

DNA-Instabilität in den Immunglobulinloci des Mantelzell-Lymphoms

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefanie Liedtke

aus Moers

Februar 2006

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. Müschen

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2006

1	Einleitung	1
1.1	B-Zellen, ein wichtiger Bestandteil der humoralen Immunantwort.....	1
1.1.1	Reifungsprozesse im Knochenmark	2
1.1.1.1	Aufbau von Antikörpern (Immunglobulinen)	2
1.1.1.2	V(D)J-Rekombination	4
1.1.2	Reifungsprozesse im Keimzentrum.....	7
1.1.2.1	Somatische Hypermutation	8
1.1.2.2	Immunglobulin-Klassenwechsel	10
1.2	Rezeptorselektion	13
1.2.1	Rezeptor-Editing.....	13
1.2.2	Rezeptor-Revision	14
1.3	Entstehung von malignen Lymphomen.....	15
1.3.1	Das Mantelzell-Lymphom.....	16
1.4	Ziele dieser Arbeit	18
2	Material & Methoden.....	19
2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> über Hitzeschock	19
2.2	Isolation von Nukleinsäuren.....	19
2.2.1	DNA-Isolation	19
2.2.2	RNA-Isolation	20
2.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	20
2.3.1	Agarosegele	20
2.4	Subklonierung von PCR-Produkten (TOPO-Reaktion)	21
2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.5.1	Standard-PCR-Reaktion	22
2.5.2	Kolonie-PCR-Reaktion.....	22
2.5.3	RT-PCR	23
2.6	Sequenzierungen.....	24
2.6.1	Aufreinigung über Ethanolpräzipitation.....	24
2.6.2	Aufreinigung von Kolonie PCR-Produkten	24
2.6.3	Sequenzreaktion	25
2.6.4	Aufreinigung der Sequenzreaktion.....	25

2.7 Herstellung von Proteinlysaten.....	26
2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford).....	27
2.9 Western Blot.....	27
2.9.1 Präparation der Proben	27
2.9.2 Gelelektrophorese.....	28
2.9.3 Transfer der Proteine	28
2.9.4 Immundetektion der Proteine	29
2.10 In-vitro-Kultur von Zelllinien.....	30
2.10.1 Langzeitexperiment (Anti- κ Behandlung von Jeko-1 Zellen).....	30
2.11 FACS-Analyse.....	31
2.12 Herstellung eines SAGE-Genexpressionsprofils.....	32
2.12.1 Isolierung der Gesamt-RNA und Bindung an Magnetpartikel.....	34
2.12.2 Herstellung doppelsträngiger cDNA	34
2.12.3 Endonukleolytische Spaltung mit <i>NlaIII</i>	35
2.12.4 Adapterligation	36
2.12.5 Endonukleolytische Spaltung mit <i>BsmFI</i>	36
2.12.6 Herstellung von Ditags über Ligation	37
2.12.7 Amplifikation der Ditags über PCR	38
2.12.8 Endonukleolytische Spaltung mit <i>NlaIII</i> und Gelaufreinigung der Ditags.....	39
2.12.9 Ligation der Ditags zu Konkatemeren und Gelaufreinigung der Konkatemere.....	40
2.12.10 Klonierung der Konkatemere in den pZero®-1 Vektor.	41
2.13 Computer und Internet.....	42
2.13.1 Computersoftware	42
2.13.2 Internetprogramme und Websites.....	42

3	Ergebnisse	43
3.1	Charakterisierung von Mantelzell-Lymphomen.....	46
3.1.1	<i>IGH</i> -, <i>IGK</i> - und <i>IGL</i> -Rearrangements der untersuchten MCL-Fälle	49
3.2	Immunglobulin-Klassenwechsel in Mantelzell-Lymphomen	49
3.2.1	Immunglobulin-Klassenwechsel in den klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53	53
3.3	Somatische Hypermutation in Mantelzell-Lymphomen.....	55
3.3.1	Nachweis von fortlaufender somatischer Hypermutation durch Erstellung eines Stammbaums.....	60
3.4	AID und BCL6 Analyse	63
3.5	Rezeptor-Editing in Mantelzell-Lymphomen.....	66
3.5.1	Intraklonale Diversität der Leichtketten in der Jeko-1 Zelllinie.....	66
3.5.1.1	Sekundäre Rekombination der Leichtketten in der Jeko-1 Zelllinie	66
3.5.1.2	Reaktion der Jeko-1 Zelllinie auf einen autoreaktiven Reiz.....	68
3.5.2	Nachweis von sekundären Rekombinationsereignissen in primären Mantelzell-Lymphomfällen.....	71
3.5.2.1	V_H -Replacement	71
3.5.2.2	V_λ -Replacement.....	74
3.5.2.3	J_λ -Replacement.....	80
3.5.2.4	Duplikationen und Deletionen in Immunglobulingegen des Mantelzell-Lymphoms	84
3.6	Differentielle Expression von DNA-Reparaturgenen in Mantelzell- Lymphomen.....	86

4	Diskussion	91
4.1	Analyse der Immunglobulinsequenzen von Mantelzell-Lymphomen hinsichtlich Keimzentrums-spezifischer Prozesse.....	91
	4.1.1 Einige Mantelzell-Lymphome besitzen mutierte V _H -Gene und Hinweise für fortlaufende somatische Hypermutation	91
	4.1.2 Mantelzell-Lymphome machen Immunglobulin-Klassenwechsel.....	93
	4.1.3 AID- und BCL6-Expression ist in einigen Mantelzell-Lymphomen nachweisbar.....	94
4.2	Hochregulation von DNA-Reparaturgenen in Mantelzell-Lymphomen	96
4.3	Besitzen Mantelzell-Lymphomzellen autoreaktive Spezifitäten?	98
4.4	Gibt es eine neue Art des Rezeptor-Editings in Mantelzell-Lymphomen?	102
	4.4.1 V _λ -Replacement	102
	4.4.2 J _λ -Replacement	103
5	Zusammenfassung.....	107
6	Literaturverzeichnis.....	108
	Abkürzungsverzeichnis	125
	Anhang	128
	Danksagungen	136

1 Einleitung

1.1 B-Zellen, ein wichtiger Bestandteil der humoralen Immunantwort

Das Immunsystem des Menschen spielt eine große Rolle bei der Abwehr von pathogenen Faktoren. Man unterscheidet dabei zwei grundlegende Mechanismen der Abwehr: die angeborene und die adaptive Immunität. Infolge einer Infektion erfolgt zunächst die zelluläre Abwehr des angeborenen Immunsystems. Dazu gehören neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, die über Phagozytose Pathogene eliminieren. Die Monozyten und Makrophagen wiederum sind in der Lage, über Zytokine die Aktivierung des adaptiven Immunsystems einzuleiten (Delves und Roitt, 2000; 1st Part). Die adaptive Immunabwehr, die vor allem durch die B-, und T-Lymphozyten vermittelt wird, reagiert spezifisch und selektiv. Ziel der B-Zellen ist es, mit Unterstützung der T-Zellen eine größtmögliche Vielfalt an verschiedenen Antikörpern hervorzubringen, wobei jedes Molekül ein anderes Fremdanigen erkennt. Um diese Vielfalt zu erlangen, vollziehen sich während der B-Zell-Entwicklung verschiedene koordinierte Prozesse, die zur Diversifizierung von Antikörpern beitragen und festgelegten Stadien zuzuordnen sind. Auf die Entwicklung der B-Zellen und die begleitenden, stadienspezifischen Prozesse soll im Folgenden eingegangen werden.

1.1.1 Reifungsprozesse im Knochenmark

Die hämatopoetische Stammzelle ist der Ursprung aller am Immunsystem beteiligten Zellarten (Busslinger *et al.*, 2000). Daraus entwickeln sich im Wesentlichen zwei Linien: Die lymphoide Linie, der die T-Zellen, B-Zellen und die natürlichen Killerzellen angehören und die myeloide Linie, aus der Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen hervorgehen. Ausgehend von einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle (CLP, engl.: *common lymphoid progenitor*) trennt sich der Differenzierungsweg der B-Zelle von der T-Zell Linie (Pui *et al.*, 1999). Die B-Zellen sind grundlegend für die humorale Immunantwort, da sie nach ihrer Aktivierung mit Unterstützung der T-Zellen eine große Anzahl an Antikörpern bilden, die das spezifische Fremdantigen erkennen.

1.1.1.1 Aufbau von Antikörpern (Immunglobulinen)

Antikörper, die auf der Oberfläche von B-Zellen präsentiert werden, bezeichnet man in membranständiger Form als B-Zell-Rezeptor (BCR, engl.: *B cell receptor*). Im ausdifferenzierten Stadium der Plasmazelle wird eine sezernierte Form gebildet. Der Aufbau unterscheidet sich allerdings nur im carboxyterminalen Bereich, da der sezernierten Form im Vergleich zur membrangebundenen Form eine hydrophobe Sequenz fehlt, die der Verankerung in der Zellmembran dient (Delves und Roitt, 2000; 1st Part). Antikörper, oder auch Immunglobuline genannt, bestehen aus einem aminoterminalen variablen und einem carboxyterminalen konstanten Bereich, der sich proteolytisch in ein F_c (engl.: *fragment crystallizable*) Fragment und zwei F_{ab} (engl.: *fragment antigen binding*) Fragmente spalten lässt (Janeway und Travers, 1997). Jeder Antikörper besitzt eine schwere und eine leichte Polypeptidkette, die jeweils in doppelter Ausführung vorkommen (vgl. Abb. 1).

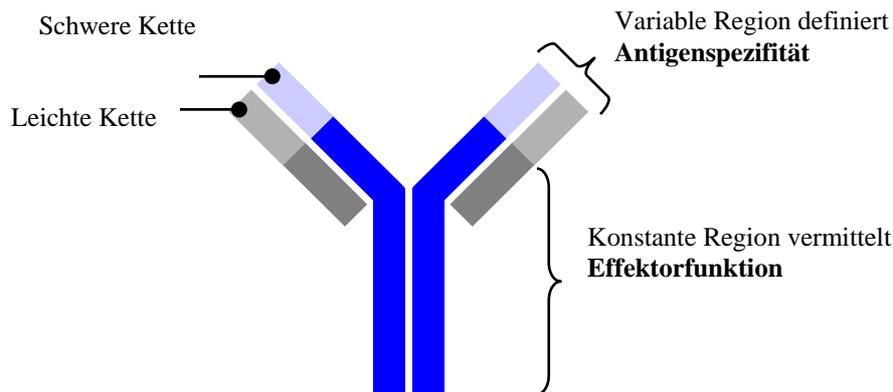


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Antikörpers. Jede der zwei schweren Ketten (blau) ist mit einer leichten Kette (grau) assoziiert. Die heller dargestellten Bereiche sind die variablen Regionen des Antikörpers, die den Kontakt zum Antigen vermitteln.

Über Disulfidbrückenbindungen werden je eine schwere und eine leichte Kette, ebenso wie die beiden schweren Ketten miteinander verbunden. Jede schwere und jede leichte Kette besteht aus einem variablen und einem konstantem Bereich. Der variable Teil setzt sich bei den schweren Ketten aus V(engl.: *variable*)-, D(engl.: *diversity*)- und J(engl.: *joining*)-Gensegmenten und bei den leichten Ketten, die entweder der κ -oder der λ -Klasse angehören können, nur aus V- und J-Gensegmenten zusammen. Innerhalb des variablen Bereichs liegen drei Komplementaritäts-bestimmende Regionen (CDR, engl.: *complementarity determining region*), die den antigenbindenden Teil des Antikörpers ausmachen. Zur Stabilisierung dienen die vor und zwischen den CDR-Regionen liegenden Gerüstregionen (FR, engl.: *framework regions*) (Janeway und Travers, 1997).

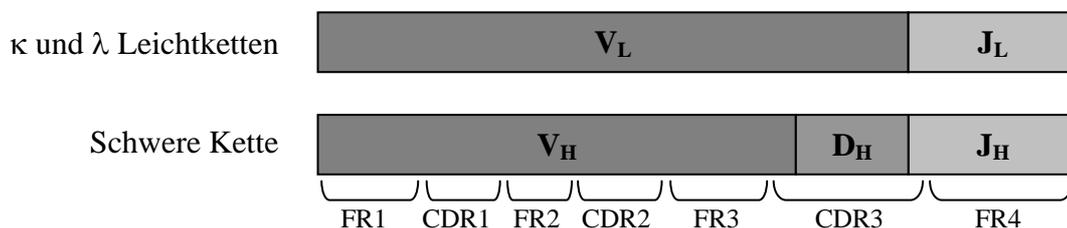


Abb. 2: Schematische Darstellung des variablen Teils von Antikörpern. Segmentaler Aufbau des variablen Teils der Leichtketten (VJ) und der schweren Kette (V(D)J). Ebenso wird die ungefähre Lage der Gerüstregionen (FR) und der Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (CDR) angegeben.

Der konstante Bereich wird durch die C-Domänen gebildet und vermittelt die Effektorfunktion des Antikörpers. Um die korrekte Bildung des Antikörpers zu gewährleisten, müssen zunächst alle am Aufbau beteiligten Gensegmente aneinandergesetzt werden. Dies geschieht über den Mechanismus der sogenannten V(D)J-Rekombination.

1.1.1.2 V(D)J-Rekombination

Bei der V(D)J-Rekombination werden die verschiedenen Gensegmente, die zur Bildung eines funktionellen Antikörpers nötig sind, zufällig über ein sequenzabhängiges Rekombinationsereignis miteinander kombiniert. Die Rekombination vollzieht sich in aufeinanderfolgenden Schritten während der frühen B-Zell-Entwicklung in hämatopoetischen Geweben, vor allem in der fötalen Leber und im Knochenmark von Erwachsenen (Tonegawa, 1983). Zu Beginn erfolgt die Umlagerung der schweren Kette (*IGH*-Lokus), wobei im pro-B-Zellstadium ein D-Segment an ein J-Segment angelagert wird und erst im prä-B-Zellstadium das fehlende V-Segment an das bestehende DJ angefügt wird (Schatz *et al.*, 1992). Es folgt die Expression einer funktionellen schweren Kette des IgM-Isotyps. Die primär gebildete μ -Kette assoziiert zunächst mit den Ersatzleichtketten V_{preB} und $\lambda 5$ (engl.: *surrogate light chains*) und mit den Transmembranproteinen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ und wird als prä-B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche der prä-B-Zelle präsentiert (Melchers *et al.*, 1995). Der prä-B-Zell-Rezeptor stimuliert die weitere B-Zellproliferation bis seine Expression zugunsten der Leichtkettenrekombination herunterreguliert wird. Es entsteht schließlich ein funktioneller B-Zell-Rezeptor, der aus individuellen schweren und leichten Ketten besteht, und durch die Signalketten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ und dem Korezeptorkomplex (CD19, CD21 und CD81) komplettiert wird (Bradbury *et al.*, 1992).

Allein aufgrund der Anzahl der verschiedenen Gensegmente, die zur Bildung des B-Zell-Rezeptors verfügbar sind (44 potentiell funktionelle V_H -, 27 D_H - und 6 J_H -Segmente (Matsuda *et al.*, 1998)), trägt der Prozess der V(D)J-Rekombination zur ersten grundlegenden Diversifizierung des Antikörperrepertoires durch rekombinatorische Vielfalt bei.

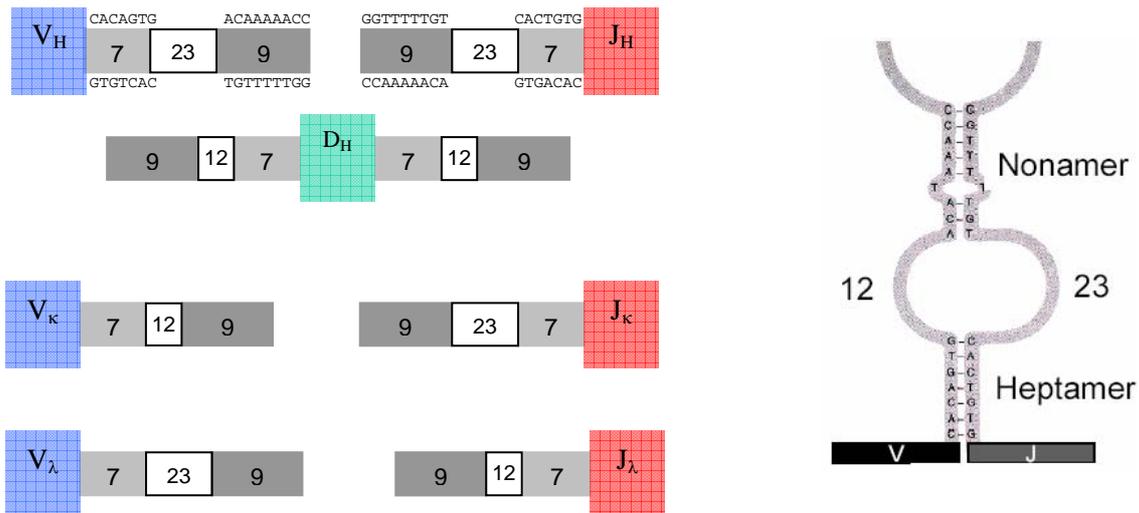


Abb. 3: V(D)J-Rekombination. A) Schematischer Aufbau der RSS-Bereiche. B) *Hairpin* Sekundärstruktur (entnommen aus Janeway und Travers, 1997).

Jedes Gensegment wird von sogenannten RSS-Bereichen (engl.: *recombination signal sequence*) flankiert, die für eine gerichtete Rekombination unerlässlich sind. Jeder RSS-Bereich besteht aus einem konserviertem Heptamer (CACAGTG) und einem Nonamer (ACAAAAACC) Motiv, die durch einen nicht konservierten Nukleotidbereich (*Spacer*) von entweder 12 oder 23 Basenpaar Länge voneinander getrennt sind (vgl. Abb. 3A). Ein Rekombinationsereignis zweier Gensegmente findet nur statt, wenn diese von RSS-Bereichen flankiert werden, die einen unterschiedlich langen *Spacer* besitzen. Dieses Phänomen ist bekannt als sogenannte 12/23er Regel (Sawchuk *et al.*, 1997). Diese Regel verhindert eine Rekombination zweier gleichartiger Gensegmente und gewährleistet dadurch die Bildung eines B-Zell-Rezeptors, der alle notwendigen Gensegmente enthält. Aufgrund der Sequenzhomologie innerhalb der RSS-Bereiche zweier zu rearrangierender Gensegmente bildet sich eine Sekundärstruktur (engl.: *hairpin loop*) aus (vgl. Abb. 3B), die als Erkennungssequenz für spezifische Rekombinasen dient. Das spezifische Schneiden der DNA zu Beginn eines Rekombinationsereignisses wird durch die Lymphozyten-spezifischen Rekombinasen RAG1 und RAG2 (engl.: *recombination activating genes*) vermittelt (Schatz *et al.*, 1989; Oettinger *et al.*, 1990).

Die RAG-Proteine bilden einen heterodimeren Komplex, der an die RSS-Bereiche bindet und zunächst einen DNA-Einzelstrangbruch am 5'-Ende des Heptamers einfügt, wobei eine freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende des flankierenden Segmentes freigesetzt wird (van Gent *et al.*, 1995; McBlane *et al.*, 1995). Diese freie Hydroxylgruppe verbindet sich anschließend mit dem Phosphatrückgrat der DNA des anderen Gensegmentes über eine direkte Transesterreaktion (van Gent *et al.*, 1996). Es entstehen zwei Arten von DNA-Enden: Die Signalenden (engl.: *blunt signal ends*) und kovalent gebundene kodierende Enden (engl.: *coding ends*). Der heterodimere RAG-Komplex bleibt solange mit diesen Enden in Form eines „*post cleavage*“ Komplexes assoziiert, und die letztendliche Verknüpfung wird durch die Proteine (Ku70, Ku80, DNA-PK, XRCC4, DNA-Ligase IV und Artemis) der NHEJ (engl.: *non homologous end joining*)-Maschinerie vermittelt (Repasky *et al.*, 2004). Die Verbindungsstelle der Gensegmente wird als „*junction*“ bezeichnet. Eine zusätzliche Diversifizierung dieser Verbindungsstelle während der V(D)J-Rekombination wird durch die Terminale deoxynucleotidyl Transferase TdT erlangt. TdT ist eine *template*-unabhängige DNA-Polymerase, die *nontemplate*-Nukleotide an das 3'-Hydroxylende der kodierenden Enden (engl.: *coding ends*) anfügt (N-Nukleotid Addition). Ebenso wird der TdT-Polymerase eine Endonukleaseaktivität zugeschrieben, die zu Verlust von Nukleotiden führen kann (Thai und Kearney, 2005). Eine weitere Modifizierung der Verbindungsstelle erfolgt durch die sogenannte P-Nukleotid Addition. Durch einen asymmetrischen endonukleolytischen Schnitt der kodierenden Enden (engl.: *coding ends*) entstehen kurze komplementäre DNA-Überhänge, die dann in die Verbindungsstelle inkorporiert werden können (Gauss und Lieber, 1996; Roth *et al.*, 1992). Durch N- und P-Additionen innerhalb der Verbindungsstelle der Gensegmente wird eine noch höhere Vielfalt der Immunglobuline erreicht, was auch als junktionale Diversität bezeichnet wird (Kehoe und Seide, 1982). Somit besitzt eine während der V(D)J-Rekombination entstandene Verbindungsstelle ein individuelles Aussehen und ist einzigartig für jeden Antikörper. Diese Einzigartigkeit kann als Klonalitätsnachweis dienen.

Ist es gelungen, einen funktionellen Antikörper zu bilden, wird dieser auf der Zelloberfläche als B-Zell-Rezeptor exprimiert und dient dort dem weiteren „*survival signaling*“. Erkennt der präsentierte B-Zell-Rezeptor jedoch körpereigene Antigene, ist es notwendig, diesen Antikörper aufgrund seiner Autoreaktivität zu eliminieren. Zu diesem Zwecke findet in einem solchen Fall das sogenannte Rezeptor-Editing statt (vgl. 1.2.1).

1.1.2 Reifungsprozesse im Keimzentrum

Nachdem eine naive B-Zelle aktiviert wurde, bildet sich innerhalb des primären Follikels ein Keimzentrum aus, das ein Mikromilieu bietet, in dem alle nötigen Faktoren für die weitere B-Zell-Entwicklung dargeboten werden (Delves und Roitt, 2000; 2nd Part). Ein wichtiger Faktor für die Keimzentrumsreaktion ist der ausschließlich in Keimzentrums B-Zellen exprimierte transkriptionelle Repressor BCL6. Durch BCL6 werden Gene reprimiert, die an der Aktivierung und Proliferation von B-Zellen sowie der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Shaffer *et al.*, 2000). Knock out Mausstudien haben gezeigt, dass BCL6 für die Bildung von Keimzentren und T-Zell-abhängigen Antigenantworten notwendig ist (Ye *et al.*, 1997). Eine Überexpression von BCL6 blockiert die Plasmazell Differenzierung durch Verzögerung der S-Phase des Zellzyklus (Albagli *et al.*, 1999). Wenn die BCL6-vermittelte Repression des Plasmazell-spezifischen Gens Blimp-1 runterreguliert wird, können die ausdifferenzierten Plasmazellen die Keimzentren verlassen (Melnick, 2005; Calame *et al.*, 2003).

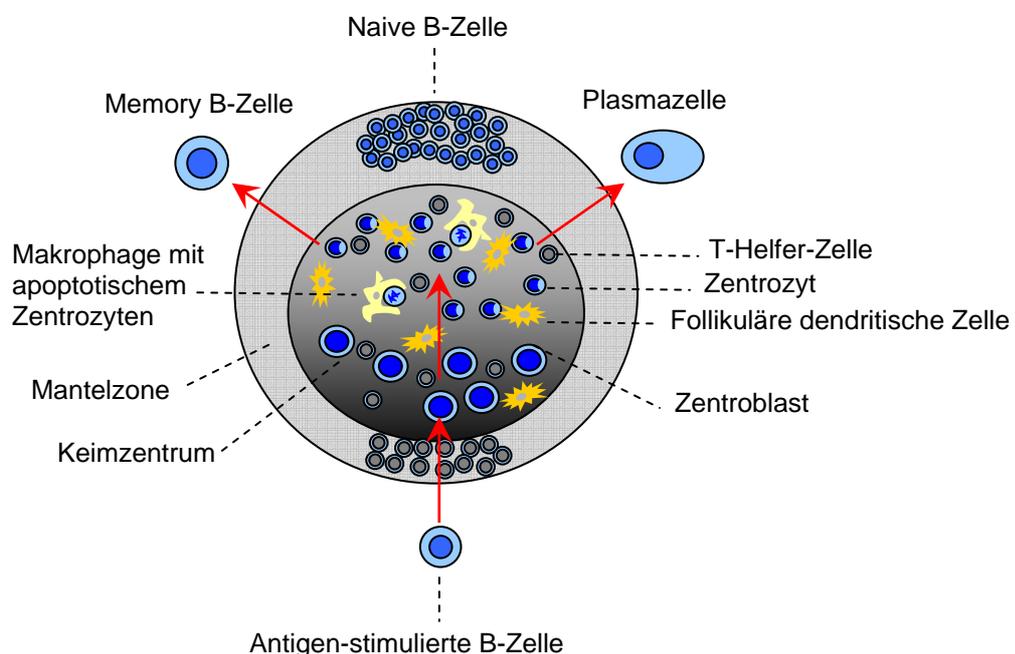


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines sekundären Follikels. Das von der Mantelzone umgebene Keimzentrum besitzt eine dunkle und eine helle Zone. Die dunkle Zone enthält vor allem die stark proliferierenden Zentroblasten. In der hellen Zone befinden sich vorrangig Zentrozyten. Innerhalb der Keimzentren findet mit Unterstützung der follikulären dendritischen Zellen und den T-Helfer-Zellen die positive Selektion der hochaffinen B-Zell-Rezeptoren statt.

Die Keimzentren innerhalb der sekundären lymphoiden Follikel (siehe Abb. 4) sind Ort der klonalen Expansion und Selektion der B-Zellen (Kelsoe, 1995). In den Keimzentren findet nach der Aktivierung einer naiven B-Zelle die sogenannte Affinitätsreifung der Antikörper statt. Die im Keimzentrum proliferierende B-Zelle entwickelt sich zunächst zum Zentroblasten, der Zelle mit der höchsten Proliferationsaktivität im Menschen (MacLennan *et al.*, 1992). Aus den Zentroblasten gehen die Zentrozyten vor, die sich in der hellen Zone des Keimzentrums befinden. Durch den Kontakt mit follikulären dendritischen Zellen, die Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren (Humphrey *et al.*, 1984), kann der Zentrozyt mit seinem Antikörper binden und so positiv selektioniert werden (Rajewsky, 1996). Nur B-Zellen, die einen funktionellen Antikörper auf ihrer Oberfläche präsentieren erhalten Überlebenssignale, wohingegen abnormale Zellen über Apoptose (negative Selektion) eliminiert werden (Guzman-Rojas *et al.*, 2002). Positiv selektionierte B-Zellen expandieren klonal (Küppers *et al.*, 1993) und differenzieren sich anschließend zu den Antikörpersezernierenden Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen aus (Liu und Banchereau, 1997).

1.1.2.1 Somatische Hypermutation

Für die in den Keimzentren der sekundären Follikeln stattfindende Affinitätsreifung spielt die somatische Hypermutation (SHM, engl.: *somatic hypermutation*) eine elementare Rolle.

Über den Prozess der somatischen Hypermutation werden vorrangig Punktmutationen in die variablen Bereiche der Immunglobulingene mit einer Rate von 10^{-3} - 10^{-4} pro Basenpaar und Generation eingefügt (McKean *et al.*, 1984; Allen *et al.*, 1987; Berek *et al.*, 1991). In einigen Fällen treten Deletionen oder Duplikationen auf, die diesem Prozess zuzuschreiben sind (Goossens *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998). Als weiteres Beiprodukt der somatischen Hypermutation werden auch größere genetische Aberrationen vermutet, die in seltenen Fällen ein Hybrid $V_H D_H J_H$ -Rearrangement hervorbringen können, und an V_H -Replacement erinnern (Bemark und Neuberger, 2003).

Durch das Einfügen von Mutationen in die variablen Regionen der schweren und der leichten Ketten sollen hochaffine Antikörper gebildet werden, die dann die weitere Affinitätsreifung durchlaufen. Die molekulare Basis der somatischen Hypermutation ist zum größten Teil noch unbekannt. Dennoch ist klar, dass das RNA-editierende Protein AID (engl.: *activation induced cytidine deaminase*) eine wichtige Rolle spielt. AID wurde 1999 von der Gruppe von T. Honjo in Japan entdeckt (Muramatsu *et al.*, 2000; Revy *et al.*, 2000). Es ist verwandt mit APOBEC-1 dem Prototyp eines RNA-editierenden Enzyms, und es wird vermutet, dass AID und APOBEC-1 durch Genduplikation entstanden sind, da sie als Tandem unmittelbar hintereinander auf dem Chromosom 12 kodiert sind (Teng *et al.*, 1993; Espinosa *et al.*, 1994 und Muto *et al.*, 2000). Die Expression von AID findet man ausschließlich in den Keimzentren der sekundären Follikel, wobei eine Korrelation zwischen der CD40L und IL4 Induktion (Imitation der T-Zell-Hilfe) und der Expression von AID besteht (Greeve *et al.*, 2003). Während der ersten Phase der somatischen Hypermutation deaminiert AID ein Cytidin zu einem Uracil. Dadurch entsteht an dieser Position eine G:U Fehlpaarung (*mismatch*). Eine darauf folgende Replikation hat dann zur Folge, dass C zu T und G zu A Transitionen entstehen: Eine Tochterzelle trägt dann das wildtypische G:C Paar, die andere Tochterzelle besitzt ein U:A Paar. Eine weitere Möglichkeit der Mutation gelingt über das Herausscheiden des Uracils durch die Uracil DNA-Glykosylase UNG. Es entsteht eine abasische Lücke, durch die während der Replikation sowohl Transitionen, als auch Transversionen entstehen. Die UNG-vermittelte abasische Lücke kann allerdings auch als Substrat für die apyrimidinische Endonuklease APE dienen, die einen Einzelstrangbruch in die DNA einfügen kann und somit eine Polymerase-vermittelte Reparatur über konventionelle Basenaustauschmechanismen erlaubt (Neuberger *et al.*, 2005). Analysen der somatischen Hypermutation zeigten, dass bevorzugte Orte (engl.: *hot spots*) für Mutationen existieren (Milstein *et al.*, 1998; Rogozin *et al.*, 2001). Die Konsensusmotive RGWY und WRCY werden bevorzugt mutiert, wobei die unterstrichenen Nukleotide die Position der Mutation angeben. Ebenso ist bekannt, dass Purine viel häufiger Ziel eines Mutationsereignisses im Vergleich zu den Pyrimidinen sind (Betz *et al.*, 1993; Pavlov *et al.*, 2002).

Das für die somatische Hypermutation unerlässliche Protein AID ist ebenso an einem Mechanismus beteiligt, der in der Lage ist, die Struktur des Antikörpers zu variieren: Immunglobulin-Klassenwechsel (CSR, engl.: *class switch recombination*).

1.1.2.2 Immunglobulin-Klassenwechsel

Antikörper lassen sich in verschiedene Klassen und Subklassen aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede in der konstanten Region der schweren Kette einteilen. Die verschiedenen Isotypen vermitteln spezifische biologische Funktionen, die für die Immunantwort auf Pathogene und die Entwicklung von Immunerkrankheiten, wie z.B. Allergien wichtig sind (Spiegelberg, 1984). Die Anzahl der verschiedenen Isotypen variiert in verschiedenen Spezies, wobei der auf Chromosom 14 liegende humane C_H-Lokus neun verschiedene Isotypen besitzt (Kirsch *et al.*, 1982).

Die nach einem primären Antigenkontakt sezernierten Antikörper sind vom IgM-Isotyp. IgM macht etwa 5-10% der Serumimmunglobuline aus und kann sowohl als Monomer (membrangebundener B-Zell-Rezeptor), als auch als Pentamer (sezernierter Antikörper) vorkommen. Wegen der pentameren Struktur mit zehn Antigenbindungsstellen, haben IgM-Antikörper eine höhere Avidität. Zu den wichtigsten Funktionen zählen die Komplementaktivierung und die Bindung an Rezeptoren sekretorischer Zellen, über die der IgM-Antikörper auch an Schleimhautoberflächen gelangen kann.

Neben IgM ist IgD die größte membrangebundene Immunglobulinklasse, welche von reifen B-Zellen exprimiert wird (Kerr *et al.*, 1992). Über alternatives Spleißen wird entweder IgM oder IgD exprimiert und mit der variablen Region der schweren Kette assoziiert. Nach einem Antigenkontakt ist es über den Prozess des Klassenwechsels möglich, andere konstante Regionen auf der Oberfläche zu exprimieren (Stavnezer, 1996).

Die monomeren Antikörper der IgG-Klasse mit den vier Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ sind die am meisten im Serum vorkommenden Antikörper (Maran *et al.*, 1994). IgG₁, IgG₃ und IgG₄ sind in der Lage die Plazenta zu passieren und erzielen dadurch einen Schutz für den Fötus. IgG₃ ist zudem auch der effektivste Aktivator des Komplementsystems und kann ebenfalls die Opsonierung vermitteln. Mit etwa gleicher Affinität bindet auch IgG₁ an den F_c Rezeptor von Phagozyten und verursacht die Opsonierung.

Die in Sekreten vorherrschende Immunglobulinklasse ist IgA (Monteiro und van de Winkel, 2003). Es kommt in den Sekreten des Bronchial-, Genital-, und Verdauungstraktes, sowie der Muttermilch, Tränen und Speichel vor und schützt dort vor Pathogenen. Das sekretorische IgA besteht im Gegensatz zum IgA des Serums aus einem Dimer, das aus einer J-Kette und einem Polypeptid besteht, das man sekretorische Komponente nennt.

IgE findet man nur in sehr geringen Konzentrationen im Serum. Es bietet vor allem eine antiparasitäre Abwehr gegen Würmer (Snow *et al.*, 1996).

Durch die Bindung an F_c-Rezeptoren von Mastzellen und die darauf folgende Quervernetzung wird u.a. Histamin freigesetzt, das eine allergische Reaktion hervorrufen kann.

Der Austausch von Immunglobulinisotypen ist ein wichtiger biologischer Aspekt der humoralen Immunantwort. Bei dem Prozess des Klassenwechsels, der sich in den Keimzentren ereignet (vgl. Abb. 5), wird die spezifische Effektorfunktion eines Antikörpers durch das Austauschen der konstanten Region erreicht.

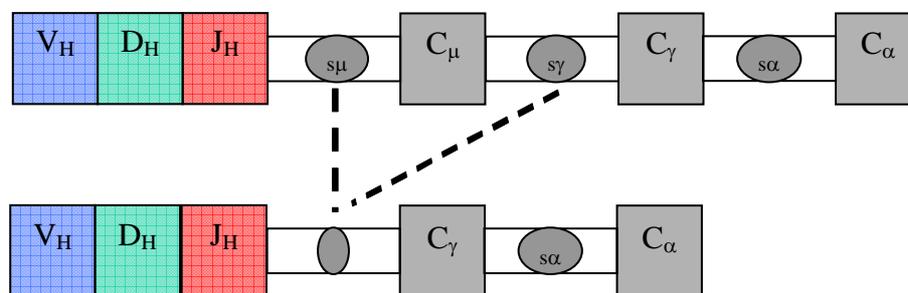


Abb. 5: Schematische Darstellung des Immunglobulin-Klassenwechsels.

Die Bildung einer schweren Kette mit einer neuen konstanten Region benötigt einen ähnlichen „*looping out*“ und Deletionsmechanismus, wie die V(D)J-Rekombination. Im Gegensatz zur sequenzabhängigen V(D)J-Rekombination ist der Rekombinationsmechanismus des Immunglobulin-Klassenwechsels Region-spezifisch und wird durch die sogenannten Switch-Regionen vermittelt, welche einige kb 5' von jedem C_H-Gen (ausser C_δ) liegen (Davis *et al.*, 1980; Dunnick *et al.*, 1980; Kataoka *et al.*, 1980; Sakano *et al.*, 1980). Diese Switch-Regionen bestehen aus einer tandemartigen Anordnung von repetitiven Einheiten, die relativ dicht in der zentralen Region liegen und in den peripheren Regionen spärlicher auftreten (Kataoka *et al.*, 1981; Nikaido *et al.*, 1981; Nikaido *et al.*, 1982). Jede Switch-Region umspannt etwa 1-9kb der intronischen DNA, die vor den C_H-Genen liegt (Nikaido *et al.*, 1982; Shimizu *et al.*, 1982; Takahashi *et al.*, 1982). Die an einem Rekombinationsprozess teilnehmenden Switch-Regionen müssen zuvor transkribiert werden (Stavnezer-Nordgren und Sirlin, 1986; Yancopoulos *et al.*, 1986; Severinson *et al.*, 1990).

Ebenso wie bei der somatischen Hypermutation ist bekannt, dass die für die Rekombination notwendigen DNA-Doppelstrangbrüche durch die Deaminase AID inseriert werden (Petersen *et al.*, 2001).

Dabei scheint AID an das Chromatin der Switch-Regionen zu binden (Nambu *et al.*, 2003) und fügt mit Hilfe der Uracil DNA-Glykosylase UNG und einer noch unbekanntem apyrimidinischen Endonuklease Einzelstrangbrüche (*nicks*) in die DNA ein (Rada *et al.*, 2002; Di Noia und Neuberger, 2002). Die Switch-Regionen enthalten viele AGCT-Wiederholungen, die dem RGYW-Motiv (dem „*hot spot*“) für AID während der somatischen Hypermutation entsprechen (Reina-San-Martin *et al.*, 2003). Die resultierenden DNA-Doppelstrangbrüche und die dazugehörigen freien Enden werden dann, ähnlich wie bei der V(D)J-Rekombination durch einen darauffolgendem „*looping out*“ und Deletionsmechanismus, intervenierende DNA-Bereiche deletiert und über NHEJ (engl.: *non homologous end joining*) repariert (Lehmann *et al.*, 1994; Honjo *et al.*, 2002). Durch dieses Rekombinationsereignis mit Beihilfe des AID Proteins und den Proteinen der NHEJ-Maschinerie erfolgt so der Austausch der konstanten Regionen eines Antikörpers und verändert so seine Effektorfunktionen.

1.2 Rezeptorselektion

1.2.1 Rezeptor-Editing

Rezeptor-Editing, klonale Deletion über Apoptose und Anergie sind die drei möglichen Mechanismen, durch die B-Zellen eine Toleranz gegenüber einem Autoantigen erreichen (Gay *et al.*, 1993; Tiegs *et al.*, 1993; Nemazee und Burki, 1989; Goodnow *et al.*, 1988). B-Zellen, die einen unvollständigen oder unfunktionellen Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen können durch die weitere Rekombination des ersten Allels, oder des zweiten Allels gerettet werden (Wilson *et al.*, 2000). Im Knochenmark kann durch ein weiteres Rekombinationsereignis ein autoreaktiver Rezeptor über den Prozess des Rezeptor-Editings verändert werden (Radic *et al.*, 1993). Die im pro-B-Zellstadium vorhandene RAG-Expression ist Voraussetzung für die V(D)J-Rekombination und wird im Falle des Rezeptor-Editings erneut induziert (Verkoczy *et al.*, 1995). Erst wenn ein funktioneller, nicht autoreaktiver B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche präsentiert wird, erfolgt ein sofortiger Stopp der V(D)J-Rekombination und die RAG-Expression wird runterreguliert. Rezeptor-Editing vollzieht sich vor allem durch Austausch einer vorhandenen leichten Immunglobulinkette, und führt zur Aufhebung einer bestehenden Autoreaktivität. Begünstigt wird dieser Austausch allein durch den Aufbau der Leichtketten Loci. Sie besitzen im Gegensatz zu der schweren Kette nur zwei Gensegmente, die aneinandergesetzt werden müssen, so dass eine schon umgelagerte Leichtkette durch ein sekundäres Rekombinationsereignis ein strangaufwärts gelegenes V-Segment und ein strangabwärts gelegenes J-Segment neu arrangieren kann. Bei der schweren Kette ist dies nicht möglich, da alle nicht rearrangierten D-Segmente im Zuge des ersten Rekombinationsereignisses deletiert wurden und somit für ein sekundäres Rekombinationsereignis nicht mehr zur Verfügung stehen. Daher findet man im Fall der schweren Kette bevorzugt den Mechanismus des sogenannten V_H -Replacement. 40 der 44 funktionellen V_H -Gensegmente besitzen kryptische Rekombinations Signal Sequenzen (cRSS, engl.: *cryptic recombination signal sequences*) im 3'-Bereich mit dem Konsensussequenz TACTGTG (Radic *et al.*, 1996). Über diese cRSS-Bereiche kann sich dann eine RAG-vermittelte Rekombination vollziehen, die zu V_H -Segmenthybriden führt. Dies ist jedoch die einzige Möglichkeit, innerhalb desselben Allels noch eine Diversifizierung der schweren Kette zu erreichen.

Es wird geschätzt, dass etwa 5% der humanen B-Zellen schwere Ketten besitzen, die durch Rezeptor-Editing entstanden sind (Zhang *et al.*, 2003).

Der Rettungsmechanismus des Rezeptor-Editing erlaubt eine bessere Überlebensrate der Zellen und trägt zur weiteren Diversifizierung des Antikörperrepertoires bei.

Nachdem die Autoreaktivität eines Antikörpers über den Mechanismus des Rezeptor-Editings behoben werden konnte, entsteht die reife naive B-Zelle, die dann in das periphere Blut gelangt und dort zirkuliert. Erst nach dem Kontakt mit einem kompatiblen Antigen wird die naive B-Zelle aktiviert und wandert in die Keimzentren der sekundären Follikel ein. Dort kann sich die sogenannte Rezeptor-Revision ereignen.

1.2.2 Rezeptor-Revision

Unter Rezeptor-Revision versteht man die erneute Umlagerung des Antikörpers in den Keimzentren. Sie stellt somit eine weitere Chance dar, ein bestehendes Rearrangement noch zu verändern. Ebenso wie beim Rezeptor-Editing vollzieht sich die Rezeptor-Revision bevorzugt an den Leichtketten, wobei auch V_H-Replacement vorkommt (Nemazee und Weigert, 2000). Im Gegensatz zum Rezeptor-Editing, was im Knochenmark stattfindet, vermutet man, dass Rezeptor-Revision in den Keimzentren nicht toleranzgetrieben sondern diversitätsgetrieben sein könnte (Hertz *et al.*, 1998; Meffre *et al.*, 1998). Die Expression des B-Zell-Rezeptors und die durch ihn vermittelten Signale sind kritisch für das Überleben der B-Zelle (Lam *et al.*, 1997). Durch die im Keimzentrum stattfindenden somatischen Mutationen kann der Rezeptor jedoch auch in seiner Bindungsfestigkeit verschlechtert werden, wodurch das zum Überleben notwendige positive Selektionssignal geblockt wird. In diesem Fall könnte die Rezeptor-Revision dazu beitragen, das Überleben dieser Zelle zu ermöglichen (Edry und Melamed, 2004).

Nach der Keimzentrumsreaktion entstehen letztendlich nur B-Zellen, die einen hochaffinen Antikörper tragen und sich bei fehlender T-Zell-Hilfe (CD40-Ligand) zu den Antikörper sekretierenden Plasmazellen und bei stattfindender T-Zell-Hilfe zu Gedächtnis B-Zellen (engl.: *memory B cells*) entwickeln (Liu und Banchereau, 1997).

1.3 Entstehung von malignen Lymphomen

Alle zuvor beschriebenen DNA-modellierenden Prozesse spielen nicht nur bei der Diversifizierung des Antikörperrepertoires eine wichtige Rolle, sondern tragen auch zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen bei, da sie von DNA-Doppelstrangbrüchen begleitet werden (Shaffer *et al.*, 2002; Vega und Medeiros, 2003). Der Nachweis von stadienspezifischen Prozessen hat sich bei der Klassifizierung von Lymphomen und Leukämien als sehr hilfreich erwiesen, um die Ursprungszelle der jeweiligen Lymphomentität zu bestimmen (vgl. Abb. 6).

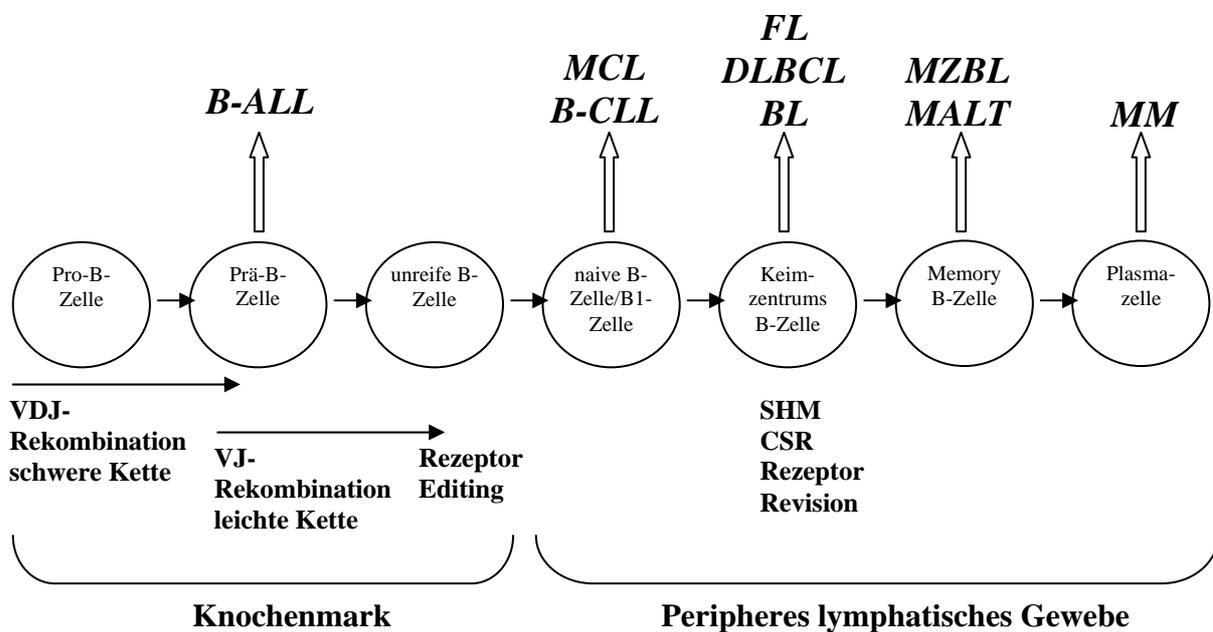


Abb. 6: Die Abbildung zeigt die normale B-Zell-Entwicklung, die stadienspezifischen Prozesse und die malignen Leukämien und Lymphome, die aus den spezifischen Stadien hervorgehen. B-ALL: „*B lineage acute lymphoblastic leukemia*“; MCL: „*mantle cell lymphoma*“; B-CLL: „*B lineage chronic lymphocytic lymphoma*“; FL: „*follicular lymphoma*“; DLBCL: „*diffus large B cell lymphoma*“; BL: „*burkitT-Lymphoma*“; MZBL: „*mantle zone B cell lymphoma*“; MALT: „*mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*“; MM: „*multiple myeloma*“; SHM: „*somatic hypermutation*“; CSR: „*class switch recombination*“.

Manche Translokationen lassen sich auf eine aberrante V(D)J-Rekombination zurückführen, da die für diesen Prozess notwendigen RSS-Bereiche auch in den betroffenen Translokationsbruchpunkten auftreten (Hiom *et al.*, 1998). Beispiele dafür sind die t(14;18) *BCL2-IGH*-Translokation im Follikulären Lymphom (Jäger *et al.*, 2000) und die t(11;14) *CCND1-IGH*-Translokation im Mantelzell-Lymphom (Welzel *et al.*, 2001).

Über den Prozess der somatischen Hypermutation werden ebenfalls Translokationen hervorgerufen, wie die für das Burkitt-Lymphom typische *Myc-IGH* Translokation (Goossens *et al.*, 1998) und die *BCL6-IGH*-Translokation des Diffus grosszelligen B-Zell Lymphoms (Akasaka *et al.*, 2000). Als Beispiel für aberranten Immunglobulin-Klassenwechsels gilt die *BCL3-IGH*-Translokation der Chronischen Lymphozytischen Leukämie (McKeithan *et al.*, 1997).

Da demzufolge alle diese Prozesse die Gefahr bergen, auch weitere chromosomale Translokationen hervorzurufen, lässt sich ein möglicher Zusammenhang zur Tumorprogression nicht ausschließen. Ein interessanter Kandidat für diese Art der Untersuchung ist das Mantelzell-Lymphom, das bisher nur schlecht heilbar ist (Bertoni *et al.*, 2004).

1.3.1 Das Mantelzell-Lymphom

Nach der Kiel-Klassifikation entspricht das Mantelzell-Lymphom weitestgehend dem zentrozytischen Lymphom (Lennert *et al.*, 1975). Erst seit der Einführung der REAL (*Revised European American Lymphoma*)-Klassifikation und der auf dieser basierenden WHO (*World Health Organization*)-Klassifikation gilt das Mantelzell-Lymphom als eigenständige Entität (Jaffe *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2000).

Mantelzell-Lymphome machen ca. 5-10% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus (Fischer, 1996; Argatoff *et al.*, 1997). Als gesundes zelluläres Gegenstück zur Tumorzelle wird eine prä-Keimzentrums B-Zelle anerkannt (Welzel *et al.*, 2001). Die Tumorzellen der Mantelzell-Lymphome sind kleine bis mittelgroße lymphoide Zellen, die von einem lockeren Netzwerk follikulärer dendritischer Zellen umgeben werden (Schrader *et al.*, 2005). Aufgrund der Ähnlichkeit zu Zentrozyten aus dem Keimzentrum wurde das Mantelzell-Lymphom zunächst als zentrozytisches Lymphom eingeordnet (Lennert *et al.*, 1975). Später galt jedoch allgemein, dass die Tumorzellen eher mit den Zellen der Mantelzone, die das Keimzentrum umgeben (vgl. Abb. 4), verwandt sind (Banks *et al.*, 1992). Es existieren drei histologische Varianten (diffus, nodulär und blastoid), die sich hinsichtlich der Überlebensrate der Patienten unterscheiden (Majlis *et al.*, 1997). Das Wachstumsmuster ist meist nodulär oder diffus.

Die blastoide Variante zeichnet sich durch eine hohe Zellproliferation und einen klinisch rasch progredienten Verlauf aus (Khoury *et al.*, 2003). Das Mantelzell-Lymphom betrifft vor allem ältere und vorrangig männliche Patienten zwischen 60 und 65 Jahren.

Die malignen Zellen zeichnen sich durch eine Koexpression des T-Zell-Markers CD5 sowie der B-Zellmarker CD19 und CD20 aus. Typischerweise negativ sind die Lymphomzellen für CD10 (Marker für lymphoide Vorläufer bis zum prä-B-Zellstadium), CD23 (Marker für mature B-Zellen) und den Keimzentrumsmarker *BCL6* (Williams und Densmore, 2005). Zudem ist eine IgM- und häufig auch eine IgD-Expression nachweisbar (Bertoni *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu normalen B-Zellen, wo eine Expression der Igκ-Leichtketten dominiert, überwiegt Oberflächenexpression von Igλ-Leichtketten gegenüber der Expression von Igκ Leichtketten im Mantelzell-Lymphom (Swerdlow *et al.*, 1983).

Charakteristisch für das Mantelzell-Lymphom ist die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32), durch die das *CCND1*-Gen (kodiert das Protein Cyclin D1) von Chromosom 11 unter den Einfluss des Promotors der schweren Immunglobulinkette (*IGH*) auf Chromosom 14 gerät.

Daraus resultiert eine konstitutive Überexpression des Zellzyklus regulierenden Proteins Cyclin D1, was eine frühe Phosphorylierung des RB (engl.: *retino blastoma*) Proteins zur Folge hat und infolgedessen eine vermehrte Zellproliferation verursacht (Lukas *et al.*, 1995). Die für die Translokation notwendigen DNA-Brüche ereignen sich im *IGH*-Lokus durch die normale V(D)J-Rekombination, wobei die Ursache des Bruchs im *CCND1* Gen noch unbekannt ist (Welzel *et al.*, 2001). Zusätzlich zu der typischen Translokation des *CCND1*-Gens findet man jedoch weitere zahlreiche Abschnitte im Genom der Mantelzell-Lymphomzellen, die chromosomale Aberrationen aufweisen (Bentz *et al.*, 2000). Insbesondere das *ATM*-Gen ist häufig von Deletionen betroffen, sodass davon auszugehen ist, dass neben der typischen Überexpression des *CCND1*-Gens auch Mutationen oder Deletion des *ATM*-Gens in der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms eine wesentliche Rolle spielen (Schaffner *et al.*, 2000).

Das Auftreten eines komplexen Karyotyps und die dazugehörige Akkumulation weiterer sekundärer genetischer Veränderungen ist entscheidend für die maligne Transformation und die Progression des Mantelzell-Lymphoms. Um die zugrundeliegenden Mechanismen der Tumorprogression zu verstehen, ist die Aufklärung der sekundären genetischen und molekularen Ereignisse notwendig.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Mantelzell-Lymphome repräsentieren eine heterogene Entität, deren zellulärer Ursprung nicht geklärt ist (Lászlo *et al.*, 2000). Entgegen der früheren Meinung, dass in Mantelzell-Lymphomen weder somatische Hypermutation noch Immunglobulin-Klassenwechsel stattfinden, gibt es neue Erkenntnisse, die dies widerlegen (Walsh *et al.*, 2003; Du *et al.*, 1997; Thorselius *et al.*, 2002; Babbage *et al.*, 2004). Die Heterogenität ließ sich auch auf dem Level der für das Mantelzell-Lymphom typischen *CCND1-IGH*-Translokation nachweisen, wo sich in seltenen Fällen *BCL-1/DJ_H*-Rearrangements zeigten (Welzel *et al.*, 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die *CCND1-IGH*-Translokation während eines sekundären *D_H-J_H*-Rearrangements in einem späteren B-Zellstadium ereignet haben könnte. Somit bleibt nicht nur die tatsächliche zelluläre Herkunft des Mantelzell-Lymphoms unklar sondern auch die Frage, ob sekundäre V(D)J-Rekombinationsereignisse Ursache der Translokation sein können. Die Tatsache, dass somatische Hypermutation, Immunglobulin-Klassenwechsel und V(D)J-Rekombination von DNA-Strangbrüchen begleitet werden, die zur malignen Progression des Mantelzell-Lymphoms beitragen können, macht eine erweiterte Untersuchung dieser Prozesse hinsichtlich der DNA-Instabilität und als mögliche Ursache für die *CCND1-IGH*-Translokation relevant.

Innerhalb dieser Doktorarbeit sollen mögliche Ursachen für sekundäre genetische Veränderungen im Mantelzell-Lymphom untersucht werden. Es steht die Frage im Vordergrund, ob sekundäre V(D)J-Rekombinationsereignisse mit chromosomalen Translokationsereignissen in Mantelzell-Lymphomen in Verbindung zu bringen sind und einen möglichen Erklärungsansatz für die in Mantelzell-Lymphomen typischerweise beobachtete *CCND1-IGH*-Translokation bieten. Ebenso soll festgestellt werden, inwiefern die somatische Hypermutation, Immunglobulin-Klassenwechsel und Rezeptor-Editing aktiv in Mantelzell-Lymphomen nachweisbar sind und DNA-Instabilität in den Immunglobulinloci herbeiführen könnten. Begleitend soll auf molekularer Ebene eine Expression der für diese Prozesse relevanten Gene und Proteine nachgewiesen werden.

2 Material & Methoden

2.1 Transformation von *Escherichia coli* über Hitzeschock

Material:

- TOP10 chemokompetente *E. coli* Zellen (Invitrogen)
- SOC-Medium [2 %iges Trypton, 0.5 %iger Hefeextrakt, 10 mmol/l NaCl, 2.5 mmol/l KCl, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l MgSO₄, 20 mmol/l Glukose] (Invitrogen)
- Ampicillin-haltige Agarplatte [1 % Bacto Pepton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.5 % NaCl; (pH7.5), 1.5 % Bactoagar, 100 mg/ml Ampicillin]
- Wasserbad
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Die Hitzeschocktransformation von chemokompetenten TOP10 Bakterienzellen (Invitrogen) erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll des TOPO TA Cloning[®] Kits (Invitrogen). Dazu wurden 2.5 µl der TOPO-Reaktion entnommen, auf die frisch aufgetauten Bakterienzellen gegeben und vorsichtig vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf Eis überführt und 250 µl SOC-Medium hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C und unter leichtem Schütteln bei 350 rpm wurden zwischen 10 und 100 µl der Bakteriensuspension auf LB_{amp}-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank aufbewahrt.

2.2 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.1 DNA-Isolation

Material:

- QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen)
- Ethanol (96-100%)
- Tischzentrifuge mit einem Einsatz für 2 ml Eppendorf-Gefäße
- Wasserbad
- Vortex-Gerät

Durchführung:

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Zellen wurde das kommerziell erhältliche QIAamp[®] DNA Blood Kit (Qiagen) herangezogen und die DNA nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.2 RNA-Isolation**Material:**

- Rneasy[®] Kit (Qiagen)
- β -Mercaptoethanol
- dH₂O_{DEPC}
- gekühltes 70 %iges Ethanol
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Eppendorf-Gefäße

Durchführung:

Gesamt RNA-Isolation erfolgte mittels des Rneasy[®] Kits von Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Im Umgang mit RNA wurde speziell auf schnelles Arbeiten auf Eis und die ausschließliche Verwendung von dH₂O_{DEPC} geachtet, um eine Degradation der RNA zu vermeiden. Die Qualität der isolierten RNA wurde anschließend auf einem 2%igem Agarose/TAE Gel anhand der spezifischen ribosomalen Banden überprüft.

2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**2.3.1 Agarosegele****Material:**

- Agarose UltraPURE (Gibco BRL)
- Blaumarker [0.1 % Bromphenolblau, 0.1 % Xylencyanol, 50 % Glycerin in 1x TAE-Puffer]
- 1x TAE-Puffer [0.04 mol/l Tris-Acetat, 4.8 g Tris, 1.1 ml Essigsäure, 1mmol/l EDTA]
- Ethidiumbromid [1 μ g/ μ l]
- 100 bp DNA-Marker [1 μ g/ μ l] (Invitrogen)
- Geldokumentationsapparatur (Herolab)

Durchführung:

Die verwendeten Agarosegele waren entsprechend der Produktgrößen konzentriert. Es wurde ausschließlich die Agarose UltraPURE von Gibco BRL benutzt. Standardmäßig wurden 2%ige Agarose Gele hergestellt, wobei TAE als Lauf-, und Gelpuffer diente. Die Gele enthielten 0.02 µg/ml Ethidiumbromid.

2.4 Subklonierung von PCR-Produkten (TOPO-Reaktion)

Material:

- frisches PCR-Produkt
- Salzlösung [50 mmol/l NaCl, 2.5 mmol/l MgCl₂]
- pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor [10 ng/µl]

Durchführung:

Für die Suklonierung von PCR-Produkten wurde das kommerziell erhältliche TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) herangezogen. Bei dieser Klonierungsmethode wird die Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus genutzt, die Restriktionsenzym, wie auch Ligase ist. Die biologische Rolle dieses Enzyms ist das Öffnen und Ligieren der DNA während des Replikationsprozesses. Der mitgelieferte TOPO[®]-Vektor besitzt T-Überhänge, die zu den aus der PCR resultierenden A-Überhängen komplementär sind.

Für die TOPO-Reaktion werden je 1 µl des mitgelieferten TOPO[®]-Vektors, 1 µl Salzlösung mit 4 µl PCR-Produkt vereinigt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Transformation des klonierten Produktes in *E. coli* Zellen.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Innerhalb dieser Doktorarbeit wurde ausschließlich die sogenannte „Hot Start“ PCR angewandt. Diese Technik beruht auf der Hemmung der Polymeraseaktivität vor der eigentlichen PCR-Reaktion. Dadurch wird eine unspezifische Amplifikation vermieden und die Ausbeute an spezifischen Produkten erhöht. Ein anti-*Taq* DNA-Polymerase Antikörper komplexiert die Polymerase und inhibiert so deren Aktivität. Erst der initiale Denaturierungsschritt von 2 Minuten aktiviert die Polymerase.

2.5.1 Standard-PCR-Reaktion

Material:

- dNTP-Mix [je 10 mmol/l] (Invitrogen)
- 10x PCR-Puffer (Invitrogen)
- Vorwärtsprimer [2.5 µmol/l, Sequenzen s. Anhang] (MWG Biotech)
- Rückwärtsprimer [2.5 µmol/l, Sequenzen s. Anhang] (MWG Biotech)
- MgCl₂ [50 mmol/l] (Invitrogen)
- PLATINUM *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen)
- dH₂O
- T1 Thermocycler (Biometra)

Durchführung:

Die Komponenten wurden auf Eis vereinigt und bei den entsprechenden PCR-Parametern (vgl. Anhang) amplifiziert.

2.5.2 Kolonie-PCR-Reaktion

Material:

- dNTP-Mix [je 10 mmol/l] (Invitrogen)
- 10x BV-Puffer [166 mmol/l Ammoniumsulfat, 670 mmol/l Tris-HCl (pH 8.8), 67 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l β-Mercaptoethanol]
- DMSO
- M13F [2.5 µmol/l, Sequenzen s. Anhang] (MWG Biotech)
- M13R [2.5 µmol/l, Sequenzen s. Anhang] (MWG Biotech)
- MgCl₂ [50 mmol/l] (Invitrogen)
- PLATINUM *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen)
- dH₂O
- T1 Thermocycler (Biometra)

Durchführung:

Zur Verifizierung von Bakterienklonen wurde die Kolonie PCR-Methode genutzt. Dabei wird eine einzelne Bakterienkolonie von einer LB_{amp}-Platte mittels einer sterilen Pipettenspitze direkt in das PCR-Reaktionsvolumen überführt (Parameter vgl. Anhang).

2.5.3 RT-PCR**Material:**

- 5x Erststrangpuffer [250 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3), 375 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂] (Invitrogen)
- Dithiothreitol/DTT [0.1 mol/l DTT in dH₂O_{DEPC}] (Invitrogen)
- RNaseOUT™ [40 U/μl in: 20 mmol/l Tris-HCl (pH 8), 50 mmol/l KCl, 0.5 mmol/l EDTA, 8 mmol/l DTT, 50 %iges Glycerol] (Invitrogen)
- dH₂O_{DEPC}
- dNTP-Mix [jeweils 10 mmol/l dATP, dCTP, dGTP, dTTP in dH₂O_{DEPC}] (Invitrogen)
- SuperScript™ III Reverse Transkriptase [200 U/μl in: 20 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 100 mmol/l NaCl, 0.1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 0.01 %iges Nonidet-40, 50 %iges Glycerol] (Invitrogen)
- oligo(dT) Primer [50 μmol/l] (MWG Biotech)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für die Erststrangsynthese werden zunächst folgende Komponenten in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben:

- 1 μl oligo(dT) Primer
- 10 pg-5 μg Gesamt-RNA oder 10 pg-500 ng mRNA
- 1 μl dNTP-Mix

Der Ansatz wird auf 13 μl mit dH₂O_{DEPC} aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65°C erhitzt. Anschließend erfolgt eine Inkubation auf Eis für 1 Minute, bevor die restlichen Komponenten hinzugegeben werden:

- 4 μl 5X Erststrangpuffer
- 1 μl DTT
- 1 μl RNaseOUT™
- 1 μl SuperScript™ III Reverse Transkriptase

Dann wird der Ansatz für mindestens 30-60 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach der Synthese erfolgt eine *GAPDH*-PCR (Parameter vgl. Anhang) zur Überprüfung der cDNA-Qualität.

2.6 Sequenzierungen

Um die zu analysierenden PCR-Produkte für die Sequenzierungen vorzubereiten, wurden zwei verschiedene Methoden der Aufreinigung angewendet.

2.6.1 Aufreinigung über Ethanolpräzipitation

Material:

- Ammoniumazetat (NH₄OAC) [7.5 mol/l]
- Glykogen (Invitrogen)
- Ethanol [100 %ig, reinst] (Roth)
- Tischzentrifuge

Durchführung:

Zur Fällung von PCR-Produkten, wird das Reaktionsvolumen (25 µl) zunächst mit 200 µl sterilem dH₂O aufgefüllt, und mit 133 µl 7.5 mol/l Ammoniumazetat, 3 µl Glykogen und 1 ml 100 %igem Ethanol versetzt. Anschließend erfolgte die Fällung für mindestens 30 Minuten bei -20°C. Danach werden die gefällten Proben für 30 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wird die pelletierte DNA zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach jedem Waschschrift für jeweils weitere 10 Minuten durch Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert. Das DNA-Pellet wird bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und in 40 µl sterilem dH₂O aufgenommen. Dann erfolgt die weitere Aufbereitung für die Sequenzreaktion.

2.6.2 Aufreinigung von Kolonie PCR-Produkten

Material:

- Filterplatten (Corning Incorporated)
- SephacrylTM S-400 (Amersham)
- dH₂O

Durchführung:

Für Aufreinigungen kompletter 96er well PCR-Platten bietet sich die Benutzung von Filterplatten an. Es werden jeweils 300 µl gut resuspendiertes Sephacryl in die Vertiefungen der Filterplatte pipettiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 2390 rpm. Danach wird die Platte mit jeweils 250 µl dH₂O fünfmal gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt mit 25 µl PCR-Produkt beladen. Zur Aufreinigung des Produktes wird nochmals für 2 Minuten bei 2760 rpm zentrifugiert. Das resultierende Produkt kann dann sofort in eine Sequenzreaktion eingesetzt werden.

2.6.3 Sequenzreaktion**Material:**

- BigDye[®] Terminator v1.1 Kit (Applied Biosystems)
- 5X Sequenzierpuffer (ABI Prism)
- BigDye[®] Terminator Reaktions-Mix (ABI Prism)
- M13F Primer [10 µmol/l, Sequenz s. Anhang]
- dH₂O
- T1 Thermocycler (Biometra)

Durchführung:

Für die Sequenzreaktion werden folgende Komponenten zusammengefügt:

- 1 µl dH₂O
- 1 µl 5X Sequenzierpuffer
- 1 µl M13F (10 µmol/l)
- 1 µl BigDye[®] Terminator Reaktions-Mix (ABI Prism)
- 6 µl Template

2.6.4 Aufreinigung der Sequenzreaktion**Material:**

- Sephadex[™] G-50 (Amersham)
- MultiScreen Column Loader Platte (Millipore)
- MultiScreen[®] -HV-Platte (Millipore)
- Microtest[™] Primaria Platte (Beckton Dickinson)
- dH₂O

Durchführung:

Das Sephadex Säulenmaterial wird zunächst auf einer MultiScreen Column Loader Platte mittels eines Spatels verteilt und dann eine MultiScreen[®]-HV-Platte aufgelegt. Danach wird das Sephadex in die MultiScreen[®]-HV-Platte überführt, mit 300 µl dH₂O pro Vertiefung beladen und für 3 Stunden quellen gelassen. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 2640 rpm. Die aufbereitete Platte wird dann auf eine Microtest[™] Primaria Platte (Beckton Dickinson) positioniert und das aufzureinigende Produkt zunächst mit 10 µl dH₂O versetzt und dann komplett auf die Sephadex-haltigen Vertiefungen der Platte aufgetragen. Dann erfolgt eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei 2640 rpm. Das nach der Zentrifugation aufgereinigte Produkt wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

2.7 Herstellung von Proteinlysaten

Material:

- Protein-Lysismix [1032 µl CellLytic Reagenz (Sigma), 150 µl Complete MINI-Lösung, 12 µl Phosphataseinhibitor-Cocktail, 6 µl PMFS (Phenylmethylsulfonyl Fluorid)]
- Complete MINI-Lösung [1 Tablette (Roche), in 1 ml dH₂O gelöst]
- 1x PBS [237 mmol/l NaCl, 2.7 mmol/l KCl, 8.1 mmol/l Na₂HPO₄, 1.5 mmol/l KH₂PO₄; (pH 7.2)]
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für die Gewinnung der Proteine aus Zellen wird zunächst der Protein-Lysismix angesetzt. Die Zellen werden zuvor durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 Minuten pelletiert und anschließend noch mal in PBS gewaschen. Dann erfolgt die Zugabe des Lysismixes, wobei etwa das 4-fache Volumen bezogen auf das Zellpellet eingesetzt wird. Zur Lyse wird die Probe dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Zuletzt wird die Probe zur Gewinnung der Proteine für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Protein-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford)

Material:

- CellLytic Reagenz (Sigma)
- Bradford-Reagenz [50 mg Coomassiblauf in 25 ml 95 %igem Ethanol gelöst, 50 ml 85 %ige Phosphorsäure ad 100 ml dH₂O]

Durchführung:

Um die Konzentration von Proteinen zu bestimmen, werden 500 µl des Bradford-Reagenz auf 95 µl CellLytic Reagenz und 5 µl der Proteinprobe gegeben und in eine Küvette überführt. Nach 5 Minuten wird die Konzentration am Spektralphotometer bestimmt. Dazu wird zunächst der Referenzwert (100 µl CellLytic Reagenz und 500 µl Bradford-Reagenz) abgestimmt. Dann werden die relativen Konzentrationen der Proteine bei einer Wellenlänge von 595 nm über die Absorption gemessen. Um die absoluten Konzentrationen zu bestimmen, müssen die Werte anhand einer BSA Eichkurve verglichen werden.

2.9 Western Blot

2.9.1 Präparation der Proben

Material:

- NuPAGE[®] SAMPLE Reducing Agent, reduzierende Agenz (Invitrogen)
- NuPAGE[®] LDS SAMPLE Buffer, Probenpuffer (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für den Nachweis von Proteinen wurden zunächst 15 µg Protein mit 1/10 Volumen der reduzierenden Agenz und ¼ Volumen des Probenpuffers versetzt. Bevor die Probe auf das Gel aufgetragen wurde, erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 70°C.

2.9.2 Gelelektrophorese

Material:

- NuPAGE[®] 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen)
- XCell *SureLock*[™] Mini-Cell Kammer (Invitrogen)
- 20x NuPAGE[®] MOPS SDS Laufpuffer (Invitrogen)
- NuPAGE[®] Antioxidanz
- SeeBlue[®] Plus2 Marker (Invitrogen)
- dH₂O

Durchführung:

Die Gelkammer wird mit 1.000 ml 1x Laufpuffer gefüllt, wobei dem Puffer der inneren Kammer noch 500 µl Antioxidanz zugesetzt werden. In die seitlichen Geltaschen werden je 7 µl des Proteinstandards geladen. Die vorbereiteten Proben werden in die restlichen Taschen des Gels gegeben und nach Anleitung des Herstellers für 50 Minuten bei 200 V aufgetrennt.

2.9.3 Transfer der Proteine

Material:

- 20x NuPAGE[®] Transferpuffer (Invitrogen)
- XCell II[™] Blot Modul (Invitrogen)
- Ponceau-Rot S [2 % Ponceau Rot S, 30 % Sulfoazylsäure, 30 % Trichloressigsäure in dH₂O]
- NuPAGE[®] Antioxidanz (Invitrogen)
- dH₂O
- Methanol
- 1x Transferpuffer [50 ml 20x NuPAGE[®] Transferpuffer, 1 ml NuPAGE[®] Antioxidanz, 200 ml Methanol, 749 ml dH₂O]
- Sponge Pad (Invitrogen)
- Nitrozellulose/Filter Paper Sandwich [0.2 µm] (Invitrogen)

Durchführung:

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach 1 Stunde bei 30 V wird die Effizienz des Transfers durch eine Ponceau-Rot S Färbung überprüft. Dazu wird die Nitrozellulosemembran kurz in der Ponceau-Rot-Lösung geschwenkt und anschließend das Ponceau-Rot durch mehrmaliges Waschen in dH₂O wieder entfernt.

Die auf der Membran vorhandenen Proteine zeigen dann eine Rotfärbung. Nach der Überprüfung des Transfers wurde die Membran wieder entfärbt. Dazu wurde mehrmals mit dH₂O und einem Tropfen NaOH (1 mol/l) gewaschen.

2.9.4 Immundetektion der Proteine

Material:

- WesternBreeze™ Immunodetektion Kit (Invitrogen)
- AID (L7E7) [mouse](Cell Signalling)
- BCL6 [rabbit] (Cell Signalling)
- ELF4e [rabbit] (Santa Cruz)
- Röntgenfilme Fuji RX New [13x18 cm] (A. Hartenstein)
- Röntgenkassette (A.Hartenstein)

Durchführung:

Der Nachweis von Proteinen erfolgte mittels der Komponenten des WesternBreeze™ Immunodetektions Kit von Invitrogen. Dazu wurde die Membran zunächst für mindestens 30 Minuten in der Blockierlösung inkubiert. Dann wurden 20 µl des jeweiligen Erstantikörpers (AID, BCL6 oder ELF4e) in der Blockierlösung verdünnt und auf die Membran gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler. Um die Membran nach der Inkubation von dem Erstantikörper zu befreien, erfolgten mindestens vier fünfminütige Waschschrte in der Waschlösung. Danach wurden 10 ml der entsprechenden Zweitantikörperlösung hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgten zwei fünfminütige Waschschrte, um den Zweitantikörper zu entfernen.

Dann wurden 1125 µl des chemolumineszenten Substrats auf die Membran gegeben und für 5 Minuten auf der Membran belassen. Das Substrat wurde anschließend durch saugfähiges Whatman Papier am Rand der Membran entfernt, bis die Oberfläche matt erschien. Die Membran wurde nicht direkt berührt. Die so aufbereitete Membran wurde zuletzt in eine Plastikfolie eingeschweißt. Der optische Nachweis der Proteine wurde durch verschiedene Expositionszeiten der Membran auf einem Röntgenfilm erreicht.

2.10 In-vitro-Kultur von Zelllinien

Material:

- RPMI 1640 mit GlutaMAX™ I [10 % FBS, 1%ig Penicillin/Streptomycin] (Gibco)
- Sterilbank (Antair)
- Brutschrank CB210 (Binder)

Durchführung:

Die verwendeten Zelllinien (vgl. Anhang) wurden in Zellkulturmedium in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C im Wärmeschrank kultiviert. Im Umgang mit den Zelllinien wurde stets steril gearbeitet.

2.10.1 Langzeitexperiment (anti- κ Behandlung von Jeko-1 Zellen)

Material:

- anti- κ Antikörper (6E1) [mouse] (Immunotech)

Durchführung:

In Anlehnung an ein Experiment in der Maus, bei dem nachgewiesen wurde, dass ein Ig κ -reaktiver Ligand in κ -positiven Zellen Rezeptor Editing induzieren kann (Ait-Azzouzene *et al.*, 2005), sollte die κ -positive Zelllinie Jeko-1 ebenfalls einem exogenen autoreaktiven Stimulus unterzogen werden.

Für das Langzeitexperiment (vgl. 3.5.1.2) wurden zunächst jeweils 10 ml Zellsuspension in Zellkulturflaschen aliquotiert. Dann wurde ein anti- κ Antikörper in einer Konzentration von 10 μ g/ml hinzugegeben. In der unbehandelten Negativkontrolle wurde dasselbe Volumen des Zellkulturmediums, in dem der Antikörper verdünnt wurde ohne Zusätze hinzugegeben. Die verschiedenen Ansätze wurden unter gleichen Bedingungen gehalten. Die behandelten Zellen wurden dauerhaft in einer Konzentration von 10 μ g/ml anti- κ Antikörper kultiviert.

2.11 FACS-Analyse

Material:

- 1x PBS [237 mmol/l NaCl; 2.7 mmol/l KCl; 8.1 mmol/l Na₂HPO₄; 1.5 mmol/l KH₂PO₄; (pH 7.4)]
- 1x PBS/EDTA [PBS+ 0.05 % EDTA]
- anti-CD5 Antikörper (BD Biosciences)
- anti-CD19 Antikörper (BD Biosciences)
- anti-CD20 Antikörper (BD Biosciences)
- anti-CD23 Antikörper (BD Biosciences)
- anti-CD27 Antikörper (BD Biosciences)
- anti-κ Antikörper (BD Biosciences)
- anti-λ Antikörper (BD Biosciences)
- anti-human IgG Antikörper (BD Biosciences)
- anti-human IgD Antikörper (BD Biosciences)
- anti-human IgM Antikörper (BD Biosciences)
- anti-VpreB Antikörper (BD Biosciences)
- Propidiumjodidlösung (PJ-Lösung) [2µg/ml in PBS/EDTA] (Sigma)
- Durchflusszytometer: FACScan (BD Biosciences)

Durchführung:

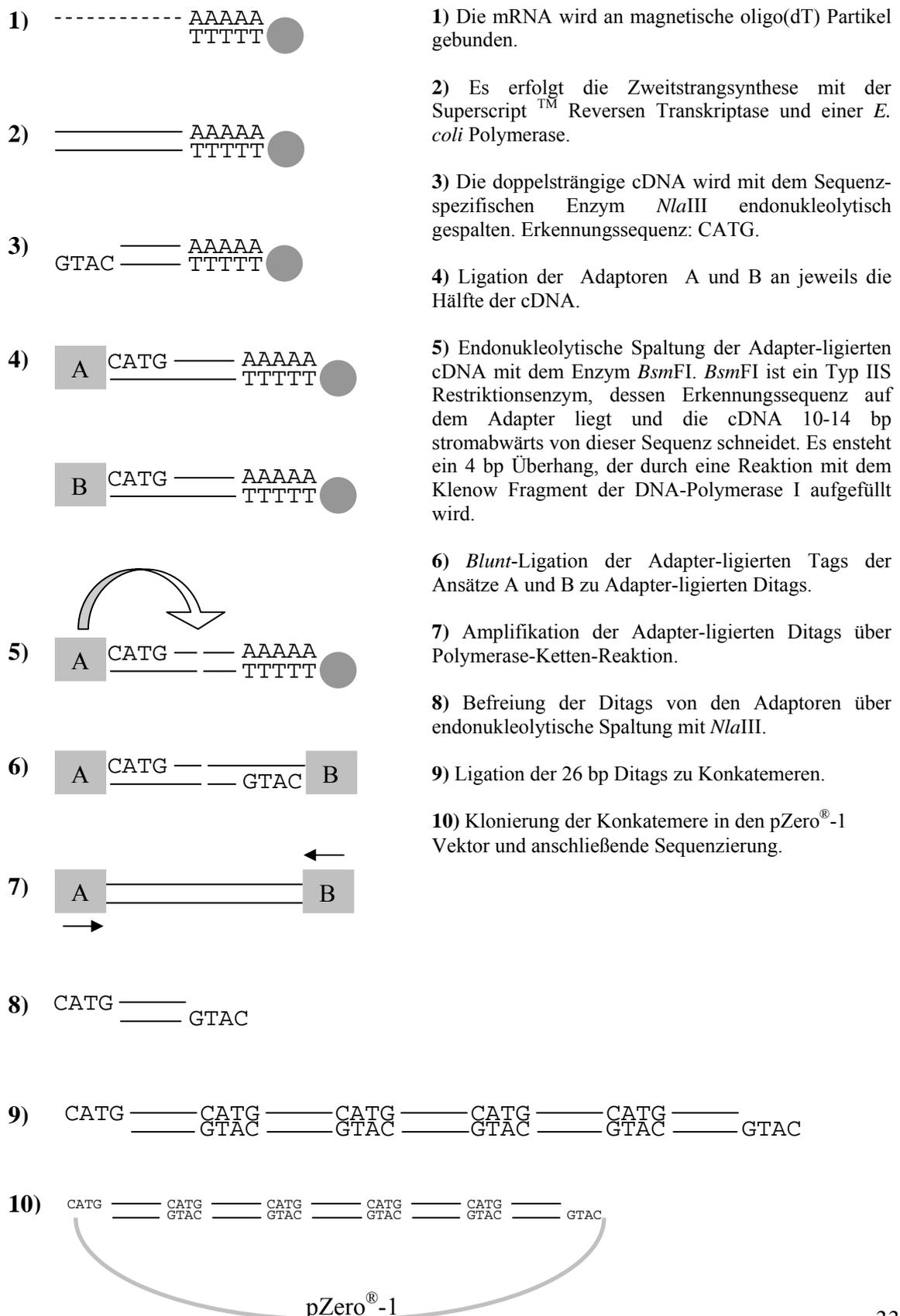
Für die durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellen wurden verschiedene Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle benutzt, die an die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelt sind. Für die Bindung der Fluoreszenz-markierten Antikörper werden ca. 10⁶ Zellen zunächst in PBS gewaschen und anschließend in 15 µl PBS aufgenommen. Dann werden jeweils 3 µl des FITC-gekoppelten und 2 µl des PE-gekoppelten Antikörpers hinzugegeben (Unterschiedliche Mengen begründet durch die etwas stärkere Intensität des PE-Farbstoffes). Es folgt eine Inkubation für 15 Minuten auf dem Schüttler bei RT. Nach der Inkubation werden die Proben mit 500 µl PBS versetzt, resuspendiert und bei 2400 rpm wieder pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 150-300 µl PJ-Lösung aufgenommen. Die Zellsuspension wird in ein FACS-Röhrchen überführt und dann sofort analysiert.

2.12 Herstellung eines SAGE-Genexpressionsprofils

Bei der SAGE (*Serial analysis of gene expression*)-Methode (Velculescu *et al.*, 1995) dient eine Nukleotidsequenz von 10 bp Länge („Tag“) dazu, ein Transkript spezifisch zuzuordnen. Aufgrund der Methodik dient hierbei immer die 10 bp lange Sequenz, die stromabwärts der am meisten 3'-gelegenen *Nla*III-Schnittstelle liegt, der spezifischen Zuordnung. In der Abbildung 7 sind die einzelnen Schritte der Methode schematisch dargestellt.

Diese Methode wurde von mir genutzt, um SAGE-Profile für zwei Burkitt-Lymphome und für Embryonale Stammzellen (ESCs; „embryonic stem cells“) und USSCs („unrestricted somatic stem cells“) zu erstellen, die nicht Teil dieser Dissertation sind. Die im Kapitel 3.6 benutzten MCL-Profile wurden freundlicherweise von Dr. Manfred Richter, Dr. Andreas Bräuninger und Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann (Universität Frankfurt, Institut für Pathologie) bereitgestellt.

Abb. 7: Schematische Übersicht der SAGE-Methode



2.12.1 Isolierung der Gesamt-RNA und Bindung an Magnetpartikel

Material:

- Magnetischer Ständer (Invitrogen)
- RNeasy[®] Kit (Qiagen)
- sterile, RNase freie Eppendorfgefäße
- Komponenten des cDNA Synthese Moduls 1A (Invitrogen)

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde das Rneasy[®] Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers genutzt (vgl. 2.2.2). Die Qualität der aufgereinigten RNA wurde anhand des Vorhandenseins der ribosomalen RNA-Banden auf einem 2 %igem Agarosegel überprüft. Degradierete Proben, die kein eindeutiges Bandenmuster aufwiesen wurden verworfen. Zur Isolation der mRNA aus der Gesamt-RNA wurden Magnetpartikel nach Anleitung des I-SAGE[™] Protokolls benutzt.

2.12.2 Herstellung doppelsträngiger cDNA

Material:

- Magnetischer Ständer (Invitrogen)
- Wasserbäder
- Komponenten des cDNA Synthese Moduls 1B (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für die Herstellung doppelsträngiger cDNA werden zunächst folgende Reagenzien vereinigt und die an Magnetpartikel gebundene mRNA darin resuspendiert.

Erststrangsynthese

18.0 µl 5X Erststrangpuffer
1.0 µl RNaseOUT[™]
54.5 µl dH₂O
9.0 µl 0.1 mol/l DTT
4.5 µl dNTP Mix [10 mmol/l]
87.0 µl Gesamtvolumen

Nach einer Inkubation für 2 Minuten bei 37°C werden 3 µl der SuperScript™ II Reversen Transkriptase hinzugefügt und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird der Ansatz für 2 Minuten auf Eis gekühlt, und dann erfolgt die Zweitstrangsynthese.

Zweitstrangsynthese

465 µl dH₂O_{DEPC}
150 µl 5X Zweitstrangpuffer
15 µl dNTP Mix [10 mmol/l]
5 µl *E. coli* DNA Ligase
20 µl *E. coli* DNA Polymerase
5 µl *E. coli* RNase H

Der Ansatz wird für 2 Stunden bei 16°C inkubiert und danach mit 0.5 mol/l EDTA die Reaktion gestoppt. Nach mehreren Waschschritten nach der Anleitung des Herstellers können die Proben endonukleolytisch gespalten werden.

2.12.3 Endonukleolytische Spaltung mit *Nla*III

Material:

- Magnetischer Ständer (Invitrogen)
- Komponenten des Cleavage Moduls (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für die endonukleolytische Spaltung mit dem *Nla*III Enzym wird folgender Ansatz hergestellt und anschließend für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

*Nla*III-Verdau

172 µl LoTE
2 µl 100X BSA
20 µl 10X Buffer 4
6 µl *Nla* III
200 µl Gesamtvolumen

Durch das anschließende Waschen in heißem Waschpuffer wird die Reaktion gestoppt.

2.12.4 Adapterligation

Material:

- Magnetischer Ständer (Invitrogen)
- Wasserbad
- Komponenten des Cleavage Moduls (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung :

Der nach dem *Nla*III-Verdau nochmals gewaschene Ansatz wird zunächst auf zwei gleiche Aliquots verteilt. Zu jedem der Ansätze werden folgende Reagenzien hinzugefügt:

Adapterligation

- 1.5 µl Adapter (40 ng/µl)
- 14.0 µl LoTE
- 2.0 µl 10X Ligase Puffer
- 17.5 µl Gesamtvolumen

Es folgt eine Inkubation für 2 Minuten bei 50°C. Nach 15-minütigem Abkühlen der Ansätze auf Eis werden dann je 2.5 µl der T4 DNA-Ligase hinzugegeben und die Adaptoren für 2 Stunden bei 16°C ligiert. Nach der Ligation folgen weitere Waschschriffe.

2.12.5 Endonukleolytische Spaltung mit *Bsm*FI

Material:

- Magnetischer Ständer (Invitrogen)
- Wasserbad
- Trockeneis
- Ethanol (100 %)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol [25:24:1,v/v] (Invitrogen)
- Komponenten des Cleavage Moduls (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für die endonukleolytische Spaltung mit dem *Bsm*FI-Enzym wird folgender Ansatz hergestellt und anschließend für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

BsmFI-Verdau

174 µl LoTE
20 µl 10X Puffer 4
4 µl 100X BSA
198 µl Gesamtvolumen

Nach einer Präinkubation für 2 Minuten bei 65°C werden 2 µl des *BsmFI* Enzyms hinzugegeben und die Ansätze für 1 Stunde bei 65°C inkubiert. Erst ab diesem Schritt befindet sich die erwünschte RNA in dem Überstand (vgl. Abb. 7 Punkt 5). Dann erfolgt eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung und eine anschließende Fällung der DNA auf Trockeneis nach Anleitung des Herstellers. Die DNA-Pellets werden in 10 µl LoTE aufgenommen und nach 3 minütiger Inkubation bei 37°C einer Klenow-Reaktion unterzogen:

Klenow-Reaktion:

5.0 µl 10X Klenow Puffer
1.0 µl 100X BSA
2.5 µl dNTP Mix [10 mmol/l]
30.5 µl dH₂O_{DEPC}
1.0 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I
50 µl Gesamtvolumen

Dieser Ansatz wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend beide Ansätze (Adapter A und Adapter B) wieder miteinander vereinigt. Es erfolgt dann eine weitere Phenol/Chloroform-Aufreinigung mit anschließender Fällung auf Trockeneis nach Anleitung des Herstellers.

2.12.6 Herstellung von Ditags über Ligation

Material:

- Wasserbad
- Trockeneis
- Ethanol (100 %)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol [25:24:1,v/v] (Invitrogen)
- Komponenten des Ditag Formation Moduls (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für die Herstellung von Ditags wird die in 1.5 µl resuspendierte DNA mit folgenden Komponenten versetzt:

Ditag-Ligation

1.25 µl 3 mM Tris-HCl, pH 7.5
0.75 µl 10X Ligase Puffer
0.75 µl dH₂O_{DEPC}
1.00 µl T4 DNA Ligase

Es wird 1.5 µl des Ligationmix auf 1.5 µl des Ansatzes gegeben und über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.12.7 Amplifikation der Ditags über PCR**Material:**

- 96-well PCR Platten
- Komponenten des Ditag PCR Moduls (Invitrogen)
- T1 Thermocycler (Biometra)

Durchführung:

Zu der Ligation vom Vortag werden zunächst 14 µl LoTE hinzugefügt. Dieser Ansatz dient dann als Template für die weiteren PCR-Reaktionen. Für die Amplifikation der Ditags erfolgt eine PCR in großem Maßstab, die zuvor nach Angaben des Herstellers getestet wurde. Es wird die PCR-Bedingung gewählt, die sich bei der Optimierung der PCR als die Beste herausgestellt hat. War die PCR im großen Maßstab erfolgreich, wird das PCR-Produkt Phenol/Chloroform aufgereinigt und anschließend über Nacht gefällt. Die gefällte DNA wird am nächsten Tag über Zentrifugation pelletiert, getrocknet und in 14 µl LoTE aufgenommen.

2.12.8 Endonukleolytische Spaltung mit *Nla*III und Gelaufreinigung der Ditags

Material:

- Trockeneis
- Ethanol (100 %)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol [25:24:1,v/v] (Invitrogen)
- Komponenten des *Nla*III Moduls (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)
- 40 % Acrylamid/Bisacrylamid [37,5:1] (Applichem)
- 5x TBE Laufpuffer [54 g Tris-Base, 27.5 g Borsäure, 2.9 g EDTA, ad 1 l mit dH₂O]
- 6x TBE Ladebuffer [6 ml 5x TBE Laufpuffer, 3.2 ml 100 % Glycerol, 0.3 ml Bromphenolblau, 0.3 ml 1 % Xylencyanol, ad 10 ml mit dH₂O]
- TEMED/N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (Sigma)
- dH₂O
- 10 % APS (Sigma)

Durchführung:

Die Ditags werden durch endonukleolytische Spaltung mit dem *Nla*III-Enzym von den Adaptoren befreit. Dazu wird das PCR-Produkt zunächst in 42 µl Aliquots aufgeteilt und dann folgende Reagenzien pro Ansatz hinzugegeben:

*Nla*III-Verdau

- 42 µl 100-bp Ditags
- 15 µl 10X Puffer 4
- 2 µl 100X BSA
- 12 µl *Nla*III
- 79 µl dH₂O_{DEPC}
- 150 µl Gesamtvolumen

Die endonukleolytische Spaltung erfolgt für 1-2 Stunden bei 37°C. Anschließend werden 5 µl des Ansatzes auf einem 4 %igem Agarosegel geprüft. Nach Phenol/Chloroform-Aufreinigung und DNA-Fällung laut Anleitung des Herstellers wird die in 32 µl aufgenommene DNA durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgereinigt. Für die Herstellung eines 10 % igen Polyacrylamidgels werden folgende Komponenten verwendet:

10% Polyacrylamidgel

- 10.25 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
- 8 ml 5x TBE Laufpuffer
- 21.35 ml dH₂O
- 0.4 ml APS
- 16 µl TEMED

Nach der Auftrennung werden die Ditags aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers eluiert.

2.12.9 Ligation der Ditags zu Konkatemeren und Gelaufreinigung der Konkatemere

Material:

- Trockeneis
- Ethanol (100 %)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol [25:24:1,v/v] (Invitrogen)
- Komponenten des Concatemer Moduls (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)
- 40 % Acrylamid/Bisacrylamid [37.5:1] (Applichem)
- 5x TBE Laufpuffer [54 g Tris-Base, 27.5 g Borsäure, 2.9 g EDTA, ad 1 l mit dH₂O]
- 6x TBE Ladepuffer [6 ml 5x TBE Laufpuffer, 3.2 ml 100 % Glycerol, 0.3 ml Bromphenolblau, 0.3 ml 1 % Xylencyanol, ad 10 ml mit dH₂O]
- TEMED/N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (Sigma)
- 10 % APS (Sigma)

Durchführung:

Für die Bildung von Konkatemeren aus den aufgereinigten Ditags wird folgender Ligationsansatz angesetzt:

Konkatemer-Ligation

- 8.75 µl 26-bp DNA Ditags
- 1.25 µl T4 DNA Ligase
- 10 µl Gesamtvolumen

Die Ligation wird mindestens 3 Stunden bei 16°C inkubiert. Nach der Ligation werden sofort 2 µl des Ladepuffers hinzugegeben und die Probe für 10 Minuten bei 65°C erhitzt. Danach wird alles auf ein 14 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

14% Polyacrylamidgel

- 14.9 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
- 8 ml 5x TBE Laufpuffer
- 16.7 ml dH₂O
- 0.4 ml APS

Nach Beendigung der Elektrophorese werden verschieden große Fraktionen der Konkatemere ausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers weiter aufgearbeitet.

2.12.10 Klonierung der Konkatemere in den pZero®-1 Vektor.

Material:

- Trockeneis
- Ethanol (100 %)
- MinElute Purification Kit (Qiagen)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol [25:24:1,v/v] (Invitrogen)
- Komponenten des Concatemer Moduls (Invitrogen)
- Komponenten des Zero Background™ Cloning Kits (Invitrogen)
- Schüttelinkubator: Thermomixer compact (Eppendorf)

Durchführung:

Für die Ligation der Konkatemere in den pZero®-1 Vektor muss dieser zunächst - endonukleolytisch mit dem *Nla*III-Isoshizomer *Sph*I geöffnet werden:

*Sph*I-Verdau

- 2.0 µl pZero®-1 (1 µg/µl)
- 2.5 µl 10X Buffer 2
- 1.4 µl *Sph* I
- 19.1 µl dH₂O
- 25 µl Gesamtvolumen

Der Verdau des Vektors erfolgt für 15-30 Minuten bei 37°C. Die Vollständigkeit des Verdau wird anschließend auf einem 1 %igem Agarosegel überprüft. Der Vektor wird dann mittels des MinElute Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und in folgende Reaktion eingesetzt:

Klonierung der Konkatemere in pZero®-1

- 6 µl Konktemere
- 1 µl pZero®-1/*Sph* I
- 1 µl 10X Ligase Puffer
- 2 µl T4 DNA Ligase

Die Ligation erfolgt bei 16°C über Nacht. Die klonierten Konkatemere werden über Kolonie-PCR (vgl. 2.5.2) getestet, sequenziert (vgl. 2.6) und die Sequenzen mit der SAGE™ analysis Software (Invitrogen) ausgewertet und mit Excel (Microsoft) weiterbearbeitet.

2.13 Computer und Internet

2.13.1 Computersoftware

Word 2003 (Microsoft), Power Point 2003 (Microsoft), Excel 2003 (Microsoft), Adobe Photoshop 7.0, SAGE™ analysis software (Invitrogen)

2.13.2 Internetprogramme und Websites

NCBI BLASTn (Verifizierung von Sequenzen):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

PubMed (Literaturrecherche):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

Primersoftware (Primerdesign):

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

IMGT (Vergleichende Analyse von V(D)J Sequenzen):

<http://imgt.cines.fr/cgi-bin/IMGtdnap.jv?livret=0&Option=humanIg>

Multalign (Erstellen von Sequenzalignments):

<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Esembl Human GeneView (Exon/Intron Sequenzinformation):

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene

ReverseComplement (Invertieren von Sequenzen):

http://www.bioinformatics.vg/bioinformatics_tools/reversecomplement.shtml

EMBL Nucleotide Sequence Database (Nukleotidsequenz Datenbank):

<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

Human DNA repair genes (Liste von DNA-Reparaturgenen):

http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html#NHEJ

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Mantelzell-Lymphomen

Für die hier beschriebenen Experimente wurden verschiedene Zelllinien und verschiedene primäre Fälle von Mantelzell-Lymphomen untersucht. In der Tabelle 1 sind 7 Zelllinien und ein Primärfall aufgeführt, für die eine FACS-Analyse zur Charakterisierung erfolgte. Es wurden die für Mantelzell-Lymphome typischen Oberflächenmarker CD5, CD19, CD20, und CD27 untersucht, sowie die Abwesenheit von CD23-Expression. CD19 ist Bestandteil des B-Zell-Rezeptorkomplexes und wird universell auf allen B-Zellen exprimiert (Tedder und Isaacs, 1989). CD20 wird im Laufe der physiologischen B-Zellentwicklung vom Stadium der prä-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle, außer auf Plasmazellen exprimiert und ist an der Progression des Zellzyklus beteiligt (Tedder und Engel, 1994). CD27 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie und wird typischerweise auf Gedächtnis B-, und T-Zellen exprimiert (Klein *et al.*, 1998b). CD23 ist ein niederaffiner Rezeptor für IgE und wird auf reifen B-Zellen exprimiert (Delespesse *et al.*, 1989). Das Transmembran Glykoprotein CD5 wird vor allem auf B1-Zellen exprimiert (Bhat *et al.*, 1992).

Die Analyse dieser Oberflächenmoleküle hat bestätigt, dass alle untersuchten Fälle die MCL-typischen Marker tragen. Zusätzlich konnte über eine PCR-Reaktion mit einem 5' *CCND1*-spezifischen Vorwärtsprimer und einem 3' J_H-Rückwärtsprimer die für Mantelzell-Lymphome typische Translokation t(11;14)(q13;q32) in allen Fällen nachgewiesen werden. Diese Translokation führt dazu, dass das *Cyclin D1* Gen (*CCND1*) unter die transkriptionelle Kontrolle des *IGH*-Lokus gerät. Die Untersuchung der MCL-Fälle auf EBV-Genom ergab, dass drei Zelllinien EBV-Genom tragen (Granta-519, NCEB-1, JVM-2). In diesen Fällen konnte das EBV-kodierte Gen *EBNA1* über PCR amplifiziert werden. Da das EBV-kodierte LMP1 (*latent membrane protein*) Protein, was ebenso wie EBNA1 mit einer EBV-Infektion assoziiert ist und zu Immunglobulin-Klassenwechsel führen kann (He *et al.*, 2003), ist diese Information wichtig für die weitere Analyse. Primäre MCL-Fälle sind typischerweise nicht mit dem Epstein-Barr Virus infiziert, da bisher nur ein Fall einer EBV-assoziierten Transformation des Mantelzell-Lymphoms dokumentiert wurde (Terasawa *et al.*, 2003).

Es wurde die jeweils exprimierte Immunglobulin-Klasse der von den MCL-Fällen exprimierten B-Zell-Rezeptoren durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden Antikörper gegen IgM, IgD und IgG verwendet. Da Mantelzell-Lymphome typischerweise aus prä-Keimzentrums B-Zellen hervorgehen erwartet man IgM⁺/IgD⁺ Zellen, da im Zuge der normalen B-Zell-Entwicklung erst im Keimzentrum ein Immunglobulin-Klassenwechsel stattfindet (Liu *et al.*, 1996). In 6 der 8 untersuchten Fälle ließen sich jedoch IgG⁺-Subklone nachweisen, was ein Hinweis darauf ist, dass diese Fälle bereits Immunglobulin-Klassenwechsel (CSR, engl.: *class switch recombination*) vollzogen haben. Interessant hierbei war der Vergleich der klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53, die aus demselben Patienten stammen. Die Zelllinie SP49 besitzt eine Hauptpopulation von IgG⁺ Zellen und Subklone, die IgM⁺ und IgD⁺ sind. Im Gegensatz dazu, besitzt die Zelllinie SP53 eine IgM⁺/IgD⁺-Hauptpopulation und einen IgG⁺-Subklon.

Fall	Entität	FACS Daten	EBNA1	CCND1-IGH
MCL001	MCL-Primärfall	IgM ⁺ IgD ⁺ λ ⁺ ; Subklone IgG ⁺ λ ⁺ ; Subklone VpreB ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁻	negativ	positiv
JEKO-1	MCL-Zelllinie	IgM ⁺ IgD ⁺ κ ⁺ ; Subklone IgG ⁺ κ ⁺ ; Subklone VpreB ⁺ , Subklone λ ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁺ ; Subklone CD27 ⁺	negativ	positiv
SP49	MCL-Zelllinie	IgG ⁺ κ ⁺ ; Subklone IgM ⁺ IgD ⁺ κ ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁺ ; Subklone CD27 ⁺	negativ	positiv
SP53	MCL-Zelllinie	IgM ⁺ IgD ⁺ κ ⁺ ; Subklone IgG ⁺ κ ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁺ ; Subklone CD27 ⁺	negativ	positiv
HBL-2	MCL-Zelllinie	IgG ⁻ λ ⁺ ; Subklone IgM ⁺ IgD ⁺ λ ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁻ CD27 ⁺	negativ	positiv
Granta-519	MCL-Zelllinie	IgM ⁺ IgD ⁺ λ ⁺ ; Subklone IgG ⁺ λ ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁻ CD27 ⁺	positiv	positiv
NCEB-1	MCL-Zelllinie	IgM ⁺ IgD ⁺ λ ⁺ ; Subklone IgG ⁺ λ ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁻ CD27 ⁺	positiv	positiv
JVM-2	MCL-Zelllinie	Oberflächen Ig negativ CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD23 ⁻ CD27 ⁺	positiv	positiv

Tab. 1: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien und des Primärfalls durch FACS-Analyse und RT-PCR.

Die FACS-Analyse hat in dem primären Fall MCL001 und der Zelllinie Jeko-1 Subklone gezeigt, die für die Ersatzleichtkette VpreB positiv sind. Da die Expression von VpreB in Zusammenhang mit Autoreaktivität gebracht und als Hinweis auf Rezeptor-Editing gesehen wird (Meffre *et al.*, 2000), erscheinen diese beiden Fälle interessant.

3.1.1 *IGH*-, *IGK*- und *IGL*-Rearrangements der untersuchten MCL-Fälle

Für die Analyse der *IGH*-Rearrangements wurden Immunglobulintranskripte über RT-PCR mit einem V_H -spezifischen 5'-Primermix und einem für die konstante Region des Immunglobulins spezifischen 3'-Primer amplifiziert (Klassenwechsel-PCR). Bei dieser Analyse wurden weitere 8 primäre Fälle einbezogen (vgl. Tab. 2), für die keine vorhergehende FACS-Analyse möglich war. Zusätzlich erfolgte für alle untersuchten Fälle eine für die V_K - J_K und V_λ - J_λ Immunglobulinleichtketten Genumlagerungen spezifische RT-PCR. Anschließend wurden alle spezifischen Produkte aus dem Gel eluiert, in den TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und in *E. coli* Zellen transformiert. Die aus der Transformation hervorgegangenen Bakterienklone wurden mittels Kolonie-PCR analysiert und die aufgereinigten Produkte in eine Sequenzreaktion eingesetzt. Die Bestimmung der Rearrangements erfolgte mittels des IMGT-Programms (LeFranc, 2001; LeFranc, 2003). Bei den primären Fällen wurde zunächst das Rearrangement des Tumorklons festgestellt, welches sich vorrangig finden lässt. Da sich aufgrund der Morphologie des Mantelzell-Lymphoms auch normale B-Zellen innerhalb des tumorösen Gewebes befinden, wurden Rearrangements, die aus dem vorhandenen Hintergrund dieser normalen B-Zellen hervorgingen, aus der Analyse ausgeschlossen. In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Sequenzierung und der nachfolgenden Auswertung zusammengefasst.

A)	MCL-Fall	<i>IGH</i>	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>
	MCL001	V3-23 D6-19 J4	V4-1 J1* V4-1 J3 V4-1 J4* V4-1 J5	V7-43 J1 V7-43 J3 V7-43 J7 V7-46 J1 V7-46 J3 V7-46 J7
	MCL003	V3-23 D6-19 J4	V2-29 J4*	V3-10 J3 V8-61 J3*
	MCL002	V3-49 D3-22 J5	V5-2 J4	V1-47 J1 V2-8 J3*
	MCL214	V3-74 D6-6 J4	V4-1 J3	V1-44 J1
	MCL239	V1-2 D3-9 J6	-	-
	MCL478	V1-3 D6-19 J4	V 2D-28 J5	V8-61 J3
	MCL601	V4-34 D2-15 J6	-	-
	MCL898	V3-7 D2-21 J4	V1-27 J4	V2-11 J1
	MCL942	V1-8 D3-3 J5	V4-1 J2	-

B)	Zelllinie	IGH	IGK	IGL
	Granta-519	V4-59 D5-5 J4	V2D-30 J3*	V4-60 J3* V3-21 J1
	NCEB-1	V3-53 D2-21 J6	V1D-39 J3 V2-29 J4*	-
	JVM-2	V3-9 D6-19 J4	V1D-37 J4*	V2-14 J3 V3-21 J1*
	HBL-2	V3-11 D3-22 J1	V1-27 J4	V6-57 J3
	SP49	V4-34 D3-22 J2	V1D-33 J4*	V7-43 J3*
	SP53	V4-34 D3-22 J2	V1D-33 J4* V4-1 J1*	V7-43 J3*
	Jeko-1	V2-70 D3-3 J4	V1-17 J3* V1-27 J4* V1-27 J5* V1-5 J1 V1-8 J4* V1D-33 J3 V1D-37 J3* V1D-39 J3* V2-29 J4 V2-29 J5 V2-30 J4* V2D-28 J4* V3-20 J2 V3-20 J3 V4-1 J1* V4-1 J2 V4-1 J3 V4-1 J3* V4-1 J4* V5-2 J1* V5-2 J3*	V1-44 J3 V1-44 J3* V2-11 J3* V2-11 J6* V2-14 J3* V2-8 J3 V2-8 J3* V2-8 J6 V3-1 J3* V3-10 J3 V3-10 J6 V3-21 J3* V3-21 J6 V3-25 J3* V4-3 J3* V4-3 J3* V4-3 J3* V4-3 J7* V6-57 J3* V6-57 J6* V6-57 J6 V7-43 J6 V7-46 J6 V8-61 J6 V9-49 J6*

Tab. 2: In den Tabellen A und B sind die *IGH*-, *IGK*- und *IGL*-Rearrangements aller untersuchten MCL-Fälle aufgelistet (A: Primärfälle; B: Zelllinien). Das Sternchen * hinter einer Sequenz bedeutet Verlust des Leserasters während der V(D)J-Rekombination. In einigen Fällen konnte kein eindeutiger Tumorklon für die Leichtketten gefunden werden. Dies ist durch einen horizontalen Strich (-) dargestellt.

Tab. 3: Frequenzen der V_H-, D-Familien und J_H-Gensegmente

V _H -Gen	Häufigkeit V _H -Gen	Häufigkeit V _H -Familie
V _{H3} -23	2/16	50%
V _{H3} -7	1/16	
V _{H3} -9	1/16	
V _{H3} -11	1/16	
V _{H3} -49	1/16	
V _{H3} -53	1/16	
V _{H3} -74	1/16	
V _{H4} -34	3/16	25%
V _{H4} -59	1/16	
V _{H1} -2	1/16	18,75%
V _{H1} -3	1/16	
V _{H1} -8	1/16	
V _{H2} -70	1/16	6,25%
D _H -Gen	Häufigkeit D _H -Gen	Häufigkeit D _H -Familie
D _{H3} -22	4/16	43,75%
D _{H3} -3	2/16	
D _{H3} -9	1/16	
D _{H6} -19	4/16	25%
D _{H6} -6	1/16	
D _{H2} -21	2/16	18,75%
D _{H2} -15	1/16	
D _{H5} -5	1/16	6,25%
J _H Gen	Häufigkeit J _H -Gen	
J _{H4}	8/16	50%
J _{H6}	3/16	18,75%
J _{H2}	2/16	12,5%
J _{H5}	2/16	12,5%
J _{H1}	1/16	6,25%

In der Tabelle 3 sind die Frequenzen der nachgewiesenen *IGH*-Rearrangements aufgeführt. Hierbei wurden sowohl die einzelnen Gensegmente, wie auch die V_H- und D_H-Genfamilien gesamt betrachtet. Die dominante Genfamilie der V_H-Segmente ist mit 50% V_{H3}. Die V_{H4}-Genfamilie war mit 25% vertreten, wobei das Gen V_{H4}-34 bevorzugt auftritt. Es folgt die V_{H1}-Genfamilie mit 18,75%. Nur in einem Fall (6,25%) wurde ein Familienmitglied von V_{H2} nachgewiesen. Bei den D_H-Segmenten erwies sich die D_{H3}-Familie mit 43,75% als bevorzugte Gruppe. Darauf folgen mit 25% D_{H6}, mit 18,75% D_{H2} und mit 6,25% D_{H5}. Das J_{H4}-Gen war bei 50% der untersuchten Fälle nachweisbar und ist somit das bevorzugte J_H-Segment. Es folgen in absteigender Reihenfolge J_{H6} (18,75%), J_{H2} (12,5%), J_{H5} (12,5%) und J_{H1} (6,25%). Die Verteilung der verschiedenen Gensegmente und der Familien stimmt mit dem Repertoire normaler B-Zellen überein (Brezinschek *et al.*, 1997) und korreliert auch zu dem Repertoire, welches in Mantelzell-Lymphomen nachgewiesen wurde (Walsh *et al.*, 2003). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Anzahl der untersuchten Fälle sehr gering ist.

3.2 Immunglobulin-Klassenwechsel in Mantelzell-Lymphomen

Die FACS-Analyse der Immunglobulin Isotypen (vgl. Tab.1) hat IgG-positive Subklone in 6 der 8 untersuchten Fälle gezeigt. Um diesen ersten Hinweis auf Immunglobulin-Klassenwechsel in Mantelzell-Lymphomen zu verifizieren, wurden die Ergebnisse herangezogen, die aus der Klassenwechsel-PCR (vgl. 3.1.1) hervorgegangen sind.

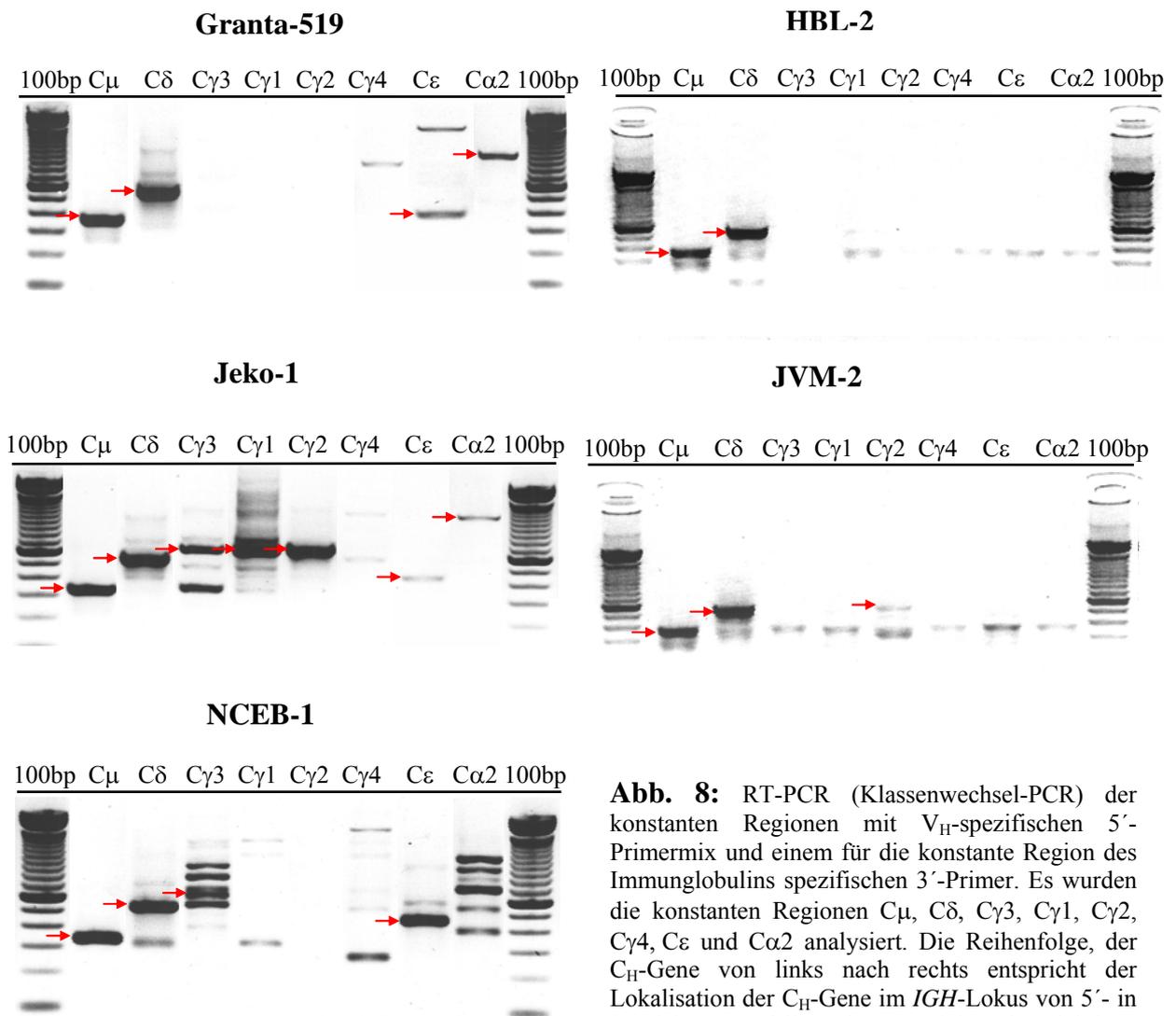


Abb. 8: RT-PCR (Klassenwechsel-PCR) der konstanten Regionen mit V_H-spezifischen 5'-Primermix und einem für die konstante Region des Immunglobulins spezifischen 3'-Primer. Es wurden die konstanten Regionen C μ , C δ , C γ 3, C γ 1, C γ 2, C γ 4, C ϵ und C α 2 analysiert. Die Reihenfolge, der C_H-Gene von links nach rechts entspricht der Lokalisation der C_H-Gene im IGH-Lokus von 5' - in 3'-Richtung. Pfeile geben Produkte der richtigen Größe an.

In der Abb. 8 sind die Resultate dargestellt, die sich anhand der PCR-Analyse ergaben.

Für die Zelllinie HBL-2 ließen sich durch die FACS-Analyse nur IgM und IgD nachweisen, was mit dem Ergebnis der PCR korreliert. Bei der Zelllinie Jeko-1 ließen sich jedoch zusätzlich zu den Amplifikaten für IgM und IgD alle untersuchten Immunglobulin-Klassen außer IgG₄ anhand der richtigen Fragmentgröße nachweisen. Bis auf HBL-2, konnte in allen anderen Fällen mindestens ein Produkt nachgewiesen werden, das aufgrund der Fragmentlänge einem klassengewechseltem Isotyp der konstanten Region entspricht. Alle PCR-Produkte, die der richtigen Fragmentlänge (Pfeil) entsprachen wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in den TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und in *E. coli* Zellen transformiert. Die aus der Transformation hervorgegangenen Bakterienklone wurden mittels Kolonie-PCR analysiert und die aufgereinigten Produkte in eine Sequenzreaktion eingesetzt. Erst die Sequenzierung der Produkte ließ es zu, falsch positive Amplifikate auszuschließen. Die Produkte, die durch die Sequenzierung nicht bestätigt werden konnten sind daher auch nicht in der Tabelle 4 aufgeführt. Da sich aufgrund der Morphologie des Mantelzell-Lymphoms auch normale B-Zellen innerhalb des tumorösen Gewebes befinden, diente die Sequenzierung bezüglich der primären Fälle dazu, die aus dem normalen B-Zell Hintergrund hervorgegangenen Fragmente, von denen des Tumorklons zu unterscheiden. Das Tumor-spezifische Rearrangement sollte bei der Sequenzanalyse aufgrund der Klonalität wiederholt auftreten und kann so von den Rearrangements der normalen B-Zellen unterschieden werden.

Primärfall	C _H -Region	Zelllinie	C _H -Region
MCL001	C _μ , C _δ	Granta-519	C _μ , C _{α1}
MCL002	C _{γ3}	NCEB-1	C _μ
MCL003	C _μ	JVM-2	C _μ , C _δ , C _{γ3}
MCL214	C _μ	HBL-2	C _μ , C _δ
MCL239	C _{γ3}	SP49	C _{γ2}
MCL478	C _μ	SP53	C _μ , C _δ , C _{γ1} , C _{γ2}
MCL601	C _μ	Jeko-1	C _μ , C _{γ1} , C _{γ3}
MCL898	C _μ , C _δ		
MCL942	C _{α2}		

Tab. 4: Liste der konstanten Regionen, die durch Sequenzanalyse bestätigt wurden. Die Identität der konstanten Regionen wurde mittels des BLAST-Programms (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) gewährleistet.

In der Tab. 4 sind die Ergebnisse der Analyse von C_H-Regionen mit PCR und der nachfolgenden Sequenzanalyse der konstanten Regionen dargestellt. Bei den primären Fällen besaßen 3 von 9 Fällen eine konstante Region, die aus einem Klassenwechsel hervorgegangen ist. Bei den Zelllinien zeigten 5 von 7 untersuchten Fällen klassengewechselte Immunglobuline. Einige PCR-Produkte ließen sich allerdings nicht in der Sequenzanalyse als C_H-Regionen bestätigen, da laut einer BLAST-Analyse ein falsches DNA-Fragment amplifiziert wurde und ein PCR-Artefakt (unspezifische Bindung der Primer) darstellt.

Die Abbildung 9 zeigt einen Sequenzvergleich der Fälle, bei denen zusätzlich zu IgM und/oder IgD auch ein klassengewechselter Isotyp nachweisbar war. Dieser Vergleich zeigt, dass tatsächlich die Sequenzbereiche bis zum 3'-Ende des J_H-Segmentes übereinstimmen und verschiedene konstante Regionen sich anschließen.

In der Literatur ist beschrieben, dass eine EBV-Infektion Aktivitäten induzieren kann, die Immunglobulin-Klassenwechsel hervorrufen (He *et al.*, 2003; Li und Maizels, 1999). Für die EBV-positive Zelllinie NCEB-1 konnte jedoch kein Immunglobulin-Klassenwechsel auf Sequenzebene bestätigt werden. Dennoch lässt sich die Aussage treffen, dass einige Mantelzell-Lymphome unabhängig von einer EBV-Infektion Immunglobulin-Klassenwechsel aufweisen. Dabei stellen sich die klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53 als besonders interessante Kandidaten heraus, da sie aus demselben Patienten stammen und somit klonal sein sollten.

Sequenz	CDR3-Region	3' J _H -Segment	Konstante Region
Granta_μ	...TGTGCGAGAG T TGGCTACAGGTCGG AGT ACTACTTTGACTACTGG	GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	GGAGTGCATCCGCCCAACC...μ
Granta_α2	...TGTGCGAGAG T TGGCTACAGGTCGG AGT ACTACTTTGACTACTGG	GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	CATCCCCGACCAGCCCCAAG...α2
JVM-2_μ	...TGTGCAAAAGATA T GCAGGG AGCAGTGGCAGG GGG CGTTGACTACTGG	GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	GGAGTGCATCCGCCCAACC...μ
JVM-2_δ	...TGTGCAAAAGATA T GCAGGG AGCAGTGGCAGG GGG CGTTGACTACTGG	GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	CACCCACCAAGGCTCCGGAT...δ
JVM-2_γ3	...TGTGCAAAAGATA T GCAGGG AGCAGTGGCAGG GGG CGTTGACTACTGG	GGCCAGGGAACCCTGGACACCGTCTCCTCAG	CTTCCACCAAGGCCCATCG...γ3
Jeko-1_μ	...TGTGCACGGATAC G GGGTTTTGGAGTGGTTA ACCT CCCTGACTACTGG	GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	GGAGTGCATCCGCCCAACC...μ
Jeko-1_γ1	...TGTGCACGGATAC G GGGTTTTGGAGTGGTTA ACCT CCCTGACTACTGG	GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	CTTCCACCAAGGCCCATCG...γ1
Jeko-1_γ3	...TGTGCACGGATAC G GGGTTTTGGAGTGGTTA ACCT CCCTGACTACTGG	GGCCAGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	CTTCCACCAAGGCCCATCG...γ3

Variable V_H-Regionkonstante C_H-Region

Abb. 9: CDR3-Regionen und Übergänge in die konstanten Regionen. Dieser Vergleich zeigt, dass unterschiedliche konstante Regionen mit der gleichen variablen Region verbunden sind und somit auf Immunglobulin-Klassenwechsel hinweisen. Die ersten 20 bp der konstanten Regionen sind in fett dargestellt.

3.2.1 Immunglobulin-Klassenwechsel in den klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53

Schon bei der FACS-Analyse haben sich die beiden klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53 voneinander unterschieden. Die Hauptpopulation von SP49 war IgG⁺ wohingegen SP53 einen IgM⁺/IgD⁺ Hauptklon und eine IgG⁺-Subpopulation aufwies (vgl. Tab.1). Die anschließende RT-PCR Analyse korreliert mit den FACS-Daten. In der Abb. 10 sieht man, dass für SP49 nur ein spezifisches Fragment für IgG₂ nachgewiesen werden konnte. Bei der Zelllinie SP53 jedoch findet man spezifische Fragmente für IgM, IgD, sowie für IgG₁ und IgG₂.

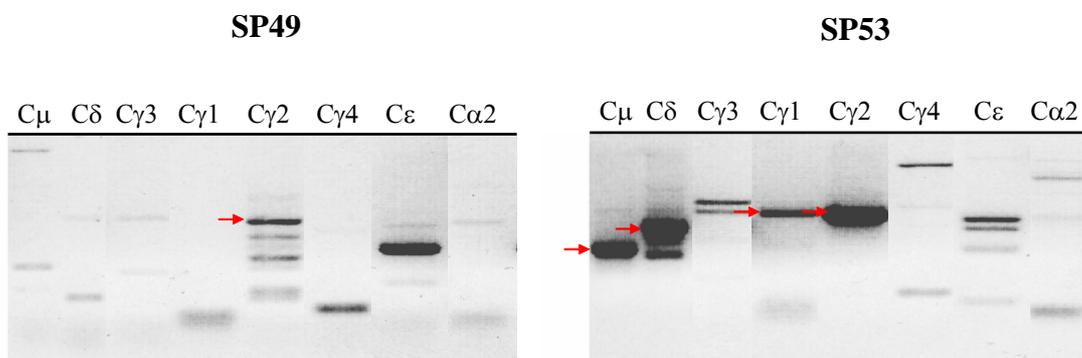


Abb. 10: RT-PCR (Klassenwechsel-PCR) der konstanten Regionen. Klonal verwandte Zelllinien. Pfeile weisen auf spezifische Fragmente der richtigen Größe hin.

In Anbetracht der Tatsache, dass hier klonal verwandte Zelllinien untersucht wurden, ist dies ein erster möglicher Hinweis auf stattfindenden Immunglobulin-Klassenwechsel in Mantelzell-Lymphomen. Um diese Aussage zu untermauern, wurden auch hier die spezifischen Fragmente eluiert, in den TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und in *E. coli* Zellen transformiert. Die aus der Transformation hervorgegangenen Bakterienklone wurden mittels Kolonie-PCR analysiert und die aufgereinigten Produkte in eine Sequenzreaktion eingesetzt. Durch einen Sequenzvergleich wurden die Übergänge der variablen Region zur konstanten Region betrachtet (vgl. Abb. 11). Hierbei zeigt sich, dass die CDR3-Regionen beider Zelllinien bis auf eine Mutation exakt übereinstimmen, was eine zusätzliche Bestätigung der klonalen Verwandtschaft dieser Linien ist. Auch die Sequenzen beider Zelllinien, die den IgG₂ Isotypen aufweisen, stimmen überein. Beim Vergleich der kompletten Sequenzen der konstanten Regionen (vgl. Abb. 12) wird diese Übereinstimmung noch verdeutlicht. Bis auf zwei Nukleotidunterschiede stimmen die Sequenzen überein. Damit ist der Hinweis auf stattfindenden Klassenwechsel bestätigt.

Sequenz	CDR3-Region	3' J _H -Segment	Konstante Region
SP53_μ	...TCTGCGAGA AT TGTCTATGATAATCGGG ATCTTTACCGACTGGG CTGGTACTTCGATCTCTGG	GGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAG	GGAGTGCATCCGCCCAACC . . μ
SP53_δ	...TCTGCGAGA AT TGTCTATGATAGTCGGG ATCTTTACCGACTGGG CTGGTACTTCGATCTCTGG	GGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAG	CACCCACCAAGGCTCCGGAT . . δ
SP53_γ1	...TCTGCGAGA AT TGTCTATGATAGTCGGG ATCTTTACCGACTGGG CTGGTACTTCGATCTCTGG	GGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAG	CCTCCACCAAGGGCCCATCG . . γ1
SP53_γ2	...TCTGCGAGA AT TGTCTATGATAGTCGGG ATCTTTACCGACTGGG CTGGTACTTCGATCTCTGG	GGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAG	CCTCCACCAAGGGCCCATCG . . γ2
SP49_γ2	...T G TGCGAGA AT TGTCTATGATAGTCGGG ATCTTTACCGACTGGG CTGGTACTTCGATCTCTGG	GGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAG	CCTCCACCAAGGGCCCATCG . . γ2

Variable V_H-Regionkonstante C_H-Region

Abb. 11: CDR3-Regionen und Übergänge in die konstanten Regionen. Dieser Vergleich zeigt, dass unterschiedliche konstante Regionen mit der gleichen variablen Region verbunden sind und somit auf Immunglobulin-Klassenwechsel hinweisen. Die ersten 20 bp der konstanten Regionen sind in fett dargestellt. Das rot und fett dargestellte Basenpaar weist auf den einzigen Unterschied innerhalb der CDR3-Region im Vergleich der beiden Zelllinien hin.



Abb. 12: Alignment (Multalign: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) der konstanten IgG₂-Regionen von SP49 und SP53.

3.3 Somatische Hypermuation in Mantelzell-Lymphomen

Somatische Hypermuation findet normalerweise in den Keimzentren der Sekundärfollikel statt (vgl. Abb. 4). Da Mantelzell-Lymphome aus Zellen hervorgehen, die einem prä-Keimzentrumsstadium entsprechen, würde man in diesen Zellen keine Mutationen erwarten. Jedoch haben einige Gruppen zeigen können, dass somatische Hypermuation in Mantelzell-Lymphomen durchaus vorkommen kann (Walsh *et al.*, 2003; Du *et al.*, 1997; Thorselius *et al.*, 2002; Babbage *et al.*, 2004). Innerhalb dieser Doktorarbeit wurde aus diesem Grund auch der Mutationsstatus der untersuchten Fälle bestimmt.

In den Tabellen 5 und 6 sind die Ergebnisse der Mutationsanalyse zusammengefasst. Bei dieser Analyse wurden alle Fälle als mutiert betrachtet, die eine Mutationsfrequenz ≥ 2 besitzen, da dies nicht auf die normale Fehlerrate der Platinum *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen) zurückgeführt werden kann. Die Fehlerrate liegt bei 1×10^4 pro bp und PCR-Zyklus. Die Klassenwechsel-PCR erfolgte bei 45 Zyklen und die darauffolgende Kolonie-PCR bei 35 Zyklen. Somit liegt die *Taq*-Fehlerrate in diesem Fall bei 0,8%.

Die Sequenzvariabilität innerhalb des V_H -Bereiches ist ungleichmäßig verteilt (Kocks und Rajewsky, 1989). Die CDR-Regionen (CDRs, engl.: *complementarity determining regions*) stellen besonders variable Regionen innerhalb des V_H -Bereiches dar (Wagner *et al.*, 1995), wohingegen die FR-Regionen (FRs, engl.: *framework regions*) die strukturelle Basis des V_H -Bereiches sind (Chitarra *et al.*, 1993). Somit führen Austauschmutationen, oder auch R-Mutationen genannt (engl.: *replacement*) innerhalb der CDR-Regionen dazu, die Variabilität des Antikörpers erhöhen, wobei R-Mutationen innerhalb der FR-Regionen sich negativ auf die Stabilität des Antikörpers auswirken können (Klein *et al.*, 1998a). Stille Mutationen (S-Mutationen; engl.: *silent*) haben keine Auswirkung auf die Stabilität. Das Verhältnis der R-Mutationen zu den S-Mutationen (R/S-Verhältnis) in den FR-Regionen von produktiven VDJ-Rearrangements lässt darauf schließen, ob eine Selektion in Richtung FR-Regionen stattgefunden hat, die keine nachteiligen Mutationen tragen (Klein *et al.*, 1998a). Liegt eine zufällige Mutagenese vor, erwartet man ein theoretisches R/S-Verhältnis von 3 für die produktiven Rearrangements (Kocks und Rajewsky, 1989). Niedrigere Werte als 3, lassen somit auf eine Selektion schließen.

MCL-Fall	V _H -Gen	N(V _H /D _H) [nt]	D _H -Gen	Potentiell funktionell	N(D _H /J _H) [nt]	J _H -Gen	Länge CDR3[aa]	Mut. FR1- 3	R/S FR1-3	Mut. CDR1-2	R/S CDR1-2	Mutations- frequenz (%)
001	3-23	-	6-19	Ja	8	4	15	3	3/0	-	-	1,23 _(3/244)
002	3-49	5	3-22	Ja	4	5	16	4	4/0	2	2/0	3,20 _(8/250)
003	3-23	17	6-19	Ja	-	4	19	5	4/1	2	1/1	2,87 _(7/244)
214	3-74	6	6-6	Ja	5	4	11	3	2/1	-	-	1,23 _(3/244)
239	1-2	5	3-9	Ja	15	6	22	15	9/6	3	2/1	6,59 _(18/273)
478	1-3	2	6-19	Ja	5	4	12	15	10/5	3	2/1	6,59 _(18/273)
601	4-34	-	2-15	Ja	4	6	20	2	2/0	-	-	0,84 _(2/238)
898	3-7	12	2-21	Ja	-	4	12	1	0/1	2	2/0	1,23 _(3/244)
942	1-8	7	3-3	Ja	14	5	17	20	10/10	8	5/3	10,26 _(28/273)

Tab. 5: VDJ-Rearrangements der untersuchten primären MCL-Fälle und Berechnung der Mutationsfrequenzen. R/S gibt das Verhältnis von *Replacement* zu *Silent* Mutationen an. Die Mutationsfrequenzen ≥ 2 , die nicht allein auf die Fehlerrate der Platinum *Taq* DNA-Polymerase (0,8%) zurückzuführen sind, sind fettgedruckt dargestellt.

MCL-Fall	V _H -Gen	N(V _H /D _H) [nt]	D _H -Gen	Potentiell funktionell	N(D _H /J _H) [nt]	J _H -Gen	Länge CDR3[aa]	Mut. FR1-3	R/S FR1- 3	Mut. CDR1-2	R/S CDR1-2	Mutations- frequenz (%)
Granta-519	4-59	1	5-5	Ja	3	4	13	-	-	-	-	0 _(0/238)
NCEB-1	3-53	15	2-21	Ja	3	6	17	2	2/0	4	3/1	2,49 _(6/241)
JVM-2	3-9	7	6-19	Ja	3	4	14	4	2/2	-	-	1,64 _(4/244)
HBL-2	3-11	6	3-22	Ja	-	1	11	6	3/3	3	1/2	3,69 _(9/244)
SP49	4-34	2	3-22	Ja	16	2	19	Fortlaufende somatische Hypermutation (1-6 Mutationen)				
SP53	4-34	2	3-22	Ja	16	2	19	Fortlaufende somatische Hypermutation (1-8 Mutationen)				
Jeko-1	2-70	1	3-3	Ja	4	4	14	1	1/0	-	-	0,38 _(1/264)

Tab. 6: VDJ-Rearrangements der untersuchten primären MCL-Fälle und Berechnung der Mutationsfrequenzen. R/S gibt das Verhältnis von *Replacement* zu *Silent* Mutationen an. Die Mutationsfrequenzen ≥ 2 , die nicht allein auf die Fehlerrate der Platinum *Taq* DNA-Polymerase (0,8%) zurückzuführen sind, sind fettgedruckt dargestellt.

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Mutationsanalyse der primären Fälle zusammengefasst. Anhand der errechneten Mutationsfrequenzen sind 5 der 9 Fälle mutiert, wobei die Fälle 239, 478, und 942 stark mutiert sind (Mutationsfrequenzen bei 6,6% und 10,3%). Die restlichen Fälle weisen teils auch Mutationen auf, die aber aufgrund der geringen Frequenz nicht eindeutig der somatischen Hypermutation zuzuschreiben sind. Bei den primären Fällen besaßen 6 von 9 und bei den Zelllinien 3 von 7 ein R/S-Verhältnis, was niedriger als 3 war und daher vermuten lässt, dass diese Fälle eine Selektion durch ein Antigen erfahren haben.

In der Literatur ist beschrieben, dass die CDR3-Längen von MCL-Fällen mit mutierten V_H -Regionen im Mittel kürzer sind, als die von Fällen mit unmutierten V_H -Regionen (Kienle *et al.*, 2003). Diesbezüglich wurden auch die CDR3-Längen der in der Tabelle 5 dargestellten primären Fälle untersucht. Dabei ergab sich eine mittlere CDR3-Länge von 18 Aminosäuren [aa] bei den mutierten und 14,5 Aminosäuren bei den unmutierten Fällen. Bei den Zelllinien (Tab. 6) tragen vier mutierte V_H -Region-Gene, wobei die klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53 fortlaufende somatische Hypermutation aufwiesen (vgl. Kapitel 3.3.1). Die CDR3-Längen lagen bei den mutierten Linien im Mittel bei 16,5 Aminosäuren und bei den unmutierten bei 13,7. Es korrelieren demnach längere CDR3-Regionen zu einem höheren Mutationsstatus.

Ebenfalls bezogen auf die Länge der CDR3-Regionen konnte ein Zusammenhang zwischen langen *IGH*-CDR3-Regionen und dem Vorhandensein von autoreaktiven oder polyreaktiven Antikörpern nachgewiesen werden (Ichiyoshi und Casali, 1994; Crouzier *et al.*, 1995; Klonowski *et al.*, 1999; Aguilera *et al.*, 2001). Ebenso scheinen vor allem positiv geladene Aminosäuren innerhalb der CDR3-Region, ein möglicher Hinweis auf Autoreaktivität zu sein (Meffre *et al.*, 2004; van Es *et al.*, 1991; Ravirajan *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1992). Ein weiteres Merkmal von polyreaktiven Antikörpern ist eine erhöhte Anzahl an aromatischen Aminosäuren, wie Tyrosin (Ichiyoshi und Casali, 1994; Crouzier *et al.*, 1995).

Primäre Fälle		Zelllinien	
MCL	CDR3-Region	MCL	CDR3-Region
001	CA K ELIAVALSN Y FD Y W	Granta-519	CA R VG Y R S E Y YFD Y W
002	CT R DTN Y NDNSG Y FL H NW	NCEB-1	CA R D Y PVSD F Y Y Y GLD V W
003	CA K ASPTGEVQSSG W Y YFD Y W	JVM-2	CA K DMQGA V AGG V D Y W
214	CAS R ASIAAL F Y W	HBL-2	CA R GT H Y YD I R V W
239	CA R EPVL H G Y Y R SV R Y Y H Y G MDLW	SP49	CA R I V Y DS R D L Y R L G W Y FDLW
478	CA R GGIA V AGIS Y W	SP53	SA R I V Y DS R D L Y R L G W Y FDLW
601	CA R GDIVVV V A A R G Y Y Y DMD V W	Jeko-1	CA R I R G F G V V N L P D Y W
898	CA R DL R H S VTES Y W		
942	CA R R G NE F W K D Y P R GLADW		

Tab. 7: Auflistung der Aminosäureabfolge der *IGH*-CDR3 Regionen der untersuchten Mantelzell-Lymphomfälle. Die basischen Aminosäuren Arginin (R), Lysin (K) und Histidin (H) sind rot und fett dargestellt. Die aromatische Aminosäure Tyrosin (Y) ist blau und fett dargestellt.

Etwa 30% der autoreaktiven Zellen, die in einer aktuellen Arbeit bezüglich der positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der CDR3-Regionen untersucht wurden, besitzen 2 oder mehr basische Aminosäuren im Vergleich zu etwa 12% in den normalen B-Zellen (Meffre *et al.*, 2004). Bei den Mantelzell-Lymphomen besitzen 62,5% der untersuchten Fälle 2 oder mehr der basischen Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin, obgleich kein direkter Zusammenhang zwischen der Länge und gleichzeitigem Auftreten dieser Aminosäuren zu bestehen scheint. Man erkennt auch eine Tendenz, dass vor allem die CDR3-Regionen, die zu stark mutierten Fällen korrespondieren (Primäre Fälle MCL239, MCL942 und die Zelllinien SP49 und SP53) eine erhöhte Anzahl an basischen Aminosäuren aufweisen. Somit ist es denkbar, dass ein Zusammenhang zwischen somatischer Hypermutation und Autoreaktivität bestehen könnte.

3.3.1 Nachweis von fortlaufender somatischer Hypermuation durch Erstellung eines Stammbaums

Anhand einer detaillierten Mutationsanalyse ließ sich in einigen Fällen fortlaufende somatische Hypermuation nachweisen. In den Zelllinien SP49 und SP53 war es anhand der Mutationen möglich, Stammbäume zu erstellen (Abb. 13).

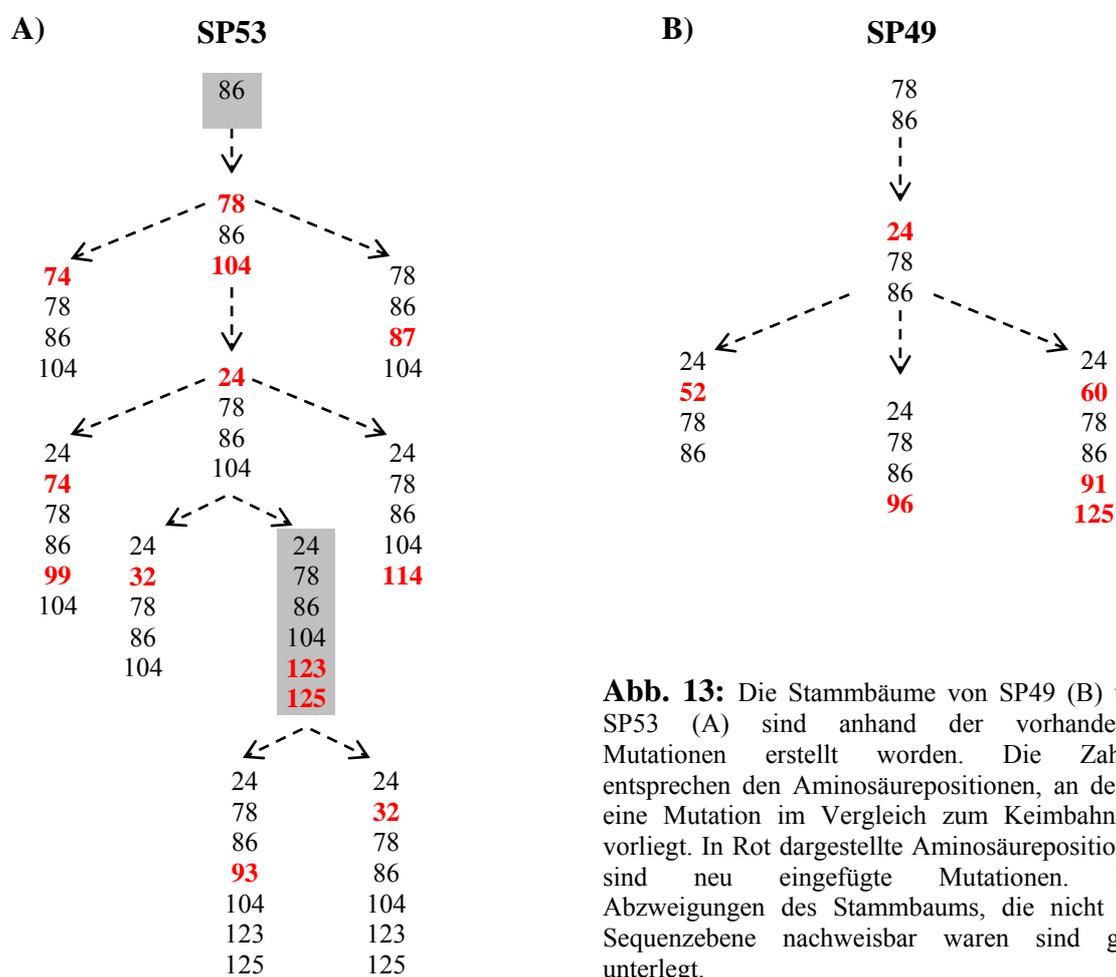


Abb. 13: Die Stammbäume von SP49 (B) und SP53 (A) sind anhand der vorhandenen Mutationen erstellt worden. Die Zahlen entsprechen den Aminosäurepositionen, an denen eine Mutation im Vergleich zum Keimbahngen vorliegt. In Rot dargestellte Aminosäurepositionen sind neu eingefügte Mutationen. Die Abzweigungen des Stammbaums, die nicht auf Sequenzebene nachweisbar waren sind grau unterlegt.

Im Vergleich von SP49 und SP53 zueinander lässt sich die klonale Verwandtschaft erkennen, da teilweise dieselben Mutationen innerhalb beider Zelllinien nachweisbar sind (24, 78, 86 und 125). Da diese Analyse eine eindeutige logische Abfolge der Mutationen ergab, ist in diesem Fall der Prozess der somatischen Hypermutation während der Tumorbildung aktiv gewesen.

Im Kapitel 3.3 wurde der V_H -Mutationsstatus der untersuchten Fälle dargestellt. Dabei zeigte der primäre Fall MCL001 nur 3 Mutationen im V_H -Gen. Bei der Mutationsanalyse der λ -Leichtketten desselben Falls erwiesen sich diese als insgesamt stark mutiert. Es folgte eine detaillierte Analyse dieser Mutationen. In dem primären Fall MCL001 war es ebenso wie in den Zelllinien SP49 und SP53 möglich, einen Mutationsstammbaum zu erstellen (Abb. 14). Aufgrund der hohen Mutationsfrequenz konnten jedoch nicht alle Sequenzen direkt miteinander in eine logische Reihenfolge gebracht werden. Daher wurden mögliche logische Verbindungen (in grau dargestellt) in die Graphik mit einbezogen. Daraufhin ließen sich die Sequenzen in einem einheitlichen Stammbaum darstellen. Auch in dem primären Fall zeigt sich anhand des Stammbaums, dass sich hier eine fortlaufende somatische Hypermutation ereignet hat.

Der Nachweis fortlaufender somatischer Hypermutation in Mantelzell-Lymphomen ist normalerweise charakteristisch für Keimzentrums-B-Zellen (László *et al.*, 1999) und widerspricht somit dem prä-Keimzentrums-Ursprung des Mantelzell-Lymphoms (Welzel *et al.*, 2001). Es ist anhand dieses Ergebnisses denkbar, dass diese Mantelzell-Lymphomfälle eine Selektion durch Antigen erfahren haben.

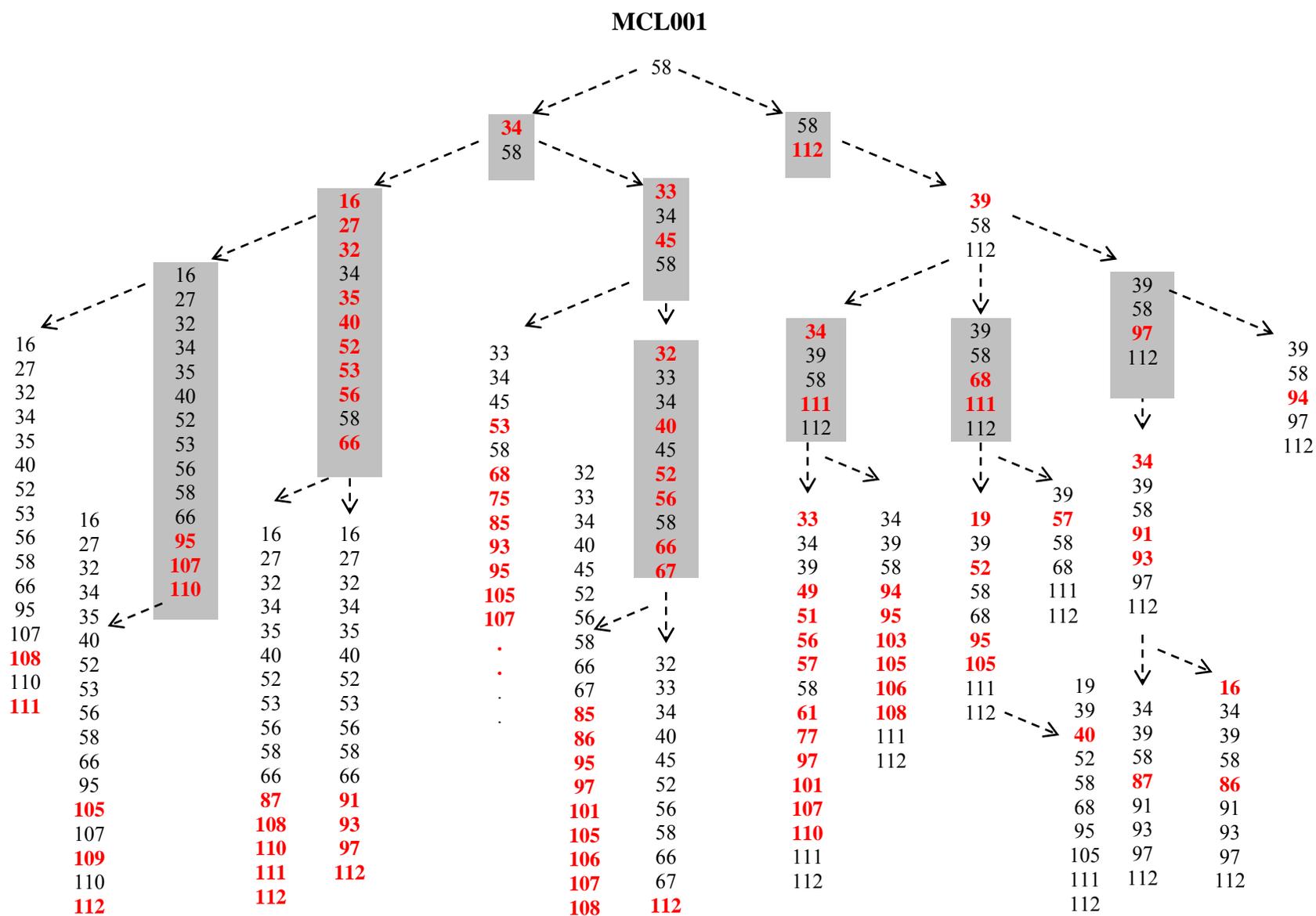


Abb. 14: Der Stammbaum des primären Falls MCL001 ist anhand der vorhandenen Mutationen erstellt worden. Die Zahlen entsprechen den Aminosäurepositionen, an denen eine Mutation im Vergleich zum Keimbahngen vorliegt. In Rot dargestellte Aminosäurepositionen sind neu eingefügte Mutationen. Die Abzweigungen des Stammbaums, die nicht auf Sequenzebene nachweisbar waren sind grau unterlegt.

3.4 AID und BCL6 Analyse

Da die vorausgegangenen Versuche eindeutige Hinweise dafür gaben, dass sowohl somatische Hypermutation, als auch Immunglobulin-Klassenwechsel in Mantelzell-Lymphomen nachweisbar sind, sollten die Daten über eine RT-PCR-Strategie bestätigt werden. Dabei wurden *AID* („*activation induced deaminase*“) spezifische Primer genutzt, die zum Nachweis der Transkripte dienten und das Expressionsmuster somit untersucht werden konnte. Das durch *AID* kodierte Protein ist essentiell für somatische Hypermutation, wie auch Immunglobulin-Klassenwechsel (Honjo *et al.*, 2004). Ebenso wurde die Expression des transkriptionellen Repressors *BCL6* in die Untersuchung mit einbezogen, der an der Bildung von Keimzentren beteiligt ist (Ye *et al.*, 1997). Überexpression von *BCL6* führt zu einer Blockade der Plasmazell-Differenzierung (Albagli *et al.*, 1999). Erst wenn die *BCL6*-vermittelte Repression des Plasmazell-spezifischen Gens *Blimp-1* runterreguliert wird, können ausdifferenzierte Plasmazellen die Keimzentren verlassen (Melnick, 2005; Calame *et al.*, 2003).

Die RT-PCR-Ergebnisse (vgl. Abb. 15A) zeigen, dass 5 von 9 primären Fällen und alle Zelllinien *AID* exprimieren (der Nachweis der Expression von *AID* bei SP53 ist in diesem Gelbild nicht dargestellt, konnte aber in vorausgegangenen Experimenten, die noch nicht alle Fälle beinhalteten, wiederholt reproduziert werden). Eine quantitative Aussage lässt sich jedoch an dieser Stelle nicht treffen, da keine Normalisierung der cDNAs vorlag (vgl. Abb. 15B). Die Integrität der verwendeten cDNAs konnte jedoch durch Amplifikation eines GAPDH cDNA-Fragments gewährleistet werden. Bei den EBV-positiven Zelllinien wurde erwartet, *AID* Expression zu finden, da LMP1 („*latent membrane protein*“), das wie EBNA1 auch von EBV kodiert wird, zu einer Induktion der *AID*-Expression führen kann (He, B. *et al.*, 2003). Überraschenderweise war jedoch in allen Zelllinien eine *AID*-Expression nachweisbar, was zeigt, dass eine Hochregulierung der *AID*-Expression in Mantelzell-Lymphomen unabhängig vom EBV-Infektionsstatus ist.

Die Expression für das Keimzentrum-spezifische *BCL6*-Transkript konnte in 8 der 9 untersuchten Primärfälle und 5 der 7 Zelllinien nachgewiesen werden. Die EBV-positiven Zelllinien JVM-2 und NCEB-1 zeigten keine *BCL6*-Expression. Da *AID* normalerweise nur in den Keimzentren exprimiert wird und *BCL6* einen Keimzentrumsmarker darstellt, ist die vorhandene *AID* Expression hier offensichtlich auf die EBV Infektion zurückzuführen.

Die ebenfalls EBV-positive Zelllinie Granta-519 zeigt eine *BCL6*-Expression, die mit der vorliegenden *AID* Expression korreliert. Die 3 Primärfälle MCL898, MCL942 und MCL003 zeigen zwar eine *BCL6*-Expression, aber keine *AID*-Expression. Das würde bedeuten, dass die Zellen im Keimzentrum vorlagen, aber keine Grundvoraussetzung für somatische Hypermutation oder Klassenwechsel gegeben waren. Da der Fall MCL942 allerdings stark mutiert und klassengewechselt, und MCL003 leicht mutiert war, müssen die Mutationen und der Klassenwechsel zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden haben, in dem *AID* exprimiert wurde. Zur Bestätigung der RT-PCR Daten folgte eine Western Blot Analyse (Abb. 16) für 5 Fälle. Die verbleibenden Fälle konnten aus Materialmangel nicht in die Analyse mit einbezogen werden. Der Primärfall MCL001 und die Jeko-1 Zelllinie zeigten eine eindeutige Expression von *AID* und eine schwächere Expression für *BCL6*. SP49 zeigte für beide untersuchten Proteine nur eine schwache Bande. Die Zelllinien Granta-519 und HBL-2 wiesen keine Signale auf, obwohl durch die RT-PCR eine Expression von *AID*, sowie von *BCL6* nachweisbar war. Der Widerspruch könnte durch die geringere Sensitivität der Western Blot Methode gegenüber der RT-PCR Methode erklärt werden, sodass eine mögliche Protein-Expression in diesen Fällen nicht ausgeschlossen werden kann. Alternativ wäre zu diskutieren, dass vorhandene *AID*- und *BCL6*-mRNA nicht translatiert wurde.

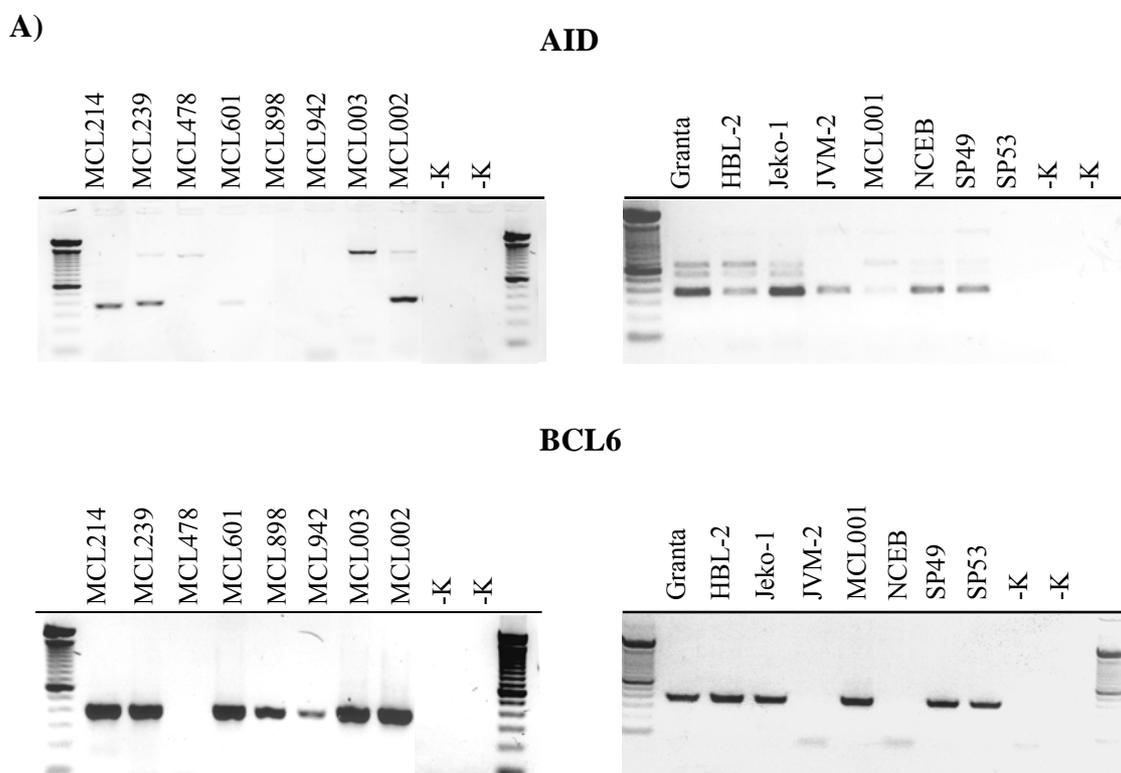


Abb. 15A: RT-PCR mit *AID* und *BCL6* spezifischen Primern. Als Marker wurde die 100bp-Leiter (Invitrogen) eingesetzt.

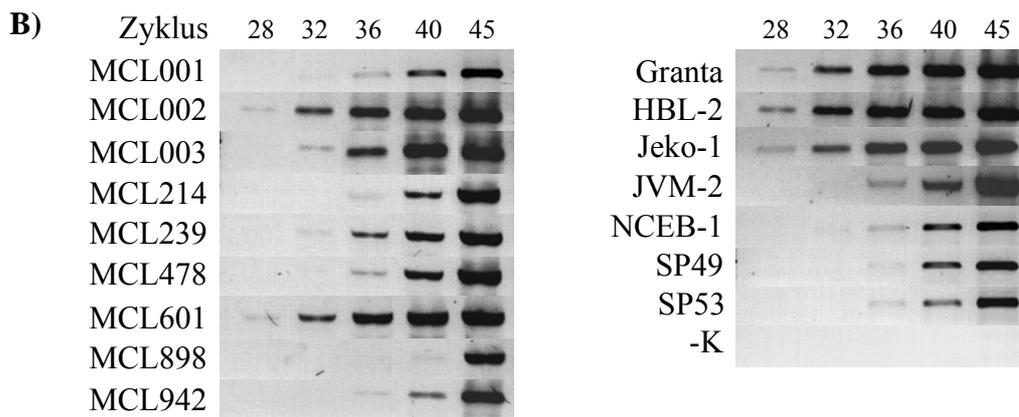


Abb. 15B): Semiquantitative RT-PCR mit *GAPDH* spezifischen Primern. Es wurden jeweils bei Zyklus 28, 32, 36, 40 und 45 je 5 μ l des PCR-Ansatzes entnommen und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

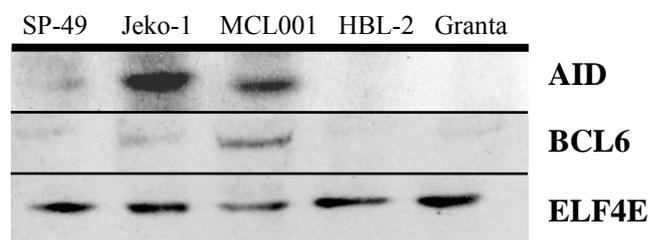


Abb. 16: Western Blot mit AID und BCL6 spezifischen Antikörpern. Die Normalisierung der Proteine wurde durch den Transkriptionsfaktor Elf4E nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt diese Analyse unter Einbeziehung der FACS-, und Sequenzdaten die Aussage zu, dass bei einigen Mantelzell-Lymphomen die Grundvoraussetzungen für somatische Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel gegeben sind und sich diese Prozesse auch eindeutig nachweisen lassen.

3.5 Rezeptor-Editing in Mantelzell-Lymphomen

3.5.1 Intraklonale Diversität der Leichtketten in der Jeko-1 Zelllinie

Bei der Analyse der Immunglobulinsequenzen von den untersuchten Mantelzell-Lymphomen, erwies sich die Jeko-1 Zelllinie als Sonderfall. Es konnte ein einziges Rearrangement für die schwere Kette, aber etliche Leichtketten Rearrangements nachgewiesen werden (vgl. Tab. 2). Durch die FACS-Analyse (vgl. Tab. 1) zeigte sich, dass die Jeko-1 Zelllinie κ -Leichtketten auf ihrer Oberfläche exprimiert und nur vereinzelt Zellen auftreten, die λ -Leichtketten aufweisen. Auf Sequenzebene zeigten sich 21 verschiedene κ -Leichtketten und 25 verschiedene λ -Leichtketten. Bei beiden Leichtkettentypen konnten sowohl funktionelle, wie nicht funktionelle Rearrangements auf Sequenzebene nachgewiesen werden.

3.5.1.1 Sekundäre Rekombination der Leichtketten in der Jeko-1 Zelllinie

Die Betrachtung der vorausgegangenen Daten führt zu der Hypothese, dass bei der Jeko-1 Zelllinie offensichtlich eine bestehende Leichtkette sukzessive durch eine weitere Leichtkette ausgetauscht wurde. Diese Art des Leichtkettenaustauschs ist ein typisches Beispiel für ein sekundäres Rekombinationsereignis wie Rezeptor-Editing.

Ein Hinweis darauf, dass Rezeptor-Editing stattgefunden hat ist das bevorzugte Auftreten von 5'-gelegenen V-Segmenten und 3'-gelegenen J-Segmenten, da durch jedes sekundäre Rekombinationsereignis ein stromaufwärts liegendes V-Segment und ein stromabwärts liegendes J-Segment das bestehende VJ-Rearrangement ersetzen. Dieser Effekt ist vor allem bei den λ -Leichtketten zu beobachten, da die stromaufwärtsgelegenen $V\lambda$ -Familien vorrangig mit einem stromabwärtsgelegenen $J\lambda$ -Segment assoziiert sind (vgl. Tab. 8).

A) Auflistung der Rearrangements von Jeko-1

<i>IGH</i>	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>
V2-70 D3-3 J4	V4-1 J1*	V3-1 J3
	V4-1 J2	V4-3 J3*
	V4-1 J3	V4-3 J3*
	V4-1 J3*	V4-3 J3*
	V4-1 J4*	V4-3 J7*
	V5-2 J1*	V2-8 J3
	V5-2 J3*	V2-8 J3*
	V1-5 J1	V2-8 J6
	V1-8 J4*	V3-10 J3
	V1-17 J3*	V3-10 J6
	V2-30 J4*	V2-11 J3*
	V3-20 J2	V2-11 J6*
	V3-20 J3	V2-14 J3*
	V1-27 J4*	V3-21 J3*
	V1-27 J5*	V3-21 J6
	V2-29 J4	V3-25 J3*
	V2-29 J5	V7-43 J6
	V1D-39 J3*	V1-44 J3
	V1D-37 J3*	V1-44 J3*
	V1D-33 J3	V7-46 J6
	V2D-28 J4*	V9-49 J6*
		V6-57 J3*
		V6-57 J6
		V6-57 J6*
		V8-61 J6

Reihenfolge der V_{λ} - und V_{κ} -Leichtketten gene
Stromabwärts ————— stromaufwärts

B) Berechnung des *in frame/out of frame* Verhältnisses

	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>
Anzahl <i>in frame/out of frame</i> Rearrangements	8/13	10/15
<i>in frame/out of frame</i> Verhältnis	0,615:1	0,6:1

Tab. 8: A) enthält alle verschiedenen Rearrangements, die für die Jeko-1 Zelle gefunden wurden. Mehrfach auftretende Rearrangements unterscheiden sich in ihrer Verbindungssequenz. Das Sternchen * hinter einer Sequenz bedeutet Verlust des Leserasters (*out of frame*). B) zeigt das Verhältnis der funktionellen zu den nichtfunktionellen Rearrangements.

Ein weiterer Hinweis auf Rezeptor-Editing kann sich in dem Verhältnis von funktionellen (*in frame*) zu nicht funktionellen (*out of frame*) Rearrangements widerspiegeln. Abhängig vom Leseraster sind normalerweise 1/3 der Rearrangements funktionell und die restlichen 2/3 nicht funktionell. Wenn das erste Allel kein produktives Rearrangement hervorbringt, wird das zweite Allel rearrangiert. Das aus dieser Rekombinationsabfolge resultierende Verhältnis von Produktiven zu Nicht-Produktiven Rearrangements ist etwa 2,5:1 (Lee *et al.*, 2000). Jedes weitere Rekombinationsereignis nimmt Einfluss auf dieses Verhältnis, da unproduktive Rearrangements im Repertoire weiterhin nachweisbar sind und sich dadurch das Verhältnis in Richtung der nicht funktionellen Rearrangements verschiebt. Die Zahl der nicht funktionellen Rearrangements überwiegt sowohl bei der κ -, als auch bei der λ -Leichtkette, was sich in den berechneten *in frame/out of frame* Verhältnissen für die beiden leichten Ketten widerspiegelt. Das Verhältnis ist bei beiden signifikant niedriger (*IGK* 0,615:1 und *IGL* 0,6:1 statt 2,5:1), was ein deutlicher Hinweis für Rezeptor-Editing ist.

3.5.1.2 Reaktion der Jeko-1 Zelllinie auf einen autoreaktiven Reiz

Um festzustellen, ob die κ^+ Jeko-1 Zellen (vgl. Tab. 1) angeregt werden können, ihren Rezeptor auf einen exogenen Stimulus hin, der Autoreaktivität imitiert, zu revidieren, wurden die Zellen über einen längeren Zeitraum mit einem anti- κ Antikörper inkubiert. Dies sollte dazu dienen, eine Rezeptor-Editing der Leichtketten zu induzieren. Es zeigte sich, dass die zu Beginn sehr kleine Population von λ -positiven Zellen nach der Behandlung mit dem anti- κ Antikörper innerhalb von 34 Tagen anwuchs (vgl. Abb. 17A und B). Außerdem zeigten sich sogenannte „*double producer*“ die gleichzeitig κ - und λ -Leichtketten auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die V(D)J-Rekombination beginnt im *IGH*-Lokus, dann wird der κ -Lokus rearrangiert und nach der Inaktivierung über KDE (engl.: *kappa deleting element*) zuletzt der λ -Lokus (Tonegawa, 1983; Korsmeyer *et al.*, 1981; Blackwell und Alt 1989, Klein *et al.*, 2005). Die Zellen im Quadrant oben rechts (Abb. 17B) könnten daher die Zellen darstellen, die in diesem Moment gerade ihren Rezeptor revidiert haben (Pauza *et al.*, 1993).

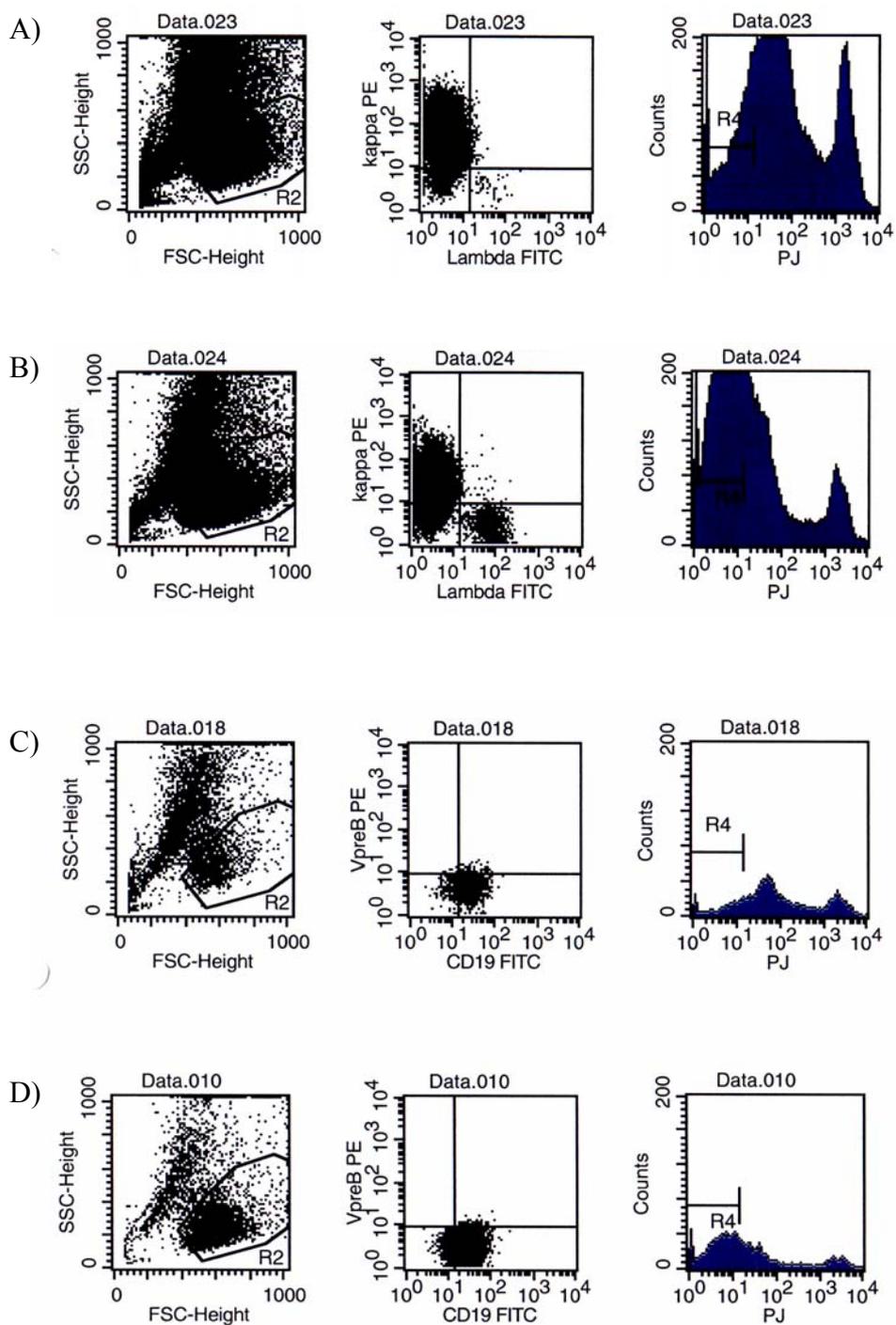


Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse von Jeko-1 Zellen. A + C) Negativkontrolle Jeko-1. Unbehandelte Zellen. B und D) Mit $10\mu\text{g/ml}$ anti- κ Antikörper behandelte Jeko-1 Zellen.

Da eine Expression der Ersatzleichtkette VpreB im Zusammenhang mit Autoreaktivität gebracht wird, wurde dieser Oberflächenmarker zusammen mit dem B-Zellmarker CD19 analysiert. Die Abb. 17C und D zeigen die FACS-Ergebnisse dieser Analyse. Es zeigten sich keine VpreB-positiven Zellen nach der Behandlung.

Zusätzlich erfolgte eine *RAG1*- und *RAG2*-spezifische RT-PCR, um eine mögliche Expression, bzw. einen Anstieg der Expression nachweisen zu können. Die RT-PCR zeigte, dass die behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine etwas höhere *RAG*-Expression aufweisen (Abb. 18). Bei den behandelten Zellen sieht man eine schwache *RAG1*-Bande im Zyklus 42 und eine deutliche Bande im Zyklus 45. Für *RAG2* lässt sich schon im Zyklus 39 eine schwache Bande erkennen, deren Intensität aber bis Zyklus 45 nicht signifikant ansteigt. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen lässt sich jedoch für beide *RAG*-Gene ein Anstieg der Expression nachweisen. Die insgesamt geringe Intensität der Banden könnte daraus resultieren, dass der Revisionsprozess nicht in allen Zellen aktiv ist und somit die Nachweisgrenze für die Expression gering ist. Die FACS-Analyse und die RT-PCR Daten lassen die Hypothese zu, dass die *RAG*-Expression bei den behandelten Zellen angestiegen ist und einen Leichtkettenaustausch zur Folge hatte. Die Zellen haben über die Benutzung der λ -Klasse offensichtlich einen Weg gefunden haben, der vermeintlichen Autoreaktivität zu entkommen.

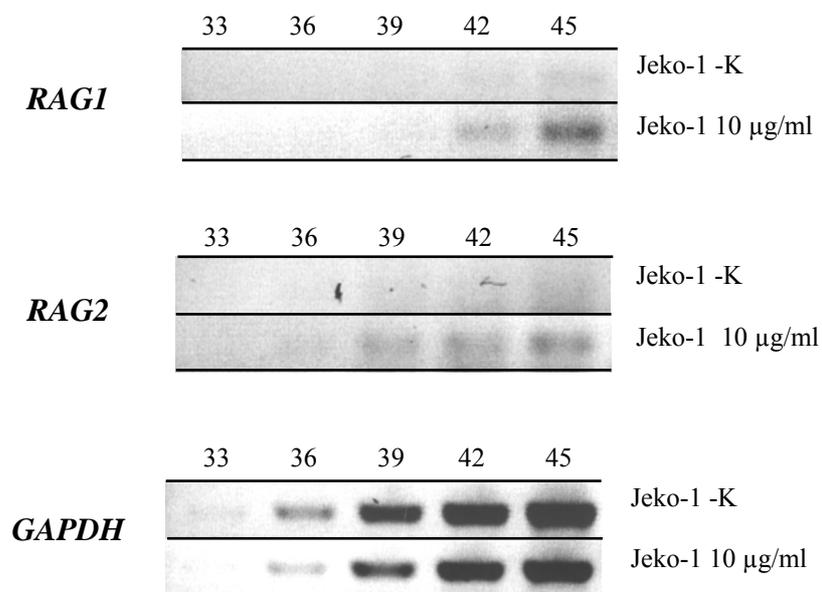


Abb. 18: RT-PCR mit *RAG1* und *RAG2* spezifischen Primern. Zur Normalisierung der cDNA erfolgte eine Amplifizierung des *GAPDH*-Fragmentes. Um eine semiquantitative Aussage zu erhalten, wurden Proben bei verschiedenen Zyklen abgenommen.

3.5.2 Nachweis von sekundären Rekombinationsereignissen in primären Mantelzell-Lymphomfällen

3.5.2.1 V_H-Replacement

V_H-Replacement der schweren Kette ist die Aktivität, durch die das bestehende V_H-Segment des vorliegenden V(D)J-Rearrangements durch ein stromaufwärts gelegenes V_H-Segment partiell ersetzt wird, wobei die dazwischen liegende DNA inklusive des originalen V_H-Segmentes deletiert wird. Grundvoraussetzung für diesen Mechanismus sind die kryptischen RSS-Bereiche, die in 40 der 44 funktionellen V_H-Gensegmenten vorliegen (Zhang *et al.*, 2003). In dem primären Fall MCL898 zeigte sich eine derartige Rekombination. Durch die IMGT-Analyse der Immunglobulinsequenzen wurden zwei Sequenzen nachgewiesen, die sowohl auf Aminosäureebene, als auch auf Nukleotidebene eine identische Verbindungssequenz aufweisen. Der Vergleich beider Sequenzen zeigt jedoch, dass ein unterschiedliches V_H-Gensegment benutzt wird (vgl. Abb. 19). Es scheint sich demzufolge ein V_H-Replacement ereignet zu haben. Die Orientierung der beiden Gene im V_H-Lokus spricht dafür, dass das zeitlich frühere V_H-Segment V_H3-7 war, welches dann durch V_H3-33 partiell ausgetauscht wurde. Die Tatsache, dass die Sequenz, die das partiell ausgetauschte V_H3-33-Segment enthält so stark mutiert ist (30 Mutationen), könnte sich darauf zurückführen lassen, dass während der klonalen Evolution dieses Mantelzell-Lymphoms erst nach dem Zeitpunkt des V_H-Replacement die somatische Hypermutation initiiert wurde. Der cRSS-Bereich von Nukleotid 239 bis 245 ist in der Abb. 19 blau umrahmt. Dass der Bruch an dieser Stelle stattgefunden hat ist allerdings nicht eindeutig, da stromaufwärts eine Mutation vorliegt, die von beiden Sequenzen geteilt wird und daher noch dem vorherigen V_H3-7-Segment zuzuschreiben ist. Daher hat der Bruch wahrscheinlich weiter 5' im V_H-Segment stattgefunden, wo ein weiterer möglicher cRSS-Bereich liegt (Abb. 19, Nukleotid 131 bis 137; Abb. 20 Nukleotid 175-181). Durch ein Sequenzalignment der beiden Keimbahngene V_H3-7 und V_H3-33 wurden zunächst Homologiebereiche aufgedeckt, um die Zugehörigkeit der untersuchten Sequenzen in Bezug auf das V_H-Segment besser einordnen zu können (Abb. 20). Der Vergleich dieses Alignments wiederum mit den untersuchten Sequenzen zeigt, dass von Basenpaar 147-152 beide Sequenzen dem V_H3-7-Segment zuzuordnen sind.

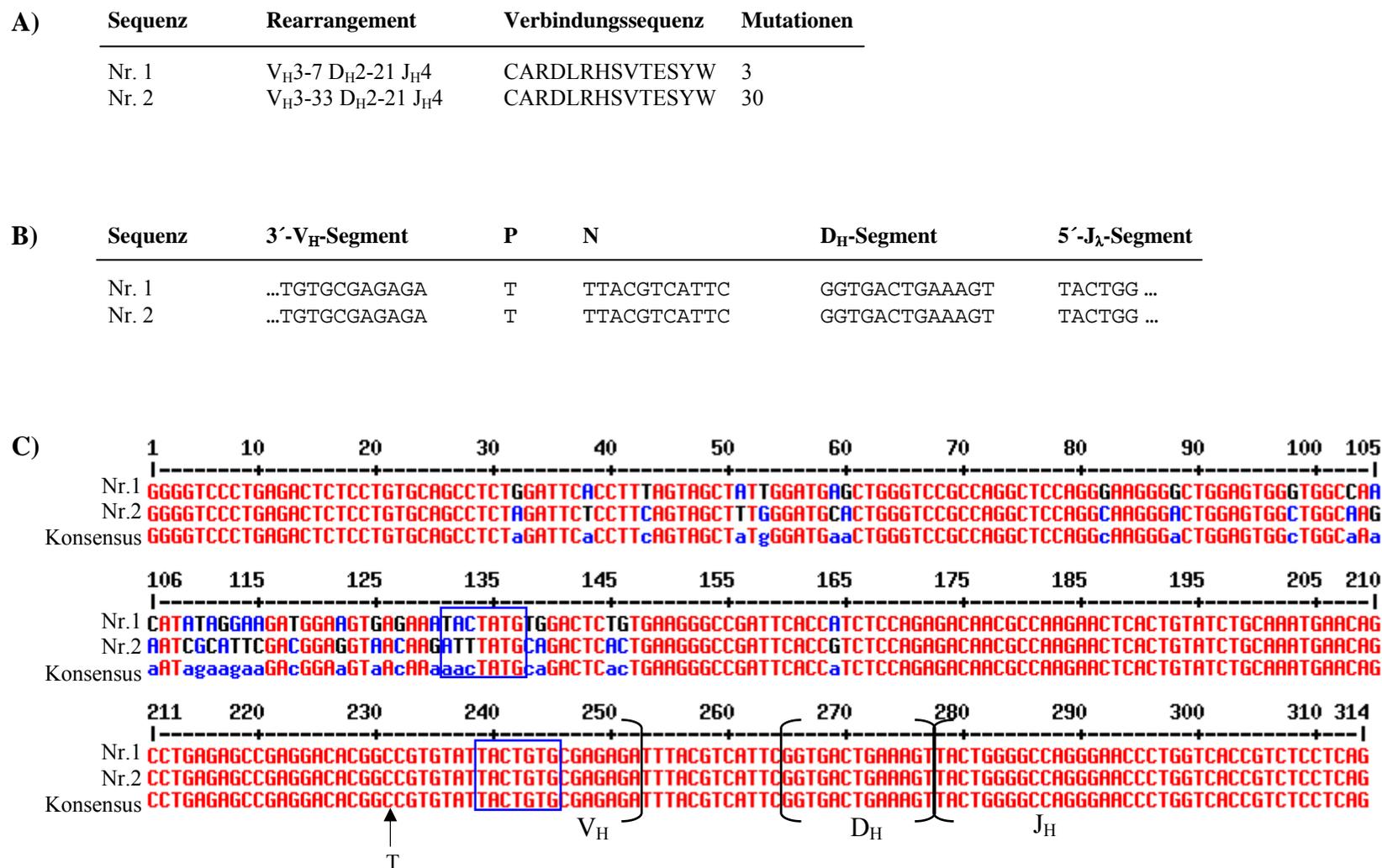


Abb. 19: Abb. 19A) und 19B) enthalten Auszüge der IMGT-V-QUEST Analyse der untersuchten Sequenzen. Die Abb. 19C) ist ein Vergleich der beiden Sequenzen und wurde mit dem Multalign Programm erstellt. Rot zeigt die Übereinstimmungen der Sequenzen und blau/schwarz die Unterschiede. Der blaue Kasten weist auf mögliche cRSS-Bereiche hin, an denen der Bruch stattgefunden haben könnte. Der Pfeil zeigt das Nukleotid im V_λ-Segment, das im Vergleich zum V_H3-7 Keimbahgen bei beiden Sequenzen mutiert ist.

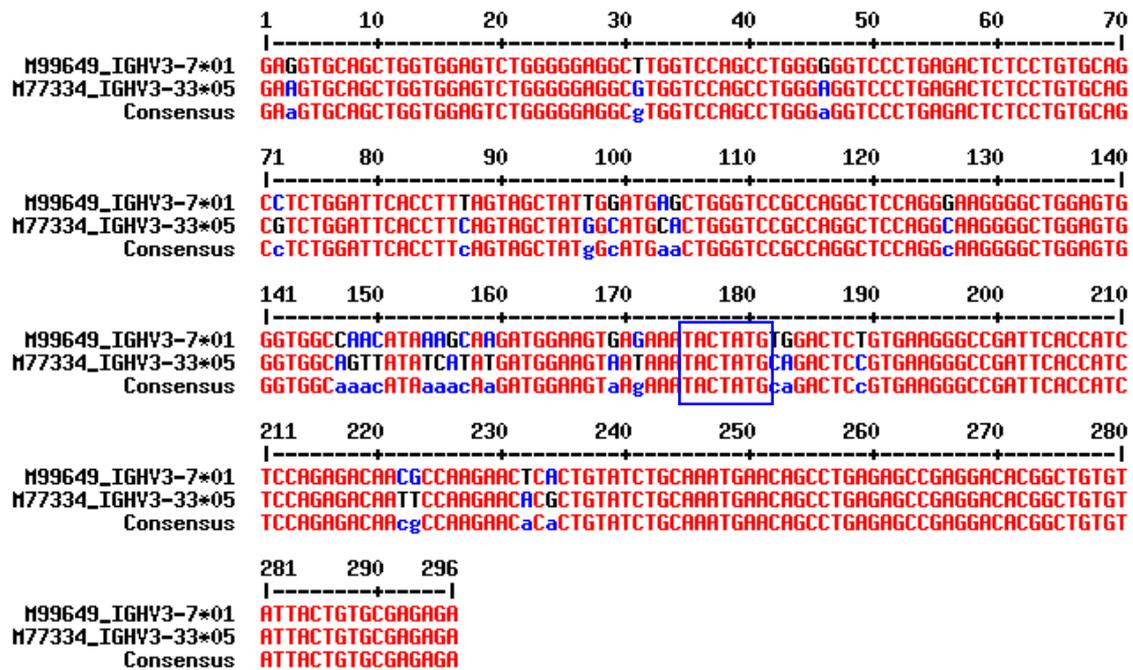


Abb. 20: In diesem Alignment wurden die beiden Keimbahngene V_{H3-7} und V_{H3-33} miteinander verglichen. Die genspezifischen Unterschiede sind in blau/schwarz dargestellt. Der blaue Kasten weist auf putative cRSS-Bereiche hin, an denen der Bruch stattgefunden haben könnte.

Die einzige Abweichung von der V_{H3-7} -Keimbahnsequenz besitzt die Sequenz Nr.2 an Basenpaarposition 164, die sich durch somatische Hypermutation erklären lässt, da diese Sequenz insgesamt sehr stark mutiert ist. Demnach muss der Bruch wahrscheinlich stromaufwärts von Basenpaar 147 (Abb. 19) stattgefunden haben. Der Bereich, der dem Konsensusmotiv bis auf ein Basenpaar entspricht ist in den Abb. 19 und 20 blau umrandet. Die Sequenz Nr.2 weist dieses Motiv aufgrund der hohen Mutationsrate offensichtlich nicht mehr auf. Der Vergleich der V_{H3-7} und V_{H3-33} Keimbahngene (Abb. 20) zeigt jedoch, dass dieser Bereich im unmutierten Zustand homolog ist. Die Tatsache, dass für eine RAG-vermittelte Rekombination nur das Vorhandensein von RSS-Bereichen notwendig ist (McBlane *et al.*, 1995) spricht dafür, dass in diesem Fall ein V_H -Replacement unter der Verwendung eines weiter stromaufwärts gelegenen cRSS-Bereiches stattgefunden haben könnte.

3.5.2.2 V_λ -Replacement

Die Revision eines Rezeptors vollzieht sich vorrangig durch den Austausch der leichten Ketten, da dies aufgrund des einfacheren Aufbaus der Leichtkettenloci begünstigt wird. In den schweren Ketten findet man aufgrund der in einem ersten Rekombinationsereignis deletierten D_H -Gensegmente nur das sogenannte V_H -Replacement, was zu einem Hybrid V_H -Segment führt. Der Nachweis von Rezeptor-Editing kann durch Sequenzanalysen gelingen. Die Verbindungsstelle der Gensegmente kann „footprints“ aufweisen, die auf ein vorheriges Rekombinationsereignis hinweisen. Die detaillierte Analyse der Verbindungsstelle kann demzufolge Aufschluss über die Reihenfolge der stattgefundenen Rekombinationsereignisse liefern.

Die Analyse der MCL001 Sequenzen offenbarte ein V_λ -Replacement, welches in der Abb. 21B schematisch dargestellt ist.

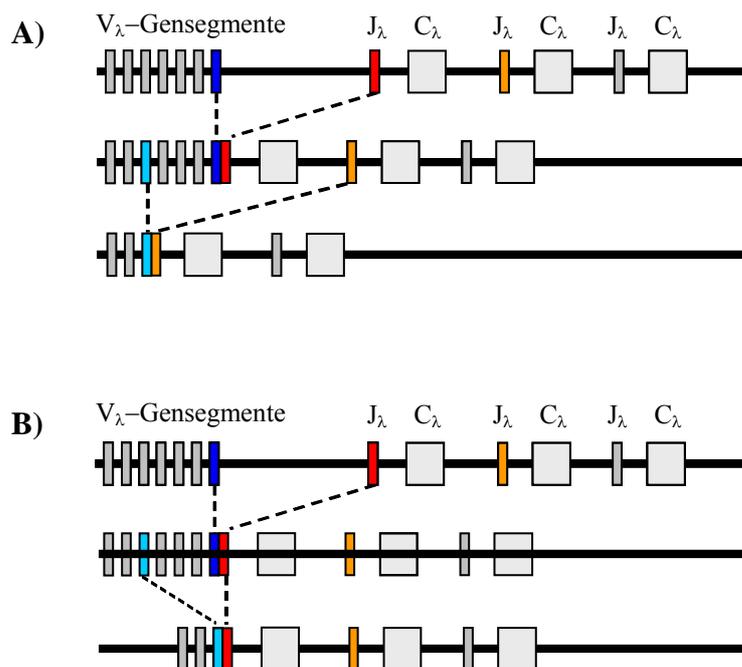


Abb. 21: Die Abbildung A) zeigt schematisch den normalen Ablauf des Leichtkettenaustauschs. Ein vorhandenes V_λ - J_λ -Rearrangement (dunkelblau und rot) wird durch den Austausch eines weiter 5'-liegenden V_λ -Segmentes (hellblau) und ein weiter 3'-liegendes J_λ -Segmentes (orange) ersetzt. B) stellt dar, wie sich ein V_λ -Replacement ereignen kann. Der Rezeptor (dunkelblau und rot) wird nur durch den partiellen Austausch des V_λ -Segmentes verändert, wobei das bestehende J_λ -Segment beibehalten wird.

Die Abb. 23A) zeigt die Rearrangements, die Verbindungssequenz und die Anzahl der Mutationen im V_λ -Segment. Dabei fällt auf, dass die Sequenz Nr.1 das V_λ 7-43 Gen und die Sequenz Nr.2 das Gen V_λ 7-43 der V_λ 7-Familie benutzt und beide dasselbe J_λ -Segment besitzen. In der Abb. 23B ist die Basensequenz der Verbindungsstelle dargestellt. Auf Nukleotidebene stimmen die beiden Sequenzen in diesem Bereich bis auf ein Nukleotid überein. Aufgrund der Einzigartigkeit der Verbindungssequenz ist dieses Ergebnis ein erster Hinweis darauf, dass die Zellen aus denen die Sequenzen generiert wurden, denselben Ursprung besitzen. Um die unterschiedlichen V_λ -Bereiche beider Sequenzen genauer zu untersuchen, erfolgte ein Sequenzalignment mit dem Multalignprogramm. Die Abb. 23C zeigt das Resultat, wobei die roten Bereiche vollständige Sequenzübereinstimmungen zeigen. Es fällt allerdings auf, dass sich die größte Übereinstimmung über den 3'-Bereich des V_λ -Segmentes bis zum 3'-Ende des J_λ -Segmentes erstreckt. Die blau und schwarz dargestellten Bereiche weisen auf Sequenzunterschiede hin. Um diese Unterschiede genauer zu bestimmen müssen die somatischen Mutationen, die durch Hypermutation entstanden sind, von den Unterschieden der beiden Gene V_λ 7-43 und V_λ 7-46 getrennt betrachtet werden. Aufgrund von zahlreichen somatischen Mutationen könnte eine Sequenz einem anderen Mitglied derselben V_H -Familie so ähnlich werden, dass das IMGT-V-Quest Programm die Zugehörigkeit der Sequenz falsch zuordnet. Um diesen Fehler auszuschließen, wurden zunächst die Keimbahnsequenzen der beiden Gene V_λ 7-43 und V_λ 7-46 mittels des Alignmentprogramms verglichen (Abb. 22).

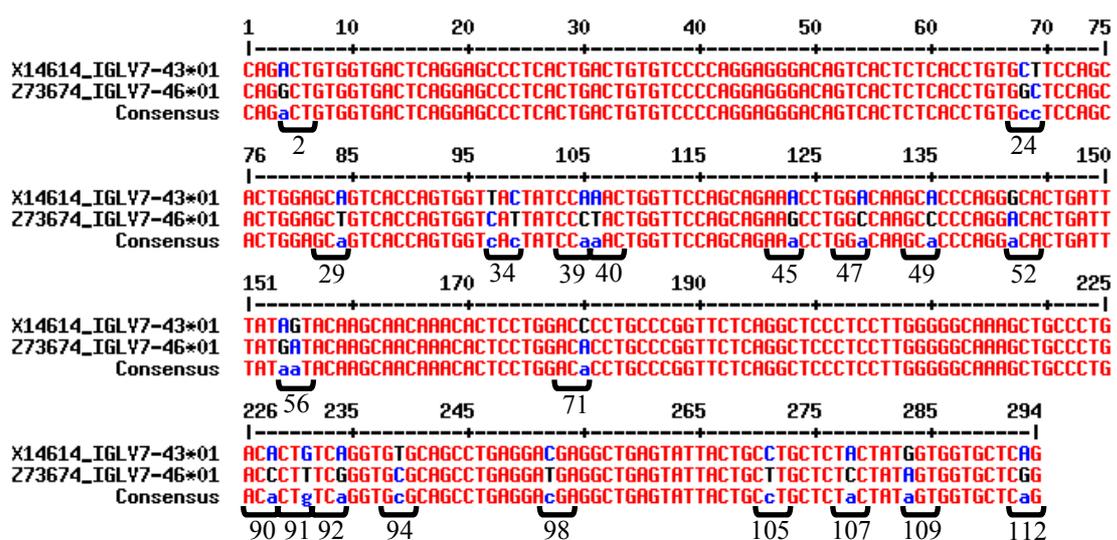


Abb. 22: In diesem Alignment wurden die beiden Keimbahngene V_λ 7-43 und V_λ 7-46 miteinander verglichen. Die Gen-spezifischen Unterschiede sind in blau/schwarz dargestellt und die Klammern unter der Sequenz geben die jeweilige Aminosäureposition an.

Dieser Vergleich zeigte, dass sich die beiden Gene in 21 Aminosäurepositionen unterscheiden, wobei 3 dieser Positionen sich in zwei Basenpaaren unterscheiden. Diese Sequenzunterschiede zwischen $V_{\lambda}7-43$ und $V_{\lambda}7-46$ sind in der Abb. 23C durch schwarze Kästchen unterhalb der Sequenzen dargestellt. Man sieht, dass die beiden untersuchten Sequenzen an 16 Aminosäurepositionen, die sich durch die Heterogenität innerhalb der V_{λ} -Genfamilie begründen nicht übereinstimmen. Somit lassen sich 17 Nukleotidunterschiede auf die Sequenzunterschiede innerhalb der $V_{\lambda}7$ -Familie und 14 Nukleotidunterschiede von insgesamt 31 Mutationen auf somatische Hypermutation zurückführen. Die Annahme, dass 55% (17 Nukleotidunterschiede) der Mutationen an den Positionen der Unterschiede innerhalb derselben Genfamilie über somatische Hypermutation entstanden sind und gleichzeitig zum exakten Nukleotidaustausch geführt haben ist höchst unwahrscheinlich. Die Sequenzen tragen also wirklich unterschiedliche V_{λ} -Segmente. Die Sequenz Nr.2 besitzt im Vergleich zum Keimbahngen nur 2 Mutationen, wohingegen die Sequenz Nr.1 sich an 20 Positionen von ihrem Keimbahngen unterscheidet (vgl. Abb. 23A)). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das bestehende, stark mutierte $V_{\lambda}7-43$ durch $V_{\lambda}7-46$ ersetzt wurde, was aufgrund des λ -Lokus Aufbaus auch möglich ist, da $V_{\lambda}7-46$ stromaufwärts von $V_{\lambda}7-43$ liegt. Ähnlich wie beim V_H -Replacement konnten innerhalb der Sequenzen mögliche kryptische RSS-Bereiche gefunden werden, die durch blaue Kästchen in der Abb. 23C hervorgehoben sind. Damit sind Hinweise innerhalb der Sequenzen gegeben, die vermuten lassen, dass sich in diesem Fall ein V_{λ} -Replacement ereignet hat.

A)

Sequenz	Rearrangement	Verbindungssequenz	Mutationen
Nr. 1	V _λ 7-43-J _λ 7	CLLSYSDARPVF	20
Nr. 2	V _λ 7-46-J _λ 7	CLLSYSDARPVF	2

B)

Sequenz	3'-V _λ -Segment	P	5'-J _λ -Segment
Nr. 1	...TGCTTGCTCTCTTATAGTGATGCTCGG	C	CTGTGTTC...
Nr. 2	...TGCTTGCTCTCCTATAGTGATGCTCGG	C	CTGTGTTC...

C)

	1	10	20	30	40	50	60	70
Nr.1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
Nr.1	GTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTGCCAGGCGGGACAGTCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCT							
Nr.2	GTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTGCCAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCA							
Konsensus	GTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTGCCAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCa							
	71	80	90	100	110	120	130	140
Nr.1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
Nr.1	CTGGAGCAGTCACCACTGGTGACTTCCAAAGCTGGTTCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCAGGGCTCT							
Nr.2	CTGGAGCTGTCACCACTGGTCATTATCCCTACTGGTTCAGCAGAAACCTGGCCAAGCACCAGGCACT							
Konsensus	CTGGAGCAGTCACCACTGGTGACTTCCAAAGCTGGTTCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCAGGCaCT							
	141	150	160	170	180	190	200	210
Nr.1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
Nr.1	AATTTATGGTACACACAGAAACACTCCTGGACCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTGGGGGCAAA							
Nr.2	GATTTATGATACAGCACAAACACTCCTGGACACCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTGGGGGCAAA							
Konsensus	aATTTATGaTACAAaCAaaAAACACTCCTGGACaCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTGGGGGCAAA							
	211	220	230	240	250	260	270	280
Nr.1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
Nr.1	GCTGCCCTGACACTGTCAAGGTGTGCACCTGAGGACGAGGCTGAGTATTACTGCTGCTCTCTATAGTG							
Nr.2	GCCGCCCTGACCCTTTCGGGTGCGAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTACTGCTGCTCTCTATAGTG							
Konsensus	GCcGCCCTGACaCTgTCaGGTGCcGCaCCTGAGGAcGAGGCTGAGTATTACTGCTGCTCTCcTATAGTG							
	281	290	300	310	320	330	335	
Nr.1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
Nr.1	ATGCTCGGCCTGTGTTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGTCCCTCGGTAAAGTCTCC							
Nr.2	ATGCTCGGCCTGTGTTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGTCCCTCGGTAAAGTCTCC							
Konsensus	ATGCTCGGCCTGTGTTTCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGTCCCTCGGTAAAGTCTCC							
	V _λ		J _λ					

Abb. 23: Abb. 23A) und 23B) enthalten Auszüge der IMGT-V-QUEST Analyse der untersuchten Sequenzen. Die Abb. 23C) ist ein Vergleich der beiden Sequenzen und wurde mit dem Multalign Programm erstellt. Rot zeigt die Übereinstimmungen der Sequenzen und blau/schwarz die Unterschiede. Der blaue Kasten weist auf einen möglichen cRSS-Bereich hin, an dem der Bruch stattgefunden haben könnte. Schwarze Balken unter der Sequenz zeigen Nukleotide, die sich innerhalb der beiden Keimbahngen V_λ7-43 und V_λ7-46 unterscheiden.

Diese beiden Sequenzen sind jedoch nicht das einzige Beispiel für diesen Mechanismus. Durch den Vergleich von zwei weiteren Sequenzen (Nr. 3 und Nr. 4) konnte ebenfalls ein V_λ -Replacement aufgedeckt werden (vgl. Abb. 24A-C)). Diese beiden Sequenzen besitzen eine übereinstimmende Verbindungssequenz auf Nukleotidebene und dasselbe J_λ -Segment, wobei das V_λ -Segment partiell ausgetauscht wurde. Im J_λ -Segment besitzen beide Sequenzen dieselben 3 Mutationen im Vergleich zu Keimbahngen, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass die Sequenzen denselben Ursprung haben. Auch diese beiden Sequenzen wurden hinsichtlich der Herkunft ihrer Sequenzunterschiede untersucht. Dabei ergaben sich 16 Nukleotidunterschiede aufgrund der Heterogenität innerhalb der V_λ -Familie und 16 Nukleotidunterschiede, die durch somatische Hypermutation entstanden sind. Somit sind hier ebenfalls unterschiedliche Gensegmente innerhalb derselben V_λ -Familie ausgetauscht worden. Auch bei diesen beiden Sequenzen existiert ein möglicher kryptischer RSS-Bereich, der einen möglichen Bruchpunkt angibt. Auffallend bei diesen beiden Sequenzen ist die Länge des N-Nukleotidbereiches. Bei der detaillierten Analyse des N-Nukleotidbereiches zeigte sich eine 12bp Duplikation, die durch 3bp voneinander getrennt ist. Der duplizierte Bereich entspricht einer Basenpaarabfolge im 3'-Bereich des $V_\lambda 7-46$ Gens (vgl. Abb. 24C)).

A)	Sequenz	Rearrangement	Verbindungssequenz	Mutationen
	Nr.3	V _λ 7-46-J _λ 3	CLLSYLLSSSGVPSGYVQVVF	19
	Nr.4	V _λ 7-43-J _λ 3	CLLSYLLSSSGVPSGYVQVVF	23

B)	Sequenz	3'-V _λ -Segment	N	P	5'-J _λ -Segment
	Nr.3	...TGCTTGCTCTCCTATAG	CTTGCTCTCCTCTAGTGGTGTCCCTCTGGTTATGTC	CA	AGTGGTTTTTC...
	Nr.4	...TGCTTGCTCTCCTATAG	CTTGCTCTCCTCTAGTGGTGTCCCTCTGGTTATGTC	CA	AGTGGTTTTTC...

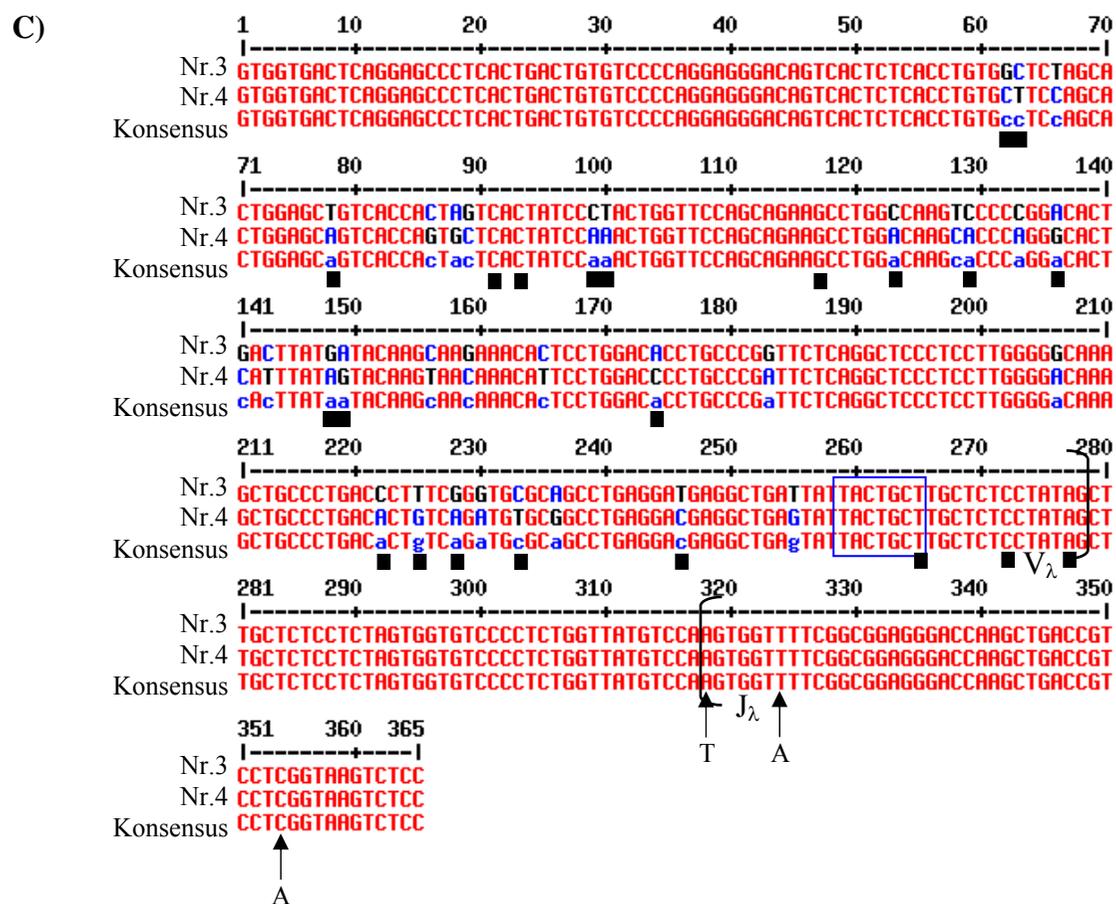


Abb. 24: Abb. 24A) und 24B) enthalten Auszüge der IMGT-V-QUEST Analyse der untersuchten Sequenzen. Die unterstrichenen Nukleotide sind innerhalb der Verbindungssequenz dupliziert. Die Abb. 24C) ist ein Vergleich der beiden Sequenzen und wurde mit dem Multalign Programm erstellt. Rot zeigt die Übereinstimmungen der Sequenzen und blau/schwarz die Unterschiede. Der blaue Kasten weist auf einen möglichen cRSS-Bereich hin, an dem der Bruch stattgefunden haben könnte. Schwarze Balken unter den Sequenzen zeigen Nukleotide, die sich innerhalb der beiden Keimbahngene V_λ7-43 und V_λ7-46 unterscheiden. Die Pfeile zeigen die Nukleotide im J_λ-Segment, die im Vergleich zum Keimbahngen bei beiden Sequenzen mutiert sind.

3.5.2.3 J_λ -Replacement

Bei der detaillierten Sequenzanalyse zeigte sich eine zunächst illegitime Art der Rezeptor-Editing. Die Rekombination zweier Gensegmente findet normalerweise nur statt, wenn diese von RSS-Bereichen flankiert werden, die einen unterschiedlich langen *Spacer* besitzen, was als sogenannte 12/23er Regel bezeichnet wird (Sawchuk *et al.*, 1997). Diese Regel verhindert eine Rekombination zweier gleichartiger Gensegmente und gewährleistet dadurch die Bildung eines B-Zell Rezeptors, der alle notwendigen Gensegmente enthält. Es ist bisher nicht beschrieben, dass ausschließlich das J-Segment ausgetauscht werden kann. Innerhalb der untersuchten Sequenzen fanden sich aber Beispiele, die für einen solchen Mechanismus sprechen (vgl. Abb. 25).

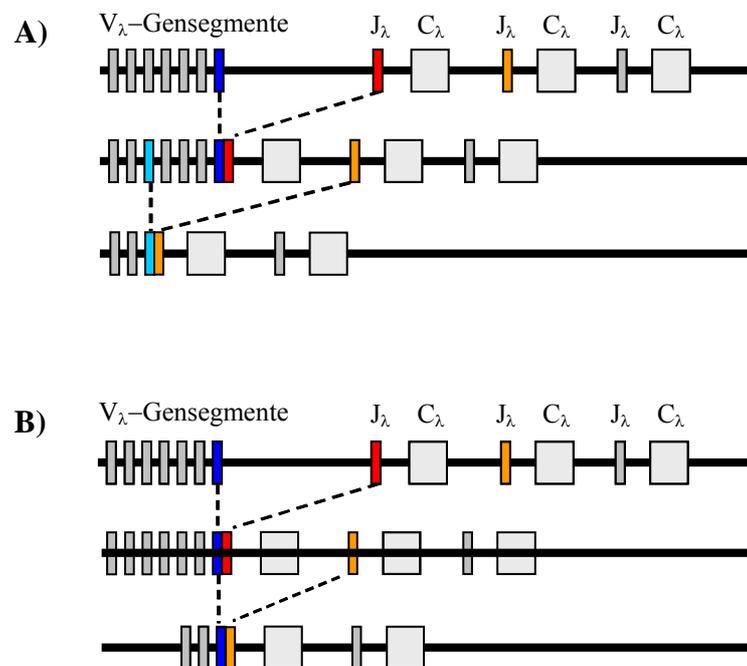


Abb. 25: Die Abbildung A) zeigt schematisch den normalen Ablauf der Rezeptor-Revision. Ein vorhandenes V_λ - J_λ -Rearrangement (dunkelblau und rot) wird durch den Austausch eines weiter 5'-liegenden V_λ -Segmentes (hellblau) und ein weiter 3'-liegendes J_λ -Segmentes (orange) ersetzt. B) zeigt ein „illegitimes“ J_λ -Replacement. Der vorherige Rezeptor (dunkelblau und rot) wird nur durch den Austausch des J_λ -Segmentes verändert, wobei das bestehende V_λ -Segment beibehalten wird.

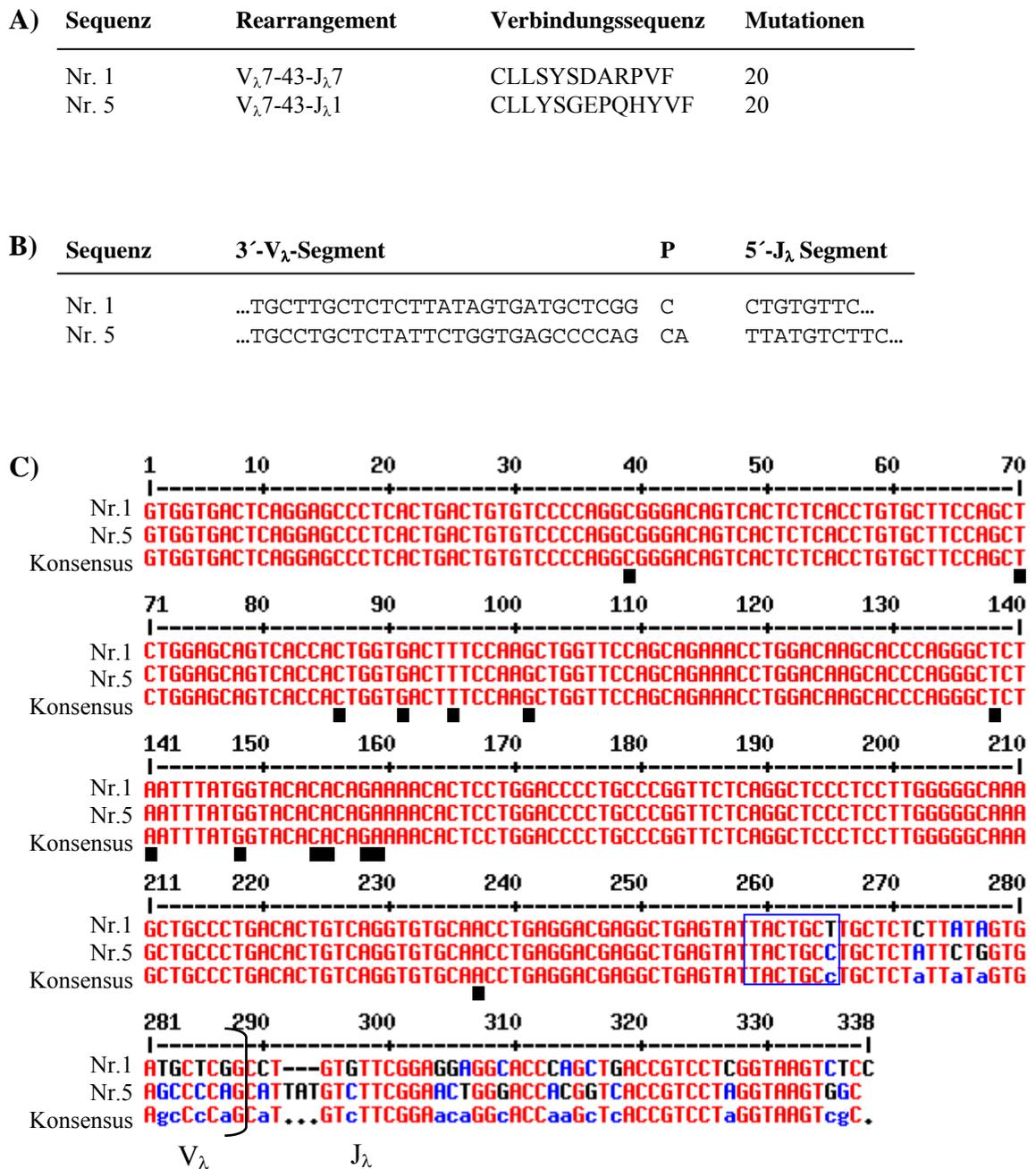


Abb. 26: Abb. 26A) und 26B) enthalten Auszüge der IMGT-V-QUEST Analyse der untersuchten Sequenzen. Die Abb. 26C) ist ein Vergleich der beiden Sequenzen und wurde mit dem Multalign Programm erstellt. Rot zeigt die Übereinstimmungen der Sequenzen und blau/schwarz die Unterschiede. Der blaue Kasten weist auf einen putativen cRSS-Bereich hin, an dem der Bruch stattgefunden haben könnte. Schwarze Balken unter der Sequenz zeigen 14 identische Mutationen beider Sequenzen im Vergleich zum Keimbahgen V_λ7-43.

Die Abb. 26A) zeigt zunächst, dass die beiden Sequenzen Nr.1 und Nr.5 dasselbe V_λ -Segment aber ein unterschiedliches J_λ -Segment benutzen. Da die Sequenzen auch eine unterschiedliche Aminosäureabfolge der Verbindungssequenz aufweisen, sieht es so aus, als wären die Sequenzen aus voneinander unabhängigen Rekombinationsereignissen hervorgegangen. Die Analyse der jeweils 20 Mutationen innerhalb der beiden Sequenzen zeigte jedoch, dass das V_λ -Segment beider Sequenzen identisch ist und im 3' Bereich des V_λ -Segmentes ein Austausch des J_λ -Segmentes stattgefunden haben könnte. Insgesamt sind 14 von 20 Mutationen im V_λ -Segment beider Sequenzen identisch. An diesen 14 Positionen unterscheiden sich beide vom Keimbahngen (vgl. Abb. 26C). Die übereinstimmenden Mutationen finden sich vorrangig im mittleren Bereich des V_λ -Segmentes. Die nicht identischen Mutationen liegen ausschließlich im 3' Bereich des V_λ -Segmentes. Da die Sequenzen sich ab dieser Region in 3' Richtung stark unterscheiden, scheint sich ein Bruch vor dieser Region ereignet zu haben.

Auch für diese ungewöhnliche Art eines J_λ -Austausches ließ sich innerhalb desselben primären MCL-Falls ein weiteres Beispiel finden. Die Abb. 27 zeigt, wie schon beim ersten Beispiel, dass hier das V_λ -Gensegment beibehalten wurde und das $J_\lambda 1$ -Segment gegen das $J_\lambda 3$ -Segment ausgetauscht wurde. Bei diesen beiden Sequenzen lagen 13 identische Mutationen im Vergleich zum Keimbahngen vor, die vor allem im mittleren Bereich der Sequenzen zu finden waren. Die Anzahl der Mutationen im V_λ -Gensegment sind bei der Sequenz Nr. 6 niedriger als bei der Sequenz Nr. 7. Die 10 zusätzlichen Mutationen der Sequenz Nr. 7 müssen sich demzufolge aufgrund von somatischer Hypermutation ergeben haben. Dies korreliert auch mit der Tatsache, dass zuerst das Rearrangement der Sequenz Nr. 6 ($V_\lambda 7-43-J_\lambda 1$) vorlag, und durch einen Austausch des J_λ -Segmentes sich das Rearrangement der Sequenz Nr. 7 ($V_\lambda 7-43-J_\lambda 3$) ergeben hat. Somit könnte das Rearrangement der Sequenz Nr. 7 zeitlich später entstanden sein, was die Wahrscheinlichkeit erhöhen könnte, durch somatische Hypermutation weitere Basenaustausche zu erfahren.

Die mögliche Entstehungsweise dieser Hybridsequenzen, die auf den ersten Blick illegitim erscheinen, da sie der 12/23er Regel widersprechen (Sawchuk *et al.*, 1997) wird in der Diskussion im Kapitel 5.2 noch genauer erläutert.

A)	Sequenz	Rearrangement	Verbindungssequenz	Mutationen
	Nr. 6	$V_{\lambda}7-43-J_{\lambda}1$	CLLYYGGARVF	13
	Nr. 7	$V_{\lambda}7-43-J_{\lambda}3$	CLLHYGGQMVF	23

B)	Sequenz	3'- V_{λ} -Segment	N	5'- J_{λ} Segment
	Nr. 6	...TGCCTGCTCTACTATGGTGGTGCTCGG		GTCTTC...
	Nr. 7	...TGCCTTCTACTACTACGGTGGTGCTCAG	AT	GGTGTC...

C)

```

1       10      20      30      40      50      60      70
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
Nr.6   GTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGTCACCTCTCACCTGTGCTTCCAGCA
Nr.7   GTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGTCACCTCTCACCTGTGCTTCCAGCA
Konsensus GTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGTCACCTCTCACCTGTGCTTCCAGCA

71      80      90      100     110     120     130     140
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
Nr.6   CTGGAGCAGTCACCAATAATGACTATCCAAGCTGGTCCAGCAGAGCCTGGACAGCACCAGGGCTCT
Nr.7   CTGGAGCAGTCACCAATAATGACTATCCAAGCTGGTCCAGCAGAGCCTGGACAGCACCAGGGCTCT
Konsensus CTGGAGCAGTCACCAATAATGACTATCCAAGCTGGTcCCAGCAGAGCCTGGACAGCACCAGGGCTCT

141     150     160     170     180     190     200     210
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
Nr.6   GATTTATGCTACAATCCATAGCACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGACAAg
Nr.7   GATTTATGCTACAATCCATAGCACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAA
Konsensus GATTTATGCTACAATCCATAGCACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGaCAAa

211     220     230     240     250     260     270     280
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
Nr.6   GCTGCCCTGACACTGTGAGGTGTGcGGCCTGAcGACGAGGCTGATATTACTGCCTTCTACACTACGGTG
Nr.7   GCTGCCCTGACACTGTGAGGTGTGcAGCCTGAcGACGAGGCTGAGTATTACTGCCTGCTCTACTATGGTG
Konsensus GCTGCCCTGACACTGTGAGGTGTGcAGCCTGAcGACGAGGCTGAcTATTACTGCCTgCTacACTAcGGTG

281     290     300     310     320     330     335
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
Nr.6   GTGCTCAGATGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTCGGTARGTCTCC
Nr.7   GTGCTCGG---GTCTTCGGARCTGGGACCAAGGTcACCGTCCTAGGTARGTGGC
Konsensus GTGCTCaG...GTcTTCGGaacaGGGACCAAGgTcACCGTCCTaGGTARGTcg.

V $\lambda$           J $\lambda$ 

```

Abb. 27: Abb. 27A) und 27B) enthalten Auszüge der IMGT-V-QUEST Analyse der untersuchten Sequenzen. Die Abb. 27C) ist ein Vergleich der beiden Sequenzen und wurde mit dem Multalign Programm erstellt. Rot zeigt die Übereinstimmungen der Sequenzen und blau/schwarz die Unterschiede. Der blaue Kasten weist auf einen möglichen cRSS-Bereich hin, an dem der Bruch stattgefunden haben könnte. Schwarze Balken unter der Sequenz zeigen 13 identische Mutationen beider Sequenzen im Vergleich zum Keimbahnen $V_{\lambda}7-43$.

3.5.2.4 Duplikationen und Deletionen in Immunglobulinen des Mantelzell-Lymphoms

Die detaillierte Analyse der Immunglobulinsequenzen hat verschiedene Prozesse gezeigt, die von DNA-Doppelstrangbrüchen begleitet werden. Ebenso beinhaltet das Auftreten von Duplikationen oder Deletionen, dass DNA-Brüche stattfinden. Innerhalb der untersuchten Mantelzell-Lymphomfälle wurden in mehreren Fällen Duplikationen oder Deletionen in den Immunglobulinen gefunden. In der Abb. 28 ist am primären Fall MCL003 ein Beispiel für eine außergewöhnliche Duplikation innerhalb des V_{λ} -Gensegmentes dargestellt. Der Sequenzvergleich mit dem Keimbahngen zeigt, dass im Bereich des V_{λ} -Segmentes eine Insertion vorliegt. Bei der detaillierten Analyse dieser 29bp großen Insertion findet man eine 22bp große Duplikation, die dem 7bp dahinter liegendem Bereich des Keimbahngens entspricht.

Die somatische Hypermutation ist bei 4% der funktionellen und mehr als 40% der nicht funktionellen Rearrangements Ursache für Deletionen oder Duplikationen und auch Translokationen (Goossens *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Küppers *et al.*, 1999; Bemark und Neuberger, 2003). Da die untersuchte Sequenz Mutationen aufweist, die auf somatische Hypermutation zurückzuführen sind, ist es demnach möglich, dass die Duplikation während des Hypermutationsprozesses stattgefunden hat. Die zwei Basenpaare (GG), die vor der Insertion und die zwei Basenpaare (TA), die hinter der Insertion liegen entsprechen dem RGWY-Konsensusmotiv (GGTA), das durch AID bevorzugt mutiert wird (Milstein *et al.*, 1998; Rogozin *et al.*, 2001). Dies könnte daher ein weiterer Hinweis darauf sein, dass durch somatische Hypermutation in Mantelzell-Lymphomen die Integrität der Immunglobulingene gefährdet werden könnte.

A)	Sequenz	Rearrangement	Verbindungssequenz	Mutationen
	MCL003	V _λ 8-61 J _λ 3	CVLYVGS#NWF	9

B)	Sequenz	3'-V _λ -Segment	N	P	5'-J _λ Segment
	MCL003	TGTGTGCTGTATGTGGGTAGTGGC	T	CAA	TTGGGTGTTC

C)

	1	10	20	30	40	50	60	70
U03637_IGLV8-61*02	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
MCL003	CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCTGGAGGGACAGTCACACTCACTTGTGGCT							
Konsensus	...ACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCTGGAGGGACAGTCACACTCACTTGTGGCT							
	71	80	90	100	110	120	130	140
U03637_IGLV8-61*02	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
MCL003	TGAGCTCTGGCTCAGTCTCTACTAGTTACTACCCAGCTGG-----AGACCCAGGCCAGGCTCCACG							
Konsensus	TGAGCTCTGGCTCAGTCTCTACTAGTTACTACCCAGCTGGGAAACAGT-----AGACCCAGGCCAGGCTCCACG							
	141	150	160	170	180	190	200	210
U03637_IGLV8-61*02	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
MCL003	TACCAGTAGACCCAGGCCAGGCTCCACGACGCTCATCTACAGCACAACACTCGCTCTTCTGGGGTCC							
Konsensus	TACCAGCAGACCCAGGCCAGGCTCCACGACGCTCATCTACAGCACAACACTCGCTCTTCTGGGGTCC							
	211	220	230	240	250	260	270	280
U03637_IGLV8-61*02	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
MCL003	CTGATTGCTTCTCTGGTCCATCCTTGGAAACAAGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCCAGGCAGATGA							
Konsensus	CTGATTGCTTCTCTGGTCCATCCTTGGAAACAAGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCCAGGCAGATGA							
	281	290	300	310	320	330	340	350
U03637_IGLV8-61*02	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----							
MCL003	TGAATCTGATTATTACTGTGTGCTGTATATGGGTAGTGGCATTTC							
Konsensus	TGAATTTAATTATTACTGTGTGCTGTATATGGGTAGTGGCTCAATTGGGTGTTGGGAGGGACCAAC							
	TGAATcTAATTATTACTGTGTGCTGTATaTGGGTAGTGGCacaac.....							

Abb. 28: Abb. 28A) und 28B) enthalten Auszüge der IMGT-V-QUEST Analyse der untersuchten Sequenzen. Die Abb. 28C) ist ein Vergleich der Keimbahnsequenz des V_λ8-61 Gens und der Immunglobulinsequenz des primären Falls MCL003 und wurde mit dem Multalign Programm erstellt. Rot zeigt die Übereinstimmungen der Sequenzen und blau/schwarz die Unterschiede. Der blaue Kasten umrahmt den Bereich der Duplikation innerhalb der Insertion.

3.6 Differentielle Expression von DNA-Reparaturgenen in Mantelzell-Lymphomen

Die zuvor beschriebenen Prozesse in Mantelzell-Lymphomen werden alle von DNA-Doppelstrangbrüchen begleitet. Um herauszufinden, ob DNA-Reparaturgene in Mantelzell-Lymphomen differentiell exprimiert sind im Vergleich zu der gesunden Ursprungszelle, wurde eine Analyse mit Hilfe der vorliegenden SAGE-Datenbank herangezogen. Diese Datenbank enthält genomweite Genexpressionsprofile der normalen B-Zellen, sowie von zwei Mantelzell-Lymphomen. Um differentiell exprimierte DNA-Reparaturgene zu identifizieren, wurden zunächst 90 Gene extrahiert, die an DNA-Reparatur beteiligt sind (vgl. Tab 9 und Tab. 10). Eine Liste der Gene ist unter dem Weblink http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html#NHEJ abrufbar. Beschreibungen zu diesen Genen sind in der Veröffentlichung von Wood *et al.*, 2005 enthalten. Dann wurden mit Hilfe der SAGE-Software 2000 und dem EXCEL-Programm die Mantelzell-Lymphome im Vergleich zu den naiven und B1-Zellen (prä-Keimzentrums B-Zellen) gesetzt, um eine differentielle Expression der DNA-Reparaturgene zu identifizieren. Die Analyse hat ergeben, dass die DNA-Reparaturgene in Mantelzell-Lymphomen im Mittel um den Faktor 2,7 im Vergleich zu den MCL-typischen Ursprungszellen (naive und B1-Zellen) hochreguliert sind. In der Tabelle 9 sind zunächst die Gene aufgeführt, die in Mantelzell-Lymphomen entweder gleichstark oder niedriger exprimiert sind, als in den gesunden Ursprungszellen. Darunter befindet sich auch das ATM-Gen, welches in 40-50% der MCL-Fälle durch Deletionen oder Mutationen inaktiviert ist (Schaffner *et al.*, 2000; Camacho *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2003).

Tab. 9: Liste der DNA-Reparaturgene, die in Mantelzell-Lymphomen niedriger exprimiert werden. Rot: ATM-Gen; grün: Gene der NHEJ-Maschinerie.

ratio	prä-B	MCL1	MCL2	B1	NBC	GCB	MCB	PC	Gen
1	9	13	8	9	12	7	13	1	<i>POLG</i>
1	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>BRCA2</i>
1	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>APTX</i>
1	1	1	1	1	1	1	1	4	<i>DCLRE1C (Artemis)</i>
0,92	7	27	19	34	16	17	13	12	<i>DDB1</i>
0,875	1	5	2	4	4	7	7	1	<i>OGG1</i>
0,833333333	4	8	2	4	8	3	1	1	<i>ERCC3</i>
0,816326531	1	2	2	1	4	3	1	1	<i>CCNH</i>
0,816326531	3	2	2	4	1	7	10	1	<i>RECQL4</i>
0,75	1	3	3	4	4	3	1	1	<i>REV1L (REV1)</i>
0,725	1109	62	54	60	100	155	63	60	<i>ATM</i>
0,666666667	2	2	6	4	8	3	7	4	<i>XRCC1</i>
0,56	1	6	8	13	12	14	16	8	<i>FANCA</i>
0,494736842	8	4	1	9	1	7	7	1	<i>MPG</i>
0,408163265	1	1	1	1	4	1	1	1	<i>ERCC6 (CSB)</i>
0,408163265	1	1	1	1	4	1	3	1	<i>CETN2</i>
0,408163265	63	1	1	1	4	10	7	8	<i>XRCC2</i>
0,384615385	1	1	1	4	1	1	1	1	<i>TDP1</i>
0,384615385	1	1	1	4	1	1	1	1	<i>CHEK2</i>
0,341463415	9	8	6	22	19	24	46	22	<i>MBD4</i>
0,183673469	34	6	3	26	23	3	10	12	<i>RECQL5</i>

Tab. 10: Liste der DNA-Reparaturgene, die in Mantelzell-Lymphomen höher exprimiert werden. Blau: Gene der MMR-Maschinerie; grün: Gene der NHEJ-Maschinerie. Rot: An SHM beteiligte Polymerasen.

ratio	prä-B	MCL1	MCL2	B1	NBC	GCB	MCB	PC	Gen
15,91836735	8	32	46	4	1	10	13	1	<i>TP53</i>
11,11111111	1	9	11	1	1	3	6	8	<i>UBE2V2 (MMS2)</i>
8,33333333	1	8	7	1	1	1	1	4	<i>FANCL</i>
7,959183673	2	13	26	1	4	17	10	4	<i>PRKDC</i>
7,777777778	2	8	6	1	1	1	1	1	<i>DDB2</i>
7,777777778	1	12	2	1	1	10	1	1	<i>RAD51</i>
7,222222222	1	2	11	1	1	1	1	1	<i>UBE2N</i>
6,111111111	1	5	6	1	1	1	1	1	<i>MSH5</i>
6,111111111	23	5	6	1	1	1	1	1	<i>POLQ</i>
6,111111111	1	3	8	1	1	1	1	1	<i>HUS1</i>
6,111111111	2	8	3	1	1	1	3	1	<i>POLH</i>
6,111111111	1	7	4	1	1	3	3	1	<i>GTF2H1</i>
5,555555556	1	8	2	1	1	1	1	1	<i>SMUG1</i>
5,555555556	1	8	2	1	1	1	3	4	<i>PolB</i>
5	1	7	2	1	1	1	1	1	<i>FANCG (XRCC9)</i>
4,489795918	2	16	6	1	4	34	23	1	<i>MSH2</i>
4,444444444	1	4	4	1	1	3	3	1	<i>BLM</i>
4,444444444	1	4	4	1	1	3	6	1	<i>NBS1</i>
4,285714286	1	3	18	1	4	44	7	1	<i>DUT</i>
3,611111111	5	1	6	1	1	1	3	1	<i>RBM2B (p53R2)</i>
3,611111111	1	1	6	1	1	1	1	12	<i>XPC</i>
3,333333333	1	3	3	1	1	1	1	1	<i>MSH6</i>
3,265306122	6	13	3	1	4	7	27	1	<i>FEN1 (Dnase IV)</i>
3,178294574	6	28	13	1	12	3	3	1	<i>GTF2H2</i>
3,0625	1	20	29	8	8	3	16	20	<i>UBE2B (RAD6B)</i>
2,694444444	25	37	60	17	19	27	60	28	<i>G22P1 (Ku70)</i>
2,634615385	3	4	10	4	1	17	7	1	<i>RPA3</i>
2,611111111	1	4	1	1	1	1	3	1	<i>CDK7</i>
2,611111111	1	4	1	1	1	1	1	4	<i>LIG1</i>
2,611111111	1	4	1	1	1	7	1	1	<i>XRCC4</i>
2,25	3	16	11	4	8	10	20	1	<i>RAD23B (HR23B)</i>
2,244897959	1	7	4	1	4	1	1	1	<i>POLE</i>
2,244897959	1	7	4	1	4	1	3	1	<i>RAD23A (HR23A)</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	1	1	1	<i>MLH3 (MUTL3)</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	1	1	1	<i>PCNA</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	1	1	1	<i>RAD18</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	1	1	1	<i>RAD17 (RAD24)</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	1	3	1	<i>MSH3</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	3	1	1	<i>CHAF1A (CAF1)</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	1	3	1	<i>RAD9A</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	1	1	4	<i>XPA</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	7	1	1	<i>BRCA1</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	7	1	4	<i>MGMT</i>
2,222222222	1	2	2	1	1	7	7	1	<i>NUDT1 (MTH1)</i>
2,040816327	6	5	5	4	1	3	1	1	<i>RAD50</i>
2,040816327	1	4	6	1	4	1	1	8	<i>GTF2H4</i>
2,040816327	1	3	7	1	4	10	13	1	<i>H2AFX (H2AX)</i>
2	2	9	7	4	4	3	7	4	<i>RPA1</i>
1,916666667	1	4	19	4	8	3	3	1	<i>RPA2</i>
1,892857143	3	29	24	9	19	27	24	4	<i>XRCC5 (Ku80)</i>
1,686567164	3	58	55	17	50	20	63	24	<i>APEX</i>
1,632653061	1	2	6	1	4	1	1	1	<i>ATR</i>
1,632653061	1	4	4	4	1	3	1	4	<i>ERCC5 (XPG)</i>
1,375	5	7	4	4	4	3	20	4	<i>TDG</i>
1,224489796	1	3	3	1	4	1	1	1	<i>MNAT1</i>
1,224489796	1	3	3	1	4	1	7	4	<i>DCLRE1A (SNM1)</i>
1,157894737	35	8	14	4	15	3	1	1	<i>RAD1</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>MLH1 (MUTL1)</i>
1,111111111	3	1	1	1	1	1	1	1	<i>PMS2</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>GTF2H3</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>ERCC1</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>RAD51C C</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>RAD51L3</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>RAD52</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>FANCC</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>RECQL5</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>CHEK1</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	3	1	1	<i>WRN</i>
1,111111111	1	1	1	1	1	1	1	4	<i>PNKP</i>

Die Tabelle 10 enthält die Gene, die bei Mantelzell-Lymphomen im Vergleich zu den gesunden Zellen höher exprimiert sind. Das am höchsten exprimierte Gen ist TP53, was bei Überexpression in Mantelzell-Lymphomen mit einer schlechteren klinischen Prognose korreliert (Louie, *et al.*, 1995).

In der Tabelle 11 sind die Gene gezeigt, die zur NHEJ („*non homologous end joining*“)-, und zur MMR („*mismatch repair*“)-Maschinerie gehören. Die Gene der NHEJ-Maschinerie sind vor allem an der V(D)J-Rekombination beteiligt, da sie die Verknüpfung der kodierenden Enden vermitteln, die durch den RAG-Komplex gebunden sind (Repasky *et al.*, 2004). In der Literatur gibt es zudem Nachweise, dass die Verbindungsstellen, die beim Immunglobulin-Klassenwechsel innerhalb der S-Regionen entstehen, mit der NHEJ-Maschinerie in Verbindung gebracht werden können (Lehman *et al.*, 1994; Honjo *et al.*, 2002). Die Deaminierung von C nach U während der somatischen Hypermutation wird wahrscheinlich durch die konservierte und spezifische MMR-Maschinerie vermittelt (Wood *et al.*, 2001). Die an dieser Reparatur beteiligten Gene sind auch in der Phase der somatischen Hypermutation aktiv, wobei deren Defizienz mit einer unveränderten oder leicht niedrigeren Mutationsrate korreliert (Wiesendanger *et al.*, 1998). Zwei weitere Kandidaten, die an der somatischen Hypermutation beteiligt sein können, sind die Polymerasen H und Q (Seki *et al.*, 2005). Diese Polymerasen sind in Mantelzell-Lymphomen etwa um den Faktor 6 höher exprimiert, als die normalen Vergleichszellen (siehe Tab. 10).

Die Tabelle 11 zeigt, dass sowohl die Gene der NHEJ-, wie auch der MMR-Maschinerie in Mantelzell-Lymphomen im Vergleich zu normalen prä-Keimzentrums B-Zellen fast alle eine höhere Expression aufweisen. Dies korreliert zu der Beobachtung, dass in Mantelzell-Lymphomen verschiedene Rekombinationsereignisse stattfinden, die auf Sequenzebene nachweisbar sind und von DNA-Doppelstrangbrüchen begleitet werden. Die höhere Expression von DNA-Reparaturgenen, die durch diese Analyse gefunden wurde bestätigt damit die in dieser Doktorarbeit nachgewiesenen Prozesse nochmals, da sich die notwendigen Reparaturen in einer höheren Expression der Reparaturgene widerspiegeln könnte.

prä-B	MCL1	MCL2	B1	NBC	GCB	MBC	PC	Gen	
2	13	26	1	4	17	10	4	<i>PRKDC</i>	NHEJ
25	37	60	17	19	27	60	28	<i>Ku70</i>	
1	4	1	1	1	7	1	1	<i>XRCC4</i>	
1	3	7	1	4	10	13	1	<i>H2AFX</i>	
3	29	24	9	19	27	24	4	<i>Ku80</i>	
1	1	1	1	1	1	1	4	<i>Artemis</i>	
1	5	6	1	1	1	1	1	<i>MSH5</i>	MMR
2	16	6	1	4	34	23	1	<i>MSH2</i>	
1	3	3	1	1	1	1	1	<i>MSH6</i>	
1	2	2	1	1	1	3	1	<i>MSH3</i>	
1	2	2	1	1	1	1	1	<i>MLH3</i>	
1	1	1	1	1	1	1	1	<i>MLH1</i>	
3	1	1	1	1	1	1	1	<i>PMS2</i>	

Tab. 11: Liste der DNA-Reparaturgene, die zum *Non-homologous end-joining* (NHEJ) und zum *Mismatch repair* (MMR) gehören. Die Anzahl der SAGE-Tags wurde normalisiert auf 100.000. In dieser Tabelle wurden die Transkripthäufigkeiten beider MCL-Fälle mit denen von naiven und B1 B-Zellen verglichen (MCL001+MCL002)/(B1+NBC). Abkürzungen: NBC= *naive B cell*, GCB= *germinal center B cell*, MCB= *memory B cell*, PC= *plasma cell*.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass es viele mögliche Ursachen für sekundäre genetische Veränderungen im Mantelzell-Lymphom gibt. Dazu gehören die somatische Hypermutation, der Immunglobulin-Klassenwechsel und das Rezeptor-Editing über V_H-Replacement und Leichtkettenaustausch. Der Nachweis der Prozesse gelang vor allem durch eine detaillierte Sequenzanalyse, die durch die molekulare Analyse der *AID*-, *BCL6*- und *RAG*-Expression gestützt wurde. Zusätzlich zeigten sich bei der Sequenzanalyse zwei ungewöhnliche Arten des Leichtkettenaustauschs, deren Mechanismus noch ungeklärt bleibt. Alle innerhalb dieser Doktorarbeit nachgewiesenen Prozesse werden von DNA-Doppelstrangbrüchen begleitet, die zur DNA-Instabilität der Immunglobulinloci beitragen können. Durch die SAGE-Analyse wurde eine Hochregulation der DNA-Reparaturgene aufgedeckt, die den erhöhten Reparaturbedarf widerspiegeln könnte. Ob die Reparaturmechanismen jedoch überhaupt vollständig funktionieren bleibt an dieser Stelle ungeklärt.

4 Diskussion

Die Tatsache, dass die potentiell funktionellen Keimbahngene des V_H - und der V_L -Loci vollständig aufgeklärt sind, bietet eine Basis für die molekulare Analyse humaner V-Gene. Dabei stellt die Möglichkeit, exprimierte Sequenzen mit den dazu korrespondierenden Keimbahnsequenzen zu vergleichen, einen großen Vorteil dar.

Innerhalb dieser Doktorarbeit wurde vor allem dieser Vorteil genutzt, um sekundäre genetische Veränderungen im Mantelzell-Lymphom aufzudecken. Begleitend wurde die Expression von Genen und Proteinen nachgewiesen, die an DNA-modellierenden Prozessen während der B-Zell-Entwicklung teilhaben und zur Entstehung und Progression des Mantelzell-Lymphoms beitragen könnten. Aus dieser Analyse des im Mantelzell-Lymphom vorhandenen Antikörperrepertoires sind einige Aspekte hervorgegangen, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

4.1 Analyse der Immunglobulinsequenzen von Mantelzell-Lymphomen hinsichtlich Keimzentrums-spezifischer Prozesse

4.1.1 Einige Mantelzell-Lymphome besitzen mutierte V_H -Gene und Hinweise für fortlaufende somatische Hypermutation

Die Analyse von Mutationen innerhalb der Immunglobulingene von B-Zellen kann zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums der betrachteten Zelle zum Zeitpunkt der Untersuchung dienen. In den variablen Regionen der Antikörper sind in unreifen und naiven B-Zellen gar keine oder nur wenige Mutationen vorhanden (Klein *et al.*, 1993). Erst nach dem Kontakt zum Antigen werden während der Keimzentrumsreaktion über den Prozess der somatischen Hypermutation Nukleotide innerhalb der Immunglobulingene mutiert (Mc Kean *et al.*, 1984; Allen *et al.*, 1987). Somit weisen Keimzentrums B-Zellen und post-Keimzentrums B-Zellen eine hohe Mutationsrate im Vergleich zu den prä-Keimzentrums B-Zellen auf, die bei etwa 10^{-3} pro Basenpaar und Zellzyklus liegt (Berek *et al.*, 1991). Die Untersuchung der Mutationsrate kann dazu herangezogen werden, die entarteten Zellen von Leukämien und Lymphomen ihren physiologischen Vorläuferzellen zuzuordnen (Goossens *et al.*, 1998; Akasaka *et al.*, 2000). Das Mantelzell-Lymphom

wurde als prä-Keimzentrums-Lymphom klassifiziert, da sich die typische *CCND1*-Translokation während der V(D)J-Rekombination ereignet haben soll (Welzel *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass einige Mantelzell-Lymphome durchaus Keimzentrums-spezifische Prozesse, wie somatische Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel aufweisen (Walsh *et al.*, 2003; Du *et al.*, 1997; Thorselius *et al.*, 2002; Babbage *et al.*, 2004; Kienle *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2003).

Innerhalb dieser Doktorarbeit wurde angestrebt, mögliche Ursachen für sekundäre genetische Veränderungen in Mantelzell-Lymphomen aufzudecken, wobei die detaillierte Analyse der Immunglobulinsequenzen im Vordergrund stand. Die Analyse dieser Sequenzen bezüglich der somatischen Hypermutation hat gezeigt, dass 5 von 9 untersuchten primären MCL-Fällen und 4 von 7 Zelllinien mutiert sind (vgl. Tab. 5 und 6). Dieser Anteil an mutierten Fällen ist höher, als in der Literatur bisher beschrieben wurde (16-29%) (Bertoni *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2003). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Zahl der untersuchten Fälle gering ist, und nicht unbedingt den statistischen Anteil an mutierten Fällen widerspiegeln muss. Die mutierten Fälle scheinen aus dem Keimzentrumsstadium oder post-Keimzentrumsstadium der B-Zell Entwicklung hervorgegangen zu sein, oder eine Keimzentrumsähnliche Reaktion außerhalb erfahren zu haben. Um die Abstammung mutierter Zellen genauer zu definieren, reicht die Bestimmung der Mutationsrate nicht aus. Um zu bestimmen, ob die entartete Zelle von Keimzentrums B-Zellen oder post-Keimzentrums B-Zellen abstammt, muss der Nachweis von fortlaufender somatischer Hypermutation erbracht werden, wie es auch für normale Keimzentrums B-Zellen (Küppers *et al.*, 1993), und für Keimzentrum-spezifische Lymphome möglich war (Bahler *et al.*, 1992; Hummel *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994).

Über einen Vergleich der Mutationen innerhalb der klonalen Tumorphosphon der untersuchten Mantelzell-Lymphomfälle konnte der Nachweis fortlaufender somatischer Hypermutation in dem primären Fall MCL001 und den klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53 erbracht werden. Bei dem primären Fall MCL001 zeigten sich in den Sequenzen der Ig λ -Leichtketten des Tumorklons Subpopulationen, die unterschiedliche Mutationen aufwiesen. Diese Mutationen konnten anhand eines Mutationsstammbaumes in eine mögliche chronologische Abfolge gebracht werden (vgl. Abb. 14). Auf gleiche Weise war es möglich, die auftretenden Mutationen in den variablen V_H-Regionen der Zelllinien SP49 und SP53 in einen Stammbaum zu integrieren (vgl. Abb. 13A und B). Der Vergleich der beiden Stammbäume von SP49 und SP53 wiederum bestätigte die klonale Verwandtschaft dieser beiden Zelllinien. In den Fällen, wo die Erstellung eines Stammbaums möglich war,

ist ein Hinweis gegeben, dass während der klonalen Expansion des Tumors der Mechanismus der somatischen Hypermutation aktiv war und es sich definitionsgemäß daher um Keimzentrums B-Zellen handelt. Alternativ ist jedoch denkbar, dass der Prozess der somatischen Hypermutation unabhängig vom Keimzentrum stattfinden kann.

4.1.2 Mantelzell-Lymphome machen Immunglobulin-Klassenwechsel

Ebenso wie somatische Hypermutation kann auch ein aberranter Immunglobulin-Klassenwechsel aufgrund der begleitenden DNA-Doppelstrangbrüche zur Entstehung von malignen Erkrankungen, wie der Chronischen Lymphozytischen Leukämie beitragen (McKeithan *et al.*, 1997). Demzufolge kann dieser Prozess auch Ursache für weitere genetische Aberrationen sein. Diesbezüglich wurde der Mechanismus des Immunglobulin-Klassenwechsels in Mantelzell-Lymphomen vorrangig auf Sequenzebene untersucht und konnte in 3 von 9 primären Fällen und 5 von 7 Zelllinien nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4). Diese Fälle besaßen Immunglobulin-Isotypen, die aus einem Klassenwechsel der konstanten Regionen hervorgegangen sein müssen. Die Expression von IgM in unreifen B-Zellen und die Koexpression von IgM und IgD in naiven und B1-Zellen kann erst nach einem Immunglobulin-Klassenwechsel durch die Verwendung der IgG, IgA oder IgE-Isotypen ersetzt werden (Stavnezer, 1996). Diese klassengewechselten Isotypen werden dann mit derselben V_H -Region exprimiert, die schon mit der konstanten μ -Region assoziiert waren. Um dies auf Sequenzebene nachzuweisen, wurden die Sequenzen miteinander verglichen, die aus demselben MCL-Fall hervorgegangen sind, aber andere Isotypen aufwiesen. Dieser Vergleich hat bei 4 Zelllinien gezeigt, dass zusätzlich zur konstanten μ -Region auch klassengewechselte Isotypen mit derselben V_H -Region assoziiert waren (vgl. Abb. 9).

Interessant hierbei waren die klonal verwandten Zelllinien SP49 und SP53, die sich in dem Gebrauch der Isotypen unterschieden. Im Gegensatz zur SP49 Zelllinie, bei der ausschließlich der IgG₂ Isotyp nachgewiesen werden konnte, besaß die SP53 Zelllinie zusätzlich noch IgM, IgD und IgG₁. Im Vergleich der SP49 und SP53 Sequenzen bestätigte sich ebenfalls, dass die verschiedenen konstanten Regionen immer an dasselbe V_H -Gensegment rearrangiert waren (vgl. Abb. 11 und 12). Der Gebrauch unterschiedlicher Isotypen beim Vergleich dieser beiden Zelllinien ist somit ein Hinweis darauf, dass der

Prozess des Immunglobulin-Klassenwechsels auch noch während der klonalen Expansion des Tumors stattgefunden hat.

Der Nachweis von Immunglobulin-Klassenwechsel in Mantelzell-Lymphomen bietet zusätzlich zur somatischen Hypermutation demnach eine weitere mögliche Ursache von sekundären genetischen Veränderungen innerhalb dieser Lymphomentität. Zur Vervollständigung der Ergebnisse auf Sequenzebene erfolgte auf molekularer Ebene der Nachweis der für diese Prozesse relevanten Deaminase AID und auf gleiche Art auch der Nachweis des Keimzentrums-spezifischen Markers BCL6.

4.1.3 AID- und BCL6-Expression ist in einigen Mantelzell-Lymphomen nachweisbar

Die „*activation-induced cytidine deaminase*“ AID wird ausschließlich in den aktivierten B-Zellen des Keimzentrums exprimiert (Muramatsu *et al.*, 2000). In den Keimzentren ist die Expression von AID Grundvoraussetzung für die Prozesse der somatischen Hypermutation und dem Immunglobulin-Klassenwechsel. Die Initiation der somatischen Hypermutation wird durch den N-terminalen Bereich des Enzyms vermittelt (Shinkura *et al.*, 2004), wohingegen der C-Terminus für den Immunglobulin-Klassenwechsel verantwortlich zu sein scheint (Barreto *et al.*, 2003).

Die Expression von AID konnte auf transkriptioneller Ebene in 5 von 9 primären Fällen und bei allen Zelllinien nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15A). Die Expression von AID in den Epstein-Barr-Virus-positiven Fällen wurde erwartet, da LMP1 („*latent membrane protein*“), das von EBV kodiert wird, zu einer Induktion der AID-Expression führt (He, B. *et al.*, 2003). Da sich in den EBV-negativen Fällen auch AID-Expression nachweisen ließ, scheint eine Hochregulation der AID-Expression in Mantelzell-Lymphomen unabhängig vom EBV-Infektionsstatus zu sein. Von den 9 mutierten Fällen, zeigten nur 5 AID-Expression, was darauf hinweist, dass die vorliegenden Mutationen zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden haben müssen, wo AID aktiv war. Dieselbe Begründung gilt auch für die Fälle, die Immunglobulin-Klassenwechsel aufweisen, aber keine AID-Expression zeigen. Gleichzeitig wurde auch die Expression des Keimzentrums-spezifischen Markers BCL6 untersucht. Diese Analyse ergab, dass von den 13 Fällen, die BCL6-Expression zeigten, 9 eine Koexpression von AID aufwiesen. Die Expression von AID und BCL6

wurde in 3 von 5 untersuchten Fällen durch Proteinnachweis über Western Blot bestätigt (vgl. Abb. 16). Die Expression von *AID*- und *BCL6*-Transkripten, sowie die Proteinexpression in einigen Mantelzell-Lymphomen bestätigt somit, dass die für somatische Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel relevante *AID*-Expression und der Keimzentrums-spezifische Marker *BCL6* nachweisbar sind. Da *BCL6* die Plasmazell-Differenzierung blockiert und bei Überexpression die Zellen im Keimzentrum zurückgehalten werden (Albagli *et al.*, 1999), wäre es denkbar, dass eine konstitutive Koexpression von *AID* und *BCL6* in Mantelzell-Lymphomen zu einer erhöhten Mutationsrate führen könnte, da die Zellen unter diesen Umständen länger im Keimzentrum verbleiben und dadurch über einen längeren Zeitraum mutiert werden können.

Die somatische Hypermutation ist jedoch nicht auf die Immunglobulingene begrenzt, da es einige Beispiele für hypermutierte Nicht-Immunglobulingene gibt (Shen *et al.*, 1998; Müschen *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2003). Eine konstitutive Expression von *AID* könnte daher eine zusätzlich zur somatischen Hypermutation und dem Immunglobulin-Klassenwechsel eine weitere Gefahr für aberrante genetische Veränderungen darstellen, die beim Mantelzell-Lymphom die Progression des Tumors zur Folge haben kann, wenn entstehende DNA-Brüche nicht behoben werden.

4.2 Hochregulation von DNA-Reparaturgenen in Mantelzell-Lymphomen

Innerhalb dieser Arbeit wurde die SAGE-Methode genutzt, um differentiell exprimierte Gene des Mantelzell-Lymphoms zu bestimmen. Da Gene mit DNA-Reparaturfunktion eine kritische Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren haben, wurde zunächst allgemein die Expression von 90 verschiedenen DNA-Reparaturgenen mittels der SAGE-Methode analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Expression dieser Gene bei Mantelzell-Lymphomen im Mittel um den Faktor 2,7 höher war, als in den Vergleichszellen (Naive und B1 B-Zellen). Da eine Hochregulation von DNA-Reparaturgenen häufig in Zusammenhang mit einer Therapieresistenz maligner Tumore gebracht werden kann (Brown *et al.*, 2000; Ferrer *et al.*, 2004; M'Kacher *et al.*, 2003; Shintani *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005), könnte diese Hypothese auch für das Mantelzell-Lymphom gelten. Alternativ ist jedoch auch denkbar, dass sich das Auftreten von induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen während der somatischen Hypermutation oder dem Immunglobulin-Klassenwechsel in einer höheren Expression der daran beteiligten Gene widerspiegelt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Gene gesondert betrachtet, die in Verbindung mit diesen beiden Prozessen stehen (vgl. Tab. 11).

Während der DNA-Replikation können falsch eingebaute Nukleotide durch die MMR („*mismatch repair*“)-Maschinerie repariert werden (Kolodner, 1996). Es gibt zwei Klassen von MMR-Proteinen in Eukaryoten: Die MutS-Homologe, die falsch eingebaute Nukleotide erkennen und die MutL-Homologe, die an die DNA-gebundenen MutS-Homologe binden und die MMR-Maschinerie initiieren (Kolodner und Marsischky, 1999; Marti *et al.*, 2002). Neben der Reparatur von falsch eingebauten Nukleotiden, sind die MMR-Proteine auch indirekt an der somatischen Hypermutation beteiligt, da Mäuse, denen die Gene *Msh2*, *Msh6*, *Mlh1* oder *Pms2* fehlen, zwar nur eine leichte Verminderung der Mutationsrate aber ein verändertes Mutationsspektrum zeigen (Cascalho *et al.*, 1998; Rada *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1998; Wiesendanger *et al.*, 2000).

Die differentielle Expression der MMR-Gene in Mantelzell-Lymphomen wurde innerhalb dieser Doktorarbeit unter Verwendung eines SAGE-Profiles untersucht. Dabei zeigte sich, dass fast alle MMR-Transkripte im Vergleich zu naiven und B1-Zellen, die als gesundes Gegenstück zur entarteten Mantelzell-Lymphomzelle gilt, höher exprimiert waren (vgl.

Tab.11). Ebenfalls konnte eine höhere Expression der Polymerasen Q und H gezeigt werden (vgl. Tab.10), die auch an dem Prozess der somatischen Hypermutation beteiligt sein sollen (Seki *et al.*, 2005). Dies korreliert mit der Tatsache, dass in vielen Mantelzell-Lymphomen somatische Hypermutation nachweisbar war.

Es gibt Hinweise darauf, dass die MMR-Proteine auch am Immunglobulin-Klassenwechsel beteiligt sind (Ehrenstein und Neuberger, 1999; Schrader *et al.*, 1999; Ehrenstein *et al.*, 2001). Umgekehrt gilt dies jedoch nicht für die NHEJ („non homologous end joining“-Maschinerie, die bisher mit der V(D)J-Rekombination und Immunglobulin-Klassenwechsel, nicht aber mit der somatischen Hypermutation in Verbindung gebracht werden konnte (Honjo *et al.*, 2002). Die NHEJ-Proteine Ku70 und Ku80 bilden ein Heterodimer, welches eine DNA-bindende Domäne besitzt (Mimori und Hardin, 1986). Nach der Bindung an die DNA assoziiert der Ku-Komplex mit DNA-PK (PRKDC) und aktiviert die intrinsische Serin-Threonin Proteinkinase-Aktivität (Khanna und Jackson, 2001). DNA-PK wiederum ist in der Lage, XRCC4 und Artemis zu phosphorylieren (Smith und Jackson, 1999; Ma *et al.*, 2002). Die Analyse dieser NHEJ-Gene ergab, dass eine Hochregulation der Expression in Mantelzell-Lymphomen im Vergleich zu den gesunden Ursprungszellen vorlag (vgl. Tab.11). Ein weiteres Protein, das in Zusammenhang mit der NHEJ-Maschinerie steht, ist H2AFX (die spezielle Form des Histons H2A), das nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen Reparaturfaktoren rekrutiert (Paull *et al.*, 2000). Die SAGE-Analyse zeigte, dass die Transkriptionsrate dieses Gens ebenfalls in Mantelzell-Lymphomen erhöht war.

Es ist denkbar, dass sich die durch somatische Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel bedingten DNA-Reparaturen in einer höheren Expression der MMR- und NHEJ-Maschinerie widerspiegeln könnten. Dafür spricht auch, dass gerade in Keimzentrums B-Zellen, in denen natürlicherweise diese Prozesse stattfinden, vor allem die Gene der NHEJ-Maschinerie vergleichsweise hoch exprimiert sind, wie in Mantelzell-Lymphomen (vgl. Tab. 11). Der Nachweis von somatischer Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel in Mantelzell-Lymphomen und die Tatsache, dass eine vergleichbare Expression von DNA-Reparaturgenen in Keimzentrums B-Zellen vorliegt, stellt vor allem die zelluläre Herkunft des Mantelzell-Lymphoms erneut in Frage, da es möglich ist, dass Mantelzell-Lymphome auch aus dem Keimzentrumsstadium oder post-Keimzentrumsstadium hervorgehen können (Lászlo *et al.*, 2000).

4.3 Besitzen Mantelzell-Lymphomzellen autoreaktive Spezifitäten?

Autoreaktivität hat Immunologen schon seit der Zeit beschäftigt, in der Paul Ehrlich vermutete, dass das Immunsystem Autoreaktivität von Zellen, den sogenannten „Horror autotoxicus“ vermeiden müsse (Ehrlich, 1900). Für Landsteiner bestand in den 1930er Jahren die Problematik darin, dass ein Immunrepertoire mit einem hohen Maß an Diversität nicht in der Lage sein könne, Autoreaktivität zu vermeiden (Landsteiner, 1936).

Seit längerem weiß man, dass diese Diversität vor allem durch den Mechanismus der V(D)J-Rekombination gewährleistet wird (Tonegawa, 1983). Ein Großteil der während der normalen B-Zell-Entwicklung neu gebildeten Antikörper ist tatsächlich autoreaktiv (Wardemann *et al.*, 2003). Die Vermeidung von Autoreaktivität geschieht vorrangig durch drei Prozesse: Rezeptor-Editing, klonale Deletion und Anergie (Gay *et al.*, 1993; Tiegs *et al.*, 1993; Nemazee und Burki, 1989; Goodnow *et al.*, 1988). Heutzutage sind einige Faktoren bekannt, die mit Autoreaktivität assoziiert sind.

Ein in der Literatur beschriebener Hinweis auf Autoreaktivität ist die Expression des 67kD großen Transmembran Glykoproteins CD5, welches einen typischen Oberflächenmarker bei Mantelzell-Lymphomen darstellt (Williams und Densmore, 2005). CD5 besitzt eine Schlüsselfunktion in der Regulation von Immuntoleranz und eine Änderung der Aktivität kann die Entstehung von Autoreaktivität begünstigen (Raman, 2002). In Bezug auf Autoimmunerkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass CD5 positive Zellen an der Produktion von polyreaktiven und autoreaktiven Antikörpern beteiligt sind (Youinou und Lydyard, 2001).

Andere Hinweise auf Autoreaktivität können durch die Analyse von *IGH*-Sequenzen erbracht werden, wobei die Sequenz allein keine Aussage zulässt, ob ein Antikörper autoreaktiv ist (Wardemann *et al.*, 2004). Es konnte ein Zusammenhang zwischen langen *IGH*-CDR3-Regionen und dem Vorhandensein von autoreaktiven oder polyreaktiven Antikörpern nachgewiesen werden (Ichiyoshi und Casali, 1994; Crouzier *et al.*, 1995; Klonowski *et al.*, 1999; Aguilera *et al.*, 2001). Liegen innerhalb der CDR3-Region gehäuft (mehr als zwei) positiv geladene Aminosäuren vor, besteht ein weiterer möglicher Hinweis auf Autoreaktivität (van Es *et al.*, 1991; Ravirajan *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1992). Innerhalb dieser Doktorarbeit wurden lange CDR3-Regionen unter den untersuchten Fällen nachgewiesen, und auch in einigen Fällen mehr als zwei basische Aminosäuren gefunden (vgl. Tab. 7).

Es schienen vor allem die CDR3-Regionen, die zu stark mutierten Fällen gehören, mehr basische Aminosäuren aufzuweisen als nicht mutierte Fälle. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die basischen Aminosäuren auch durch den Mechanismus der VDJ-Rekombination entstanden sein könnten. Eine mögliche Korrelation zwischen somatischer Hypermutation und Autoreaktivität könnte darin bestehen, dass über den Prozess der somatischen Hypermutation eine bestehende autoreaktive Spezifität verändert werden soll. Ein vergleichbarer Mechanismus wird in der Chronischen lymphozytischen Leukämie (CLL) vermutet (Hervé *et al.*, 2005). Diese Erkrankung weist sowohl mutierte, als auch unmutierte Subgruppen auf, wobei die mutierte Subgruppe mit einer besseren klinischen Prognose assoziiert ist (Hamblin *et al.*, 1999). Dies gilt nicht analog für das Mantelzell-Lymphom, da hier kein prognostischer Unterschied gefunden wurde (Bertoni *et al.*, 2004). Daher scheint diese Art des Zusammenhangs zwischen somatischer Hypermutation und Autoreaktivität bei Mantelzell-Lymphomen nicht zu gelten. Alternativ ist eher denkbar, dass gerade durch Hypermutation Autoreaktivität in den Mantelzell-Lymphomzellen hervorgerufen wird, was möglicherweise einen Beitrag zur Malignität dieser Entität leistet.

Wie bereits anfangs erwähnt wurde, ist Rezeptor-Editing eine weitere Möglichkeit der Zelle, eine autoreaktive Spezifität zu verändern (Gay *et al.*, 1993). Dabei wird durch ein sekundäres V(D)J-Rekombinationsereignis der bestehende autoreaktive Antikörper durch einen neuen Antikörper ersetzt (Pelanda *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998). Im Leichtkettenloкус geschieht der Austausch des vorliegenden $V_{\lambda}J_{\lambda}$ -Rearrangements durch ein stromaufwärts gelegenes neues V_{λ} - und ein weiter stromabwärts gelegenes J_{λ} -Segment und kann so einen autoreaktiven Antikörper verändern (Nemazee, 1996). Beim Schwerkettenloкус ist diese Art des Austausches nicht möglich, da im Zuge des ersten Rekombinationsereignisses alle weiteren D_H -Segmente deletiert werden. Daher findet im *IGH*-Lokus das sogenannte V_H -Replacement statt, wobei dort ausschließlich ein V_H -Gensegment partiell ausgetauscht wird (Zhang *et al.*, 2003).

Innerhalb dieser Doktorarbeit konnte bei der Zelllinie Jeko-1 ein typischer Austausch der Leichtketten beobachtet werden. Es wurde eine starke intraklonale Diversität der Leichtketten in dieser Zelllinie auf Sequenzebene nachgewiesen, wobei sich wiederholt nur eine rearrangierte funktionelle schwere Kette zeigte (vgl. Tab. 8). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass in diesem Fall Rezeptor-Editing vorliegt, was auch durch die Beobachtung gestützt werden konnte, dass die am meisten stromaufwärts-gelegenen V-

Segmente vorrangig mit stromabwärts-gelegenen J-Segmenten rearrangiert waren (vgl. Tab. 8A). Zudem spiegelt sich auch in dem Verhältnis von funktionellen zu nicht funktionellen Rearrangements wider, ob Rezeptor-Editing vorliegt (Lee *et al.*, 2000). Bei der Jeko-1 Zelllinie waren insgesamt mehr nicht funktionelle Rearrangements im Vergleich zu funktionellen Rearrangements nachweisbar, was zu den niedrigeren *in frame/out of frame* Verhältnissen der beiden Leichtketten (etwa 0,6:1 statt 2,5:1) korrespondiert (vgl. Tab. 8B). Auf Sequenzebene zeigten sich also Hinweise für Rezeptor-Editing. Da sich bei der durchflusszytometrischen Analyse dieser Zelllinie zusätzlich zu der κ^+ -Hauptpopulation eine kleine λ^+ -Subpopulation zeigte (vgl. Tab. 1), ergab sich ein weiterer Versuch, der in Anlehnung an einen Versuch in der Maus (Ait-Azzouzene *et al.*, 2005) dazu genutzt werden sollte, Rezeptor-Editing in Mantelzell-Lymphomzellen zu induzieren. Dabei wurde die Jeko-1 Zelllinie einem exogenen Stimulus unterzogen, der eine autoreaktive Aktivität imitieren sollte. Daher wurde in diesem Versuch ein anti- κ -Antikörper eingesetzt, der die κ -positiven Zellen dazu veranlassen sollte, ihren Rezeptor von κ nach λ zu editieren, um dem autoreaktiven Reiz auszuweichen (vgl. 2.10.1). In einer durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich nach dieser Art der Stimulation ein Anwachsen der λ -positiven Population im Verhältnis zur κ -positiven Population (vgl. Abb. 17). Ebenso ließen sich sogenannte „*double producer*“ nachweisen, die sowohl κ als auch λ koexprimieren. Diese Zellen könnten gerade im Begriff sein, ihren Rezeptor von κ nach λ zu revidieren (Pauza *et al.*, 1993). Die normale Reihenfolge der Rekombination beginnt im *IGH*-Lokus, dann wird der κ -Lokus rearrangiert und nach der Inaktivierung des κ -Lokus durch KDE (engl.: *kappa deleting element*) zuletzt der λ -Lokus rearrangiert (Tonegawa, 1983; Korsmeyer *et al.*, 1981; Blackwell und Alt 1989; Klein *et al.*, 2005).

Die Beobachtung des Rezeptor-Editings bei der Jeko-1 Zelllinie wurde durch den Nachweis einer leicht höheren *RAG1/2*-Expression in den anti- κ -behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen unterstützt (vgl. Abb. 18). Die Reexpression von RAG-Proteinen ist notwendig, um die vorhandenen autoreaktiven Antikörper einer Zelle durch erneute V(D)J-Rekombination zu beseitigen (Hertz und Nemazee, 1997; Melamed *et al.*, 1998). In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Koexpression von *RAG1/2* und *VpreB* und dem Auftreten von Rezeptor-Editing beschrieben (Meffre *et al.*, 2000). Diese Veröffentlichung beschreibt eine Gruppe von humanen B-Zellen, die Rezeptor-Editing assoziierte Eigenschaften aufweisen, und sowohl konventionelle Leichtketten, sowie *VpreB* exprimieren.

Einige dieser Eigenschaften stimmen mit den FACS-Daten der Jeko-1 Zelllinie überein, da bei der anfänglichen durchflusszytometrischen Untersuchung auch eine Subpopulation von *VpreB*-positiven Zellen gefunden wurde. Auch bei den behandelten Zellen wurde die Expression von *VpreB* betrachtet (vgl. Abb.17D), wobei sich in diesem Fall keine *VpreB*-Expression nachweisen ließ.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Ersatzleichtketten zwar mit gleicher Affinität an die schwere Kette binden (Gauthier *et al.*, 1999), aber bei einer Koexistenz von konventionellen und Ersatzleichtketten die konventionellen Ketten viel stärker exprimiert werden und dadurch die Ersatzleichtketten quasi verdrängt werden (Lassoued *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998).

Es gibt demnach verschiedene Hinweise darauf, dass einige Mantelzell-Lymphomzellen eine autoreaktive Aktivität besitzen könnten. Um diesbezüglich eine Aussage zum Mantelzell-Lymphom zu treffen, könnten rekombinante Antikörper hergestellt werden und deren Reaktivität über ELISA getestet werden, da die Sequenz allein nicht aussagekräftig genug ist, um eine Autoreaktivität des Antikörpers nachzuweisen. Welche Rolle Autoreaktivität für die Pathogenese in Mantelzell-Lymphomen spielt, bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Mantelzell-Lymphom eine sehr heterogene Entität ist (Lászlo *et al.*, 2000). Diese Heterogenität spiegelt sich nicht nur in den verschiedenen morphologischen Varianten, die sich hinsichtlich der Überlebensrate der Patienten unterscheiden (Majlis *et al.*, 1997), sondern auch auf DNA-Ebene in einem komplexen Karyotyp wider (Bentz *et al.*, 2000). In Bezug auf Autoreaktivität ist jedoch vor allem das Vorhandensein von somatischer Hypermutation interessant, da dieser Prozess entweder eine autoreaktive Spezifität hervorbringen oder verändern kann. Da Mantelzell-Lymphome mutierte und unmutierte Subgruppen aufweisen, ist es daher unwahrscheinlich, dass Autoreaktivität ein allgemeines Phänomen oder Charakteristikum dieser Erkrankung sein könnte. Dennoch könnte die weitere Untersuchung von Autoreaktivität in Mantelzell-Lymphomen interessante Einblicke in die Entstehung des Tumors geben und vielleicht auch die vorhandene Heterogenität im Ansatz erklären.

4.4 Gibt es eine neue Art des Rezeptor-Editings in Mantelzell-Lymphomen?

4.4.1 V_{λ} -Replacement

In der Jeko-1 Zelllinie konnte innerhalb dieser Doktorarbeit das im vorherigen Kapitel schon beschriebene Rezeptor-Editing durch den Austausch der Leichtketten nachgewiesen werden und ein möglicher Zusammenhang zu Autoreaktivität hergestellt werden. Eine andere bekannte Art des Rezeptor-Editings vollzieht sich im *IGH*-Lokus, wo V_H -Replacement zur Erneuerung des Rezeptors beiträgt (Zhang *et al.*, 2003). Ein Beispiel für V_H -Replacement zeigte sich auch in dem primären Fall MCL898, wobei hier offensichtlich ein weiter stromaufwärts liegender cRSS-Bereich für die Rekombination genutzt wurde (vgl. Abb. 19). In dem primären Fall MCL001 jedoch zeigte sich ein zum V_H -Replacement vergleichbarer Mechanismus im *IGL*-Lokus. Beim Sequenzvergleich stimmten die Bereiche stromabwärts vom 3'- V_{λ} , über die CDR3-Region, bis hin zum J_{λ} -Gensegment überein, wobei der 5'-Bereich des V_{λ} -Gensegmentes offenbar ausgetauscht wurde. Gleichzeitig konnte eine mögliche cRSS-Sequenz in dem Bereich identifiziert werden, an der ein Bruch stattgefunden haben könnte. Für diese Art des Leichtkettenaustausches wurden zwei Beispiele gefunden (vgl. Abb. 23 und 24). Unter der Berücksichtigung aller Ergebnisse, die aus dieser Analyse hervorgegangen sind, wie eine vorhandene mögliche cRSS-Sequenz, übereinstimmende CDR3-Region und übereinstimmende Mutationen im J_{λ} -Bereich, gibt es genügend Hinweise, die in Analogie zum V_H -Replacement für ein V_{λ} -Replacement sprechen. Hinzu kommt, dass der Aufbau der RSS-Bereiche von V_H - und V_{λ} -Gensegmenten übereinstimmt und somit denkbar ist, dass ein mögliches V_{λ} -Replacement denselben mechanistischen Regeln, wie ein V_H -Replacement folgt.

4.4.2 J_λ -Replacement

Anders stellt sich das jedoch bei dem J_λ -Replacement dar, welches sich in demselben primären Fall nachweisen ließ. Hier stimmt der V_λ -Teil bis in den 3'-Bereich im Sequenzvergleich überein, wobei die darauf folgende CDR3-Region und das J_λ -Segment sich unterscheiden (vgl. Abb. 26 und 27). Es scheint also ähnlich wie beim zuvor beschriebenen V_λ -Replacements ein Bruch im 3'-Bereich des V_λ -Gens stattgefunden zu haben, wobei der hinter dem Bruch liegende Teil neu arrangiert wurde. Für das J_λ -Replacement würden jedoch nicht dieselben mechanistischen Voraussetzungen gelten. Während der normalen V(D)J-Rekombination wirkt sich die Länge des RSS-Spacers direkt auf die Effizienz der Reaktion aus, da ein 12/23er Signalpaar benötigt wird (Tonegawa, 1983; Sawchuk *et al.*, 1997). Beim J_λ -Replacement liegen jedoch keine offensichtlichen Sequenzbereiche vor, die einen cRSS-abhängigen Mechanismus erlauben. Der vorliegende cRSS-Bereich, der innerhalb der Sequenzen nachgewiesen wurde kann sich nicht mit dem konventionellen RSS-Bereichs des ausgetauschten J_λ -Segmentes gepaart und zu einer Rekombination geführt haben, da diese beiden Signalsequenzen gegenläufig orientiert sind, wobei selbst in diesem Fall Beispiele in der Literatur beschrieben sind, wie es trotzdem zu einem Austausch kommen könnte (Wilson *et al.*, 2000). Hinzu kommt allerdings, dass der vorliegende 3'-Bereich des V_λ -Gen vor dem neu hinzugekommenen J_λ -Segment nicht erklärbar ist. Die Tatsache, dass sich demnach das J_λ -Replacement nicht, wie das V_λ -Replacement, mit einem cRSS-vermittelten Mechanismus vereinbaren lässt, wirft die Frage auf, wie dieses Hybrid entstanden sein könnte.

Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei diesem Hybrid um ein Artefakt handeln könnte, ist die wahrscheinlichste Möglichkeit, die zur Entstehung eines solchen Artefaktes beitragen könnte die initiale PCR-Reaktion. Eine mögliche Artefaktbildung innerhalb einer PCR-Reaktion ist in der Abb. 29 schematisch wiedergegeben.

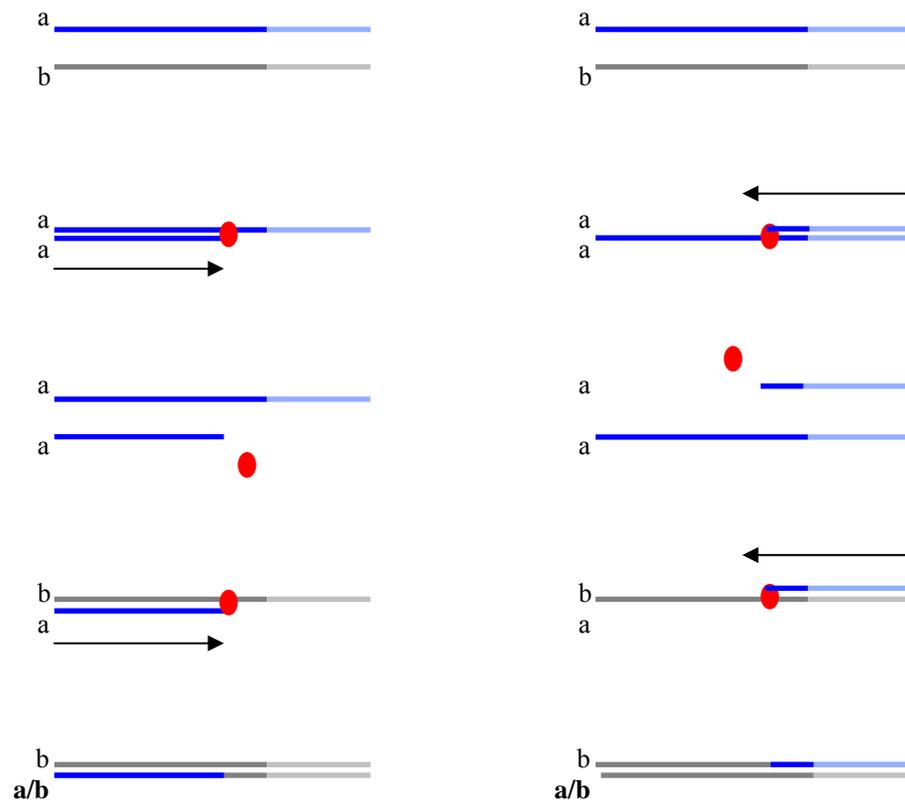


Abb. 29: Schematische Darstellung der Artefaktbildung während einer PCR Reaktion. Der rote Kreis soll die *Taq* DNA-Polymerase darstellen. Pfeile weisen in die Elongationsrichtung. Die hier schematisch dargestellten Sequenzen besitzen einen in dunkel dargestellten V-Bereich und einen in hell dargestellten J-Bereich. Die Artefaktbildung ist beispielhaft an beiden Strängen dargestellt.

Eins der unterschiedlichen Templates a und b (in diesem Beispiel a) könnte während eines Elongationsschrittes nicht vollständig repliziert worden sein, wenn die Polymerase zufällig abfällt, oder das Template an dieser Position schon vorher gebrochen war. Über Sequenzhomologiebereiche könnte dann das kürzere Fragment a im nächsten Annealingschritt an die Sequenz b binden und von dort aus elongiert werden. Dadurch würde in der Konsequenz eine Hybridsequenz entstehen, die aus dem 5'-Bereich des V-Segmentes a und dem restlichen Bereich des Templates b besteht. Diese Art der Artefaktbildung könnte sich an beiden Strängen ereignen und so zum Austausch des V-Segmentes oder zum Austausch des J-Segmentes führen.

Diese demnach theoretisch denkbaren PCR-Artefakte besäßen dann eine erschreckende Ähnlichkeit zu den Hybridsequenzen, die innerhalb dieser Doktorarbeit identifiziert wurden. Dagegen spricht allerdings das in Abb. 27 dargestellte Beispiel für J_λ -Replacement. Die V_λ -Bereiche beider Sequenzen teilen 13 übereinstimmende Mutationen, wobei eine dieser Sequenzen noch 10 Zusätzliche aufweist. Es lassen sich die zuvor beschriebenen möglichen PCR-Artefakte in diesem Beispiel ausschließen, da ansonsten die V_λ -Bereiche identisch sein müssten. Die Entstehung von 10 zusätzlichen Mutationen kann hierbei auch nicht durch die Fehlerrate der verwendeten *Taq*-Polymerase begründet sein, da diese laut Hersteller (Invitrogen) bei 1×10^4 pro bp liegt.

Da ein PCR-Artefakt demzufolge unwahrscheinlich ist, stellt sich weiterhin die Frage, durch welchen Mechanismus die Hybridsequenz des J_λ -Replacement entstanden ist. Einige Arbeiten zeigen, dass im TCR β -Lokus individuelle RSS-Bereiche die Benutzung von Gensegmenten über die 12/23er Regel hinaus regulieren können (Sleckman *et al.*, 2000; Bassing *et al.*, 2000). Zudem ist bekannt, dass im *IGH*-Lokus vorkommende cRSS-Bereiche stark von der eigentlichen Konsensussequenz abweichen können und trotzdem eine Rekombination vermitteln können (Hesse *et al.*, 1989). Bei der Untersuchung einer Maus, der D-Elemente fehlen, konnte eine Rekombination zwischen einem 23/23er Signalpaar nachgewiesen werden, die ebenfalls im Widerspruch zur 12/23er Regel steht (Koralov *et al.*, 2005). Vielleicht liegt in den Sequenzen des untersuchten primären Falls ein cRSS-Bereich, der eine Rekombination ermöglicht. Diese Sequenz könnte allerdings unerkannt bleiben, wenn sie stark von der Konsensussequenz abweicht.

Alternativ wäre allerdings viel näherliegend, dass der Austauschmechanismus beim J_λ -Replacement über homologe Rekombination geschieht. Der notwendige Bruch könnte zum einen im cRSS-Bereich durch RAG, oder durch AID an einem mutagenen „hot spot“ (RGWY-Motiv) initiiert worden sein. In dem untersuchten Fall MCL001 konnte die Expression von AID auf Transkriptebene (vgl. Abb. 15), wie durch eine Western Blot Analyse (vgl. Abb. 16) nachgewiesen werden. Über Sequenzhomologiebereiche könnten zwei unterschiedliche Sequenzen miteinander rekombiniert werden und die Entstehung von Sequenzhybriden erklären.

Der tatsächlich stattgefunden Mechanismus, der sowohl zum V_{λ} -, als auch zum J_{λ} -Replacement geführt hat, bleibt an dieser Stelle ungewiss, wobei es jedoch Gründe gibt, die sowohl einen cRSS/RAG-vermittelten Mechanismus ähnlich zum V_H -Replacement, als auch einen AID-vermittelten Austausch über homologe Rekombination denkbar machen. Die Identifikation des vorliegenden Mechanismus könnte über einen Nachweis von Rekombinationsintermediaten, wie den „*excision circles*“ beim V_H -Replacement erbracht werden (Zhang *et al.*, 2003), wobei dieser Nachweis nicht in allen Fällen gelang (Wilson *et al.*, 2000). Neu bleibt jedoch der Nachweis des partiellen Austauschs von Gensegmenten in der λ -Leichtkette. Ob dieses Phänomen typischerweise mit Mantelzell-Lymphomen assoziiert ist bleibt allerdings fraglich. Unstrittig scheint jedoch die Hypothese, dass die für diese Art des Austausches notwendigen Doppelstrangbrüche immer ein Risiko für genetische Aberrationen bergen.

Zusammengefasst zeigt sich, dass in Mantelzell-Lymphomen verschiedene Prozesse nachweisbar sind, die zur DNA-Instabilität in den Immunglobulinloci beitragen können. Diese Arbeit konnte zeigen, dass somatische Hypermutation (vgl. 3.3) und Immunglobulin-Klassenwechsel (vgl. 3.2) nicht untypisch für Mantelzell-Lymphome sind. Ebenso konnten klassische Möglichkeiten des Rezeptor-Editings, wie der Leichtkettenaustausch (vgl. 3.5.1) und V_H -Replacement (vgl. 3.5.2.1) identifiziert werden. Zusätzlich wurden zwei weitere mögliche Beispiele für sekundäre Rekombinationsereignisse aufgedeckt: V_{λ} - und J_{λ} -Replacement. Jeder der genannten Prozesse könnte an Translokationen beteiligt sein, die infolgedessen die genomische Integrität gefährden (Vega und Medeiros, 2003). Da man zusätzlich zu der für das Mantelzell-Lymphom typischen *CCND1-IGH*-Translokation auch weitere zahlreiche Abschnitte im Genom findet, die chromosomale Aberrationen aufweisen (Bentz *et al.*, 2000), scheinen die Ergebnisse, die innerhalb dieser Doktorarbeit erzielt wurden, einen möglichen Erklärungsansatz dafür zu bieten.

5 Zusammenfassung

Das Mantelzell-Lymphom ist eine Krebserkrankung, die aus B-Zellen hervorgeht. Während der normalen B-Zell Entwicklung ereignen sich DNA-Umlagerungsprozesse und Mutationen, die von DNA-Doppelstrangbrüchen begleitet werden. Dazu gehört die V(D)J-Rekombination, Rezeptor Editing, Somatische Hypermutation und der Immunglobulin-Klassenwechsel. Die dabei entstehenden Doppelstrangbrüche innerhalb der DNA bergen allerdings auch die Gefahr, dass genetische Aberrationen auftreten können. Das Mantelzell-Lymphom ist eine aggressiv verlaufende B-Zell Neoplasie, die aus prä-Keimzentrums B-Zellen hervorgeht. Um mögliche Ursachen für genetische Veränderungen im Mantelzell-Lymphom zu untersuchen, stand die detaillierte Analyse von Immunglobulingensequenzen im Vordergrund. Dabei zeigte sich, dass viele Mantelzell-Lymphomzellen mutiert sind, wobei die Detailanalyse der Mutationen innerhalb der klonalen Tumorphosphon in einigen Fällen die Erstellung eines Stammbaums ermöglichte und ein Hinweis auf aktive somatische Hypermutation ist. Ebenso konnten verschiedene Immunglobulin-Isotypen in einigen MCL-Fällen gefunden werden, was ein Beweis für Immunglobulin-Klassenwechsel ist. Expression der Cytidineaminase AID, die an beiden Prozessen beteiligt ist, konnte in diesen Fällen sowohl durch RT-PCR, wie auch Westernblot nachgewiesen werden. Zudem erfolgte ein Nachweis des Keimzentrums spezifischen Markers BCL6, der von einigen MCL-Fällen ebenso exprimiert wird. Desweiteren stand die Frage im Vordergrund, ob V(D)J-Rekombinationsereignisse mit chromosomalen Translokationsereignissen in Mantelzell-Lymphomen in Verbindung zu bringen sind und einen möglichen Erklärungsansatz für die typischerweise beobachtete *CCND1-IGH* Translokation bieten. Innerhalb der Untersuchungen konnten bisher nicht beschriebene sekundäre Rekombinationsereignisse innerhalb des λ -Leichtkettenlokus aufgedeckt werden. Abweichend von dem herkömmlichen Leichtkettenaustausch zeigten die Untersuchungen, dass sich Rekombinationen ereignet haben, bei denen nur das V_{λ} -Gensegment partiell ausgetauscht wurde. Ebenso konnte ein Austausch des J_{λ} -Gensegmentes nachgewiesen werden, was bisher nicht beschrieben wurde. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass sich in Mantelzell-Lymphomen kontinuierlich verschiedene DNA-Rekombinationen ereignen, die eventuell zur genomischen Instabilität in den Immunglobulinloci des Mantelzell-Lymphoms beitragen.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilera I, Melero J, Nunez-Roldan A, Sanchez B.
Molecular structure of eight human autoreactive monoclonal antibodies.
Immunology 2001; **102**: 273-280.
- Ait-Azzouzene D, Verkoczy L, Peters J, Gavin A, Skog P, Vela JL, Nemazee D.
An immunoglobulin C kappa-reactive single chain antibody fusion protein induces tolerance through receptor editing in a normal polyclonal immune system.
J Exp Med 2005; **201**: 817-828.
- Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, Ohno H.
Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6.
Blood 2000; **96**: 2907-2909.
- Albagli O, Lantoin D, Quief S, Quignon F, Englert C, Kerckaert JP, Montarras D, Pinset C, Lindon C.
Overexpressed BCL6 (LAZ3) oncoprotein triggers apoptosis, delays S phase progression and associates with replication foci.
Oncogene 1999; **18**: 5063-5075.
- Allen D, Cumano A, Dildrop R, Kocks C, Rajewsky K, Rajewsky N, Roes J, Sablitzky F, Siekevitz M.
Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development.
Immunol Rev 1987; **96**: 5-22.
- Argatoff L, Connors J, Klasa R, Horsman D, Gascoyne R.
Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases.
Blood 1997; **89**: 2067-2078.
- Babbage G, Garand R, Robillard N, Zojer N, Stevenson FK, Sahota SS.
Mantle cell lymphoma with t(11;14) and unmutated or mutated VH genes expresses AID and undergoes isotype switch events.
Blood 2004; **103**: 2795-2798.
- Bahler DW, Levy R.
Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection.
Proc Natl Acad Sci U S A 1992; **89**: 6770-6774.
- Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES, et al.
Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data.
Am J Surg Pathol 1992; **16**: 637-640.
- Barreto V, Reina-San-Martin B, Ramiro AR, McBride KM, Nussenzweig MC.
C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion.
Mol Cell 2003; **12**: 501-508.
- Bassing CH, Alt FW, Hughes MM, D'Auteuil M, Wehrly TD, Woodman BB, Gartner F, White JM, Davidson L, Sleckman BP.
Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule.
Nature 2000; **405**: 583-586.
- Bemark M, Neuberger MS.
By-products of immunoglobulin somatic hypermutation.
Genes Chromosomes Cancer 2003; **38**: 32-39.

- Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, Baudis M, Barth TF, Moller P, Lichter P, Dohner H
t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Genes Chromosomes Cancer 2000; **27**: 285-294.
- Berek C, Berger A, Apel M.
Maturation of the immune response in germinal centers.
Cell 1991; **67**: 1121-1129.
- Bertoni F, Zucca E, Cavalli F.
Mantle cell lymphoma.
Curr Opin Hematol 2004; **11**: 411-418.
- Betz AG, Rada C, Pannell R, Milstein C, Neuberger MS.
Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots.
Proc Natl Acad Sci U S A 1993; **90**: 2385-2388.
- Bhat NM, Kantor AB, Bieber MM, Stall AM, Herzenberg LA, Teng NN.
The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells.
Int Immunol 1992; **4**: 243-252.
- Blackwell TK, Alt FW.
Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals.
Annu Rev Genet 1989; **23**: 605-636.
- Bradbury, LE, Kansas, GS, Levy, S, Evans, RL, Tedder, TF.
The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules.
J Immunol 1992; **149**: 2841-2850.
- Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE.
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 1997; **99**: 2488-2501.
- Brown KD, Lataxes TA, Shangary S, Mannino JL, Giardina JF, Chen J, Baskaran R.
Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism.
J Biol Chem 2000; **275**: 6651-6656.
- Busslinger M, Nutt SL, Rolink AG.
Lineage commitment in lymphopoiesis.
Curr Opin Immunol 2000; **12**: 151-158.
- Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C.
Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells.
Annu Rev Immunol 2003; **21**: 205-230.
- Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernandez PL, Campo E.
ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances.
Blood 2002; **99**: 238-244.

- Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Martinez N, Martinez-Climent JA, Gonzalez M, Mateo M, Caleo A, Sanchez-Beato M, Menarguez J, Garcia-Conde J, Sole F, Campo E, Piris MA.
Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations.
Blood 2003; **101**: 4042-4046.
- Cascalho M, Wong J, Steinberg C, Wabl M.
Mismatch repair co-opted by hypermutation.
Science 1998; **279**: 1207-1210.
- Chen C, Prak EL, Weigert M.
Editing disease-associated autoantibodies.
Immunity 1997; **6**: 97-105.
- Chitarra V, Alzari PM, Bentley GA, Bhat TN, Eisele JL, Houdusse A, Lescar J, Souchon H, Poljak RJ.
Three-dimensional structure of a heteroclitic antigen-antibody cross-reaction complex.
Proc Natl Acad Sci U S A 1993; **90**: 7711-7715.
- Crouzier R, Martin T, Pasquali JL.
Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors.
J Immunol 1995; **154**: 4526-4535.
- Davis MM, Kim SK, Hood LE.
DNA sequences mediating class switching in alpha-immunoglobulins.
Science 1980; **209**: 1360-1365.
- Delespesse G, Sarfati M, Hofstetter H.
Human IgE-binding factors.
Immunol Today 1989; **10**: 159-164.
- Delves PJ, Roitt IM.
The immune system. First of two parts.
N Engl J Med 2000; **343**: 37-49.
- Delves PJ, Roitt IM.
The immune system. Second of two parts.
N Engl J Med 2000; **343**: 108-117.
- Di Noia J, Neuberger MS.
Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase.
Nature 2002; **419**: 43-48.
- Du MQ, Diss TC, Xu CF, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan LX.
Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas.
Br J Haematol 1997; **96**: 124-131.
- Dunnick W, Rabbitts TH, Milstein C.
An immunoglobulin deletion mutant with implications for the heavy-chain switch and RNA splicing.
Nature 1980; **286**: 669-675.
- Edry E, Melamed D.
Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis.
J Immunol 2004; **173**: 4265-4271.
- Ehrlich P.
On immunity with special reference to cell life.
Proc R Soc Lond 1900; 424-428.

- Ehrenstein MR, Neuberger MS.
Deficiency in Msh2 affects the efficiency and local sequence specificity of immunoglobulin class-switch recombination: parallels with somatic hypermutation.
EMBO J 1999; **18**: 3484-3490.
- Ehrenstein MR, Rada C, Jones AM, Milstein C, Neuberger MS.
Switch junction sequences in PMS2-deficient mice reveal a microhomology-mediated mechanism of Ig class switch recombination.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001; **98**: 14553-14558.
- Espinosa R 3rd, Funahashi T, Hadjiagapiou C, Le Beau MM, Davidson NO.
Assignment of the gene encoding the human apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC1) to chromosome 12p13.1.
Genomics 1994; **24**: 414-415.
- Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD, Chan WC, Vose JM, Smith LM, Armitage JO, Mayer RA, Pike BL, Collins FS, Hacia JG.
Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma.
Proc Natl Acad Sci U S A 2003; **100**: 5372-5377.
- Ferrer A, Marce S, Bellosillo B, Villamor N, Bosch F, Lopez-Guillermo A, Espinet B, Sole F, Montserrat E, Campo E, Colomer D.
Activation of mitochondrial apoptotic pathway in mantle cell lymphoma: high sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA-damage response genes.
Oncogene 2004; **23**: 8941-8949.
- Fisher R.
Mantle-cell lymphoma: classification and therapeutic implications.
Ann Oncol 1996; **7**: 35-39.
- Gauss GH, Lieber MR.
Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination.
Mol Cell Biol 1996; **16**: 258-269.
- Gauthier L, Lemmers B, Guelpa-Fonlupt V, Fougereau M, Schiff C.
Mu-surrogate light chain physicochemical interactions of the human preB cell receptor: implications for VH repertoire selection and cell signaling at the preB cell stage.
J Immunol 1999; **162**: 41-50.
- Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M.
Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance.
J Exp Med 1993; **177**: 999-1008.
- Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, Pritchard-Briscoe H, Wotherspoon JS, Loblay RH, Raphael K, et al.
Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice.
Nature 1988; **334**: 676-682.
- Goossens T, Klein U, Küppers R.
Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; **95**: 2463-2468.
- Gordon MS, Kanegai CM, Doerr JR, Wall R.
Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igbeta, CD79b) and mb1 (Igalph, CD79a).
Proc Natl Acad Sci U S A 2003; **100**: 4126-4131.

- Greeve J, Philipsen A, Krause K, Klapper W, Heidorn K, Castle BE, Janda J, Marcu KB, Parwaresch R.
Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas.
Blood 2003; **101**: 3574-3580.
- Guo WF, Lin RX, Huang J, Zhou Z, Yang J, Guo GZ, Wang SQ.
Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in lung cancer cells using microarray analysis.
Radiat Res 2005; **164**: 27-35.
- Guzman-Rojas L, Sims-Mourtada JC, Rangel R, Martinez-Valdez H.
Life and death within germinal centres: a double-edged sword.
Immunol 2002; **107**: 167-175.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK.
Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1999; **94**: 1848-1854.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J.
Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms.
Ann Oncol 2000; **11**: 3-10.
- He B, Raab-Traub N, Casali P, Cerutti A.
EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching.
J Immunol 2003; **171**: 5215-5224.
- Hertz M, Nemazee D.
BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro.
Immunity 1997; **6**: 429-436.
- Hertz M, Kouskoff V, Nakamura T, Nemazee D.
V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling.
Nature 1998; **394**: 292-295.
- Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, Chiorazzi N, Meffre E.
Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity.
J Clin Invest 2005; **115**: 1636-1643.
- Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M.
V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals.
Genes Dev 1989; **3**: 1053-1061.
- Hiom K, Melek M, Gellert M.
DNA transposition by the RAG1 and RAG2 proteins: a possible source of oncogenic translocations.
Cell 1998; **94**: 463-470.
- Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M.
Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation.
Annu Rev Immunol 2002; **20**: 165-196.
- Honjo T, Muramatsu M, Fagarasan S.
AID: how does it aid antibody diversity?
Immunity 2004; **20**: 659-668.
- Honjo T, Alt FW, Neuberger M.
Molecular Biology of B Cells
Elsevier Academic Press, London; 2004.

- Humphrey JH, Grennan D, Sundaram V.
The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them.
Eur J Immunol 1984; **186**: 859-864.
- Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H.
Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle.
Blood 1994; **84**: 403-407.
- Ichiyoshi Y, Casali P.
Analysis of the structural correlates for antibody polyreactivity by multiple reassortments of chimeric human immunoglobulin heavy and light chain V segments.
J Exp Med 1994; **180**: 885-895.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.)
World Health Organization Classification of Tumours.
Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.
(2001) *IARC Press*, Lyon
- Jäger U, Bocskor S, Le T, Mitterbauer G, Bolz I, Chott A, Kneba M, Mannhalter C, Nadel B.
Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation.
Blood 2000; **95**: 3520-3529.
- Janeway CA und Travers P. in: Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/ Berlin/ Oxford 1997.
- Kataoka T, Kawakami T, Takahashi N, Honjo T.
Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch.
Proc Natl Acad Sci U S A 1980; **77**: 919-923.
- Kataoka T, Miyata T, Honjo T.
Repetitive sequences in class-switch recombination regions of immunoglobulin heavy chain genes.
Cell 1981; **23**: 357-368.
- Kehoe JM, Seide RK.
Immunoglobulin structure and function: genetic control of antibody diversity.
J Am Vet Med Assoc 1982; **181**: 1000-1004.
- Kelsoe G.
The germinal center reaction.
Immunol Today 1995; **16**: 324-326.
- Kerr WG, Hendershot LM, Burrows PD.
Regulation of IgM and IgD expression in human B-lineage cells.
J Immunol 1991; **146**: 3314-3321.
- Khanna KK, Jackson SP.
DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.
Nat Genet 2001; **27**: 247-254.
- Khoury JD, Sen F, Abruzzo LV, Hayes K, Glassman A, Medeiros LJ.
Cytogenetic findings in blastoid mantle cell lymphoma.
Hum Pathol 2003; **34**: 1022-1029.

- Kienle D, Krober A, Katzenberger T, Ott G, Leupolt E, Barth TF, Moller P, Benner A, Habermann A, Muller-Hermelink HK, Bentz M, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S.
VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome.
Blood 2003; **102**: 3003-3009.
- Kirsch IR, Morton CC, Nakahara K, Leder P.
Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes.
Science 1982; **216**: 301-303.
- Klein F, Feldhahn N, Mooster JL, Sprangers M, Hofmann WK, Wernet P, Wartenberg M, Müschen M.
Tracing the pre-B to immature B cell transition in human leukemia cells reveals a coordinated sequence of primary and secondary IGK gene rearrangement, IGK deletion, and IGL gene rearrangement.
J Immunol 2005; **174**: 367-375.
- Klein U, Küppers R, Rajewsky K.
Human IgM+IgD+ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life.
Eur J Immunol 1993; **23**: 3272-3277.
- Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Küppers R.
Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells.
Immunol Rev 1998a; **162**: 261-280.
- Klein U, Rajewsky K, Küppers R.
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 1998b; **188**: 1679-1689.
- Klonowski KD, Primiano LL, Monestier M.
Atypical VH-D-JH rearrangements in newborn autoimmune MRL mice.
J Immunol 1999; **162**: 1566-1572.
- Kocks C, Rajewsky K.
Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways.
Annu Rev Immunol 1989; **7**: 537-559.
- Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P.
Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 1981; **78**: 7096-7100.
- Kolodner R.
Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair.
Genes Dev 1996; **10**: 1433-1442.
- Kolodner RD, Marsischky GT.
Eukaryotic DNA mismatch repair.
Curr Opin Genet Dev 1999; **9**: 89-96.
- Koralov SB, Novobrantseva TI, Hochedlinger K, Jaenisch R, Rajewsky K.
Direct in vivo VH to JH rearrangement violating the 12/23 rule.
J Exp Med 2005; **201**: 341-348.

- Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K.
Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections.
EMBO J 1993; **12**: 4955-4967
- Küppers R, Goossens T, Klein U.
The role of somatic hypermutation in the generation of deletions and duplications in human Ig V region genes and chromosomal translocations.
Curr Top Microbiol Immunol 1999; **246**: 193-198.
- Lam KP, Kuhn R, Rajewsky K.
In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death.
Cell 1997; **90**: 1073-1083.
- Landsteiner K.
The specificity of serological reactions.
(Dover, New York 1936)
- Lassoued K, Nunez CA, Billips L, Kubagawa H, Monteiro RC, LeBlen TW, Cooper MD.
Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage in pre-B cell differentiation.
Cell 1993; **73**: 73-86.
- Lászlo T, Nagy M, Kelenyi G, Matolcsy A.
Immunoglobulin V(H) gene mutational analysis suggests that blastic variant of mantle cell lymphoma derives from different stages of B-cell maturation.
Leuk Res 2000; **24**: 27-31.
- Lee J, Monson NL, Lipsky PE.
The V lambda J lambda repertoire in human fetal spleen: evidence for positive selection and extensive receptor editing.
J Immunol 2000; **165**: 6322-6333.
- Lefranc MP.
IMGT, the international ImMunoGeneTics database.
Nucleic Acids Res 2001; **29**: 207-209.
- Lefranc MP.
IMGT, the international ImMunoGeneTics database.
Nucleic Acids Res 2003; **31**: 307-310.
- Lehman CW, Trautman JK, Carroll D.
Illegitimate recombination in *Xenopus*: characterization of end-joined junctions.
Nucleic Acids Res 1994; **22**: 434-442.
- Lennert K, Stein H, Kaiserling E.
Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata.
Br J Cancer 1975; **31**: 29-43.
- Li MJ, Maizels N.
Activation and targeting of immunoglobulin switch recombination by activities induced by EBV infection.
J Immunol 1999; **163**: 6659-6664.
- Liu YJ, Malisan F, de Bouteiller O, Guret C, Lebecque S, Banchereau J, Mills FC, Max EE, Martinez-Valdez H.
Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation.
Immunity 1996; **4**: 241-250.

- Liu YJ, Banchereau J.
Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells.
Semin Immunol 1997; **9**: 235-240.
- Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A, Chaganti RS.
p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32).
Blood 1995; **86**: 2892-2899.
- Lukas J, Bartkova J, Rohde M, Strauss M, Bartek J.
Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity.
Mol Cell Biol 1995; **15**: 2600-2611.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR.
Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination.
Cell 2002; **108**: 781-794.
- MacLennan IC, Liu YJ, Johnson GD.
Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses.
Immunol Rev 1992; **126**: 143-161
- Majlis A, Pugh W, Rodriguez M, Benedict W, Cabanillas F.
Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants.
J Clin Oncol 1997; **15**: 1664-1671.
- Maran R, Dueymes M, Le Corre R, Renaudineau Y, Shoenfeld Y, Youinou P.
IgG subclasses of human autoantibodies.
Ann Med Interne 1997; **148**: 29-38.
- Marti TM, Kunz C, Fleck O.
DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways.
J Cell Physiol 2002; **191**: 28-41.
- Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T.
The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus.
J Exp Med 1998; **188**: 2151-2162.
- McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, Cuomo CA, Gellert M, Oettinger MA.
Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps.
Cell 1995; **83**: 387-395.
- McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M.
Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin.
Proc Natl Acad Sci U S A 1984; **81**: 3180-3184.
- McKeithan TW, Takimoto GS, Ohno H, Bjorling VS, Morgan R, Hecht BK, Dube I, Sandberg AA, Rowley JD.
BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study.
Genes Chromosomes Cancer 1997; **20**: 64-72.
- Meffre E, Schaefer A, Wardemann H, Wilson P, Davis E, Nussenzweig MC.
Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies.
J Exp Med 2004; **199**: 145-150.

- Meffre E, Davis E, Schiff C, Cunningham-Rundles C, Ivashkiv LB, Staudt LM, Young JW, Nussenzweig MC.
Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors.
Nat Immunol 2000; **1**: 207-213.
- Meffre E, Papavasiliou F, Cohen P, de Bouteiller O, Bell D, Karasuyama H, Schiff C, Banchereau J, Liu YJ, Nussenzweig MC
Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells.
J Exp Med 1998; **188**: 765-772.
- Melamed D, Benschop RJ, Cambier JC, Nemazee D.
Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection.
Cell 1998; **92**: 173-182.
- Melchers F, Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P, Andersson J.
Positive and negative selection events during B lymphopoiesis.
Curr Opin Immunol 1995; **7**: 214-227.
- Melnick A.
Reprogramming specific gene expression pathways in B-cell lymphomas.
Cell Cycle 2005; **4**: 239-241.
- Milstein C, Neuberger MS, Staden R.
Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; **95**: 8791-8794.
- Mimori T, Hardin JA.
Mechanism of interaction between Ku protein and DNA.
J Biol Chem 1986; **261**: 10375-10379.
- M'kacher R, Bennaceur A, Farace F, Lauge A, Plassa LF, Wittmer E, Dossou J, Violot D, Deutsch E, Bourhis J, Stoppa-Lyonnet D, Ribrag V, Carde P, Parmentier C, Bernheim A, Turhan AG.
Multiple molecular mechanisms contribute to radiation sensitivity in mantle cell lymphoma.
Oncogene 2003; **22**: 7905-7912.
- Monteiro RC, Van De Winkel JG.
IgA Fc receptors.
Annu Rev Immunol 2003; **21**: 177-204.
- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T.
Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme.
Cell 2000; **102**: 553-563.
- Müschen M, Re D, Jungnickel B, Diehl V, Rajewsky K, Küppers R.
Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction.
J Exp Med 2000; **192**: 1833-1840.
- Muto T, Muramatsu M, Taniwaki M, Kinoshita K, Honjo T.
Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene.
Genomics 2000; **68**: 85-88.
- Nambu Y, Sugai M, Gonda H, Lee CG, Katakai T, Agata Y, Yokota Y, Shimizu A.
Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin.
Science 2003; **302**: 2137-2140.

- Nemazee DA, Burki K.
Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes.
Nature 1989; **337**: 562-566.
- Nemazee D.
Can receptor editing play an important role in normal B-cell development?
J Autoimmun 1996; **9**: 259-261.
- Nemazee D, Weigert M.
Revising B cell receptors.
J Exp Med 2000; **191**: 1813-1817.
- Neuberger MS, Di Noia JM, Beale RC, Williams GT, Yang Z, Rada C.
Somatic hypermutation at A.T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation.
Nat Rev Immunol 2005; **5**: 171-178.
- Nikaido T, Nakai S, Honjo T.
Switch region of immunoglobulin Cmu gene is composed of simple tandem repetitive sequences.
Nature 1981; **292**: 845-848.
- Nikaido T, Yamawaki-Kataoka Y, Honjo T.
Nucleotide sequences of switch regions of immunoglobulin C epsilon and C gamma genes and their comparison.
J Biol Chem 1982; **257**: 7322-7329.
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D.
Rag-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination.
Science 1990; **248**: 1517-1523.
- Paul TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM.
A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.
Curr Biol 2000; **10**: 886-895.
- Pauza ME, Rehmann JA, LeBien TW.
Unusual patterns of immunoglobulin gene rearrangement and expression during human B cell ontogeny: human B cells can simultaneously express cell surface kappa and lambda light chains.
J Exp Med 1993; **178**: 139-149.
- Pavlov YI, Rogozin IB, Galkin AP, Aksenova AY, Hanaoka F, Rada C, Kunkel TA.
Correlation of somatic hypermutation specificity and A-T base pair substitution errors by DNA polymerase eta during copying of a mouse immunoglobulin kappa light chain transgene.
Proc Natl Acad Sci U S A 2002; **99**: 9954-9959.
- Pelanda R, Schwers S, Sonoda E, Torres RM, Nemazee D, Rajewsky K.
Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification.
Immunity 1997; **7**: 765-775.
- Petersen S, Casellas R, Reina-San-Martin B, Chen HT, Difilippantonio MJ, Wilson PC, Hanitsch L, Celeste A, Muramatsu M, Pilch DR, Redon C, Ried T, Bonner WM, Honjo T, Nussenzweig MC, Nussenzweig A.
AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching.
Nature 2001; **414**: 660-665.
- Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS.
Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination.
Immunity 1999; **11**: 299-308.

- Rada C, Ehrenstein MR, Neuberger MS, Milstein C.
Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting.
Immunity 1998; **9**: 135-141.
- Rada C, Williams GT, Nilsen H, Barnes DE, Lindahl T, Neuberger MS.
Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice.
Curr Biol 2002; **12**: 1748-1755.
- Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M.
B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors.
J Exp Med 1993; **177**: 1165-1173.
- Radic MZ, Zouali M.
Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance.
Immunity 1996; **5**: 505-511.
- Rajewsky K.
Clonal selection and learning in the antibody system.
Nature 1996; **381**: 751-758.
- Raman C.
CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance.
Immunol Res 2002; **26**: 255-263.
- Ravirajan CT, Rahman MA, Papadaki L, Griffiths MH, Kalsi J, Martin AC, Ehrenstein MR, Latchman DS, Isenberg DA.
Genetic, structural and functional properties of an IgG DNA-binding monoclonal antibody from a lupus patient with nephritis.
Eur J Immunol 1998; **28**: 339-350.
- Reina-San-Martin B, Difilippantonio S, Hanitsch L, Masilamani RF, Nussenzweig A, Nussenzweig MC.
H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation.
J Exp Med 2003; **197**: 1767-1778.
- Repasky JA, Corbett E, Boboila C, Schatz DG.
Mutational analysis of terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated N-nucleotide addition in V(D)J recombination.
J Immunol 2004; **172**: 5478-5488.
- Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Labeau R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A.
Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2).
Cell 2000; **102**: 565-575.
- Rogozin IB, Pavlov YI, Bebenek K, Matsuda T, Kunkel TA.
Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase eta error spectrum.
Nat Immunol 2001; **2**: 530-536.
- Roth DB, Menetski JP, Nakajima PB, Bosma MJ, Gellert M.
V(D)J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes.
Cell 1992; **70**: 983-991.

- Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, Roeder W, Tonegawa S.
Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes.
Nature 1980; **286**: 676-683.
- Sawchuk DJ, Weis-Garcia F, Malik S, Besmer E, Bustin M, Nussenzweig MC, Cortes P.
V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins.
J Exp Med 1997; **185**: 2025-2032.
- Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P.
Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene.
Proc Natl Acad Sci U S A 2000; **97**: 2773-2778.
- Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D.
The V(D)J recombination activating gene, RAG-1.
Cell 1989; **59**: 1035-1048.
- Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS.
V(D)J recombination: molecular biology and regulation.
Annu Rev Immunol 1992; **10**: 359-383.
- Schrader CE, Edelmann W, Kucherlapati R, Stavnezer J.
Reduced isotype switching in splenic B cells from mice deficient in mismatch repair enzymes.
J Exp Med 1999; **190**: 323-330.
- Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Janssen D, Teymoortash A, Siebmann JU, Parwaresch R, Tiemann M.
Growth pattern and distribution of follicular dendritic cells in mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 96 patients.
Virchows Arch 2005;:1-9.
- Seki M, Gearhart PJ, Wood RD.
DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes.
EMBO Rep 2005; **6**: 1143-1148.
- Severinson E, Fernandez C, Stavnezer J.
Induction of germ-line immunoglobulin heavy chain transcripts by mitogens and interleukins prior to switch recombination.
Eur J Immunol 1990; **20**: 1079-1084.
- Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM.
BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control.
Immunity 2000; **13**: 199-212.
- Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM.
Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation.
Nat Rev Immunol 2002; **2**: 920-932.
- Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U.
Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes.
Science 1998; **280**: 1750-1752.
- Shimizu A, Takahashi N, Yaoita Y, Honjo T.
Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain.
Cell 1982; **28**: 499-506.
- Shinkura R, Ito S, Begum NA, Nagaoka H, Muramatsu M, Kinoshita K, Sakakibara Y, Hijikata H, Honjo T.
Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination.
Nat Immunol 2004; **5**: 707-712.

- Shintani S, Mihara M, Li C, Nakahara Y, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H.
Up-regulation of DNA-dependent protein kinase correlates with radiation resistance in oral squamous cell carcinoma.
Cancer Sci 2003; **94**: 894-900.
- Sleckman BP, Bassing CH, Hughes MM, Okada A, D'Auteuil M, Wehrly TD, Woodman BB, Davidson L, Chen J, Alt FW.
Mechanisms that direct ordered assembly of T cell receptor beta locus V, D, and J gene segments.
Proc Natl Acad Sci U S A 2000; **97**: 7975-7980.
- Smith GC, Jackson SP.
The DNA-dependent protein kinase.
Genes Dev 1999; **13**: 916-934.
- Snow RE, Chapman CJ, Holgate ST, Stevenson FK.
Immunogenetics of human IgE.
Hum Antibodies Hybridomas 1996; **7**: 157-166.
- Spiegelberg HL.
Biological role of different antibody classes.
Int Arch Allergy Appl Immunol 1989; **90**: 22-27.
- Stavnezer-Nordgren J, Sirlin S.
Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching.
EMBO J 1986; **5**: 95-102.
- Stavnezer J.
Immunoglobulin class switching.
Curr Opin Immunol 1996; **8**: 199-205.
- Swerdlow SH, Habeshaw JA, Murray LJ, Dhaliwal HS, Lister TA, Stansfeld AG.
Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse.
Am J Pathol 1983; **113**: 181-197.
- Takahashi N, Ueda S, Obata M, Nikaido T, Nakai S, Honjo T.
Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family.
Cell 1982; **29**: 671-679.
- Tedder TF, Engel P.
CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes.
Immunol Today 1994; **15**: 450-454.
- Tedder TF, Isaacs CM.
Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily.
J Immunol 1989; **143**: 712-717.
- Teng B, Burant CF, Davidson NO.
Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein.
Science 1993; **260**: 1816-1819.
- Terasawa T, Ohashi H, Utsumi M, Tsushita K, Kinoshita T, Nakamura S, Saito H.
Case of Epstein-Barr virus-associated transformation of mantle cell lymphoma.
Am J Hematol 2003; **73**: 194-199.
- Thai TH, Kearney JF.
Isoforms of terminal deoxynucleotidyltransferase: developmental aspects and function.
Adv Immunol 2005; **86**: 113-136.

- Thorselius M, Walsh S, Eriksson I, Thunberg U, Johnson A, Backlin C, Enblad G, Sundstrom C, Roos G, Rosenquist R.
Somatic hypermutation and V(H) gene usage in mantle cell lymphoma.
Eur J Haematol 2002; **68**: 217-224.
- Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D.
Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells.
J Exp Med 1993; **177**: 1009-1020.
- Tonegawa S.
Somatic generation of antibody diversity.
Nature 1983; **302**: 575-581.
- Van Es JH, Gmelig Meyling FH, van de Akker WR, Aanstoot H, Derksen RH, Logtenberg T.
Somatic mutations in the variable regions of a human IgG anti-double-stranded DNA autoantibody suggest a role for antigen in the induction of systemic lupus erythematosus.
J Exp Med 1991; **173**: 461-470.
- Van Gent DC, McBlane JF, Gellert M.
Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system.
Cell 1995; **81**: 925-934.
- Van Gent DC, Mizuuchi K., Gellert M.
Similarities between initiation of V(D)J recombination and retroviral integration.
Science 1996; **271**: 1592-1594.
- Vega F, Medeiros LJ.
Chromosomal translocations involved in Non-Hodgkin Lymphomas.
Arch Pathol Lab Med 2003; **127**: 1148-1160.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW.
Serial analysis of gene expression.
Science 1995; **270**: 484-487.
- Verkoczy LK, Stiernhdm BJ, Berinstein NL.
Up-regulation of recombination activating gene expression by signal transduction through the surface Ig receptor.
J Immunol 1995; **154**: 5136-5143.
- Wagner SD, Milstein C, Neuberger MS.
(1995) Codon bias targets mutation.
Nature 1995 ; **376**: 732.
- Walsh SH, Thorselius M, Johnson A, Soderberg O, Jerkeman M, Bjorck E, Eriksson I, Thunberg U, Landgren O, Ehinger M, Lofvenberg E, Wallman K, Enblad G, Sander B, Porwit-MacDonald A, Dictor M, Olofsson T, Sundstrom C, Roos G, Rosenquist R.
Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma.
Blood 2003; **101**: 4047-4054.
- Wang YH, Nomura J, Faye-Petersen OM, Cooper MD.
Surrogate light chain production during B cell differentiation: differential intracellular versus cell surface expression.
J Immunol 1998; **161**: 1132-1139.
- Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC.
Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.
Science 2003; **301**: 1374-1377.

- Wardemann H, Hammersen J, Nussenzweig MC.
Human autoantibody silencing by immunoglobulin light chains.
J Exp Med 2004; **200**: 191-199.
- Welzel N, Le T, Marculescu R, Mitterbauer G, Chott A, Pott C, Kneba M, Du MQ, Kusec R, Drach J, Raderer M, Mannhalter C, Lechner K, Nadel B, Jaeger U.
Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma.
Cancer Res 2001; **61**: 1629-1636.
- Wiesendanger M, Scharff MD, Edelmann W.
Somatic hypermutation, transcription, and DNA mismatch repair.
Cell 1998; **94**: 415-418.
- Wiesendanger M, Kneitz B, Edelmann W, Scharff MD.
Somatic hypermutation in MutS homologue (MSH)3-, MSH6-, and MSH3/MSH6-deficient mice reveals a role for the MSH2-MSH6 heterodimer in modulating the base substitution pattern.
J Exp Med 2000; **191**: 579-584.
- Williams ME, Densmore JJ.
Biology and therapy of mantle cell lymphoma.
Curr Opin Oncol 2005; **17**: 425-431.
- Wilson PC, de Bouteiller O, Liu YJ, Potter K, Banchereau J, Capra JD, Pascual V.
Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes.
J Exp Med 1998; **187**: 59-70.
- Wilson PC, Wilson K, Liu YJ, Banchereau J, Pascual V, Capra JD.
Receptor revision of immunoglobulin heavy chain variable region genes in normal human B lymphocytes.
J Exp Med 2000; **191**: 1881-1894.
- Winkler TH, Fehr H, Kalden JR.
Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas.
Eur J Immunol 1992; **22**: 1719-1728.
- Winter DB, Phung QH, Umar A, Baker SM, Tarone RE, Tanaka K, Liskay RM, Kunkel TA, Bohr VA, Gearhart PJ.
Altered spectra of hypermutation in antibodies from mice deficient for the DNA mismatch repair protein PMS2.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; **95**: 6953-6958.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T.
Human DNA repair genes.
Science 2001; **291**: 1284-1289.
- Wood RD, Mitchell M, Lindahl T.
Human DNA repair genes, 2005.
Mutat Res 2005; **577**: 275-283.
- Xu H, Li H, Suri-Payer E, Hardy RR, Weigert M.
Regulation of anti-DNA B cells in recombination-activating gene-deficient mice.
J Exp Med 1998; **188**: 1247-1254.
- Yancopoulos GD, DePinho RA, Zimmerman KA, Lutzker SG, Rosenberg N, Alt FW.
Secondary genomic rearrangement events in pre-B cells: VHDJH replacement by a LINE-1 sequence and directed class switching.
EMBO J 1986; **5**: 3259-3266.

- Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RS, Rothman P, Stall AM, Pandolfi PP, Dalla-Favera R.
The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation.
Nat Genet 1997; **16**: 161-170.
- Youinou P, Lydyard PM.
CD5+ B cells in nonorgan-specific autoimmune diseases: a fresh look.
Lupus 2001; **10**: 523-525.
- Zhang Z, Zemlin M, Wang YH, Munfus D, Huye LE, Findley HW, Bridges SL, Roth DB, Burrows PD, Cooper MD.
Contribution of Vh gene replacement to the primary B cell repertoire.
Immunity 2003; **19**: 21-31.
- Zhu D, Hawkins RE, Hamblin TJ, Stevenson FK.
Clonal history of a human follicular lymphoma as revealed in the immunoglobulin variable region genes.
Br J Haematol 1994; **86**: 505-512.

Abkürzungsverzeichnis

allgemeine Abkürzungen

aa	Aminosäure („ <i>amino acid</i> “)
Abb.	Abbildung
AID	„ <i>activation induced cytidine deaminase</i> “
ATM	„ <i>ataxia telangiectasia mutated</i> “
BCL6	„ <i>B cell lymphoma 6</i> “
BCR	„ <i>B cell receptor</i> “
BSA	bovines Serumalbumin
<i>BsmF1</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> F1
C α	konstante Region alpha
CD	„ <i>cluster of differentiation</i> “
cDNA	copy DNA
CDR	„ <i>complementarity determining region</i> “
C ϵ	konstante Region epsilon
C γ	konstante Region gamma
C _H	konstante Region der schweren Kette
C μ	konstante Region mu
cRSS	kryptische Rekombinations-Signalsequenz „ <i>cryptic recombination signal sequence</i> “
CSR	Immunglobulin-Klassenwechsel („ <i>class switch recombination</i> “)
D	„ <i>diversity</i> “
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBNA1	„ <i>Epstein Barr Virus Nuclear Antigen 1</i> “
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Elf4E	Eukaryotischer Initiations Faktor 4E
EtOH	Ethanol
F _{ab} -Fragment	„ <i>fragment antigen binding</i> “ der Antikörper
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung („ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “)
F _c -Fragment	„ <i>fragment crystallizable</i> “ der Antikörper
FBS	„ <i>fetal bovine serum</i> “
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Gerüstregion(en) „ <i>framework region(s)</i> “ der V-Region
GAPDH	„ <i>Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> “
GC	Keimzentrum („ <i>germinal center</i> “)
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
<i>IGH</i> -Lokus	Immunglobulin Schwerkettenlokus

IGK-Lokus	Immunglobulin κ -Lokus
IGL-Lokus	Immunglobulin λ -Lokus
IgM	Immunglobulin M
IMGT	„ <i>ImmunoGeneTics</i> “
J	„ <i>joining</i> “
κ	Kappa
KCl	Kaliumchlorid
KDE	„ <i>kappa deleting element</i> “
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
λ	Lambda
LMP-1	„ <i>latent membrane protein 1</i> “
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung („ <i>magnetic activated cell sorting</i> “)
MBC	„ <i>memory B cell</i> “
MCL	„ <i>mantle cell lymphoma</i> “
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMR	„ <i>Mismatch repair</i> “
mRNA	„ <i>messenger</i> “ Ribonukleinsäure
Mut.	Mutationen
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NBC	„ <i>naive B cell</i> “
NH ₄ Ac	Ammoniumazetat
NHEJ	„ <i>Non-homologous end joining</i> “
<i>Nla</i> III	<i>Neisseria lactamica</i> III
Nt	Nukleotid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung „ <i>phosphate buffered saline</i> “
PC	Plasmazelle „ <i>plasma cell</i> “
PCR	Polymerasekettenreaktion „ <i>polymerase chain reaction</i> “
PE	Phycoerythrin
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der [H ⁺]
PJ	Propidiumiodid
RAG	„ <i>recombination activating gene</i> “
RB	„ <i>retino blastoma</i> “
REAL	„ <i>Revised European American Lymphoma</i> “
RNA	Ribonukleinsäure „ <i>ribonucleic acid</i> “
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSS	Rekombinations-Signal-Sequenz „ <i>recombination signal sequence</i> “
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	Schalterregion(en)
SAGE	„ <i>Serial Analysis of Gene Expression</i> “
SHM	somatische Hypermutation („ <i>somatic hypermutation</i> “)
ss	Einzelstrang „ <i>single strand</i> “
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheit

üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	„variable“
V-Gene	Gene der variablen Region
V _H	V-Segment des Immunglobulin Schwerkettenlokus
V _K	V-Segment des Immunglobulin Kappa Kettenlokus
V _λ	V-Segment des Immunglobulin Lambda Kettenlokus
v:w	<i>volume:weight</i> , Verhältnis Volumen zu Gewicht
WHO	„ <i>World Health Organization</i> “

Einheiten

%	Prozent
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
g	Gramm
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli
μ	mikro
mol/l	Molar
n	nano
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
V	Volt

Anhang

Primer

Die im Folgenden aufgeführten Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

Tab. 10: Innerhalb dieser Doktorarbeit verwendete Primer und Annealingtemperaturen der PCR-Reaktionen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
AID_F	TGCTCTTCCTCCGCTACATC
AID_R	CCTCATAACAGGGGCAAAAGG
BCL6_F	GGCCTCCTTCCGCTACAAG
BCL6_R	TCTGGCGCAAATGAAGTCGC
GAPDH_FOR	TTAGCACCCCTGGCCAAGG
GAPDH_REV	CTTACTCCTTGGAGGCCATG
VH1	CAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA
VH2	GTCCTRCGCTGGTGAAACCCACACA
VH3	GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
VH4	GACCCTGTCCCTCACCTGCRCTGTC
VH5	AAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGARGA
VH6	ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG
JH1.4.5_int	GACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC
JH2_int	GACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
JH3_int	GACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC
JH6_int	GACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC
VK1	GACATCCRGWTGACCCAGTCTCCWTC
VK2	CAGWCTCCACTCTCCCTGYCCGTCA
VK3	TTGTGWTGACRCAGTCTCCAGSCACC
VK4	AGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC
VK5	CAGTCTCCAGCATTCATGTCAGCGA
VK6	TTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAA
JK1.2.4_ext	ACTCACGTTTGGATYTCCASCTTGGTCC
JK3_ext	GTACTIONTACGTTTGGATATCCACTTTGGTCC
JK5_ext	GCTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCC

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
VLamda1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTG
VLamda2	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCT
VLamda3	ACTCAGCCACCCTCAGTGTCGT
VLamda3B	CTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT
VLamda4	TTTCTTCTGAGCTGACTCAGGAC
VLamda5_F	TAACTCAGTGACGCATGTGTTTG
VLamda6	GAGTCTCCGGGAAGACGGTA
VLamda7	GTGGTGACTCAGGAGCCCTCAC
VLamda8	ACTGTGGTGACCCAGGAGCCA
VLamda9	GCTGACTCAGCCACCTTCTGCA
JL1_ext	GCCACTTACCTAGGACGGTGAC
JL2.3_ext	GAAGAGACTCACCTAGGACGGTC
JL6.7_ext	GGAGACTYACCGAGGACGGTC
RAG1_Meffre_F	TGCAGACATCTCAACACTTTGGCCAG
RAG1_Meffre_R	TTTCAAAGGATCTCACCCGGAACAGC
RAG2_Meffre_F	AGCAGCCCCCTCTGGCCTTCAG
RAG2_Meffre_R	CATGGTTATGCTTTACATCCAGATG
Cmu_R	AGACGAGGGGGAAAAGGTT
Cdelta-R	AGAGCTGGCTGCTTGTCATG
Cgamma1_R	GAGTTTTGTCAACAAGATTTGGGCT
Cgamma2_R	GCACTCGACACAACATTTGCG
Cgamma3_R	TCACCAAGTGGGGTTTTGAGC
Cgamma4_R	ATGGGCATGGGGGACCATTT
Calpha2_R	TGTTGGCGGTTAGTGGGGTC
Cepsilon_R	GAGGTGGCATTGGAGGGAAT
OligodT Primer	TTTTTTTTTTTTTTT
M13F	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC

PCR-Parameter

V_H-PCR (Klassenwechsel-PCR)

5 µl PCR-Puffer	95°C, 2 Minuten	45 Zyklen
2 µl MgCl ₂ [50 mmol/l]	95°C, 1 Minute	
1 µl dNTPs [10 mmol/l]	63°C, 1 Minute	
2 µl VH-Primermix	72°C, 1 Minute	
2 µl des jeweiligen C _H -spezifischen Primers	72°C, 5 Minuten	
36 µl dH ₂ O		
1 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		
1 µl cDNA		

V_λ-PCR

5 µl PCR-Puffer (Invitrogen)	95°C, 2 Minuten	45 Zyklen
1.5 µl MgCl ₂ [50 mmol/l]	95°C, 50 Sekunden	
1 µl dNTPs [10 mmol/l]	63°C, 30 Sekunden	
2.5 µl des jeweiligen VL-Primers	72°C, 1 Minute	
2.5 µl JL-Primermix	72°C, 5 Minuten	
35.5 µl dH ₂ O		
1 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		
1 µl cDNA		

V_κ-PCR

5 µl PCR-Puffer (Invitrogen)	95°C, 2 Minuten	45 Zyklen
2.5 µl MgCl ₂ [50 mmol/l]	95°C, 50 Sekunden	
1 µl dNTPs [10 mmol/l]	61°C, 30 Sekunden	
2.5 µl des jeweiligen VK-Primers	72°C, 1 Minute	
2.5 µl JK-Primermix	72°C, 5 Minuten	
34.5 µl dH ₂ O		
1 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		
1 µl cDNA		

AID-PCR

5 µl PCR-Puffer (Invitrogen)	95°C, 2 Minuten	45 Zyklen
2 µl MgCl ₂ [50 mmol/l]	95°C, 1 Minute	
1 µl dNTPs [10 mmol/l]	64°C, 1 Minute	
2 µl AID_F-Primer	72°C, 1 Minute	
2 µl AID_R-Primer	72°C, 5 Minuten	
36 µl dH ₂ O		
1 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		
1 µl cDNA		

BCL6-PCR

5 µl PCR-Puffer (Invitrogen)	95°C, 2 Minuten	45 Zyklen
2 µl MgCl ₂ [50 mmol/l]	95°C, 1 Minute	
1 µl dNTPs [10 mmol/l]	63°C, 1 Minute	
2 µl BCL6_F-Primer	72°C, 1 Minute	
2 µl BCL6_R-Primer	72°C, 5 Minuten	
36.5 µl dH ₂ O		
1 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		
0.5 µl cDNA		

GAPDH-PCR

5 µl PCR-Puffer (Invitrogen)	95°C, 2 Minuten	45 Zyklen
2 µl MgCl ₂ [50 mmol/l]	95°C, 50 Sekunden	
1 µl dNTPs [10 mmol/l]	55°C, 30 Sekunden	
2 µl GAPDH_FOR-Primer	72°C, 1 Minute	
2 µl GAPDH_REV-Primer	72°C, 5 Minuten	
36 µl dH ₂ O		
1 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		
1 µl cDNA		

RAG-PCR

5 µl PCR-Puffer (Invitrogen)	95°C, 2 Minuten	45 Zyklen
2 µl MgCl ₂ [50 mmol/l]	95°C, 30 Sekunden	
1 µl dNTPs [10 mmol/l]	60°C, 30 Sekunden	
2 µl RAG1_Meffre_F-Primer	72°C, 30 Sekunden	
2 µl RAG1_Meffre_R-Primer	72°C, 5 Minuten	
36 µl dH ₂ O		
1 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		
1 µl cDNA		

Kolonie-PCR

2.5 µl BV-Puffer	95°C, 2 Minuten	25 Zyklen
1.25 µl DMSO	95°C, 30 Sekunden	
1.25 µl dNTPs [10 mmol/l]	58°C, 1 Minute	
1 µl M13F	72°C, 1 Minute	
1 µl M13R	72°C, 5 Minuten	
18 µl dH ₂ O		
0.2 µl Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase		

Zelllinien und Primärfälle

Zelllinien	Quelle/Herkunft
Granta-519	DMSZ
HBL-2	Dr. Wolfram Klapper, Kiel
Jeko-1	DMSZ
JVM-2	DMSZ
NCEB-1	Dr. Wolfram Klapper, Kiel
SP49	Dr. Masanori Daibata (Kochi, Japan)
SP53	Dr. Masanori Daibata (Kochi, Japan)
BV-173	DMSZ

Primärfälle	Quelle/Herkunft
MCL001	Dr. Wolfram Klapper, Kiel
MCL002	Dr. Christiane Pott, Kiel
MCL003	Dr. Christiane Pott, Kiel
MCL214	Prof. Dr. Hansmann, Kiel
MCL239	Prof. Dr. Hansmann, Kiel
MCL478	Prof. Dr. Hansmann, Kiel
MCL601	Prof. Dr. Hansmann, Kiel
MCL898	Prof. Dr. Hansmann, Kiel
MCL942	Prof. Dr. Hansmann, Kiel

Tab: 11 Liste der EMBL-Accession Nummern der untersuchten Sequenzen. EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)

SP49

AM183974: IGHV4-34 IGHD 3-22 IGHJ2 IGHC γ 2

AM184059: IGKV1D-33 IGKJ4

AM184063: IGLV7-43 IGLJ3

SP53

AM183975: IGHV4-34 IGHD 3-22 IGHJ2 IGHC γ 1

AM183976: IGHV4-34 IGHD 3-22 IGHJ2 IGHC γ 2

AM183977: IGHV4-34 IGHD 3-22 IGHJ2 IGHC μ

AM183978: IGHV4-34 IGHD 3-22 IGHJ IGHC δ

AM184060: IGKV1D-33 IGKJ4

AM184061: IGKV4-1 IGKJ1

AM184062: IGLV7-43 IGLJ3

Granta-519

AM183979: IGHV4-59 IGHD 5-5 IGHJ4 IGHC α 2

AM183980: IGHV4-59 IGHD 5-5 IGHJ4 IGHC μ

AM184054: IGKV2D-30 IGKJ3

AM184052: IGLV4-60 IGLJ3

AM184053: IGLV3-21 IGLJ1

JVM-2

AM183981: IGHV3-9 IGHD 6-19 IGHJ4 IGHC μ

AM183982: IGHV3-9 IGHD 6-19 IGHJ4 IGHC δ

AM183983: IGHV3-9 IGHD 6-19 IGHJ4 IGHC γ 3

AM184058: IGKV1D-37 IGKJ4

AM184064: IGLV2-14 IGLJ3

AM184065: IGLV3-21 IGLJ1

NCEB-1

AM183984: IGHV3-53 IGHD 2-21 IGHJ6 IGHC μ

AM184056: IGKV1D-39 IGKJ3

AM184057: IGKV2-29 IGKJ4

HBL-2

AM183985: IGHV3-11 IGHD 3-22 IGHJ1 IGHC μ

AM183986: IGHV3-11 IGHD 3-22 IGHJ1 IGHC δ

AM184055: IGKV1-27 IGKJ4

AM184066: IGLV6-57 IGLJ3

Jeko-1

AM183987: IGHV2-70 IGHD 3-3 IGHJ4 IGHC μ

AM183998: IGLV2-8 IGLJ6
AM183999: IGLV2-11 IGLJ6
AM184000: IGLV2-8 IGLJ3
AM184001: IGLV3-10 IGLJ6
AM184002: IGLV3-21 IGLJ3
AM184003: IGLV3-21 IGLJ6
AM184004: IGLV3-25 IGLJ3
AM184005: IGLV3-10 IGLJ3
AM184006: IGLV6-57 IGLJ6
AM184007: IGLV6-57 IGLJ6
AM184008: IGLV7-46 IGLJ6
AM184009: IGLV7-43 IGLJ6
AM184010: IGLV8-61 IGLJ6
AM184011: IGLV9-49 IGLJ6
AM184012: IGLV4-3 IGLJ3
AM184013: IGLV4-3 IGLJ3
AM184014: IGLV4-3 IGLJ7
AM184015: IGLV4-3 IGLJ3
AM184016: IGLV2-11 IGLJ3
AM184017: IGLV2-14 IGLJ3
AM184018: IGLV2-8 IGLJ3
AM184019: IGLV3-1 IGLJ3
AM184020: IGLV1-44 IGLJ3
AM184021: IGLV1-44 IGLJ3
AM184022: IGKV2-29 IGKJ4
AM184023: IGKV2-30 IGKJ4
AM184024: IGKV3-20 IGKJ2
AM184025: IGKV1-8 IGKJ4
AM184026: IGKV4-1 IGKJ4
AM184027: IGKV4-1 IGKJ4
AM184028: IGKV1-17 IGKJ3
AM184029: IGKV1-5 IGKJ1
AM184030: IGKV4-1 IGKJ1
AM184031: IGKV4-1 IGKJ2
AM184032: IGKV1-27 IGKJ4
AM184033: IGKV4-1 IGKJ4
AM184034: IGKV1D-33 IGKJ3
AM184035: IGKV1-27 IGKJ5
AM184036: IGKV3-20 IGKJ3
AM184037: IGKV5-2 IGKJ1
AM184038: IGKV4-1 IGKJ3
AM184039: IGKV4-1 IGKJ3

MCL001

AM183988: IGHV3-23 IGHD 6-19 IGHJ4 IGHC δ
AM183989: IGHV3-23 IGHD 6-19 IGHJ4 IGHC μ

AM184040: IGKV4-1 IGKJ1
AM184041: IGKV4-1 IGKJ3
AM184042: IGKV4-1 IGKJ4
AM184043: IGKV4-1 IGKJ5

AM184044: IGLV7-43 IGLJ7
AM184045: IGLV7-43 IGLJ1
AM184046: IGLV7-46 IGLJ1
AM184047: IGLV7-46 IGLJ7
AM184048: IGLV7-46 IGLJ3
AM184049: IGLV7-43 IGLJ3
AM184050: IGLV7-43 IGLJ1
AM184051: IGLV7-43 IGLJ3

MCL002

AM183990: IGHV3-49 IGHD 3-22 IGHJ5 IGHC γ 3

AM184067: IGLV5-2 IGLJ4

AM184068: IGLV2-8 IGLJ3

MCL003

AM183991: IGHV3-23 IGHD 6-19 IGHJ4 IGHC μ

AM184073: IGKV2-29 IGKJ4

AM184071: IGLV3-10 IGLJ3

AM184072: IGLV8-61 IGLJ3

MCL214

AM1839792: IGHV 3-74 IGHD 6-6 IGHJ4 IGHC μ

AM184074: IGKV4-1 IGKJ3

AM184075: IGLV1-44 IGLJ1

MCL239

AM183993: IGHV1-2 IGHD 3-9 IGHJ6 IGHC γ 3

MCL478

AM183994: IGHV1-3 IGHD 6-19 IGHJ4 IGHC μ

AM184070: IGLV8-61 IGLJ3

AM184077: IGKV2D-28 IGKJ5

MCL601

AM183995: IGHV4-34 IGHD 2-15 IGHJ6 IGHC μ

MCL898

AM183996: IGHV3-7 IGHD 2-21 IGHJ4 IGHC μ

AM184069: IGLV2-11 IGLJ1

AM184078: IGKV1-27 IGKJ4

MCL942

AM183997: IGHV1-8 IGHD 3-3 IGHJ5 IGHC α 2

AM184076: IGKV4-1 IGKJ2

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Markus Müschen für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner möchte ich mich dafür bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, das Koreferat zu übernehmen.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Masanori Daibata, Dr. Wolfram Klapper, Dr. Christiane Pott, Kiel, für die Zelllinien und Primärfälle, die mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Prof. Dr. Hansmann, Dr. Manfred Richter und Dr. Andrea Bräuninger möchte ich für die freundliche Bereitstellung der MCL-SAGE-Profiles danken.

Vielen Dank an Niklas Feldhahn, der mich in die Weisheiten von SAGE eingewiesen hat und mir immer mit fachlichem Rat zur Seite stand. Ich möchte mich auch bei Jana L. Mooster, Peter Wurst und Céline Bons bedanken, die mich bei den Sequenzen unterstützt haben und auch privat zu Freunden wurden. Große Unterstützung habe ich auch durch alle anderen Mitglieder der AG-Müschen erfahren, und möchte an dieser Stelle noch mal einen besonderen Dank an Euch alle ausrichten. Mein Dank gilt ebenfalls den anderen Mitgliedern des ITZ, mit denen ich immer nette Gespräche führen konnte und deren Geräte ich durchaus im Notfall mitnutzen durfte. Vielen Dank an die zwei Gabi's für das Sequenzieren aller Proben, die in dieser Doktorarbeit analysiert wurden.

Als nächstes möchte ich meiner Familie danken, die immer sehr interessiert den Verlauf dieser Doktorarbeit verfolgt hat. Auch der Familie meines Freundes gilt mein Dank für das rege Interesse an meiner Arbeit. Meiner besten Freundin Tanja möchte ich für die große Unterstützung schon während des gesamten Studiums danken. Jessica und Jens danke ich für die vielen aufbauenden Gespräche, die mich immer wieder neu motiviert haben. Auch bei meinen anderen Freunden möchte ich mich an dieser Stelle bedanken, denn Ihr habt mir immer wieder den Rücken gestärkt.

Ein besonderer Dank gilt Tom, der mich schon seit dem Abitur in meinem Leben begleitet und trotz schwieriger und stressiger Zeiten auch heute noch hinter mir steht. Danke!

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20.02.2006

(Stefanie Liedtke)