0,25 g/l PCR grade, Roche) versetzt. In der darauffolgenden zweistündigen Inkubation bei 55°C werden die Proteine der Zelle verdaut und die DNA freigelegt. Nach 10 Min. Inaktivierung der Proteinase K bei 99°C erfolgt eine Zugabe weiterer PCR-Komponenten (Puffer,

Wasser, MgCl-Konzentration, Primer-Mischung, siehe 2.4 V-Gen-PCR Protokolle, 1. Runde) sowie eine Zugabe von 0,3 µl High-fidelity-Polymerase (Roche) nach 5 Min. Denaturierung bei 95°C (engl. hotstart) (Fehlerrate der DNA-Polymerase: $8,3 \times 10^{-6}$ /bp/Zyklus, Roche). 1 µl der ersten PCR dient als Sequenzvorlage (engl. template) für die zweite, seminested, hotstart PCR (siehe 2.4 V-Gen-PCR Protokolle, 2. Runde). Diese zweite PCR wird getrennt für die einzelnen V_HL und V_λ-Genfamilien angesetzt. Als Kontrolle für die Funktionalität der ersten PCR werden einzelsortierte Zellen von monoklonalen Zelllinien mit bekannter V-Genumlagerung amplifiziert, als Kontaminationskontrolle dienen Leerkontrollen, d.h. Reaktionsgefäße ohne sortierte Zelle. 25% der PCR-Reaktionen bestehen aus solchen Leerkontrollen, so daß eine ausreichende statistische Aussagekraft gewährleistet ist.

Amplifikate werden auf einem Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und per Qiaex-Gel-extraction-kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Im Anschluß erfolgt eine Direktsequenzierung mittels BigDye Deoxy sequencing kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und automatischem Sequenzierer (ABI3100, Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers. Sequenzen werden analysiert mit Hilfe der EMBL IMGT und GenBank Datenbanken und der DNASTAR Lasergene v6 software (Dnastar Inc., Madison, USA). Die statistische Signifikanz einer präferentiellen Nutzung von V_H3-30-Genumlagerungen in IgD-only Zellen, verglichen mit naiven oder klassengewechselten B-Zellen, wird mit Hilfe des exakten Fisher-Tests überprüft.

2.4 V-Gen-PCR Protokolle

Protokoll für die 1. Runde V-Gen-PCR

PCR-Ansatz	20,5 µl (Einzelzelle in 1x PCR-Puffer) 2,5 µl dNTP (2 mM) 3 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂ (Expand High Fidelity, Roche) 6 µl V _H L-, V _λ -, 3'J _H - und 3'J _λ -Primer (Mischung, 2,5 µM) 4 µl 25 mM MgCl ₂ (Expand High Fidelity, Roche) ad 49,7 µl H ₂ O
Polymerase	0,3 µl DNA-Polymerase (Expand High Fidelity, Roche)
PCR-Programm	95°C 5 Min., 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min., 35x (95°C 50 Sek., 63°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 15°C Pause
Primermischung	1. Runde: je 4 µl einer 250 µM Primerverdünnung von: V _H L1-5; V _λ 1-4; V _λ 6-9; 3'J _H 1,2,4,5; 3'J _H 3; 3'J _H 6 sowie 3'J _λ 1; 3'J _λ 2,3; 3'J _λ 6,7; versetzt mit 916 µl 10 mM Tris-Puffer (2,5 µM Endkonzentration).

Protokoll für die 2. Runde V-Gen-PCR

Die $MgCl_2$ -Konzentrationen beziehen sich auf die jeweiligen V_{HL} - bzw. V_{λ} -Primer (Bräuninger et al., 1999; Klein et al., 1995; Kupperts et al., 1993; Müschen et al., 2001):

$MgCl_2$ -Konzentration 1,5 mM (V_{HL1} , V_{HL5} , $V_{\lambda1-4}$ und $V_{\lambda6-9}$)
2 mM (V_{HL2-4})

PCR-Ansatz 3 μ l dNTP (2 mM)
 3 μ l 10x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$ (Fermentas,
 St. Leon-Rot, Deutschland)
 1,5 μ l eines V_{HL} - oder V_{λ} -Primers (2,5 μ M)
 1,5 μ l einer 5' J_H - oder 5' J_{λ} -Primermischung (2,5 μ M)
 1,8 μ l bzw. 2,4 μ l 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas)
 0,3 μ l DNA-Polymerase (Fermentas)
 ad 29 μ l H_2O

Polymerase 1 μ l Template (1. Runde PCR)

PCR-Programm 95°C 2 Min., 72°C 1 Min., 45x (95°C 50 Sek., 63°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 15°C Pause

V_{H3} -Primermischung 2. Runde:

je 2 μ l einer 250 μ M Primerverdünnung von: V_{HL3} und $V_{HL3.2}$ versetzt mit 96 μ l 10 mM Tris-Puffer.

$V_{\lambda3}$ -Primermischung 2. Runde:

je 2 μ l einer 250 μ M Primerverdünnung von: $V_{\lambda3A}$ und $V_{\lambda3B}$ versetzt mit 96 μ l 10 mM Tris-Puffer.

5' J_H -Primermischung 2. Runde:

je 2 μ l einer 250 μ M Primerverdünnung von: 5' $J_H1,4,5$; 5' J_H2 ; 5' J_H3 und 5' J_H6 versetzt mit 92 μ l 10 mM Tris-Puffer.

5' J_{λ} -Primermischung 2. Runde:

je 2 μ l einer 250 μ M Primerverdünnung von: 5' $J_{\lambda}1$; 5' $J_{\lambda}2,3,7$ und 5' $J_{\lambda}6$ versetzt mit 94 μ l 10 mM Tris-Puffer.

2.5 Kalkulation der Größe von IgD-only B-Zell- und IgD⁺ PC-Klonen

Der durchschnittliche Anteil von IgD-only B-Zellen an CD19⁺ B-Zellen liegt bei 0,2%. Bei einem geschätzten Volumen von 5 l Blut in einem Spender, 1×10^5 B-Lymphozyten pro ml Blut und unter der Annahme, daß die Zusammensetzung der in 50 ml Blutspende enthaltenen Zellen statistisch repräsentativ für das Gesamtblutbild ist, kann man extrapolieren, daß ein Klon mit 5 Mitgliedern unter 50 untersuchten IgD-only B-Zellen eine Gesamtgröße von $0,002 \times 5000 \times 10^5 \times 0,1 \approx 100.000$ Zellen im peripheren Blut aufweist.

Im Vergleich dazu: unter 1×10^9 TMC aus Patient D befinden sich ca. 1% PC (CD38^{high}). Etwa 5% dieser PC sind IgD⁺, womit sich für einen Klon mit 13

Mitgliedern unter 49 informativen Zellen eine Gesamtgröße von $10^9 \times 0,01 \times 0,05 \times 13/49 \approx 132.000$ Klonmitgliedern ergibt.

2.6 Analyse von Austauschmutationsmustern in V_{H3-30} -Genumlagerungen aus IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC

Jede Genumlagerung, die kein vorzeitiges Stop-Kodon oder eine Verschiebung des Leserasters aufweist, kann als funktional betrachtet werden. Alle diese potentiell funktionalen V_{H3-30} -Genumlagerungen aus IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC werden anhand ihres Leserasters gleichförmig angeordnet (engl. alignment). Ebenso wird solch ein Alignment aus potentiell funktionalen V_{H3-30} -Genumlagerungen von Nicht-IgD-only B-Zellen erstellt, d.h. IgG⁺ Zellen aus der vorliegenden Analyse und klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen aus Gen-Datenbanken (EMBL und Genbank). Alle V_{H3-30} -Genumlagerungen aus Datenbanken ohne eindeutige Herkunft oder mit ungeklärter Klonalität sind von der Analyse ausgeschlossen. In einem Vergleich beider Alignments (nicht gezeigt) werden alle Veränderungen in der Ladung oder Polarität von Aminosäuren der FR3 gezählt, die aufgrund von Austauschmutationen (engl. replacement mutation, R) aufgetreten sind. Identische Mutationen in klonal verwandten V_{H3-30} -Genumlagerungen zählen einfach, da sie unter Umständen auf ein einziges Mutationsereignis zurückzuführen sind. Mutationen ohne Einfluß auf Ladung oder Polarität treten in beiden Alignments in vergleichbarer Häufigkeit auf und werden vernachlässigt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden im Mutationsmuster der FR3 zwischen IgD-only B-Zellen/IgD⁺ PC und Nicht-IgD-only B-Zellen wird über den exakten Fisher-Test bestimmt.

2.7 Messung von Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen

In einer Kooperation mit dem Institut für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen und der Hämatologie des Universitätsklinikums Bern wird die durchschnittliche Telomerlänge in humanen naiven, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen bestimmt. Hierzu werden je $>5 \times 10^5$ Zellen der genannten Populationen in einer Reinheit von $> 99\%$ aus Buffycoats von 13 gesunden Individuen sortiert und in FCS/ DMSO 10% bei -80°C lebend eingefroren und von der Hämatologie Essen an die Hämatologie in Bern versendet. Dort wird mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Durchflußzytometrie (engl. fluorescence in situ hybridization and flow cytometry, flow-FISH) die Messung der

Telomerlänge vorgenommen wie zuvor beschrieben (Baerlocher et al., 2006). Kurz skizziert werden die Zellen für 15 Min. bei 87°C inkubiert und mit Formamid fixiert. Für FISH erfolgt eine Hybridisierung mit einer Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-gekoppelten (C₃TA₂)₃ Peptid-Nukleinsäuresonde. Tote Zellen werden von der Analyse ausgeschlossen durch Färbung mit LDS 751 DNA dye (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die Durchflußzytometrische Analyse geschieht mit einem FACS-Calibur (BD). Die statistische Auswertung erfolgt anschließend am Institut für Zellbiologie in Essen. Eine statistische Signifikanz der Unterschiede in den durchschnittlichen Telomerlängen von naiven, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen wird determiniert über paarweise Vergleiche nach der Tukey-Kramer-Methode (engl. Tukey's post-hoc test) basierend auf einer als signifikant unterschiedlich (p < 0,003) bestimmten Varianzanalyse (engl. analysis of variance, ANOVA). Die ANOVA wurde durchgeführt mit Hilfe des ezANOVA-Programms (University of South Carolina, Columbia, USA).

2.8 Analyse von Bcl6-Mutationen in humanen B-Zell-Populationen

Zur Mutationsanalyse des Haupt-Mutations-*cluster* (engl. major mutation cluster, MMC) des Bcl6 Genlokus in humanen B-Zell-Populationen werden einzelne naive, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselte B-Zellen in 20 µl Expand High Fidelity PCR-Puffer (Roche) sortiert und mit 0,25 g/l Proteinase K (Roche) für 2 h inkubiert. Nach 7 Min. Inaktivierung der Proteinase bei 95°C wird mit einer seminested PCR-Strategie der Bcl6-MMC mit einer Länge von 744 Basenpaaren (engl. base pair, bp) amplifiziert. Die PCR-Produkte werden mit dem EZNA Cycle pure kit (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) aufgereinigt und mit den Primern der zweiten PCR von beiden Seiten mittels ABI Cycle Sequencing Kit Version 3.1 (Applied Biosystems) und automatischem Sequenzierer (ABI3130, Applied Biosystems) sequenziert. Die Sequenzanalyse geschieht unter Zuhilfenahme des SeqScape Programmes Version 2.5 (Applied Biosystems) und der GenBank-Datenbank. Um festzustellen ob nur ein oder beide Allele aus einer Zelle amplifiziert werden, werden nur Donoren verwendet, die nachweislich heterozygot für einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (rs3832246) sind.

Protokoll für die 1. Runde Bcl6-MMC-PCR

PCR-Ansatz	20,5 µl (Einzelzelle in 1x PCR-Puffer)
	1 µl dNTP (2 mM)

2 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Expand High Fidelity, Roche)
 2 µl Bcl6_1st_fwd (2,5 µM)
 2 µl Bcl6_1st_rev (2,5 µM)
 4 µl 25 mM MgCl₂ (Expand High Fidelity, Roche)
 ad 39,7 µl H₂O

Polymerase (hotstart) 0,3 µl DNA-Polymerase (Expand High Fidelity, Roche)

PCR-Programm 95°C 3 Min., 80°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min., 35x (95°C 30 Sek., 59°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 15°C Pause

Protokoll für die 2. Bcl6-MMC-PCR

PCR-Ansatz 1 µl dNTP (2 mM)
 3 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Expand High Fidelity, Roche)
 1,5 µl Bcl6_2nd_fwd (2,5 µM)
 1,5 µl Bcl6_2nd_rev (2,5 µM)
 2,1 µl 25 mM MgCl₂ (Expand High Fidelity, Roche)
 0,3 µl DNA-Polymerase (Expand High Fidelity, Roche)
 ad 28,5 µl H₂O

Template 1,5 µl Bcl6 MMC PCR 1. Runde

PCR-Programm 95°C 4 Min., 72°C 1 Min., 40x (95°C 30 Sek., 56°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 15°C Pause

2.9 Detektierung von klonal verwandten B-Zellen aus PB

Ein wichtiger Beweis dafür, daß zumindest ein Teil der mutierten IgM⁺ B-Lymphozyten eine GC-Reaktion durchlaufen hat, ist der Nachweis einer klonalen Verwandtschaft solcher Zellen mit klassischen, IgG⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen. Hierzu werden zwei verschiedene Techniken angewandt. In beiden Methoden dient die Einzigartigkeit der CDRIII dazu, V_HD_HJ_H-Genumlagerungen von Geschwister-B-Zellen zu isolieren.

2.9.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und CDRIII-Spektren-Typisierung

Aliquots von je 30.000 IgG⁺CD27⁺ und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen werden sortiert und die RNA mit RNeasy mini kit (Qiagen) über eine Säule aufgereinigt. Es erfolgt eine reverse Transkription (RT) mit Superscript-III-RT (Invitrogen). Die verwendeten Primer für die RT von IgG⁺ B-Zellen binden an die konstanten Bereiche von IgG1 (C_γ1) und IgG3 (C_γ3), die für IgM⁺CD27⁺ B-Zellen an IgD (C_δ) oder IgM (C_μ). Die Distanz zum 3'-Ende des umgelagerten J_H Gens ist für diese drei Primer identisch. Mit Hilfe eines V_H1-Familien-spezifischen und eines V_H6-Primers wird cDNA nach folgendem Protokoll amplifiziert:

Protokoll für die V_H1-/ V_H6-PCR zur CDRIII-Spektren-Typisierung

PCR-Ansatz 3 µl dNTP (2,5 mM)
 3 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Expand High Fidelity, Roche)
 1,5 µl VH1_FR2_fwd oder VH6_FR2_fwd (2,5 µM)
 1,5 µl C_γ1/C_γ3_exon1 (2,5 µM) oder C_μ/C_δ-Mischung (2,5 µM)
 1,8 µl 25 mM MgCl₂ (Expand High Fidelity, Roche)
 ad 22,7 µl H₂O

Template 7 µl cDNA (C_γ oder C_μ und C_δ)
 Polymerase (hotstart) 0,3 µl DNA-Polymerase (Expand High Fidelity, Roche)

PCR-Programm 95°C 2 Min., 80°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min., 35x (95°C 30 Sek., 46°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 15°C Pause

C_μ/C_δ-Mischung (2,5 µM):

je 2 µl einer 250 µM Primerverdünnung von C_μ_exon1_1st_rev und C_δ_exon1_1st_rev, versetzt mit 96 µl 10 mM Tris-Puffer.

Die PCR-Produkte werden Ethanol-präzipitiert (Zugabe von Ethanol auf 70% Endkonzentration, Zentrifugation für 30 Min. bei 10.000 g) und das entstandene Pellet in 10 µl Formamid gelöst. Nach einer Denaturierung der DNA bei 95°C für 2 Min. werden die Proben nebeneinander auf ein denaturierendes PAGE-Gel aufgetragen.

6% PAGE Gel:	9 ml	(19:1 Acrylamid: Bisacrylamid)
	25,2 ml	Harnstoff (7 M)
	12 ml	5xTBE-Puffer
	60 µl	Temed
	180 µl	APS
	ad 60 ml	dd H ₂ O

5xTBE-Puffer:	27,5 g	Borsäure
	54 g	Tris-HCl
	20 ml	0,5 M EDTA pH8
	ad 1l	ddH ₂ O

Das Gel wird für 12 h unter Spannung gesetzt (1340 V, 13 mA) und anschließend mit dem Silver sequence DNA staining kit (Promega, Mannheim, Germany) nach Angaben des Herstellers gefärbt. PCR-Produkte gleicher Größe aus korrespondierenden IgM⁺CD27⁺ und IgG⁺ Proben werden ausgeschnitten und über Nacht in 50 µl H₂O gewässert. Restlicher Harnstoff wird mittels einer weiteren Ethanol-Fällung entfernt. Das Pellet wird wiederum in 50 µl H₂O gelöst und 5 µl davon in weiteren 35 PCR-Zyklen (Bedingungen siehe oben) amplifiziert. Die PCR-

Produkte werden über eine DNA-Säule (EZNA Cycle pure kit, VWR) aufgereinigt und sequenziert. Monoklonale Produkte mit identischer CDRIII in beiden Populationen werden mit dem pGEM T-easy cloning kit (Promega) kloniert und wiederum sequenziert, um verschiedene Mitglieder eines Klons nachweisen zu können (siehe Flußdiagramm Anhang A1).

2.9.2 PCR mit CDRIII-spezifischen Primern

Aus Aliquots von bis zu 1.5×10^6 $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen wird - wie unter 2.9.1 beschrieben - RNA extrahiert und revers transkribiert. Um den polyklonalen Hintergrund der nicht klonal verwandten Gedächtnis-B-Zellen zu reduzieren, werden gezielt nur Genumlagerungen der 1-Gen-Familie V_{H6} und des einzelnen V-Gens V_{H3-23} vervielfältigt. Im Falle des V_{H3-23} -Gens wird ein Primer eingesetzt, der für die Leitpeptidregion von V_{H3-23} spezifisch ist. Um potentielle Kontaminationen mit DNA aus IgG^+ B-Zellen von der Amplifikation auszuschließen, werden auf Seite der $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ cDNA nested Primer für C_{μ} und C_{δ} eingesetzt. Aus den 2 Donoren für die V_{H3-23} -Klone werden zusätzlich naive B-Zellen isoliert und auf Klonmitglieder untersucht. Die cDNA wird nach folgendem Protokoll amplifiziert:

V_{H6} - und V_{H3} -PCR für die Gewinnung CDRIII-spezifischer Primer

PCR-Ansatz	3 μl dNTP (2,5 mM) 3 μl 10x PCR-Puffer ohne MgCl_2 (Expand High Fidelity, Roche) 1,5 μl $V_{H6_FR1_fwd}$ (2,5 μM) oder V_{H3-23} -Leader (2,5 μM) 1,5 μl $C_{\gamma 1}/C_{\gamma 3_exon1}$ (2,5 μM) oder C_{μ}/C_{δ} -Nested-Mischung (2,5 μM) 2,4 μl 25 mM MgCl_2 (Expand High Fidelity, Roche) ad 22,7 μl H_2O
Template	7 μl cDNA ($C_{\gamma 1+3}$ oder C_{μ} und C_{δ})
Polymerase (hotstart)	0,3 μl DNA-Polymerase (Expand High Fidelity, Roche)
PCR-Programm	95°C 2 Min., 80°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min., 35x (95°C 30 Sek., 62°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 15°C Pause

C_{μ}/C_{δ} -Nested-Mischung (2,5 μM):

je 2 μl einer 250 μM Primerverdünnung von $C_{\mu_exon1_2nd_rev}$ und $C_{\delta_exon1_2nd_rev}$, versetzt mit 96 μl 10 mM Tris-Puffer.

Im Anschluß an die PCR wird die amplifizierte cDNA der IgG^+ B-Zellen mittels pGEM-T-Easy cloning kit (Promega) kloniert. Zwischen 8 und 30 Sequenzen pro Donor werden generiert und komplementär zu den jeweiligen CDRIII-Regionen werden Primer erstellt. Für jeden einzelnen dieser Primer wird eine PCR-Bedingung

bestimmt, die die Amplifikation der Originalsequenz aus Verdünnungen ($< 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) der korrespondierenden Plasmid-Präparationen in nicht mehr als 35 Zyklen erlaubt. Die PCR-Bedingungen sind weitgehend identisch (siehe oben), einzig wird statt C-spezifischen Primern der jeweilige CDRIII-spezifische Primer eingesetzt. Die Magnesiumionen-Konzentrationen variieren zwischen 1,5 und 2 mM Endkonzentration, die Annealingtemperaturen zwischen 62 und 63°C. Diese PCR-Bedingungen werden genutzt, um klonal verwandte Genumlagerungen aus cDNA von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und naiven B Zellen zu vervielfältigen und im Erfolgsfall zusätzliche Klonmitglieder aus IgG^+ cDNA zu isolieren. Für jeden Klon werden zwischen 30 und 120 Plasmide erstellt und sequenziert (siehe Flußdiagramm Anhang A2). Für einige $\text{V}_\text{H}6$ -Klone mit Mitgliedern in sowohl IgG^+ als auch $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen konnte mit Hilfe von zusätzlichen Primern für die 5'-Region der CDRIII ebenfalls der konstante Teil von IgM und/oder IgD aus cDNA von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen amplifiziert werden (nicht gezeigt). Die PCR-Bedingungen hierfür entsprechen den oben genannten, einzig werden statt den V_H -Primern die 5'-CDRIII-Primer verwendet (nicht gezeigt).

2.10 Kalkulation der Größe von Gedächtnis-B-Zell-Klonen im PB

Unter den Annahmen, daß erstens mit der CDRIII-Primer-basierenden Strategie alle Mitglieder eines Klones unter den sortierten Zellen gefunden werden und zweitens identische Sequenzen von derselben Zelle stammen, kann die Mindestgröße eines Klons im PB nach folgendem Beispiel geschätzt werden: Der größte Klon (Abb. 4, Klon N) mit 37 Mitgliedern in 3×10^6 sortierten CD27^+ B-Zellen aus 1×10^9 Gesamt-B-Zellen (1×10^8 B-Zellen in 500 ml PB, geschätztes PB-Gesamtvolumen 5 l) und einem Gedächtnis-B-Zell-Anteil von 29% hätte in 5 l PB eine Mitgliederzahl von $37 \times 1 \times 10^9 \times 0.29 : 3 \times 10^6 \approx 3600$ B-Zellen.

2.11 Erstellung und Analyse von Mutationsbäumen

Mutationsbäume sind eine graphische Rekonstruktion von Zellteilungsabfolgen anhand von Mutationsmustern klonal verwandter Sequenzen. Sie repräsentieren die Phylogenese eines einzelnen Klones z.B. in einem GC. Sequenzen mit identischer CDRIII werden mit Clustal W (Megalign, DNASTar, Madison, Wisconsin, USA) in einem Alignment zusammengefasst. Da mögliche DNA-Polymerase-Fehler eine korrekte Rekonstruktion erschweren können, wird die Anzahl erwarteter Fehler pro

Sequenz kalkuliert als: ~ 200 bp Sequenz x 70 PCR-Zyklen x Polymerase-Fehlerrate ($8,3 \times 10^{-6}$ /bp/Zyklus) = 0,1 (bzw. 0,2 im Falle der V_H3-23 -Klone mit ~ 300 bp Sequenz). Diese 1 bis 2 nicht-SHM-generierten Mutationen unter 10 Sequenzen können vernachlässigt werden, da sie nur vereinzelt als Punktmutation und nicht mehrfach an gleicher Stelle in verschiedenen Sequenzen auftreten können. Alle Nukleotide, die nicht mit der Keimbahnsequenz des jeweiligen V-Gens übereinstimmen, werden als SHM-generiert angenommen. Die CDRIII ist von dieser Analyse ausgenommen. Alle Sequenzen eines Klones werden manuell genealogisch ausgerichtet, d.h. der Mutationsbaum wurzelt in der Keimbahnsequenz und eine aufsteigende Zahl von gemeinsamen Mutationen wird korreliert mit dem Alter der Zellteilungsgeneration. Jeder Mutationsbaum wird so angeordnet, daß ihm möglichst wenige Verzweigungen und Mutationsereignisse zugrunde liegen. Es existieren wenige Fälle ohne eindeutige Lösung für eine Kette von Mutationsereignissen (z.B. die Anzahl möglicher Rückmutationen wog die Anzahl gemeinsamer Mutationen auf, oder gemeinsame Mutationen können ebenfalls als unabhängige Ereignisse interpretiert werden). In diesen Fällen wird zu Gunsten einer höheren Anzahl gemeinsamer Mutationen entschieden. Die wesentliche Struktur des jeweiligen Mutationsbaumes wurde dadurch nicht verändert. Parallel dient das IgTree[®] Programm (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ramit Mehr, Bar-Ilan Universität, Ramat-Gan, Israel) als unabhängige Validierung für die phylogenetischen Analysen (Barak et al., 2008).

2.12 Erstellung von Genausprägungsprofilen von humanen B-Zell-Populationen

Die vergleichende Analyse von Genausprägungsprofilen (engl. gene expression profile) lässt sich dazu verwenden, den Grad einer Verwandtschaft oder Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Zelltypen einzuschätzen. Darüber hinaus bietet sie die Möglichkeit, von einer differentiellen Expression einzelner Gene oder Gengruppen auf spezielle Funktionen oder Eigenschaften von Zelltypen zurückzuschließen. Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen humaner B-Zell-Populationen werden aus 650 ml Vollblut von 5 gesunden Spendern quantitativ naive, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselte B-Zellen sortiert. Die Reinheit der Sortierungen beträgt dabei >98%. Die isolierten Zellen werden sedimentiert, in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert, mit 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt,

Deutschland) versetzt und gemischt bis eine milchige Lösung entsteht. Diese wird für 15 Min. bei 16.000 g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird abgenommen und das gleiche Volumen Ethanol (70%) zugegeben. Die RNA in dieser Mischung wird über eine Säule (RNeasy Mini kit, Qiagen) aufgereinigt. Alle Arbeitsschritte erfolgen auf Eis, alle Zentrifugierungen in einer Kühlzentrifuge (4°C). Die Qualität der RNA wird mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Böblingen, Deutschland) und dem Eukaryote Total RNA Nano Series II kit (Agilent) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Als Maß für die Qualität der RNA dient der RNA-Integritäts-Wert (engl. RNA integrity number, RIN), der Werte zwischen 0 (RNA vollständig degradiert) und 10 (keine Degradierung feststellbar) annehmen kann. Es werden ausschließlich RNAs mit einer RIN > 9,5 verwendet. Je 250 ng dieser RNAs werden mit Hilfe des Message Amp II biotin enhanced kit (Ambion (Applied Biosystems), Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Der hierzu verwendete Oligo-dT-Primer enthält 5' eine T7-Promotorsequenz. Für die Synthese des komplementären DNA-Stranges dienen Zufalls-Hexamer-Primer (engl. random hexamer primer). Die cDNA wird bis zu 14 h einer *in-vitro*-Transkription durch T7-RNA-Polymerase unterzogen, die Uridintriphosphate (UTP) für die amplifizierte RNA (aRNA) sind biotinyliert. Nach Aufreinigung der aRNA wird diese fragmentiert und auf Human-Genom-Arrays hybridisiert. Die verwendeten HG-U133Plus_2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) unterscheiden mit 54.675 Gensonden (engl. probe sets) mehr als 47.000 Transkripte von ca. 38.500 Genen. Die hybridisierten Arrays werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff quantitativ gefärbt und in einem Scanner 3000 (Affymetrix) eingelesen. Die Signalstärke mehrerer *probe sets* ist ein Maß für die Transkriptmenge eines einzelnen Gens. Zur Qualitätssicherung existieren Schwellenwerte, die von den einzelnen Arrays nicht über- /unterschritten werden dürfen. Diese sind eine minimale, durchschnittliche Signalintensität (Scaling Factor < 15), eine Mindestmenge an exprimierten Transkripten (*present calls* > 35%) und außerdem ein Maximum an Hintergrundsignalen (Noise < 5 und Background < 50). Die wichtigsten Schwellenwerte sind die 3'-5'-Signal-Rate. Je degradiert die Transkripte eines Gens sind, desto weniger Signal kann von einem *probe set* generiert werden, das weiter 5' mit der aRNA hybridisiert. D.h. je intakter die aRNA, desto höher das 5'-Signal und desto niedriger die 3'-5'-Rate. Diese Raten werden exemplarisch für definierte Transkripte (Actin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) etc.) bestimmt.

2.13 Analyse der Genexpressionsprofile humaner B-Zell-Populationen

Die Genexpressionsprofil-Daten von 20 Arrays müssen normalisiert werden, einerseits um Unterschiede in der Gesamtintensität einzelner Arrays auszugleichen (engl. *scaling*) vor allem jedoch um Hintergrundsignale von echten Signalen unterscheiden zu können. Der hierzu verwendete Algorithmus ist der GC-RMA (engl. GC content Robust Multiarray Averaging) –Algorithmus, er korrigiert und übersetzt Signalintensitäten in Signalwerte (Wu et al., 2004). Parallel dient der Affymetrix Microarray Suite 5 (MAS5)-Algorithmus dazu, jedem Signal eine Markierung (engl. *flag*) je nach Expression (*present call*) oder nicht-Expression (*absent call*) zuzuweisen. In die engeren Analysen gelangen auf diese Weise nur Gen-Sonden (*probe sets*), die laut MAS5 mindestens 2 *present calls* in einem B-Zell-Populationstyp (Kondition) aufweisen können. Die Signalwerte dieser 29.969 *probe sets* ($\approx 55\%$) beruhen dabei weiterhin auf GC-RMA-Normalisierung. Die 20 Arrays werden in vier Chargen (engl. *batch*) erstellt. Daraus resultierende Batch-Effekte (Unterschiede zwischen Chargen überwiegen scheinbar Unterschiede zwischen Populationen) werden mit Hilfe der ComBat-Software (Johnson et al., 2007) korrigiert. Alle Datenauswertungen erfolgen mit dem GeneSpring GX 7.3.1 Programm (Agilent) oder dem GSEA-Programm (Broad Institute, MIT, Cambridge, Massachusetts, USA).

2.13.1 Hierarchische Gliederung

Die hierarchische Gliederung ist eine statistische Analyse, in der einzelne Datensätze anhand ihrer Ähnlichkeiten untereinander zu Gruppen zusammengefasst werden. Der verwendete *cluster*-Algorithmus ist die Average-Linkage-Methode. Hierbei werden die zueinander ähnlichsten Datensätze/*cluster* jeweils zu einem nächsthöheren *cluster* zusammengefasst (agglomeratives Gruppieren), als Ähnlichkeitsmaß dient die Pearson-Korrelation. Ein *bootstrapping*-Verfahren aus 100 willkürlichen Austausch einzelner Komponenten der Datensätze unter Berechnung der Stabilität einzelner *cluster* (engl. *confidence level*, entspricht der Frequenz einer identischen Anordnung) dient als Test für die Richtigkeit solcher Ähnlichkeits-Bäume.

2.13.2 Prinzipielle-Komponenten-Analyse

Die Prinzipielle-Komponenten-Analyse (engl. *principal component analysis*, PCA) ist eine Methode, die Variation vieler Datensätze in wenigen Dimensionen darzustellen.

Die Varianz der Signalwerte eines *probe sets* lässt sich als Vektor darstellen, dessen Lage im Raum die Ähnlichkeit der Populationen reflektiert, d.h. die Variation ist maximal entlang seiner Ausrichtung. Ein Algorithmus fasst einen möglichst großen Teil solcher ähnlicher Vektoren zu einer einzigen Dimension (erste prinzipielle Komponente) zusammen. Die Fortführung solcher linearen Kombinationen (zweite, dritte prinzipielle Komponente usw.) von originalen Variablen erhält weitgehend die Variation der Daten und ermöglicht eine übersichtliche Betrachtungsweise vieler, großer Datensätze. Eine PCA kann sowohl beaufsichtigt oder unbeaufsichtigt (engl. supervised/ unsupervised) erfolgen, dazu werden entweder nur differentiell ausgeprägte Gene aus bestimmten Konditionen betrachtet oder eine willkürliche Genliste der PCA zugrunde gelegt.

2.13.3 Paarweise Vergleiche

Paarweise Vergleiche sind eine Methode, Gene (oder *probe sets*) nach ihrer differentiellen Ausprägung zwischen Datensätzen zweier Konditionen anzuordnen. Als statistische Evaluierung beim Vergleich von zwei Komponenten dient der T-Test (parametrisch, ungleiche Varianzen). Für das Problem des multiplen Testens werden die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) nach der Benjamini-Hochberg-Methode korrigiert (Benjamini und Hochberg, 1995), so daß der Anteil für irrtümlich als signifikant ausgeprägt beurteilte *probe sets* nicht mehr als 5% beträgt (engl. false discovery rate, FDR = 5%). Beim Vergleich von mehr als 2 Komponenten wird die Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey's post-hoc test und Benjamini-Hochberg-Adjustierung genutzt. Die Genlisten, die paarweisen Vergleichen zugrunde liegen, werden *unsupervised* zusammengestellt nach Filterkriterien (Signalstärke, minimaler Expressionsfaktor, Standardabweichung, *present call*) oder *supervised* nach Gengruppen, definiert in vorangegangenen Analysen. Diese definierten Gengruppen werden aus Datenbanken rekrutiert, aufgeführt in Tabelle 1.

Tabelle 1: Datenbanken zur Klassifizierung von Genen

Datenbank ^a	Abkürzung	Quelle	Inhalt
Molecular Signature Database	MSigDB	Broad Institute, Cambridge, USA	organisierte Genlisten (C2) aus PubMed-Publikationen oder zusammengestellt von Experten verschiedener Bereiche Motif-basierende Genlisten (C2), Gene mit gemeinsamen <i>cis</i> -regulatorischen Elementen
Gene Ontology	GO	GO Consortium, Stanford University, Stanford, USA	Eine konsistente Kategorisierung von Genprodukten aus verschiedensten Datenbanken und Publikationen nach 3 Kriterien: 1. Zelluläre Komponente, 2. Biologischer Prozess, 3. molekulare Funktion
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	KEGG	Universität Kyoto, Kyoto, Japan	Karten von Gen-Pfaden und deren Module, basierend auf wissenschaftlichen Publikationen
Staudt's Database	SDB	National Institute of Health, Bethesda, USA	Eine Bibliothek von Genexpressions-Signaturen maligner und gesunder lymphoider Zellen
Gene Map Annotator and Pathway Profiler	GenMAPP	University of California, San Francisco, USA	Eine Visualisierung und Klassifizierung von Genexpressionsdaten in biologischen Gen-Pfaden und Gengruppen

^aAlle genannten Datenbanken sind etablierte, von Experten erstellte oder beaufsichtigte, zitationsfähige Quellen (Ashburner et al., 2000; Dahlquist, 2004; Kanehisa und Goto, 2000; Shaffer et al., 2006; Subramanian et al., 2005).

2.13.4 Gengruppen-Anreicherungs-Analyse

Die Gengruppen-Anreicherungs-Analyse (engl. gene set enrichment analysis, GSEA) erfolgt mit dem GSEA-Programm (Broad Institute, MIT, Cambridge, Massachusetts, USA). Ihr zugrunde liegt ein paarweiser Vergleich zweier Konditionen. Diese hierarchisch angeordnete Genliste wird systematisch auf die Verteilung von Komponenten bestimmter Gengruppen getestet. Sie beurteilt, ob ganze Gengruppen statistisch signifikant in einer einzelnen Kondition stärker oder schwächer transkribiert vorliegen. Es ist auch möglich, daß geringe Unterschiede in der Transkription einzelner Gene im paarweisen Vergleich bedeutungslos erscheinen, jedoch schwache Unterschiede in einer funktionell verknüpften Gengruppe zusammengenommen einen großen Einfluß auf biologische Funktionen ausüben können. Die Gengruppen für eine solche Analyse definieren sich z.B. über eine molekulare Funktion, eine funktionelle Abhängigkeit oder eine gemeinsame Regulation. Sie werden entweder manuell generiert oder stammen aus Datenbanken (Tabelle 1). Die statistische Auswertung basiert auf einer kumulativen (engl. running

sum) Statistik, einem Gengruppen-basierenden *bootstrapping*-Verfahren und einer Adjustierung des Multiplen-Test-Verfahrens (Subramanian et al., 2005).

2.14 PCR-Primer

Gezeigt sind alle PCR-Primer, geordnet nach den jeweiligen Projekten. Die CDRIII-spezifischen Primer sind nicht aufgelistet; unter Anhang A3 sind diejenigen, die zur Detektion klonaler Sequenzen führten, in den jeweiligen Beispiel-Sequenzen mit aufgeführt.

IgD-only B-Zellen und IgD-PC

VH1L	5'-CTC-ACC-ATG-GAC-TGG-ACC-TGG-AG-3'
VH2L	5'-TGC-TCC-ACR-CTC-CTG-CTR-CTG-A-3'
VH3L	5'-ACC-ATG-GAG-TTT-GGG-CTG-AGC-TG-3'
VH3.2L	5'-ACC-ATG-GAA-CTG-GGG-CTC-CGC-TG-3'
VH4L	5'-CTC-CTG-GTG-GCA-GCT-CCC-AGA-T-3'
VH5L	5'-ATC-ATG-GGG-TCA-ACC-GCC-ATC-CT-3'
3'JH1.2.4.5	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-3'
3'JH3	5'-ACC-TGA-AGA-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-3'
3'JH6	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-3'
5'JH1.4.5	5'-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-KCC-CTG-GCC-3'
5'JH2	5'-GAC-AGT-GAC-CAG-GGT-GCC-ACG-GCC-3'
5'JH3	5'-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-CCC-TTG-GCC-3'
5'JH6	5'-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-CCC-TTK-GCC-3'
VI1	5'-GGT-CCT-GGG-CCC-AGT-CTG-TG-3'
VI2	5'-CAG-TCT-GCC-CTG-ACT-CAG-CCT-3'
VI3A	5'-CTC-AGC-CAC-CCT-CAG-TGT-CCG-T-3'
VI3B	5'-CTC-AGC-CAC-CCT-CGG-TGT-CAG-T-3'
VI4	5'-TTT-CTT-CTG-AGC-TGA-CTC-AGG-AC-3'
VI6	5'-GAG-TCT-CCG-GGG-AAG-ACG-GTA-3'
VI7	5'-GTG-GTG-ACT-CAG-GAG-CCC-TCA-C-3'
VI8	5'-ACT-GTG-GTG-ACC-CAG-GAG-CCA-3'
VI9	5'-GCT-GAC-TCA-GCC-ACC-TTC-TGC-A-3'
3'JI1	5'-GCC-ACT-TAC-CTA-GGA-CGG-TGA-C-3'
3'JI2.3	5'-GAA-GAG-ACT-CAC-CTA-GGA-CGG-TC-3'
3'JI6.7	5'-GGA-GAC-TYA-CCG-AGG-ACG-GTC-3'
5'JI1	5'-GGA-CGG-TGA-CCT-TGG-TCC-CAG-T-3'
5'JI2.3.7	5'-GAC-GGT-CAG-CTT-GGT-SCC-TCC-3'
5'JI6	5'-GAC-GGT-CAC-CTT-GGT-GCC-ACT-3'

Bcl6-MMC Mutationsanalyse

Bcl6_1st_fwd	5'-CGCTCTTGCCAAATGCTTTGGC-3'
Bcl6_1st_rev	5'-CTCTCGTTAGGAAGATCACGGC-3'
Bcl6_2nd_fwd	5'-CGCTCTTGCCAAATGCTTTG-3'
Bcl6_2nd_rev	5'-GACACGATACTTCATCTCATC-3'

Detektion klonal verwandter V_H-Gen-Sequenzen von B-Zellen aus PB

C γ 1/C γ 3_exon1	5'-AGGCAGCCCAGGGCCGCTGTGCC-3'
C μ _exon1_1st_rev	5'-AGCCAACGGCCACGCTGCTCGTAT-3'
C μ _exon1_2nd_rev	5'-TCGTATCCGACGGGGAATTCTCACAG-3'
C δ _exon1_1st_rev	5'-CATGCCAGGACCACAGGGCTGTTATC-3'
C δ _exon1_2nd_rev	5'-GTTATCCTTTGGGTGTCTGCACCCTG-3'
VH1_FR2_fwd	5'-GGTGCACAGGCCCTGGACAA-3'
VH6_FR2_fwd	5'-TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG-3'
VH6_FR1_fwd	5'-ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG-3'
VH3-23_Leader	5'-TTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTG-3'

3. Ergebnisse

3.1 V-Gen-Analyse von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC

Das erste Thema der vorliegenden Dissertationsschrift war die Fortführung und endgültige Auswertung einer Analyse des V-Gen-Repertoires von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC des Menschen. Diese Analyse sollte zu einem besseren Verständnis dieser seltenen und besonderen Zellen beitragen.

In einer früheren Studie wurde anhand von IgM⁻IgD⁺Igλ⁺-sortierten Einzelzellen aus 3 gesunden Blutspendern nach Anzeichen für Rezeptor-Revision gesucht (Goossens et al., 2001). In dieser Studie wurden ebenso Anzeichen für eine hohe Klonalität und ein verzerrtes V-Gen-Repertoire in IgD-only B-Zellen festgestellt. Ähnliche Beobachtungen traten auch in einer Analyse von IgD⁺ PC aus Tonsillen auf. Eine finale Bestätigung dieser Ergebnisse konnte durch eine zusätzliche Analyse je eines Blut- und eines Tonsillen-Spenders erzielt werden. Die experimentelle Arbeit an den letzten beiden Spendern (Spender 4 und D) sowie die vollständige Auswertung der Daten zu klonaler Verwandtschaft, der V_H-Nutzung und Analyse der Aminosäureaustausche in FRIII aus allen Donoren ist Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

IgD-only B-Zellen aus PB und IgD⁺ PC aus Tonsillengewebe wurden anhand der Expression von CD27, IgD, IgM und Igλ als Einzelzellen sortiert und ihre V_H- und V_λ-Gene amplifiziert. Die IgD-only B-Zellen aus PB der Spender 1-3 wurden sortiert als IgM⁻IgD⁺Igλ⁺, die des Spenders 4 als CD27⁺IgM⁻IgD⁺Igλ⁺. Parallel wurden tonsilläre IgD⁺ PC aus den Spendern A-C von IgD-gefärbten Cytospins mittels hydraulischem Mikromanipulator isoliert (nicht beschrieben, siehe (Seifert et al., 2009)). Aus Spender D geschah die Isolierung nach CD38^{high} und intrazellulärer IgD-Expression per FACS. Um die Besonderheiten in der V-Gen-Analyse von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC darzustellen, wurden aus Blutspender 1 und 4 und Tonsille C und D Vergleichspopulationen sortiert: naive (CD27⁻IgD⁺Igλ⁺) und klassengewechselte (IgM⁻IgD⁻Igλ⁺) B-Zellen aus Donor 1, IgG⁺ B-Zellen (CD27⁺IgG⁺Igλ⁺) aus Donor 4, IgG⁺ PC aus Tonsille C (Mikrodissektion) und Tonsille D (CD38^{high}, intrazellulär IgG⁺).

3.1.1 Klonalität und VH3-30-Frequenz in IgD-only B-Zellen aus PB

Aus 53-91% der Einzelzellen konnte eine V-Gen-Umlagerung amplifiziert werden ((Goossens et al., 2001) und nicht gezeigt). Wie zuvor gezeigt (Liu et al., 1996) war

der Mutationsgehalt in den IgD-only B-Zellen sowohl in V_H - als auch in V_L -Genumlagerungen höher als in den klassengewechselten B-Zellen, nämlich 12,2% (10,0-15,0%) gegenüber 6,6 und 5,8% in V_H und 8,2% (6,2-10,6%) gegenüber 4,5 und 5,5% in V_L -Genen; naive B-Zellen waren unmutiert (nicht gezeigt). Die R/S-Werte der FR in IgD-only B-Zellen lagen bei einem Mittelwert von 1,5 (1,2 bis 1,8), wie es typisch ist für selektierte post-GC-B-Zellen (Klein et al., 1998a).

Im Gegensatz zu naiven oder klassengewechselten B-Zellen, bei denen kein Fall von Klonalität festgestellt wurde, war ein großer Teil (48-82%) der IgD-only B-Zellen klonal verwandt. Die Größe der Klone variierte zwischen 2 und 15 Mitgliedern unter 40 bis 62 Zellen pro Auswertung (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klonale Verwandtschaft in B-Zell-Populationen aus PB

Spender	Zelltyp	V_H -PCR-Effizienz ^a	klonal verwandte Zellen (% aller Zellen)	Anzahl Klone	Klone mit Diversität	Klonmitglieder
1	IgD-only	32/40	19 (48)	8	6	2-3
2	IgD-only	53/62	32 (52)	7	6	2-12
3	IgD-only	40/48	26 (54)	6	5	2-15
4	IgD-only	31/51	42 (82)	14	14	2-13
1	naiv	26/36	0	-	-	-
1	klassengewechselt	35/55	0	-	-	-
4	klassengewechselt	28/37	0	-	-	-

^a Probenröhrchen ohne Amplifikat wurden als Sortierungsausfall interpretiert, die V_H -PCR-Effizienz bezieht sich demnach auf Proben mit mindestens einem V_H - oder V_L -Amplifikat

Verglichen mit naiven und klassengewechselten B-Zellen enthalten V_H -Genumlagerungen von IgD-only B-Zellen überdurchschnittlich oft das Segment V_H3-30 (Tabelle 3). In der vorliegenden Analyse beträgt die Frequenz von V_H3-30 in amplifizierten V_H -Genen aus IgD-only B-Zellen zwischen 30 und 47%. Dies steht im Gegensatz zu einer Frequenz von 15% unter naiven und 9 bzw. 8% unter den klassengewechselten B-Zellen von Donor 1 und 4. Der Unterschied in den V_H3-30 -Frequenzen zwischen IgD-only B-Zellen und jeweils naiven B-Zellen aus Spender 1 bzw. klassengewechselten B-Zellen aus Spender 1 und 4 zusammen ist statistisch signifikant (exakter Fisher-Test) mit einer einzigen Ausnahme: die V_H3-30 -Frequenz unter den IgD-only B-Zellen aus Spender 3 ist zu gering, um einen signifikanten Schwellenwert im Vergleich zu naiven B-Zellen zu erreichen (Tabelle 3). In Donor 1 und 2 sind die V_H3-30 -exprimierenden B-Zellen vornehmlich in den klonal expandierten Zellen aufzufinden (Tabelle 3).

Tabelle 3: V_H3-30-Nutzung in B-Zell-Populationen aus PB

Spender	Zelltyp	V _H 3-30 ⁺ Zellen (% V _H -Amplifikate) ^a	statistische Signifikanz ^b	klonal verwandte Zellen (% aller klonal verwandter Zellen)	Anzahl Klone	einzelne Zellen (% V _H - Amplifikate) ^a
1	IgD-only	15 (47)	0,009, <0,001	11 (58)	4	4 (13)
2	IgD-only	19 (36)	0,037, <0,001	13 (41)	3	6 (9)
3	IgD-only	12 (30)	0,098, 0,003	5 (19)	2	7 (18)
4	IgD-only	14 (45)	0,013, <0,001	7 (23)	2	7 (23)
1	naiv	4 (15)	-	0	0	4 (15)
1	klassen- gewechselt	3 (9)	-	0	0	3 (9)
4	klassen- gewechselt	2 (8)	-	0	0	2 (8)

^a VH-PCR-Effizienz siehe Tabelle 2

^b Die Irrtumswahrscheinlichkeit p für einen Unterschied in der V_H3-30-Nutzung zwischen IgD-only B-Zellen und naiven (Spender 1, erster Wert) oder klassengewechselten B-Zellen (Spender 1 und 4 vereinigt, zweiter Wert) nach dem exakten Fischer-Test.

Weiterhin konnte eine häufige Nutzung des J_H6-Gensegmentes in IgD-only B-Zellen von Spender 1 und 3 beobachtet werden: 48% (11/23), 29% (6/21), 44% (12/27) und 35% (9/26) der V_H-Genumlagerungen mit eindeutig bestimmbar J_H-Segment der jeweiligen Spender 1, 2, 3 und 4 nutzten J_H6, verglichen mit nur 20% (7/35) der naiven und 26% (12/46) bzw. 33% (7/21) der klassengewechselten B-Zellen der Spender 1 und 4. Unter den jeweiligen V_λ-Gensegmenten konnte keine Verschiebung des V-Gen-Repertoires identifiziert werden.

Laut der vorliegenden Untersuchung sind IgD-only B-Zellen aus dem PB häufig zu großen Teilen klonal verwandt und nutzen präferentiell das V_H3-30-Gensegment.

3.1.2 Klonalität und VH3-30-Frequenz in tonsillären IgD⁺ PC

IgD-sekretierende PC sind immunologisch aktive, ausdifferenzierte IgD-only B-Zellen. Daher war es wichtig, diese Zellen ebenfalls auf die oben beschriebenen Besonderheiten hin zu testen. Zur Validierung wurden ebenfalls IgG-exprimierende PC aus Tonsille C und D mikrodisssektiert bzw. sortiert und ihre V_H- und V_L-Genumlagerungen analysiert.

Aus 72% bis 90% der isolierten PC konnten V-Genumlagerungen amplifiziert werden (nicht gezeigt). Beinahe alle der analysierten PC aus Tonsille 1-4 waren in ihren V-Genen mutiert (nicht gezeigt). Die durchschnittliche V_H-Mutationsfrequenz

betrug 6,4% (3,7-9,9%) in IgD⁺ PC aus den vier Tonsillen und 4,6 bzw. 5,4% unter den IgG⁺ PC aus Tonsille C und D (nicht gezeigt). Die durchschnittliche Mutationsfrequenz der V_λ-Genumlagerungen betrug 4,9% (2,5-6,1%) in IgD⁺ PC und 2,6% (Tonsille C) bzw. 2,2% (Tonsille D) in IgG⁺ PC (nicht gezeigt). Die R/S-Werte der FR in IgD⁺ PC hatten einen Mittelwert von 1,7 (1,2-2,6).

Während die klonale Zusammensetzung der analysierten PC in Tonsille A mit nur 2 klonal verwandten PC unter 15 verwertbaren Sequenzen relativ niedrig ausfiel, waren 31, 43 und 34% unter jeweils 51, 49 und 73 auswertbaren V-Genumlagerungen aus Tonsille B, C und D klonal verwandt. Aufgrund von detektierbaren in-frame-V_λ-Genumlagerungen in einzelnen Klonmitgliedern ist es wahrscheinlich, daß alle gefundenen Klone λ-Leichtketten benutzen (Tabelle 4). 19 von 21 Klonen waren intraklonal diversifiziert. Unter den jeweils 45 bzw. 37 Amplifikaten aus IgG⁺ PC der Tonsillen C und D war in keinem Fall eine klonal verwandte Genumlagerung nachweisbar (Tabelle 4).

Tabelle 4: Klonale Verwandtschaft in tonsillären PC

Tonsille	Zelltyp	V _H -PCR-Effizienz ^a	klonal verwandte Zellen (% aller Zellen)	Anzahl Klone	Klone mit in-frame V _λ J _λ	Klone mit Diversität	Klonmitglieder
A	IgD ⁺	11/15	2 (13)	1	1	1	2
B	IgD ⁺	39/51	16 (31)	7 ^a	6	6	2-4
C	IgD ⁺	31/49	21 (43)	4	4	3	2-13
D	IgD ⁺	34/73	25 (34)	9	9	9	2-5
C	IgG ⁺	33/45	0	-	-	-	-
D	IgG ⁺	26/37	0	-	-	-	-

^a Probenröhrchen ohne Amplifikat wurden als Sortierungsausfall interpretiert, die V_H-PCR-Effizienz bezieht sich demnach auf Proben mit mindestens einem V_H- oder V_L-Amplifikat.

Unter den V_H-Genumlagerungen aus IgD⁺ PC aus Tonsille A bis D enthielten jeweils 27, 56, 52 bzw. 6% ein funktional umgelagertes V_H3-30-Gensegment, IgG⁺ PC aus Tonsille C und D dagegen wiesen nur in 3% bzw. 4% der V_H-Genumlagerungen funktionale V_H3-30-Gensegmente auf. Für Tonsille A, B und C waren die Unterschiede statistisch signifikant laut exaktem Fischer-Test. Die meisten klonal verwandten PC aus Tonsille B benutzten V_H3-30. (Tabelle 5).

Tabelle 5: V_H3-30-Nutzung in tonsillären PC

Tonsille	Zelltyp	V _H 3-30 ⁺ Zellen (% V _H -Amplifikate) ^a	statistische Signifikanz ^b	klonal verwandte Zellen	Anzahl Klone	einzelne Zellen (% V _H -Amplifikate) ^a
----------	---------	--	---------------------------------------	-------------------------	--------------	--

		(% aller klonal verwandter Zellen)				
A	IgD ⁺	3 (27)	0,023	0	0	3 (27)
B	IgD ⁺	22 (56)	<0,001	14 (88)	5	8 (21)
C	IgD ⁺	16 (52)	<0,001	13 (62)	1	3 (10)
D	IgD ⁺	2 (6)	0,197	2 (8)	1	0
C	IgG ⁺	1 (3)	-	0	0	1 (3)
D	IgG ⁺	1 (4)	-	0	0	1 (4)

^a VH-PCR-Effizienz siehe Tabelle 4

^b Die Irrtumswahrscheinlichkeit p für einen Unterschied in der V_H3-30 -Nutzung zwischen IgD⁺ PC und klassengewechselten PC (Tonsille C und D vereinigt) nach exaktem Fischer-Test.

Wie zuvor in der Analyse von IgD-only B-Zellen aus PB beschrieben, nutzen IgD⁺ PC ebenfalls häufig J_H6 als Teil ihrer Genumlagerungen. 56% (6/11), 52% (13/25), 53% (8/15) und 47% (16/34) der V_H -Gene aus IgD⁺ PC der Tonsillen A bis D mit identifizierbarem J_H -Segment der Tonsillen A-D nutzen J_H6 , dagegen nur 13% (4/30) und 28% (7/25) der IgG⁺ PC. Für die Leichtkettengene wurden keine Verschiebungen im Repertoire festgestellt.

Zusammengefasst zeigen IgD-sezernierende PC ein ähnliches Muster in Klonalität und Nutzung des V_H3-30 -Gensegments wie IgD-only B-Zellen aus PB, einzig weisen PC eine höhere Variabilität innerhalb dieser Muster auf.

3.1.3 Die Analyse von Austauschmutationsmustern in den FR funktionaler V_H3-30 -Gensegmente

Die verstärkte Nutzung des V_H3-30 -Gensegmentes in IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC (zusammen IgD-only Zellen) legten eine Bedeutung dieses V-Genes für die Selektion dieser besonderen Zellen nahe. Um diese Hypothese zu untermauern wurden zwei Alignments von V_H3-30 -Genumlagerungen aus IgD-only Zellen und nicht-IgD-only Zellen (aus unserer Analyse und Gen-Datenbanken zusammengestellt) miteinander verglichen.

Eine visuelle Überprüfung lieferte keine Hinweise auf Besonderheiten in der Genumlagerung, etwa eine Restriktion der CDRIII-Länge oder eine gehäufte Nutzung bestimmter Aminosäuren in den CDR aufgrund eines besonderen Mutationsmusters (nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu fiel ein eigentümliches Muster an Austauschmutationen in der V_H3-30 -FRIII von IgD-only Zellen auf, das auf eine Selektion von polaren und eine Gegenselektion von sauren und unpolaren Aminosäuren hinweist. Der Vergleich zu Aminosäureaustauschen in nicht-IgD-only Zellen war laut exaktem Fischer-Test

statistisch signifikant (Tabelle 6). Identische Austauschmutationen in klonal verwandten Sequenzen wurden einfach gezählt.

Tabelle 6: Unterschiede im Aminosäureaustausch-Muster in der FRIII von V_H3-30

Polarität/ Ladung in Keimbahn-Konfiguration	mutiert zu	IgD-only (% Gesamt)	nicht-IgD-only (% Gesamt)	exakter Fischer-Test (p)
polar/ unpolar/ positiv	negativ	36 (13)	17 (20)	0,034
polar/ unpolar/ negativ	positiv	57 (20)	13 (15)	0,081
unpolar/ positiv/ negativ	polar	117 (42)	26 (31)	0,021
polar/ positiv/ negativ	unpolar	71 (25)	28 (33)	0,038
Gesamt		281	84	

Darüber hinaus konnte ein bevorzugter Austausch von Lysin nach Arginin an Position 76 des V_H3-30-Gens festgestellt werden: 24 von 102 IgD-only Zellen kodieren für ein solches Arginin. Zählt man gemeinsame Mutationen in klonal verwandten Sequenzen nur einmal, generieren 18 von 25 Austauschmutationen in Kodon 76 von V_H3-30 ein Arginin an dieser Stelle, wogegen nur 3 unter 9 Austauschmutationen in nicht-IgD-only Zellen zum Einbau eines Arginins führen ($p < 0,044$ nach exaktem Fischer-Test). Verschiebungen im Mutationsmuster der anderen FR wurden nicht festgestellt.

Zusammengefasst zeigte die V-Gen-Analyse von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC eine hohe Klonalität und ein verzerrtes V_H-Gen-Repertoire. Ebenfalls konnten Hinweise auf eine Relevanz der FR für die Selektion dieser eigentümlichen Populationen gefunden werden. Die neuen und bereits publizierten Erkenntnisse zu IgD-only Zellen ergänzen sich zu einem sehr speziellen Szenario einer Superantigen-getriebenen Immunantwort (siehe Diskussion).

3.2 Molekulare Analyse von humanen B-Zell-Populationen

Ein weiteres Thema der vorliegenden Dissertationsschrift war die Herkunft von IgM⁺ B-Zellen mit somatisch mutierten V-Genen. Drei verschiedene experimentelle Ansätze wurden genutzt, um zu klären, ob in diesen B-Zell-Populationen Hinweise auf eine GC-Passage gefunden werden können.

3.2.1 Analyse der Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen

Ein erster Ansatz sollte überprüfen, ob mutierte IgM⁺ B-Zellen genau wie klassengewechselte B-Zellen als Zeichen einer GC-Passage längere Telomere als naive B-Zellen besitzen. Hierzu wurden die Telomerlängen von 13 gesunden Spendern mittels flow-FISH bestimmt. Die Auswertung ergab, daß in jedem der 13 Spender die Telomere der klassengewechselten B-Zellen (MW 8,7±1,1 kb) länger waren als die der naiven B-Zellen. (7,2±0,7 kb). Die mittleren Telomerlängen der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ (7,9±0,8 kb) sowie IgM-only B-Zellen (8,1±1,3 kb) waren intermediär zu diesen Werten. Ein statistischer Test konnte zeigen, daß alle untersuchten CD27⁺ B-Zell-Populationen signifikant längere Telomere aufweisen als naive B-Zellen (Tabelle 7).

	Naive	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	IgM-only	Klassengewechselte
Anzahl der Spender	13	13	13	13
durchschnittliche Telomerlänge (kb)	7,17	7,86	8,07	8,71
Standardabweichung (kb)	0,71	0,79	1,25	1,1
Signifikanz einer Unterschiedlichkeit zu naiven B-Zellen ^a	-	p< 0,028	p< 0,034	p< 0,0003
Signifikanz einer Unterschiedlichkeit zu klassengewechselten B-Zellen ^a	p< 0,0003	p< 0,034	p< 0,181	-

Tabelle 7: Analyse von Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen aus PB

^a Gezeigt sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten von post-hoc paarweisen Vergleichen nach Tukey basierend auf ANOVA (p< 0,003).

Die gemessenen Telomerlängen variieren beträchtlich von Spender zu Spender (Abb. 3). In vorangegangenen Untersuchungen, in denen nicht zwischen mutierten IgM^+ und klassengewechselten B-Zellen unterschieden wurde, konnte ebenfalls eine solche Variabilität in den Telomerlängen beobachtet werden (Son et al., 2003; Weng et al., 1997a). So wurde in der vorliegenden Arbeit in drei von 13 Spendern ein leicht höherer Wert in der durchschnittlichen Telomerlänge von naiven gegenüber $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und/ oder IgM -only B-Zellen festgestellt (Spender 8, 11, 12; Abb. 3).

Grundsätzlich weisen alle IgM^+ B-Zell-Populationen in unserer Analyse einen niedrigeren Wert für durchschnittliche Telomerlänge auf als die jeweiligen klassengewechselten B-Zellen, ein statistisch signifikanter Unterschied besteht jedoch nur zu $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ($p < 0,0342$, Tabelle 7).

Abbildung 3: Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen

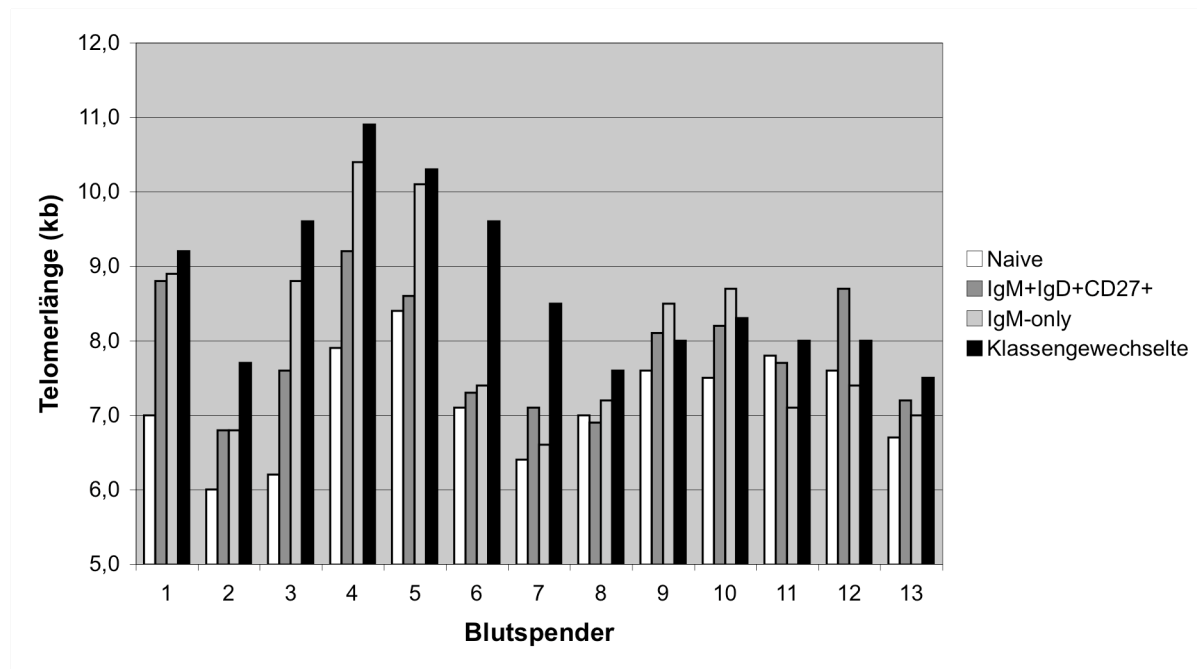


Abb. 3: Die Telomerlänge naiver und CD27^+ B-Zell-Populationen aus humanem PB, gemessen mit flow-FISH. Die individuelle Telomerlänge (kb) von naiven (weiß), $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ (dunkelgrau), IgM -only (hellgrau) und klassengewechselten B-Zellen (schwarz) aus 13 gesunden Blutspendern.

Zusammengefasst haben mutierte $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen als Anzeichen einer GC-Erfahrung längere Telomere als naive B-Zellen. Bemerkenswert ist hierbei, daß dieser Längenunterschied in etwa 50% des Längenunterschiedes zu klassengewechselten B-Zellen beträgt.

3.2.2 Analyse von Bcl6-Mutationen in humanen B-Zell-Populationen

Ein weiterer experimenteller Ansatz zur Klärung einer GC-Erfahrung von mutierten IgM⁺ B-Zellen war eine Mutationsanalyse des Bcl6-MMC. Bcl6, der zentrale Transkriptionsfaktor für GC-B-Zellen, mutiert auch in nicht-malignen B-Zellen gelegentlich durch aberrante SHM. Da der Prozess der SHM die Transkription des Zielgenes voraussetzt, können Mutationen im Bcl6-Lokus nur dann entstehen, wenn neben der Aktivität einer SHM-Maschinerie (zur Diversifizierung des Ig-Lokus) ebenfalls der Bcl6-Lokus in ausreichendem Maße transkribiert wird. Demzufolge wurden aus drei gesunden Spendern Bcl6-MMC-Mutationen als molekulare Spuren einer GC-Reaktion in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselten B-Zellen mittels Einzelzell-PCR untersucht. Der Ansatz der Einzelzell-PCR erlaubt eine verlässliche Analyse von seltenen Mutationseignissen (DNA-Polymerase-Fehler sind durch Direktsequenzierung der PCR-Produkte vernachlässigbar) und lässt eine genaue Einschätzung der Frequenz mutierter Sequenzen in einer Population zu, da diese nicht durch eine artifizielle Überrepräsentierung weniger Sequenzen verzerrt werden kann. Ein Nachteil ist, daß Zellen mit zwei unmutierten Allelen keine Auskunft darüber geben, ob nur ein oder beide amplifiziert wurden. Um dies zu umgehen, werden nur Spender mit einem heterozygot ausgeprägten SNP für die Analyse zugelassen.

Insgesamt wurden in 21% (14-25%) der PCRs beide Allele amplifiziert (Tabelle 8). Unter 60 amplifizierbaren, naiven B-Zellen wurden keine Mutationen in Bcl6-MMC gefunden, wogegen 16 von 75 (21%) IgM⁺IgD⁺CD27⁺, 13 von 64 (20%) IgM-only und 19 von 57 (33%) klassengewechselten B-Zellen Mutationen trugen. Die durchschnittlichen Mutationsfrequenzen betragen 0,045% (0,036-0,084%) in IgM⁺IgD⁺CD27⁺, 0,050% (0,013-0,119%) in IgM-only und 0,085% (0,082-0,093%) in klassengewechselten B-Zellen. Diese Mutationen waren über den gesamten Bcl6-MMC verteilt und – abgesehen von zwei 1 bp-Deletionen und einer 5 bp-Deletion – ausschließlich einzelne Nukleotid-Austausch-Mutationen. Mehrere Mutationen pro Sequenz traten weniger häufig auf als einzelne, mit 2 bis 6 Mutationen in 4 bis 9 Zellen und einzelnen Mutationen in 8 bis 12 Zellen pro CD27⁺ B-Zell-Population.

Tabelle 8: Bcl6-Mutationen in B-Zell-Populationen aus humanem PB

Spender	Zelltyp	PCR-Effizienz ^a	1 Allel/ 2 Allele amplifiziert ^b	mutierte Zellen (%)	Anzahl Mutationen ^c	Mutations- frequenz (%) ^d
A	Naiv	26/50	22/4	0	0	0
	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	31/50	22/9	7 (23)	6x1, 1x2	0,039
	IgM-only	26/50	21/5	5 (19)	5x1	0,024
	Klassen- gewechselt	18/50	16/2	6 (33)	4x1, 1x2, 1x5	0,082
B	Naiv	18/50	11/7	0	0	0
	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	25/50	21/4	5 (20)	4x1, 1x3	0,036
	IgM-only	20/50	15/5	6 (30)	1x1, 2x2, 1x4, 1x5, 1x6	0,119
	Klassen- gewechselt	24/50	19/5	8 (33)	4x1, 2x2, 1x3, 1x5	0,082
C	Naiv	16/40	12/4	0	0	0
	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	19/40	15/4	4 (21)	2x1, 1x5, 1x6	0,084
	IgM-only	18/40	13/5	2 (11)	2x1	0,013
	Klassen- gewechselt	15/40	14/1	5 (33)	2x1, 2x2, 1x4	0,093
MW ^e	Naiv	60/140	45/15	0	0	0
	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	75/140	58/17	16 (21)	12x1, 1x2, 1x3, 1x5, 1x6	0,045
	IgM-only	64/140	49/15	13 (20)	8x1, 2x2, 1x4, 1x5, 1x6	0,050
	Klassen- gewechselt	57/140	49/8	19 (33)	10x1, 5x2, 1x3, 1x4, 2x5	0,085

^aVerhältnis positiver PCR zu analysierten Einzelzellen.

^bAnzahl der PCR-Produkte mit einem oder zwei Allelen.

^cIn AxB zeigt A die Anzahl der Sequenzen mit B Mutationen an.

^dDer Prozentsatz von Mutationen bezüglich einer Gesamtmenge von 670 betrachteten bp des Bcl6-MMC pro Sequenz.

^eDer Mittelwert (MW) über die Spender A-C.

Unter der Bedingung, daß ein Nukleotid mit gleicher Wahrscheinlichkeit zu jeweils einem der drei anderen Nukleotide des genetischen Codes mutieren kann, konnte - verglichen mit einer erwarteten Frequenz von 33% für eine Transition (67% für eine Transversion) - in IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselten B-Zellen eine Frequenz von jeweils 63%, 58% und 46% festgestellt werden. Diese Bevorteilung

von Transitionen zeigte statistische Signifikanz für beide IgM⁺CD27⁺ B-Zell- Populationen (p < 0,001) nicht aber klassengewechselte B-Zellen (p < 0,09).

Das bevorzugte Mutieren der SHM-hotspots RGYW und WRCY (Rogozin und Kolchanov, 1992) war ebenfalls nachweisbar, jeder CD27⁺ B-Zelltyp trug vermehrt Mutationen in solchen Sequenzmotiven. 28,6% der Mutationen in IgM⁺IgD⁺CD27⁺, 18,5% in IgM-only und 40,5% in klassengewechselten B-Zellen lagen in RGYW/WRCY-Motiven. Dies überschreitet in jedem Fall die Schwelle einer zufälligen Mutationsfrequenz von 16,7%, gemessen an der beobachteten Mutationslast pro Gesamtzahl verfügbarer RGYW/WRCY-Nukleotide. Der Unterschied zwischen zufälligem und beobachtetem Mutationsmuster ist statistisch nur für klassengewechselte B-Zellen signifikant (p < 0,001). Von einer ähnlichen, nicht signifikanten Nutzung von RGYW/WRCY-Motiven wird in einer weiteren Studie zu Bcl6-Mutationen in klassengewechselten B-Zellen berichtet (Yavuz et al., 2002).

Zusammengefasst weisen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only B-Zellen Mutationen im Bcl6-MMC als Hinweise auf eine GC-Passage auf. Die Mutationsfrequenz entspricht dabei ca. 50% der Mutationsfrequenz des Bcl6-MMC in klassengewechselten B-Zellen.

3.2.3 Detektion klonal verwandter IgM⁺ und IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen

Ein Beweis dafür, daß mutierte IgM⁺ B-Zellen an GC-Reaktionen teilgenommen haben und dort modifiziert worden sind, wäre der Nachweis von klonal verwandten IgM⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Lymphozyten, die sich anhand gemeinsamer und individueller Mutationen zu genealogischen Bäumen mit durchmischter Anordnung rekonstruieren lassen.

Es wurden zwei experimentelle Strategien entworfen, um klonal verwandte IgM⁺CD27⁺ und IgG⁺ B-Zellen aus PB isolieren zu können. In beiden Fällen werden nur IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und nicht IgM-only B-Zellen untersucht, da letztere weniger stark kontrovers diskutiert sind bezüglich ihrer Herkunft (Weller et al., 2001) und außerdem ihre Zahl im PB zu gering ist um mit den gewählten experimentellen Ansätzen eine effiziente Analyse zu gewährleisten.

Der erste Ansatz basiert auf PAGE und CDRIII-Spektren-Typisierung (siehe 2.9.1 und Anhang A1). Dieser Ansatz erlaubt nur die Detektion sehr großer Klone, da die amplifizierten V_H-Gene (besonders V_{H1}), bei mehr als 30.000 eingesetzten B-Zellen pro PCR-Ansatz schon bei dieser relativ niedrig anzunehmenden Diversität ein sehr dichtes und polyklonales CDRIII-Spektrum auf dem Gel zur Folge hatte. In

einer Kalkulation mit einer Gesamtzahl von jeweils ca. 6×10^8 $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen im PB muß ein putativer Klon mindestens 20.000 Mitglieder aufweisen um je einen Vertreter in zwei Aliquots aus 30.000 Zellen zu führen. Aus insgesamt 10 gesunden Spendern wurden jeweils mehrere Aliquots a 30.000 B-Zellen sortiert, separat revers transkribiert und mit einem V_H1 -Familien-Primer sowie jeweils C_γ - und C_μ/C_δ -Primern amplifiziert, wie in 2.9.1 beschrieben. Die Amplifikation von $C_\gamma2$ -Genen wurde durch die Spezifität des C_γ -Primers ausgeschlossen, da $C_\gamma2$ -Transkripte vornehmlich aus TI-Immunantworten stammen (Shackelford et al., 1988). Der identische Abstand der C_H -Primer zum umgelagerten J_H -Gen war hierbei wichtig, um die in ihrer Größe übereinstimmenden CDRIII putativer Klonmitglieder in gleich große Amplifikate und damit identische Laufhöhen auf einem Gel zu übersetzen. Nach einer Silbernitrat-Färbung wurden aus den erstellten CDR-Spektren-Typisierungen korrespondierender $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen eines Spenders Produkte gleicher Größe ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert. Insgesamt wurden mehr als 120 Amplifikat-Paare aus 10 Spendern analysiert. Mehr als 85% dieser Produkte waren oligo- bis polyklonal und wurden von der Analyse ausgeschlossen. Von den restlichen monoklonalen Amplifikaten konnte ein einzelner Klon mit 7 unterschiedlichen IgG^+ und 2 unterschiedlichen IgM^+ Mitgliedern isoliert werden. (Abb. 2 A). Die Klonmitglieder enthielten zwischen 3 und 9 V_H -Gen-Mutationen pro Sequenz von denen 2 bis 7 in mindestens 2 Mitgliedern geteilt wurden.

Es ist wichtig anzumerken, daß die genealogische Analyse nicht nur mehrere IgG^+ Klonmitglieder mit nur einer einzigen Mutation, sondern auch 5 zusätzliche Mutationen zeigt, die in IgM - und IgG -Sequenzen gemeinsam auftreten. Daraus läßt sich schließen, daß der Großteil – wenn nicht sogar alle – der V -Gen-Mutationen in den IgM^+ Klonmitgliedern aus der Entwicklung eines GC-B-Zell-Klones herrühren, der klassische Gedächtnis-B-Zellen hervorgebracht hat.

Mit einer weiteren Methode, basierend auf einer PCR mit CDRIII-spezifischen Primern, wurde versucht, Klone auch aus größeren Zellmengen zu isolieren. Um einen hohen polyklonalen Hintergrund aufgrund unspezifischer Bindung des CDRIII-spezifischen Primers zu reduzieren, wurden ausschließlich V_H6 - (Spender 1-6) und V_H3-23 -Genumlagerungen (Spender 7 und 8) amplifiziert. Aus sechs Spendern (Spender 1-6) wurden bis zu $1,5 \times 10^6$ sortierte IgG^+ und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen und aus zwei Spendern (Spender 7 und 8) zusätzlich naive B-Zellen isoliert. RNA wurde isoliert und C_H -Gen-spezifisch revers transkribiert. Die cDNA wurde amplifiziert mit

einer Kombination aus V_{H6} - bzw. V_{H3-23} - sowie C_{γ} - und nested C_{μ}/C_{δ} -Primern. Durch die Nutzung von nested C_{μ}/C_{δ} -Primern für die IgM^+ cDNA sollte eine potentielle Verunreinigung der PCR mit IgG -Transkripten aus Sortierungsfehlern ausgeschlossen werden. Die amplifizierten VH -Genumlagerungen aus IgG -cDNA wurden kloniert und 8 bis 30 Sequenzen zufällig ausgewählt um einen $CDRIII$ -spezifischen Primer zu generieren. Die Primer wurden derart positioniert (möglichst weit 3' bzw. in $FRIV$ gelegen), daß ausreichend Sequenz aus dem 5'-Bereich der jeweiligen $CDRIII$ in den resultierenden PCR-Produkten enthalten war um eine eindeutige Beurteilung klonaler Verwandtschaft gewährleisten zu können. Konnten klonal verwandte Genumlagerungen aus IgM -cDNA vervielfältigt werden, so wurden anschließend auch zusätzliche Klonmitglieder aus der IgG -cDNA amplifiziert (siehe 2.9.2 und Anhang A2).

Aus 6 von 8 Donoren konnten 37 monoklonale PCR-Produkte amplifiziert und sequenziert werden (2 bis 9 pro Spender, Tabelle 9). Oligo-oder polyklonale Produkte wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Von diesen 37 Produkten waren 11 V_{H6} -PCR-Produkte und 3 V_{H3-23} -PCR-Produkte aus $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen klonal verwandt mit Genumlagerungen aus IgG^+ B-Zellen des entsprechenden Spenders (Tabelle 9). Im Gegensatz dazu waren in den naiven B-Zellen aus Spender 7 und 8 keine klonal verwandten Sequenzen detektierbar: lediglich oligoklonale, unmutierte Produkte mit variierender $CDRIII$ -Länge wurden durch unspezifisches Binden des $CDRIII$ -Primers amplifiziert (nicht gezeigt). Das Fehlen von Klonmitgliedern unter den naiven validiert die Zuverlässigkeit des experimentellen Ansatzes zur Detektion verwandter IgM^+CD27^+ und IgG^+ B-Zellen. Ein Nachteil der $CDRIII$ -Primer-Methode gegenüber der PAGE-Strategie ist, daß der Gebrauch eines $CDRIII$ -spezifischen Primers den Verlust der C_H -Sequenz bedingt. Eine Restunsicherheit, daß die amplifizierten klonal verwandten Sequenzen aus IgM^+ B-Zellen durch kontaminierende Sequenzen aus IgG^+ B-Zellen entstanden, wurde durch eine unabhängige PCR-Strategie ausgeräumt. Mit Hilfe zusätzlicher $CDRIII$ -spezifischer Primer, möglichst weit 5' gelegen, wurde in Kombination mit C_{μ} - bzw. C_{δ} -Primern aus 4 von 11 V_{H6} -exprimierenden Klonen ebenfalls der C_{μ} - und/ oder C_{δ} -Terminus nachgewiesen. Die Primer wurden derart positioniert, daß eine eindeutige Identifikation des jeweiligen Klones anhand der $CDRIII$ -Sequenz gewährleistet war (nicht gezeigt).

Tabelle 9: Klone mit IgM⁺ und IgG⁺ Mitgliedern in humanen B-Zellen mit somatisch mutierten V_H-Genen

Spender	% CD27 ⁺ B-Zellen	analysiertes V _H -Gen	CDRIII-spezifische Primer	Produkte mit monoklonaler CDRIII (%) ^b	Klone mit IgM ⁺ und IgG ⁺ Mitgliedern (%) ^c
1	30	V _H 6	15	5 (33)	2 (40)
2	40	V _H 6	20	2 (10)	0
3	45	V _H 6	20	3 (15)	0
4	30	V _H 6	15	3 (20)	3 (100)
5	25	V _H 6	8	4 (38)	2 (50)
6	19	V _H 6	8	4 (50)	4 (100)
7	29	V _H 3-23	30	9 (30)	1 (11)
8	21	V _H 3-23	30	7 (23)	2 (29)

^aAnzahl der CDRIII-spezifischen Primer, die ein spezifisches Produkt aus DNA-Verdünnungen des korrespondierenden IgG⁺ B-Zell-Klones amplifizieren konnten

^bGezählt wurden nur Produkte mit monoklonalen Sequenzen, d.h. Produkte in denen der CDRIII-Primer ein einzelnes Produkt amplifizierte.

^cDie Anzahl der Klone mit IgM⁺ und IgG⁺ B-Zellen mit somatisch mutierten V_H-Genen. Die Frequenz solcher Klone unter monoklonal amplifizierten Produkten ist in Klammern angegeben.

Zur Untersuchung der klonalen Diversität wurden die PCR-Produkte aus beiden Populationen kloniert und pro Population eines Spenders wurden zwischen 30 und 60 Bakterienklone sequenziert. Partielle Alignments dieser Klone sind inklusive Keimbahnsequenz und Primersequenz in Anhang A3 dargestellt. Für alle 15 Klone (inklusive Klon A, PAGE-Strategie) wurden mehrere verschiedene Mitglieder, unterscheidbar anhand von bis zu 25 Punktmutationen, bzw. einzelner Triplet-Insertionen und –Deletionen detektiert (Abb. 4). Die durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ bzw. IgG⁺ B-Zellen lag bei jeweils 4,2% und 6,2%, übereinstimmend mit Literaturangaben zu beiden Populationen (Klein et al., 1998b).

Die klonale Entwicklung der verwandten Sequenzen wurde mittels genealogischer Mutationsanalysen rekonstruiert und zeigte eine große Vielfalt an unterschiedlichen Formen der Bäume (Abb. 4). Ein wichtiges Resultat der Mutationsanalyse war, daß sich 6 der Klone (Abb. 4 H-N) aus frühen IgM⁺ und späten, überwiegend stärker mutierten, IgG⁺ GC-Abkömmlingen zusammensetzten. Dagegen lagen in den anderen 9 von 15 Klonen insgesamt (Abb. 4 A-G, O und P) beide Zelltypen in einer vermischten Anordnung bezüglich ihrer GC-Abstammung

vor. Bemerkenswerterweise waren diese IgG⁺ B-Zellen ebenfalls im Durchschnitt stärker mutiert als ihre IgM⁺-Geschwisterzellen. Zusätzlich konnten in zwei Klonen (Abb. 4 E und M) IgM⁺ und in einem Klon (Abb. 4 G) sogar IgM⁺ und IgG⁺ post-GC-B-Zellen mit unmutiertem V_H-Gen gefunden werden.

Abbildung 4 Teil 1 (Klon A-F): Genealogische Rekonstruktion klonal verwandter IgM⁺ und IgG⁺ post-GC-B-Zellen

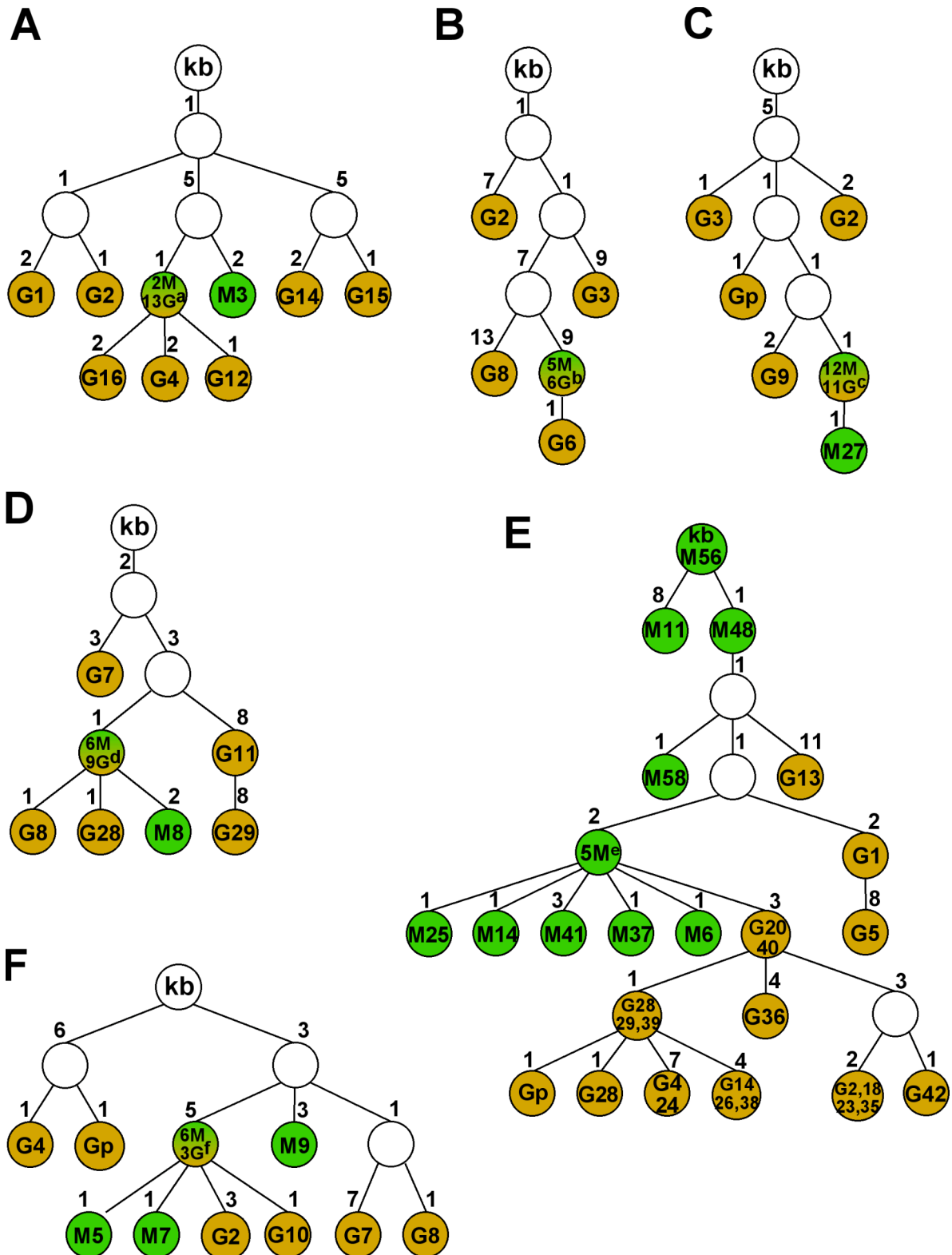


Abbildung 4 Teil 2 (Klon G-M): Genealogische Rekonstruktion klonal verwandter IgM⁺ und IgG⁺ post-GC-B-Zellen

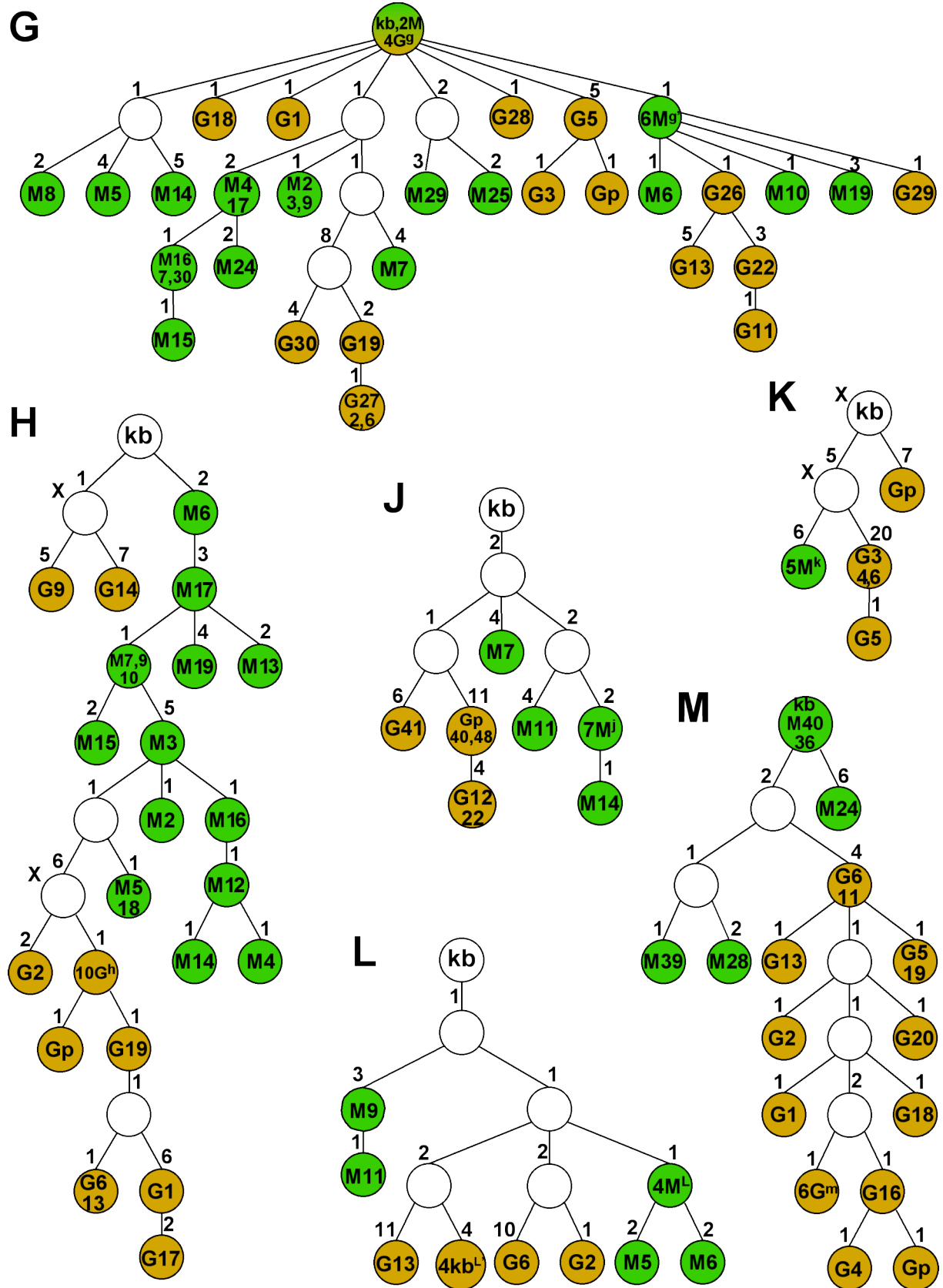


Abbildung 4 Teil 3 (Klon N-P): Genealogische Rekonstruktion klonal verwandter IgM⁺ und IgG⁺ post-GC-B-Zellen

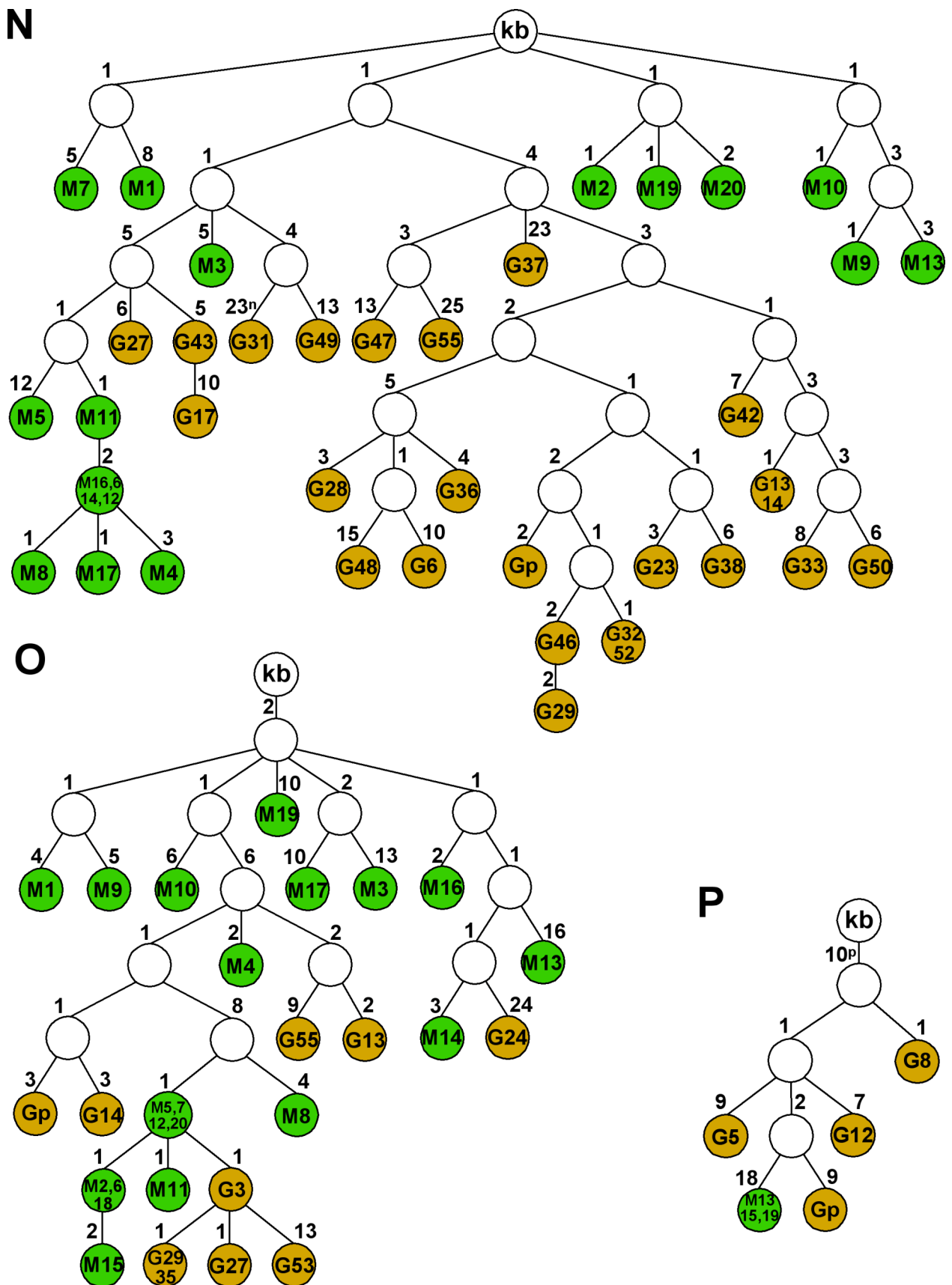


Abb. 4 (Teil 1 bis 3): Rekonstruktion der Entwicklung von post-GC-B-Zellklonen aus PB anhand von Mutationsbäumen. Die Bäume wurzeln in den Keimbahnsequenzen (kb) der V_H-Gene. Grüne Kreise repräsentieren IgM⁺ (M), braune Kreise IgG⁺ (G) Mitglieder. Die Zahlen

in den Kreisen hinter dem B-Zell-Typ entsprechen den Sequenz-Nummern, Zahlen davor bezeichnen die Anzahl identischer Sequenzen (Aufschlüsselung der Sequenz-Nummern siehe unten). Gp ist die initiale IgG⁺ Sequenz aufgrund derer der CDRIII-spezifische Primer entwickelt wurde. Leere Kreise symbolisieren putative Intermediate. Die Zahlen außerhalb der Kreise geben die Anzahl der zusätzlichen Mutationen zum nächsthöheren (putativen) Mitglied an. Ein schwarzes X außerhalb eines Kreises bezeichnet putative Wurzeln prädiversifizierter IgM⁺ Klonmitglieder als Ausgangspunkt separater IgG⁺ Verzweigungen. A: V_H1-18 exprimierender Klon (PAGE-Strategie); B-M: V_H6-exprimierende Klone (CDRIII-Strategie); N-P: V_H3-23-exprimierende Klone (CDRIII-Strategie)

^a enthält M1, M2, G6-13 und G17-21

^b enthält M1, M2, M6, M8, M10, G1, G4, G5, G7, G9 und Gp

^c enthält M2, M7, M14, M19, M20, M24, M28, M31, M33, M37, M39, M40, G1, G5, G7, G8, G10, G17, G21-24 und G29

^d enthält M2-6, M9, G4, G9, G18, G19, G21-23, G27 und Gp

^e enthält M15, M28, M43, M49 und M63

^f enthält M1-4, M6, M10, G1, G3 und G9

^g enthält M12, M21, G4, G7, G8 und G10

^{g'} enthält M13, M20, M23 und M26-28

^h enthält G3-5, G7, G8, G10-12, G15 und G18

^j enthält M1-3, M8, M10, M12 und M15

^k enthält M3, M4, M6, M9 und M10

^L enthält M2, M8, M10 und M15

^{L'} enthält G10, G11, G14 und Gp

^m enthält G3, G9, G10, G14, G15 und G17

ⁿ Die Anzahl der Mutationen beinhaltet eine 3 bp-Deletion in Sequenz G31

^p Die Anzahl der Mutationen beinhaltet eine 3 bp-Insertion in allen nachfolgenden Sequenzen

Betrachtet man die allgemeine Form der verschiedenen Klone, fällt eine beachtliche Diversität auf. Ein Großteil der Klone besteht aus vielen verschiedenen Mitgliedern, die sich zu parallelen Verzweigungen mit unterschiedlichen Mutationsmustern anordnen lassen. Darüber hinaus sind regelmäßig schwach mutierte, frühe GC-Abkömmlinge gemeinsam mit späteren, stärker diversifizierten V_H-Gen-Sequenzen aufzufinden. Dies zeigt, daß bereits früh in einer GC-Reaktion und fortwährend in ihrem Verlauf Gedächtnis-B-Zellen gebildet werden und das GC verlassen.

Unter der Annahme, daß alle Mitglieder eines Klones gefunden werden konnten, und identische Sequenzen aus derselben B-Zelle stammen, wurde eine durchschnittliche Mitgliederzahl von 1000 B-Zellen (190 bis 3600) kalkuliert (siehe 2.10).

Zusammengefasst konnten mit zwei verschiedenen experimentellen Strategien 15 verschiedene B-Zell-Klone aus 6 von 8 Blutspendern isoliert werden. Die Klone nutzten V_H-Gene der V_H1, V_H3 oder der V_H6-Familien und setzten sich zusammen aus klonal diversifizierten IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgG⁺ B-Zellen. In 9 von 14 Klonen war ein Mutationsmuster aufzufinden, das sich nur mit einer gemeinsamen GC-Erfahrung von IgM⁺ und IgG⁺ Mitgliedern eines Klones erklären lässt. Weiterhin zeigte die Analyse der Mutationsbäume, daß Gedächtnis-GC-B-Zellen mit einer sehr

hohen Diversität während der gesamten GC-Reaktion gebildet werden, wobei frühere Abkömmlinge vornehmlich IgM⁺ und spätere IgG⁺ sind.

3.3 Genexpressionsanalyse humaner B-Zell-Populationen aus PB

Das dritte Thema der vorliegenden Dissertationsschrift war eine Charakterisierung von B-Zell-Populationen aus humanem peripheren Blut anhand von Genexpressionsprofilen. Die Auswertung dieser Genexpressionsprofile ist noch nicht abgeschlossen, im Folgenden werden erste Erkenntnisse aufgeführt.

Mit einer genomweiten Genexpressionsanalyse von naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselten B-Zellen soll die Verwandtschaft dieser B-Zell-Populationen in Bezug auf ihre Genausprägung bestimmt werden. Weiterhin sollen potentiell individuelle Genmuster aufgedeckt werden, die dann in weiterführenden Studien als Anhaltspunkte für eine funktionelle Charakterisierung der einzelnen Populationen dienen können.

Es wurden zu jeder der oben genannten B-Zell-Poulationen jeweils 5 Genexpressionsprofile erstellt. Die Profile stammen von sortierten B-Zellen aus Vollblutspenden von insgesamt 9 verschiedenen Spendern. Hierbei wurde eine weitgehende Überlappung bei der Auswahl der Spender für die verschiedenen Populationen angestrebt, jedoch konnten nur selten alle vier Populationen mit ausreichender Ausbeute, Reinheit und RNA-Qualität aus einem einzelnen Spender isoliert werden. Darüber hinaus konnte die Isolierung einzelner Populationen aus einem Spender nicht immer zeitgleich durchgeführt werden, z.B. wurden alle klassengewechselten B-Zell-Profile aus separaten (wiederholten) Blutspenden angefertigt. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die erstellten Genexpressionsprofile und die jeweiligen Spender.

Tabelle 10: Aufschlüsselung der Genexpressionsprofile und zugehörigen Spender

Charge	IgM-only (M)	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ (D)	Naiv (N)	Klassengewechselt (KW)
1	Spender 1	Spender 2	Spender 2	Spender 3
2	Spender 3	Spender 4	Spender 4	Spender 2
3	Spender 2	Spender 1	Spender 1	Spender 1
4	Spender 6	Spender 5	Spender 5	Spender 3
5	Spender 7	Spender 8	Spender 8	Spender 9
Verhältnis männlich/ weiblich	3/2	3/2	3/2	3/2

3.3.1 Bestimmung eines Verwandtschaftsgrades von B-Zell-Populationen anhand hierarchischer Gliederung

Da der Phänotyp einer Zelle (d.h. ihre Eigenschaften und Fähigkeiten) die Transkription eines bestimmten Genmusters voraussetzt, kann das Transkriptom einer Zelle als hinreichendes Äquivalent ihres Phänotyps betrachtet werden (hierbei werden z.B. translationelle Genregulationsmechanismen vernachlässigt). Da die verwendeten Genexpressionsarrays (U133Plus_2.0 Arrays, Affymetrix) repräsentativ sind für das annähernd gesamte humane Transkriptom, kann der Grad einer Verwandtschaft für die untersuchten B-Zell-Populationen bestimmt werden.

Dies geschieht mit einer hierarchischen Gliederung der einzelnen Arrays (siehe 2.13.1) anhand des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten. Je stärker zwei Datensätze (oder zwei *cluster*) miteinander korrelieren, desto enger verzweigt werden sie in einem genealogischen Baum dargestellt. Eine hierarchische Gliederung über das gesamte Datenspektrum (54.675 *probe sets*) wäre irreführend: sehr viele sogenannte Haushalts-Gene (engl. housekeeping genes) werden von allen Populationen in einem mehr oder weniger gleichmäßigen Rahmen transkribiert. Gemeinsam mit technischen und auch biologischen Artefakten würde man die entsprechenden *probe sets* demnach als Hintergrundsignale bezeichnen, da sie auf einen spezifischen Phänotyp bestimmter Populationen keinen direkten Einfluß haben, aber dennoch in die Gesamtwertung einer Ähnlichkeitsmatrix Einfluß nähmen. Um eine genealogische Auswertung des Phänotyps - und nicht des Hintergrundes - zu gewährleisten, muß für eine hierarchische Gliederung gefiltert werden.

Die 54.675 *probe sets* wurden nach folgenden Kriterien gefiltert: erstens nach mindestens 2 *present calls* (nach MAS5) in wenigstens einer B-Zell-Population (Kondition), womit alle Transkripte ausgeschlossen wurden, die nicht mehr als einmal ein verlässliches Signal pro Kondition aufweisen konnten. Die übriggebliebenen 29.969 *probe sets* wurden zweitens nach aufsteigender Standardabweichung (engl. standard deviation, SD) in Gruppen zusammengefasst, z.B. alle *probe sets*, die eine SD >0,3 (12.918 *probe sets*), >0,4 (7.662 *probe sets*), >0,5 (4.717 *probe sets*), ... , >1,5 (514 *probe sets*) in mindestens einer Kondition aufwiesen. Über diese *probe set*-Gruppen wurde hierarchisch gegliedert und mittels *bootstrapping*-Verfahren die wahrscheinlichste (weil stabilste) Anordnung ermittelt. Trotz der starken Einschränkung in der Anzahl der *probe sets* gilt eine solche hierarchische Gliederung

als *unsupervised* und ist statistisch aussagekräftiger als eine *supervised* Analyse, da sie sich auf allgemeine, nicht Konditions-bezogene experimentelle Parameter stützt.

Die wahrscheinlichste hierarchische Gliederung von 20 Arrays aus je 5 naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselten B-Zell-Populationen ist in Abb. 2 gezeigt, sie war reproduzierbar für ein Spektrum von 1000 bis 5000 *probe sets*.

Abbildung 2: Hierarchische Gliederung von 20 Genexpressionsprofilen humaner B-Zell-Populationen aus PB

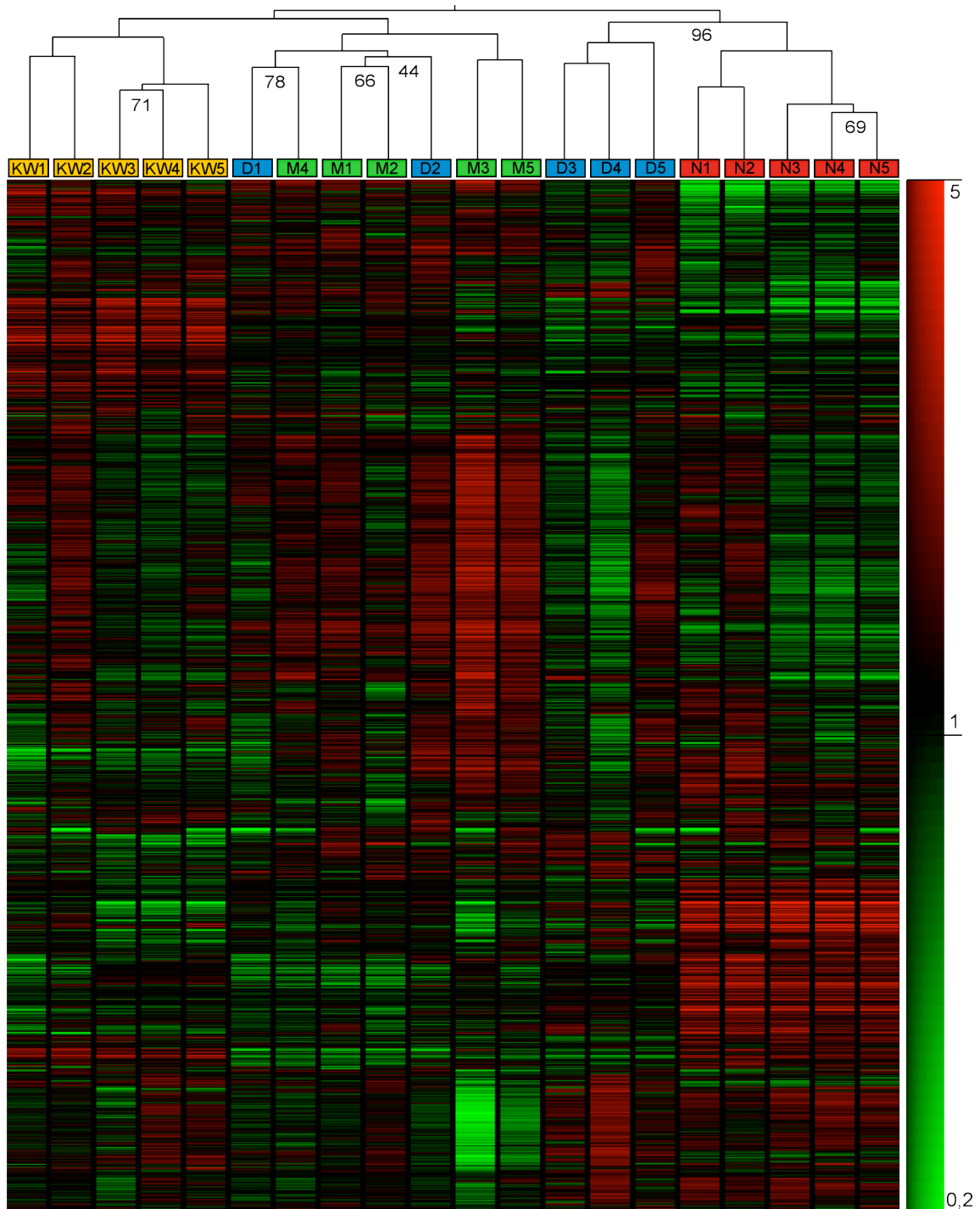


Abb. 2: Hierarchische Gliederung (*unsupervised*) nach der Average-Linkage-Methode von je 5 Genexpressionsprofilen aus naiven (N, rot), IgM⁺IgD⁺CD27⁺ (D, blau), IgM-only (M, grün) und klassengewechselten (KW, gelb) B-Zellen. Sie basiert auf 4717 *probe sets* (SD>0,5), Ähnlichkeitsmaß ist die Pearson-Korrelation. Die Zahlen unter den Verzweigungen geben die Reproduzierbarkeit dieses *clusters* (in %) in einem *bootstrapping*-Verfahren mit 100 Datensatzvariationen an. Verzweigungen ohne Zahl entsprechen 100%. Rechts: Farblegende für den Expressionsfaktor nach *probe set*-spezifischer Normalisierung.

Es war festzustellen, daß die Profile sowohl naiver als auch klassengewechselter B-Zellen separat gruppierten. Dies ist leicht nachzuvollziehen, beachtet man die jeweils stark ausgeprägten Areale Populations-spezifisch hoch bzw. niedrig exprimierter Transkripte. Die Eingliederung der IgM-only-B-Zellen erfolgte klar auf Seiten der klassischen Gedächtnis-B-Zellen, während die IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen aufsplitteten in ein Verhältnis von zwei Gedächtnis-B-Zell-ähnlichen und drei naive B-Zell-ähnlichen Profilen. Das allgemeine Muster der Genexpression war in beiden IgM⁺CD27⁺ Populationen wesentlich diffuser und uneinheitlicher. Dies liegt zum einen daran, daß die dominierenden Muster naiver und klassengewechselter B-Zellen potentielle Areale aus gleichförmig exprimierten Transkripten der anderen beiden Populationen zerpflücken. Zum anderen aber auch an einer generellen, überraschend hohen Variabilität der Datensets untereinander, vergleicht man etwa das Farbschema von D4 und D5 bzw. M2 und M3. Ebenfalls fällt auf, daß trotz einer Korrektur von Batch-Effekten mittels ComBat-Software nach wie vor die Profile aus Batch 1 (N1+2, M1+2, D1+2, KW1+2) und Batch 2 (N3-5, M3, D3-5, KW3-5) grundsätzlich zueinander ähnlicher waren. Batch 3 und 4 (M4 bzw. M5) fügten sich ein zwischen die übrigen IgM-only B-Zellen.

Zusammengefasst gruppierten naive und klassengewechselte B-Zellen separat über ein weites Spektrum an differentiell ausgeprägten Transkripten. IgM-only-B-Zellen erschienen verwandter mit klassengewechselten B-Zellen, wogegen IgM⁺IgD⁺CD27⁺B-Zellen, gemessen an ihrem Genexpressionsprofil, eine Zwischenform aus naiven und Gedächtnis-B-Zellen darstellten. Es ist wichtig festzuhalten, daß sich die dominanten Areale aus naiv- oder klassengewechselt-spezifischen *probe sets* weder in den Genexpressionsmustern von IgM-only noch in denen von IgM⁺IgD⁺CD27⁺B-Zellen wiederfinden ließen.

3.3.2 Bestimmung eines Verwandtschaftsgrades von B-Zell-Populationen mit PCA

Während eine hierarchische Gliederung die Beziehungen zwischen vollständigen Datensätzen auf einzelne Korrelationskoeffizienten reduziert, stellt die PCA einen

verfeinerten und differenzierteren Ansatz dar, verwandtschaftliche Beziehungen aufzuschlüsseln (siehe 2.13.2).

Die größte analysierte Datenmenge umfasste *probe sets* mit mindestens zwei *present calls* in wenigstens einer Kondition (29.969 *probe sets*); analysiert wurden jeweils 5 Datensätze (Spender) pro Kondition (naive, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselte B-Lymphozyten). Die 29.969 *probe sets* wurden schrittweise reduziert nach ihrer SD in wenigstens einer Kondition. Im Folgenden werden Auszüge dieser separat berechneten PCA gezeigt (Abb. 5 und Abb. 6).

Abbildung 5: *unsupervised* PCA von B-Zell-Populationen aus PB

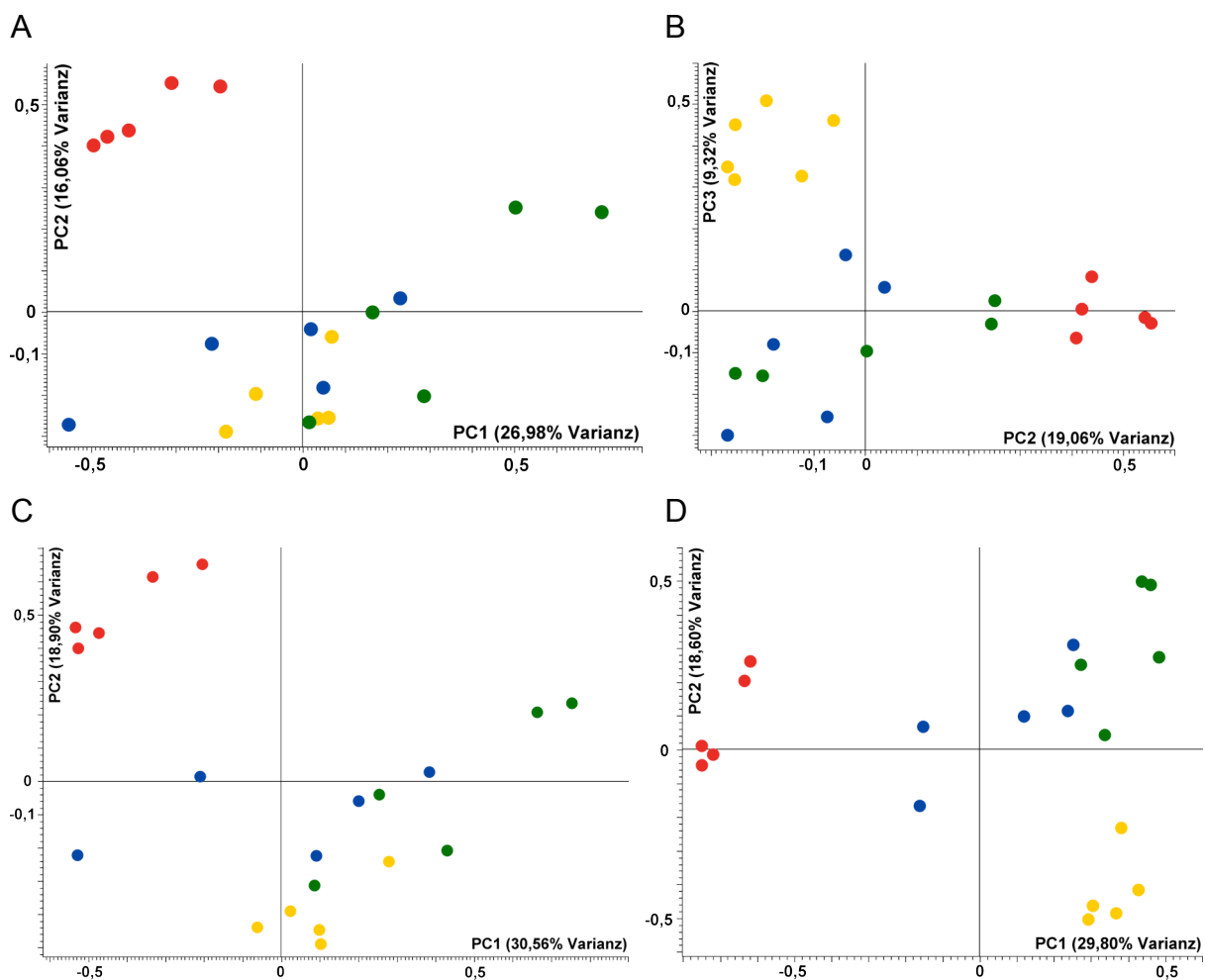


Abb. 5: PCA von naiven (rot), IgM⁺IgD⁺CD27⁺ (blau), IgM-only (grün) und klassengewechselten (gelb) B-Zellen aus PB basierend auf je 5 Genexpressionsprofilen. Die Lage im Koordinatensystem reflektiert die Ähnlichkeit der Populationen, definiert durch einen möglichst hohen Anteil der Gesamtvarianz (1., 2. bzw. 3. prinzipielle Komponente, PC, Varianzanteil in Klammern, siehe Achsenbeschriftung).

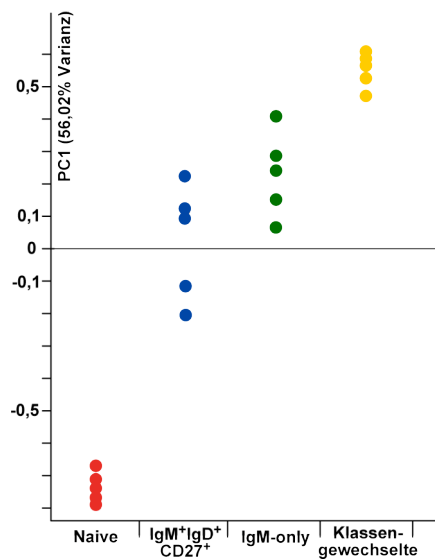
A: PC1 gegen PC2 *unsupervised* PCA über 29.969 *probe sets* (SD > 0); B: wie in A, PC2 gegen PC3; C: PC1 gegen PC2 *unsupervised* PCA über 4.717 *probe sets* (SD > 0,5); D: PC1 gegen PC2 *unsupervised* PCA über 1.046 *probe sets* (SD > 1)

Eine *unsupervised* PCA über die Genexpressionsprofile der vier B-Zell-Populationen zeigte unabhängig von der Anzahl der *probe sets* ein höher aufgelöstes Bild von den Ähnlichkeiten der Profile untereinander. Wie in der hierarchischen Gliederung bildeten sowohl naive (rot) als auch klassengewechselte (gelb) B-Zellen jeweils enge *cluster* in allen Analysen (Abb. 5 A-D). Eine PCA über 29.969 *probe sets* (Abb. 5 A und B) zeigte für die ersten beiden prinzipiellen Komponenten (PC1 und PC2), die jeweils 26,98 bzw. 16,06% der Gesamtvarianz beinhalteten, eine wesentlich schwächere Assoziation der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen mit den naiven B-Zellen. In der PC1 war nur ein einzelnes IgM⁺IgD⁺CD27⁺-Profil deutlich, ein weiteres intermediär mit naiven B-Zell-Profilen assoziiert. Dem gegenüber standen die drei restlichen IgM⁺IgD⁺CD27⁺-Profile deutlich auf Seiten der klassengewechselten B-Zell-Profile. Nahm man die PC2 hinzu (zusammen ca. 42% der Varianz), setzte sich der naive *cluster* noch deutlicher von den CD27⁺-Profilen ab. Abb. 5 B schließt PC3 mit ein, die jedoch mit nur ca. 10% zusätzlicher Varianz wenig Aussagekraft beinhaltet. Da sowohl PC2 und ansatzweise auch PC3 (zusammen ca. 30% Varianz) eine scharfe Assoziation zweier IgM-only-Profile mit dem naiven *cluster* andeuteten, so stand dem immer noch die gewichtigere PC1 mit ca. 27% Varianz gegenüber. Die Reduzierung der *probe set*-Anzahl nach SD (Abb. 5 C und D) auf 4.717 und 1.046 verstärkte diese Resultate. In beiden Fällen erklärten die jeweils ersten beiden PC zusammen ca. 50 bzw. 49% der Gesamtvarianz, wobei maximal zwei IgM⁺IgD⁺CD27⁺-Profile eine – je nach PC – intermediäre oder naive Assoziation aufwiesen. Der Großteil der Varianz aus 20 Genexpressionsprofilen ließ in einer *unsupervised* PCA drei von fünf IgM⁺IgD⁺CD27⁺-Profilen klar mit klassengewechselten, klassischen Gedächtnis-B-Zellen gruppieren.

Da laut hierarchischer Gliederung und auch in einer *unsupervised* PCA keine eindeutige Ähnlichkeit aller IgM⁺IgD⁺CD27⁺-Profile zu denen von entweder naiven oder klassengewechselten B-Zellen festzustellen war, wurde eine *supervised* PCA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden alle signifikant ($p < 0,05$; T-Test) differentiell zwischen naiven und klassengewechselten B-Zellen über einen paarweisen Vergleich ermittelt. Diese Genliste aus 2.322 *probe sets* wurde anschließend einer PCA für alle 20 Profile unterzogen (Abb. 6).

Abbildung 4: supervised PCA von B-Zell-Populationen aus PB

A



B

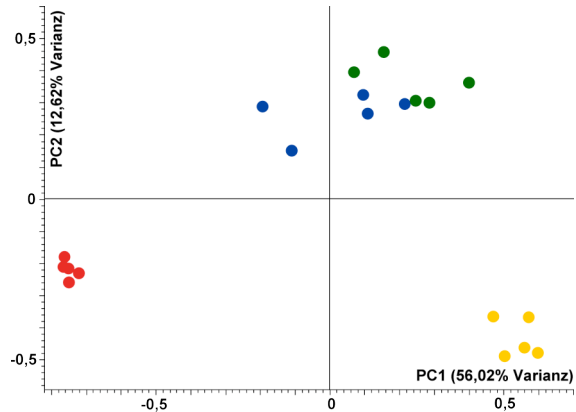


Abb. 6: supervised PCA von naiven (rot), $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ (blau), IgM -only (grün) und klassengewechselten (gelb) B-Zellen aus PB basierend auf je 5 Genexpressionsprofilen. Die Lage im Koordinatensystem reflektiert die Ähnlichkeit der Populationen, definiert durch einen möglichst hohen Anteil der Gesamtvarianz (PC1 bzw. PC2, Varianzanteil in Klammern). A: PC1 von 2.322 zwischen naiven und klassengewechselten B-Zellen differenziell ausgeprägten *probe sets* ($p < 0,05$, T-Test); F: wie in E, PC1 gegen PC2

Die supervised PCA der vier B-Zell-Populationen unterstrich mit der PC1 (ca. 56% der Varianz) den Eindruck aus den unsupervised PCA, daß $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen klassengewechselten B-Zellen ähnlicher sind als naiven. Wenn auch nach wie vor die beiden $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ -Profile tendenziell einen „naiveren“ Phänotyp aufzeigten als ihre Gegenstücke aus drei anderen Spendern, stieg der Gesamtabstand der Population zu naiven Profilen (Vergleich PC1 aus Abb. 5 A und C mit Abb. 6 A, Abb. 5 D reflektiert zu wenige *probe sets* für einen gültigen Vergleich mit Abb. 5 A).

Hierbei ist jedoch zu beachten, daß ausschließlich *probe sets* analysiert wurden, die mutmaßlich eine wichtige Rolle in entweder naiven oder klassengewechselten B-Zellen spielen, was einen verzerrten Eindruck auf die Eigenschaften von $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen vermitteln kann. D.h. in einer so restriktiven Analyse wie der angewandten supervised PCA wäre eine deutlichere Assoziation von mutierten IgM -B-Zell-Populationen mit einer der beiden Extreme zu erwarten gewesen. Nahm man zusätzlich zu PC1 die PC2 (ca. 13%) hinzu (Abb. 6 B), so setzten sich die $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ebenfalls von klassengewechselten Profilen ab und bildeten ein eigenständiges *cluster*.

Zusammengefasst waren beide $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ B-Zell-Populationen im Schnitt klassengewechselten B-Zellen ähnlicher als naiven, wobei $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen

näher zu naiven B-Zellen tendierten als IgM-only B-Zellen. Eine *supervised* PCA suggerierte eine Eigenständigkeit beider Populationen und nicht eine eindeutige Verwandtschaft mit naiven oder klassengewechselten B-Lymphozyten.

3.3.3 Charakterisierung von B-Zell-Populationen aus PB mit paarweisen Vergleichen ihrer Genexpressionsprofile

Über paarweise Vergleiche werden die Genexpressionsprofile naiver, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselter B-Zellen auf eine statistisch signifikante differentielle Ausprägung von Transkripten untersucht. Auf diese Weise sollen Genmuster aufgedeckt werden, die eine möglichst umfassende Charakterisierung einzelner Populationen ermöglichen. Solche Charakterisierungen können grundsätzlich nur auf biologische Funktionen hinweisen; sie bedürfen einer Verifizierung durch z.B. Proteinanalysen oder funktionelle Studien.

Für eine Übersicht wurden alle *probe sets* mit mindestens zwei *present calls* in wenigstens einer Kondition (29.969 *probe sets*) in den 6 möglichen paarweisen Vergleichen auf einen mindestens 2-fachen Unterschied zwischen jeweils zwei Konditionen gefiltert. In einem zweiten Schritt wurde für jedes *probe set* ein statistischer Test (T-Test) durchgeführt, *probe sets* mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit > 0,05 wurden verworfen. Im Anschluß daran wurden alle *probe sets*, die das gleiche Transkript erkennen, auf dasjenige mit der höchsten Signalintensität reduziert, d.h. *probe sets* kollabieren zu differentiiell ausgeprägten Genen. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der als differentiiell exprimiert deklarierten Gene zwischen den einzelnen Paaren.

Tabelle 11: Anzahl der differentiiell ausgeprägten Gene in B-Zell-Populationen

	Naive	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	IgM-only	Klassengewechselte
Naive		789	1105	1125
IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺			19 (121) ^a	422
IgM-only				509
Klassengewechselte				

^a Der Wert in Klammern steht für eine Genliste, die mit relaxierter Benjamini-Hochberg-Adjustierung (FDR = 10%) erstellt wurde. Das Vermeiden einer allzu stringenten Statistik soll einer Maskierung geringer Unterschiede zwischen den einander sehr ähnlichen Datensätzen der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only-B-Zellen entgegenwirken.

Die vorliegende Dissertationsschrift fokussiert sich auf eine Charakterisierung der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen anhand von Funktionen, die sie von naiven und

klassengewechselten B-Zellen unterscheiden. Werte für IgM-only B-Zellen sind zwar weiterhin angezeigt, nehmen aber keinen Einfluß auf die Berechnungen.

Zunächst wird eine Genliste von 214 Genen (390 *probe sets*) erstellt, die als differentiell ausgeprägt zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und gleichzeitig naiven und klassengewechselten B-Zellen gefunden wurden (Anhang A4). Spezifische Unterschiede zu IgM-only B-Zellen waren kein Kriterium der Analyse. Die Liste von 214 IgM⁺IgD⁺CD27⁺-spezifischen Genen wurde kategorisiert in: Gene verschiedener Signaltransduktionswege, der Zellzyklusregulation des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix, Transkriptionsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle (Anhang A4). Ebenfalls waren 51 putative Transkripte von offenen Leserastern und 55 weitere funktionell nicht näher charakterisierte Transkripte Teil der 390 *probe sets*. Diese 106 Elemente wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Liste von 214 Genen wurde manuell auf Schlüsselemente geprüft. Dies waren Gene bzw. Kategorien, die eine wichtige Funktionen in Lymphozyten ausüben oder sich durch hohe Expressionsfaktoren zwischen den Populationen auszeichnen. Auch Kategorien mit auffallend vielen Mitgliedern (z.B. „Aufbau und Regulation Zytoskelett“) oder mit definierter Funktion in B-Lymphozyten (z.B. BCR-Signalweg, Ca⁺⁺-Signalweg etc.) wurden als potentielle Hinweise auf Besonderheiten von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen in Betracht gezogen.

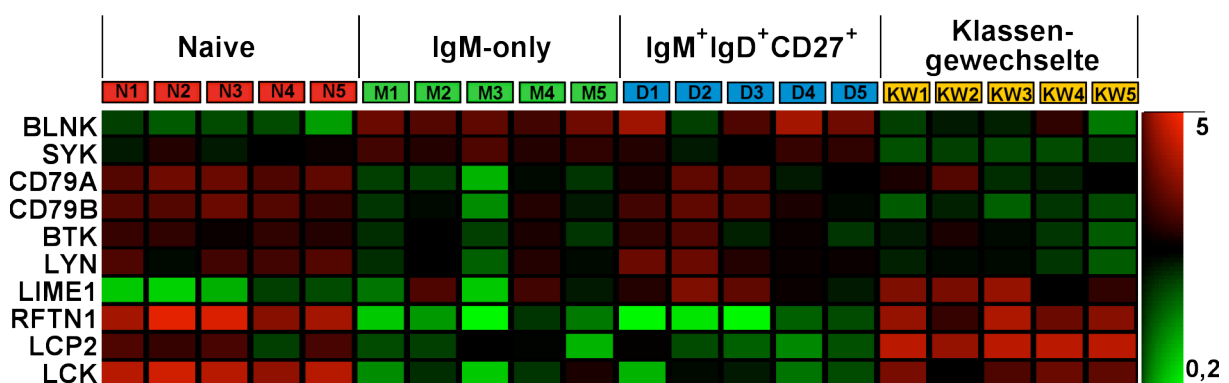
Um solche Besonderheiten zu untermauern (oder verwerfen) wurden mittels Literatur-/ Gendatenbank-Recherche Listen von Genen erstellt, für deren einzelne Mitglieder eine Verwandtschaft oder funktionale Verknüpfung mit den Schlüsselementen bekannt ist. Diese Genlisten wurden in paarweisen Vergleichen über drei Konditionen (naive, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselte B-Zellen) auf ihre statistisch signifikant differentiell exprimierten Mitglieder reduziert anhand einer Varianzanalyse ($p < 0,05$) und paarweisem Tukey-Test ($p < 0,05$) unter Berücksichtigung einer FDR nach Benjamini und Hochberg. Im weiteren Verlauf der Dissertationsschrift werden Gene, die diese Kriterien erfüllten, kurz als „differentiell exprimierte Gene“ aufgeführt. Es ist wichtig zu bemerken, daß die paarweisen Vergleiche auf allen 54.675 *probe sets* basierten. Daraus resultierte, daß hier ebenfalls Gene mit einem Expressionsfaktor < 2 , mit nur einem *present call* oder mit Expressionsunterschieden in nur einer der drei Konditionen in die Analyse eingeschlossen waren. Dieser Strategiewechsel geschah, damit nicht länger Transkriptionsmuster für eine Charakterisierung bestimmt, sondern einzelne Elemente daraus umfassend ausgewertet werden konnten. Der Filter für nicht

exprimierte Gene liegt nicht mehr in der Betrachtung von *present / absent calls*, sondern in einer verstärkt konservativen statistischen Varianzanalyse.

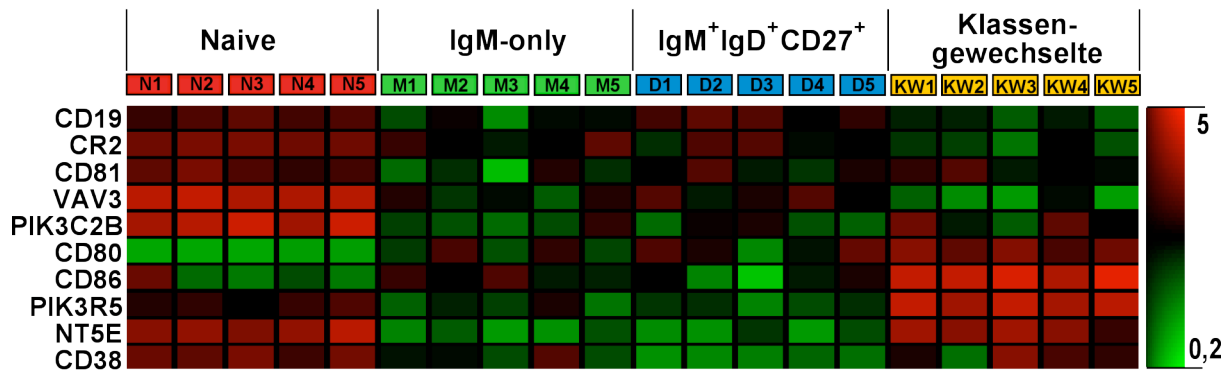
Im Folgenden werden die wichtigsten Resultate dieser paarweisen Vergleiche vorgestellt. Ein Großteil der 214 IgM⁺IgD⁺CD27⁺-spezifischen Gene (Anhang A4) kodierte für Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle. Besonders eine Kategorie aus 22 Mitgliedern der BCR-Signaltransduktion stach hervor. Basierend auf Online-Datenbanken (Tabelle 1) wurde eine Liste aus 55 Genen zusammengestellt, die unmittelbar an der Rezeption, Modifikation und Weitergabe von Signalen einer BCR-Kreuzvernetzung beteiligt sind (nicht gezeigt). Gene der schweren und leichten Kette des BCR wurden entfernt. Diese Liste wurde erstens nach „differentieller Expression“ (s.o.) und zweitens nach einem Mindestsignalwert von 50 in mindestens 5 Datensätzen einer Kondition gefiltert. Ein Mindestsignalwert von 50 wurde gewählt, weil *probe sets* mit niedrigerem Signalwert - trotz Normalisierung - eher statistische Fluktuation (Hintergrundrauschen) als reguläre Expression repräsentierten (nicht gezeigt). Ebenfalls befinden sich Signalwerte von nicht-B-Zell-Genen (z.B. T-cell receptor alpha chain, TCRA) in der Regel auf einem Niveau unter 50 (nicht gezeigt). Die resultierende Liste aus 29 Genen wurde eingeteilt in solche, die dem Kern-Signaltransduktionspfad angehören (Abb. 7 A) und solche, die entweder verstärkend (Abb. 7 B) oder dämpfend auf ein BCR-Signal wirken (Abb. 7 C).

Abbildung 7: Differentiell exprimierte Gene der BCR-Signaltransduktion

A



B



C

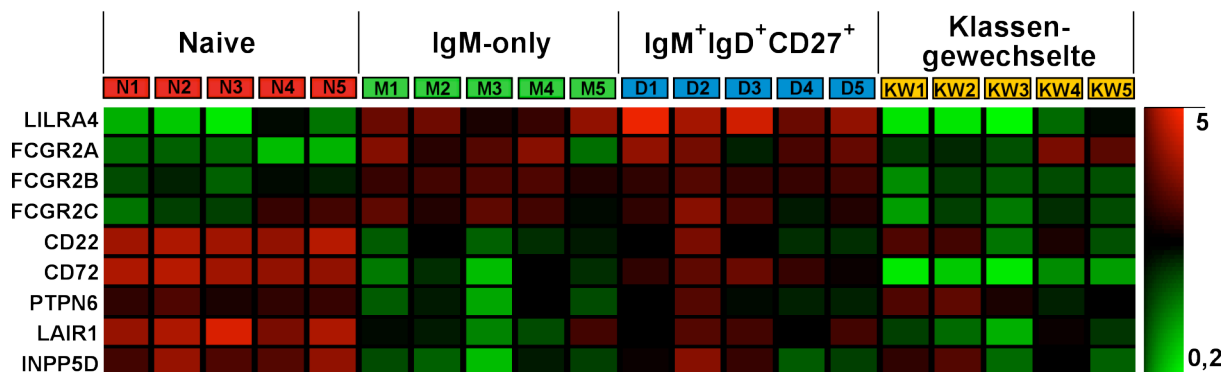


Abb. 7: Abgebildet sind die Signalwerte von *probe sets* mit der höchsten Signalintensität von allen *probe sets* eines Transkriptes. Die Signalwerte liegen *probe set*-spezifisch normalisiert vor (engl. per-Gene-normalization) und sind tabellarisch aufgelistet nach Kondition/Datensatz und Gensymbol. Die Legende gibt Auskunft über ein Expressions-Spektrum von 5-fach höherer (rot) bis zu 5-fach niedrigerer (grün) Signalintensität eines *probe set*-Mittelwertes (schwarz). Gezeigt sind statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene mit einem Mindestsignalwert von 50. A: Gene des zentralen BCR-Signaltransduktionsweges; B: Gene mit kostimulierendem Einfluß; C: Gene mit inhibierendem Einfluß auf die BCR-Signalweitergabe.

Neben Genen der BCR-Signaltransduktion sind Moleküle der BCR-Kostimulation (CD19, CD80, CD86) (Fearon und Carter, 1995; Linsley et al., 1994) und auch – Inhibierung (*Fcγ-receptor 2* (FCGR2), CD22, CD72) (Fournier et al., 2008; Kumanogoh et al., 2000; Ravetch und Lanier, 2000) ungleich stark ausgeprägt. Von den insgesamt 29 Genen sind 18 Gene mit einer besonderen Gewichtung in naiven oder klassengewechselten B-Zellen exprimiert, 11 Gene zeigen jedoch ein Expressionsmuster, das auf Besonderheiten von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ bzw. IgM-only-B-Zellen in Bezug auf BCR-Signalverarbeitung schließen lässt. Es ist wichtig zu bemerken, daß kaum eines der Gene einen mittleren Signalwert von 50 in einer Kondition unterschritt (nicht gezeigt). Das bedeutet, daß zwar deutliche Unterschiede im Expressionsniveau der Signalmoleküle vorliegen, jedoch alle Faktoren prinzipiell jeder Population zur Verfügung stehen. Ausnahmen dazu sind *nucleotidase 5E* (NT5E, CD73), CD38 und *lymphocyte cytosolic protein 2* (LCP2); deren Transkripte

sind nicht in mutierten IgM⁺ B-Zellen nachweisbar. Auch *raft linker protein 1* (RFTN1), *leukocyte immunoglobulin-like receptor 4* (LILR4) und FCGR2 (CD32) sind interessant im Hinblick auf eine mögliche Einzigartigkeit der BCR-Signalverarbeitung in IgM⁺CD27⁺ B-Zellen.

Eine der wichtigsten Konsequenzen der BCR-Kreuzvernetzung ist eine Modulierung der intrazellulären Kalzium-Konzentration als „second messenger“ (Engelke et al., 2007; Oh-hora und Rao, 2008). Da neben Unterschieden in der BCR-Signaltransduktion auch einige Gene des Ca⁺⁺-Signalweges als differentiell exprimiert in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen vorlagen (Anhang A4), lag es nahe ebenfalls zu diesem Signalweg eine umfassende Genliste (ca. 250 Gene) zu erstellen und auf Signifikanz zu testen. Quelle für diese Genliste waren die gängigen Datenbanken (Tabelle 1) und zusätzlich eine Auswahl aktueller Primärliteratur (Dolmetsch et al., 1997; Engelke et al., 2007; Kurosaki et al., 2000; Lewis, 2003; Oh-hora und Rao, 2008; Prakriya und Lewis, 2003). Ein signifikantes Muster wie in der BCR-Weitergabe war über eine breite Palette von Genen der Ca⁺⁺-Signaltransduktion nicht aufzufinden (nicht gezeigt). Zwar differierten wichtige Gene für die unmittelbare BCR-Ca⁺⁺-Transduktion (STIM1-2, ORAI1-3) (Gwack et al., 2007; Prakriya et al., 2006) statistisch signifikant in ihrer Expression (leicht erhöht in naiven und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen), jedoch war der Expressionsfaktor < 1,3 und die Signalwerte in allen Konditionen so hoch, daß eine funktionelle Wirkung unwahrscheinlich ist (nicht gezeigt). Interessant dagegen erschien das Expressionsmuster von Inositol-Triphosphat-Rezeptoren (ITPR), essentiellen Mediatoren des *store operated calcium release* (SOCR) nach BCR-Kreuzvernetzung (Sugawara et al., 1997).

Abbildung 8: Differentielle Expression von Rezeptoren für SOCR-Regulation

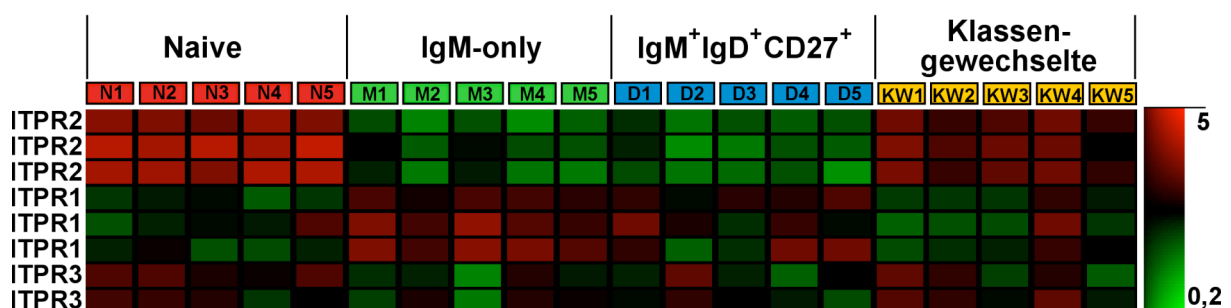


Abb. 8: Abgebildet sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von allen *probe sets* für Transkripte von ITPR1-3. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Die Expressionsunterschiede von ITPRs (besonders Typ1 und 2) sind gegenläufig in mutierten IgM⁺ bzw. naiven und klassengewechselten B-Zellen. IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen enthalten vermehrt Transkripte für ITPR1 (ca. 1,5-fach), dafür weniger ITPR2 (ca. 4-fach) und ITPR3 (ca. 1,3-fach) (Abb. 8).

Eine unterschiedliche und kombinatorische Expression der drei Inositol-Triphosphat-Rezeptoren bestimmt eine Selektivität bezüglich dreier Transkriptionsfaktoren in Lymphozyten (Dolmetsch et al., 1997; Li et al., 1998). Diese Transkriptionsfaktoren mit zentralen Funktionen in B-Lymphozyten (Matthias, 1998; Oh-hora und Rao, 2008) sind *nuclear factor κB* (NFκB), *octamer binding transcription factor 1* (Oct1) und *nuclear factor of activated T-cell* (NFAT) (Choi et al., 1994; Dolmetsch et al., 1998). Eine differentielle Expression dieser drei Transkriptionsfaktoren (bzw. ihrer Untereinheiten) ist nicht signifikant (nicht gezeigt) und ließe nur schwerlich eine Aussage über ihre Aktivität zu, da diese hauptsächlich auf Protein-Ebene reguliert wird. Zur Verifizierung eines Einflusses der jeweiligen ITPR-Zusammensetzungen auf eine Selektivität bezüglich NFκB, Oct1 und NFAT, wurden Listen putativer Zielgene erstellt. Diese Listen beruhen ausschließlich auf den Motiv-basierenden Genlisten (C3) der MSigDB. Sämtliche Gene mit putativen *cis*-Bindestellen für NFκB, Oct1 und/oder NFAT (initial jeweils 96, 555 und 902 Gene) wurden manuell auf Gene mit bekannter Funktion in B-Lymphozyten reduziert. Daraus resultierten 62, 92 bzw. 155 differentiell exprimierte Gene (65%, 17% und 17% der initialen Listen) mit Signalwerten > 50 in mindestens einer Kondition (Abb. 9-11). 35 Gene aus diesen Genlisten waren in mehr als einer dieser Listen enthalten, IL6 und inhibitor of NFκB (NFKBIA) wurden von allen drei Transkriptionsfaktoren reguliert (nicht gezeigt). Darüber hinaus waren 27 Gene der Liste mit IgM⁺IgD⁺CD27⁺-spezifischer Expression (214 Gene) ebenfalls Zielgene von NFκB, Oct1 und/oder NFAT (nicht gezeigt).

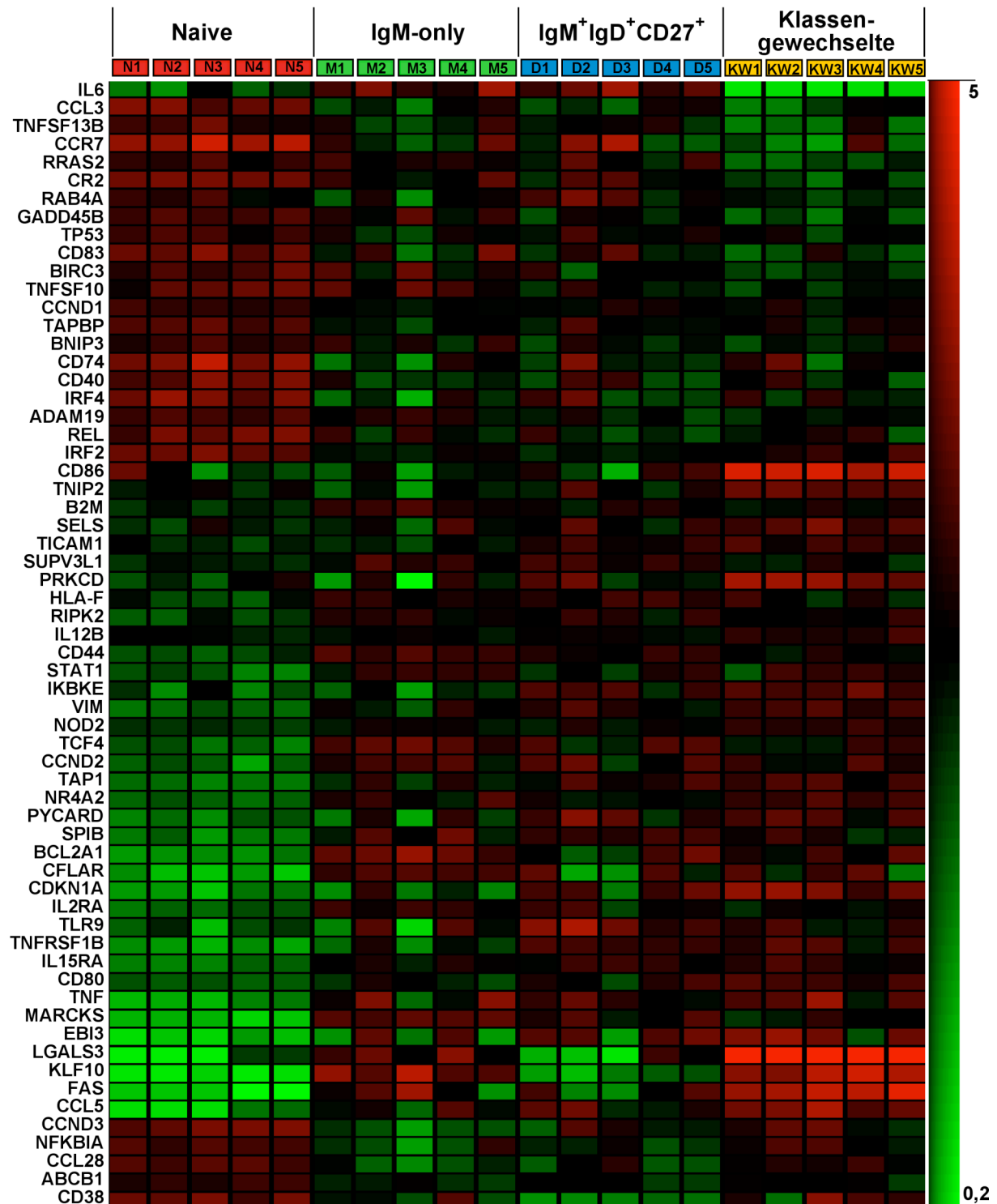
Abbildung 9: Differenziell exprimierte Zielgene von NF κ B

Abb. 9: Abgebildet sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differenziell exprimierten Zielgenen des Transkriptionsfaktors NF κ B. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Abbildung 10: Differentiell exprimierte Zielgene von Oct1

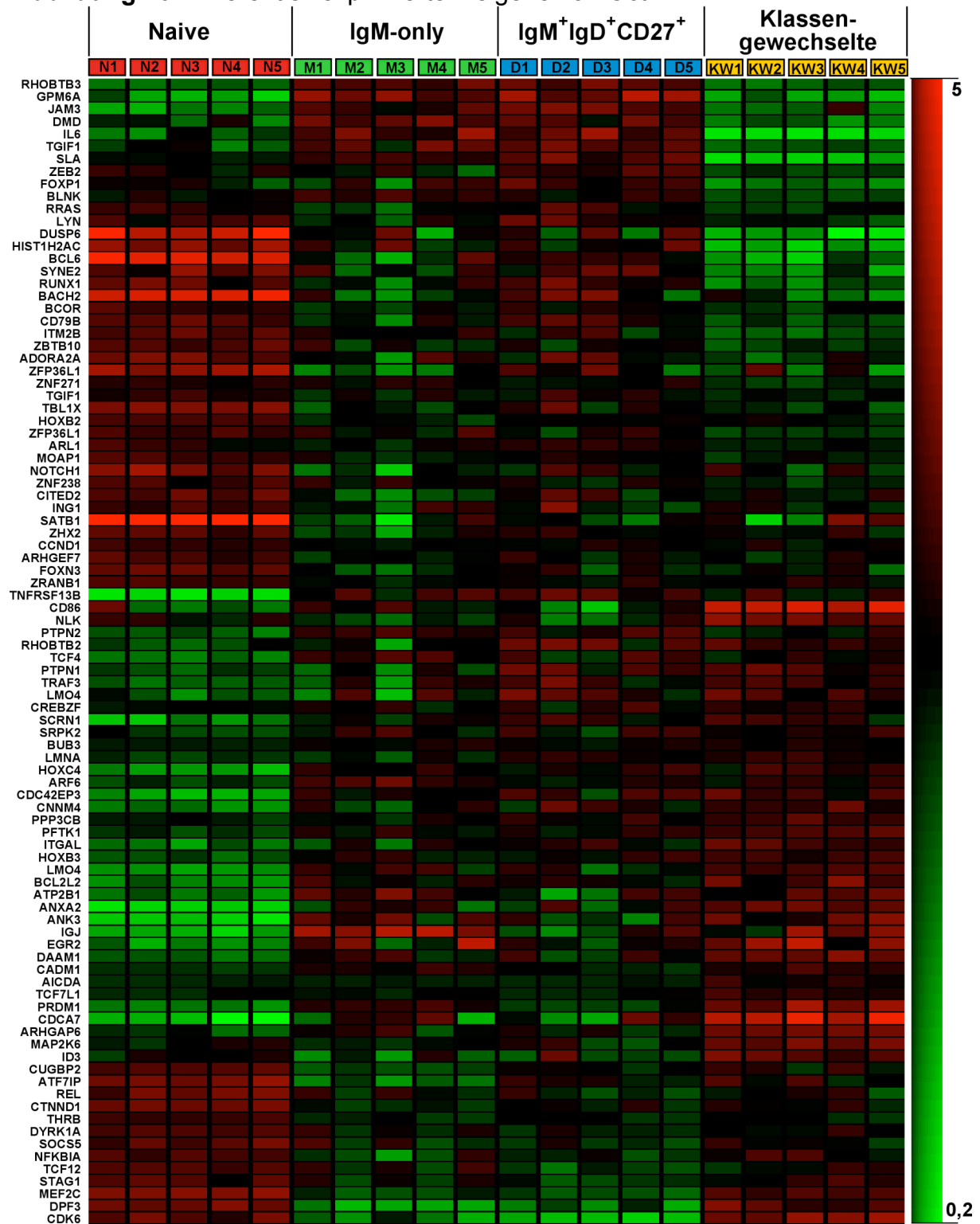


Abb. 10: Abgebildet sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differentiell exprimierten Zielgenen des Transkriptionsfaktors Oct1. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Abbildung 11: Differenziell exprimierte Zielgene von NFAT

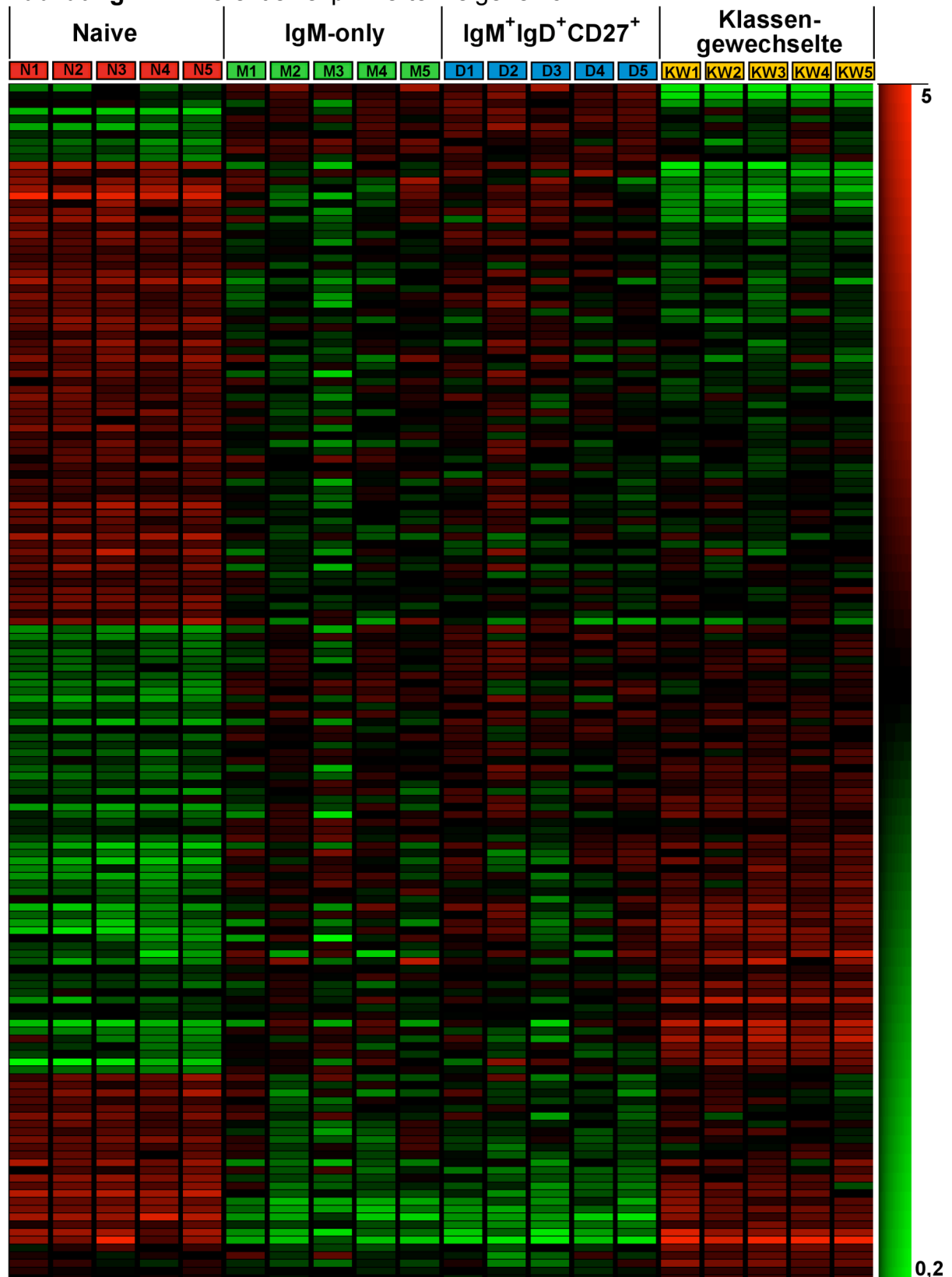


Abb. 11: Abgebildet sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und klassengewechselten B-Zellen differenziell exprimierten Zielgenen des Transkriptionsfaktors NFAT. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Eine Liste mit den entsprechenden Gensymbolen ist zu finden in

Anhang A5. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Die Zielgene von NFκB, Oct1 und NFAT (Abb. 9-11) zeigten ein differentielles Expressionsmuster mit bis zu 50-fachem Unterschied im Transkriptionsniveau. Die meisten Gene waren besonders stark oder schwach in naiven oder klassengewechselten B-Zellen transkribiert; sowohl IgM⁺IgD⁺CD27⁺ als auch IgM-only B-Zellen zeigten hier ein intermediäres Expressionsniveau. Es ist interessant zu bemerken, daß Gene, die einen klassengewechselten Phänotyp ausmachten (hoch in klassengewechselten B-Zellen), optisch keinen Unterschied zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only B-Zellen aufwiesen. Jedoch waren Gene, die einen naiven Phänotyp bedingten tendenziell leicht stärker in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen transkribiert (beachte Abb. 10 und 11). Darüber hinaus enthielten die Listen zu NFκB, Oct1 und NFAT jeweils 6, 25 und 37 Gene (10%, 27% und 24%), die spezifisch in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only B-Zellen (nicht) transkribiert werden.

Zusammengefasst konnte für Gene der BCR-Signaltransduktion, der Ca⁺⁺-Signalweitergabe und jeweils 17%, 17% bzw. 65% der Zielgene von NFκB, Oct1 und NFAT ein deutliches Expressionsmuster für naive, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselte B-Zellen festgestellt werden. Diese Unterschiede sind wertvolle Anhaltspunkte für Populations-spezifische Charakteristika bei der Ca⁺⁺-abhängigen Signaltransduktion.

Es existiert eine Vielzahl weiterer Rezeptoren und signalgebender Moleküle, die einen Einfluß auf B-Lymphozyten oder ihre Interaktionspartner ausüben können. In Abb. 12 ist eine Auswahl solcher Rezeptoren und Transmitter mit signifikant unterschiedlicher Expression in mindestens einer Kondition aufgeführt. Die Gene für diese Analyse rekrutierten sich aus den üblichen Datenbanken (Tabelle 1). Um die zunächst sehr große Liste (fast 500 Gene) auf wesentliche Unterschiede zu beschränken, wurde hier ein Schwellenwert von 150 (mittlere Signalintensität) in mindestens einer Kondition festgelegt.

Abbildung 12: Differentiell exprimierte Hormone, Interleukine, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren

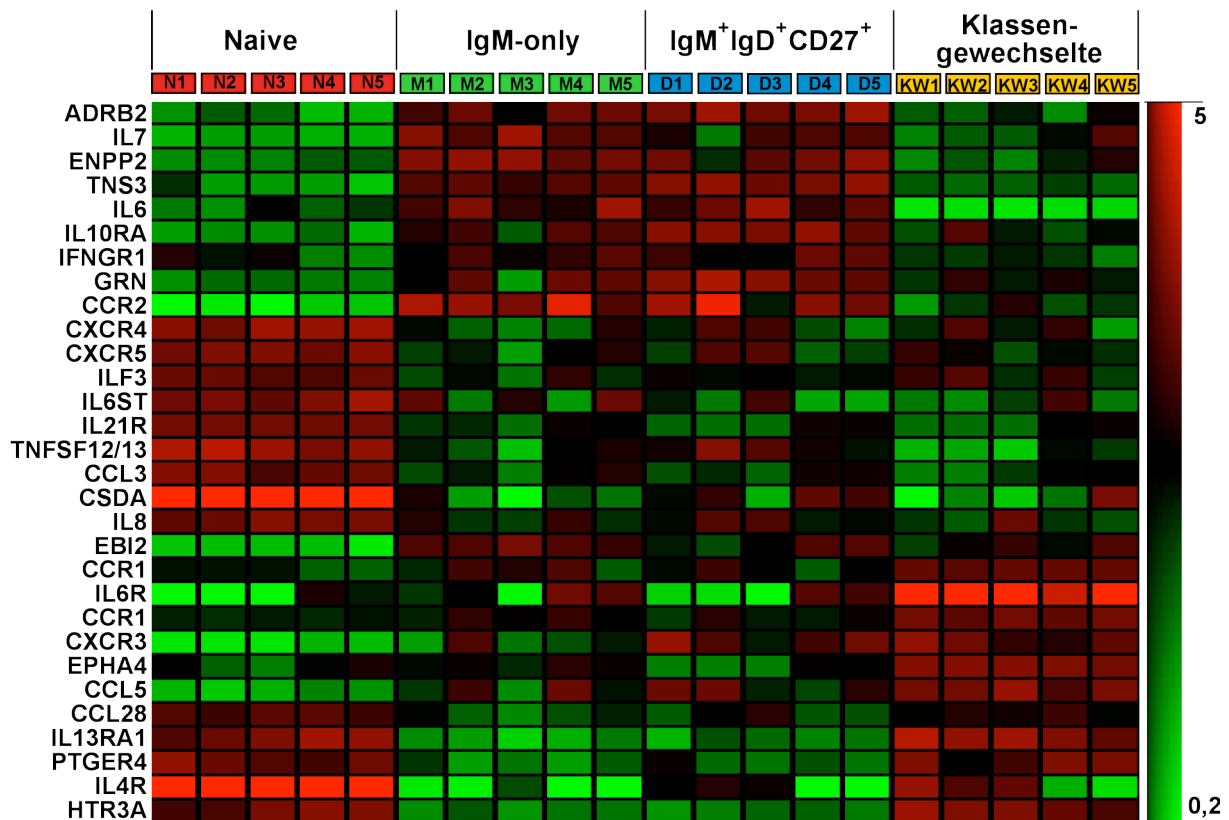


Abb. 12: Abgebildet sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differentiell ausgeprägten Rezeptoren und Signaltransmittern. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Interleukine, Chemokine, Tumornekrosefaktoren, Interferone und deren Liganden (Rezeptoren) gehören zur Gruppe der Zytokine und sind die wichtigsten Moleküle für Zellkommunikation im Immunsystem (Janeway und Travers, 1997). Ihre Funktionen sind so divers, daß an dieser Stelle nicht detailliert auf jedes einzelne Mitglied der Liste in Abb. 12 eingegangen werden kann. Es sei hier auf einige Gene mit sehr hohen Expressionsfaktoren (5-10-fach) hingewiesen, die an anderer Stelle (siehe Diskussion) erschöpfender diskutiert werden. Das Zytokin Interleukin 6 (IL6) wurde beinahe ausschließlich von IgM⁺CD27⁺ B-Zellen transkribiert, während sein Rezeptor (IL6R) vermehrt in klassengewechselten B-zellen gefunden wurde. Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR5 hatten beide - im Vergleich zu naiven - wesentlich niedrigere Transkriptionsniveaus in CD27⁺ B-Zellen. Reziprok dazu konnte *Epstein-Barr virus-induced gene 2* (EBI2) verstärkt in CD27⁺ B-Zellen ausgeprägt vorgefunden werden. Letztlich seien noch die Rezeptoren für IL4, IL10

und IL13 erwähnt. Die Transkription dieser Ketten (IL4R und IL13RA) geschah hauptsächlich in naiven und klassengewechselten B-Zellen. Im Gegensatz dazu war der Rezeptor für IL10, ebenfalls ein wichtiger Stimulator für B-Lymphozyten, vornehmlich in IgM⁺CD27⁺ Zellen aufzufinden.

Adrenergic beta receptor 2 (ADRB2) wurde vornehmlich von mutierten IgM⁺ B-Zellen ausgebildet, naive und klassengewechselte B-Zellen hatten sehr geringe Transkriptionswerte. Umgekehrt verhielt es sich für einen Serotonin-Rezeptor (HTR3A), dieser schien in IgM-only und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen zu fehlen.

Abschließend sei erwähnt, daß ca. 50% der in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ oder klassengewechselten B-Zellen hoch differentiell exprimierten Zytokine/ Zytokinrezeptoren und anderer Signalmoleküle aus Abb. 12 ein Expressionsmuster spezifisch für mutierte IgM⁺ B-Zellen aufweisen. Zusammen mit den oftmals dramatischen Einflüssen auf B-Lymphozyten und deren Interaktionspartner ist diese Genliste vermutlich eine spannende Quelle für Ansätze zu funktionellen Studien.

IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen wurden als migrierendes Pendant zu MGZ-B-Zellen vorgeschlagen (Weller et al., 2004). Da für die Ausbildung eines MGZ-B-Zell-Kompartimentes in Maus und Mensch der Notch2-Signalweg eine wichtige Rolle spielt (Kuroda et al., 2003; Pillai et al., 2004; Saito et al., 2003; Scheeren et al., 2008), war es interessant zu untersuchen, ob eine Notch-Signatur (oder Spuren davon) in IgM⁺CD27⁺ B-Zellen gefunden werden konnten (siehe auch Anhang A4: Wnt-/ Hegehog-/ Notch-Signalweg). Zu diesem Zweck wurde aus Datenbank-Quellen und Primärliteratur (Borggreffe und Oswald, 2009) eine Liste von Notch-Signaltransduktions- und -Zielgenen erstellt (ca. 80 Gene) und auf signifikante Expressionsunterschiede getestet (Abb. 13).

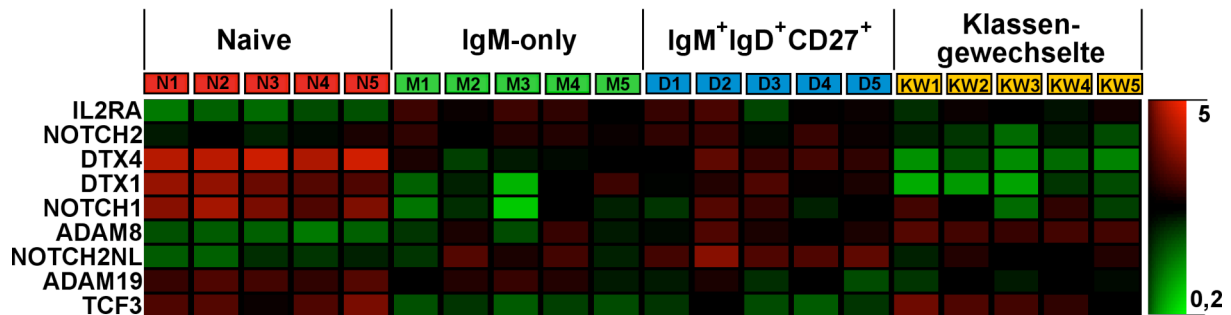
Abbildung 13: Differenziell exprimierte Notch-Signaltransduktions- und -Zielgene

Abb. 13: Abgebildet sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differenziell ausgeprägten Gene des Notch-Pfades und seiner Zielgene. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Eine Notch-Signatur war in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen nicht erkennbar. Nur 37 der 162 *probe sets* hatten Signalwerte über 50, von ca. 80 Genen waren nur 9 signifikant differenziell exprimiert (Abb. 13). Weiterhin ergab sich kein Expressionsmuster, das auf IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen gewichtet war, sondern ein eher diffuses Bild, das hohe Transkriptionslevel nur in naiven B-Zellen zeigte. Dem Gesamteindruck, daß eine schwache Transkriptmenge konsistent in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen vorliegt, muß entgegengehalten werden, daß die Unterschiede im Transkriptionslevel zu IgM-only oder klassengewechselten B-Zellen sehr niedrig sind (< 1,5). Schließlich fehlten essentielle Zielgene von Notch, wie etwa *Homolog of Enhancer of Split* (HES); der Transkriptionsfaktor 3 (TCF3) war sogar stärker in naiven bzw. klassengewechselten B-Zellen ausgeprägt.

Ein ähnliches Bild ergab sich für Gene des *Wingless-Type MMTV Integration Site Family* (Wnt)-Signalweges; auch hier war keiner der Populationen eine deutliche Signatur aus differenziell ausgeprägten Genen zuzuweisen (Abb. 14).

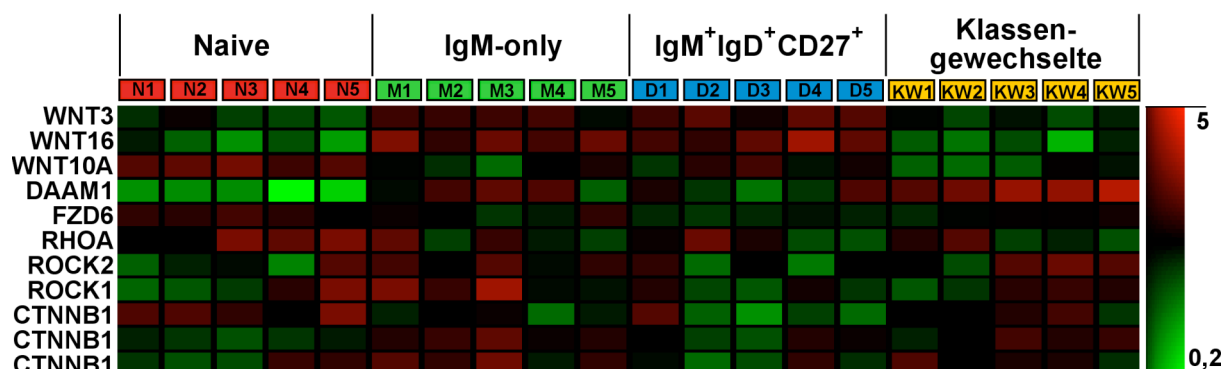
Abbildung 14: Differenziell exprimierte Gene der WNT-Signaltransduktion

Abb. 14: Abgebildet sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differentiell ausgeprägten Gene des WNT-Pfades. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblgende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Ebefalls zeigten Zielgene des WNT-Signalweges (Zyclin D1-3, *Baculoviral IAP-repeat containing* (BIRC), *X-linked Inhibitor of Apoptosis*, (XIAP) (entnommen aus KEGG) keine signifikanten Unterschiede, einzig Actin Gamma 1 (ACTG1) jedoch nicht Actin Beta (ACTB) (nicht gezeigt). Bemerkenswert ist die Transkription der Gene Wnt3 und Wnt16, sie waren die einzigen für mutierte IgM⁺ B-Zellen spezifischen Gene, wiesen Signalwerte zwischen 200 und 700 bzw. Expressionsfaktoren von 3- bis 5- fach auf. Über die Rolle von Wnt3 oder Wnt16 in Lymphozyten ist wenig bekannt, Wnt16 ist auf Prä-B-Zellen ausgeprägt (Müschen et al., 2002). Eine plausible Erklärung für die Expression beider Gene wäre eine Signalwirkung auf interagierende Zelltypen (MacDonald et al., 2009).

Zusammengefasst zeigt keine der analysierten B-Zell-Populationen eine Notch- oder Wnt-Signatur. Die 8 Gene aus der Liste mit mehr als 2-fachem Expressionsunterschied (Anhang A4) tauchen zwar in der Analyse wieder auf, ergeben jedoch kein konsistentes Bild.

Eine jüngere Untersuchung an humanen naiven, IgM⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen aus der Milz konnte zeigen, daß CD27⁺ B-Zellen – unabhängig von externen Stimuli – schneller in Proliferation gehen als naive B-Zellen (Good und Tangye, 2007). Ursache hierfür war die Expression von Zellzyklusregulatoren in naiven B-Zellen, welche eine Zellzyklusruhe (Quieszenz) bewirken (*Krüppel-like factor 4*, (KLF4), KLF9 und *promyelocytic leukemia zinc-finger*, (PLZF)). Da mehrere solche Faktoren in der Liste aus 214 IgM⁺IgD⁺CD27⁺-spezifischen Genen auftraten, wurde eine Liste wichtiger Zellzyklus-Repressoren (KLFs, *forkhead transcription factor O* (FOXO) und *cyclin dependent kinase inhibitor* (CDKN) (Richards et al., 2008) auf signifikante Expressionsmuster getestet (Abb. 15).

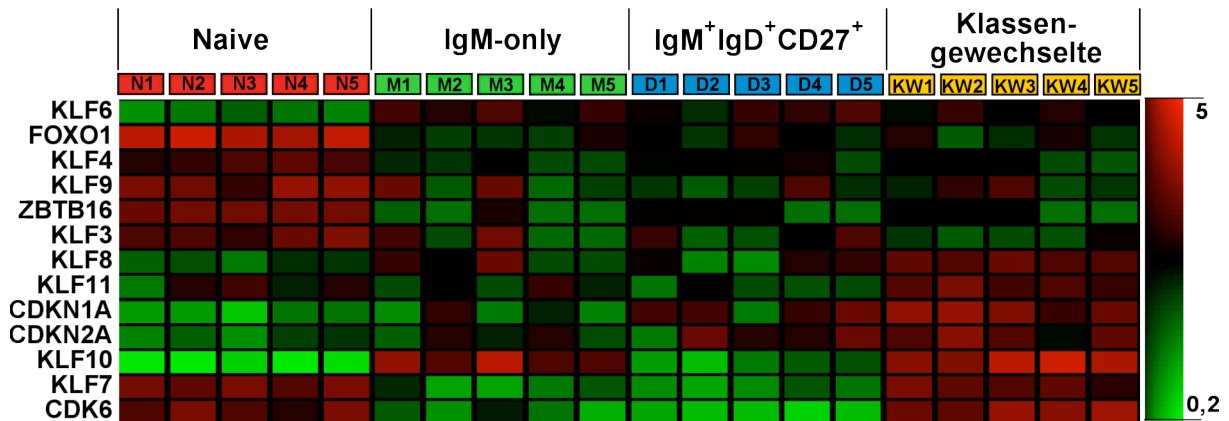
Abbildung 15: Differentiell exprimierte Zellzyklus-Repressoren und CDK6

Abb. 15: Gezeigt sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differenziell ausgeprägten Zellzyklus-Repressoren und CDK6. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gen-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

In der vorliegenden Analyse konnte eine verstärkte Expression von KLF4, KLF9 und PLZF (ZBTB16) in naiven B-Zellen bestätigt werden (Good und Tangye, 2007). Darüber hinaus zeigten FOXO1 und KLF3 ein vergleichbares Expressionsmuster mit ähnlichen Transkriptionsunterscheiden (zwischen 3- und 10-fach). Während KLF6 umgekehrt dazu in CD27⁺ B-Zellen 2-fach höher exprimiert vorliegt, sind außerdem noch KLF8, KLF11 und CDKN1A/2A vornehmlich auf Seiten der klassengewechselten B-Zellen besonders stark vertreten. Eine besondere Expression zeigt KLF10: außer *probe sets* für Immunglobulin D (IGHD) zeigt kaum ein Gen eine so deutliche Übereinstimmung von naiven und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen (nicht gezeigt). KLF7 wiederum ist spezifisch für naive bzw. klassengewechselten B-Zellen. Ein weiteres Gen, *cyclin dependent kinase 6* (CDK6), ist kein Zellzyklus-Repressor sondern (gemeinsam mit CDK4) am Übergang von der G₀/G₁ zur S-Phase des Zellzyklus beteiligt (Guan et al., 1994). Das weitgehend redundante CDK4 liegt nicht differentiell transkribiert vor (nicht gezeigt).

Ergänzend zu Untersuchungen an B-Zell-Populationen aus Milzgewebe konnte eine Reihe weiterer Zellzyklus-Regulatoren mit möglichen spezifischen Funktionen in entweder naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und/oder klassengewechselten B-Zellen identifiziert werden.

Zwei weitere Gen-Kategorien wurden aus Datenbanken (Tabelle 1) ergänzt und auf signifikante Expressionsmuster untersucht: Zelladhäsionsmoleküle (Abb. 16) und Gene des Zytoskelettes (Abb. 17).

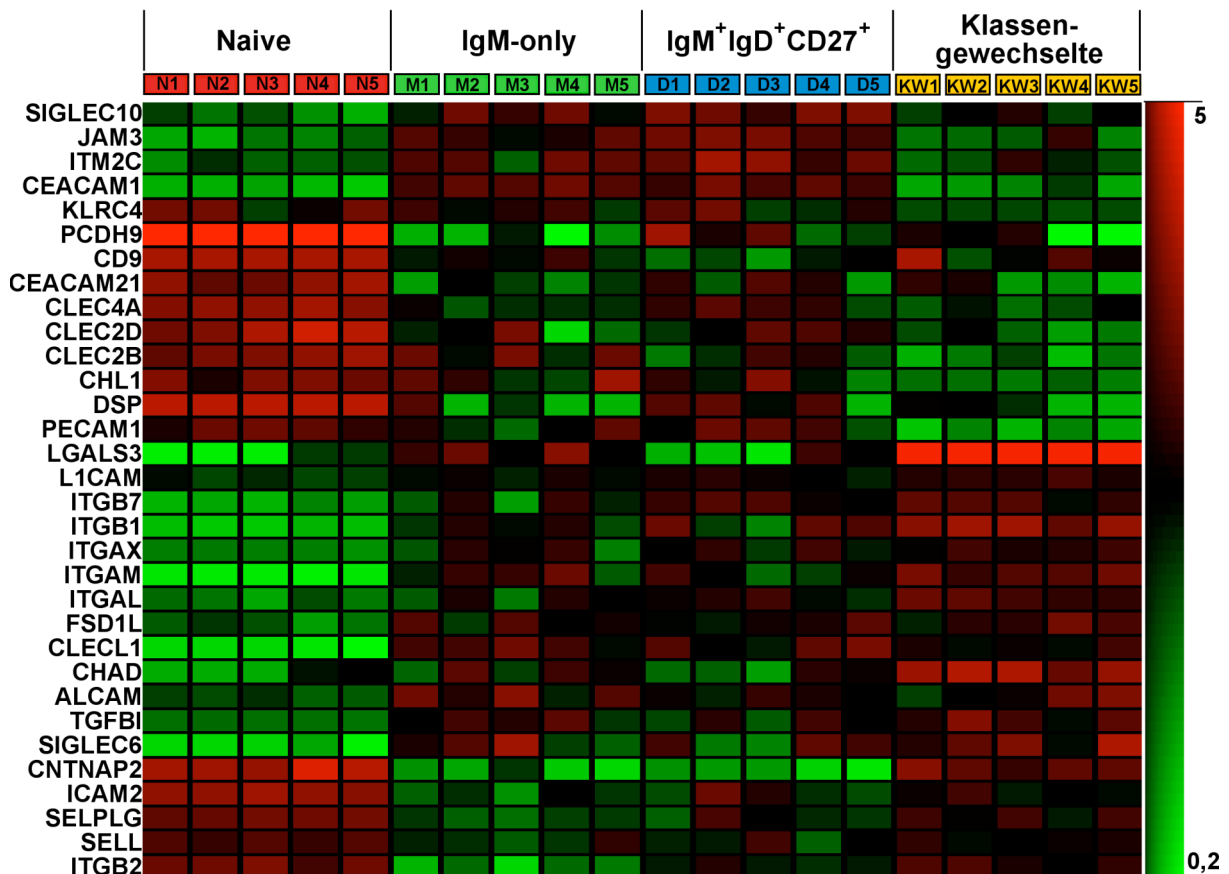
Abbildung 16: Differenziell exprimierte Zelladhäsionsmoleküle

Abb. 16: Gezeigt sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differenziell ausgeprägten Zelladhäsionsmolekülen. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Eine Liste aus ca. 200 Genen, wurde erstellt aus cellular adhesion molecules (CAM), Lektinen, Selektinen, Cadherinen und Integrinen (nicht gezeigt). Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln Zellkontakte zu anderen Zellen oder Geweben, zur extrazellulären Matrix oder löslichen Proteinen. Obwohl oftmals nur wenig über die genaue Funktion einzelner Moleküle bekannt ist, sind dennoch alle Gruppen an wichtigen Prozessen des Immunsystems beteiligt: Lektine (z.B. *C-type lectins* (CLEC) oder *sialic acid binding lectins* (SIGLEC)) können Pathogene binden, internalisieren und Immunantworten einleiten oder modifizieren (Geijtenbeek und Gringhuis, 2009; von Gunten und Bochner, 2008). Selektin-Liganden (SELPLG, SELL) sind an der Transepithel-Bewegung von Leukozyten beteiligt (Barthel et al., 2007). Auch Integrine wie *Integrin beta 2* (ITGB2) binden an Liganden auf Epithelzellen, Zellen des Immunsystems oder der extrazellulären Matrix und übermitteln Signale für weitreichende intrazelluläre Veränderungen (Davis, 2009).

Unter den Genen aus Abb. 16 sind demnach mehrere Kandidaten, die eine spezifische Funktion von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und IgM -only, aber auch naiven und klassengewechselten B-Zellen in Bezug auf Zellkontakte, Gewebsdurchlässigkeit oder Selektivität auf bestimmte Gewebekompartimente suggerieren.

Abbildung 17: Differentiell exprimierte Gene des Zytoskeletts und Zytoskelett-interagierender Faktoren

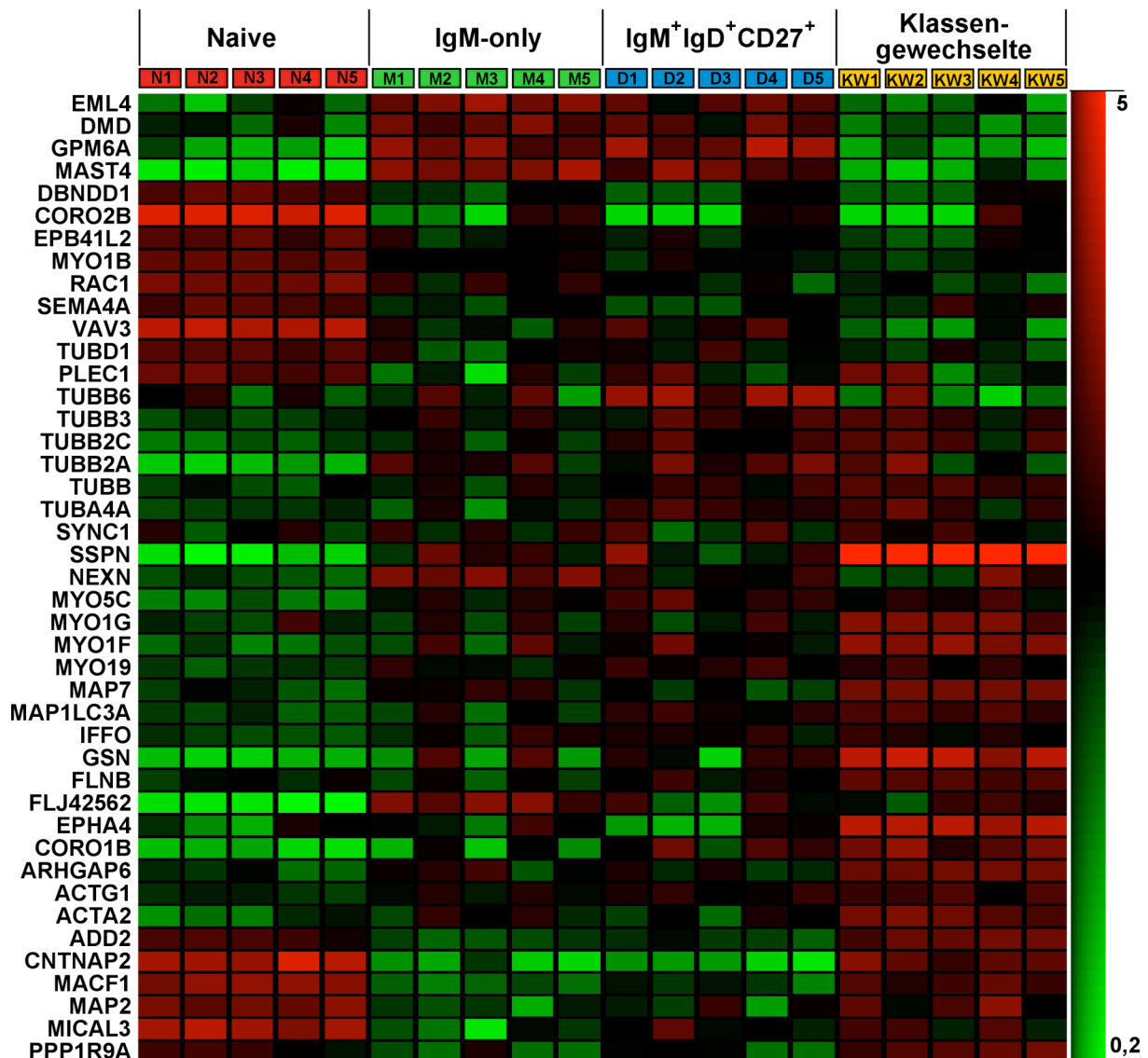


Abb. 17: Gezeigt sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und klassengewechselten B-Zellen differentiell ausgeprägten Zytoskelettgenen und interagierenden Proteinen. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblegende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Eine Liste von ca. 350 Genen für Mikrofilamente, Mikrotubuli, intermediäre Filamente und assoziierte Faktoren wurde erstellt aus Datenbanken (Tabelle 1) und auf

differentielle Expression geprüft. Das Zytoskelett von Lymphozyten unterliegt dynamischen Prozessen. Der Kontakt mit T-Zellen oder APCs in der immunologischen Synapse zieht schwerwiegende Veränderungen des Zytoskelettes mit sich (Harwood und Batista, 2008; Yuseff et al., 2009), aber auch subtilere Veränderungen, wie z.B. Lymphozyten-Migration (Junge et al., 1999), Endozytose (Le Roux et al., 2007), MHCII-Präsentation (Barois et al., 1998) oder dynamische Prozesse der Lipid-Floß-Zusammensetzung (engl. lipid raft) (Cheng et al., 2001; Hao und August, 2005; Jugloff und Jongstra-Bilen, 1997) sind gekoppelt an Umlagerungen des (cortikalen) Zytoskeletts. Es lag nahe, solche putativen Erfahrungen oder Besonderheiten einzelner B-Zell-Populationen auch auf Transkriptionsebene zu untersuchen (Abb. 18). Ein Muster aus 43 differentiell exprimierten Genen suggerierte, daß naive, mutierte IgM⁺ und klassengewechselte B-Zellen intrinsische Unterschiede im Aufbau oder der Zusammensetzung des Zytoskelettes aufweisen. Eine detaillierte Literaturrecherche für jedes einzelne Gen auf bekannte Funktionen in B-Zellen oder anderen Zellen des Immunsystems blieb ohne Erfolg. Auffallend war jedoch, daß ein großer Teil der Gene aus Abb. 17 (13 von 43, 30%) auch in Studien zur Zusammensetzung von *lipid rafts* in B-Zellen (Abb. 18) vertreten war (Mielenz et al., 2005; Saeki et al., 2003).

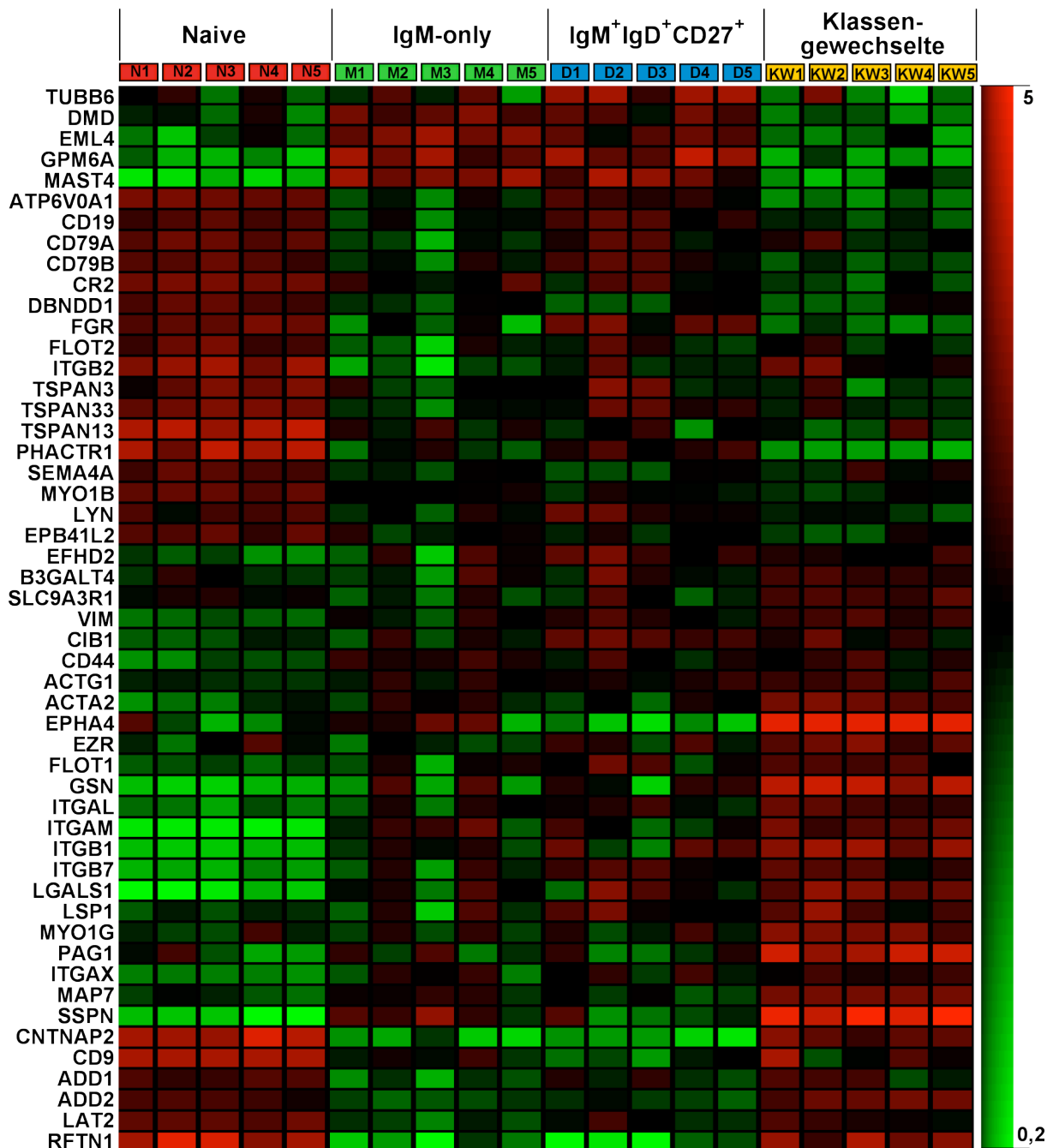
Abbildung 18: Differentiell exprimierte Gene aus *lipid rafts* in B-Lymphozyten

Abb. 18: Gezeigt sind die signifikant unterschiedlichen (ANOVA und Tukey-Test) Signalwerte von in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen differentiell ausgeprägten Genen aus *lipid rafts* in Lymphozyten. Gezeigt ist das jeweils signalintensivste *probe set*. Die Signalwerte sind per-Gene-normalisiert und nach Kondition und Gensymbol geordnet. Farblgende: Signalmittelwert = 1 (schwarz), 5-fach höher (rot) und 5-fach niedriger (grün).

Eine Liste aus ca. 150 Genen, die laut GO-Datenbank (Tabelle 1) bzw. aus Primärliteratur (Mielenz et al., 2005; Saeki et al., 2003) in einen Zusammenhang mit *lipid raft*-Zusammensetzung bzw. –Signalweitergabe gebracht werden konnten, wurde auf differentielle Expression zwischen den 3 B-Zell-Populationen geprüft. Daraus ergaben sich 51 signifikante Gene, die nach ihrer Expressionssignatur

gegliedert wurden (Abb. 18). Wie zu erwarten, ist diese Liste weitgehend redundant mit Genen aus der BCR-Signaltransduktion, Zelladhäsionsmolekülen und Genen des Zytoskelettes, d.h. 28 von 51 Genen (55%) sind Teil vorheriger Abbildungen. Die bisher nicht aufgeführten Gene aus dieser Liste sind z.B. Protonenpumpen (ATPase 6V0A1), strukturgebende Moleküle (Tetraspanine, TSPAN; Flotillin, FLOT), Phosphoproteine (PAG1) und eine Reihe von Genen, deren Funktion weitgehend ungeklärt ist. Abb. 18 soll einen Eindruck dafür vermitteln, daß Gene, die auf Grund lange bekannter Funktion bestimmten Kategorien zugeordnet werden, durchaus auch in einem anderen Zusammenhang zu differentiellen Expressionsmustern zusammengefügt werden können, die einen besonderen Effekt auf die Eigenschaften von B-Zellen haben.

Zusammengefasst lässt sich über die Genexpressionsanalyse anhand paarweiser Vergleiche eine Vielzahl von interessanten, für B-Lymphozyten-Populationen und deren Immunfunktionen potentiell bedeutsamen Gene identifizieren. Wie Abb. 18 verdeutlicht, sind diese potentiellen Unterschiede nicht notwendigerweise auf eine einzelne Eigenschaft beschränkt, sondern unter Umständen an mehreren oder gar gänzlich verschiedenen Funktionen beteiligt. Für eine abschließende Klärung B-Zell-Populations-spezifischer Charakteristika ist daher eine Verifizierung in funktionellen Studien unabdingbar.

3.3.4 Charakterisierung von B-Zell-Populationen aus PB mit GSEA

Eine GSEA ist ein statistisches Verfahren, um eine gewichtete Expression von Gengruppen in einer von zwei Konditionen zu testen. Die Gengruppen können frei bestimmt werden, z.B. manuell aus Primärliteratur zusammengestellt oder definiert über eine funktionelle Verknüpfung, ähnlichen Aufbau oder gleiche Regulationsmechanismen ihrer Genprodukte.

Die GSEA ist noch nicht abgeschlossen, daher werden in dieser Dissertationsschrift nur erste Ergebnisse vorgestellt.

Der Analyse lagen vollständige Datensätze (je 54.675 *probe sets*) aus Signal-Rohwerten zugrunde, das GSEA-Programm verwendet eigene Normalisierungs- und Rechnungsverfahren. Das Verhältnis von Signalwert zu Hintergrund wurde als Maß für die Gen-Rangliste genommen und eine gewichtete Statistik für die Erstellung des Anreicherungs-Spiegels (engl. enrichment score, ES) verwendet. Jeder einzelnen Analyse wurde ein *bootstrapping*-Verfahren aus 1000 Permutationen von Gen Sets (alle *probe sets* eines Gens) angeschlossen (Subramanian et al., 2005).

Im Folgenden wird eine Auswahl von hoch signifikant in einer Kondition (naive, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ oder klassengewechselten B-Zellen) angereicherte Gengruppen gezeigt. Hoch signifikant bedeutet einen normalisierten ES (NES) von > 1,2 (kann Werte von 0 bis 2 annehmen), eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) < 0,05 und einer FDR (q) < 0,25 (diese darf so hoch gewählt werden, weil nur wenige Gengruppen unter vielen als differentiell exprimiert angenommen werden können). Der rot-blaue Farbbalken in den Grafiken repräsentiert eine Rangliste der exprimierten Gene. In grün ist ein Anreicherungsprofil (Verlauf des ES beim Abschreiten der Rangliste), in schwarz einzelne Treffer einer Gengruppe eingezeichnet.

Eine GSEA basierend auf der MSigDB und SDB (Tabelle 1) zeigte ein breites Spektrum an differentiell angereicherten Gengruppen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht angereicherter Gengruppen aus MSigDB und SDB geordnet nach paarweisen Vergleichen

	Naive	IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	Klassengewechselte
Naive	-	(801) 74	(1034) 115
IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	(730) 29	-	(964) 73
Klassengewechselte	(497) 15	(567) 8	-

Die Zahl in Klammern bezeichnet die Anzahl der angereicherten Gengruppen mit einer FDR < 0,25 aus 1535 Gengruppen der MSigDB und SDB insgesamt. Die unterstehende Zahl bezeichnet die Anzahl der Gengruppen, angereichert mit FDR < 0,25, p < 0,05, NES > 1,5.

Die Gengruppen aus MSigDB und SDB sind zumeist *unsupervised*, d.h. sie sind in der Regel sehr grob gefasst und schließen viel Hintergrund mit ein. Auf eine oberflächliche Betrachtung dieser Gengruppen erfolgte eine Kategorisierung in: Gengruppen des Metabolismus, der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung. Abb. 19 zeigt eine Auswahl von 4 Gengruppen, die repräsentativ für ein breites Spektrum der MSigDB- und SD-Datenbank-Analyse waren.

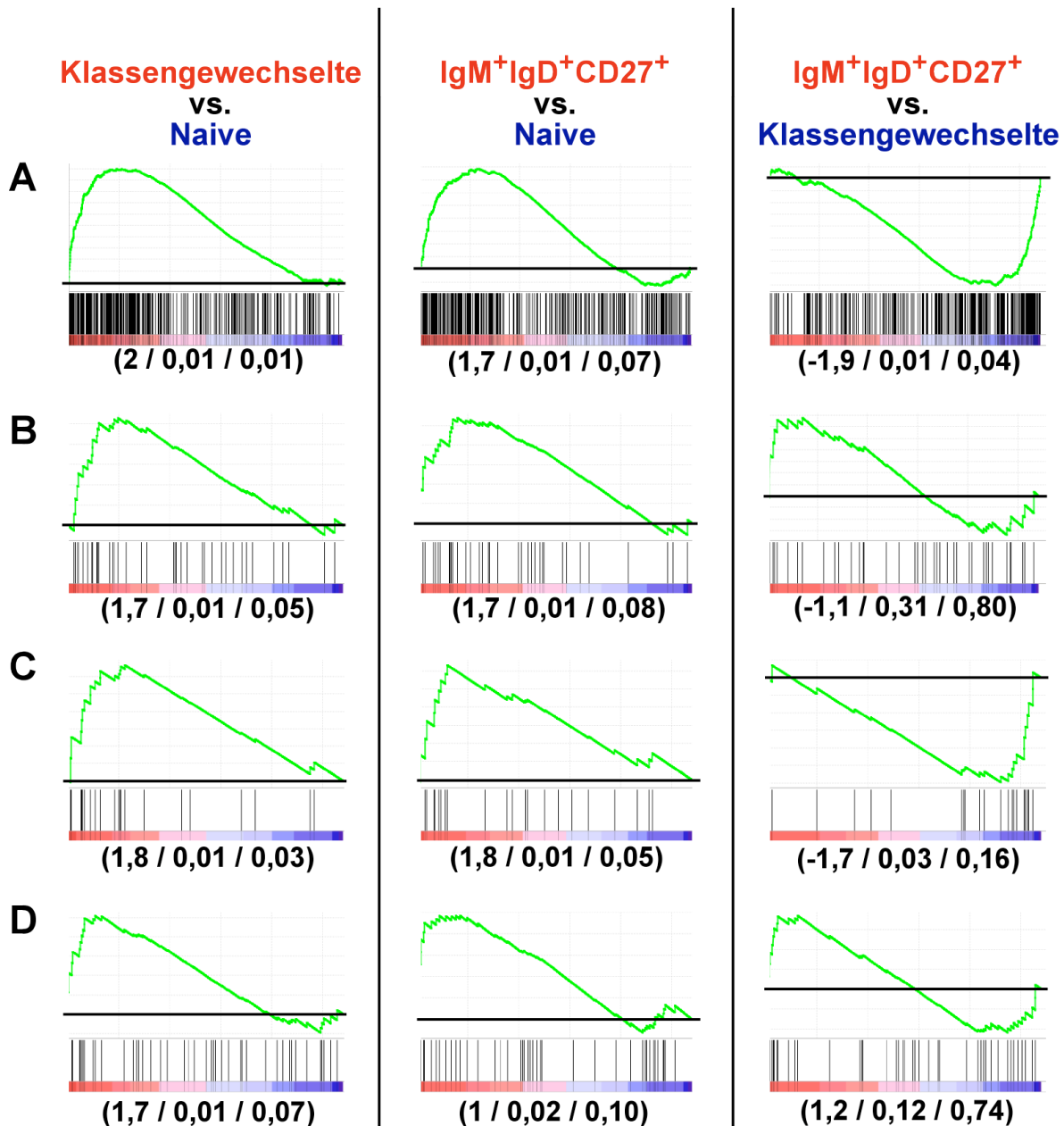
Abbildung 19: Angereicherte Gengruppen aus MSigDB (C2: curated gene sets)

Abb. 19: Gezeigt sind signifikant differentiell angereicherte Gengruppen in naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ bzw. klassengewechselten B-Zell-Populationen. Der ES-Kurvenverlauf (grün) reflektiert die Gewichtung einer Verteilung der betrachteten Gengruppe entweder im positiven (rot) oder negativen Bereich (blau) eines paarweisen Vergleiches aus zwei Komponenten (siehe Farbkodierung in der Überschrift). Ein positiver ES („Berg“) stellt daher eine Gewichtung im roten, ein negativer ES („Tal“) eine Gewichtung im blauen Bereich eines paarweisen Vergleiches dar, gemessen an einer Null-Linie (schwarz). Einzelne Mitglieder einer Gengruppe sind dargestellt als senkrechte Striche (schwarz), relativ zu ihrer Position in der Rangliste exprimierter Gene. Die Zahlen in Klammern entsprechen (NES / p / q). Die Gengruppen dieser Analyse entstammen der MSigDB (C2 curated gene sets, Tabelle 1) und sind unmodifiziert. A: Gene die im Vergleich zu PC differentiell in Plasmablasten ausgeprägt sind (Tarte et al., 2003). B: Gene der Glykolyse (GenMAPP, Tabelle 1). C: Gene der homöostatischen Proliferation in T-Zellen (Goldrath et al., 2004). D: Gene, die im Vergleich zu naiven differentiell in Gedächtnis-T-Zellen ausgeprägt sind.

Abb. 19 A behandelt eine Gengruppe die in PC signifikant höher exprimiert sind als in Plasmablasten (Tarte et al., 2003). Diese Gengruppe war ebenfalls angereichert in

IgM⁺IgD⁺CD27⁺ gegenüber naiven, darüber hinaus jedoch noch stärker ausgeprägt in klassengewechselten B-Zellen. Einige weitere Gengruppen aus der gleichen Studie (z.B. Plasmablasten gegenüber PB B-Zellen etc.) tauchten ebenfalls auf, wenn auch weniger signifikant (FDR > 0,25 und nicht gezeigt). Abb. 19 B zeigt ein ähnliches Muster, die Gene der Glykolyse (nach GenMAPP) waren präferentiell in CD27⁺ B-Zellen stärker transkribiert. Für diese Gengruppe bestand kein Unterschied zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen. Eine Vielzahl weiterer Gengruppen (z.B. des Aminosäurehaushaltes, der Glukoneogenese, der Nukleotidsynthese und des Fettsäuremetabolismus) zeigten eine gleiche Tendenz (nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis auf höhere metabolische Aktivität in somatisch mutierten B-Zell-Populationen. Abb. 19 C behandelt eine Gengruppe, die im Vergleich zu ruhenden, stärker in homöostatisch proliferierenden Lymphozyten exprimiert sind (Goldrath et al., 2004). Viele weitere Gengruppen der Kategorie „Zellzyklus, Zellproliferation oder DNA-Synthese“ waren vermehrt in CD27⁺, besonders jedoch in klassengewechselten B-Zellen transkribiert (nicht gezeigt). Abschließend zeigt Abb. 19 D ein interessantes Ergebnis der GSEA über MSigDB und SDB: Gene, die im Vergleich zu naiven T-Zellen stärker in Gedächtnis-T-Zellen transkribiert waren (Goldrath et al., 2004), waren präferentiell auch in CD27⁺ B-Zellen ausgeprägt, mit der stärksten Gewichtung auf klassischen Gedächtnis-B-Zellen.

Als vorläufiges Ergebnis einer GSEA über mehr als 1500 Gengruppen aus Primärliteratur ist festzuhalten, daß IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselte B-Zellen im Gegensatz zu naiven B-Zellen konsistent Gengruppen verstärkt exprimieren, die typische Eigenschaften von Gedächtnis-B-Zellen ausmachen. Diese sind verstärkte Zellproliferation (und ein damit verbundener, erhöhter Metabolismus) (Macallan et al., 2005; Tangye und Good, 2007; van Zelm et al., 2007) und eine Neigung zur Plasmazell-Differenzierung (Agematsu et al., 1997; Shi et al., 2003). Auch eine Anreicherung von Genen, die aus einem paarweisen Vergleich naiver und Gedächtnis-T-Zell-Genen stammen, in CD27⁺ B-Zellen ist bezeichnend für die Gemeinsamkeiten von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen.

Da Gengruppen aus Datenbanken wie MSigDB und SDB (Tabelle 1) oftmals zu divers sind, um eine präzise Aussage über einzelne, charakteristische Eigenschaften der drei B-Zell-Populationen zu treffen, beschränkt sich die weitere GSEA auf Gengruppen der GO-Datenbank (Tabelle 1) bzw. manuell bearbeitete Auszüge aus Genlisten anderer Datenbanken.

Eine wichtige Fragestellung an die GSEA ist, ob Gengruppen, die mit Expressionsmustern der paarweisen Vergleiche (Abb. 7 bis 18) überlappen, als spezifisch angereichert in einer Kondition gefunden werden können. Im Folgenden sind Gengruppen aus verschiedenen Datenbanken und Primärliteratur zu den drei Transkriptionsfaktoren NF κ B (Gilmore, 2006; Perkins, 2007), Oct1 (Matthias, 1998) und NFAT (Choi et al., 1994; Gwack et al., 2007; Rao et al., 1997) zusammengestellt und getestet worden (Abb. 20).

Abbildung 20: Angereicherte Gengruppen assoziiert mit NF κ B-, Oct1- oder NFAT-Aktivität in B-Lymphozyten

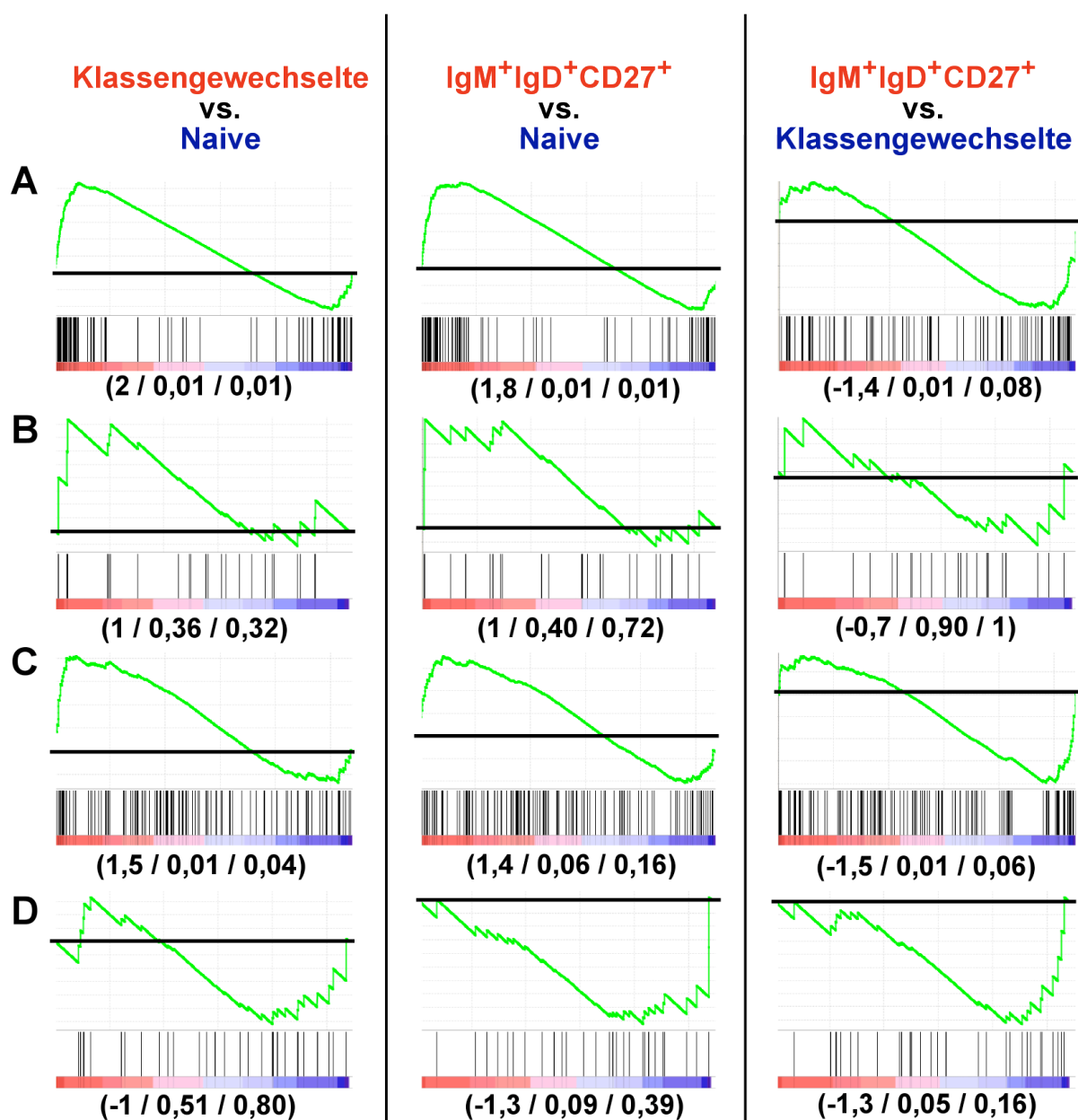


Abb. 20: Gezeigt sind Ergebnisse einer GSEA zwischen naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ bzw. klassengewechselten B-Zell-Populationen. Der ES-Kurvenverlauf (grün) reflektiert die Gewichtung einer Verteilung der betrachteten Gengruppe entweder im positiven (rot) oder

negativen Bereich (blau) eines paarweisen Vergleiches aus zwei Komponenten (siehe Farbkodierung in der Überschrift). Ein positiver ES („Berg“) stellt daher eine Gewichtung im roten, ein negativer ES („Tal“) eine Gewichtung im blauen Bereich eines paarweisen Vergleiches dar, gemessen an einer Null-Linie (schwarz). Einzelne Mitglieder einer Gengruppe sind dargestellt als senkrechte Striche (schwarz), relativ zu ihrer Position in der Rangliste exprimierter Gene. Die Zahlen in Klammern entsprechen (NES / p / q). Die Gengruppen dieser Analyse wurden zusammengestellt aus Primärliteratur (siehe Text). A: 216 Gene assoziiert mit NF κ B-Expression in Lymphozyten. B: 156 Gene assoziiert mit NF κ B-Expression in B-Zellen. C: 162 Gene, assoziiert mit Oct1-Expression in Immunzellen. D: 78 Gene assoziiert mit NFAT-Expression in B-Lymphozyten. (Quellen: siehe Text)

Eine Anreicherung einzelner Gengruppen die mit NF κ B-, Oct1- oder NFAT-Expression assoziiert waren, zeigte sich statistisch signifikant für 216 Gene der NF κ B-Gruppe und für 162 Gene der Oct1-Gruppe (Abb. 20 A und C). In beiden Fällen zeigten CD27⁺ B-Zellen eine tendenzielle Anreicherung der Gengruppe, der Unterschied zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen war ebenfalls statistisch signifikant. Die Gruppe der 162 Oct1-assoziierten Gene erschien mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit > 5% (p < 0,06) als nicht differentiell angereichert zwischen naiven und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen, doch ist hier schon rein optisch eine Tendenz in der Verteilung ersichtlich (siehe ES Abb. 20 C). Eine Relaxierung des Signifikanz-Schwellenwertes wäre sinnvoll für die Betrachtung von Oct1 als potentiell Populations-spezifisch wirkenden Faktor. In Abb. 20 A war klar zu erkennen, daß eine besondere NF κ B-Signatur in CD27⁺, besonders aber in klassengewechselten B-Zellen vorliegt. Dieser Eindruck ließ sich nicht erhärten durch eine Reduktion der Liste auf Gene, die gesichert in B-Lymphozyten exprimiert sind (Abb. 20 B). Eine Liste aus 162 Oct1- (Abb. 20 C), bzw. 162 NFAT-assoziierten Genen (Abb. 20 D) zeigte ebenfalls nach Reduktion auf B-Lymphozyten-Gene keine statistisch gesicherte Verteilung mehr (nicht gezeigt).

Die Analyse einer NFAT-assoziierten Gengruppe aus 216 Genen (Abb. 20 D) ergab eine signifikante differentielle Anreicherung in klassengewechselten, verglichen mit IgM⁺IgD⁺CD27⁺, jedoch nur eine Tendenz zur Anreicherung in naiven B-Zellen.

Zusammengefasst zeigen die Genlisten zu NF κ B, Oct1 und NFAT interessante Tendenzen, bedürfen aber einer intensiven Überarbeitung um gesicherte Schlüsse über B-Zell-Populations-spezifische Eigenheiten ziehen zu können.

In Abb. 21 ist eine Auswahl von Ergebnissen einer GSEA über 1.454 Gengruppen aus GO (Tabelle 1) aufgeführt, die mit den Genlisten oder Kategorien aus den paarweisen Vergleichen überlappen. bzw. zusammenhängen.

Abbildung 21: Angereicherte Gengruppen aus GO

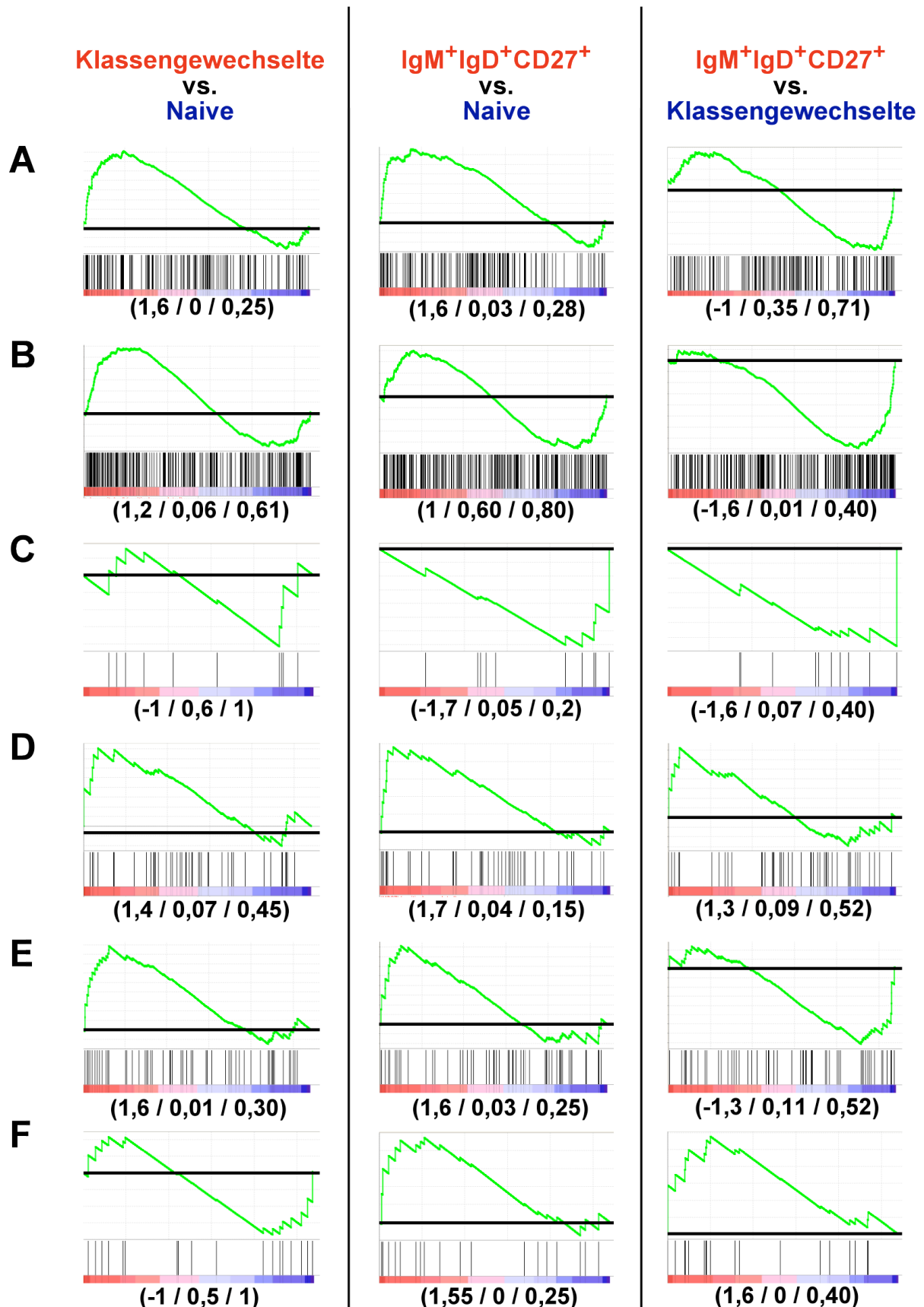


Abb. 21: Gezeigt sind Ergebnisse einer GSEA zwischen naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ bzw. klassengewechselten B-Zell-Populationen. Der ES-Kurvenverlauf (grün) reflektiert die Gewichtung einer Verteilung der betrachteten Gengruppe entweder im positiven (rot) oder negativen Bereich (blau) eines paarweisen Vergleiches aus zwei Komponenten (siehe

Farbkodierung in der Überschrift). Die Zahlen in Klammern entsprechen (NES / p / q). Die Gengruppen dieser Analyse entstammen GO (1.454, Tabelle 1). Gezeigte Gengruppen (GO-Name) A: Cell_Cell_Signaling; B: Cell_Cycle_GO; C: G1_Phase; D: Cell_Cell_Adhesion; E: Actin_Binding; F: Humoral_Immune_Response

Bezüglich des GO-Sets Cell_Cell_Signaling (1813 Gene, die an irgendeinem Prozess des Informationsaustausches zwischen Zellen beteiligt sind) war eine statistisch signifikante Anreicherung in IgM⁺IgD⁺CD27⁺, besonders aber in klassengewechselten gegenüber naiven B-Zellen zu finden. Als einziger Vorbehalt blieb eine minimal erhöhte FDR (q < 0,28) beim Vergleich IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und naiver B-Zellen. Unterschiede zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten Lymphozyten waren nicht signifikant (Abb. 21A und Vergleich Abb. 12). Die Gengruppe Cell_Cycle_GO (4290 Gene der Progression biochemischer und morphologischer Phasen und Ereignisse während sukzessiven Replikationen einer Zelle) zeigte eine ansatzweise signifikante Anreicherung nur in klassengewechselten B-Zellen, verglichen mit IgM⁺IgD⁺CD27⁺, jedoch nicht naiven B-Zellen (Abb. 21 B). Vermutlich reflektiert dies die hohe homöostatische Proliferationsrate der klassengewechselten B-Zellen (Vitetta et al., 1991). Reduziert auf 75 Gene der G1-Phase (Gene für Prozesse des Intervalls zwischen Mitose und DNA-Replikation, Abb. 21 C) zeigte sich ein besonderes Bild: die (statistisch tendenziell signifikante) Anreicherung dieser Gene in naiven und klassengewechselten gegenüber IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen suggeriert einen reduzierten G1-Phase-Phänotyp in mutierten IgM⁺IgD⁺CD27⁺ Lymphozyten (Vergleich Abb. 15). Aus einer Liste von 668 Genen der interzellulären Adhäsion waren (unter relaxierten statistischen Bedingungen) wiederum CD27⁺ B-Zellen gegenüber naiven tendenziell „adhäsiver“ (Abb. 21 D und vergleiche Abb. 16). In Abb. 21 E ist eine Gruppe von 704 Genen dargestellt, die selektiv mit monomerem oder filamentösen Aktin interagieren. Aktin ist in nicht-Muskelzellen vornehmlich an der Ausbildung des kortikalen Zytoskelettes beteiligt (Kunda und Baum, 2009) und daher ist die Anreicherung dieser Gengruppe in mutierten B-Lymphozyten eine mögliche Bestätigung besonderer Muster von Zytoskelett- oder *lipid raft*-assoziierten Genen (Vergleich Abb. 17 und 18). Eine Liste von 270 Genprodukten, die mit „einer Immunantwort durch Körperflüssigkeiten assoziiert ist (GO: Humoral_Immune_Response) zeigt - ähnlich zu G1-Phase-Genen – eine besondere Assoziation mit dem IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zell-Phänotyp. Diese Gengruppe ist die ausgeprägteste (gemessen an statistischer Signifikanz) in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen, verglichen mit naiven und klassengewechselten B-Zellen gleichzeitig aus einer Analyse von 1.454 GO-Gengruppen (Abb. 21 F).

Neben den Gengruppen in Abb. 21 wurden noch weitere der Kategorien Signalweitergabe, Zellzyklus, Zelladhäsion und Zytoskelett als differentiell angereichert in mindestens einer Kondition gefunden (nicht gezeigt).

Zusammengefasst konnte die GSEA bereits in ihrem frühen Stadium zu Erkenntnissen über B-Zell-Populationen und deren Eigenschaften verhelfen. Es ist gelungen, einen Eindruck über proliferative oder Stoffwechsel-bezogene Leistungen in naiven und somatisch mutierten B-Lymphozytentypen zu erlangen. Darüber hinaus konnten Genexpressionsmuster aus paarweisen Vergleichen – die aus rein willkürlichen Gesichtspunkten zusammengestellt wurden – durchaus auch mit Anreicherungen verwandter Gengruppen bestätigt werden. Ebenso konnten Hinweise auf spezifische Eigenschaften von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen aufgedeckt werden. Die Ergebnisse aus paarweisen Vergleichen und GSEA deuten auf viele konkrete Untersuchungsansätze für funktionelle Untersuchungen an humanen PB B-Zell-Populationen hin.

4. Diskussion

4.1 V-Gen-Analyse von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC

Im Folgenden sollen die Ergebnisse aus der Analyse des V-Gen-Repertoires von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC diskutiert und interpretiert werden.

4.1.1 IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC gehören zu sehr großen Klonen

Untersuchungen an IgD⁺IgM⁻CD38⁺ GC-B-Zellen suggerierten bereits bei der Erstbeschreibung einer IgD-only B-Zellen Population, daß diese Zellen nicht nur überaus stark somatisch mutiert, sondern auch zu einem großen Teil klonal verwandt sind (Liu et al., 1996). Vergleichbare Ergebnisse waren ebenfalls in IgD⁺ PC aufzufinden (Arpin et al., 1998). Beide Arbeiten stützten sich jedoch alleine auf eine Populationsanalyse von V_H5-exprimierenden Zellen, was unzureichend ist für eine Beurteilung der gesamten Population. Darüber hinaus ist eine solche Analyse nur eingeschränkt aussagekräftig im Hinblick auf die Zusammensetzung einer Population, da sie erstens anfällig ist für technische Artefakte und zweitens identische Amplifikate nie eindeutig einer oder mehreren Ursprungszellen zugewiesen werden können. So wären z.B. bereits wenige kontaminierende Plasmablasten aufgrund ihrer großen Mengen von Ig-Transkripten eine Fehlerquelle, da sie das Gesamtbild einer klonalen Zusammensetzung verzerren würden. Die vorliegende Einzelzellanalyse über das gesamte V-Gen-Spektrum ist daher eine präzisere und umfassendere Vorgehensweise zur Bestimmung der V-Gen-Nutzung und klonalen Zusammensetzung von IgD-only Zellen. Ein weiterer Vorteil ist, daß mit der Analyse von Gedächtnis-B-Zellen nur selektierte und nicht potentiell gegenselektierte GC-Zellen in die Untersuchung einfließen.

Die Daten zu den Spendern 1 bis 3 und Tonsillen A bis C wurden in einer vorangegangenen Arbeit, die Daten zu Spender 4 und Tonsille D als Teil der vorliegenden Dissertation erhoben.

Es konnte gezeigt werden, daß durchschnittlich 59% (48% bis 82%) der untersuchten Einzelzellen eines Blutspenders klonal verwandt waren. Beachtet man die geringe Stichprobengröße, so kann man erwarten, daß ein noch größerer Teil, wenn nicht gar alle IgD-only B-Zellen, zu sehr großen Klonen mit bis zu 100.000 Mitgliedern eines Klons gehören (siehe 2.5) (Vergleich: die Klongröße der IgG⁺/IgM⁺ B-Zellen beträgt durchschnittlich 1000 Mitglieder im PB, siehe 2.10). Die klonale Zusammensetzung von IgD⁺ PC aus Tonsillen zeigte ein vergleichbares, wenn auch weniger ausgeprägtes Bild. Die Tonsillen B, C und D wiesen eine Frequenz klonaler

Zellen von durchschnittlich 36% (31-43%) auf. Nur 13% der IgD⁺ PC aus Tonsille A waren klonal verwandt; das Ausreißen aus der Ergebnisreihe könnte im niedrigen Alter des Spenders oder einer Fluktuation in einer sehr kleinen Stichprobe (unter 15 auswertbaren Sequenzen waren 2 klonal verwandt) begründet liegen. Auch unter den IgD⁺ PC waren in 51, 49 und 73 informativen Zellen durchschnittlich 7 Klone mit 2 bis 13 Mitgliedern enthalten (Vergleich PB). Es konnten ebenfalls Klongrößen von bis zu 132.000 Zellen theoretisch erreicht werden (siehe Kapitel 2.5).

Im Gegensatz zu IgD-only Gedächtnis-B-Zellen aus PB und IgD⁺ PC aus Tonsillengewebe konnte keine klonale Verwandtschaft unter vergleichbaren Stichproben aus 36 naiven (Donor 1), und 55 bzw. 37 IgG⁺ B-Zellen aus PB (Spender 1 und 4) detektiert werden. Auch unter 45 und 37 IgG⁺ PC (Tonsille D und C) waren keine identischen CDRIII-Genumlagerungen auffindbar. Auch in vorangegangenen Studien an 350 Gedächtnis-B-Zellen aus PB oder 56 IgA⁺ PC und 107 IgM⁺ PC aus Tonsillen konnten nur jeweils 5, 3 bzw. gar keine klonal verwandten Paare identifiziert werden (de Wildt et al., 1999; Yavuz et al., 2001). Selbst in einer Studie zu stark expandierten IgM⁺ und IgA⁺ Plasmazell-Klonen der Darm-Mukosa war für große V_H-Gen-Familien stets ein polyklonaler Hintergrund gegeben, nachgewiesen durch eine CDRIII-Spektren-Typisierung (Holtmeier et al., 2000). Zusammengefasst ist die Zusammensetzung aus wenigen, sehr großen Klonen eine besondere Eigenschaft von IgD-only B-Zellen und auch IgD⁺ PC.

Die beobachtete hohe klonale Diversität in beiden IgD⁺ Zelltypen legt eine Generierung dieser Zellen in einer GC-Reaktion nahe (Küppers et al., 1993). Dies gilt besonders für die IgD-only B-Zellen aus PB, da mutierte Gedächtnis-B-Zellen aus GC-Reaktionen stammen (Rajewsky, 1996), während un- oder schwach mutierte PC auch in extrafollikulären Immunantworten gebildet werden (MacLennan et al., 2003). Die Tatsache, daß IgD-only B-Zellen, die in Keimzentren gefunden wurden, einen sehr großen Teil (bis 15%) der B-Zellen einer Tonsille ausmachten (Liu et al., 1996), unterstreicht diese Vermutung und suggeriert eine Abstammung aus ebenfalls sehr großen GC-Zell-Klonen. Übereinstimmend mit Selektionsprozessen in GC-Reaktionen, wiesen beide IgD-only Populationen aus PB und Tonsille durchschnittliche R/S-Werte in den FR auf (jeweils 1,5 und 1,7) wie sie typisch sind für post-GC-B-Zellen (Klein et al., 1998a).

4.1.2 Häufige Nutzung von V_H3-30 in IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC

Ein weiteres Ergebnis der V-Gen-Analyse von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC ist die mitunter dramatisch bevorzugte Nutzung des V_H3-30-Gensegmentes. 40% (30 bis 47%) der IgD-only Zellen aus dem Blut und 35% (6 bis 56%) der tonsillären IgD⁺ PC nutzten dieses V_H-Gensegment. Laut einer Studie zur Autoreaktivität von IgD-only B-Zellen aus PB und Tonsillengewebe exprimierten 6 von 20 dieser Zellen V_H3-30, dies wurde von den Autoren jedoch nicht kommentiert (Koelsch et al., 2007). Die überraschend hohe Frequenz eines einzelnen V_H-Genes in IgD-only Zellen stand in einem deutlichen Gegensatz zu 11% (8 bis 15%) bzw. 3 und 4% der naiven, IgG⁺ B-Zellen und IgG⁺ PC aus einer Auswahl der untersuchten Blutspender (Tabelle 3) bzw. Tonsille C und D (Tabelle 5). Da diese Kontrollen parallel zu den IgD⁺-Zellen und mit vergleichbarer Effizienz durchgeführt wurden, ist eine Verzerrung der Sicht durch experimentelle Artefakte auszuschließen. Tatsächlich liegt die Frequenz der V_H3-30 Gensegmente in nicht-IgD-only B-Zellen auch laut anderen Publikationen bei 5 bis 11% (Brezinschek et al., 1995; de Wildt et al., 1999; Yavuz et al., 2001). Daher ist die häufige Nutzung von V_H3-30 eine Besonderheit der IgD-only B-Zellen und IgD-sezernierenden PC und dies hat Implikationen für die Entstehung dieser Zellen in Superantigen-getriebenen GC-Reaktionen (siehe 4.1.4). Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß eine weitere Arbeit zu IgD-only B-Zellen ebenfalls eine präferentielle Nutzung des V_H4-34-Genes in tonsillären IgD-only Zellen beschreibt. In dieser Arbeit liegt die durchschnittliche Nutzung jedoch nur bei 6% aller IgD-only Zellen aus 15 Spendern, verglichen mit ca. 2-3% in CD27⁺ B-Zellen (Zheng et al., 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden vergleichbare Frequenzen von V_H4-34 festgestellt (nicht gezeigt).

4.1.3 Besondere Muster von Austauschmutationen in der V_H3-30-FRIII von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC

Die Abstammung der IgD-only B-Zellen von besonderen GC-Reaktionen (Liu et al., 1996) und die gehäufte Nutzung von V_H3-30 legten nahe, daß ein Selektionsvorteil für V_H3-30 exprimierende naive B-Zellen in das IgD-only Kompartiment besteht (Kaartinen et al., 1984). Zusätzliche Hinweise auf eine antigenische Selektion dieses V_H-Genes wären Auffälligkeiten in den CDR-Regionen, etwa besondere Austauschmutationen (Hershberg et al., 2008; Kocks und Rajewsky, 1988) oder eine definierte Länge oder Aminosäurekomposition der CDRIII (Ghia et al., 2008; Press et al., 1991; Rohatgi et al., 2009). Bei einem Vergleich von IgD-only V_H3-30-Sequenzen

mit nicht-IgD-only V_{H3-30} -Sequenzen konnten keine besonderen Hinweise auf eine klassische Antigenselektion identifiziert werden. Statt dessen fiel ein bevorzugter Austausch von Lysin nach Arginin an Position 76 des V_{H3-30} -Gens in IgD-only Zellen auf: 72% der Austauschmutationen an dieser Position kodierten ein Arginin, verglichen mit 33% in nicht-IgD-only Zellen ($p < 0,05$). Eine detailliertere Analyse des Aminosäure-Austauschmutation-Musters erwies eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Selektion von polaren und Gegenselektion von sauren und unpolaren Aminosäuren in der V_{H3-30} -FRIII von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC. Unter der Annahme, daß die überaus stark mutierten IgD-only Zellen eine Affinität der CDR-Regionen zu einem initialen Antigen kaum mehr gewährleisten können (Arpin et al., 1998; Liu et al., 1996), würde ein Beitrag der (verhältnismäßig konservierten) FR zur Affinität eine CDR-unabhängige Kreuzvernetzung des BCR während der GC-Reaktion und damit eine fortwährende Selektion der entsprechenden B-Zellen ermöglichen. Übereinstimmend mit diesem Szenario ist ein spezifisches Austauschmutations-Muster in der FR3 eines überaus häufig benutzten V_H -Gens in IgD-only B-Zellen: hier könnte sich die antigenische Selektion auf exponierte Motive der Gerüstregionen verlagert haben. Auch dies ist ein Hinweis auf eine Superantigen-getriebene Entstehung von IgD-only B-Zellen.

4.1.4 Ein Szenario für die Superantigen-getriebene Entstehung von IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC

Die besonderen Strukturen des BCR von IgD-only B-Zellen lassen Spekulationen über eine Generierung dieser Zellen in Superantigen-getriebenen GC-Reaktionen zu. Naive B-Zellen, die über einen membranständigen IgM und IgD BCR mit λ -Leichtkette und im Idealfall auch V_{H3-30} verfügen, wären prädestiniert für eine Kreuzvernetzung durch ein Superantigen, das (vornehmlich) die Gerüst-Komponenten von IgD, Ig λ und vorzugsweise V_{H3-30} komplementiert (Abb. 22).

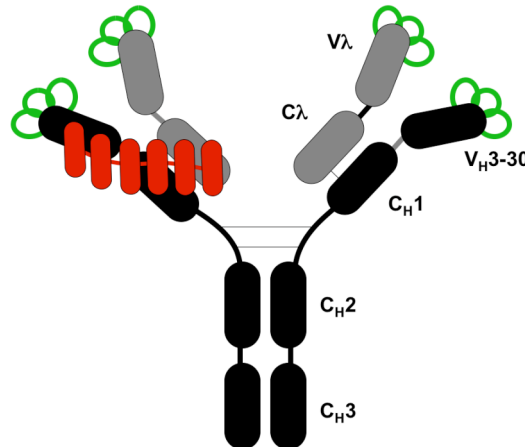
Abbildung 22: Putative Bindung eines Superantigens an IgD, Ig λ und V_H3-30

Abb. 22: Abgebildet ist ein stilisierter, zweidimensionaler BCR des Isotyps IgD-V_H3-30 (schwarz) und Ig λ (grau). Schwarze Querbalken symbolisieren kovalente Bindungen der einzelnen Domänen, in grün sind die variablen Schleifen (CDRI bis III) dargestellt. Ein putatives Superantigen (rot) bindet überlappend an C_H1, C λ und die FR des V_H3-30-Gensegmentes.

Durch Kreuzvernetzung des BCR würde das Superantigen internalisiert, prozessiert und ein Protein-Anteil auf MHCII präsentiert werden. Eine Unterstützung durch T-Zellen und eine Teilnahme an bzw. Initiierung einer GC-Reaktion wäre die Folge. Mit Einsetzen der SHM würden die ersten Mutationen auftreten und die Zelle klonal expandieren. Für einige (wahrscheinlich nur wenige) B-Zellen bedeutete der Verlust von IgM durch den ungewöhnlichen C μ -C δ -Klassenwechsel einen Selektionsvorteil durch intensivierete Kreuzvernetzung von IgD. Diese nunmehr IgD-only GC-B-Zellen wären ihren Geschwisterzellen an Affinität überlegen, würden über kurz oder lang das GC dominieren und sequentiell als IgD-only Gedächtnis-B-Zelle oder IgD⁺ PC in die Peripherie auswandern.

Dieses Szenario wird durch die Besonderheiten und molekularen Eigenschaften der IgD-only B-Zellen gestützt:

Wenn die Bildung eines IgD-only Kompartimentes tatsächlich nur von besonderen Antigenen dirigiert wird, dann sollte seine Ausbildung abhängig von entsprechenden (wiederholten) Infektionen mit diesem Antigen sein. Tatsächlich ist die interindividuelle Varianz bezüglich der IgD-only B-Zellen sehr groß: in 9 von 10 Spendern war keine distinkte IgD-only-Population erkennbar und die Größe der Populationen in IgD-only-Spendern schwankte von 0,1 bis 2% der B-Zellen im Blut und zwischen 5 und 15% der PC in der Tonsille (nicht gezeigt) (Arpin et al., 1998; Klein et al., 1998c). Hier bietet sich auch ein Erklärungsansatz für die beobachteten Schwankungen in den untersuchten Spendern: der jüngste Spender (Tonsille A) wäre demzufolge einem primären Kontakt mit dem Superantigen ausgesetzt

gewesen und bildete ein IgD-only Kompartiment gerade erst aus, der ältere Spender (Tonsille D) litt unter einer akuten, polyklonalen Immunantwort gegen das spezielle Superantigen und produzierte vermehrt nicht-V_H3-30-Antikörper (Tabellen 4 und 5). Die Zahlen für die IgD-only Gedächtnis-B-Zellen (Tabellen 2 und 3) sind uniformer, da Gedächtnis-B-Zellen in erwachsenen Menschen einen Durchschnitt wiederholter Immunantworten repräsentieren. Eine stabilere, weniger variierende Klonalität, V_H-Gen-Nutzung und Mutationslast sind daher plausibel.

Die teilweise enorme Mutationslast der IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC ist in dem Superantigen-Szenario wahrscheinlich durch zwei verschiedene Stellgrößen bestimmt: erstens geschieht in den IgD-only-GCs eine verzerrte, untypische Selektion. Da die Superantigene eine Kreuzvernetzung des BCR weitgehend unabhängig von den CDRI bis III gewährleisten, bleiben schrittweise akkumulierende Mutationen in diesen Regionen (Berek und Milstein, 1987) ohne weitere Folgen für die Zelle (solange sie nicht das Leseraster verschieben oder blockieren). Das bedeutet, die GC-B-Zelle kann wiederholt und ausgedehnt an Mutations- und Selektionsprozessen teilnehmen und bekommt in jedem Fall ein ausreichendes Überlebenssignal (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991). Erst die relativ seltenen, weil zumeist gegenselektierten Austauschmutationen in den Gerüstregionen (siehe 4.1.3), könnten eine Übertretung eines nötigen Signalschwellenwertes und damit ein mögliches Verlassen der GC-Reaktion bewirken (Niu et al., 1998). Oder aber die schiere Größe des Klons verdrängt Mitglieder aus limitierten GC-Nischen (Pereira et al., 2009). Bis solche Prozesse sich jedoch eingestellt haben, würden IgD-only B-Zellen über längere Zeiträume in GCs verweilen und ungebremst Mutationen akkumulieren. Auch in *activation induced cytidine deaminase (AICDA)*^{-/-}-Mäusen geschieht aufgrund mangelnder SHM keine Affinitätsreifung und die Mäuse entwickeln übergroße GCs (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000), möglicherweise weil den B-Zellen das Erreichen eines Signal-Schwellenwertes durch einen höher affinen BCR verwehrt ist (Niu et al., 1998). Die Kinetiken expandierter GC-Passagen führen theoretisch auch zum Herauswachsen weniger dominanter Klone. Der zweite Grund für die Akkumulation vieler Mutationen in den CDR wäre eine potentielle wiederholte Teilnahme an GC-Reaktionen (Bende et al., 2007; Schwickert et al., 2007). Damit übereinstimmend war der Mutationsgehalt in IgD-only-B-Zellen jüngerer Spender niedriger als in älteren Spendern (nicht gezeigt). Eine wiederholte Teilnahme an GC-Reaktionen trüge ebenfalls zu einer Expansion weniger Klone innerhalb der IgD-only Populationen bei.

Das zentrale Merkmal für IgD-only-B-Zellen ist die Deletion von IgM. Der Verlust von IgM könnte mehrere Wirkungen auf die Rezeption der IgD-only B-Zellen haben: die verschiedenen Wirkmechanismen der IgM- und IgD-Kreuzvernetzung (Brink et al., 1992; Mayumi et al., 1994) könnten zu einem verbesserten Einfluß auf die Überlebensfähigkeit von IgD-only-Zellen führen, z.B. werden B-Zellen der chronischen lymphozytischen Leukämie vermehrt apoptotisch, wenn sie mittels anti-IgM-Antikörpern aktiviert werden, wogegen anti-IgD-Antikörper zu einer erhöhten Überlebensrate führen (Zupo et al., 2000). Das Resultat einer C μ -Deletion wäre in dem Fall eine verbesserte Überlebenssignal-Struktur aufgrund intrinsischer BCR-Eigenschaften. Gleichfalls ist es denkbar, daß – wie eingangs erwähnt – der Verlust von IgM eine höhere IgD-Rezeptordichte und ein somit besseres Superantigen-vermitteltes Kreuzvernetzungs-Signal ermöglicht. Wahrscheinlicher ist jedoch folgendes Szenario: da aufgrund alternativer Spleißverfahren die Aktivierung von B-Zellen (und das Unterlaufen einer GC-Reaktion) von der Herunterregulierung von Oberflächen-IgD begleitet wird (Lebecque et al., 1997; Monroe et al., 1983; Yuan und Tucker, 1984), würde das im Falle einer GC-Reaktion auf ein Superantigen zu einem sofortigen Zusammenbruch führen, da GC-B-Zellen ohne Kreuzvernetzung ihres BCR schnell Apoptose unterlaufen (Liu et al., 1989). Bei solch einem Selektionsdruck für IgD-Expression wäre die Deletion von IgM vorteilhaft (wenn nicht notwendig), da sie alternatives Spleißen unmöglich macht und die Expression von IgM auf Kosten von IgD unterbindet. Das wahrscheinlich seltene Ereignis eines C μ -C δ -Klassenwechsels (Kluin et al., 1995) erklärt, warum nur wenige IgD-only B-Zell-Klone existieren, obwohl initial ein sehr breites Spektrum von naiven und CD27⁺ B-Zellen durch das Superantigen aktiviert würde.

Ein putatives Superantigen mit den oben beschriebenen Eigenschaften ist bislang nicht identifiziert worden. Interessanterweise existieren jedoch Antigene aus *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis*, die speziell an humanes IgD binden (Forsgren und Grubb, 1979) und isolierte IgD⁺ B-Zellen aus PB zur Proliferation *in vitro* stimulieren können (Forsgren et al., 1988). Speziell aus *Moraxella catarrhalis* konnte ein Protein isoliert werden (*Moraxella* IgD binding protein, MID), das an C δ 1 und C δ 2 bindet, als Mitogen wirken und in der Anwesenheit von Th2-Zytokinen die Ig-Produktion in B-Zellen stimulieren kann (Gjorloff Wingren et al., 2002; Janson et al., 1991; Ruan et al., 1990). Die beschriebenen Pathogene verursachen Infektionen der Atemwege und tatsächlich werden IgD-only-Zellen hauptsächlich in chronischer Tonsillitis und hyperplastischen

Adenoiden gefunden und nicht oder nur sehr selten in z.B. Lymphknoten des Darmes (Johansen et al., 2005).

Daß eine Bindung eines Superantigenes an der Entstehung von IgD-only Zellen beteiligt ist, wird zumindest gestützt durch die V_H3-30 nutzenden Klone: ein besonderes Muster an Austauschmutationen in der FRIII ist kompatibel mit einem Modell, in dem eine Selektion anhand von Motiven der Antikörperstruktur außerhalb regulärer Antigenbindestellen stattfindet. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, daß ein breites Spektrum an V_λ -Genen genutzt wurde, was wiederum impliziert, daß C_λ und nicht V_λ wichtig ist für die Selektion von IgD-only B-Zellen.

Wenn tatsächlich ein sehr spezielles (und damit wahrscheinlich ein einziges) Superantigen nötig wäre, um den beschriebenen Selektionsdruck auszuüben, wie erklärt sich dann, daß immer noch recht viele Klone bereits in jungen Spendern gebildet werden können? Der limitierende Faktor dafür wäre bei gleichbleibend verfügbarer T-Zell-Hilfe (Meyer-Hermann et al., 2009), das frühe Ereignis eines $C\delta$ -Klassenwechsels (Lebecque et al., 1997). Eine Häufigkeit für $C\delta$ -Klassenwechsel ist nur schwer einzuschätzen, jedoch sei eine Studie zu HIV-gp140-spezifischen IgG^+ Gedächtnis-B-Zellen aus HIV-Patienten erwähnt: die Klonalität monoantigenisch selektierter IgG^+ B-Zellen ist zwar leicht niedriger, liegt aber dennoch in dem Bereich der IgD-only Gedächtnis-B-Zellen (50 Klone aus 502 Zellen gegenüber 6 bis 8 Klonen aus 50 Zellen) (Scheid et al., 2009). Dies verdeutlicht, daß für die Selektion von IgD-only Gedächtnis-B-Zellen in die beobachtete Anzahl von Klonen ein einzelnes Superantigen ausreichen könnte.

Auch für die Generierung von IgD-only B-Zellen wurde über einen Einfluß von Autoreaktivität spekuliert. Mehr als die Hälfte der Antikörper aus IgD-only B-Zellen zeigte eine Affinität für humane Autoantigene. Diese Affinität war entweder bereits durch die Keimbahnsequenzen der benutzten V-Gene gegeben oder assoziiert mit somatischen Mutationen in den CDR (Koelsch et al., 2007; Zheng et al., 2004). Es ist wichtig zu bemerken, daß die V_H -Genumlagerungen der untersuchten IgD-only B-Zellen in beiden Studien in Kombination mit C_γ exprimiert wurden und insofern Einflüsse der $C\delta$ -Region unbeachtet blieben. Es gibt zwei interessante Ansätze, die die Erkenntnisse zur Autoreaktivität mit dem Superantigen-Szenario verknüpfen: erstens könnte das betreffende Superantigen ein Super-Autoantigen sein, zweitens unterstreicht die Tatsache, daß IgD-only B-Zellen vermehrt autoreaktive Genumlagerungen kodieren, die Loslösung dieser Zellen von einer Selektion, in der Schutzmechanismen für Autoreaktivität (Meffre et al., 2000; Tsuiji et al., 2006;

Tussiwand et al., 2009) nicht mehr greifen. Das Superantigen wäre theoretisch in der Lage, die mangelnde T-Zell-Hilfe für einen autoreaktiven B-Zell Klon zu überbrücken und durch Unterstützung von Superantigen-spezifischen T-Helfer-Zellen zu ersetzen.

Zusammengefasst konnten in dieser Dissertationsschrift IgD-only B-Zellen und IgD⁺ PC näher charakterisiert werden. Diese Zellen zeichnen sich nicht nur durch eine hohe Mutationslast, C_μ-Deletion und präferentielle Igλ-Expression aus, sondern weiterhin durch eine hohe klonale Verwandtschaft und eine stark verzerrte V-Gen-Nutzung. Interessanterweise lassen sich diese Eigenschaften in einem Szenario zusammenführen, das eine Generierung dieser Zellen in einer Superantigen-getriebenen GC-Reaktion suggeriert.

4.2 Molekulare Analysen von humanen B-Zell-Populationen

In den folgenden Kapiteln sollen die Daten zu einer gemeinsamen Herkunft von somatisch mutierten IgM⁺ und IgG⁺ B-Zellen aus GC-Reaktionen diskutiert und in Zusammenhang mit der gegenwärtigen Literatur gebracht werden. Darüber hinaus sollen Implikationen auf die Entwicklung von Gedächtnis-B-Zellen im Allgemeinen und die Vorteile einer Beteiligung von Gedächtnis-B-Zellen an angeborenen Immunantworten diskutiert werden.

4.2.1 Humane mutierte IgM⁺ B-Zell-Populationen tragen molekulare Spuren einer GC-Reaktion

Das Durchlaufen einer GC-Reaktion geschieht nicht ohne Spuren. Diese manifestieren sich in GC-B-Zellen auf DNA-Ebene und werden an post-GC-B-Zellen weitergegeben. Um den kontrovers diskutierten Ursprung von somatisch mutierten IgM⁺ B-Zellen im Menschen aufzudecken, wurden zwei solcher GC-Merkmale in IgM-only und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen untersucht.

Zuerst wurden die Telomerlängen von naiven, IgM⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen miteinander verglichen. Während der immensen klonalen Expansion in GCs (Zhang et al., 1988) reaktivieren B-Zellen Telomerase (Hu et al., 1997; Igarashi und Sakaguchi, 1997), um einer vorzeitigen Seneszenz und Apoptose durch Telomerverlust entgegenwirken zu können (Allsopp und Harley, 1995; Allsopp et al., 1992). Im Vergleich zu Stammzellen und malignen Zellen, die eine replikative Telomerverkürzung kompensieren können (Allsopp et al., 1992), weisen GC-B-Zellen eine weitere Besonderheit auf: sie verlängern ihre Telomere

über die ursprüngliche Länge hinaus (Norrback et al., 2001; Weng et al., 1997a). Diese Überkompensation resultiert in verlängerten Telomeren in klassengewechselten post-GC-B-Zellen (Hodes et al., 2002; Martens et al., 2002) und dient möglicherweise als Puffer für zukünftige Zellteilungen langlebiger Gedächtnis-B-Lymphozyten, die regelmäßig homöostatisch proliferieren (van Zelm et al., 2007; Vitetta et al., 1991) und auch wiederholt an GC-Reaktionen teilnehmen können (Bende et al., 2007; Schwickert et al., 2007). Zwar weisen *in vitro*-Experimente auf eine potentielle Reaktivierung von Telomerase auch in TI-Immunantworten hin (Igarashi und Sakaguchi, 1997), jedoch korreliert eine Reaktivierung von Telomerase in Lymphozyten nicht notwendigerweise mit einer messbaren Telomer-Verlängerung (Weng et al., 1997b). Tatsächlich zeigen weitere *in vitro*-Studien an TD- und TI-aktivierten PB B-Zellen, daß nur im Falle einer TD-Aktivierung eine statistisch signifikante Telomer-Verlängerung nachzuweisen ist (Martens et al., 2002) (Abb. 23). Da eine potentielle primäre Diversifizierung durch SHM im Menschen weder räumlich oder zeitlich, noch auf einer zellulären Ebene definiert wurde, kann eine putative Reaktivierung von Telomerase in diesem postulierten Prozess formal nicht ausgeschlossen werden. Im Gegenteil müsste ein solcher Prozess sich durch eine Telomerase-Aktivität und Telomer-Verlängerung ähnlich denen in GC-B-Zellen auffallen. Eine solche Struktur ist bislang jedoch nicht gefunden worden.

Abbildung 23: Relative Telomerlänge als potentieller Indikator für eine GC-Passage von Gedächtnis-B-Zellen

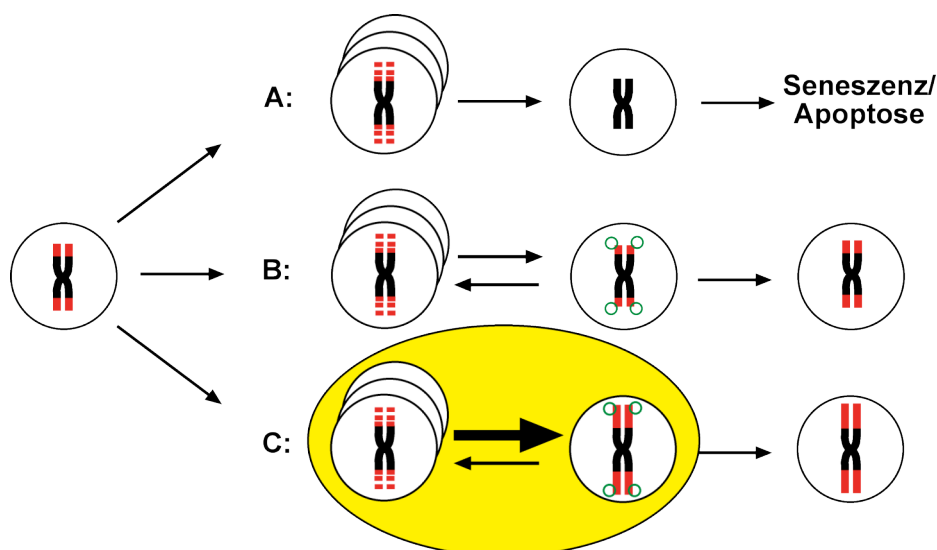


Abb. 23: Abgebildet sind drei hypothetische Szenarien zum Telomer-Haushalt einer B-Zelle. Eine naive B-Zelle (links im Bild) zeigt eine durchschnittliche Telomerlänge (rot) pro Chromosom (schwarz). Szenario A: Sequentielle Zellteilungen verkürzen die Telomere, bis

eine Schwelle zur Seneszenz unterschritten wird und die Zelle stirbt. Szenario B: In einer extrafollikulären Aktivierung der Zelle ohne T-Zell-Hilfe wird Telomerase (grün) aktiviert und gleicht den Telomerverlust aus. Szenario C: Die ausnehmend hohe Telomerase-Aktivität in den B-Zellen eines GC (gelb) sorgt für eine Verlängerung der Telomere über den initialen Wert der naiven B-Zelle hinaus.

In der vorliegenden Analyse von Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen wurden in Kooperation mit den Hämatologischen Instituten der Universitätskliniken Essen und Bern 13 erwachsene Individuen untersucht. In allen Spendern hatten klassengewechselte B-Zellen die jeweils längsten Telomere. IgM-only und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen hatten im Durchschnitt kürzere, jedoch immer noch signifikant längere Telomere als naive B-Zellen (Tabelle 7). Interessanterweise beträgt die relative Telomer-Verlängerung der mutierten IgM⁺ B-Zellen zu naiven und klassengewechselten B-Zellen ca. 50%, eine Analogie zum durchschnittlichen Mutationsgehalt. Dieser Hinweis auf eine verkürzte, weniger intensive GC-Erfahrung wird später eingehender diskutiert. In Abb. 3 zeigt sich, daß die absolute Telomerlänge zwischen einzelnen Individuen beträchtlich variieren kann. Tatsächlich waren in drei aus 13 Spendern die Telomere der naiven B-Lymphozyten länger als in mutierten IgM⁺ B-Zellen. Diese Variabilität konnte ebenfalls in klassengewechselten B-Zellen detektiert werden (Son et al., 2003; Weng et al., 1997a) und reflektiert vermutlich Schwankungen von Telomerverlängerung in GC-Reaktionen und proliferationsbedingten Telomer-Verkürzungen, abhängig von den jeweiligen individuellen Immunantworten auf neue Infektionen oder Reinfektionen. Folglich zeigt die Analyse von Telomerlängen in humanen B-Zell-Populationen, daß IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only im Vergleich zu naiven B-Zellen längere Telomere aufweisen, und das unterstützt ihre Generierung in einem GC.

Als weitere Spur einer GC-Reaktion in B-Zellen wurde der Bcl6-MMC auf Mutationen untersucht. Bcl6 ist eines der ersten Gene, das als Ziel aberranter SHM identifiziert werden konnte (Pasqualucci et al., 1998; Shen et al., 1998). In diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß in 30% nicht maligner GC- und klassengewechselter B-Zellen eines gesunden Menschen Mutationen in Intron 1 des Bcl6-Lokus vorliegen. Diese Mutationen zeigen eindeutige Anzeichen von SHM (Pasqualucci et al., 1998). Es ist wichtig zu erwähnen, daß diese Mutationen nicht in allen klassengewechselten B-Zellen auftreten, sondern nur in etwa 30% der Zellen, mit einer etwa 50 bis 100-fach niedrigeren Mutationsfrequenz, verglichen mit der von V-Genen. Ein weiterer essentieller Punkt ist, daß SHM eng an die Transkription des Zielgenes gekoppelt ist (Bachl et al., 2001; Fukita et al., 1998; Yang et al., 2006). Diese Besonderheiten der

(aberranten) SHM lassen sich zu einem Szenario zusammenführen, in dem Bcl6-Mutationen in PB B-Zellen mit somatisch mutierten V-Genen als molekulare Merkmale einer GC-Erfahrung interpretiert werden (Abb. 24).

Abbildung 24: Bcl6-MMC-Mutationen als Indikatoren für eine GC-Passage von Gedächtnis-B-Zellen

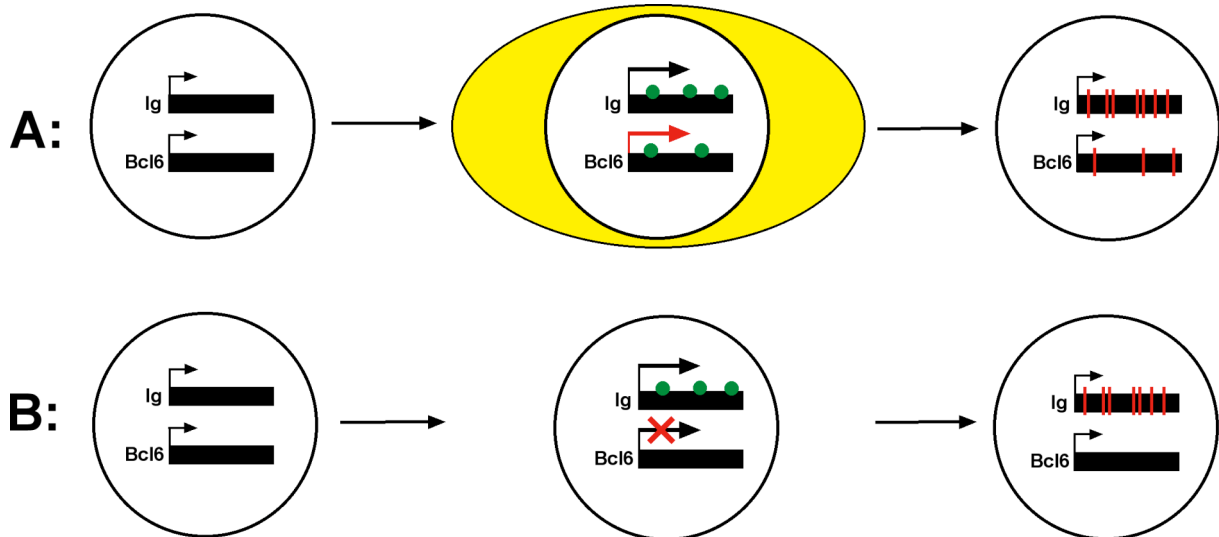


Abb. 24: Abgebildet sind zwei hypothetische Szenarien zur gemeinsamen bzw. unabhängigen SHM des Ig- und des Bcl6-Lokus. A: In einer GC-Reaktion ermöglicht die SHM-Maschinerie (grün) die Einführung von Mutationen in den Ig-Lokus. Da der zentrale GC-Transkriptionsfaktor Bcl6 vermehrt transkribiert wird, wird er zum Ziel aberranter SHM. B: in einer extrafollikulären Situation, etwa primärer Diversifizierung des BCR oder einer TI-Aktivierung, geschieht keine verstärkte Bcl6-Transkription und Bcl6 kann nicht mutieren.

Demzufolge können Bcl6-Mutationen nur dann in IgM⁺ B-Zellen auftreten, wenn diese in einer GC-Reaktion somatisch mutieren, d.h. zu einem Zeitpunkt oder in einer Umgebung, in der Bcl6 entsprechend stark transkribiert wird (Klein und Dalla-Favera, 2008). Es ist wichtig zu bemerken, daß eine geringe Menge an Bcl6-Transkripten auch in naiven oder Gedächtnis-B-Zellen nachweisbar ist (Klein und Dalla-Favera, 2008), diese jedoch bei T-Zell-unabhängiger Stimulation rapide reduziert werden ((Allman et al., 1996; Ye et al., 1993) und K.-M. Toellner, persönliche Mitteilung). Es kann formal nicht ausgeschlossen werden, daß Bcl6 ebenfalls in einer primären Diversifizierung des BCR transkribiert wird. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da Bcl6 der zentrale Regulator einer GC-Reaktion ist (Klein und Dalla-Favera, 2008).

Da somatische Mutationen des Ig-Lokus und des Bcl6-Lokus beide durch die gleiche SHM-Maschinerie generiert werden (Pasqualucci et al., 1998), sollten ihre Mutationsfrequenzen korrelieren – und genau dies ist auch zu beobachten: mutierte IgM⁺ B-Zellen weisen 50 bis 60% des Mutationsgehaltes des Ig- und Bcl6-Lokus von

klassengewechselten B-Zellen auf (Tabelle 8). Weiterhin ist zu bemerken, daß der durchschnittliche Anteil Bcl6-mutierter IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only B-Zellen nur 20-21% der Populationen ausmacht (Vergleich klassengewechselte B-Zellen: 33%, Tabelle 8), dies ist jedoch bei einer verringerten Mutationsfrequenz der Populationen zu erwarten: bei 50- bis 100-fach reduzierter Mutationsfrequenz erzeugt ein zusätzlicher Faktor von 0,5 mehr unmutierte Sequenzen. Mehr noch ist davon auszugehen, daß ein großer Teil – wenn nicht alle – der IgM⁺CD27⁺ B-Zellen GC-Erfahrung haben müssen, damit eine ausreichende Fraktion Bcl6-unmutierter Zellen erhalten bleibt.

Die Tatsache, daß intrinsische Besonderheiten der SHM (RGYW-Mutationen, das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen) nicht in allen Mutationsmustern der analysierten Zelltypen als statistisch gesichert auftreten, könnte auf eine höhere Varianz im Mutationsmuster schließen als bisher angenommen. Wenn eine zu geringe Anzahl von Mutationen analysiert wurde, wurde die volle Bandbreite der biologischen Streuung nicht erfasst. Dies könnte bedingt sein durch z.B. einen Einfluß von Bcl6-Mutationen auf die Transkriptionsrate von Bcl6 und damit verbundene Selektionsprozesse (Pasqualucci et al., 2003) oder Unterschiede in den Zeitfenstern, die der SHM-Maschinerie während einer GC-Passage der einzelnen Populationen zur Verfügung stehen.

Zusammengefasst ist die Detektion von Bcl6-Mutationen ein weiteres, starkes Argument dafür, daß die meisten, wenn nicht sogar alle der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only B-Zellen aus GC-Reaktionen abstammen.

4.2.2 IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgG⁺CD27⁺ B-Zellen stammen aus gemeinsamen GC-Reaktionen

Wenn in einer GC-Reaktion sowohl IgM⁺ als auch IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen aus einer naiven Gründerzelle entstehen, muß eine klonale Verwandtschaft dieser Zellen nachweisbar sein. Solche putativen Klone verfügen über ein Muster gemeinsamer und individueller somatischer Mutationen (Abb. 25)

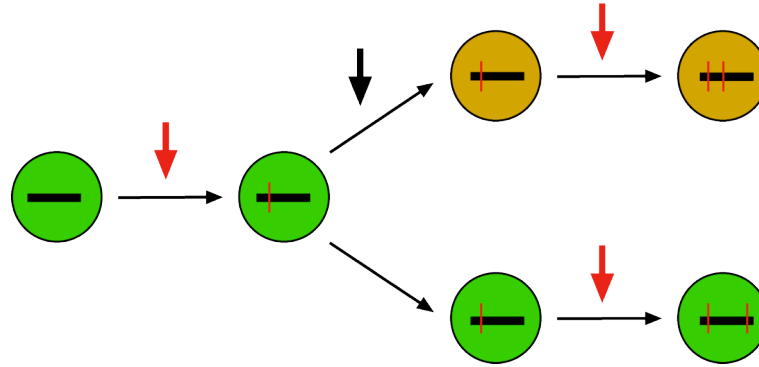
Abbildung 25: Szenario einer putativen klonalen Entwicklung einer GC-B-Zelle

Abb. 25: Dargestellt ist eine hypothetische Entstehung klonal verwandter IgM⁺ (grün) und IgG⁺ (braun) GC-B-Zellen. Die Gründerzelle (links im Bild) erfährt ein Mutationsereignis (roter Pfeil) im Ig-Lokus und vererbt eine gemeinsame Mutation an ihre Nachkommen. Während nur ein Teil ihrer Nachkommenschaft klassenwechselt (schwarzer Pfeil), bleibt der andere Teil IgM⁺. Anschließende Mutationsereignisse führen zu individuellen Mutationen.

Es ist gelungen, mit zwei unabhängigen Methoden die Existenz solcher klonal verwandter V_H-Genumlagerungen mit gemeinsamen und individuellen somatischen Mutationen aus IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgG⁺ B-Zellen nachzuweisen. Der V_H1-18-exprimierende Klon wurde mittels PAGE-Strategie identifiziert. Der experimentelle Aufbau gewährleistete die Amplifikation von V_HD_HJ_H-Genumlagerung gemeinsam mit den C_μ/C_δ bzw. C_γ-Termini und stellte somit eine intrinsische Kontrolle für die Verlässlichkeit einer Amplifizierung aus beiden Populationen dar (Anhang A3, Klon A). Im Falle der CDRIII-Primer-Strategie konnte eine Richtigkeit der Ergebnisse validiert werden durch eine Amplifikation von Klon-spezifischer CDRIII gemeinsam mit entsprechenden C_H-Termini in vier von 11 V_H6-exprimierenden Klonen. Die niedrige Effizienz ist hierbei bedingt durch die Schwierigkeit, einen zweiten Primer für eine einzelne CDRIII zu erstellen, der gleichzeitig den Anforderungen an Klon-Spezifität und an ausreichende Positionierung 5' der CDRIII genügt. Der exemplarische Nachweis in vier von 11 Fällen ist unter diesen Gesichtspunkten eine gute Validierung. Eine weitere Bestätigung, daß verwandte B-Zellen in beiden CD27⁺ Populationen nachgewiesen werden konnten, ist das Fehlen solcher Klonmitglieder in naiven B-Zellen der Spender 7 und 8 (nicht gezeigt). Die Heterogenität der CDRIII naiver B-Zellen bereits in Kindern (Weller et al., 2008) ist eine angemessene Kontrolle für die Unterscheidung von spezifischen gegenüber zufällig identischen Amplifikaten aus polyklonalen B-Zellen. Das stärkste Argument für einen realen und gegen einen artifiziellen Ursprung der klonal verwandten Sequenzen in IgM⁺ und IgG⁺ B-Zellen ist schließlich das Vorhandensein von Mustern in den Resultaten. Im Einzelnen sind dies die durchschnittliche frühere Abstammung von IgM⁺ B-Zellen

gegenüber klassengewechselt, eine niedrigere, mit Literaturquellen übereinstimmende V-Gen-Mutationsfrequenz (insbesondere auch bei späten IgM⁺ Abkömmlingen) und nicht zuletzt die Beobachtung, daß IgM⁺ und IgG⁺ Klonmitglieder (von wenigen, wichtigen Ausnahmen abgesehen) tendenziell zusammen gruppieren. Im Falle von Kontaminierungen wäre eine wesentlich durchmischtere Anordnung zu erwarten.

Es ist wichtig festzuhalten, daß eine klonale Verwandtschaft von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgG⁺ B-Zellen alleine kein Nachweis für eine Entstehung von IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen im GC ist. Einzelne Mitglieder sowohl primär diversifizierter IgM⁺ B-Zellen als auch solcher aus TI-Immunantworten können nach einer extrafollikulären Entstehung eine Stimulation durch T-Zellen erfahren, eine GC-Reaktion durchlaufen und diese als klassengewechselte Gedächtnis-B-Lymphozyten verlassen. Erst die jeweiligen Mutationsmuster von klonal verwandten IgM⁺ und IgG⁺ B-Zellen können Rückschlüsse auf eine genealogische Entwicklung in oder außerhalb eines GC erlauben. In Abb. 4 sind drei Klone gezeigt (J, L, M), die kein Urteil über eine GC-Erfahrung zulassen. Alle mutierten und unmutierten IgM⁺ Mitglieder können TI generierte oder prädiversifizierte Klone sein, von denen einzelne Mitglieder in nachfolgenden Immunantworten zu klassengewechselten post-GC-B-Zellen differenzierten. Ähnliches gilt für zwei weitere Klone (Abb. 4 H, K): hier muß jedoch bereits das unwahrscheinliche Szenario postuliert werden, daß mindestens zwei unterschiedliche Mitglieder eines TI-generierten oder primär diversifizierten Klones zusätzlich an GC-Reaktionen teilgenommen haben (die putativen Gründerzellen sind mit einem X markiert). Das Mutationsmuster der 10 restlichen Klone (Abb. 4 A-G und N-P) ist dagegen so vielgestaltig, daß die verschiedenen IgM⁺ und IgG⁺ Mitglieder noch stärker durchmischt in den genealogischen Rekonstrukten auftreten. Eine Erklärung eines solchen Bildes durch Teilnehmen einzelner Mitglieder an GC-Reaktionen setzt eine enorme Größe und Diversität der betreffenden Klone voraus, um die Wahrscheinlichkeit für eine solche unabhängige Selektion in verschiedenen Immunantworten zu gewährleisten. Diese erforderliche Klongröße und -diversität ist mit durchschnittlich 1000 (190 bis 3600) Mitgliedern eines Klones jedoch nicht gegeben (siehe Kalkulation der Klongrößen, 2.10 und Abb. 4). Die durchmischte Anordnung von IgM⁺ und IgG⁺ Klonmitgliedern in 10 von 15 detektierten Klonen der vorliegenden Analyse läßt sich nicht damit erklären, daß statt einer einzelnen naiven B-Zelle mehrere prädiversifizierte oder TI-generierte Vorläufer eine GC-Reaktion durchlaufen haben. Die einzig mögliche

Erklärung für das beobachtete Muster aus geteilten und individuellen V-Gen-Mutationen in zwei Drittel der klonal verwandten B-Lymphozyten ist das Szenario einer gemeinsamen Herkunft klonal verwandter IgM⁺ und IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen aus GC-Reaktionen.

Da die meisten Klone (11 von 15) aus V_H6-amplifizierten Produkten isoliert wurden, muß formal diskutiert werden, ob IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselte Geschwisterzellen eine Besonderheit dieses einzelnen V-Genes darstellen. Dies ist jedoch äußerst unwahrscheinlich, da in der Literatur bislang keine Hinweise auf eine Affinität des V_H6-Gensegmentes zu bestimmten Antigenen existieren. Viel eher bestimmt die niedrige Frequenz V_H6-exprimierender B-Zellen in der PB Population (Brezinschek et al., 1995) einen niedrigeren Hintergrund aus polyklonalen Zellen und erleichtert die Amplifikation einzelner Klone. Schließlich zeigt der Nachweis von drei V_H3-23- und einem V_H1-18- exprimierenden Klon, daß IgM⁺ und IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen auch häufigere V_H-Gene nutzen.

Die Auswertung von nur 15 Klonen aus PB erlaubt kein Urteil darüber, ob alle oder nur ein Teil der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen aus GCs stammen. Gemessen an insgesamt 37 monoklonalen, experimentell weiter verfolgten C_μ oder C_δ-amplifizierten Sequenzen konnten jedoch 14 (40%) der IgG⁺ Lymphozyten-Sequenzen korrespondierende IgM⁺IgD⁺CD27⁺ Klonmitglieder zugeordnet werden. Das bedeutet, daß GC-Reaktionen regelmäßig IgG⁺ und IgM⁺ Mitglieder hervorbringen. Außerdem lassen sich Rückschlüsse auf die klonale Zusammensetzung der beiden B-Zell-Populationen im Blut ziehen: Vergleicht man deren ähnliche Frequenzen (Klein et al., 1998b) mit der ebenfalls ähnlich großen Anzahl der jeweiligen unterschiedlichen IgM⁺ und IgG⁺ Mitglieder in 8 von 15 Klonen (Abb. 4 E-J, L-O), so legt dies nahe, daß ein sehr großer Teil, wenn nicht sogar alle IgG⁺ B-Zellen, auch IgM⁺ Geschwisterzellen haben. Mögliche Gründe, warum entsprechende IgM⁺ Klonmitglieder nur in 40% der Fälle nachgewiesen werden konnten, sind erstens, daß die Anzahl der IgM⁺ Klonmitglieder unterhalb einer Nachweisgrenze liegt (weniger als 1 Mitglied in 0,5 l Blut) oder Mutationen in den Primerbindestellen eine Amplifikation erschweren. Zweitens befinden sich nur ca. 2% der humanen Lymphozyten im Blut; ihre Menge und Zusammensetzung ist von einer Vielzahl komplexer Mechanismen reguliert (etwa dem Austausch von Zellen mit lymphoiden Geweben) und unterliegt ständigen Veränderungen (Blum und Pabst, 2007). Demzufolge stellt die zelluläre Zusammensetzung des Blutes nur bedingt eine Reflexion der gesamten B-Zell-Population eines Menschen dar (Blum und Pabst,

2007). Daher ist ein einzelner Lymphozyten-Klon, der neben vielen weiteren in einer Immunantwort gebildet wurde, nur anteilig oder unter Umständen gar nicht im Blut aufzufinden. Darüber hinaus reduzieren mit der Zeit Mechanismen wie Konkurrenz und Apoptose (Utzny und Burroughs, 2001) die Anzahl der langlebigen Klonmitglieder. Dem Nachweis klonal verwandter IgM^+ und IgG^+ B-Zellen im PB des Menschen sind demnach nicht nur technische, sondern auch biologische Grenzen gesetzt.

Klonal verwandte V_H -Gen-Sequenzen aus PB $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und IgG^+ B-Zellen sind der formale Beweis dafür, daß klonale Diversifizierungsmuster aus klassischen, klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen ebenfalls in IgM^+ B-Zellen existieren. Dies ist das stärkste Argument für eine gemeinsame Herkunft aus GC-Reaktionen von somatisch mutierten IgM^+ und IgG^+ B-Zellen.

4.2.3 Ist eine Entstehung von somatisch mutierten IgM^+ B-Zellen mit dem gegenwärtigen Wissensstand vereinbar?

Wie fügen sich diese neuen Erkenntnisse in ein Bild, in dem somatische Mutationen in den V-Genen dieser Zellen durch primäre Diversifizierung oder durch Teilnahme an TI-Immunantworten eingefügt werden? Es wurde berichtet, daß Menschen, die von Geburt an keine Milz besitzen, bzw. Patienten nach einer Splenektomie spezifisch mutierte IgM^+ B-Zellen verlieren (Kruetzmann et al., 2003) (IgM -only-B-Zellen wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt). Diese Abhängigkeit der $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ B-Lymphozyten von Milzgewebe wurde interpretiert als entweder eine Abhängigkeit der Zellen von Überlebenssignalen aus bzw. einer Generierung in diesem Gewebe. Die Wichtigkeit von (mutierten) IgM^+ B-Zellen in Immunantworten gegen TI-Pathogene ist unbestritten (Martin und Kearney, 2002; Pillai et al., 2005; Shi et al., 2005; Takizawa et al., 2006). Darüber hinaus wären offensichtliche Parallelen zur Entwicklung von B1a-B-Zellen in der Milz von Mäusen eine interessante Korrelation, da diese besonderen Zellen ebenfalls eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunität gegen polysaccharidhaltige Pathogene ausüben (Wardemann et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde spekuliert, daß humane $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ein Pendant zu Maus-B1a-B-Zellen darstellen (Capolunghi et al., 2008; Kruetzmann et al., 2003; Rosado et al., 2009) und diese Theorie wurde bereits in eine Reihe von klinischen Zusammenhängen eingearbeitet (Di Sabatino et al., 2008; Di Sabatino et al., 2007; Plebani et al., 2007). Es ist jedoch wichtig zu bemerken, daß in keiner dieser Publikationen gezeigt werden konnte, daß

mutierte $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen in TI-Immunantworten gebildet werden. Der einzige experimentelle Fokus war, daß diese Zellen mit einer Resistenz gegen verkapselte Bakterien korrelieren. Dies ist unzureichend für eine Beurteilung der Herkunft von somatischen Mutationen in IgM^+CD27^+ B-Zellen. Eine Teilnahme an TI-Immunantworten ist kein Garant für eine Affinitätsreifung gegen TI-Antigene (El Shikh et al., 2009), zumal wahrscheinlich jeder TD-Immunantwort eine initiale, T-Zell-unabhängige Aktivierung von B-Zellen vorausgeht (Baumgarth, 2000). Tatsächlich wurde die Abhängigkeit von $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen von der Milz, und damit eine Abhängigkeit von TI-Immunantworten (Kruetzmann et al., 2003), in mehreren anderen Studien nicht beobachtet (Martinez-Gamboa et al., 2009; Wasserstrom et al., 2008; Weller et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen durchaus typischer T-Helfer-Zell-Stimuli bedürfen, um eine verbesserte Immunantwort zu gewährleisten (Agematsu et al., 1997). Dies ist nicht eingängig mit einer TI-Generierung. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, daß in einer Immunisierung humanisierter Mäuse (immundefiziente (SCID) Mäuse mit transplantierten humanen B-Zellen) mit Polysaccharid-Impfstoff und inaktivierten Pneumokokken sowohl IgM^+ als auch IgG^+ Gedächtnis-B-Zellen mit jeweiliger Affinität zu Polysaccharid- und gleichzeitig Protein-Antigenen gebildet werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß IgM^+ Gedächtnis-B-Zellen auch nach einem Klassenwechsel zu IgG für beide (TI- und TD-) Antigentypen Affinität zeigen (Moens et al., 2008). Zu einem gleichen Resultat führten Untersuchungen an Polysaccharid-geimpften Menschen: in 7 unabhängigen Individuen konnten klassengewechselte, affinitätsgereifte post-GC-B-Zellen und damit verbundene verbesserte Immunantworten gegen TI-Antigene nachgewiesen werden (erklärt durch einen vorherigen, natürlichen Kontakt mit TI-Antigenen in Konjugation mit Proteinen) (Zhou et al., 2002). Auch diese Erkenntnisse zeigen überzeugend, daß klassische Gedächtnis-B-Zellen an TI-Immunantworten teilnehmen und eine T-Zell-abhängige Affinitätsreifung gegen TI-Epitope von z.B. kokkalen Bakterien geschieht. Dies ist formal kein Widerspruch zu einer Affinitätsreifung von IgM^+CD27^+ B-Zellen in TI-Immunantworten, doch zeigt es, daß die beobachteten Phänomene durchaus mit einer klassischen Generierung von $IgM^+IgD^+CD27^+$ Gedächtnis-B-Zellen in GC-Reaktionen kompatibel sind. Zum Abschluß sollen noch wichtige Arbeiten an Mausmodellen erwähnt werden: es existiert eine Gedächtnisfunktion für TI-Antigene in Nagetieren; diese ist abhängig von B1b-B-Lymphozyten, bedarf keiner T-Zellen und ist unabhängig von SHM (Alugupalli et al., 2004; Toyama et al., 2002). Demnach

ist es möglich, durch TI-Immunisierung langlebige Gedächtnis-B-Zellen – wie die des Menschen (Richards et al., 2000) – gegen TI-Antigene zu bilden. Bei einer genaueren Betrachtung solcher TI-Immunisierungen zeigen sich jedoch mit humanen $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen unvereinbare Eigenschaften: im Gegensatz zu TD- führen TI-Immunisierungen in Mäusen zwar zu (abortiven) GC-Reaktionen, die darin gebildeten post-GC-B-Zellen sind jedoch weitgehend unmutiert und nicht langlebig (Obukhanych und Nussenzweig, 2006; Toellner et al., 2002). Nicht zuletzt gibt es Hinweise darauf, daß MGZ in Mäusen ein Reservoir für post-GC-B-Zellen darstellen (Liu et al., 1988; Song und Cerny, 2003). Das bedeutet, an einer Prävention von Infektionen durch verkapselte Bakterien können ebenfalls Zellen aus TD-Immunisierungen beteiligt sein.

Das Fazit zu einer TI-Generierung von somatischen Mutationen in IgM^+CD27^+ B-Zellen ist, daß eine Korrelation dieser Zellen mit einer verbesserten Immunantwort gegen TI-Antigene die vorliegenden Daten zu einer Generierung in TD-Immunantworten keineswegs ausschließt. Stattdessen wird deutlich, daß natürliche Effektorfunktionen dieser post-GC-B-Zellen durch intrinsische Errungenschaften während einer Affinitätsreifung gegen TD-Antigene, oder alleine durch ihre Lokalisation in den MGZ der Milz begründet sein müssen (Dunn-Walters et al., 1995; Zandvoort et al., 2001).

Im Vergleich dazu stützt sich die Theorie einer primären Diversifizierung auf direkte, eindeutige Indizien. Es wurde berichtet, daß eine Population von $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen bereits in Föten angelegt wird (Scheeren et al., 2008). Mit geringer Frequenz ist eine solche Population auch in Nabelschnurblut zu finden (Weller et al., 2001) und wird bis zu einem Alter von 2 Jahren graduell und parallel zu IgG^+ B-Zellen aufgebaut (Weller et al., 2008). Die Existenz solcher Zellen ist ein klarer Hinweis darauf, daß (in Maßen) eine T-Zell-unabhängige Diversifizierung für die Existenz von $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen in fötaler Leber und im Nabelschnurblut von Neugeborenen verantwortlich sein kann. Es ist jedoch wichtig zu bemerken, daß erstens die Frequenz der mutierten $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Lymphozyten in Fötus und Nabelschnur sehr gering ist (< 5% bzw. 1%), weiterhin der Anteil der mutierten Zellen nur 17-21% bzw. 20-64% der IgD^+CD27^+ Zellen ausmacht und schließlich die durchschnittliche Mutationsfrequenz der mutierten B-Zellen 2,4 bzw. 0,4% beträgt (Scheeren et al., 2008; Weller et al., 2001). Dies steht in einem deutlichen Gegensatz zu den mutierten IgM^+ B-Zellen des adulten Menschen, der durchschnittlich 25% $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen im Blut aufweist, von denen fast alle

(94%) mutiert sind, und zwar mit einer durchschnittlichen Mutationsfrequenz von 4-6%. Daher sind die Prozesse, die eine Diversifizierung des BCR bereits im Fötus steuern, verhältnismäßig selten und uneffektiv. Welche Prozesse könnten an solch einer Diversifizierung des BCR beteiligt sein? Wenn auch für mutierte Zellen aus humanem Nabelschnurblut theoretisch immer noch potentielle T-Zell-abhängige fötale Infektionen verantwortlich gemacht werden könnten (Adkins et al., 2004; Cooper, 1987; Enders et al., 2007; Lazzarotto et al., 2008; Stiehm et al., 1966), so scheint das für $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen aus fötaler Leber nicht zuzutreffen: In der entsprechenden Arbeit zeigen artifizielle, humanisierte Mausmodelle, daß die Entwicklung eines diversifizierten $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ Kompartimentes weitgehend unabhängig von T-Zellen geschieht. Während Weller et al. und Scheeren et al. jeweils nur mutierte IgM^+ B-Zellen in Fötus und Nabelschnurblut beschreiben, steht demgegenüber eine frühere Publikation, die nur unmutierte C_μ - jedoch eine ganze Reihe von somatisch mutierten C_γ -Transkripten beschreibt (Mortari et al., 1993). Für diese IgG^+ Transkripte kommen als Quelle im Nabelschnurblut nur klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen in Frage, die in uteralen T-Zell-abhängigen Immunreaktionen im Fötus gebildet wurden. In solchen putativen GC-Reaktionen würden ebenfalls IgM^+ Gedächtnis-B-Zellen als frühe Abkömmlinge das GC verlassen. Selbst wenn das nicht zutreffen sollte, kann für keine der beiden Arbeiten ausgeschlossen werden, daß die beobachteten mutierten $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ Zellen statt einer Prädiversifizierung aus TD-Immunantworten stammen. Dafür würde bereits die niedrige Mutationsfrequenz der fötalen $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen sprechen, wie durch Mausmodelle suggeriert wird (Toellner et al., 2002). Leider sind Untersuchungen zur Langlebigkeit – TI generierte mutierte Zellen sind kurzlebig (Toellner et al., 2002) - der sogenannten prädiversifizierten $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen in Fötus und Nabelschnurblut nicht möglich. Eine stetige Akkumulation der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ab Geburt wird in diesem Zusammenhang interpretiert als zunehmender Ausbau einer solchen unabhängigen B-Zell-Abstammungslinie, parallel zu einer Akkumulation von IgG^+ Gedächtnis-B-Zellen (Weller et al., 2008). Hier stellt sich jedoch die Frage, warum ein vorgeschlagener Prädiversifizierungsweg nicht mit einer weitgehend konstanten Mutationsrate arbeitet, sondern diese erst nach zwei Jahren Lebensalter voll ausgebildet haben sollte. Naheliegender ist dagegen eine Herkunft von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und klassengewechselten B-Zellen aus gemeinsamen GC-Reaktionen, die spätestens ab der Geburt durch akkumulierende Infektionen/Reinfektionen mit wiederholten GC-Passagen und zusätzlicher

Affinitätsreifung zu einem gleichmäßigen Aufbau eines klassengewechselten und IgM⁺ post-GC-Kompartimentes führen würden (Agematsu et al., 1997; Zandvoort et al., 2001).

Eines der ersten und stärksten Argumente für eine GC-unabhängige Generierung von somatisch mutierten IgM⁺ B-Zellen war die Existenz solcher Zellen in Patienten mit Typ 1 des Hyper-IgM-Syndrom (HIGM) (Weller et al., 2001). Diesen Patienten fehlt ein intakter CD40-Ligand (Ferrari et al., 2001), daher weisen diese Patienten Defekte in der Ausbildung von GC-Strukturen in Lymphknoten auf (Facchetti et al., 1995; Notarangelo et al., 1992; Van Kooten und Banchereau, 1996). Es ist wichtig, auch hier zu bemerken, daß die gefundenen Zellen in Frequenz (1-4%), Anteil mutierter Zellen (43-95%) und Mutationsfrequenz (0,3 bis 3,4%) denen in Föten und Nabelschnurblut ähneln (Scheeren et al., 2008; Weller et al., 2001). Weitere Arbeiten zu mutierten IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen in Typ 1 HIGM-Patienten zeigen diese Tendenz umso deutlicher (Chu et al., 1995; Kuraoka et al., 2009; Longo et al., 2009). Daher gilt auch hier das Argument, daß ein zu geringer Teil der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ Lymphozyten mutiert ist (und auch qualitativ zu niedrig), um mit den Werten einer expandierenden Population von post-GC-B-Zellen in Milz und PB bereits in jungen Kindern (8-11 Monate), geschweige denn in adulten Menschen plausibel korreliert werden zu können. Darüber hinaus muß festgehalten werden, daß in immundefizienten Menschen des HIGM-Syndroms (genau wie in Föten oder Säuglingen (Adkins et al., 2004; Levy, 2007)) eine starke Suppression bzw. Unvollständigkeit des Immunsystems vorliegt. Somit läßt ein Mangel an Konkurrenz durch adaptive Immunität Raum für alternative Mechanismen, etwa eine rudimentär angelegte primäre Diversifizierung oder ein gewisses Maß an SHM durch TI-Aktivierungen, oder SHM in unreifen, transitionellen B-Zellen, wie in Mäusen nachgewiesen werden konnte (Han et al., 2007; Mao et al., 2004; Ueda et al., 2007). Abschließend sei noch erwähnt, daß eine Untersuchung von Typ 1 HIGM-Patienten auf GC- oder GC-ähnliche Strukturen niemals so umfassend durchgeführt wurde, daß diese vollkommen ausgeschlossen werden können, mehr noch wurden in einer Studie sogar GC-ähnliche Strukturen in Lymphknoten gefunden (Facchetti et al., 1995). Außer CD40-CD40L-Interaktion zum Ein- und Austritt in GC-Reaktionen (Basso et al., 2004) verfügen die Patienten über alle nötigen Elemente einer TD-Affinitätsreifung. Interessanterweise gibt es zumindest einen alternativen Liganden für humanes CD40, der in GCs exprimiert wird und eine stimulierende Wirkung auf B-Zellen ausübt (Brodeur et al., 2003). Auch in Mausmodellen existieren Hinweise auf

eine CD40L-unabhängige Aktivierung von CD40 in TI-induzierten GC-Reaktionen (Gaspal et al., 2006). Eine alternative Stimulierung von CD40 ist demnach auch in CD40L-defizienten Patienten möglich.

In Typ 2 HIGM-Patienten, in denen aufgrund von Mutationen des AICDA-Gens keine SHM und kein Klassenwechsel, dafür aber hyperplastische Keimzentren aufzufinden sind (Revy et al., 2000; Weller et al., 2004), sind hohe Frequenzen von $\text{IgM}^+\text{IgD}^-\text{CD27}^+$ (bis 7% der PB B-Zellen) mit unmutierten BCR aufzufinden. Das verleitet Weill et al., dazu, IgM -only (und nicht $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$) B-Zellen als frühe GC-B-Zellen zu postulieren, die mangels Klassenwechsel-Rekombination akkumulieren (Weill et al., 2009). Dazu steht jedoch in deutlichem Widerspruch, daß erstens AICDA-defiziente Patienten ebenfalls eine ähnlich große Population unmutierter $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen aufweisen (Weller et al., 2004), zweitens IgM -only B-Zellen im PB dagegen klassischerweise mutiert sind (Klein et al., 1998b) und darüber hinaus intrinsisch eine reduzierte Klassenwechsel-Kapazität aufweisen (Werner-Favre et al., 2001). Im Gegenteil ist die Existenz von IgM -only B-Zellen in Patienten mit vergrößerten GC eher ein Hinweis darauf, daß dies post-GC-B-Zellen sind, die IgD herunterreguliert haben.

Ein weiteres Argument für einen primären Diversifizierungsweg für B-Lymphozyten im Menschen entstammt der Analyse des BCR-Repertoires in Kleinkindern (8 bis 11 Monate) anhand der Verteilung und Komplexität der CDRIII-Längen in naiven, $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$, klassengewechselten und GC-B-Zellen (aufgesplittet in C_μ - und C_γ -Ig-Transkripte) (Weller et al., 2008) (Abb. 26).

Abbildung 26: BCR-Rezeptor-Diversität in Kleinkindern

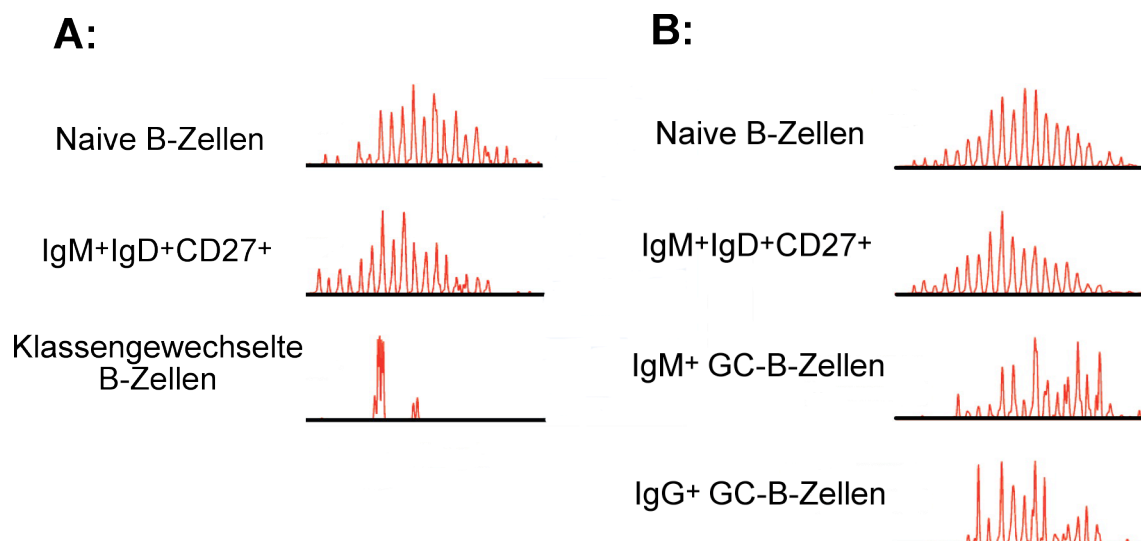


Abb. 26: Abgebildet sind CDRIII-Spektren-Analysen des VH3-15 Gens von B-Zell-Populationen aus PB eines 11 Monate alten Kleinkindes (A) bzw. aus der Milz eines 8

Monate alten Kleinkindes. Die Beschriftung bezeichnet die jeweils untersuchte Population, die roten Peaks zeigen eine Verteilung distinkter CDRIII-Längen von amplifizierten V-Genen. Wichtig: untereinander dargestellte Verteilungen beruhen auf einer identisch skalierten X-Achse. Modifiziert nach (Weill et al., 2009).

Es fällt auf, daß naive und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ein sehr heterogenes, klassengewechselte und GC-B-Zellen ein verhältnismäßig homogenes (bzw. oligoklonales) CDRIII-Spektrum aufweisen. Weller et al. interpretieren diesen Unterschied als Hinweis auf eine polyklonale, prädiversifizierte Zusammensetzung der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen, die – ähnlich naiver B-Zellen – bereits früh in der Entwicklung von Kleinkindern polyklonal angelegt wurden. IgG^+ B-Zellen dagegen entstehen nur schrittweise mit ersten Immunreaktionen. Wie ist ein solches Bild mit einer gemeinsamen Herkunft von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und IgG^+ B-Zellen aus GC-Reaktionen zu vereinbaren? Der Schlüssel liegt darin, daß Kleinkinder aufgrund der niedrigen Entwicklungsstufe ihres Immunsystems in großem Maße immunsupprimiert sind (Lydyard et al., 2004). Ein verzerrter Zytokin-Haushalt (Levy, 2007), reduzierte $\text{T}_\text{H}1$ - und $\text{T}_\text{H}2$ -Antworten (Adkins et al., 2004), aber auch Einschränkungen in der Diversität der B-Lymphozyten (Mortari et al., 1993; Xue et al., 1997), sowie in der Architektur von lymphoiden Follikeln, Follikulären Dendritischen Zell-Netzwerken und GCs (Adkins et al., 2004; Pihlgren et al., 2003; Timens et al., 1987) führen dazu, daß besonders der adaptive Arm nur unzureichend funktionsfähig ist (Marshall-Clarke et al., 2000; Siegrist und Aspinall, 2009). Eine der Folgen ist, daß Antikörperreaktionen verzögert, weniger effizient und vor allem mit kürzerer Dauer ablaufen (Adkins et al., 2004; Siegrist, 2001). GC-Reaktionen, die über unzureichende T-Zell- oder FDC-Netzwerke verfügen, könnten früh abbrechen und daher hauptsächlich IgM^+ Gedächtnis-B-Zellen ausschütten. Ebenso könnte das Klassenwechselverhalten aufgrund von verzerrten Zytokin-Haushalten benachteiligt sein (Levy, 2007). Für ein verändertes Klassenwechselverhalten spricht ebenfalls, daß IgG^+ B-Zellen bereits ab Geburt, IgA^+ B-Zellen jedoch erst nach ca. 2 Monaten gebildet werden (Lydyard et al., 2004), und daß in Neugeborenen die Verteilung von Ig-Klassen von denen in erwachsenen Menschen abweicht (Adkins et al., 2004). Nicht zuletzt müssten interklonale Selektionsprozesse während einer GC-Reaktion in Betracht gezogen werden. Das impliziert, daß frühe IgM^+ B-Zellen mit einer kurzen Verweildauer im GC weitaus weniger Konkurrenz ausgesetzt sind als hochaffine IgG^+ B-Zellen in einer späten GC-Reaktion, deren Zusammensetzung durch wenige Klone bestimmt wird (Kroese et al., 1987; Küppers et al., 1993). Es gibt also eine Reihe von Prozessen, die eine polyklonale Zusammensetzung von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen als Folge von

TD-Immunantworten erklären können. Interessanterweise bergen sogar die Daten zu einer sogenannten primären Diversifizierung von mutierten IgM⁺ Lymphozyten im Menschen deutliche Hinweise auf eine antigenische Selektion: die CDRIII der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen ist durchschnittlich kürzer als in naiven B-Zellen (Abb. 26). Durchschnittlich kürzere CDRIII-Längen sind in der Literatur eindeutig mit antigenischer Selektion assoziiert worden (Brezinschek et al., 1998; Luger et al., 2001; McHeyzer-Williams et al., 1993; Rosner et al., 2001; Tsuiji et al., 2006). Dieser Unterschied besteht ebenfalls zwischen unmutierten C_μ- und mutierten C_γ- und C_α-Transkripten aus Nabelschnurblut (Mortari et al., 1993). Wenn Weill et al. kürzere CDRIII auf Antigen-unabhängige Selektionsprozesse, d.h. tonische BCR-Signale durch autoantigenes Kreuzvernetzen, bei der Entstehung von MGZ-B-Zellen zurückführen (Weill et al., 2009), lassen sie dabei außer Acht, daß in Mäusen gerade das schwächste tonische BCR-Kreuzvernetzen zur Differenzierung in MGZ-B-Zellen führt, während die intensivste Kreuzvernetzung zur Differenzierung in B1-B-Zellen führt (Casola et al., 2004). Im Menschen gibt es jedoch keine Unterschiede in den durchschnittlichen CDRIII-Längen von B1 und B2-B-Zellen in PB (Brezinschek et al., 1997) und Nabelschnurblut (Kiyoi et al., 1995).

Ein letzter Punkt der diskutiert werden soll ist die Ähnlichkeit von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen aus PB zu MGZ-B-Zellen der Milz; so z.B. eine nachgewiesene klonale Verwandtschaft (Weller et al., 2004), eine besondere Reaktivität mit TI-Antigenen (Kruetzmann et al., 2003; Martin und Kearney, 2002; Takizawa et al., 2006) und eine mögliche Abhängigkeit von Notch2 (Scheeren et al., 2008), einem wichtigen Faktor für MGZ-B-Zell-Entwicklung in Mäusen (Saito et al., 2003; Tanigaki et al., 2002). Diese Übereinstimmungen haben dazu geführt, daß in der Literatur IgM⁺CD27⁺ PB B-Zellen häufig mit MGZ-B-Zellen gleichgesetzt werden, so z.B. in (Weill et al., 2009). Auch dies hat Implikationen auf eine Betrachtung dieser Zellen als unabhängige Abstammungslinie, da wichtige Arbeiten an Mausmodellen zeigten, daß dieses Szenario in Nagetieren zutrifft (Cariappa et al., 2001; Casola et al., 2004; Kuroda et al., 2003; Loder et al., 1999; Saito et al., 2003; Tanigaki et al., 2002). Es ist jedoch zu beachten, daß zwischen Maus und Mensch experimentell wie biologisch wichtige Unterschiede bestehen: beinahe alle Arbeiten zu Maus-B-Zellen werden an entnommenen Milzen durchgeführt, daher ist nur wenig über PB B-Zell-Populationen bekannt. Jedoch können B-Zellen aus verschiedenen Geweben wichtige Unterschiede, z.B. im Mutationsgehalt, aufweisen (Blum und Pabst, 2007; Weller et al., 2004; Weller et al., 2008). Darüber hinaus bestehen strukturelle

(Mebius und Kraal, 2005) und qualitative Unterschiede zwischen Mensch und Kleinsäuger, etwa der Mutationsgehalt der MGZ-B-Zellen (Carsetti et al., 2004; Dunn-Walters et al., 1995). Eine MGZ-B-Zelle ist definiert durch ihre Lokalisation (sessile Interaktion mit Milzgewebe), daher ist eine Bezeichnung von zirkulierenden $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen aus PB als MGZ-B-Zellen unpräzise. Es zeigt sich ausgerechnet in Publikationen zu einer Übereinstimmung dieser Populationen (Weller et al., 2004; Weller et al., 2008) entscheidende Unterschiede: in altersgleichen Spendern weisen die B-Zellen aus der Milz – wohlgermerkt sowohl IgM^+CD27^+ als auch klassengewechselte B-Zellen – einen ca. 2-fach niedrigeren Mutationsgehalt auf. Dies macht deutlich, daß auch im Menschen besondere Selektionskriterien für die Zusammensetzung der MGZ bestehen und die beiden Populationen nicht ohne weiteres gleichgesetzt werden dürfen. Abgesehen davon besteht kein Grund zur Annahme, daß nicht gelegentlich sowohl $IgM^+IgD^+CD27^+$ als auch klassengewechselte B-Zellen in die MGZ (und aus ihr heraus) selektiert werden. Dies jedoch ist kein Widerspruch zu einer Abstammung aus gemeinsamen GC-Reaktionen. Es gibt sogar einen interessanten Hinweis auf klonale Verwandtschaft von GC-B-Zellen und MGZ-B-Zellen eines sekundären Milz-Follikels (Mateo et al., 2001), wenn auch die Gemeinsamkeit von 2 Bcl6-Mutationen zu gering ist, um als unumstößlicher Beweis für eine klonale Verwandtschaft von B-Zellen zu gelten.

Zusammengefasst ist die Präsenz einer sehr kleinen Fraktion von geringfügig mutierten IgM^+ B-Zellen in fötaler Leber, Nabelschnurblut und auch in Typ1 HIGM-Patienten bestenfalls ein Hinweis auf eine rudimentäre Diversifizierungsmaschinerie, die im Menschen nur minimal, oder unter extremen Bedingungen wirksam ist. Zum jetzigen Zeitpunkt existiert kein Beweis dafür, daß es sich bei mutierten IgM^+ Lymphozyten nicht um Gedächtnis-B-Zellen handelt, die in gesunden, erwachsenen Menschen gemeinsam mit IgG^+ B-Zellen in GC-Reaktionen gebildet werden.

4.2.4 Die Dynamik von Gedächtnis-B-Zellen in primären und sekundären Immunantworten

Die Analyse von Genumlagerungen aus klonal verwandten IgM^+ und IgG^+ Gedächtnis-B-Zellen zeigt nicht nur ihre gemeinsame Herkunft aus GC-Reaktionen, sondern gewährt darüber hinaus Einblicke in die Dynamik der Entwicklung von Gedächtnis-B-Zell-Klonen in GC-Reaktionen.

Es fällt auf, daß für viele Klone eine überraschende Vielfalt an parallel selektierten Mutationsmustern besteht. Daß eine solch hohe Diversität und daraus resultierenden unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Antikörper aus einem einzelnen B-Zell-Klon entspringt, zeigt, wie vielfältig und komplex die parallel ablaufenden Selektionsprozesse in einem einzelnen GC sind. Die hohe Diversität eines B-Zell-Klones in Antwort zu einer begrenzten Auswahl von präsentierten Antigenen einer GC-Reaktion könnte dazu beitragen, eine erschwerte Wiedererkennung von leicht modifizierten Pathogenen (ein Phänomen, bezeichnet als original antigenic sin) zu umgehen.

Weiterhin zeigt das regelmäßige Auffinden von Klonmitgliedern mit nur wenigen oder gar keinen Mutationen im V_H -Gen, daß Gedächtnis-B-Zellen durchweg in GC-Reaktionen und nicht z.B. nur in der Endphase gebildet werden. Es zeigt ebenfalls, daß auch post-GC-B-Zellen mit nur wenigen Mutationen existieren können, und nicht notwendigerweise aus Immunreaktionen ohne oder mit verminderter T-Zell-Hilfe stammen. Ebenfalls wird ersichtlich, daß der Klassenwechsel ein relativ frühes Ereignis im Verlauf einer GC-Reaktion sein kann, wenn auch tendenziell IgG^+ Klonmitglieder eher späte Abkömmlinge mit stärker mutierten V_H -Gen Sequenzen sind. Das impliziert, daß IgM^+ B-Zellen vornehmlich frühe Abkömmlinge derselben GC-Reaktionen wie klassische Gedächtnis-B-Zellen sind, und liefert eine plausible Erklärung für ihre niedrigeren Mutationsfrequenzen.

Mutierte IgM^+ B-Zellen sind Gedächtnis-B-Zellen, deren relativ niedrigere Affinität z.B. durch die hohe Avidität eines pentameren IgM -Antikörpers ausgeglichen wird. Ihre im Vergleich zu klassengewechselten B-Zellen breitere, intermediär affine Diversifizierung in GC-Reaktionen erlaubt ihnen womöglich eine Aktivierbarkeit durch BCR-Kreuzvernetzung eines breiteren Spektrums an Antigenen und ist entscheidend für ihre Rolle in angeborener Immunität gegen T-Zell-unabhängige Antigene. Der Vorteil gegenüber unmutierten B1-B-Zellen ist hierbei, daß sie als Gedächtnis-B-Zellen (auch von nicht kognitiven, zufällig affinen) Antigenen schneller und besser aktiviert werden können (Agematsu et al., 1997). Darüber hinaus sind IgM^+ Gedächtnis-B-Zellen – im Gegensatz zu klassengewechselten und B1-/naiven B-Zellen - durch einen stringenten Selektionsprozess von autoreaktiven Mitgliedern befreit (Tsuiji et al., 2006) und verringern so das Risiko von Autoimmunerkrankungen als Begleiterscheinung einer Infektion durch gewöhnliche Pathogene. Nicht zuletzt sind IgM^+ Gedächtnis-B-Zellen, neben ihrer dualen Funktion in angeborener und adaptiver Immunität, antigenerfahrene Mitglieder eines Gedächtnis-B-Zell-Klones,

offen für eine weitere Affinitätsreifung gegen modifizierte Pathogene. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit zu einem späteren Klassenwechsel in sekundären Immunantworten (Werner-Favre et al., 2001), etwa um auf veränderte Lokalisation des Antigens reagieren zu können, was klassengewechselten B-Zellen unter Umständen (d.h. für 5' gelegene C_H-Gene) verwehrt ist.

Die Analyse von Gedächtnis-B-Zell-Klonen erlaubt ein besseres Verständnis vieler Aspekte einer T-Zell-abhängigen Immunantwort. Weiterhin bietet sie Raum für Spekulationen, warum im Menschen im Vergleich zu niederen Säugetieren vermehrt antigenerfahrene Lymphozyten am Aufbau einer natürlichen Immunität beteiligt sind.

Zusammengefasst zeigen die Daten zu Telomerlängen, Bcl6-Mutationen und klonal verwandten IgM⁺ und IgG⁺ post-GC-B-Zellen, daß der überwiegende Teil – wenn nicht gar alle - IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und auch IgM-only B-Zellen gesunder Erwachsener aus GC-Reaktionen stammen und somit Gedächtnis-B-Zellen in einem klassischen Sinne sind.

4.3 Genexpressionsanalyse von humanen B-Zell-Populationen

In den folgenden Kapiteln soll die Analyse von Genexpressionsprofilen zur Verwandtschaftsbestimmung und Charakterisierung von B-Lymphozyten-Populationen aus PB des Menschen diskutiert und interpretiert werden. Grundlage für diese Analyse waren jeweils 5 Genexpressions-Arrays pro naiver, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ bzw. klassengewechselter B-Zell-Population. Im Gegensatz zu vorherigen Studien (Klein et al., 2003; Weller et al., 2004) konnten in der vorliegenden Analyse große Unterschiede zwischen den Transkriptionsmustern der einzelnen Populationen gefunden werden. Dies schließt nicht nur die Menge der differentiell exprimierten Transkripte, sondern auch den Expressionsfaktor einzelner Transkripte mit ein. Dieser lag für signifikant differentiell exprimierte Gene zumeist zwischen 2 und 10, in manchen Fällen konnten jedoch dramatische 50- bis 150-fache Unterschiede im Transkriptgehalt einzelner Gene nachgewiesen werden. Tabelle 11 (siehe 3.3.3) zeigt eine Übersicht über die Anzahl der mindestens 2-fach statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene.

Eine gezielte Suche nach Transkripten, die durch Kontaminationen mit T-Zellen (z.B. CD3, CD4 oder CD8), NK-Zellen (CD56, CD16), Monozyten (CD14, CD16) oder B-Zellen der jeweils anderen Populationen (IgM, IgD, IgG/IgA bzw.

CD27) entstanden sein müssen, hatten Signalwerte nahe dem Hintergrund (nicht gezeigt).

Zusammengefasst zeigt dies, daß die Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels des Message Amp II biotin enhanced kit (Applied Biosystems, siehe 2.12) erfolgreich, mit hoher Sensitivität und ausreichender Reinheit verlaufen ist. Sie bietet eine stabile Grundlage für eine Charakterisierung von humanen PB B-Zell-Populationen.

4.3.1 Bestimmung eines Verwandtschaftsgrades von B-Zell-Populationen aus PB

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde anhand zweier verschiedener mathematischer Verfahren die Ähnlichkeit von naiven, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen auf transkriptioneller Ebene geprüft. In beiden Ansätzen gruppieren sich die je 5 verschiedenen Datensätze naiver bzw. klassengewechselte Lymphozyten in jeweils unabhängigen *clustern*. Da beide Konditionen als extreme Phänotypen angenommen werden können (bezüglich der Frage, ob IgM⁺ B-Zellen ähnlicher zu naiven oder klassengewechselten B-Zellen sind), ist dies eine gute Validierung für die Richtigkeit der Vorgehensweise. Die Lage der IgM-only B-Zellen in den hierarchischen Gliederungen und PCA zeigte in beiden Fällen eine jeweils deutliche Assoziation mit klassengewechselten B-Zellen. Dies stimmt überein mit anderen Quellen (Weill et al., 2009), die IgM-only B-Zellen als GC-Vorläufer bzw. –Derivate betrachten. Die Einordnung der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen dagegen ist weniger eindeutig. Betrachtet man die Ähnlichkeit von naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen alleine, so erscheinen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen als Intermediate zwischen naiven und klassengewechselten B-Zellen. Diese intermediäre Lokalisierung zeigt zwar nach wie vor eine stärkere Tendenz zu klassengewechselten B-Zellen, dennoch sind in der hierarchischen Gliederung drei Datensätze und in der (statistisch aussagekräftigeren) PCA zumindest einer deutlich mit naiven B-Zellen assoziiert (siehe 3.3). Es gibt drei Szenarien, die im Zusammenhang mit einer solchen heterogenen Ähnlichkeit diskutiert werden müssen: Erstens, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen des Menschen sind eine biologisch heterogene Population aus (prädiversifizierten) naiven B-Zellen und post-GC-B-Zellen, daher ähnelt die je nach Spender variierende Zusammensetzung entweder mehr naiven oder mehr klassengewechselten B-Zellen. Ein solches Szenario ist grundsätzlich nicht auszuschließen, erscheint aber vor dem Hintergrund

der beschriebenen molekularen Gemeinsamkeiten und klonaler Verwandtschaft mit post-GC-B-Zellen als unwahrscheinlich. Zweitens könnte die Dualität der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen in angeborener und adaptiver Immunität sich ebenfalls – je nach individueller genetischer Prädisposition oder klinischer Vergangenheit – in den einzelnen Spendern auch in den Transkriptionleveln der Population niedergeschlagen haben, wodurch IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen einiger Spender einen stärkeren B1-/naive B-Zellen-Phänotyp aufweisen. Drittens müssen jedoch noch rein technische Umstände in Betracht gezogen werden: In einer Mindestreinheit von 98% für sortierte IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen kommen als kontaminierende Ereignisse vor allem IgM⁺IgD⁺ naive B-Zellen und nicht IgD⁻ (IgM-only, IgG⁺, IgA⁺) in Frage. Dieser Umstand führt dazu, daß bis zu 2% der analysierten Transkripte aus naiven B-Zellen stammen. Dies wäre in einer *supervised* Analyse zu vernachlässigen, da in der Regel diese Transkripte auch nur 2% der Signalintensität erreichen. In einer *unsupervised* hierarchischen Gliederung bzw. PCA würde ein Expressionsmuster aus in naiven B-Zellen besonders stark exprimierten Transkripten jedoch auf ein bestehendes Expressionsmuster aufaddiert. Dieses würde zwar schwache Signalwerte aufweisen, kann im Vergleich zu nicht-naiven B-Zellen jedoch statistische Signifikanz erreichen, solange genügend Transkripte eines naiven Phänotypes die Hintergrundschwelle durchbrechen. Eine eindeutige Klärung, welche der drei Ursachen für die beobachteten Resultate verantwortlich zeichnet, kann nicht erfolgen. Es ist jedoch bezeichnend, daß eine PCA mit Reduktion der *probe sets* bzw. mit einer Umstellung der Analyse auf *supervised*, die Assoziation der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ mit naiven B-Zellen abnimmt, d.h. Kontaminationen vermutlich eine Rolle spielen.

Zusammengefasst ist die Ähnlichkeitsanalyse von B-Zell-Populationen aus humanem PB vereinbar mit dem Szenario, daß IgM⁺CD27⁺ B-Zellen Gedächtnis-B-Zellen sind. Mehr noch untermauert eine höhere Ähnlichkeit eines Großteils der mutierten IgM⁺ B-Zell-Populationen mit klassengewechselten B-Zellen diese Hypothese. Darüber hinaus wird der wesentlich faszinierendere Eindruck erweckt, daß die höchste Ähnlichkeit immer noch zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgM-only B-Zellen besteht und somit eine Eigenständigkeit, d.h. eine losgelöste Rolle unabhängig von naiven und klassengewechselten B-Zellen suggeriert. Dies wirft die Fragestellung auf, welche spezifischen Eigenschaften in den Entwicklungsprozessen in GC-Reaktionen etabliert werden. Bezüglich einer Verschiedenheit von IgM-only und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen muß an dieser Stelle erwähnt werden, daß mit den

bisherigen Analysen kein wesentlicher Unterschied festzustellen war. Weder in den Untersuchungen zu Spuren einer GC-Erfahrung (siehe 3.2.1 und 3.2.2) noch den Auswertungen der Genexpressionsprofile (siehe 3.3) konnte bislang ein Hinweis auf eine Besonderheit einer der beiden Populationen gefunden werden, möglicherweise erfordert dies eine statistisch relaxiertere Vorgehensweise (Tabelle 11). Die weitere Analyse in dieser Arbeit fokussiert sich auf naive, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselte B-Zellen.

4.3.2 Identifizierung von Gensignaturen, die eine spezifische Funktion von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen suggerieren

Die Auswertung von Genexpressionsprofilen anhand paarweiser Vergleiche ist eine Methode um Besonderheiten eines Phänotyps identifizieren zu können. Ihr Vorteil ist, daß der Phänotyp von Entitäten umfassend erfasst werden kann. Die vorliegende Analyse basiert auf Genexpressions-Arrays des Typs HG-U133Plus_2.0 (Affymetrix) und erlaubt eine genomweite Analyse der transkriptionellen Unterschiede in humanen Zellen. In der Größe der Datenmenge liegt gleichzeitig auch der Nachteil einer solchen Analyse: es erfordert viel Aufwand, relevante Unterschiede herauszufiltern, etwa funktional verknüpfte Gengruppen oder zentral wirkende Signalmoleküle/Transkriptionsfaktoren, die einen Hinweis auf biologische Eigenschaften liefern. Die Betonung liegt hierbei auf Hinweis, denn der Auswertung von großen Datenmengen liegt ein statistisches Problem zugrunde: je mehr Instanzen getestet werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für die Identifizierung von falsch-positiven Ereignissen, d.h. *probe sets*, die aufgrund statistischer Schwankungen zufällig als differentiell ausgeprägt erscheinen, obwohl sie es nicht sind. Mathematische Korrekturverfahren (FDR) sind daher essentiell für eine Analyse. Jedoch sind auch ihnen Grenzen gesetzt, besonders wenn es um die Beurteilung einzelner *probe sets* oder sehr kleiner Gengruppen geht (Vergleich GSEA: je größer eine Genliste ist, desto verlässlicher ist die Kalkulation der FDR). Da eine finale Klärung der identifizierten Genmuster (siehe 3.3.3) durch zusätzliche Nachweise auf Proteinebene, besser noch durch funktionale Studien, noch nicht erfolgt ist, müssen die im Folgenden auszugsweise aufgeführten Ergebnisse unter Vorbehalt diskutiert werden.

Hinweise auf Besonderheiten der BCR-Signaltransduktion

Alle vier untersuchten B-Zell-Populationen sind ruhende Lymphozyten. In Ermangelung einer Interaktion mit kognitiven Antigenen sollte eine Kreuzvernetzung des BCR ausschließlich auf sogenannte tonische Signale zurückzuführen sein, die zusammen mit Zytokinen wie BAFF für das Überleben der ruhenden Lymphozyten verantwortlich sind (Khan, 2009; Kraus et al., 2004). Die Verfügbarkeit entsprechender Antigene sollte für B-Zellen des PB im Durchschnitt gleich sein. Zu erwarten wären Unterschiede erst bei der Signalweitergabe innerhalb der B-Zellen: die verschiedenen Verhältnisse von IgM zu IgD auf der Oberfläche von naiven, IgM-only und IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen (Klein et al., 1997; Klein et al., 1998b), bzw. der Wechsel zu einem anderen C_H-Gen ist mit Unterschieden in der Signalweitergabe in Maus-B-Zellen (Geisberger et al., 2003; Horikawa et al., 1999) bzw. im Menschen verbunden (Martin und Goodnow, 2002). Tatsächlich sind zentrale Elemente der BCR-Signaltransduktion, wie CD79A/B, BLNK, LYN, SYK und BTK und andere (Tsubata und Wienands, 2001) auf Transkriptionsebene differentiell mit bis zu 10-fachem Unterschied exprimiert (Abb. 7). Eine eindeutige Assoziation von stärkerer Transkription signalweitergebender Moleküle in Gedächtnis-B-Zellen (z.B. LYN) ist nicht grundsätzlich gegeben, jedoch findet sich ein interessantes Genexpressionsmuster von Molekülen, die in einer Aktivierung von Phospholipase C_γ2 (PLC_γ2) münden. Die Phosphotyrosinkinase (PTK) BTK und SYK sind hierfür zentrale Moleküle (Kurosaki et al., 2000; Takata et al., 1994) und in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen mit einem Expressionsfaktor von 2 bis 3 (engl. 2 to 3 fold change, 2-3 FC) exprimiert. In Abbildung 5 ist eine Assoziation von SYK mit mutierten IgM⁺ B-Zellen zu erkennen. Die darüber hinaus starke Assoziation von BLNK (3-4 FC), dem Bindeglied zwischen BTK/SYK und PLC_γ2 (Kurosaki et al., 2000) suggeriert, daß eine erhöhte Bereitstellung von SYK und BLNK in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen einen Einfluß auf SOCR ausübt (Kurosaki et al., 2000). Dafür existieren weitere Hinweise: eine Rolle von PLC_γ2 ist die Bereitstellung der *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Tri-Phosphat (IP3) für interne Kalzium-Mobilisierung (Engelke et al., 2007; Oh-hora und Rao, 2008). Das Expressionsmuster von Inositol-Triphosphat-Rezeptoren (ITPR), essentiellen Mediatoren des SOCR nach BCR-Kreuzvernetzung (Sugawara et al., 1997), ist differentiell angelegt mit 4-10 FC (Abb. 8). Die variable Wirkung einer Aktivierung von ITPR1-3 durch IP3-Bindung auf die Übersetzung von Kalzium-Influx in Transkription (Dolmetsch et al., 1997; Gwack et al., 2007; Kurosaki et al., 2000; Miyakawa et al., 1999) ist eine mögliche Übersetzung eines BCR-

Signals in eine gedämpfte, transiente Ca^{++} -Oszillation in $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen (Miyakawa et al., 1999), z.B. aufgrund der etwa 100 fach höheren Affinität des ITPR2 für IP3 (Miyakawa et al., 1999). Eine Auswirkung solcher gedämpften, kurzlebigen Signale ist eine differentielle Aktivität der drei Transkriptionsfaktoren $\text{NF}\kappa\text{B}$, Oct1 und NFAT (Dolmetsch et al., 1997; Li et al., 1998). Wenn $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen bei Kreuzvernetzung schnell und effizient IP3 bereitstellen können und diese Signale anders umgesetzt werden als in naiven oder klassengewechselten B-Zellen, dann muß dies auch Auswirkungen auf die Expression der Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren haben, und genau das ist zu beobachten (Abb. 9-11). Diese differentiellen Genexpressionsmuster sind nicht nur das Resultat aus paarweisen Vergleichen, sondern konnten darüber hinaus noch durch eine weitere Methode zur Auswertung von großen Datenmengen, der GSEA, bestätigt werden (Abb. 20).

Darüber hinaus existieren zusätzliche Hinweise auf besondere Eigenschaften mutierter IgM^+ B-Zellen in der BCR-Signaltransduktion: die offensichtliche Abwesenheit der *Src-family* PTK LCK (*absent call*) ist ein Hinweis, auf welchem Weg IgM^+ Gedächtnis-B-Zellen an einer Funktion in angeborener Immunität beteiligt sein könnten, denn B1-B-Zellen der Maus sind funktionell an die Abwesenheit von LCK gekoppelt (Dal Porto et al., 2004; Frances et al., 2005).

Ein weiterer essentieller Faktor für BCR-Signalweitergabe ist das Protein RFTN1 (25-40 FC) mit seiner entscheidenden Rolle für die Ausbildung und Erhaltung von BCR-Signalosomen in sogenannten *lipid rafts* (Saeki et al., 2003). Es ist interessant zu spekulieren, was die drastisch niedrigere Expression eines so zentralen Proteins in $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen bedeutet. Der Eintritt des BCR in *lipid rafts* ist ein wichtiger Schritt für die Initiierung eines BCR-Signals, da die vormontierten weiterführenden Signalmoleküle ($\text{Ig}\alpha/\text{Ig}\beta$, LYN) eine schnelle Weitergabe erlauben (Cheng et al., 2001; Tsubata und Wienands, 2001). Was würde in einer Situation passieren, in der der Zutritt zu solchen *lipid rafts* oder deren Stabilität herabgesetzt wäre (Saeki et al., 2003)? Möglicherweise kann der Mangel an RFTN1 durch die Bindung eines repetitiven Antigens ersetzt werden, so daß die Interaktion von BCR und *lipid raft* erhöht und stabilisiert wird. Dies würde mutierte IgM^+ B-Zellen bevorzugt an TI-2 Immunantworten teilnehmen lassen. Zwar zeigen $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen schnelle Gedächtnis-Antworten bei Aktivierung durch T-Zell-Stimuli und/oder Staphylokokken (SAC) (Shi et al., 2005; Tangye et al., 2003a), doch verlaufen diese weniger robust (Tangye et al., 2003a). Darüber hinaus existieren Hinweise, daß eine Stimulierung von Oberflächen-IgG durch monoklonale

Antikörper alleine zu Proliferation und Ig-Sekretion führt (Callard et al., 1995) während eine Stimulierung von Oberflächen-IgM nur dann einen Effekt hat, wenn mehrere anti-IgM-Antikörper miteinander verknüpft werden (Callard et al., 1995; Igarashi und Sakaguchi, 1997; Liou et al., 2009). Welchen Wert sollte eine solche differentielle Expression von RFTN1 in humanen B-Zell-Populationen haben? Generell reagieren natürlich alle Populationen auf TI-2-Antigene. Doch naiven B-Zellen fehlt die Fähigkeit zur sekundären Immunantwort und klassengewechselte B-Zellen können kein pentameres IgM sezernieren, das eine hohe Avidität (ideal für repetitive Antigene) besitzt und das Komplementsystem aktiviert. Möglicherweise bremst eine heruntergesetzte Reaktivität auf monomere Antigene das Ausdünnen/Klassenwechseln der wertvollen, antibakteriell wirkenden IgM-Gedächtnis-B-Zellen.

Die kostimulatorisch wirkende *ADP-ribosyl-cyclase*, auch bekannt als CD31-Ligand oder CD38, ist ein Ektoenzym mit multiplen Funktionen in Zelladhäsion, Signaltransduktion und Ca^{++} -Influx in Lymphozyten (Deaglio und Malavasi, 2006). Dieses Gen wird in $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen nicht transkribiert (*absent call*). Es gibt Hinweise, daß die Ektodomäne von CD38 wichtig und die enzymatische Funktion der Zyklyase unerheblich ist für die Signalweitergabe in B-Lymphozyten (Lund et al., 1998; Lund et al., 1999). Ein Modell für die Beteiligung von CD38 an der BCR-Signalweitergabe wurde postuliert, daß mit Hilfe eines dritten BCR-assoziierten Faktors eine BCR-Signaltransduktion nur im Falle einer gleichzeitigen Aktivierung/Ligandenbindung von CD38 erfolgen kann (Lund et al., 1999). Auch dieses Modell wurde bereits dafür herangezogen, mögliche Funktionen von B-Lymphozyten sowohl in angeborener als auch adaptiver Immunität zu postulieren (Malavasi et al., 2006).

Für eine Reihe weiterer Ektoenzyme wurden vergleichbare Funktionen außerhalb ihrer enzymatischen postuliert oder gefunden (Goding und Howard, 1998). Eines davon, *nucleotidase 5E* (NT5E), ist mit einer zu CD38 vergleichbaren Funktion in T-Lymphozyten von Mäusen beschrieben worden (Resta et al., 1998; Yamashita et al., 1998). Auch dieses Enzym ist an der Modulation von *lipid raft*-assoziierter Signalweitergabe des T-Zell-Rezeptors beteiligt und auf 75% der humanen B-Zellen exprimiert (Resta et al., 1998). Interessanterweise ist dieses wichtige Signalmodulierende Molekül genau wie CD38 spezifisch in mutierten IgM^+ B-Zellen sehr niedrig (4 FC) exprimiert (Abb. 7).

Eine GSEA aus GO-Gengruppen (Abb. 21 F) zeigte in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen eine signifikante Anreicherung von Genen, die in der humoralen Immunantwort eine Rolle spielen. Dies ist eine Bestätigung, daß IgM⁺CD27⁺ B-Zellen besonders sind bezüglich der Initiierung und Ausführung von Immunantworten.

Zusammengefasst sind einige wichtige Gene der Signaltransduktion des BCR, seiner aktivierenden und inhibitorischen Moleküle speziell in IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen besonders hoch, niedrig oder gar nicht ausgeprägt. Eine biologische Relevanz dieses Ergebnisses wird dadurch unterstützt, daß unmittelbar betroffene Mechanismen, wie Ca⁺⁺-Haushalt und Transkription von Zielgenen dreier wichtiger Transkriptionsfaktoren, in B-Zellen ebenfalls ein differentielles Expressionsmuster zeigen. Man kann spekulieren, daß regelmäßige oder tonische Signale in IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen unterschiedlich zu naiven und klassengewechselten B-Zellen rezeptiert werden und anschließend in eine besondere Kombination von Transkriptionsregulation umgesetzt werden, an der sowohl NFκB, Oct1 und NFAT beteiligt sind. Darüber hinaus fallen einzelne Gene mit essentiellen Funktionen in BCR-Signaltransduktion als differentiell in IgM⁺CD27⁺ B-Zellen ausgeprägt auf, die in Verbindung mit angeborenen oder TI-2-Immunreaktionen gebracht werden können. Möglicherweise liegen darin Hinweise auf Mechanismen, die eine duale Funktion von IgM⁺ post-GC-B-Zellen in angeborener und adaptiver Immunität im Menschen, vielleicht sogar ihre Wichtigkeit für TI-2-Antigene, erklären können.

Hinweise auf eine besondere Ausstattung mit Zytokinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

Ein weiterer Hinweis auf eine Spezialisierung der IgM⁺CD27⁺ B-Zellen in natürlicher Immunität ist die Transkription von IL6 mit 3-5 FC in diesen Zellen. Dieses Zytokin ist wichtig für die Kopplung von angeborener an erworbene Immunität (Hoebe et al., 2004; Jones, 2005). Es ist interessant, IL6 in einer B-Zell-Population exprimiert vorzufinden, da es gewöhnlich nur von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten sezerniert wird. Die Ausschüttung dieses Zytokins ist ein zentraler Faktor für den Wechsel von einer primären Entzündungsreaktion zu einer adaptiven Immunantwort: Apoptose wird induziert, die Ausschüttung von Interferonen und Tumornekrosefaktoren wird reduziert, Chemo-Attraktoren für B- und T-Zellen werden sezerniert (Jones, 2005). Der Einfluß von IL6 auf B-Zellen dagegen ist vornehmlich eine Ausdifferenzierung in PC und Ig-Sekretion. Es ist bezeichnend, daß IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen IL6 sehr stark transkribieren, der Rezeptor dafür aber nur von

klassengewechselten B-Zellen exprimiert wird (20-40 FC, *absent call* in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen) (Abb. 12). Auch dies betont eine Beteiligung von IgM⁺ B-Zellen an frühen Ereignissen im Übergang von angeborener zu adaptiver Immunität und nicht nur – wie ihre klassengewechselten Geschwisterzellen – an einer effizienten Bekämpfung des Pathogens.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Expression von CXCR4 und CXCR5 vornehmlich in naiven B-Zellen (2-3 FC). Diese Chemokinrezeptoren vermitteln im Wechsel die Organisation von dunkler und heller Zone der GC-Reaktion (Allen et al., 2004). Im Gegensatz dazu ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor EBI2 (5 FC) ein essentieller Faktor für das Verlassen oder Vermeiden einer GC-Reaktion durch eine extrafollikulär orientierte Migration (Pereira et al., 2009). Dies ist eine Validierung der Herkunft von IgM⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen aus Keimzentren, da post-GC-B-Zellen CXCR4- und CXCR5-Expression unterbunden haben müssen, um nicht länger einer GC-Chemoattraktion zu unterliegen. EBI2 dagegen muß in Analogie zu einem GC-Exit-Modell zumindest zeitweise exprimiert worden sein, und eine solche Expression liegt vor. Es ist ebenfalls interessant zu sehen, daß naive B-Zellen offensichtlich schon CXCR4- und CXCR5-Transkripte generieren, vermutlich um im Fall einer Aktivierung durch kognitives Antigen zügig am Aufbau einer GC-Reaktion mitzuwirken.

Die Rezeptoren für die T_H2-Interleukine IL4 und IL13 haben weitgehend redundante Auswirkungen auf B-Lymphozyten (Kelly-Welch et al., 2003). Die vorherrschende Wirkung ist dabei der Klassenwechsel zu IgE und eine vermehrte Ausschüttung dieses Immunglobulins (Grimbacher et al., 1998; Trigona et al., 1999). Daß die Transkription von IL4R und IL13RA hauptsächlich in naiven und klassengewechselten B-Zellen geschieht und IgM⁺CD27⁺ B-Zellen nur relativ wenig IL4R/IL13R transkribieren (5-10 FC, Abb. 12), stimmt mit der Idee überein, daß IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen offen für einen späteren Klassenwechsel in sekundären Immunantworten sind. Da Klassenwechsel, abgesehen von dem zu IgE, stufenweise geschieht (Brinkmann et al., 1992) und C_ε und C_α2 die am weitesten 3' gelegenen C_H-Gene im Menschen darstellen (Flanagan und Rabbitts, 1982), wäre ein Klassenwechsel zu IgE unvorteilhaft, da die meisten C_H-Gene durch einen direkten Klassenwechsel zu IgE verwehrt blieben. In Übereinstimmung mit dieser Theorie ist der Rezeptor für IL10 verstärkt in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen aufzufinden. Für diesen wichtigen Stimulator von B-Lymphozyten konnte gezeigt werden, daß er in Kombination mit IL4- oder *transforming growth factor beta* (TGF-β)-Stimulation eine

Rolle für Klassenwechselperhalten zu einem wesentlich breiteren Spektrum von C_H -Genen spielt (Hummelshoj et al., 2006).

Überraschend ist die offensichtlich spezifische Expression des Rezeptors für Adrenalin, ADRB2, in mutierten IgM^+ B-Zellen, und umgekehrt das Fehlen des Serotonin-Rezeptors HTR3A. ADRB2 ist direkt mit einem Effektor (Kalziumkanal CACNA1) gekoppelt und ermöglicht einen rapiden Ca^{++} -Influx bzw. eine unmittelbare Produktion des second-Messengers cAMP (Davare et al., 2001). Eine Sensitivität von B-Zellen für Botenstoffe des Neuroendokrinen Systems findet in der Literatur zunehmend Beachtung (Berczi et al., 1996; Elenkov et al., 2000). Eine Sensitivität für die wichtigen Akute-Phase-Hormone Adrenalin und Noradrenalin wäre eine Besonderheit der mutierten IgM^+ Populationen, da die Signalwerte des ADRB2 für naive und klassengewechselte B-Zellen sehr niedrig waren (etwa 100) und alternative Adrenozeptoren in keiner B-Zell-Population exprimiert wurden (nicht gezeigt). Für den Serotonin-Rezeptor HTR3A ist bekannt, daß er positiv auf die Aktivierung von T-Zellen einwirken (Khan und Hichami, 1999) und darüber hinaus verschiedene Wirkungen auf den Kalium-Haushalt von prä-B-Zellen haben kann (Choquet und Korn, 1988).

Zusammengefasst sind ausgesuchte Beispiele von differentiell ausgeprägten Zytokinen, Hormonen bzw. deren Rezeptoren spannende Ansätze, um zentrale Funktionen oder Mechanismen von B-Zell-Populationen aus PB zu untersuchen und zu verstehen. Auch eine GSEA (Abb. 21 A) zeigte zumindest eine Gewichtung von Genen der Zell-Zell-Signalweitergabe in $CD27^+$ Gedächtnis-B-Zellen.

Die differentielle Expression von Zellzyklus-Regulatoren

Die Analyse von KLF4, KLF9 und PLZF (ZBTB16) in humanen B-Zellen zeigte, daß Unterschiede in der Expression dieser Zellzyklus-Repressoren einen Beitrag zu einer intrinsisch besseren Aktivierbarkeit von Gedächtnis-B-Zellen leisten (Good und Tangye, 2007). In einer umfassenden Analyse weiterer Repressoren konnten mehrere zusätzliche Kandidaten identifiziert werden, die das von Good et al. vorgeschlagene Szenario erweitern und abrunden können (Abb. 15). Im Ergebnisteil wurde bereits auf KLF10 und KLF7 hingewiesen, weil ihre Transkriptionslevel sowohl Übereinstimmungen der $IgM^+IgD^+CD27^+$ mit naiven B-Zellen (KLF10, 4-5 FC), als auch Besonderheiten der mutierten IgM^+ B-Zellen (KLF7, 3-4 FC) suggerieren. In der Literatur gibt es außer beschriebenen Assoziationen mit bestimmten

Tumorerkrankungen keine Hinweise auf spezifische Funktionen dieser beiden Faktoren.

Die fehlende Expression (*absent call*) von Zyklin-abhängiger Kinase 6 (CDK6) in IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen suggeriert, daß sich mutierte IgM⁺ B-Zellen vermehrt in der Zellzyklusphase G₀ befinden, da CDK6 einen Einfluß auf den G₀/G₁-Übergang von T-Lymphozyten ausüben kann (Veiga-Fernandes und Rocha, 2004). Interessanterweise lieferte auch die GSEA auf Gengruppen aus GO Hinweise (Abb. 21 B und C), daß naive und klassengewechselte B-Zellen tendenziell Gene, die mit der G1-Phase des Zellzyklus assoziiert sind, vermehrt ausprägen. Diese Unterschiede waren jedoch nur eingeschränkt statistisch signifikant. Als Gegenargument üben CDK6 und CDK4 weitgehend redundante Funktion aus (Guan et al., 1994); CDK4 wird von allen B-Zell-Populationen gleichmäßig ausgeprägt (nicht gezeigt), könnte also CDK6 weitgehend ersetzen (Malumbres et al., 2004; Veiga-Fernandes und Rocha, 2004). Darüber hinaus müssen auch IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen ein gewisses Maß an homöostatischer Proliferation erfüllen können um langlebig zu sein (Woodland und Schmidt, 2005). Siehe hierzu auch die GSEA in Abb. 19 C: eine Anreicherung von Genen, die in homöostatisch proliferierenden T-Zellen auftreten, ist im Vergleich zu naiven, verstärkt in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und mehr noch in klassengewechselten B-Zellen aufzufinden. Vielleicht ist die Abwesenheit von CDK6 kein quantitativer Hinweis auf die Zellzyklus-Situation der IgM⁺CD27⁺ B-Zellen, sondern vielmehr ein qualitativer Hinweis darauf, durch welchen Mechanismus diese Zellen proliferieren, oder wie schnell oder wie häufig hintereinander sie proliferieren.

Zusammengefasst konnte mit Hilfe der Analyse von Genexpressionsprofilen eine Reihe weiterer Zellzyklus-Regulatoren mit möglichen spezifischen Funktionen in naiven, IgM-only, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und/oder klassengewechselten B-Zellen identifiziert werden.

Die differentielle Expression von Zelladhäsionsmolekülen

Zelladhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle in Immunreaktionen, da sie unter anderem an Prozessen wie selektive Zell-Zell-Interaktion, Epithel-Transmigration und auch Pathogen-Bindung involviert sind (Janeway und Travers, 1997). Im Folgenden sollen einige Zelladhäsionsmoleküle näher beleuchtet werden, die ausschließlich oder zumindest besonders stark in mutierten IgM⁺ B-Zellen transkribiert vorliegen (Abb. 16).

Sialic acid binding lectins (SIGLEC, 2-3 FC) können Pathogene binden, internalisieren und Immunantworten einleiten oder modifizieren (Geijtenbeek und Gringhuis, 2009; von Gunten und Bochner, 2008). Das hemmend wirkende SIGLEC10 ist bisher in der Literatur nicht im Zusammenhang mit Lymphozyten beschrieben, jedoch ist seine Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen untersucht worden (Ancuta et al., 2009). SIGLEC10 könnte demnach auch in IgM⁺CD27⁺ B-Zellen (3 FC) für eine besondere Interaktion mit bakteriellen oder auch anderen Pathogenen verantwortlich sein (Crocker und Varki, 2001).

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1, 4-10 FC) ist ein Molekül, das regulierend auf BCR-Kreuzvernetzung und dessen Signaltransduktion einwirken kann. In Mausmodellen (Greicius et al., 2003) und auch humanen B-Zellen (Lobo et al., 2009) konnte festgestellt werden, daß IgM-Kreuzvernetzung, gemeinsam mit CEACAM1-Ligation zu einer erhöhten Aggregation und Aktivierung von B-Zellen führen kann. Dies geschieht womöglich in Verbindung mit dem CD19-Signaling-Komplex (Lobo et al., 2009), der ein wichtiges Bindeglied von angeborener und adaptiver Immunität darstellt (Fearon und Carter, 1995). Ebenso dient CEACAM1 zur Bindung und Internalisierung bestimmter Bakterien, wirkt dann jedoch inhibierend auf die Ig-Sekretion (Pantelic et al., 2005).

Zusammengefasst bietet auch die Analyse von Zelladhäsionsmolekülen eine Quelle für Gene, die zu einem besseren Verständnis von humanen B-Zell-Populationen aus PB beitragen können. Abermals fielen einige Mitglieder in der Genliste auf, die differentiell zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und naiven bzw. klassengewechselten B-Zellen transkribiert wurden. Es ist interessant, daß in der Literatur für diese Moleküle entweder eine Funktion in angeborener oder in TI-Immunität berichtet wurde. Dies weist abermals darauf hin, daß IgM⁺ post-GC-B-Zellen im Menschen wichtig sind für diese Immunantworten. Eine GSEA bestätigte eine besondere Verteilung von Transkripten für Zelladhäsionsmoleküle zwischen naiven und CD27⁺ B-Zellen (Abb. 21 D).

Hinweise auf Besonderheiten des kortikalen Zytoskeletts und *lipid raft* assoziierter Prozesse

Eine Untersuchung der Genexpressionsprofile von humanen B-Zell-Populationen auf Unterschiede in der Zusammensetzung des Zytoskeletts resultierte in einer Liste von 43 aus 350 Genen (ca. 12%), die signifikant differentiell innerhalb der drei untersuchten Haupt-B-Zell-Fraktionen ausgeprägt waren. Dies ist überraschend, da

so zentrale und konservierte Elemente einer Zelle – besonders in ruhenden Lymphozyten und nicht in z.B. proliferierenden GC-B-Zellen – homogen exprimiert sein sollten. Eine genauere Überprüfung bestätigte die Erwartung, daß die meisten der Gene tatsächlich nur Unterschiede in der Menge an Transkripten zwischen den Populationen aufwiesen und nur in seltenen Fällen in einer Population nicht exprimiert (*absent call*) vorlagen. Die wenigen Gene, die speziell in mutierten IgM⁺ B-Zellen herauf- oder herunterreguliert vorlagen, waren darüber hinaus in der Literatur nicht (oder nur in malignen Zellen, nicht gezeigt) mit einer Expression oder Funktion in Leukozyten in Verbindung gebracht worden. Eine GSEA für Gruppen aus Zytoskelett-assoziierten Genen blieb erfolglos, einzig war eine Liste aus Genen, die mit Aktin interagieren, in Gedächtnis-B-Zellen angereichert (Abb. 21 E).

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Genexpressionsmuster in Zytoskelett-Genen lieferte eine Liste von Genen, die in humanen B-Lymphozyten an Aufbau, Regulation oder Zusammensetzung von *lipid rafts* (Abb. 18) beteiligt sind (Mielenz et al., 2005; Saeki et al., 2003). Diese Genliste zeigte eine Übereinstimmung mit ca. 30% der Zytoskelett-assoziierten Gene. Mehrere Quellen zeigen, daß das cortikale Zytoskelett eng an die dynamischen Prozesse der *lipid rafts* gekoppelt ist (Cheng et al., 2001; Hao und August, 2005; Jugloff und Jongstra-Bilen, 1997). Es wäre eine interessante Fragestellung, ob die gefundenen Unterschiede Eigenschaften von B-Zell-Populationen bestimmen, oder eher sekundäre Effekte darstellen, bedingt durch Unterschiede in der Signalweitergabe oder auch Zelladhäsion.

Zusammengefasst bietet die Analyse von Zytoskelett-Genen und *lipid raft*-assoziierten Genen einen unabhängigen Ansatzpunkt um Erkenntnisse über B-Zell-Populations-spezifische Eigenschaften gewinnen zu können.

4.3.3 GSEA von humanen PB B-Zell-Populationen

Nach paarweisen Vergleichen ist die zweite Methode zur Auswertung von Genexpressionsanalysen die GSEA. Sie stellt eine unabhängige Methode dar, um die präferentielle Verteilung von Genen, die in einer funktionalen Beziehung zueinander stehen, aufdecken zu können.

Eine erste GSEA basierte auf Genen der Datenbanken MSigDB und SDB. Sehr viele der Gengruppen daraus zeigten eine signifikante Anreicherung in einer Kondition (Tabelle 11), waren jedoch bezüglich der Eigenschaften von naiven, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und klassengewechselten B-Zellen zumeist schwer zu interpretieren.

Die Ursache dafür ist, daß die Gengruppen sehr grob gefasst sind und aus Vergleichen sehr weit entfernter Zelltypen (etwa gesunde mit entarteten, transfizierte mit untransfizierten oder unreife mit ausdifferenzierten Zellen) stammen. Die Gengruppen (oder ihre Verknüpfung) sind oftmals zu groß, zu divers oder zu speziell, als daß verhältnismäßig subtile Unterschiede einander ähnlicher, ruhender Lymphozyten aus PB erfasst werden können. Die als signifikant angereichert angezeigten Gengruppen wurden aus diesem Grund manuell gefiltert nach einer möglichen Interpretierbarkeit bzw. einem Bezug zu Lymphozyten. Die übrigen Listen konnten nach näherer Beurteilung grob in drei Kategorien eingeteilt werden: Metabolismus, Zellproliferation und Zelldifferenzierung von Lymphozyten/ PC. In Abb. 19 sind repräsentative Mitglieder der Kategorien gezeigt.

Abb. 19 A behandelt eine Gengruppe die in PC signifikant höher exprimiert ist als in Plasmablasten (Tarte et al., 2003). Diese Gengruppe ist ebenfalls in $IgM^+IgD^+CD27^+$ angereichert gegenüber naiven, darüber hinaus jedoch noch stärker ausgeprägt in klassengewechselten B-Zellen. Da im humanen PB ebenfalls eine geringe Zahl von Plasmablasten auftreten können (Mei et al., 2009), und diese Plasmablasten sowohl Oberflächen-Ig als auch CD27 ausprägen, muß an dieser Stelle eine potentielle Kontamination mit solchen Zellen als Ursache für die beobachteten Muster diskutiert werden. Eine Kontamination mit PC ist unwahrscheinlich, da sie erstens nur eine geringe Frequenz im Blut haben und darüber hinaus anhand von drei durchflußzytometrischen Größen identifiziert und von der Sortierung ausgeschlossen werden können: Zellgröße und -Granularität (Verhältnis von Durchlicht/Streulich), und weiterhin eine besonders hohe CD27-Expression (Jackson et al., 2009). Nicht zuletzt spricht gegen eine Verunreinigung der Proben, daß sowohl IgM^+CD27^+ als auch IgG^+CD27^+ Plasmablasten in verhältnismäßig gleichen Frequenzen auftraten (nicht gezeigt). Ein Einfluß dieser Zellen als Störgröße in den Genexpressionsprofilen müsste demnach in $IgM^+IgD^+CD27^+$ und IgG^+ B-Zellen gleich groß sein. Abb. 19 A zeigt jedoch einen deutlichen Gradienten in der Verteilung der assoziierten Gene in $IgM^+IgD^+CD27^+$ und klassengewechselten B-Zellen. Stattdessen kann angenommen werden, daß die Expression von Plasmablasten-Genen in Gedächtnis-B-Zellen vielmehr mit deren Neigung zur PC-Differenzierung korreliert (Agematsu et al., 1997; Shi et al., 2003). Abb. 19 B zeigt neben vielen weiteren Gengruppen (z.B. Glukoneogenese, Lipidmetabolismus, Aminosäuresynthese, nicht gezeigt), daß $IgM^+IgD^+CD27^+$ und klassengewechselte B-Zellen einen erhöhten Stoffwechsel betreiben. Dies suggeriert

bereits ihre gemeinsame Morphologie, sprich größere Zellvolumina und heterogenere Zellform, verglichen mit naiven B-Zellen (Dunn-Walters et al., 1995; Klein et al., 1997). Abb. 19 C zeigt, daß homöostatische Proliferation eine graduell zunehmende Eigenschaft von $IgM^+IgD^+CD27^+$ und klassengewechselten verglichen mit naiven B-Zellen ist, wie bereits verschiedentlich in der Literatur vorgeschlagen wurde (Bernasconi et al., 2003; Bernasconi et al., 2002; Woodland und Schmidt, 2005). Abschließend zeigt Abb. 19 D eine Anreicherung von Genen, die Gedächtnis-T-Zellen von naiven T-Zellen unterscheiden, in $IgM^+IgD^+CD27^+$ und klassengewechselten B-Zellen. Dies ist eine zusätzliche und unabhängige Validierung des Szenarios, daß die untersuchten $CD27^+$ B-Zell-Populationen aus gemeinsamen GC-Reaktionen stammen und daher klassische Gedächtnis-B-Zellen sind.

Zusätzlich zur Suche nach Populations-spezifischen Eigenschaften kann die GSEA als unabhängige Validierung von paarweisen Vergleichen herangezogen werden, da sie zwar auf denselben Datensätzen beruht, sich jedoch einer verschiedenen Normalisierung, Datenanalyse und statistischen Auswertung bedient.

Abb. 20 und 21 zeigen den Versuch einer solchen Validierung bezüglich der spezifischen Anreicherung von Zielgenen der Transkriptionsfaktoren $NF\kappa B$, Oct1 und NFAT. Dazu wurden Listen derer Zielgene erstellt und nach einer bekannten Funktion in Lymphozyten gefiltert. In Abb. 20 A werden 216 Zielgene von $NF\kappa B$ nach ihrer Verteilung in naiven, $IgM^+IgD^+CD27^+$ und klassengewechselten B-Zellen abgebildet. Setzt man eine solche Gewichtung mit Aktivität in einer Population gleich, dann wäre dies ein Hinweis darauf, daß der Einfluß von $NF\kappa B$ auf Transkription in $CD27^+$ B-Zellen höher ist als in naiven, mit besonderer Gewichtung in klassengewechselten B-Lymphozyten. Dies schließt ebenfalls Gene ein, die bislang in der Literatur zwar mit Lymphozyten, jedoch nicht spezifisch mit B-Zellen in Verbindung gebracht wurden. Reduziert man diese Liste um weitere 60 auf 156 Gene, die tatsächlich in B-Lymphozyten nachgewiesen wurden (Abb. 20 B), so ist eine Anreicherung nicht mehr gegeben. In Abb. 20 C ist eine Verteilung von Oct1-Zielgenen in Leukozyten gegeben. Auch hier besteht der Eindruck einer graduellen Anreicherung in Gedächtnis-B-Zellen, jedoch ist der Unterschied zwischen naiven und $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen nicht signifikant. Abbildung 20 D stellt die Verteilung von 78 B-Zell-spezifischen NFAT-Zielgenen dar, in keinem der paarweisen Vergleiche wird statistische Signifikanz erreicht, jedoch ist auch hier ein interessanter Ansatz zu sehen, der eine niedrigere Aktivität von NFAT in $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zellen

suggeriert. Zusammengefasst bedürfen die Genlisten zu NF κ B, Oct1 und NFAT zusätzlicher Überarbeitung, um mit Hilfe einer GSEA gesicherte Schlüsse über B-Zell-Populations-spezifische Eigenschaften ziehen zu können. Vielversprechend ist, daß für alle drei Transkriptionsfaktoren eine deutlichen Gewichtung des ES vorliegt, diese im Falle von NFAT sogar spezifisch in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen zu fehlen scheint (siehe Abb. 20).

Abb. 19 zeigt Auszüge einer GSEA von über 1400 Genlisten aus GO. Mit dieser Analyse oftmals sehr theoretischer Genlisten, deren Einordnung strikt nach den drei Kategorien Lokalisation (cellular component), biologische Funktion (biological process) und molekulare Wirkungsweise (molecular function) erfolgt, sollte unter anderem getestet werden, ob die Erkenntnisse aus den paarweisen Vergleichen der Genexpressionsprofile (siehe 3.3.3) verifizierbar waren. Es konnte zu jeder Kategorie von Genen, die ein differentielles Expressionsmuster zeigten, mehrere signifikante Anreicherungen verwandter Gengruppen durch GSEA nachgewiesen werden (Abb. 19 und nicht gezeigt). Eine Diskussion einzelner Auszüge aus dieser Analyse geschieht im Zusammenhang mit der jeweiligen Kategorie (siehe 4.3.2).

Zusammengefasst konnte die GSEA die Charakterisierung von B-Zell-Populationen in Bezug auf allgemeine Eigenschaften von Gedächtnis-B-Zellen erweitern. Darüber hinaus konnten populationsspezifische Besonderheiten, suggeriert durch paarweise Vergleiche, mit der GSEA verifiziert werden. Eine umfassendere Analyse der Genexpressionsprofile durch GSEA, besonders auch unter Einbeziehung der IgM-only B-Zellen, muß noch erfolgen.

Das Fazit der Analyse von Genexpressionsprofilen humaner naiver, IgM⁺IgD⁺CD27⁺, IgM-only und klassengewechselter B-Lymphozyten aus PB ist, daß IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen und klassengewechselte B-Zellen im Einklang mit den Daten zu Telomerlänge, Bcl6-Mutationen und gemeinsamer expandierter Klone, zueinander in einem höheren Verwandtschaftsgrad stehen als zu naiven B-Zellen. Darüber hinaus existiert nicht nur eine allgemeine Ähnlichkeit der Profile, sondern essentielle Eigenschaften von Gedächtnis-B-Zellen wie erhöhter Stoffwechsel, Neigung zur PC-Differenzierung, höhere Zellteilungsrate und Gene, die eine Antigen-Erfahrung reflektieren, sind ihnen gemeinsam. Eine fokussierte Analyse von Genen, die speziell in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Lymphozyten exprimiert oder nicht transkribiert werden, gibt Hinweise darauf, wie bestimmte molekulare Mechanismen diesen besonderen post-

GC-Zellen eine zusätzliche Rolle in angeborener Immunität und auch in TI-Immunantworten erlauben.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsschrift konnten neue Erkenntnisse über B-Lymphozyten in gesunden Menschen gewonnen werden.

Der erste Teil behandelt eine sehr seltene und einzigartige B-Zell-Population, die IgD-only B-Zellen. Diese Lymphozyten zeichnet ein ungewöhnlicher Klassenwechsel zu IgD, eine überdurchschnittlich hohe Frequenz an somatischen V-Gen-Mutationen und eine präferentielle Nutzung von $V\lambda$ -Leichtketten aus. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß IgD-only B-Zellen aus wenigen, überaus stark expandierten Klonen zusammengesetzt sind und sehr häufig das V_H3 -30-Gensegment nutzen. Diese neuen Erkenntnisse konnten entscheidend dazu beitragen, eine Theorie zur Superantigen-getriebenen Entstehung dieser einzigartigen B-Zell-Population in gesunden Menschen zu formulieren die im Einklang mit ihren ungewöhnlichen Eigenschaften steht.

Das zweite Thema dieser Arbeit ist auf die seit langem kontrovers diskutierte Entstehung von IgM^+ B-Zellen mit somatisch mutierten V-Genen fokussiert. Der Nachweis von expandierten post-GC-B-Zell-Klonen mit IgM^+ und IgG^+ Mitgliedern zeigte, daß IgM^+ Gedächtnis-B-Zellen in TD-Immunantworten entstehen können. Weiterhin trugen zwei unabhängige Analysen molekularer Spuren von GC-Reaktionen dazu bei, eine GC-Abstammung auf den Großteil der mutierten IgM^+ B-Zell-Population zu extrapolieren. Damit konnte die bislang umstrittene Herkunft dieser Zellen, die bis zu 25% der PB B-Zellen in erwachsenen Menschen ausmachen, weitgehend geklärt werden. Daraus resultiert ein besseres Verständnis von verschiedenen Infektionserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Immundefizienzen und B-Zell-Neoplasien, die IgM^+ B-Lymphozyten mit mutierten V-Genen einschließen. Darüber hinaus erlaubte die genealogische Analyse der Klone wertvolle Erkenntnisse über die Dynamik und Diversität der Entwicklung von Gedächtnis-B-Zellen in einer GC-Reaktion.

Der dritte Abschnitt dieser Arbeit behandelt die Erstellung und Auswertung von Genexpressionsprofilen humaner B-Zell-Populationen. Mit diesen Analysen konnte eine generelle Ähnlichkeit von mutierten IgM^+ zu klassengewechselten B-Zellen und auch Gemeinsamkeiten in Gedächtnis-B-Zell-spezifischen Eigenschaften bestätigen, daß diese beiden Populationen näher miteinander verwandt sind als mit naiven B-Zellen. Darüber hinaus konnten spezifische Eigenschaften von $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Lymphozyten identifiziert werden, die die duale Funktion dieser Zellen in angeborener und adaptiver Immunität erklären.

6. Ausblick

Bezüglich der IgD-only B-Zell-Population wäre es interessant zu untersuchen, ob bei Langzeit-Stimulierung von IgM⁺IgD⁺ B-Zellen mit den kürzlich identifizierten IgD-bindenden Antigenen oder mit Lysaten von Bakterien, die in Infektionen der respiratorischen Mukosa involviert sind, vermehrt Igλ⁺V_H3-30⁺ B-Zellen auswachsen. Vielleicht könnte sogar ein Klassenwechsel nach Cδ, z.B. durch den Nachweis von switch-μ-switch-δ Exzisionszirkeln (Chen et al., 2009), als unmittelbare Folge einer konstanten IgD-Stimulierung nachgewiesen werden. Dies wäre eine Bestätigung für das Superantigen-getriebene Szenario. Möglicherweise könnten ebenfalls Antikörper aus IgD⁺ PC als Köder genutzt werden, um aus Bakterienlysaten IgD-bindende Superantigene anzureichern und zu charakterisieren.

Im Hinblick auf ihre mögliche Verwandtschaft mit IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen wäre es interessant zu klären, ob die MGZ-B-Zellen im Menschen aus einer unabhängigen Abstammungslinie entstehen (Carsetti et al., 2004; Weill et al., 2009) oder ebenfalls aus post-GC-B-Zellen rekrutiert werden können. Zur Analyse könnten aus sekundären Follikeln humaner Milz GC und auch MGZ gepickt, vereinigt und mit Hilfe der CDRIII-spezifischen-Primer-Methode auf verwandte Klone untersucht werden. Ein wesentlich aufschlußreicherer Ansatz wäre massive parallele Sequenzierung. Mit dieser Technik könnte man einen umfassenden Überblick über die klonale Zusammensetzung und Verwandtschaft des B-Zell-Repertoires des Blutes (Leukapherese) und/oder einer Milz (Splenektomie) erlangen. Dies würde natürlich in so großem Umfang hohe Anforderungen an Zellseparationsmethoden und auch Verfahren zur Auswertung stellen, es läge jedoch auch ein besonderer Reiz darin, da eine vergleichbare Studie in erwachsenen Menschen in solchem Umfang noch nicht durchgeführt worden ist. Ebenfalls wäre eine interessante klinische Studie, in welchem Umfang bestimmte Impfstoffe (TI und TD) IgM⁺ und IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen hervorbringen. Zu diesem Zweck könnte bei Immunisierung Deuterium als klonaler Marker für neu gebildete Zellen verwendet werden (Vrisekoop et al., 2008). Nach Verstreichen eines Zeitraumes von mehreren Monaten könnten langlebige Gedächtnis-B-Zellen geerntet, die schwerere DNA mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und molekularbiologisch analysiert werden (C_H-Gene, V-Gene, klonale Zusammensetzung etc.).

Bezüglich der möglicherweise prädiversifizierten IgM⁺ B-Zellen in Föten, Nabelschnurblut und HIGM-Patienten wäre es interessant herauszufinden, an welchen Orten diese gebildet werden, und ob an diesen Stellen Bcl6 exprimiert und

Telomere verlängert werden. Dies könnte mit Hilfe einer umfassenden Sichtung von Gewebeschnitten erfolgen, die z.B. durch Kombination mit anti-AID, anti-Bcl6 und anti-hTERT Antikörpern gefärbt wurden. Ebenso wäre es interessant zu untersuchen, ob IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen aus adulten Menschen und solche aus Föten Unterschiede in der Charakteristik ihrer somatischen Mutationen (Hotspot-Nutzung, Transitionen/Transversionen) aufweisen. Dies könnte zur Klärung beitragen, ob die fötalen Zellen nicht doch aus TD-Reaktionen stammen, da eine neuere Publikation besondere Mutationsmuster in den prädiversifizierten IgM⁺ B-Zellen aus HIGM-Patienten beschreibt (Longo et al., 2009).

Die Auswertung der Genexpressionsprofile ist bislang nur unvollständig erfolgt. Erstens stehen für die Charakterisierung der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen noch Analysen aus (weitere GSEA über noch nicht bearbeitete Datenbanken, Fortführung von Literaturrecherche zu weiteren differentiell exprimierten Genen aus den paarweisen Vergleichen etc.). Eine interessante Aufgabe wäre zum Beispiel, aus den differentiell exprimierten Zielgenen von NFκB, Oct1 und NFAT diejenigen herauszufiltern, die eine besondere Funktion in den einzelnen Populationen bewirken. Dies erfordert jedoch nicht nur einen hohen Aufwand an Literaturrecherche, sondern schließt ebenfalls Verifikationen einer differentiellen Ausprägung auf Proteinebene mit ein. Dies gilt selbstverständlich auch für die differentiell exprimierten Gene der anderen Kategorien. Schließlich müssten funktionale Untersuchungen zu ausgewählten Kandidaten durchgeführt werden, um eine biologische Relevanz der gefundenen Unterschiede zu zeigen. Solche Untersuchungen wären z.B. *in vitro* Aktivierungsstudien von *ex vivo* B-Zellen aus PB, um z.B. eine besondere Funktion von Adrenalin (ADRB2), bestimmten Zytokinen (IL4R, IL13R, IL10R) oder Liganden für Zelladhäsionsmoleküle auf IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen zu testen. Ebenso könnte untersucht werden, ob eine Reduzierung von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zell-spezifischen Transkripten mit si-RNA Einflüsse auf die Langlebigkeit, Reaktivität oder das Klassenwechselerhalten zeigt. Im Anschluß an diese Arbeiten könnte dann auch der Fokus auf besondere Eigenschaften von naiven, IgM-only und klassengewechselten B-Zellen gelegt werden.

7. Literatur

- Adkins, B., Leclerc, C., und Marshall-Clarke, S. (2004). Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 4, 553-564.
- Agematsu, K., Kobata, T., Yang, F. C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Kitahara, M., Mori, T., Sugita, K., Morimoto, C., und Komiyama, A. (1995). CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur J Immunol* 25, 2825-2829.
- Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F. C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., und Komiyama, A. (1997). B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol* 27, 2073-2079.
- Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., und Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5, 943-952.
- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R. R., Selvaggi, T., Kehry, M. R., und Staudt, L. M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 87, 5257-5268.
- Allsopp, R. C., und Harley, C. B. (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 219, 130-136.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., und Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10114-10118.
- Alt, F. W., Rathbun, G., Oltz, E., Taccioli, G., und Shinkai, Y. (1992). Function and control of recombination-activating gene activity. *Ann N Y Acad Sci* 651, 277-294.
- Alugupalli, K. R., Leong, J. M., Woodland, R. T., Muramatsu, M., Honjo, T., und Gerstein, R. M. (2004). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21, 379-390.
- Ancuta, P., Liu, K. Y., Misra, V., Wacleche, V. S., Gosselin, A., Zhou, X., und Gabuzda, D. (2009). Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics* 10, 403.
- Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Fugier-Vivier, I., Briere, F., Banchereau, J., Lebecque, S., und Liu, Y. J. (1998). The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, Cmu-Cdelta switch, and lambda light chain expression. *J Exp Med* 187, 1169-1178.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M., und Olsson, C. (2001). Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol* 166, 5051-5057.
- Baerlocher, G. M., Vulto, I., de Jong, G., und Lansdorp, P. M. (2006). Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* 1, 2365-2376.
- Barak, M., Zuckerman, N. S., Edelman, H., Unger, R., und Mehr, R. (2008). IgTree: creating Immunoglobulin variable region gene lineage trees. *J Immunol Methods* 338, 67-74.

- Barois, N., Forquet, F., und Davoust, J. (1998). Actin microfilaments control the MHC class II antigen presentation pathway in B cells. *J Cell Sci* *111 (Pt 13)*, 1791-1800.
- Barthel, S. R., Gavino, J. D., Descheny, L., und Dimitroff, C. J. (2007). Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* *11*, 1473-1491.
- Basso, K., Klein, U., Niu, H., Stolovitzky, G. A., Tu, Y., Califano, A., Cattoretti, G., und Dalla-Favera, R. (2004). Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood* *104*, 4088-4096.
- Baumgarth, N. (2000). A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev* *176*, 171-180.
- Bende, R. J., van Maldegem, F., Triesscheijn, M., Wormhoudt, T. A., Guijt, R., und van Noesel, C. J. (2007). Germinal centers in human lymph nodes contain reactivated memory B cells. *J Exp Med* *204*, 2655-2665.
- Benjamini, Y., und Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B* *57*, 289-300.
- Berczi, I., Chalmers, I. M., Nagy, E., und Warrington, R. J. (1996). The immune effects of neuropeptides. *Baillieres Clin Rheumatol* *10*, 227-257.
- Berek, C., Berger, A., und Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* *67*, 1121-1129.
- Berek, C., und Milstein, C. (1987). Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* *96*, 23-41.
- Bernasconi, N. L., Onai, N., und Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* *101*, 4500-4504.
- Bernasconi, N. L., Traggiai, E., und Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* *298*, 2199-2202.
- Blackwell, T. K., und Alt, F. W. (1984). Site-specific recombination between immunoglobulin D and JH segments that were introduced into the genome of a murine pre-B cell line. *Cell* *37*, 105-112.
- Blum, K. S., und Pabst, R. (2007). Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunol Lett* *108*, 45-51.
- Borggreffe, T., und Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* *66*, 1631-1646.
- Brandtzaeg, P., Surjan, L., Jr., und Berdal, P. (1978). Immunoglobulin systems of human tonsils. I. Control subjects of various ages: quantification of Ig-producing cells, tonsillar morphometry and serum Ig concentrations. *Clin Exp Immunol* *31*, 367-381.
- Brezinschek, H. P., Brezinschek, R. I., und Lipsky, P. E. (1995). Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol* *155*, 190-202.
- Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Brezinschek, R. I., Dorner, T., Domiati-Saad, R., und Lipsky, P. E. (1997). Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest* *99*, 2488-2501.
- Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Dorner, T., Brezinschek, R. I., und Lipsky, P. E. (1998). Pairing of variable heavy and variable kappa chains in individual naive and memory B cells. *J Immunol* *160*, 4762-4767.

- Brink, R., Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adams, E., Eris, J., Mason, D. Y., Hartley, S. B., und Basten, A. (1992). Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J Exp Med* 176, 991-1005.
- Brinkmann, V., Muller, S., und Heusser, C. H. (1992). T cell dependent differentiation of human B cells: direct switch from IgM to IgE, and sequential switch from IgM via IgG to IgA production. *Mol Immunol* 29, 1159-1164.
- Brodeur, S. R., Angelini, F., Bacharier, L. B., Blom, A. M., Mizoguchi, E., Fujiwara, H., Plebani, A., Notarangelo, L. D., Dahlback, B., Tsitsikov, E., und Geha, R. S. (2003). C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity* 18, 837-848.
- Bräuninger, A., Goossens, T., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2001). Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol* 31, 3631-3637.
- Bräuninger, A., Küppers, R., Spieker, T., Siebert, R., Strickler, J. G., Schlegelberger, B., Rajewsky, K., und Hansmann, M. L. (1999). Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. *Blood* 93, 2679-2687.
- Callard, R. E., Herbert, J., Smith, S. H., Armitage, R. J., und Costelloe, K. E. (1995). CD40 cross-linking inhibits specific antibody production by human B cells. *Int Immunol* 7, 1809-1815.
- Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M. M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., *et al.* (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 180, 800-808.
- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., und Pillai, S. (2001). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14, 603-615.
- Carsetti, R., Rosado, M. M., und Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197, 179-191.
- Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C., und Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5, 317-327.
- Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N. W., Bengten, E., Edholm, E. S., Santini, P. A., Rath, P., Chiu, A., *et al.* (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* 10, 889-898.
- Cheng, P. C., Cherukuri, A., Dykstra, M., Malapati, S., Sproul, T., Chen, M. R., und Pierce, S. K. (2001). Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function. *Semin Immunol* 13, 107-114.
- Choi, M. S., Brines, R. D., Holman, M. J., und Klaus, G. G. (1994). Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4. *Immunity* 1, 179-187.
- Choquet, D., und Korn, H. (1988). Dual effects of serotonin on a voltage-gated conductance in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4557-4561.
- Chu, Y. W., Marin, E., Fuleihan, R., Ramesh, N., Rosen, F. S., Geha, R. S., und Insel, R. A. (1995). Somatic mutation of human immunoglobulin V genes in the X-linked HyperIgM syndrome. *J Clin Invest* 95, 1389-1393.
- Cooper, M. D. (1987). Current concepts. B lymphocytes. Normal development and function. *N Engl J Med* 317, 1452-1456.

- Crocker, P. R., und Varki, A. (2001). Siglecs in the immune system. *Immunology* 103, 137-145.
- Dahlquist, K. D. (2004). Using GenMAPP and MAPPFinder to view microarray data on biological pathways and identify global trends in the data. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 7, Unit 7 5*.
- Dal Porto, J. M., Burke, K., und Cambier, J. C. (2004). Regulation of BCR signal transduction in B-1 cells requires the expression of the Src family kinase Lck. *Immunity* 21, 443-453.
- Davare, M. A., Avdonin, V., Hall, D. D., Peden, E. M., Burette, A., Weinberg, R. J., Horne, M. C., Hoshi, T., und Hell, J. W. (2001). A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* 293, 98-101.
- Davidson, R. N., und Wall, R. A. (2001). Prevention and management of infections in patients without a spleen. *Clin Microbiol Infect* 7, 657-660.
- Davis, D. M. (2009). Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 9, 543-555.
- de Villartay, J. P., Fischer, A., und Durandy, A. (2003). The mechanisms of immune diversification and their disorders. *Nat Rev Immunol* 3, 962-972.
- de Wildt, R. M., Hoet, R. M., van Venrooij, W. J., Tomlinson, I. M., und Winter, G. (1999). Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire. *J Mol Biol* 285, 895-901.
- Deaglio, S., und Malavasi, F. (2006). The CD38/CD157 mammalian gene family: An evolutionary paradigm for other leukocyte surface enzymes. *Purinergic Signal* 2, 431-441.
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., und Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.
- Di Noia, J. M., und Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76, 1-22.
- Di Sabatino, A., Rosado, M. M., Cazzola, P., Biancheri, P., Tinozzi, F. P., Laera, M. R., Cantoro, L., Vanoli, A., Carsetti, R., und Corazza, G. R. (2008). Splenic function and IgM-memory B cells in Crohn's disease patients treated with infliximab. *Inflamm Bowel Dis* 14, 591-596.
- Di Sabatino, A., Rosado, M. M., Miele, L., Capolunghi, F., Cazzola, P., Biancheri, P., Carsetti, R., Gasbarrini, G., und Corazza, G. R. (2007). Impairment of splenic IgM-memory but not switched-memory B cells in a patient with celiac disease and splenic atrophy. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1461-1463.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., und Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-858.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K., und Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936.
- Dono, M., Zupo, S., Leanza, N., Melioli, G., Fogli, M., Melagrana, A., Chiorazzi, N., und Ferrarini, M. (2000). Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents. *J Immunol* 164, 5596-5604.
- Dunn-Walters, D. K., Isaacson, P. G., und Spencer, J. (1995). Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med* 182, 559-566.

- El Shikh, M. E., El Sayed, R. M., Szakal, A. K., und Tew, J. G. (2009). T-independent antibody responses to T-dependent antigens: a novel follicular dendritic cell-dependent activity. *J Immunol* 182, 3482-3491.
- Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., und Vizi, E. S. (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52, 595-638.
- Enders, M., Biber, M., und Exler, S. (2007). [Measles, mumps and rubella virus infection in pregnancy. Possible adverse effects on pregnant women, pregnancy outcome and the fetus]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 50, 1393-1398.
- Engelke, M., Engels, N., Dittmann, K., Stork, B., und Wienands, J. (2007). Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* 218, 235-246.
- Facchetti, F., Appiani, C., Salvi, L., Levy, J., und Notarangelo, L. D. (1995). Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells. *J Immunol* 154, 6624-6633.
- Fearon, D. T., und Carter, R. H. (1995). The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 127-149.
- Fecteau, J. F., Cote, G., und Neron, S. (2006). A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 177, 3728-3736.
- Feddersen, R. M., und Van Ness, B. G. (1985). Double recombination of a single immunoglobulin kappa-chain allele: implications for the mechanism of rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4793-4797.
- Ferrari, S., Giliani, S., Insalaco, A., Al-Ghonaium, A., Soresina, A. R., Loubser, M., Avanzini, M. A., Marconi, M., Badolato, R., Ugazio, A. G., *et al.* (2001). Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12614-12619.
- Ferrarini, M., Viale, G., Risso, A., und Pernis, B. (1976). A study of immunoglobulin classes present on the membrane and in the cytoplasm of human tonsil plasma cells. *Eur J Immunol* 6, 562-565.
- Fibbe, W. E., und Jansen, J. (1984). Prognostic factors in IgD myeloma: a study of 21 cases. *Scand J Haematol* 33, 471-475.
- Fine, J. M., Rivat, C., Lambin, P., und Ropartz, C. (1974). Monoclonal IgD. A comparative study of 60 sera with IgD "M" component. *Biomedicine* 21, 119-125.
- Flanagan, J. G., und Rabbitts, T. H. (1982). Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes. *Nature* 300, 709-713.
- Forsgren, A., und Grubb, A. O. (1979). Many bacterial species bind human IgD. *J Immunol* 122, 1468-1472.
- Forsgren, A., Penta, A., Schlossman, S. F., und Tedder, T. F. (1988). *Branhamella catarrhalis* activates human B lymphocytes following interactions with surface IgD and class I major histocompatibility complex antigens. *Cell Immunol* 112, 78-88.
- Fournier, E. M., Siberil, S., Costes, A., Varin, A., Fridman, W. H., Teillaud, J. L., und Sautes-Fridman, C. (2008). Activation of human peripheral IgM+ B cells is transiently inhibited by BCR-independent aggregation of Fc gammaRIIB. *J Immunol* 181, 5350-5359.

- Frances, R., Tumang, J. R., and Rothstein, T. L. (2005). B-1 cells are deficient in Lck: defective B cell receptor signal transduction in B-1 cells occurs in the absence of elevated Lck expression. *J Immunol* *175*, 27-31.
- Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* *9*, 105-114.
- Gaspar, F. M., McConnell, F. M., Kim, M. Y., Gray, D., Kosco-Vilbois, M. H., Raykundalia, C. R., Botto, M., and Lane, P. J. (2006). The generation of thymus-independent germinal centers depends on CD40 but not on CD154, the T cell-derived CD40-ligand. *Eur J Immunol* *36*, 1665-1673.
- Geijtenbeek, T. B., and Gringhuis, S. I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* *9*, 465-479.
- Geisberger, R., Cramer, R., and Achatz, G. (2003). Models of signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Immunology* *110*, 401-410.
- Ghia, E. M., Jain, S., Widhopf, G. F., 2nd, Rassenti, L. Z., Keating, M. J., Wierda, W. G., Gribben, J. G., Brown, J. R., Rai, K. R., Byrd, J. C., *et al.* (2008). Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* *111*, 5101-5108.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* *25*, 6680-6684.
- Gjorloff Wingren, A., Hadzic, R., Forsgren, A., and Riesbeck, K. (2002). The novel IgD binding protein from *Moraxella catarrhalis* induces human B lymphocyte activation and Ig secretion in the presence of Th2 cytokines. *J Immunol* *168*, 5582-5588.
- Goding, J. W., and Howard, M. C. (1998). Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol Rev* *161*, 5-10.
- Goldrath, A. W., Luckey, C. J., Park, R., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16885-16890.
- Good, K. L., Bryant, V. L., and Tangye, S. G. (2006). Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol* *177*, 5236-5247.
- Good, K. L., and Tangye, S. G. (2007). Decreased expression of Kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13420-13425.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., and *et al.* (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* *334*, 676-682.
- Goossens, T., Bräuninger, A., Klein, U., Küppers, R., and Rajewsky, K. (2001). Receptor revision plays no major role in shaping the receptor repertoire of human memory B cells after the onset of somatic hypermutation. *Eur J Immunol* *31*, 3638-3648.
- Goossens, T., Klein, U., and Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2463-2468.
- Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B., and Singer, B. B. (2003). CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J Leukoc Biol* *74*, 126-134.
- Grimbacher, B., Holland, S. M., and Puck, J. M. (1998). The interleukin-4 receptor variant Q576R in hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* *338*, 1073-1074.

- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., und Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8, 2939-2952.
- Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P. G., und Rao, A. (2007). Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42, 145-156.
- Han, J. H., Akira, S., Calame, K., Beutler, B., Selsing, E., und Imanishi-Kari, T. (2007). Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity* 27, 64-75.
- Han, S., Hathcock, K., Zheng, B., Kepler, T. B., Hodes, R., und Kelsoe, G. (1995). Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol* 155, 556-567.
- Hao, S., und August, A. (2005). Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation. *Mol Biol Cell* 16, 2275-2284.
- Harwood, N. E., und Batista, F. D. (2008). New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity* 28, 609-619.
- Hauser, A. E., Junt, T., Mempel, T. R., Sneddon, M. W., Kleinstein, S. H., Henrickson, S. E., von Andrian, U. H., Shlomchik, M. J., und Haberman, A. M. (2007). Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26, 655-667.
- Hebeis, B. J., Klenovsek, K., Rohwer, P., Ritter, U., Schneider, A., Mach, M., und Winkler, T. H. (2004). Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help. *J Exp Med* 199, 593-602.
- Hershberg, U., Uduman, M., Shlomchik, M. J., und Kleinstein, S. H. (2008). Improved methods for detecting selection by mutation analysis of Ig V region sequences. *Int Immunol* 20, 683-694.
- Hodes, R. J., Hathcock, K. S., und Weng, N. P. (2002). Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 699-706.
- Hoebe, K., Janssen, E., und Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5, 971-974.
- Holtmeier, W., Hennemann, A., und Caspary, W. F. (2000). IgA and IgM V(H) repertoires in human colon: evidence for clonally expanded B cells that are widely disseminated. *Gastroenterology* 119, 1253-1266.
- Horikawa, K., Nishizumi, H., Umemori, H., Aizawa, S., Takatsu, K., und Yamamoto, T. (1999). Distinctive roles of Fyn and Lyn in IgD- and IgM-mediated signaling. *Int Immunol* 11, 1441-1449.
- Hu, B. T., Lee, S. C., Marin, E., Ryan, D. H., und Insel, R. A. (1997). Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *J Immunol* 159, 1068-1071.
- Hug, N., und Lingner, J. (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 115, 413-425.
- Hummelshoj, L., Ryder, L. P., und Poulsen, L. K. (2006). The role of the interleukin-10 subfamily members in immunoglobulin production by human B cells. *Scand J Immunol* 64, 40-47.
- Höfer, T., Muehlinghaus, G., Moser, K., Yoshida, T., H, E. M., Hebel, K., Hauser, A., Hoyer, B., E, O. L., Dörner, T., *et al.* (2006). Adaptation of humoral memory. *Immunol Rev* 211, 295-302.
- Igarashi, H., und Sakaguchi, N. (1997). Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* 89, 1299-1307.

- Jackson, S. M., Harp, N., Patel, D., Wulf, J., Spaeth, E. D., Dike, U. K., James, J. A., und Capra, J. D. (2009). Key developmental transitions in human germinal center B cells are revealed by differential CD45RB expression. *Blood* *113*, 3999-4007.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., und Weiss, U. (1991). Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* *354*, 389-392.
- Janeway, C., und Travers, T. (1997). *Immunobiology*. London: Current Biology Ltd.
- Janson, H., Heden, L. O., Grubb, A., Ruan, M. R., und Forsgren, A. (1991). Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*: cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* *59*, 119-125.
- Johansen, F. E., Baekkevold, E. S., Carlsen, H. S., Farstad, I. N., Soler, D., und Brandtzaeg, P. (2005). Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from tonsils. *Blood* *106*, 593-600.
- Johnson, W. E., Li, C., und Rabinovic, A. (2007). Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* *8*, 118-127.
- Jones, S. A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* *175*, 3463-3468.
- Jugloff, L. S., und Jongstra-Bilen, J. (1997). Cross-linking of the IgM receptor induces rapid translocation of IgM-associated Ig alpha, Lyn, and Syk tyrosine kinases to the membrane skeleton. *J Immunol* *159*, 1096-1106.
- Junge, S., Brenner, B., Lepple-Wienhues, A., Nilius, B., Lang, F., Linderkamp, O., und Gulbins, E. (1999). Intracellular mechanisms of L-selectin induced capping. *Cell Signal* *11*, 301-308.
- Kaartinen, M., Griffiths, G. M., und Milstein, C. (1984). mRNA sequences define an unusually restricted IgG response to oxazolone. *Ann Immunol (Paris)* *135C*, 143-148.
- Kanehisa, M., und Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* *28*, 27-30.
- Kelly-Welch, A. E., Hanson, E. M., Boothby, M. R., und Keegan, A. D. (2003). Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* *300*, 1527-1528.
- Khan, N. A., und Hichami, A. (1999). Ionotropic 5-hydroxytryptamine type 3 receptor activates the protein kinase C-dependent phospholipase D pathway in human T-cells. *Biochem J* *344 Pt 1*, 199-204.
- Khan, W. N. (2009). B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol* *183*, 3561-3567.
- Kiyoi, H., Naito, K., Ohno, R., und Naoe, T. (1995). Comparable profiles of the immunoglobulin heavy chain complementarity determining region (CDR)-3 in CD5+ and CD5- human cord blood B lymphocytes. *Immunology* *85*, 236-240.
- Klein, U., und Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* *8*, 22-33.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Bräuninger, A., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1998a). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* *162*, 261-280.
- Klein, U., Klein, G., Ehlin-Henriksson, B., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1995). Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol Med* *1*, 495-505.
- Klein, U., Küppers, R., und Rajewsky, K. (1994). Variable region gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child: somatically mutated memory B

- cells accumulate in the peripheral blood already at young age. *J Exp Med* **180**, 1383-1393.
- Klein, U., Küppers, R., und Rajewsky, K. (1997). Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* **89**, 1288-1298.
- Klein, U., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1998b). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* **188**, 1679-1689.
- Klein, U., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1998c). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* **188**, 1679-1689.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., und Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2639-2644.
- Kluin, P. M., Kayano, H., Zani, V. J., Kluin-Nelemans, H. C., Tucker, P. W., Satterwhite, E., und Dyer, M. J. (1995). IgD class switching: identification of a novel recombination site in neoplastic and normal B cells. *Eur J Immunol* **25**, 3504-3508.
- Kocks, C., und Rajewsky, K. (1988). Stepwise intraclonal maturation of antibody affinity through somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8206-8210.
- Koelsch, K., Zheng, N. Y., Zhang, Q., Duty, A., Helms, C., Mathias, M. D., Jared, M., Smith, K., Capra, J. D., und Wilson, P. C. (2007). Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *J Clin Invest* **117**, 1558-1565.
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N., und Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* **117**, 787-800.
- Kroese, F. G., Timens, W., und Nieuwenhuis, P. (1990). Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol* **84 (Pt 1)**, 103-148.
- Kroese, F. G., Wubbena, A. S., Seijen, H. G., und Nieuwenhuis, P. (1987). Germinal centers develop oligoclonally. *Eur J Immunol* **17**, 1069-1072.
- Kruetzmann, S., Rosado, M. M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H. H., Berner, R., Peters, A., Boehm, T., Plebani, A., *et al.* (2003). Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* **197**, 939-945.
- Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., *et al.* (2000). Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* **13**, 621-631.
- Kunda, P., und Baum, B. (2009). The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol* **19**, 174-179.
- Kuppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L., und Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J* **12**, 4955-4967.
- Kuraoka, M., Liao, D., Yang, K., Allgood, S. D., Levesque, M. C., Kelsoe, G., und Ueda, Y. (2009). Activation-induced cytidine deaminase expression and activity in the absence of germinal centers: insights into hyper-IgM syndrome. *J Immunol* **183**, 3237-3248.

- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S., und Honjo, T. (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18, 301-312.
- Kurosaki, T., Maeda, A., Ishiai, M., Hashimoto, A., Inabe, K., und Takata, M. (2000). Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells. *Immunol Rev* 176, 19-29.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M. L., und Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-1529.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L., und Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J* 12, 4955-4967.
- Lazarotto, T., Guerra, B., Lanari, M., Gabrielli, L., und Landini, M. P. (2008). New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 41, 192-197.
- Le Roux, D., Lankar, D., Yuseff, M. I., Vascotto, F., Yokozeki, T., Faure-Andre, G., Mougneau, E., Glaichenhaus, N., Manoury, B., Bonnerot, C., und Lennon-Dumenil, A. M. (2007). Syk-dependent actin dynamics regulate endocytic trafficking and processing of antigens internalized through the B-cell receptor. *Mol Biol Cell* 18, 3451-3462.
- Lebecque, S., de Bouteiller, O., Arpin, C., Banchereau, J., und Liu, Y. J. (1997). Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. *J Exp Med* 185, 563-571.
- Lebecque, S. G., und Gearhart, P. J. (1990). Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 172, 1717-1727.
- Levy, O. (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7, 379-390.
- Lewis, R. S. (2003). Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans* 31, 925-929.
- Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G., und Tsien, R. Y. (1998). Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 392, 936-941.
- Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., und Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.
- Liou, L. B., Wu, M. W., und Chao, W. J. (2009). Macrophages and abnormal BCL-6 or c-MYC gene expression affect the resistance of peritoneal B cells to induction of hyporesponsiveness. *Scand J Immunol* 69, 447-456.
- Liu, M., Duke, J. L., Richter, D. J., Vinuesa, C. G., Goodnow, C. C., Kleinstein, S. H., und Schatz, D. G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.
- Liu, Y. J., de Bouteiller, O., Arpin, C., Briere, F., Galibert, L., Ho, S., Martinez-Valdez, H., Banchereau, J., und Lebecque, S. (1996). Normal human IgD+IgM-germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts. *Immunity* 4, 603-613.
- Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J., und MacLennan, I. C. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342, 929-931.
- Liu, Y. J., Oldfield, S., und MacLennan, I. C. (1988). Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur J Immunol* 18, 355-362.

- Lobo, E. O., Zhang, Z., und Shively, J. E. (2009). Pivotal advance: CEACAM1 is a negative coreceptor for the B cell receptor and promotes CD19-mediated adhesion of B cells in a PI3K-dependent manner. *J Leukoc Biol* 86, 205-218.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., und Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 190, 75-89.
- Longo, N. S., Lugar, P. L., Yavuz, S., Zhang, W., Krijger, P. H., Russ, D. E., Jima, D. D., Dave, S. S., Grammer, A. C., und Lipsky, P. E. (2009). Analysis of somatic hypermutation in X-linked hyper-IgM syndrome shows specific deficiencies in mutational targeting. *Blood* 113, 3706-3715.
- Luger, E., Lamers, M., Achatz-Straussberger, G., Geisberger, R., Infuhr, D., Breitenbach, M., Cramer, R., und Achatz, G. (2001). Somatic diversity of the immunoglobulin repertoire is controlled in an isotype-specific manner. *Eur J Immunol* 31, 2319-2330.
- Lund, F. E., Cockayne, D. A., Randall, T. D., Solvason, N., Schuber, F., und Howard, M. C. (1998). CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev* 161, 79-93.
- Lund, F. E., Muller-Steffner, H. M., Yu, N., Stout, C. D., Schuber, F., und Howard, M. C. (1999). CD38 signaling in B lymphocytes is controlled by its ectodomain but occurs independently of enzymatically generated ADP-ribose or cyclic ADP-ribose. *J Immunol* 162, 2693-2702.
- Lydyard, P., Whelan, A., und Fanger, M. W. (2004). *Immunology*. Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Macallan, D. C., Wallace, D. L., Zhang, Y., Ghattas, H., Asquith, B., de Lara, C., Worth, A., Panayiotakopoulos, G., Griffin, G. E., Tough, D. F., und Beverley, P. C. (2005). B-cell kinetics in humans: rapid turnover of peripheral blood memory cells. *Blood* 105, 3633-3640.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., und He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.
- MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.
- MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C., und Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194, 8-18.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Ferrero, E., Funaro, A., Sancho, J., Ausiello, C. M., Ortolan, E., Vaisitti, T., Zubiaur, M., Fedele, G., *et al.* (2006). CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity. *Mol Med* 12, 334-341.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., und Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493-504.
- Manis, J. P., Tian, M., und Alt, F. W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 23, 31-39.
- Manz, R. A., Arce, S., Cassese, G., Hauser, A. E., Hiepe, F., und Radbruch, A. (2002). Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14, 517-521.
- Mao, C., Jiang, L., Melo-Jorge, M., Puthenveetil, M., Zhang, X., Carroll, M. C., und Imanishi-Kari, T. (2004). T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype. *Immunity* 20, 133-144.
- Marshall-Clarke, S., Reen, D., Tasker, L., und Hassan, J. (2000). Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today* 21, 35-41.

- Martens, U. M., Brass, V., Sedlacek, L., Pantic, M., Exner, C., Guo, Y., Engelhardt, M., Lansdorp, P. M., Waller, C. F., und Lange, W. (2002). Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br J Haematol* *119*, 810-818.
- Martin, F., und Kearney, J. F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* *2*, 323-335.
- Martin, S. W., und Goodnow, C. C. (2002). Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* *3*, 182-188.
- Martinez-Gamboa, L., Mei, H., Loddenkemper, C., Ballmer, B., Hansen, A., Lipsky, P. E., Emmerich, F., Radbruch, A., Salama, A., und Dörner, T. (2009). Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. *Clin Immunol* *130*, 199-212.
- Mateo, M. S., Mollejo, M., Villuendas, R., Algara, P., Sanchez-Beato, M., Martinez, P., und Piris, M. A. (2001). Molecular heterogeneity of splenic marginal zone lymphomas: analysis of mutations in the 5' non-coding region of the *bcl-6* gene. *Leukemia* *15*, 628-634.
- Matthias, P. (1998). Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site: who is doing what? *Semin Immunol* *10*, 155-163.
- Mayumi, M., Ishigami, T., Kanazashi, S., Yamaoka, K., Sumimoto, S., Heike, T., Katamura, K., Hata, D., und Kim, K. M. (1994). Positive and negative signals transduced through surface immunoglobulins in human B cells. *J Allergy Clin Immunol* *94*, 612-619.
- McHeyzer-Williams, M. G., McLean, M. J., Lalor, P. A., und Nossal, G. J. (1993). Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J Exp Med* *178*, 295-307.
- Mebius, R. E., und Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* *5*, 606-616.
- Meffre, E., Casellas, R., und Nussenzweig, M. C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* *1*, 379-385.
- Mei, H. E., Yoshida, T., Sime, W., Hiepe, F., Thiele, K., Manz, R. A., Radbruch, A., und Dorner, T. (2009). Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* *113*, 2461-2469.
- Meyer-Hermann, M., Figge, M. T., und Toellner, K. M. (2009). Germinal centres seen through the mathematical eye: B-cell models on the catwalk. *Trends Immunol* *30*, 157-164.
- Mielenz, D., Vettermann, C., Hampel, M., Lang, C., Avramidou, A., Karas, M., und Jack, H. M. (2005). Lipid rafts associate with intracellular B cell receptors and exhibit a B cell stage-specific protein composition. *J Immunol* *174*, 3508-3517.
- Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T., und Iino, M. (1999). Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP3 receptor subtypes. *Embo J* *18*, 1303-1308.
- Moens, L., Wuyts, M., Meyts, I., De Boeck, K., und Bossuyt, X. (2008). Human memory B lymphocyte subsets fulfill distinct roles in the anti-polysaccharide and anti-protein immune response. *J Immunol* *181*, 5306-5312.
- Mond, J. J., Lees, A., und Snapper, C. M. (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* *13*, 655-692.
- Monroe, J. G., Havran, W. L., und Cambier, J. C. (1983). B lymphocyte activation: entry into cell cycle is accompanied by decreased expression of IgD but not IgM. *Eur J Immunol* *13*, 208-213.
- Mortari, F., Wang, J. Y., und Schroeder, H. W., Jr. (1993). Human cord blood antibody repertoire. Mixed population of VH gene segments and CDR3 distribution in the expressed C alpha and C gamma repertoires. *J Immunol* *150*, 1348-1357.

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., und Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553-563.
- Murphy, K. M., Travers, P., und Walport, M. (2009). *Janeway Immunology*. London: Current Biology Ltd.
- Müschen, M., Küppers, R., Spieker, T., Bräuninger, A., Rajewsky, K., und Hansmann, M. L. (2001). Molecular single-cell analysis of Hodgkin- and Reed-Sternberg cells harboring unmutated immunoglobulin variable region genes. *Lab Invest* *81*, 289-295.
- Müschen, M., Lee, S., Zhou, G., Feldhahn, N., Barath, V. S., Chen, J., Moers, C., Kronke, M., Rowley, J. D., und Wang, S. M. (2002). Molecular portraits of B cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10014-10019.
- Nadel, B., Tang, A., und Feeney, A. J. (1998). V(H) replacement is unlikely to contribute significantly to receptor editing due to an ineffectual embedded recombination signal sequence. *Mol Immunol* *35*, 227-232.
- Neuberger, M. S. (2008). Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol Cell Biol* *86*, 124-132.
- Niu, H., Ye, B. H., und Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev* *12*, 1953-1961.
- Norrback, K. F., Hultdin, M., Dahlenborg, K., Osterman, P., Carlsson, R., und Roos, G. (2001). Telomerase regulation and telomere dynamics in germinal centers. *Eur J Haematol* *67*, 309-317.
- Notarangelo, L. D., Duse, M., und Ugazio, A. G. (1992). Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodefic Rev* *3*, 101-121.
- Obukhanych, T. V., und Nussenzweig, M. C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* *203*, 305-310.
- Oh-hora, M., und Rao, A. (2008). Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* *20*, 250-258.
- Pantelic, M., Kim, Y. J., Bolland, S., Chen, I., Shively, J., und Chen, T. (2005). *Neisseria gonorrhoeae* kills carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CD66a)-expressing human B cells and inhibits antibody production. *Infect Immun* *73*, 4171-4179.
- Pascual, V., Liu, Y. J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J., und Capra, J. D. (1994). Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* *180*, 329-339.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R. S., und Dalla-Favera, R. (2003). Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* *101*, 2914-2923.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., und Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11816-11821.
- Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y., und Cyster, J. G. (2009). EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* *460*, 1122-1126.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 49-62.
- Pihlgren, M., Tougne, C., Bozzotti, P., Fulurija, A., Duchosal, M. A., Lambert, P. H., und Siegrist, C. A. (2003). Unresponsiveness to lymphoid-mediated signals at the neonatal follicular dendritic cell precursor level contributes to delayed

- germinal center induction and limitations of neonatal antibody responses to T-dependent antigens. *J Immunol* 170, 2824-2832.
- Pillai, S., Cariappa, A., und Moran, S. T. (2004). Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol Rev* 197, 206-218.
- Pillai, S., Cariappa, A., und Moran, S. T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23, 161-196.
- Plebani, A., Lougaris, V., Soresina, A., Meini, A., Zunino, F., Losi, C. G., Gatta, R., Cattaneo, G., Nespoli, L., Marinoni, M., *et al.* (2007). A novel immunodeficiency characterized by the exclusive presence of transitional B cells unresponsive to CpG. *Immunology* 121, 183-188.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., und Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230-233.
- Prakriya, M., und Lewis, R. S. (2003). CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 33, 311-321.
- Press, J. L., Giorgetti, C. A., und Busby, W. F., 3rd (1991). A new germline VH36-60 gene is used in the neonatal primary and adult memory response to (T,G)-A--L. *Mol Immunol* 28, 1217-1224.
- Preud'homme, J. L., Petit, I., Barra, A., Morel, F., Lecron, J. C., und Lelievre, E. (2000). Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol Immunol* 37, 871-887.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Rao, A., Luo, C., und Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-747.
- Ravetch, J. V., und Lanier, L. L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84-89.
- Resta, R., Yamashita, Y., und Thompson, L. F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 161, 95-109.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., *et al.* (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575.
- Richards, S., Watanabe, C., Santos, L., Craxton, A., und Clark, E. A. (2008). Regulation of B-cell entry into the cell cycle. *Immunol Rev* 224, 183-200.
- Richards, S. J., Morgan, G. J., und Hillmen, P. (2000). Immunophenotypic analysis of B cells in PNH: insights into the generation of circulating naive and memory B cells. *Blood* 96, 3522-3528.
- Rogozin, I. B., und Kolchanov, N. A. (1992). Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1171, 11-18.
- Rohatgi, S., Dutta, D., Tahir, S., und Sehgal, D. (2009). Molecular dissection of antibody responses against pneumococcal surface protein A: evidence for diverse DH-less heavy chain gene usage and avidity maturation. *J Immunol* 182, 5570-5585.
- Rosado, M. M., Aranburu, A., Capolunghi, F., Giorda, E., Cascioli, S., Cenci, F., Petrini, S., Miller, E., Leanderson, T., Bottazzo, G. F., *et al.* (2009). From the fetal liver to spleen and gut: the highway to natural antibody. *Mucosal Immunol* 2, 351-361.
- Rosner, K., Winter, D. B., Tarone, R. E., Skovgaard, G. L., Bohr, V. A., und Gearhart, P. J. (2001). Third complementarity-determining region of mutated VH

- immunoglobulin genes contains shorter V, D, J, P, and N components than non-mutated genes. *Immunology* 103, 179-187.
- Rowe, D. S., und Fahey, J. L. (1965). A New Class Of Human Immunoglobulins. I. A Unique Myeloma Protein. *J Exp Med* 121, 171-184.
- Ruan, M. R., Akkoyunlu, M., Grubb, A., und Forsgren, A. (1990). Protein D of *Haemophilus influenzae*. A novel bacterial surface protein with affinity for human IgD. *J Immunol* 145, 3379-3384.
- Saeki, K., Miura, Y., Aki, D., Kurosaki, T., und Yoshimura, A. (2003). The B cell-specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction. *Embo J* 22, 3015-3026.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., *et al.* (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675-685.
- Sanz, I. (1991). Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 147, 1720-1729.
- Scheeren, F. A., Nagasawa, M., Weijer, K., Cupedo, T., Kirberg, J., Legrand, N., und Spits, H. (2008). T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM+ IgD+ CD27+ B cells. *J Exp Med* 205, 2033-2042.
- Scheid, J. F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M. S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R. G., Anthony, R. M., Zebroski, H., Hurley, A., *et al.* (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458, 636-640.
- Schwickert, T. A., Lindquist, R. L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M. H., Dustin, M. L., und Nussenzweig, M. C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446, 83-87.
- Seifert, M., Steimle-Grauer, S. A., Goossens, T., Hansmann, M. L., Bräuninger, A., und Küppers, R. (2009). A model for the development of human IgD-only B cells: Genotypic analyses suggest their generation in superantigen driven immune responses. *Mol Immunol* 46, 630-639.
- Shackelford, P. G., Nelson, S. J., Palma, A. T., und Nahm, M. H. (1988). Human antibodies to group A streptococcal carbohydrate. Ontogeny, subclass restriction, and clonal diversity. *J Immunol* 140, 3200-3205.
- Shaffer, A. L., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Giltnane, J. M., Lam, L. T., Pickeral, O. K., und Staudt, L. M. (2001). Signatures of the immune response. *Immunity* 15, 375-385.
- Shaffer, A. L., Wright, G., Yang, L., Powell, J., Ngo, V., Lamy, L., Lam, L. T., Davis, R. E., und Staudt, L. M. (2006). A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunol Rev* 210, 67-85.
- Shen, H. M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., und Storb, U. (1998). Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280, 1750-1752.
- Shi, Y., Agematsu, K., Ochs, H. D., und Sugane, K. (2003). Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin Immunol* 108, 128-137.
- Shi, Y., Yamazaki, T., Okubo, Y., Uehara, Y., Sugane, K., und Agematsu, K. (2005). Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J Immunol* 175, 3262-3267.
- Siegrist, C. A. (2001). Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 19, 3331-3346.

- Siegrist, C. A., und Aspinall, R. (2009). B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol* 9, 185-194.
- Son, N. H., Joyce, B., Hieatt, A., Chrest, F. J., Yanovski, J., und Weng, N. P. (2003). Stable telomere length and telomerase expression from naive to memory B-lymphocyte differentiation. *Mech Ageing Dev* 124, 427-432.
- Song, H., und Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med* 198, 1923-1935.
- Steiniger, B., Timphus, E. M., Jacob, R., und Barth, P. J. (2005). CD27+ B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. *Immunology* 116, 429-442.
- Stiehm, E. R., Ammann, A. J., und Cherry, J. D. (1966). Elevated cord macroglobulins in the diagnosis of intrauterine infections. *N Engl J Med* 275, 971-977.
- Storb, U., Peters, A., Klotz, E., Kim, N., Shen, H. M., Hackett, J., Rogerson, B., und Martin, T. E. (1998). Cis-acting sequences that affect somatic hypermutation of Ig genes. *Immunol Rev* 162, 153-160.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., und Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550.
- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M., und Kurosaki, T. (1997). Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Embo J* 16, 3078-3088.
- Surjan, L., Jr., Brandtzaeg, P., und Berdal, P. (1978). Immunoglobulin systems of human tonsils. II. Patients with chronic tonsillitis or tonsillar hyperplasia: quantification of Ig-producing cells, tonsillar morphometry and serum Ig concentrations. *Clin Exp Immunol* 31, 382-390.
- Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., und Kurosaki, T. (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J* 13, 1341-1349.
- Takizawa, M., Sugane, K., und Agematsu, K. (2006). Role of tonsillar IgD+CD27+ memory B cells in humoral immunity against pneumococcal infection. *Hum Immunol* 67, 966-975.
- Tangye, S. G., Avery, D. T., Deenick, E. K., und Hodgkin, P. D. (2003a). Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol* 170, 686-694.
- Tangye, S. G., Avery, D. T., und Hodgkin, P. D. (2003b). A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells. *J Immunol* 170, 261-269.
- Tangye, S. G., und Good, K. L. (2007). Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J Immunol* 179, 13-19.
- Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T., und Honjo, T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* 3, 443-450.

- Tarte, K., Zhan, F., De Vos, J., Klein, B., und Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 102, 592-600.
- Teng, G., und Papavasiliou, F. N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* 41, 107-120.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., und Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 177, 1009-1020.
- Timens, W., Rozeboom, T., und Poppema, S. (1987). Fetal and neonatal development of human spleen: an immunohistological study. *Immunology* 60, 603-609.
- Toellner, K. M., Jenkinson, W. E., Taylor, D. R., Khan, M., Sze, D. M., Sansom, D. M., Vinuesa, C. G., und MacLennan, I. C. (2002). Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers. *J Exp Med* 195, 383-389.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y., und Tokuhisa, T. (2002). Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 17, 329-339.
- Trigona, W. L., Brown, W. C., und Estes, D. M. (1999). Functional implications for signaling via the IL4R/IL13R complex on bovine cells. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 73-79.
- Tsubata, T., und Wienands, J. (2001). B cell signaling. Introduction. *Int Rev Immunol* 20, 675-678.
- Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M. C., und Wardemann, H. (2006). A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *J Exp Med* 203, 393-400.
- Tussiwand, R., Bosco, N., Ceredig, R., und Rolink, A. G. (2009). Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *Eur J Immunol* 39, 2317-2324.
- Ueda, Y., Liao, D., Yang, K., Patel, A., und Kelsoe, G. (2007). T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol* 178, 3593-3601.
- Utzny, C., und Burroughs, N. J. (2001). Long-term stability of diverse immunological memory. *J Theor Biol* 211, 393-402.
- Vaandrager, J. W., Schuurin, E., Kluin-Nelemans, H. C., Dyer, M. J., Raap, A. K., und Kluin, P. M. (1998). DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood* 92, 2871-2878.
- van Es, J. H., Meyling, F. H., und Logtenberg, T. (1992). High frequency of somatically mutated IgM molecules in the human adult blood B cell repertoire. *Eur J Immunol* 22, 2761-2764.
- Van Kooten, C., und Banchereau, J. (1996). CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* 61, 1-77.
- van Zelm, M. C., Szczepanski, T., van der Burg, M., und van Dongen, J. J. (2007). Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med* 204, 645-655.
- Veiga-Fernandes, H., und Rocha, B. (2004). High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division. *Nat Immunol* 5, 31-37.
- Vitetta, E. S., Berton, M. T., Burger, C., Kepron, M., Lee, W. T., und Yin, X. M. (1991). Memory B and T cells. *Annu Rev Immunol* 9, 193-217.

- von Gunten, S., und Bochner, B. S. (2008). Basic and clinical immunology of Siglecs. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 61-82.
- Vrisekoop, N., den Braber, I., de Boer, A. B., Ruiter, A. F., Ackermans, M. T., van der Crabben, S. N., Schrijver, E. H., Spierenburg, G., Sauerwein, H. P., Hazenberg, M. D., *et al.* (2008). Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6115-6120.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., und Nussenzweig, M. C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374-1377.
- Wasserstrom, H., Bussel, J., Lim, L. C., und Cunningham-Rundles, C. (2008). Memory B cells and pneumococcal antibody after splenectomy. *J Immunol* 181, 3684-3689.
- Weill, J. C., Weller, S., und Reynaud, C. A. (2004). A bird's eye view on human B cells. *Semin Immunol* 16, 277-281.
- Weill, J. C., Weller, S., und Reynaud, C. A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27, 267-285.
- Weller, S., Braun, M. C., Tan, B. K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M. E., Plebani, A., Kumararatne, D. S., Bonnet, D., Tournilhac, O., *et al.* (2004). Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647-3654.
- Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M. C., Le Deist, F. F., de Saint Basile, G. G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C. A., und Weill, J. C. (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1166-1170.
- Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecue, D., Gauthier, F., Weill, J. C., und Reynaud, C. A. (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J Exp Med* 205, 1331-1342.
- Weng, N. P., Granger, L., und Hodes, R. J. (1997a). Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10827-10832.
- Weng, N. P., Palmer, L. D., Levine, B. L., Lane, H. C., June, C. H., und Hodes, R. J. (1997b). Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging. *Immunol Rev* 160, 43-54.
- Werner-Favre, C., Bovia, F., Schneider, P., Holler, N., Barnet, M., Kindler, V., Tschopp, J., und Zubler, R. H. (2001). IgG subclass switch capacity is low in switched and in IgM-only, but high in IgD+IgM+, post-germinal center (CD27+) human B cells. *Eur J Immunol* 31, 243-249.
- Weston-Bell, N., Townsend, M., Di Genova, G., Forconi, F., und Sahota, S. S. (2009). Defining origins of malignant B cells: a new circulating normal human IgM(+)D(+) B-cell subset lacking CD27 expression and displaying somatically mutated IGHV genes as a relevant memory population. *Leukemia*.
- Wirh's, S., und Lanzavecchia, A. (2005). ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol* 35, 3433-3441.
- Woodland, R. T., und Schmidt, M. R. (2005). Homeostatic proliferation of B cells. *Semin Immunol* 17, 209-217.

- Wu, Z., Irizarry, R., Gentleman, R., Martinez Murillo, F., und Spencer, F. (2004). A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc* **99**, 909-915.
- Wuerffel, R. A., Du, J., Thompson, R. J., und Kenter, A. L. (1997). Ig Sgamma3 DNA-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J Immunol* **159**, 4139-4144.
- Xue, W., Luo, S., Adler, W. H., Schulze, D. H., und Berman, J. E. (1997). Immunoglobulin heavy chain junctional diversity in young and aged humans. *Hum Immunol* **57**, 80-92.
- Yamashita, Y., Hooker, S. W., Jiang, H., Laurent, A. B., Resta, R., Khare, K., Coe, A., Kincade, P. W., und Thompson, L. F. (1998). CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol* **28**, 2981-2990.
- Yang, S. Y., Fugmann, S. D., und Schatz, D. G. (2006). Control of gene conversion and somatic hypermutation by immunoglobulin promoter and enhancer sequences. *J Exp Med* **203**, 2919-2928.
- Yavuz, A. S., Monson, N. L., Yavuz, S., Grammer, A. C., Longo, N., Girschick, H. J., und Lipsky, P. E. (2002). Different patterns of bcl-6 and p53 gene mutations in tonsillar B cells indicate separate mutational mechanisms. *Mol Immunol* **39**, 485-493.
- Yavuz, S., Grammer, A. C., Yavuz, A. S., Nanki, T., und Lipsky, P. E. (2001). Comparative characteristics of mu chain and alpha chain transcripts expressed by individual tonsil plasma cells. *Mol Immunol* **38**, 19-34.
- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* **16**, 161-170.
- Ye, B. H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D. M., Offit, K., Chaganti, R. S., und Dalla-Favera, R. (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* **262**, 747-750.
- Yuan, D., und Tucker, P. W. (1984). Transcriptional regulation of the mu-delta heavy chain locus in normal murine B lymphocytes. *J Exp Med* **160**, 564-583.
- Yuseff, M. I., Lankar, D., und Lennon-Dumenil, A. M. (2009). Dynamics of membrane trafficking downstream of B and T cell receptor engagement: impact on immune synapses. *Traffic* **10**, 629-636.
- Zandvoort, A., Lodewijk, M. E., de Boer, N. K., Dammers, P. M., Kroese, F. G., und Timens, W. (2001). CD27 expression in the human splenic marginal zone: the infant marginal zone is populated by naive B cells. *Tissue Antigens* **58**, 234-242.
- Zarrin, A. A., Del Vecchio, C., Tseng, E., Gleason, M., Zarin, P., Tian, M., und Alt, F. W. (2007). Antibody class switching mediated by yeast endonuclease-generated DNA breaks. *Science* **315**, 377-381.
- Zhang, J., MacLennan, I. C., Liu, Y. J., und Lane, P. J. (1988). Is rapid proliferation in B centroblasts linked to somatic mutation in memory B cell clones? *Immunol Lett* **18**, 297-299.
- Zhang, Z. (2007). VH replacement in mice and humans. *Trends Immunol* **28**, 132-137.
- Zhang, Z., Zemlin, M., Wang, Y. H., Munfus, D., Huye, L. E., Findley, H. W., Bridges, S. L., Roth, D. B., Burrows, P. D., und Cooper, M. D. (2003). Contribution of Vh gene replacement to the primary B cell repertoire. *Immunity* **19**, 21-31.
- Zheng, N. Y., Wilson, K., Wang, X., Boston, A., Kolar, G., Jackson, S. M., Liu, Y. J., Pascual, V., Capra, J. D., und Wilson, P. C. (2004). Human immunoglobulin

- selection associated with class switch and possible tolerogenic origins for C delta class-switched B cells. *J Clin Invest* 113, 1188-1201.
- Zhou, J., Lottenbach, K. R., Barenkamp, S. J., Lucas, A. H., and Reason, D. C. (2002). Recurrent variable region gene usage and somatic mutation in the human antibody response to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 23F. *Infect Immun* 70, 4083-4091.
- Zinkernagel, R. M. (2000). What is missing in immunology to understand immunity? *Nat Immunol* 1, 181-185.
- Zinkernagel, R. M., und Hengartner, H. (2004). On immunity against infections and vaccines: credo 2004. *Scand J Immunol* 60, 9-13.
- Zupo, S., Massara, R., Dono, M., Rossi, E., Malavasi, F., Cosulich, M. E., und Ferrarini, M. (2000). Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood* 95, 1199-1206.

8. Teilpublikationen

Seifert, M., Steimle-Grauer, S. A., Goossens, T., Hansmann, M. L., Bräuninger, A., Küppers, R.

A model for the development of human IgD-only B cells: Genotypic analyses suggest their generation in superantigen driven immune responses.

Mol Immunol (2009). 46, 630-639.

M.S. und S. S. teilen eine gemeinsame Koerstautorenschaft

Seifert, M. und Küppers, R.

Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM⁺(IgD⁺)CD27⁺ B cells and the dynamics of memory B cell generation.

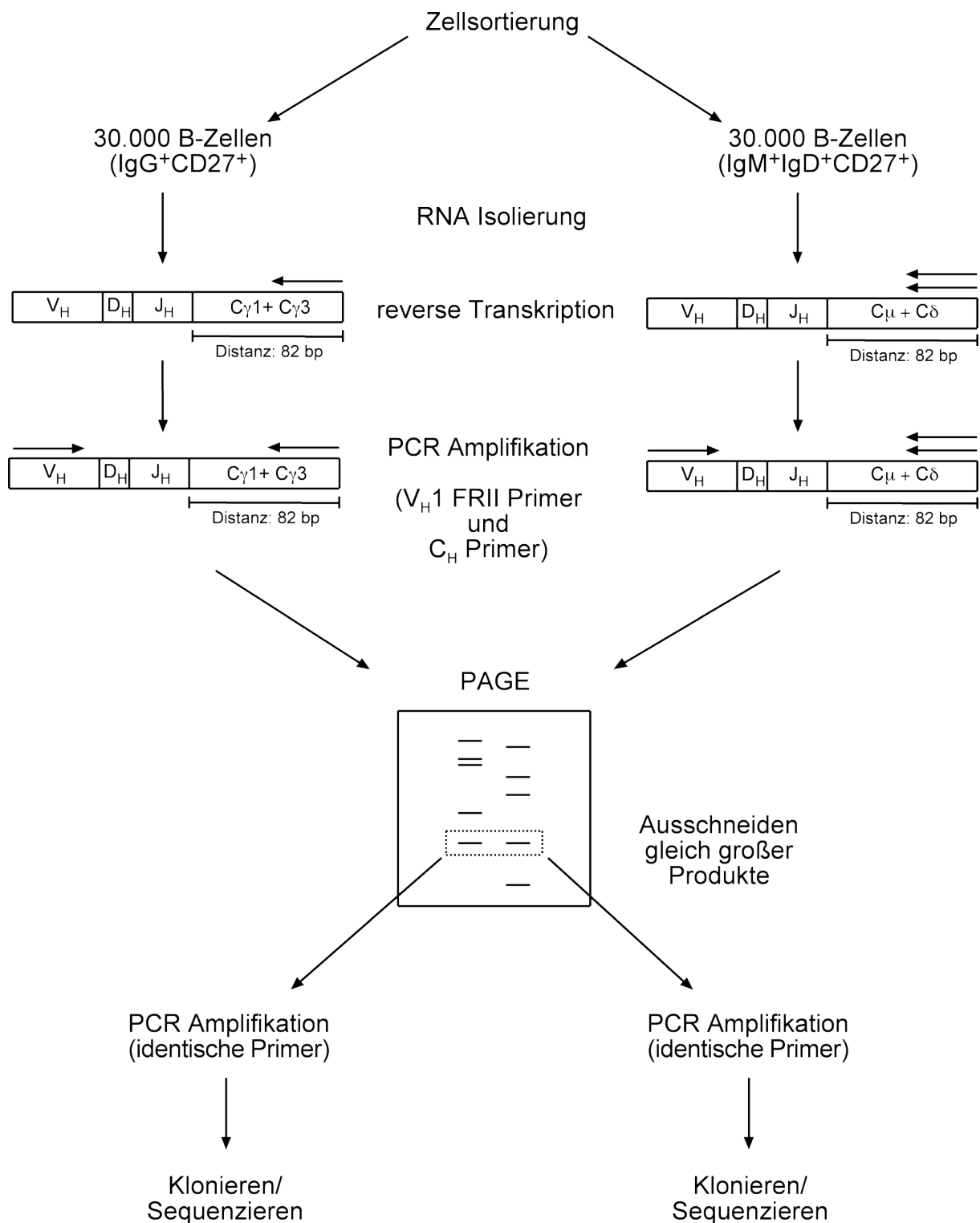
J Ex Med (2009)

In Revision

9. Anhang

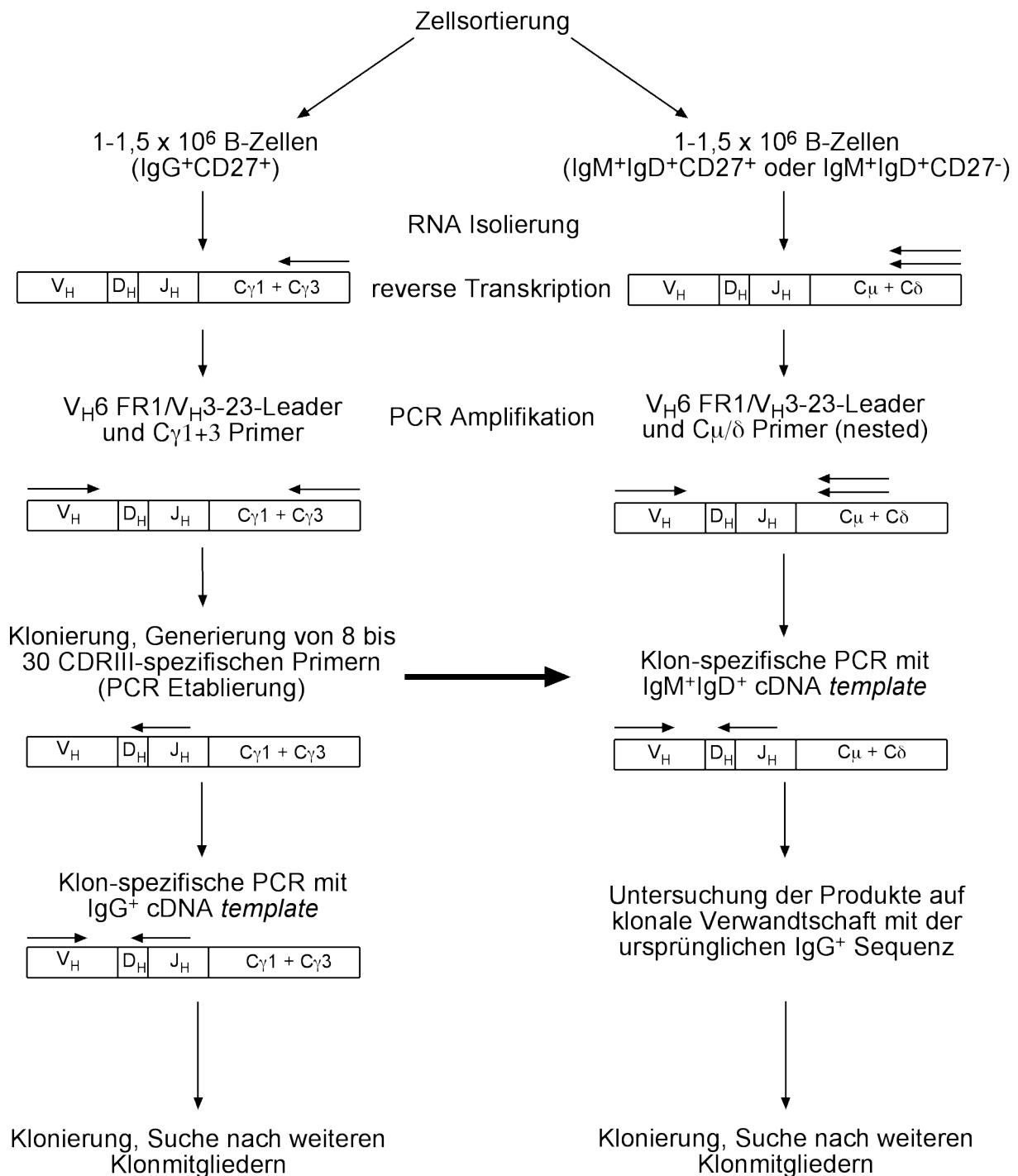
A1 Flußdiagramm: Detektion klonaler V_H1 -Gen-Sequenzen mit PAGE und CDRIII-Spektren-Typisierung

Das Flußdiagramm soll die experimentelle Vorgehensweise zur Detektion klonal verwandter Sequenzen aus IgM^+CD27^+ und IgG^+CD27^+ B-Zellen mittels PAGE und CDRIII-Spektren-Typisierung veranschaulichen.



A2 Flußdiagramm: Detektion klonaler V_H6- und V_H3-23-Gen-Sequenzen mit CDRIII-spezifischen Primern

Das Flußdiagramm soll die experimentelle Vorgehensweise zur Detektion klonal verwandter Sequenzen aus IgM⁺CD27⁺ und IgG⁺ B-Zellen mittels CDRIII-spezifischer Primer-Strategie veranschaulichen.



A3 Partielle Alignments jedes identifizierten Klones mit IgM⁺ und IgG⁺ Mitgliedern

Gezeigt sind 5 zufällig ausgewählte Sequenzen jedes identifizierten Klones aus 3.2.3. Die Sequenzen sind ausgerichtet an der korrespondierenden Keimbahnsequenz (Keimbahn) des jeweiligen V_H-, D_H und J_H-Gensegmentes. Jedes Alignment enthält die initiale IgG-Sequenz (IgG primär) mittels der ein CDRIII-spezifischer Primer (unterstrichene Sequenz) erstellt wurde. Klon A wurde mit PAGE-Gelelektrophorese und CDRIII-Spektren-Typisierung gefunden, daher enthalten die Sequenzen zusätzlich Teile von C_μ oder C_γ.

Klon A

VH1-18	IGHD4-23	
CGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGTAACTCC		Keimbahn
...C.....A.....C.....C....		IgG1
.....T.....G.....C.....C....		IgM3
...T...T.....G.....A.....C.....C....		IgG3
...T...T.....G.....A.....C.....C....		IgM1
...T...T.....G.....A.....C.....C....		IgG9

IGHJ4	IGHG1	
TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA		Keimbahn
CACT.....C.....A.....		IgG1
.....C.....GGAGTG.ATC		IgM3
.....C.....A.....		IgG3
.....C.....GGAGTG.ATC		IgM1
.....C.....A.....		IgG9

Klon B

VH6		
TCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACA		Keimbahn
.....TG.T..AA.....TT.....T..AC.....G.....G.....T.....		IgG primär
.....T...G.....		IgG2
.....T.....G.....TT.....		IgG3
.....TG.T..AA.....TT.....T..AC.....G.....G.....T.....		IgM1
.....TG.T..AA.....TT.....T..AC.....GG.....G.....T.....		IgG6

<u>VH6</u>	<u>IGHD5-24</u>	<u>IGHJ4</u>	
CATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGA	GAGTGGGATAGAA	CTTTGACTACTGGGG	Keimbahn
.....A.....T..G.....A.....C.....CGGGGG.....GAACG.....			IgG primär
.....C.....C.....T.T.....G.....C.....			IgG2
.....G.....T..C.T.....A.....C.....			IgG3
.....A.....T..G.....A.....C.....			IgM1
.....A.....T..G.....A.....C.....			IgG6

Klon C

<u>VH6</u>			
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCA			Keimbahn
.....T.....T.....G...			IgG primär
.....T..G.....G...			IgG2
.....T.....G...			IgG3
.....C.....C.....T.....G...			IgG29
.....C.....C.....T.....G...			IgM20

<u>VH6</u>	<u>IGHD3-3</u>	<u>IGHJ4</u>	
ACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAACGATT		CTTTGACTACTGGGGCCA	Keimbahn
.....G.....C..A.....A.....G.....CCCCTC.....			IgG primär
.....G.....C..A.....A.....G.....			IgG2
.....G.....C..A.....A.....G.....			IgG3
.....G.....C..A.....A.....G.....			IgG29
.....G.....C..A.....A.....G.....			IgM20

Klon D

<u>VH6</u>			
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCA			Keimbahn
.....T.....G.....G...			IgG primär
.....T..G.....G.....G.....			IgG7
.....G.....T.....C.....G...			IgM8
.....T.....G.....			IgM9
.G.C.....A.G.....C.T..G.....GG...			IgG29

<u>VH6</u>	<u>IGHD1-26</u>	<u>IGHJ4</u>	
ACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGCTACTAC		TTTGACTACTGGGACCA	Keimbahn
..TT.....C.....T.....C.A...TCTGGG.....G...			IgG primär
T.....C.....C.....T.....C.A.....			IgG7
..TT.....C.....T.....C.A.....			IgM8
..TT.....C.....T.....C.A.....			IgM9
.....TAT..G.....C.A.....			IgG29

Klon E

<u>VH6</u>			
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACAC			Keimbahn
.....A.....TCT.....T...C.....			IgG primär
..C.....A.....G.....			IgM11
.....TCT.....			IgM15
.....G.....C.....TCT.....C.T...C...G.....T...C.....			IgG24
.....G.....C.....TCT.....T...C.....			IgG42

<u>VH6</u>	<u>IGHD1-26</u>	<u>IGHJ6</u>	
ATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGA	TATAGCAGCAG	CTACTACTACTACGGTA	
Keimbahn			
.....T.....A.....TCTCA.....GACGGCCC.....			IgG primär
.....C.....A.A.....T.....T.....A...			IgM11
.....T.....A.....T.....			IgM15
.....G..T.....A.....T.....			IgG24
..A.....G..T.....T.....T.....			IgG42

Klon F

<u>VH6</u>			
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACAC			Keimbahn
.....G.....T.....G.....TT.....			IgG primär
.....G.....C.....T.....			IgM9
.....T...G.....			IgG8
.....G.....T.....G.....G.....			IgM7
.....G.....G.....T.....G.....GG.....			IgG10

<u>VH6</u>	<u>IGHD3-9</u>	<u>IGHJ5</u>	
ATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGA	CGATATTTTGACTGGTT	TGGTTC	Keimbahn
.....C.....T.....	GGT...T...C.....TCCGCCGCTCAGT...G..	IgG primär
.....A.....T...C...		IgM9
.....A.....CA.....T...C...	IgG8
.....A.....CA.....T...C...	IgM7
.....A.....CA.....T...C...	IgG10

Klon G

<u>VH6</u>			
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGA			Keimbahn
.....T.....G.....T.....	IgG primär
.....G.....G.....	IgG11
.....CG.....C.....	IgG2
.....G.....	IgM14
.....T.....G.....	IgM29

<u>VH6</u>	<u>IGHD7-27</u>	<u>IGHJ4</u>	
CACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGA	TAACTGG	CTACTGGGCCAG	Keimbahn
..G.....GAAT.....GGAGTATTAGG.....	IgG primär
.....T.....CT.....G.....	IgG11
.....G.....A..C.....G.....	IgG2
.....C.....A.....		IgM14
.....C.....			IgM29

Klon H

<u>VH6</u>			
ATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGC			Keimbahn
....CT.G.....C.....G.....G.....TT..A.....G.....A.....AG...T...A.....			IgG primär
.C.....T.....T.....G...T.....G.....			IgG9
.....G.....A.....T...T...A.....	IgM17
.....G.....A.....G.....	IgM4
....CT.G.....C.....G.T.T...TT..A.....G..A..G.A.....AG...T.GG.A.....			IgG17

<u>VH6</u>	<u>IGHD1-26</u>	<u>IGHJ4</u>	
CAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG	ACTCCCAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGGGAG	TTGACTACTGGGGCCAG	Keimbahn
T.....C.....T.....T.....AAAAGAGTCC.....AC.....		IgG primär
.....A.....A.....GA..C...		IgM3
.....A.....A.....GA..C...		IgM4
.....T.....A.....C.....T.....		IgG3
.....T.....A...G.....C.....T.....		IgG5

Klon L

<u>VH6</u>		
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCA		Keimbahn
.....G.....G..C.....A.G.....		IgG primär
.....A.....C.....A.....C...		IgM11
.....C.....		IgM5
.....TCT.....C...C.....G.....		IgG6
.....C.....		IgG2

<u>VH6</u>	<u>IGHD3-3</u>	
ACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAG	TACGATTTTTGGAGTGGTT	Keimbahn
.....CA.G...GGGATGGCAC.....C...A...		IgG primär
.....T.....G.		IgM11
.G.....C.....A.....A.....G.		IgM5
T.....C.....G.....T.....A.T.....A.....C...		IgG6
G.....A.T.....A.....C...		IgG2

<u>IGHJ4</u>	
CCCTACTACTTTGACTACTGGGGC	Keimbahn
..	IgG primär
	IgM11
	IgM5
	IgG6
	IgG2

<u>IGHD7-27</u>	<u>IGHJ4</u>	
TAACTGG	GACGCAGTGACTACTGGGGCC	Keimbahn
G.....CCCC	IgG primär
A.....		IgM7
A.....		IgG49
A.....		IgM3
G.C.....		IgG27

Klon O

<u>VH3-23</u>		
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCA		Keimbahn
.....A.....T.....		IgG primär
.....A.....G.....C.....		IgM1
..C...AC...AA.....A.....A.....C.....A.....T.....AGC.....		IgG24
.....C.....		IgM10
.....A.....T.....A.....		IgG13

<u>VH3-23</u>		
TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG		Keimbahn
..A.....AG.....C..A.A..C.C.C.....A.....A.....		IgG primär
..T.....C.....CG.C.C....C...C..A...T.....		IgM1
..A.....A.....A.....A.....		IgG24
.....A.....C..A.A..C.C.C.....		IgM10
.....A.....C..A.A..C.C.C.....		IgG13

<u>VH3-23</u>	<u>IGHD</u>	
GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAA	TGGC	Keimbahn
.....A.G.....T.....TTT....		IgG primär
.....A.....T.....		IgM1
C.....C.....A.G.....G.....T.....		IgG24
.....T.....G.....A.....T.....		IgM10
.....A.G.....T.....		IgG13

<u>3-3</u>	<u>IGHJ6</u>	
AGTGG	GTACAATTACCACTACGCTAT	Keimbahn
...CTG.....		IgG primär
...		IgM1
...		IgG24
...		IgM10
...		IgG13

Klon P

VH3-23

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA
T.C.....A.....C.....G.....
G.....T.C.....T.....
T.C.....
A..C.....
C.....G.....

Keimbahn
 IgG primär
 IgG5
 IgG8
 IgG12
 IgM12

VH3-23

TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT---AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
 ...C.....AT...G...C.GGA...AAC...A.....T..T.T...G.....
 ...C.....AT...G...GGT.C.A...A.A.G.....G.....
 ...C.....AT...G...GGT.....A.....G.....
 ...C.....C..AT...G...GGT..A...A.....C.....G.....
 ...C.....T..A.T.....AT..A.G...C.GGA...A...A.A.....C...A.T.G.....

Keimbahn
 IgG primär
 IgG5
 IgG8
 IgG12
 IgM12

VH3-23

CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGA
T.....T
G.....G.....C.....
GG.....G.....
 G.T.....A.A.....C.....T...G.T...C.A.....

Keimbahn
 IgG primär
 IgG5
 IgG8
 IgG12
 IgM12

IGHD3-16

GGAGGTTATGCT

IGHJ4

TTTGACTACTGGGGCCA

CGA.....TACACT.....

Keimbahn
 IgG primär
 IgG5
 IgG8
 IgG12
 IgM12

A4 Auflistung und Beschreibung von 214 Genen, die in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen höher oder niedriger transkribiert sind als in naiven und klassengewechselten B-Zellen

probe set	Expressionsfaktor		Gen-Symbol	Beschreibung
	MD27/ Naive	MD27/ KW		
Zytoskelett und extrazelluläre Matrix				
204834_at	14,4	2,0	FGL2	Fibrinogen-ähnlich
212992_at	2,8	2,9	AHNAK2	Ein Gerüstprotein
209191_at	2,6	3,7	TUBB6	Tubulin Beta 6
240777_at	2,4	3,5	SYNE2	Verbindet Aktin mit der Kernlamina
225613_at	30,1	3,8	MAST4	Mikrotubulus assoziierte Kinase
216699_s_at	7,3	3,5	KLK1	kallikrein 1, Serinprotease
228673_s_at	2,2	2,1	EML4	interagiert mit Mikrotubuli
224374_s_at	4,1	5,0	EMILIN2	Kollagen-ähnlich, extrazelluläre Matrix
229566_at	3,1	4,7	LOC645638	extrazellulärer Proteaseinhibitor
203881_s_at	2,3	3,3	DMD	dystrophin, bindet Myosin
212993_at	3,8	2,6	BTBD14A	Ein Gerüstprotein
204964_s_at	14,5	-6,6	SSPN	sarcospan (Kras assoziiertes Gen)
202890_at	2,4	-16,7	MAP7	interagiert mit Mikrotubuli
200696_s_at	3,0	-4,1	GSN	Gelsolin, Aktin-Regulation
214602_at	18,5	-2,4	COL4A4	collagen, type IV, alpha 4
206167_s_at	3,2	-7,4	ARHGAP6	GAP, Aktin-regulation
235670_at	2,4	-2,5	STX11	Vesikeltransport (SNARE)
200974_at	2,5	-3,7	ACTA2	Aktin Alpha 2
213638_at	-2,5	2,7	PHACTR1	Phosphatase, Aktin-Regulation
212365_at	-5,3	3,2	MYO1B	Myosin IB
201718_s_at	-5,6	4,3	EPB41L2	Verbindet Spektrin und Aktin
222234_s_at	-33,3	2,1	DBNDD1	Dysbindin, Teil des Dystrophin-Komplexes
219259_at	-10,8	-2,6	SEMA4A	Signalmolekül für Zytoskelett-Umlagerungen
218330_s_at	-2,2	-3,0	NAV2	interagiert mit intermediären Filamenten
225540_at	-3,9	-2,5	MAP2	interagiert mit Mikrotubuli
205268_s_at	-2,6	-4,1	ADD2	Verbindet Aktin und Zellmembran
BCR/TCR Signalweitergabe				
227900_at	2,1	2,7	CBLB	Kostimulatorisch in T-Zellen
210313_at	9,0	20,2	LILRA4	ITAM-Molekül, kostimulierend
224192_at	2,9	2,9	FCRL2	Fc-Rezeptor-Homolog
205789_at	2,1	2,6	CD1D	MHC-ähnliches Glykoprotein
205987_at	7,3	4,9	CD1C	MHC-ähnliches Glykoprotein
1553678_a_at	13,5	-4,2	ITGB1	Integrin Beta 1(CD29)
204647_at	7,2	-9,7	HOMER3	NFAT-Regulator
1554519_at	5,5	-2,1	CD80	Kostimulatorisches Molekül
210031_at	7,9	-9,3	CD247	Kostimulatorisch bei B-T-Zell-Interaktion
209583_s_at	-9,3	5,6	CD200	könnte myeloide Zellaktivität stimulieren
205790_at	-22,2	2,4	SKAP1	BCR/TCR-Signalweitergabe
210644_s_at	-3,2	2,5	LAIR1	ITIM-Molekül, hemmend
206759_at	-14,7	2,5	FCER2	CD23, Fc-Rezeptor
215925_s_at	-2,1	6,6	CD72	CD100-Rezeptor, kostimulatorisch
210325_at	-14,1	13,5	CD1A	MHC-ähnliches Glykoprotein
210972_x_at	-2,7	-7,0	TRAC	TCR Alpha C-Kette
212646_at	-35,7	-22,4	RFTN1	BCR-Signalweitergabe
205269_at	-2,3	-10,8	LCP2	BCR-Signalweitergabe
204891_s_at	-4,6	-2,1	LCK	BCR-Signalweitergabe
235310_at	-6,7	-6,7	GCET2	ITAM, (induziert durch Ii4)
205692_s_at	-10,3	-5,3	CD38	Kostimulatorisches Molekül

1553995_a_at	-4,1	-3,4	NT5E	(CD73) 5'-Nucleotidase, kostimulatorisch
--------------	------	------	------	--

Ca⁺⁺ Signalweg

209469_at	5,8	5,1	GPM6A	Ca ⁺⁺ -Kanal, Axonales Wachstum
218872_at	17,4	-2,8	TESC	Tescalcin, Ca ⁺⁺ signaling
225019_at	-2,0	3,3	CAMK2D	CaM Kinase II delta
206637_at	-27,0	-2,2	P2RY14	Intrazelluläre Ca ⁺⁺ -Ausschüttung
211323_s_at	-4,5	-2,2	ITPR1	Intrazelluläre Ca ⁺⁺ -Ausschüttung
210786_s_at	-2,4	-2,0	FLI1	Hämatopoese
211825_s_at	-3,1	-2,1	EWSR1 /// FLI1	Hämatopoese

GTP-Signalweg

202975_s_at	17,6	16,9	RHOBTB3	GTPase
206290_s_at	3,1	10,7	RGS7	G-Protein-Regulation
204115_at	9,3	10,0	GNG11	GTPase
202748_at	2,4	2,1	GBP2	G-Protein-Regulation
222942_s_at	4,6	-10,9	TIAM2	GEF
217762_s_at	3,1	-2,1	RAB31	GTPase
209581_at	2,0	-6,0	HRASLS3	G-Protein-Regulation
218807_at	-2,3	2,0	VAV3	GEF
203431_s_at	-23,6	2,2	RICS	G-Protein-Regulation

Insulin-Signalweg

209185_s_at	-2,3	2,5	IRS2	Insulin Rezeptor Substrat 2
213792_s_at	-3,8	-2,7	INSR	Insulin Rezeptor

Mitogen-assoziierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg

204068_at	4,4	3,5	STK3	Serin/Threonin-Kinase 3
206170_at	4,5	2,8	ADRB2	Adrenalinrezeptor
208892_s_at	-4,4	6,8	DUSP6	reguliert MAPK-Signalweitergabe

Phosphatidylinositolphosphat-/Proteinkinase C-Signalweg

219358_s_at	2,0	2,6	CENTA2	centaurin, PIP3-Signalweg
210612_s_at	2,4	-2,0	SYNJ2	synaptojanin 2, PIP3-Signalweg
209504_s_at	2,1	-2,3	PLEKHB1	PKC-Signalweg
1558770_a_at	2,1	-3,1	PIK3R6	PIP3-Signalweg
217677_at	-2,5	2,2	PLEKHA2	PKC-Signalweg
219024_at	-3,0	2,3	PLEKHA1	PKC-Signalweg
219155_at	-2,0	-7,2	PITPNC1	PIP3-Signalweg
225688_s_at	-29,2	-5,4	PHLDB2	PKC-Signalweg

Wnt- /Hedgehog- /Notch-Signalweg

229103_at	2,7	2,6	WNT3	WNT-Signalweg
224022_x_at	2,4	2,4	WNT16	WNT-Signalweg
1553873_at	3,2	2,3	KLHL34	Kelch-ähnlich 34 (Drosophila)
209815_at	3,2	-2,7	PTCH1	Patched Homolog 1 (Drosophila)
226666_at	4,7	-2,3	DAAM1	Dishevelled assoziiert
223709_s_at	-2,6	2,5	WNT10A	WNT-Signalweg
212611_at	-2,9	2,1	DTX4	Deltex Homolog 4 (Drosophila)
227336_at	-2,2	5,4	DTX1	Deltex Homolog 1 (Drosophila)
203987_at	-6,0	-2,1	FZD6	Frizzled Homolog 6 (Drosophila)

Sonstige Signalgebende und -verarbeitende Moleküle

206907_at	19,5	2,3	TNFSF9	Tumor Nekrose Faktor Familie 9 (Ligand)
205805_s_at	2,0	2,1	ROR1	RTK-like Orphan-Rezeptor
227396_at	2,9	3,7	PTPRJ	Protein Tyrosin Phosphatase
212230_at	15,8	3,3	PPAP2B	Phosphatische Säure Phosphatase Typ 2B
218888_s_at	7,4	2,1	NETO2	RTK-/Metalloprotease-ähnlich
223159_s_at	4,5	-3,0	NEK6	Serin/Threonin-Kinase
225116_at	7,2	-6,3	HIPK2	Proteinkinase, interagiert mit Homöodomäne
228568_at	-5,7	2,0	FCER3	Glutamat-Rezeptor

228494_at	-10,2	-25,1	PPP1R9A	Proteinphosphatase 1 Regulator
209371_s_at	-10,6	-2,1	SH3BP2	SH3-bindendes Protein
227013_at	-5,1	-9,1	LATS2	putative Serin/Threonin-Kinase
204491_at	-3,8	-17,6	PDE4D	cAMP-spezifische Phosphodiesterase
204119_s_at	-4,1	-3,4	ADK	Adenosinkinase

SLAM-Signalweg

211192_s_at	2,6	2,8	CD84	CD84 molecule
222838_at	19,9	-2,2	SLAMF7	SLAM family member 7

Transkriptionsfaktoren und DNA-interagierende Moleküle

215767_at	17,2	2,0	ZNF804A	Zinkfinger-Protein 804A
225802_at	3,9	2,6	TOP1MT	mitochondriale Topoisomerase I
228698_at	36,3	11,2	SOX7	Transkriptionsfaktor, embryonale Entwicklung
219387_at	4,7	2,4	CCDC88A	Enthält Coiled-Coil-Domäne 88A
228994_at	3,9	2,8	CCDC24	Enthält Coiled-Coil-Domäne 24
219221_at	6,5	-3,0	ZBTB38	Zinkfinger-Protein 38
219836_at	9,9	-14,0	ZBED2	Zinkfinger-Protein D2
204529_s_at	5,1	-22,9	TOX	DNA-biegender Molekül
205255_x_at	6,0	-5,6	TCF7	Transkriptionsfaktor 3 (T-Zellen)
228964_at	3,1	-4,8	PRDM1	Blimp, Plasmazell-Differenzierung
202393_s_at	5,1	-5,5	KLF10	Quieszenz-Transkriptionsfaktor
236635_at	-5,9	2,2	ZNF667	Zinkfingerprotein 667
218793_s_at	-2,5	3,2	SCML1	Polycomb-Familie, Repressor
203140_at	-4,4	2,4	BCL6	GC-Transkriptionsfaktor
208703_s_at	-8,8	10,0	APLP2	DNA-bindend, Zellzyklus
210829_s_at	-4,9	-2,1	SSBP2	bindet einzelsträngige DNA
204900_x_at	-2,5	-3,4	SAP30	Histon-Deazetylase-Komplex
219396_s_at	-7,5	-4,8	NEIL1	Glykosylase, Basenexzisionsreparatur
1555420_a_at	-5,4	-4,6	KLF7	Quieszenz-Transkriptionsfaktor
211597_s_at	-55,2	-224,2	HOPX	HOP Homöobox, Zellzyklusregulation
236442_at	-3,4	-2,7	DPF3	Zinkfinger-Protein DPF3
230807_at	-5,9	-3,9	CCDC151	Enthält Coiled-Coil-Domäne 151

Zelladhäsionsmoleküle

221004_s_at	2,6	2,2	ITM2C	Integrales Membran-Protein
209498_at	18,3	5,0	CEACAM1	ITIM, bindet an Endothelzellen
212813_at	3,2	2,2	JAM3	Leukozytenmigration
206869_at	7,7	-9,8	CHAD	Chondroadherin
208949_s_at	4,8	-38,3	LGALS3	Galaktose bindendes Lektin
201506_at	5,9	-2,5	TGFBI	moduliert Zelladhäsion
219737_s_at	-7,0	7,2	PCDH9	Protocadherin 9
1555691_a_at	-2,1	4,5	KLRC4	Lektin-ähnlich
200606_at	-69,0	4,0	DSP	Desmoplakin (tight junction)
204591_at	-2,9	2,9	CHL1	L1CAM-ähnliches Molekül
201005_at	-31,9	-3,7	CD9	Tetraspanin, CEACAM-Ligand
215145_s_at	-17,5	-9,7	CNTNAP2	interagiert mit Kontaklin

Wachstumsfaktoren, Hormone und deren Rezeptoren

209392_at	41,3	11,3	ENPP2	autokriner Wachstumsfaktor, Zellmigration
217853_at	4,4	2,8	TNS3	Focale Adhäsion/Signalweitergabe
205207_at	2,2	12,6	IL6	Interferon Beta
204912_at	4,1	2,1	IL10RA	Interleukin-10 Rezeptor
242903_at	2,5	2,3	IFNGR1	Interferon Gamma Rezeptor
200678_x_at	3,4	2,1	GRN	Granulin, autokriner Wachstumsfaktor
205225_at	4,4	2,9	ESR1	Östrogenrezeptor
206978_at	41,1	2,9	CCR2	Chemokinrezeptor 2
205098_at	5,2	-16,0	CCR1	Chemokinrezeptor 1
226333_at	3,4	-35,5	IL6R	Interleukin-6 Rezeptor
216176_at	2,5	-8,5	HCRP1	Wachstumsfaktor

209499_x_at	-2,4	4,0	TNFSF12-TNFSF13	Tumor Nekrose Faktor Familie 12 (Ligand), BAFF
205114_s_at	-7,8	4,4	CCL3	Chemokinligand 3
201161_s_at	-10,3	3,5	CSDA	Kolonie-stimulierender Faktor
204897_at	-2,2	-2,1	PTGER4	Prostaglandin E Rezeptor
203233_at	-105,0	-4,5	IL4R	Interleukin-4 Rezeptor
211612_s_at	-6,3	-7,4	IL13RA1	Interleukin-13 Rezeptor
216615_s_at	-2,1	-7,6	HTR3A	Serotonin-Rezeptor
209524_at	-4,0	-2,3	HDGFRP3	Wachstumsfaktor ähnlich HDGF
228948_at	-5,0	-106,7	EPHA4	Ephrin-Rezeptor A4

immunglobuline

215118_s_at	13,3	-13,9	IGHG/IGHM	Immunglobulin G C-terminus
228518_at	7,7	-2,1	IGHG/IGHM	Immunglobulin G C-terminus
217022_s_at	15,0	-7,4	IGHA1 /IGHA2	Immunglobulin A C-terminus
216491_x_at	-2,4	2,7	IGHM	Immunglobulin M C-terminus
213674_x_at	-3,6	32,6	IGHD	Immunglobulin D C-terminus
1558438_a_at	-2,4	-13,3	IGHE	Immunglobulin G C-terminus

Kanäle, Pumpen und Transporter

230748_at	5,1	-2,5	SLC16A6	unbekannt
205234_at	9,9	4,8	SLC16A4	monocarboxylat-Transporter
212192_at	2,9	-2,9	KCTD12	Kaliumkanal
205262_at	2,0	-2,3	KCNH2	Kaliumkanal
39248_at	3,2	-9,1	AQP3	Wasserkanal (Aquaporin 3)
214595_at	-34,5	3,0	KCNG1	Kaliumkanal
202124_s_at	-4,1	-2,4	TRAK2	Chlorid-Kanal
210432_s_at	-43,1	-16,4	SCN3A	Natriumkanal
219287_at	-2,4	-2,1	KCNMB4	Kaliumkanal
223727_at	-3,5	-2,5	KCNIP2	Kaliumkanal
1552742_at	-23,8	-16,6	KCNH8	Kaliumkanal

Metabolismus

237180_at	2,1	2,4	PSME4	Protein Qualitätskontrolle
224839_s_at	3,1	2,2	GPT2	Glukoneogenese
45288_at	2,5	2,7	ABHD6	enthält Abhydrolase-Domäne
202589_at	3,8	-9,8	TYMS	Thymidylat-Synthetase
223062_s_at	2,6	-2,0	PSAT1	Phosphoserin Aminotransferase
32502_at	2,4	-3,1	GDPD5	Phosphodiesterase
223952_x_at	2,3	-2,3	DHRS9	Dehydrogenase
226517_at	9,6	-2,2	BCAT1	Aminosäure Anabolismus
218844_at	2,5	-2,6	ACSF2	Acetyl-CoA Synthetase
213725_x_at	-2,4	2,1	XYLT1	Xylosyltransferase I
225207_at	-10,6	2,2	PDK4	Pyruvat Dehydrogenase
204646_at	-2,0	4,8	DPYD	Dihydropyrimidin Dehydrogenase
207819_s_at	-2,7	2,6	ABCB4	MDR/TAP Mitglied 4
209994_s_at	-2,5	2,4	ABCB1 /// ABCB4	MDR/TAP Mitglied 1
237465_at	-2,6	-2,5	USP53	Protein Qualitätskontrolle
207245_at	-72,5	-7,3	UGT2B17	Protein Qualitätskontrolle
218217_at	-3,5	-3,0	SCPEP1	Serin Karboxypeptidase 1
227417_at	-13,7	-54,1	MOSC2	Molybdän-Kofaktor Synthese
209512_at	-2,4	-3,0	HSDL2	Hydroxysteroid Dehydrogenase ähnlich
202967_at	-4,1	-2,0	GSTA4	Glutathion-S Transferase

Apoptoseregulation

204780_s_at	31,1	-4,2	FAS	CD95, Apoptoserezeptor
210609_s_at	2,9	-2,4	TP53I3	P53-induziertes Protein
205780_at	2,3	-3,9	BIK	BCL2-interagierendes Molekül
217963_s_at	2,2	-2,6	NGFRAP1	NGFR-assoziierte Apoptose
209995_s_at	-48,5	10,8	TCL1A	Apoptose Regulator
203795_s_at	-2,7	2,5	BCL7A	Apoptose Regulator

Zellzyklus

212912_at	2,4	4,5	RPS6KA2	Zellzyklusregulation
224428_s_at	9,7	-4,8	CDCA7	Kontaktunabhängiges Zellwachstum
216176_at	2,5	-8,5	HCRP1	inhibiert Proliferation
202503_s_at	2,6	-12,0	KIAA0101	PCNA assoziierter Faktor
212560_at	-29,2	-3,8	SORL1	inhibiert Proliferation
204249_s_at	-7,0	-8,3	LMO2	moduliert Retinoblastom 1
224847_at	-5,0	-7,1	CDK6	Cyclin-abhängige Kinase 6

RNA Interaktion/Transkription

213273_at	3,7	3,8	ODZ4	interagiert mit mRNA
226425_at	3,3	-6,8	CLIP4	mRNA turnover
204207_s_at	-5,4	-10,2	RNGTT	mRNA-Capping-Enzym
203865_s_at	-18,3	-2,8	ADARB1	RNA spezifische Adenosin Deaminase
225941_at	-3,3	-2,4	EIF4E3	Translationsfaktor 4E3
218696_at	-3,5	-3,4	EIF2AK3	Translationsfaktor 2 alpha kinase (PERK)

Verschiedenes

208923_at	6,0	-2,5	CYFIP1	FMR1-interagierendes Protein
207395_at	3,4	-6,0	BTN1A1	Butyrophilin, assoziiert mit Muttermilch
221253_s_at	-3,7	-7,4	MUTED	Genese von Lysosom-ähnlichen Organellen
225673_at	-2,9	-3,3	MYADM	Myeloider Differenzierungsmarker

A5 Auflistung und Beschreibung von 155 Zielgenen von NFAT, die ein differentielles Expressionsmuster in PB B-Zell-Populationen aufweisen (Abb. 11)

<i>probe set</i>	Gen-Symbol	Beschreibung
205207_at	IL6	Interleukin 6 (Interferon Beta 2)
203761_at	SLA	Src-like Adaptor
223287_s_at	FOXP1	Forkhead-box Protein 1 (Quieszenz)
201170_s_at	BHLHB2	Transkriptionsfaktor
229103_at	WNT3	Wnt-Signaltransduktion
226267_at	JDP2	AP1-Transkription Regulator
207630_s_at	CREM	cAMP-Signaltransduktion
228046_at	ZNF827	Transkriptionsfaktor
223068_at	EML4	Zytoskelett assoziierter Faktor
221012_s_at	TRIM8	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor
215925_s_at	CD72	BCR-Inhibition, reguliert XBP1 (Differenzierung)
204165_at	WASF1	Regulator für Actin Polymerisierung
204591_at	CHL1	Zelladhäsion
209185_s_at	IRS2	Insulin Rezeptor Substrat
203140_at	BCL6	GC-Transkriptionsfaktor
202761_s_at	SYNE2	Nukleäres Gerüstprotein
209360_s_at	RUNX1	Runt-ähnlicher Transkriptionsfaktor
207574_s_at	GADD45B	Zellzyklus Regulator
223916_s_at	BCOR	Bcl6 Korepressor
202364_at	MXI1	Reguliert Myc, Tumorsuppressor
205297_s_at	CD79B	BCR-Signaltransduktion
204103_at	CCL4	Chemokinligand 4
226111_s_at	ZNF385A	Transkriptionsfaktor
219312_s_at	ZBTB10	Transkriptionsfaktor
214157_at	GNAS	G-Protein Signaltransduktion
211965_at	ZFP36L1	Transkriptionsfaktor
225915_at	CAB39L	Kalzium Signaltransduktion
210347_s_at	BCL11A	B Zell-Lymphom (CLL) 11A
211105_s_at	NFATC1	NFAT (zytoplasmatisch, Kalzium abhängig)
228003_at	RAB30	Signaltransduktion

219132_at	PELI2	Signaltransduktion (Traf 6)
203735_x_at	PPFIBP1	Liprin beta 1
227597_at	DIS3L2	Zellzyklus Regulator
216734_s_at	CXCR5	Chemokinrezeptor 5
203026_at	ZBTB5	Transkriptionsfaktor
205259_at	NR3C2	Nukleärer Rezeptor
228208_x_at	ZNF354C	Transkriptionsfaktor
202123_s_at	ABL1	Rezeptor Tyrosin Kinase
203708_at	PDE4B	Phosphodiesterase 4B
200783_s_at	STMN1	Stathmin1
200920_s_at	BTG1	B-Zell Translokationsgen 1
1553685_s_at	SP1	Transkriptionsfaktor
219123_at	ZNF232	Transkriptionsfaktor
212774_at	ZNF238	Transkriptionsfaktor
221579_s_at	NUDT3	Nudix -Motif 3
218785_s_at	RABL5	Signaltransduktion
207980_s_at	CITED2	Zellzyklus Regulator
212261_at	GIGYF2	Signaltransduktion
202688_at	TNFSF10	TRAIL-Rezeptor (Apo2-Ligand)
206649_s_at	TFE3	Transkriptionsfaktor bindet IgM-Enhancer
209507_at	RPA3	DNA-Replikation
232981_s_at	AP1GBP1	AP1-Transkription Regulator
210582_s_at	LIMK2	LIM-Domäne enthaltende Kinase
203415_at	PDCD6	Apoptose
221757_at	PIK3IP1	Signaltransduktion
201051_at	ANP32A	Nukleäres Phosphoprotein
202883_s_at	PPP2R1B	Protein Phosphatase 2
226157_at	TFDP2	Transkriptionsfaktor (E2F Dimerisierung)
205027_s_at	MAP3K8	Signaltransduktion
242794_at	MAML3	Mastermind 3
1567628_at	CD74	MHCII unveränderliche Kette
221873_at	ZNF143	Transkriptionsfaktor
204562_at	IRF4	PC-Differenzierung
211671_s_at	NR3C1	Nukleärer Rezeptor
217742_s_at	WAC	Protein-Adapter
239843_at	RIT1	Signaltransduktion
209110_s_at	RGL2	Signaltransduktion
208407_s_at	CTNND1	Catenin deltaD1
225283_at	ARRDC4	enthält Arrestin-Domäne
212195_at	IL6ST	IL6-Signaltransduktion
221059_s_at	COTL1	Koaktosin-ähnlich
215092_s_at	NFAT5	Muskeltonus-abhängiger NFAT
223082_at	SH3KBP1	Signaltransduktion
202680_at	GTF2E2	Transkriptionsfaktor
205512_s_at	AIFM1	Apoptose
203181_x_at	SRPK2	Protein Kinase
205414_s_at	RICH2	Signaltransduktion
203753_at	TCF4	Transkriptionsfaktor
213793_s_at	HOMER1	NFAT-Signaltransduktion
212860_at	ZDHHC18	Transkriptionsfaktor
225947_at	MYO19	Myosin 19
200863_s_at	RAB11A	Signaltransduktion
203508_at	TNFRSF1B	CD120b (Tumornekrosefaktor Rezeptor)
202978_s_at	CREBZF	CREB Transkriptionsfaktor
218751_s_at	FBXW7	Proteininteraktion
203749_s_at	RARA	Retinolsäure-Rezeptor
212798_s_at	ANKMY2	enthält Ankyrin-Domäne
208617_s_at	PTP4A2	Protein Tyrosin Phosphatase
208749_x_at	FLOT1	Flottilin 1
201426_s_at	VIM	intermediäres Filament
209563_x_at	CALM1	Calmodulin 1
212687_at	LIMS1	Zellseneszenz

222409_at	CORO1C	Aktin bindendes Protein
227983_at	RILPL2	Signaltransduktion
214004_s_at	VGLL4	Vestigial ähnliches Protein 4
1553645_at	CCDC141	enthält coiled-coil-Domäne
238622_at	RAP2B	Signaltransduktion
218645_at	ZNF277	Transkriptionsfaktor
212124_at	ZMIZ1	Transkriptionsfaktor
212930_at	ATP2B1	Kalziumtransport (ATPase)
209286_at	CDC42EP3	Zellzyklus Regulator
225173_at	ARHGAP18	Signaltransduktion
209205_s_at	LMO4	enthält LIM-Domäne
207121_s_at	MAPK6	Signaltransduktion
216248_s_at	NR4A2	Nukleärer Rezeptor
219930_at	KLF8	Krüppel-like Faktor (Quieszenz)
204655_at	CCL5	Chemokin-Ligand 5
203725_at	GADD45A	Zellzyklus/ DNA-Reparatur
202284_s_at	CDKN1A	CDK-Inhibitor
212135_s_at	ATP2B4	Kalziumtransport (ATPase)
221496_s_at	TOB2	Signaltransduktion
244062_at	DAAM1	WNT-Signaltransduktion
202388_at	RGS2	Signaltransduktion
205249_at	EGR2	Wachstumsfaktor-Signaltransduktion
207901_at	IL12B	Interleukin 12B
209031_at	CADM1	Zelladhäsion
217963_s_at	NGFRAP1	Tumornekrosefaktor Rezeptor
230563_at	RASGEF1A	Signaltransduktion
200872_at	S100A10	Kalzium-Signaltransduktion
226003_at	KIF21A	Kinesin 21 A
203373_at	SOCS2	Zytokin-Signaltransduktion
200696_s_at	GSN	Depolymerisiert Aktin
228964_at	PRDM1	PC-Differenzierung
205686_s_at	CD86	BCR-Kostimulation
206167_s_at	ARHGAP6	Signaltransduktion
202890_at	MAP7	Zytoskelett-assoziiert
201105_at	LGALS1	Lektin 1 (löslich)
210426_x_at	RORA	Retinolsäure-Rezeptor ähnlich
210284_s_at	MAP3K7IP2	Signaltransduktion
213227_at	PGRMC2	Hormonrezeptor Komponente
1555247_a_at	RAPGEF6	Signaltransduktion
211960_s_at	RAB7A	Signaltransduktion
223894_s_at	AKTIP	AKT-interagierendes Protein
222846_at	RAB8B	Signaltransduktion
218181_s_at	MAP4K4	Signaltransduktion
201502_s_at	NFKBIA	NF kappa B Inhibitor
224027_at	CCL28	Chemokinligand 28
208986_at	TCF12	Transkriptionsfaktor
202293_at	STAG1	Stroma-Antigen 1
202479_s_at	TRIB2	Tribbles-Homolog 2
222572_at	PPM2C	Protein Phosphatase 2C
209200_at	MEF2C	Myozyten stimulierender Faktor 2C
210786_s_at	FLI1	Friend Leukämie Virus Integration 1
211323_s_at	ITPR1	SOCR Rezeptor
236442_at	DPF3	Transkriptionsfaktor
204334_at	KLF7	Quieszenz-Faktor
219301_s_at	CNTNAP2	Kontaktin-assoziiertes Protein
224848_at	CDK6	Zyklus abhängige Kinase 6
204249_s_at	LMO2	Rhombotin ähnliche LIM-Domäne
211597_s_at	HOPX	HOP Homöobox
224303_x_at	NIN	Ninein
226025_at	ANKRD28	enthält Ankyrin-Domäne
222590_s_at	NLK	Nemo-ähnliche Kinase
229414_at	PITPNC1	Signaltransduktion

214582_at PDE3B Phosphodiesterase 3B

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Ralf Küppers für seine hervorragende Betreuung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine große Geduld.

Auch Kerstin Heise möchte ich herzlich danken für ihre herausragende Unterstützung meiner Arbeit und eine freundschaftliche Zusammenarbeit.

Auch Klaus Lennartz bin ich für seine Unterweisung im Gebrauch eines Zellsortierers, eine freundschaftliche Zusammenarbeit und nicht zuletzt wertvolle Lektionen in organischer Chemie sehr verbunden.

Danken möchte ich ebenso Enrico Tiacchi für seine Anleitung in der Auswertung von Genexpressionsprofilen und Roland Schmitz und Ludger Sellmann für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern der AG Küppers für eine herzliche und abwechslungsreiche Arbeitsatmosphäre danken. Wie werde ich Euch vermissen!

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem Karla, für ihre Ermutigung, ihren Beistand und den Rückhalt den sie mir gegeben hat.

Lebenslauf

Name	Marc Seifert
Akademischer Grad	Dipl. Biol.
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Adresse	Ernastraße 1 45130 Essen
Geburtsdatum	01. August 1978 in Bergisch-Gladbach
Nationalität	deutsch
Ausbildung:	
1985 – 1989	Grundschule Echtz
1989 – 1998	Gymnasium am Wirteltor, Düren
1998 – 1999	Zivildienst (Malteser Hilfsdienst)
1999	Praktikum am Max-Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln
1999 – 2004	Biologiestudium an der Universität Köln
2004	Diplom in Biologie (Gesamtnote: sehr gut)
seit 2004	Doktorand am Institut für Zellbiologie, Abteilung Molekulare Genetik, Prof. R. Küppers, Universitätsklinikum Essen

Essen, den _____

Marc Seifert

Einige der in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationspartnern erzielt. Hierauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an entsprechender Stelle hingewiesen.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Marc Seifert

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. Nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Molekulare Analyse von humanen Gedächtnis-B-Zell-Populationen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Marc Seifert befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds
der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Marc Seifert