

## **Bettina Goossens: Mechanismen der Diversifizierung des Antikörper-Repertoires während der frühen und späten B-Zellentwicklung im Menschen. 2001**

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Diversifizierung des Antikörper-Repertoires während der frühen und späten B-Zellentwicklung im Menschen untersucht. Für eine systematische Analyse der Regulation der Leichtketten-Genumlagerungen während der frühen humanen B-Zell-Entwicklung, die Aufschluß über die Funktionalität der Genumlagerungen gibt, wurden VJH-, VkJk-Genumlagerungen und Umlagerungen des 'kappa deleting element' (KDE) simultan aus einzelnen naiven I+ und k+ B-Zellen aus dem peripheren Blut (PB) analysiert. Während nur 2-3% der k-ausprägenden Zellen VJH-Genumlagerungen tragen, haben nahezu alle I-exprimierenden Zellen rearrangierte k-Loci. VkJk-Genumlagerungen in I+ B-Zellen verwenden im Vergleich zu VkJk-Genen in k+ B-Zellen bevorzugt 3'-gelegene Jk-Gene. Somit scheint die frühe B-Zellentwicklung durch eine Vielzahl sequentieller Leichtketten-Genumlagerungen charakterisiert zu sein, die im allgemeinen auf dem k-Lokus beginnen und dann auf den I-Lokus übergehen. Etwa 30% der VkJk-Genumlagerungen in I+ naiven B-Zellen sind funktionell rearrangiert, jedoch durch Umlagerung des KDE inaktiviert. Die Inaktivierung funktioneller VkJk-Genumlagerungen durch das KDE ermöglicht den Zellen, VkJk-Gene, die nicht mit der entsprechenden Schwereketten paaren, zu inaktivieren und autoreaktive Rezeptoren zu editieren. Dieser Prozeß wurde auch in der Maus beschrieben.

Seit der Auffindung von RAG-Genexpression und Rekombinations-Intermediärprodukten in Keimzentrums-B-Zellen wird diskutiert, ob sequentielle Ig-Genumlagerungen nicht nur während der frühen B-Zellentwicklung, sondern auch im Verlauf der Keimzentrumsreaktion an der Diversifizierung des Antikörperrepertoires beteiligt sind. Da es in der Literatur Hinweise darauf gibt, daß durch somatische Hypermutation inaktivierte VkJk-Gene durch neue Genumlagerungen auf dem I-Lokus ersetzt werden können, sollte mittels einer Analyse der VkJk-, KDE- und VJH-Genumlagerungen in einzelnen I+ post-Keimzentrumszellen eine Abschätzung der Bedeutung solcher Prozesse erfolgen. Innerhalb der 265 analysierten I+ post-Keimzentrums-B-Zellen aus dem PB wurden nur zwei Zellen identifiziert, in denen VJH-Genumlagerungen nach Akkumulation von (unvorteilhaften) Mutationen in funktionell rearrangierten VkJk-Genen nicht ausgeschlossen werden können. Unter Berücksichtigung der PCR-Effizienz ist die Häufigkeit solcher Zellen im PB somit kleiner als 3%. Darüber hinaus wurden Schwer- und Leichtketten-Genumlagerungen der oligoklonalen Population der IgD+IgM- B-Zellen aus dem PB untersucht. In keiner der 77 IgD-only B-Zellen, die sich 21 Klone zuordnen ließen, konnten Kombinationen von V-Genumlagerungen nachgewiesen werden, welche Rezeptor-Revision während der klonalen Expansion im Keimzentrum implizieren. Des weiteren ergab die Analyse von 127 V<sub>H</sub>-Genumlagerungen aus IgD-only Gedächtnis-B-Zellen bzw. 49 V<sub>H</sub>-Genumlagerungen aus klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen keinen Hinweis auf die Existenz von V<sub>H</sub>-Gen-Revision durch die Ausbildung von V<sub>H</sub>-Hybriden. Obwohl einige Studien in Maus und Mensch auf Rekombinationsprozesse außerhalb des Knochenmarks hindeuten, scheint der Anteil solcher Prozesse an der Ausbildung des Antikörperrepertoires des PB im Menschen gering zu sein.

Aufgrund häufiger Deletionen/Duplikationen in rearrangierten V<sub>H</sub>-Genen Keimzentrums-assoziiierter Lymphome wurden V<sub>H</sub>-Genumlagerungen, welche aus tonsillären Keimzentrums-B-Zellen gesunder Donoren mittels Einzelzell-PCR amplifiziert wurden, auf das Vorkommen von Deletionen/Duplikationen untersucht. Die Analyse ergab, daß in 43% der nicht-funktionell rearrangierten und in 4% der funktionell rearrangierten V<sub>H</sub>-Genumlagerungen Deletionen und/oder Duplikationen nachgewiesen werden konnten. Sowohl das Muster der Deletionen/Duplikationen als auch deren Abwesenheit in unmutierten V-Genumlagerungen deuten darauf hin, daß Deletionen/Duplikationen durch den Mechanismus der somatischen Hypermutation entstehen. Aufgrund ihrer Häufigkeit in nicht-funktionell rearrangierten V-Genen läßt sich abschätzen, daß Deletionen/Duplikationen etwa 6% der Mutationsereignisse ausmachen. Da die Bildung von

Deletionen/Duplikationen mit DNA-Strangbrüchen einhergeht, könnte die somatische Hypermutation an chromosomalen Translokationen beteiligt sein. Für einige Fälle von c-myc Translokation im Burkitt-Lymphom wurde gezeigt, daß der Mechanismus der somatischen Hypermutation wahrscheinlich an deren Entstehung beteiligt ist. Somit hat der Prozeß der somatischen Hypermutation nicht nur Bedeutung für die Ausbildung hoch-affiner Gedächtnis-B-Zellen, sondern erhöht auch die Gefahr der Lymphom-Entstehung durch Onkogen-Translokationen.

---

Southern Blot analyses of immunoglobulin light chain gene rearrangements in human leukemias and myelomas indicated that  $\lambda$  loci in  $\kappa$ -producing cells are largely unrearranged while  $\kappa$  loci in  $\lambda$ -producers are often rearranged and inactivated by rearrangements of the kappa-deleting element (KDE). For a systematic analysis of the regulation of light chain rearrangements during early B cell development in normal human B cells also considering functionality of the rearrangements, we used FACS-sorted single naive  $\lambda$ - and  $\kappa$ -expressing B cells from peripheral blood of healthy humans. V $\lambda$ J $\lambda$  and V $\kappa$ J $\kappa$  joints and rearrangements involving the KDE were amplified simultaneously from single cells and sequenced. Whereas only 2-3% of  $\kappa$ -expressing cells carry V $\lambda$ J $\lambda$  joints, nearly all  $\lambda$ -expressing cells have rearranged  $\kappa$  loci and indeed carry V $\kappa$ J $\kappa$  joints. The V $\kappa$ J $\kappa$  joints in  $\lambda$ -expressing cells exhibit preferential J $\kappa$ 4 and J $\kappa$ 5 over J $\kappa$ 1 and J $\kappa$ 2 usage compared to  $\kappa$ -expressing cells. 30% of the V $\kappa$ J $\kappa$  joints in  $\lambda$  producers are rearranged in-frame. These data indicate extensive sequential V $\kappa$ -J $\kappa$  rearrangements and inactivation of functional V $\kappa$ J $\kappa$  joints in  $\lambda$ -expressing cells, presumably before V $\lambda$ J $\lambda$  joining.

In order to determine whether V gene replacement accompanies somatic hypermutation in the germinal center (GC) reaction in the human, we analysed V $\lambda$ J $\lambda$  and V $\kappa$ J $\kappa$  joints and the kappa deleting element in single  $\lambda$ + naive and post GC B cells for rearrangements at the  $\lambda$  and  $\kappa$  loci. Among 265  $\lambda$ + post GC B cells, not a single unequivocal and only two potential examples of a cell that switched to  $\lambda$  light chain expression after accumulation of (unfavorable) mutations in its productive V $\kappa$ J $\kappa$  rearrangement were observed. Taking the PCR efficiency into account, the frequency of such cells is likely below 3%. In addition, heavy and light chain gene rearrangements were amplified and sequenced from the oligoclonal population of IgD-only peripheral blood post GC B cells which display extensive intraclonal sequence diversity. Among 77 IgD-only B cells belonging to 21 clones, no combination of V gene rearrangements indicating receptor revision during clonal expansion was observed. Moreover, among 127 and 49 V $_H$  genes amplified from IgD-only and class switched B cells, respectively, not a single example of V $_H$  revision through V $_H$  hybrid generation was detected. These results suggest that in the human germinal center reaction V gene replacement either does not usually accompany somatic hypermutation or is mostly counterselected.

Human naive and GC B cells were analysed for rearranged V $_H$  region genes by single cell PCR.

Whereas no deletions or duplications were found in naive B cells, about 4% of in-frame and 43% of out-of-frame rearrangements of GC B cells harboured deletions and/or duplications of variable length. The pattern of deletions/duplications and their restriction to mutated V genes strongly suggests that they were generated through the process of somatic hypermutation. Deletions and duplications account for about 6% of somatic mutations introduced into rearranged V $_H$  region genes of GC B cells.

Furthermore, it appears that several types of oncogene translocations (like translocations of c-myc into or adjacent to rearranged Ig genes in Burkitt's lymphoma) happen as a byproduct of somatic hypermutation within the GC.