

Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Aus der Abteilung für Kinderheilkunde mit Schwerpunkt Neonatologie

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Wahn

Direktor Neonatologie: Prof. Dr. med. Michael Obladen

**Entwicklung des B-Zellrezeptor-Gen-Repertoires nach
Antigenexposition bei Früh- und Reifgeborenen in den ersten
postnatalen Wochen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

von

Catherine Annabell Paar aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Karl Bauer

Korreferent: Prof. Dr. med. Roland Wauer

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 23.09.2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung	2
2.	Hintergrund	3
2.1	Der B-Zellrezeptor	3
2.2	Bildung des funktionellen B-Zellrezeptorgens	4
2.3	Entwicklung der B-Zellen nach Antigenkontakt	5
2.3.1	Somatische Mutationen	
2.3.2	Klassenwechsel	
3.	Methoden	7
3.1	RNA Isolierung	7
3.2	RT-Polymerasekettenreaktion	7
3.3	Extraktion des DNA-Amplifikates	8
3.4	Klonierung	9
3.4.1	Ligation	
3.4.2	Transformation	
3.4.3	Minipräparation	
3.4.4	Insertkontrollverdau	
3.4.5	Linearisierung	
3.5	Sequenzreaktion	12
3.6	Computergestützte Sequenzanalyse	13
3.6.1	Consensus-Sequenzbildung	
3.6.2	Zuordnung und Analyse des V-Segments	
3.6.3	Zuordnung und Analyse der NDN-Region	
3.6.4	Zuordnung und Analyse des J-Segments	
3.6.5	Auswertung der Mutationen	
3.6.6	Kontaminationausschluß	
3.6.7	Auswertung und Statistik	
4	Ergebnisse	16
4.1	Patienten und Gruppen	16
4.2	Die Entwicklung der Diversität der IgG-B-Zellklone verläuft verzögert ab	17

4.3	Bei FG steigt die Mutationsrate tendenziell langsamer an als bei RG mit dem Alter	20
4.4	RG weisen früher Sequenzen mit multiplen Mutationen auf als FG	21
4.5	R/S-Raten in CDR2 und FR3	22
4.6	Prozentuale Anteil der replacement Mutationen	22
5	Diskussion	24
5.1	Die Entwicklung der Diversität an IgG-B-Zellklonen ist bei FG im Gegensatz zu RG verzögert	24
5.2	Die Affinitätsreifung von FG scheint gegenüber RG eingeschränkt zu sein	27
5.3	Selektion der Mutationen	29
5.4	Schlussfolgerung	29
5.5	Zusammenfassung	30
6	Anhang	32
6.1	Literaturverzeichnis	32
6.2	Abkürzungsverzeichnis	39

6.2 Abkürzungen

AID	Activation induced deaminase
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BZR	B-Zellrezeptor
bp	Basenpaar
CD40	Clusters of differentiation 40
CD40L	Clusters of differentiation 40-Ligand
CDR	Complementarity determining regions
CTP	Cytosintriphosphat
D _H -Segment	Diversity-Segment der schweren Kette des Immunglobulin-Gens
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ERW	Erwachsene
FG	Frühgeborene
FR	Framework regions
GTP	Guanosintriphosphat
HIGM2	Hyper-IgM-Syndrom 2
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF γ	Interferon Gamma
J _H -Segment	Joining-Segment der schweren Kette des Immunglobulin- Gens
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
Min	Minuten
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NSB	Nabelschnurblut
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RG	Reifgeborene
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymersae-Kettenreaktion
Sek	Sekunden
TZR	T-Zellrezeptor
TdT	Desoxynucleotidyltransferase
TTP	Tyrosintriphosphat
UNG	Uracil-DNA-Glycosylase
V _H -Segment	Variability-Segment der schweren Kette des Immunglobulin-Gens
Wo	Wochen

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Karl Bauer danke ich herzlich für das interessante Thema, die Übernahme der Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und das offene Ohr für alle Fragen.

Ich danke Herrn Dr. med. Michael Zemlin für die Beantwortung aller Fragen.

Frau Rodica Altmann danke ich für die technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor.

Insbesondere danke ich meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Catherine Annabell Paar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Entwicklung des B-Zellrezeptor-Gen-Repertoires nach Antigenexposition bei Früh- und Reifgeborenen in den ersten postnatalen Wochen, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.