

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie, Rheumatologie)

**Charakterisierung des B-Zell-Rezeptors (BCR) auf
NFAT2-deletierten CLL-Zellen im E μ -TCL1-Mausmodell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Müller, David Johannes

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. M. R. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

Tag der Disputation: 22.05.2020

*Für meine Mutter,
weil sie auf vieles verzichtet hat, um uns Kindern
eine glückliche Kindheit, erstklassige Erziehung
und einmalige Förderung zu ermöglichen.*

*Für meinen Vater,
weil er in bewundernswerter Ruhe und
Uneigennützigkeit so vieles in uns Kinder investiert hat.*

Ohne euch wäre ich niemals dort, wo ich jetzt bin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Chronisch Lymphatische Leukämie.....	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2. Klinik und Krankheitsverlauf.....	2
1.1.3. Therapie der CLL.....	4
1.2. Die Transkriptionsfaktoren NFAT.....	7
1.2.1. Vorkommen und Funktion.....	7
1.2.2. NFAT2 in B-Zellen.....	8
1.2.3. NFAT in Tumoren.....	8
1.3. Die CLL im Transgenen Mausmodell.....	10
1.3.1. Das E μ -TCL1-Mausmodell.....	10
1.3.2. Das E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mausmodell.....	11
1.4. Darlegung des Phänotyps der untersuchten Mauslinien.....	12
1.4.1. Krankheitsverlauf und Manifestationsformen der CLL im E μ -TCL1- und E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mausmodell.....	12
1.4.2. Aktivitätsmuster der exprimierten BCR im E μ -TCL1- und E μ -TCL1- NFAT2k.o.-Mausmodell.....	14
1.5. Der B-Zell-Rezeptor (BCR).....	16
1.5.1. Allgemeines zur B-Zelle.....	16
1.5.2. Struktur und physiologische Funktion des BCR.....	18
1.5.3. Genetische Kodierung des BCR.....	20
1.6. Ziele dieser Arbeit.....	26
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Material.....	27
2.1.1. Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien.....	27
2.1.3. Geräte und Zubehör.....	28

2.1.4.	Puffer und Medien.....	30
2.1.5.	Primer	30
2.2.	Gewinnung von Milzproben aus Wildtyp- und transgenen E μ -TCL1-Mäusen..	30
2.3.	Amplifikation der hypervariablen DNA-Regionen des B-Zell-Rezeptors (BCR) aus isolierten Milzproben	31
2.3.1.	mRNA-Isolation aus Splenozyten	31
2.3.2.	cDNA-Synthese des BCRs aus isolierter mRNA.....	32
2.3.3.	Polymerase-Kettenreaktionen mit Ig-Mouse Primer Set (Novagen)	32
2.4.	Klonierung der PCR-Produkte in E. coli	36
2.4.1.	Gelelektrophorese zur Aufreinigung der PCR-Produkte	36
2.4.2.	DNA-Isolation aus Agarosegel	36
2.4.3.	Klonierung in pCR TM 4-TOPO [®] Vektor (invitrogen) und Transformation in E. coli	38
2.4.4.	Plasmid-Isolation aus E.coli Kolonien	39
2.5.	Sequenzierung der hypervariablen Regionen des B-Zell-Rezeptors	40
2.5.1.	Sequenzierung der präparierten Plasmid-DNA.....	40
2.5.2.	Sequenzierung von DNA (isoliert aus Agarosegel) mittels Next- Generation-Sequencing	40
2.6.	DNA Sequenzanalyse der hypervariablen Regionen des B-Zell-Rezeptors.....	41
2.6.1.	Analyse der Plasmid-Sequenzen mittels <i>IMGTV-QUEST</i> (imgt).....	41
2.6.2.	Analyse der Next-Generation-Sequencing-Ergebnisse mittels <i>IMGTHighV-Quest</i> (imgt).....	42
3.	Ergebnisse.....	44
3.1.	Etablierung der Methodik	44
3.1.1.	Etablierung der Multiplex PCRs mit Ig-Mouse Primer Set (Novagen)	44
3.1.2.	Etablierung der Klonierung in pCR TM 4-TOPO [®] Vektor (invitrogen)	47
3.2.	Ergebnisse der Plasmid-Sequenz-Analyse.....	48
3.2.1.	Klonalitätsmuster in den untersuchten Mauslinien	48
3.2.2.	Mutationsgrad der detektierten IGVH-Gene.....	58

3.3. Ergebnisse der NGS-Analyse.....	63
3.3.1. Rohdaten-Processing und Filterung der IMGT-Alignments.....	63
3.3.2. Klonalitätsmuster in den untersuchten Mauslinien	66
3.3.2.1. Anzahl an detektierten VDJ-Klonen	67
3.3.2.2. Quantität der detektierten VDJ-Klone.....	68
3.3.2.3. Identische VDJ-Rekombinationen unter identifizierten "Hauptklonen"	72
3.3.3. Häufigkeitsverteilung der detektierten IGVH-Gene	75
3.3.3.1. Anzahl an registrierten IGVH-Genen.....	75
3.3.3.2. Quantität der detektierten IGVH-Gene.....	77
3.3.3.3. Genvergleich der detektierten IGVH-Gene zwischen WT, TCL- und TCL-KO-Modell	81
4. Diskussion	87
4.1. Die Klonalitätsanalyse des BCR-Repertoires in NFAT2-deletierten CLL- Zellen	89
4.2. Der Mutationsstatus des B-Zell-Rezeptor in NFAT2-deletierten CLL-Zellen...	93
4.3. Charakterisierung eines stereotypen BCR-Musters in NFAT2-deletierten CLL-Zellen.....	97
5. Zusammenfassung	101
Abbildungsverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	104
Literaturverzeichnis	105
Anhang	112
Erklärung zum Eigenanteil	113
Veröffentlichungen.....	115
Danksagung	116

Abkürzungsverzeichnis

AID	Activation-Induced-Cytidine Deaminase	PCR	Polymerase-Kettenreaktion(en)
Akt	codierendes Gen für Proteinkinase B	PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
bp	base pair	RPKM	Reads per Kilobase Million
BCR	B-Zell-Rezeptor(en)	rpm	revolutions per minute
BTK	Bruton's tyrosine kinase	SEM	standard error of the mean
CD	cluster of differentiation	SLL	Small Lymphocytic Lymphoma
CDR	complementary determining region(s)	Syk	Spleen tyrosine kinase
cHL	klassisches Hodgkin Lymphom	TCL1 (Gen)	T cell leukemia-1 gene
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie	TCL (Genotyp)	E μ -TCL1
C-Region	konstante Region	TCL1 (Genotyp)	E μ -TCL1
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	TCL-KO (Genotyp)	E μ -TCL1-NFAT2k.o.
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	TCL-NFAT2k.o. (Genotyp)	E μ -TCL1-NFAT2k.o.
FPKM	Fragments per Kilobase Million	UMI	unique molecular identifier
IGVH	V-Gen der schweren Kette einer Immunglobulinvariablen-Region	V-Region	variable Region
IMGT	International Immunogenetics Information System	WT	Wildtyp
MBL	monoklonale B-Zell-Lymphozytose		
MW	Mittelwert	\geq	größer gleich
MZ-Zellen	Marginalzonen-(B-)Zellen	\leq	kleiner gleich
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells		
NGS	Next-Generation-Sequencing		
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom		

1. Einleitung

1.1. Die Chronisch Lymphatische Leukämie

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämieform in der westlichen Welt. Mit einer Inzidenz von mehr als 5400 Neuerkrankungen pro Jahr deckt die CLL in Deutschland rund 40 Prozent aller diagnostizierten Leukämiefälle ab.[1]

Das Risiko an einer CLL zu erkranken ist bei Männern deutlich höher als bei Frauen und steigt mit fortgeschrittenem Lebensalter, sodass das mediane Alter bei Diagnosestellung bei ungefähr 70 Jahren liegt.[2-4]

Die Chronisch Lymphatische Leukämie ist durch das Auftreten eines malignen B-Zellklons charakterisiert. Es kommt hierbei zu einer stetigen Akkumulation von phänotypisch reifen, jedoch immuninkompetenten B-Zellen in Blut, Knochenmark, Lymphknoten und anderen lymphatischen Geweben. Klinisch ist eine Lymphozytose des peripheren Blutes charakteristisch.[5]

Anhand klinischer, morphologischer und immunphänotypischer Kriterien wird die CLL als niedrig-malignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom klassifiziert.[2, 6] Ein weiteres Lymphom mit nahezu identischem morphologisch-immunphänotypischem Erscheinens ist das Kleinzellige B-Zell-Lymphom (Small Lymphocytic Lymphoma, SLL). Das SLL ist durch ein solides bzw. nodales Befallsmuster charakterisiert, ohne einen leukämischen Verlauf im Blut des Patienten aufzuweisen. Aufgrund der morphologischen wie immunphänotypischen Ähnlichkeit von CLL und SLL werden beide Entitäten durch die World Health Organization (WHO) als unterschiedliche Manifestationsformen derselben Erkrankung zusammengefasst (CLL/SLL).[2, 7]

Ein maligner B-Zellklon, wie er im Rahmen der CLL/SLL in einem Patienten auftritt, verfügt über ein spezifisches Repertoire an Antigenen, welches auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Charakteristisch ist hierbei die Koexpression der B-Zell-Antigene CD19, CD20 und CD23 sowie des T-Zell-Antigens CD5. Die Expression der Oberflächen-Antigene CD20 und CD79b ist in einer CLL-Zelle im Vergleich zu einer physiologischen B-Zelle häufig vermindert.[8-11]

Um beim Auffinden eines B-Zellklons im Blut eines Patienten die Diagnose einer chronischen lymphatischen Leukämie stellen zu können, muss der detektierte phänoimmunotypische Klon mit einer Häufigkeit von > 5000 Zellen/ μl Blut vorliegen.[8]

Wird ein B-Zellklon mit einer geringeren Häufigkeit als 5000 Zellen/ μl Blut diagnostiziert, ist in diesem Fall von einer monoklonalen B-Zell-Lymphozytose (MBL) zu sprechen. Diese konnte in einer Studie von Rawstron et al. bei etwa $3,5\%$ erwachsener Probanden mit ansonsten unauffälligen Blutwerten nachgewiesen werden.[12, 13] Analog zur CLL steigt auch für das Auftreten einer MBL das Risiko mit fortschreitendem Lebensalter eines Patienten.[13, 14] Anhand der im Blut nachweisbaren B-Zellzahl lassen sich zwei Gruppen der MBL unterscheiden, deren Progressionsrisiko in eine manifeste CLL unterschiedlich ist. Während bei einer Zellzahl von $< 0,5 \times 10^9/\text{L}$ eine "low-count" MBL mit äußerst geringem Progressionsrisiko vorliegt, besteht bei einer "high-count" MBL ein erhebliches Progressionsrisiko in eine CLL, sodass eine jährliche Kontrolle des Befundes notwendig ist.[6] Obwohl verschiedene Gesichtspunkte für ein hypothetisches Verständnis der MBL als Vorstufe zur CLL sprechen, entwickelt nur ein geringer Prozentsatz von annähernd 1% aller diagnostizierten MBL-Patienten eine therapiebedürftige CLL.[15]

1.1.2. Klinik und Krankheitsverlauf

Die Diagnosestellung erfolgt bei rund 50% aller Patienten zufällig aufgrund erhöhter Leukozytenwerte im Blut, ohne dass Krankheitssymptome bestehen. Gelegentlich ist Leistungsminderung oder Nachtschweiß der Auslöser der diagnostischen Maßnahmen. Häufig sind Lymphknotenvergrößerungen bei einer CLL zu beobachten, die sich besonders im Verlauf der Erkrankung zu einer ausgeprägten Lymphadenopathie entwickeln können. Die Akkumulation der klonalen B-Zellen kann zudem zu einer Splenomegalie oder Hepatomegalie führen, sowie weitere Symptome wie Hautaffektionen in Form von Pruritus, chronischer Urtikaria, Herpeserkrankungen, knotiger Hautinfiltraten und selten auch eine Parotisschwellung oder den Befall der Tränendrüse verursachen.[16]

Obwohl die chronische lymphatische Leukämie prinzipiell zu den indolenten, langsam progredienten Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt wird [6], ist der klinische Erkrankungsverlauf stadienabhängig und sehr heterogen. Während bei rund einem

Drittel aller Patienten nach Diagnosestellung die Erkrankung lediglich überwacht beobachtet werden kann - ohne dass jemals eine Therapie benötigt werden würde -, ergibt sich bei einem weiteren Drittel nach einer gewissen Zeit des beobachtenden Abwartens (sog. *watch and wait*) eine Indikation zur Therapie. Davon abzugrenzen ist die Therapiebedürftigkeit eines weiteren Drittels aller CLL-Patienten, das bereits bei oder kurz nach Diagnosestellung aufgrund der raschen Progredienz der Erkrankung eine Therapie benötigt.[17]

Um angesichts des heterogenen Krankheitsverlaufs Patienten hinsichtlich ihres individuellen Risikos und ihrer Prognose besser differenzieren zu können, wurden verschiedene Klassifikationssysteme zur Risikostratifikation von CLL-Patienten entwickelt.

1975 und 1981 wurden von K. R. Rai und J. L. Binet zwei unabhängige Klassifikationssysteme veröffentlicht, mit deren Hilfe anhand von klinischen Daten (Lymphknoten-, Milz-, Lebervergrößerung) und Laborparametern (Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobinwert) eine Einteilung von Patienten in verschiedene Krankheitsstadien möglich wurde.[18, 19] Auch heute ist die Einteilung in klinische Stadien nach den Kriterien von Rai und Binet im Rahmen des klinischen Staging bei Diagnosestellung und im Verlauf einer CLL-Erkrankung fest etabliert. Da jedoch innerhalb der einzelnen Krankheitsstadien unterschiedliche Patienten noch immer sehr heterogene Krankheitsverläufe aufweisen und zudem rund 3/4 aller Diagnosestellungen in einem frühen Krankheitsstadium (Rai 0 / Binet A) erfolgen, in welchem anhand beider Staging-Systeme keine prognostische Aussage über den weiteren Krankheitsverlauf getroffen werden kann [20], wurden weitere prognostische Marker für eine Verbesserung der Risikostratifikation bei CLL-Patienten gesucht.

Zwei Veröffentlichungen der Gruppen um Damle und Hamblin zeigten im Jahr 1999, dass anhand des Mutationsstatus der IGVH-Gene¹ von CLL-Zellen schon in frühen Krankheitsstadien eine prognostische Einschätzung des weiteren Krankheitsverlaufs möglich war. So zeigten Patienten mit nicht-mutierten IGVH-Genen eine wesentlich schlechtere Verlaufsform der CLL mit reduzierter Ansprechrate auf Chemotherapie und verkürztem Überleben im Gegensatz zu IGVH-Genen des mutierten Typs². [21, 22] Neben dem IGVH-Mutationsstatus erwies sich der Nachweis von speziellen

¹ Nähere Informationen zu IGVH-Genen: siehe im Abschnitt 1.5.3 dieser Einleitung.

² Nähere Informationen zum Mutationsstatus: ebenfalls im Abschnitt 1.5.3 dieser Einleitung.

Chromosomenaberrationen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als geeigneter prognostischer Parameter zur Risikostratifikation von CLL-Patienten. So weisen Patienten mit einer Deletion des Chromosoms 17 (del17(p)) mit Verlust des Tumorsuppressorgens TP 53 eine deutlich schlechtere Prognose auf als Patienten ohne oder mit anderen Chromosomenaberrationen.[23] Sowohl die Bestimmung des IGVH-Mutationsstatus als auch die FISH-Analyse wurden deshalb in einer aktuellen Empfehlung als standardmäßige Diagnostik bei Erstdiagnosestellung von CLL-Patienten vorgeschlagen.[20]

Eine Komplikation im Krankheitsverlauf der CLL ist die Entwicklung eines aggressiven Lymphoms auf dem Boden der bestehenden Grunderkrankung (*Richter-Syndrom*).

Es werden zwei Varianten des Richter-Syndroms unterschieden, von denen die häufigere Variante das Bild eines diffus-großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) darstellt. Die seltenere Verlaufsform zeigt das histopathologische Bild eines klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) oder eines anderen Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL).[24] Durchschnittlich 2 - 7 % aller CLL-Patienten entwickeln im Krankheitsverlauf ein Richter-Syndrom, wobei hinsichtlich der Prävalenz eine große Varianz an publizierten Werten besteht.[25] Es ist gekennzeichnet durch ein hochaggressives Krankheitsbild mit ausgeprägter Therapieresistenz und sehr schlechter Prognose.[24] Ein wichtiger prognostischer Faktor hinsichtlich des Verlaufs der DLBCL-Variante besteht in der klonalen Verwandtschaft zwischen den B-Zell-Klonen der CLL und des DLBCL. 80 % der DLBCL-Variante weisen eine klonale Verwandtschaft zur vorbestehenden CLL auf, welches mit einer schlechteren Prognose bei signifikant verkürztem Überleben (8 - 16 Monate) assoziiert ist. Das durchschnittliche Überleben bei nicht-CLL-verwandten Richter-Syndromen beträgt indes ca. 5 Jahre ähnlich eines de-novo-DLBCL.[25, 26]

1.1.3. Therapie der CLL

Für die Therapie der CLL stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung, deren Bandbreite von klassischen Chemotherapeutika über monoklonale Antikörper bis hin zu

neuartigen zielgerichteten Therapien³ wie Tyrosinkinase-Inhibitoren und Bcl-2-Inhibitoren reicht.

Lange Zeit galten alkylierende Zytostatika wie Chlorambucil, Bendamustin und Cyclophosphamid als Mittel der Wahl zur medikamentösen Behandlung der CLL. Insbesondere die Gabe von Chlorambucil als Monotherapie war jahrzehntelang Goldstandard und Erstlinientherapie.[28]

Auch heute spielen Chemotherapeutika, zu denen neben den alkylierenden Substanzen auch Purinanaloga wie Fludarabin, Pentostatin und Cladribin gezählt werden, eine zentrale Rolle in der Therapie der CLL, wenngleich sie überwiegend nicht mehr als Monotherapie, sondern als Bestandteil einer kombinierten Chemo-Immuntherapie gemeinsam mit monoklonalen Antikörpern eingesetzt werden.[29]

Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern und deren Einsatz im Rahmen einer immunologischen Tumorthherapie verbesserte Ende des 20. und Anfang des 21. Jahrhunderts die Behandlungsstrategien und therapeutischen Möglichkeiten des onkologischen Fachgebietes.[30]

Für die Therapie der CLL sind besonders monoklonale Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD20 von großer Bedeutung. CD20, ein glykosyliertes Phosphoprotein, wird von reifen B-Zellen auf deren Oberfläche exprimiert und erwies sich als gutes Zielprotein für monoklonale Antikörper.[31] Rituximab [32], der am längsten etablierte anti-CD20 Antikörper, eröffnete in Kombination mit Fludarabin und Cyclophosphamid oder mit Bendamustin eine äußerst wirkungsvolle und deutlich verbesserte Therapiemöglichkeit im Vergleich zur reinen Monotherapie mit herkömmlichen Chemotherapeutika.[26, 33, 34] Neben Ofatumumab, einem weiteren anti-CD20 Antikörper der ersten Generation, existiert mit Obinutuzumab ein anti-CD20 Antikörper der zweiten Generation, der durch veränderte Glykosylierung in seiner Wirksamkeit weiterentwickelt wurde. Beide kommen ähnlich wie Rituximab in unterschiedlichen Therapieschemata bei der Behandlung der CLL zum Einsatz.[35]

Zudem steht mit Alemtuzumab ein monoklonaler Antikörper gegen das Antigen CD52 zur Verfügung, welcher vor allem bei der Therapie von Hoch-Risiko-Patienten wie

³ Voraussetzung zur Entwicklung effektiver Behandlungsmethoden ist eine detaillierte Entschlüsselung der molekularen Abläufe einer Erkrankung. "Targeted therapeutics" greifen zielgerichtet auf molekularer Ebene an, mit dem Ziel selektiv und wirkungsvoll die Signalkaskade einer Erkrankung zu unterbrechen.27. Padma, V.V., *An overview of targeted cancer therapy*. Biomedicine (Taipei), 2015. 5(4): p. 19.

Trägern von TP53-Mutationen und/oder Deletionen auf Chromosom 11 (del(11q)) bzw. 17 (del(17p)) zum Einsatz kam.[29, 36]

Ein innovativer Therapieansatz bei der Behandlung der CLL bietet die Signalkaskade nach Aktivierung des B-Zellrezeptors (BCR). Die Aktivität des B-Zellrezeptors und die damit verbundenen molekularen Prozesse im Inneren einer B-Zelle spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CLL.[37] Durch die Entwicklung von Biologika wie Ibrutinib und Idelalisib, die als Kinaseninhibitoren direkten Einfluss auf den B-Zellrezeptor-Signalweg nehmen, wurde es möglich, sehr effektiv und wirkungsvoll in die molekularen Abläufe einer CLL-Zelle einzugreifen.[38] Verschiedene Tyrosinkinase wie beispielsweise die Bruton's tyrosine kinase (BTK), Spleen tyrosine kinase (Syk) oder Phosphatidylinositol-3 Kinasen (PI3K) sind wichtige Akteure in der BCR-Signalkaskade und in CLL-Zellen teilweise überexprimiert oder dauerhaft aktiviert.[39] Ihre Hemmung durch zielgerichtete Inhibitoren (wie beispielsweise Fostamatinib als Syk-Inhibitor, Ibrutinib als BTK-Inhibitor und Idelalisib als PI3K-Inhibitor) führt zu einer Unterbrechung des BCR-Signalwegs und mündet im Zelltod der CLL-Zellen.[38, 39]

Die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in CLL-Zellen ist bereits lange beschrieben. Die Entwicklung von Bcl-2-Inhibitoren wurde durch fehlende Aktivität und das Fehlen effektiver Methoden zur Bereitstellung des Wirkstoffs im Zellinneren verzögert. Nun ist mit Venetoclax ein hochpotenter Bcl-2-Inhibitor für die Therapie der CLL zugelassen.[39, 40]

Abhängig vom Stadium der Erkrankung und unter Berücksichtigung von patientenabhängigen Faktoren wie bestehenden Komorbiditäten, wird im Therapiefall eine geeignete Auswahl aus den vorhandenen Medikamenten zur medikamentösen Behandlung der CLL getroffen. Hierbei spielen die zielgerichteten Therapien auch in den frühen Therapieleitlinien eine immer größer werdende Rolle. Die einzig kurative Therapie besteht in einer allogenen Stammzelltransplantation. Aufgrund ihrer hohen therapiebedingten Morbidität und Mortalität ist sie nur bei refraktären Patienten oder in Hochrisikosituationen indiziert.[41]

1.2. Die Transkriptionsfaktoren NFAT

1.2.1. Vorkommen und Funktion

Vor über 30 Jahren wurde im Zellkern aktivierter T-Zellen die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren (*Nuclear factor of activated T-cells*) entdeckt.[42] Es zeigte sich in der Folge, dass NFAT-Proteine nicht ausschließlich in T-Zellen auftreten, sondern in einer Vielzahl von Immun- und Blutzellen vorkommen. So spielen sie in T-Zellen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, B-Zellen, Mastzellen und Megakaryozyten bei der Zellaktivierung und -differenzierung eine wichtige Rolle. Auch für die Entwicklung und Ausbildung verschiedener Gewebe und Organe in Säugern wie Herz, Skelettmuskulatur, glatter Muskulatur, Blutgefäße, Nervengewebe, Knochen, Pankreas und Haut sind die NFAT-Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung.[43]

Bei der Erforschung von NFAT und seiner Rolle in zellulären Prozessen wurde beschrieben, dass eine Dysregulation des NFAT-Signalweges häufig mit der Entstehung von Tumoren und der malignen Transformation von Zellen assoziiert ist.[44]

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren setzt sich aus fünf verschiedenen Proteinen zusammen: Die fünf Isoformen NFAT1 (auch bezeichnet als NFATc2 bzw. NFATp) [45], NFAT2 (alias NFATc1 bzw. NFATc) [46], NFAT3 (alias NFATc4) [47], NFAT4 (alias NFATc3 bzw. NFATx) [47] und NFAT5 (alias TonEBP) [48] verfügen mit Ausnahme von NFAT5 über einen einheitlichen strukturellen Aufbau.[48]

NFAT-Proteine kommen in einer Vielzahl an unterschiedlichen Geweben und Organen des menschlichen Körpers vor, in denen sich die fünf Isoformen in ihrer Funktion und Relevanz für das jeweilige Gewebe oder Organ unterscheiden.[43]

Die Transkriptionsfaktoren NFAT liegen in inaktiver Form hochphosphoryliert im Zytoplasma einer Zelle vor. Während die Aktivierung von NFAT1-4 durch intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom erfolgt, wird NFAT5 über osmotischen Stress aktiviert.[48, 49]

Im Rahmen seiner Aktivierung wird NFAT dephosphoryliert und transloziert aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo es gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene induziert.[50] Eine Rephosphorylierung durch eine NFAT-Kinase (z.B. GSK3) im Nukleus führt zur Inaktivierung von NFAT mit

anschließender Translokation ins Zytoplasma, in welchem das NFAT-Protein bis zu seiner erneuten Aktivierung von Kinasen im phosphorylierten - und damit inaktiven - Zustand gehalten wird.[51, 52]

1.2.2. NFAT2 in B-Zellen

In B-Zellen ist der Transkriptionsfaktor NFAT2 von zentraler Relevanz, da NFAT2 auf die Zellentwicklung von B-1a Zellen und die Signaltransmission in B-Zellen wesentlichen Einfluss ausübt.[53, 54]

B-Zellen sind als Vorläufer von Antikörper/Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen zentraler Bestandteil der spezifischen Immunabwehr und verbinden zelluläres und humorales Immunsystem. Anhand von phänotypischen und funktionellen Merkmalen sowie der topografischen Verteilung in unterschiedlichen Geweben und Körperregionen können B-Zellen klassifiziert und in verschiedene Subgruppen unterteilt werden.[55, 56] So unterscheidet man mit den B-1 und B-2 Zellen zwei unterschiedliche B-Zellpopulationen, deren weitere Charakterisierung in Abschnitt 1.5.1 auf S. 16 beschrieben wird. NFAT2 ist für die Entwicklung von B-1a Zellen von essenzieller Bedeutung. Mäuse, in denen die lymphozytäre Expression von NFAT2 verhindert wurde, zeigten eine stark verminderte B-1a Zellpopulation.[53]

Auch bei der Signaltransmission in B-Zellen ist NFAT2 im Rahmen der Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT2-Signalkaskade nach Stimulation des BCR maßgeblich beteiligt.[54]

1.2.3. NFAT in Tumoren

Neben den zahlreichen Prozessen, in denen NFAT-Transkriptionsfaktoren involviert sind oder die von NFAT reguliert werden, spielt die Dysregulationen in NFAT-Signalwegen eine Rolle in der Entstehung von Tumoren und deren Progression.[44]

Nach derzeitigem Wissen sind aberrante NFAT-Signalwege an vielen Prozessen innerhalb der Tumorzellbiologie beteiligt und für die Transformation und Zellproliferation von Krebszellen [57], deren Metastasierung, für die Entwicklung von Therapieresistenzen, für die Generierung eines Tumor-unterstützenden Mikromilieus sowie für den Ablauf der Tumorangiogenese von wichtiger Bedeutung.[43, 58-60]

So unterschiedlich das Vorkommen und die Wirkung der NFAT-Isoformen im physiologischen Sinne sind, so verschieden und komplex ist ihre Wirkungsweise in Tumoren und ihrer Entstehung. Eine Überexpression von NFAT2 führt beispielsweise zur malignen Transformation und Proliferation von Fibroblasten [57], wohingegen die Überexpression von NFAT1 zum Zellzyklusarrest und zur Induktion von Apoptose führen kann.[61] NFAT-Transkriptionsfaktoren können demnach je nach Isoform und molekularbiologischen Interaktionsbedingungen tumorfördernd oder tumorsuppressiv wirken. Die unterschiedlichen und teilweise widersprüchlichen Funktionen im Rahmen der Tumorgenese sind am ehesten durch die Vielfalt an NFAT-involvierten Prozessen sowie dem variablen Vorkommen der NFAT-Isoformen in verschiedenen Zellen und Geweben zu erklären.[58]

Die Metastasierungsfähigkeit eines Malignoms ist ein „Hallmark“-Charakteristikum, welches in seiner Komplexität in vielem noch unverstanden ist.[62] Ein wesentlicher Aspekt hinsichtlich der Metastasierung sind bestimmte Fähigkeiten der Tumorzellen, die sie im Verlauf der Tumorprogression erlangen. Hierzu zählen das invasive Wachstum, die Migration aus dem ursprünglichen Zellverband mit Anschluss an das Gefäßsystem des erkrankten Organismus, welches zu einer Ausschwemmung der Tumorzellen in Form von zirkulierenden Tumor-Emboli führt.[63] Wie an Brustkrebszellen festgestellt werden konnte, sind NFAT1 und NFAT5 an Prozessen der Zellinvasion und -migration beteiligt [64], was in ähnlicher Form auch bei Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden konnte.[65, 66] Ihre metastasierungsfördernde Wirkung erzielen die NFAT-Transkriptionsfaktoren durch die verstärkte Expression von invasions- und migrationsfördernden Genen wie beispielsweise COX-2, Autotaxin und verschiedenen Metalloproteinasen.[43, 58]

Bemerkenswert ist, dass für NFAT3 ein anti-metastatisch, invasions- und migrationshemmender Effekt in Östrogen-Rezeptor- α -positiven Brustkrebszellen (ER α +) beschrieben wurde [67], was wiederum die komplexe und zum Teil widersprüchliche Wirkungsweise von NFAT-Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Tumorgenese widerspiegelt.

1.3. Die CLL im Transgenen Mausmodell

1.3.1. Das E μ -TCL1-Mausmodell

Um die Pathogenese und den dynamischen Verlauf einer Erkrankung zu erforschen, werden biologische Modelle benötigt, welche die charakteristischen Eigenschaften der humanen Erkrankung möglichst detailliert widerspiegeln. Oft dienen hierfür Tiermodelle, mit welchen nicht nur pathophysiologische Prozesse untersucht werden, sondern auch neu entwickelte Therapeutika erprobt werden können.

Im Jahr 2002 gelang der Gruppe um R. Bichi und C.M. Croce die Etablierung eines transgenen Mausmodells, welches den phänotypischen Merkmalen einer humanen CLL-Erkrankung sehr nahe kommt. Durch die B-Zell-spezifische Expression des Onkogens TCL1 gelang es, ein Mausmodell zu generieren, das durch die progrediente Akkumulation von CD5⁺ - und damit CLL-typischen -B-Zellen in Peritonealhöhle, Knochenmark und Milz der Mäuse, sowie durch die leukämische Ausschwemmung der B-Zellen ins periphere Blut im fortschreitenden Krankheitsverlauf wesentliche pathognomonische Merkmale der humanen CLL besitzt und deshalb zu einem weltweit etablierten und akzeptierten Mausmodell für die Erforschung der humanen CLL in vivo wurde.[68]

Das *T cell leukemia-1 gene* (TCL1) wurde als Gen beschrieben, das vor allem in der frühen Entwicklung von B- und T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielt.[69] Während TCL1 seinem Namen gemäß bei verschiedenen T-Zell-Leukämien, insbesondere der adulten T-Zell-Leukämie (ATL), überexprimiert wird [70, 71], wurde eine variable Expression des Gens in B-Lymphozyten, deren Vorläuferstadien sowie in malignen B-Zell-Erkrankungen beschrieben.[72] Um die Rolle von TCL1 in der B-Zell-Entwicklung und der Entstehung von B-Zell-Neoplasien zu erforschen, entwickelte die Gruppe um R. Bichi und C.M. Croce ein transgenes Mausmodell, in welchem das TCL1-Gen unter der regulatorischen Kontrolle des Enhancers *IgH-E μ* des V_H-Promotors liegt und damit selektiv in unreifen wie reifen B-Zellen exprimiert wird⁴. [68] Es zeigte sich, dass alle Mäuse ab einem Alter von sechs Lebensmonaten eine erhöhte B-Zellpopulation aufwiesen, die sowohl IgM als auch CD5 exprimierte. In der Peritonealhöhle der Mäuse konnten die IgM/CD5⁺ B-Zellen bereits nach zwei

⁴ Weitere Informationen zur V_H-Region sind unter "1.5.2 Struktur und physiologische Funktion des BCR" (S.18) in dieser Arbeit zu finden.

Lebensmonaten, in der Milz nach vier Monaten und im Knochenmark nach acht Monaten nachgewiesen werden. R. Bichi beschreibt weiterhin, dass alle Mäuse im Alter von 13 - 18 Monaten ein Krankheitsbild mit Hepatosplenomegalie, einer Lymphadenopathie sowie einer deutlichen Lymphozytose entwickelten. Da in diesem Symptomkomplex viele Charakteristika der humanen CLL-Erkrankung abgebildet werden, etablierte sich das E μ -TCL1-Mausmodell als Modellsystem für die humane CLL.[68]

1.3.2. Das E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mausmodell

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors NFAT2 auf die Pathogenese und die Dynamik der CLL zu untersuchen, generierten M. Märklin und M. Müller basierend auf dem E μ -TCL1-Mausmodell ein konditionelles Knockout-Modell, in welchem selektiv in B-Zellen die Expression von NFAT2 verhindert wurde. Die durchgeführte Gen-Ausschaltung beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination, bei der mittels des sequenzspezifischen *Cre/loxP*-Rekombinationssystems eine Deletion des von zwei loxP-Sequenzen flankierten, kodierenden DNA-Abschnittes für NFAT2 durch die Rekombinase *Cre* erreicht wird.[73, 74]

Um einen gezielten Knockout von NFAT2 in B-Zellen zu erreichen, wurde eine Expression von Cre unter dem B-Zellspezifischen Promoter von CD19 gewählt. Mäuse des genetischen C57BL/6-Hintergrunds, deren kodierender Bereich für NFAT2 durch zwei loxP-Sequenzen markiert worden war ("gefloxt"; Genotyp NFAT2^{fl/fl}), wurden mit Tieren der CD19/Cre-Linie (CD19^{cre/+}) gekreuzt. Es resultierten unter anderem Mäuse des Genotyps NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+} mit B-Zellspezifischem NFAT2-Knockout. Zur Erzeugung des B-Zellspezifischen NFAT2-Knockouts im E μ -TCL1-Mausmodell wurden die beschriebenen Mäuse des konditionellen NFAT2-Knockouts mit Tieren des E μ -TCL1-Modells verpaart, sodass Mäuse des Genotyps E μ -TCL1^{+/-} NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+} auf genetischem C57BL/6-Hintergrund entstanden.[74]

1.4. Darlegung des Phänotyps der untersuchten Mauslinien

1.4.1. Krankheitsverlauf und Manifestationsformen der CLL im E μ -TCL1- und E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mausmodell

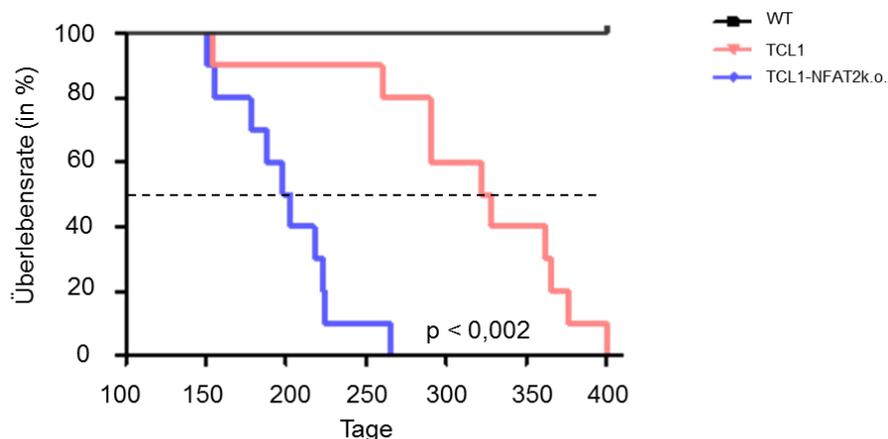
Da das Erscheinungsbild der CLL im transgenen E μ -TCL1-Mausmodell ohne NFAT2-Knockout unter 1.3.1 dieser Arbeit detailliert beschrieben ist, soll im Folgenden die Darlegung des Krankheitsverlaufs im E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mausmodell im Vordergrund stehen. Speziell soll hierbei auf die Fragestellung, wie der Knockout von NFAT2 die Pathophysiologie der CLL beeinflusst, näher eingegangen werden. In der Dissertation von M. Märklin wird die Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL ausführlich analysiert und beschrieben.[75]

In diesem Kapitel "1.4 Darlegung des Phänotyps der untersuchten Mauslinien" werden im Hinblick auf das Verständnis dieser Arbeit ausgewählte Aspekte aus Märklins Untersuchungsergebnissen, die als Grundlage dieser Arbeit dienen, vorgestellt und detailliert erläutert. Dies erfolgt mit Frau Dr. Märklins freundlichem Einverständnis.

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im weiteren Text an manchen Stellen auf die ausführliche Ausformulierung der Maus-Genotypen verzichtet. Stattdessen werden folgende Abkürzungen verwendet:

Wildtyp (NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{+/+}):	<i>WT</i>
E μ -TCL1:	<i>TCL1</i> bzw. <i>TCL</i>
E μ -TCL1-NFAT2k.o. (NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{cre/+}):	<i>TCL-NFAT2k.o.</i> bzw. <i>TCL-KO</i>

Als gravierendster Unterschied des Krankheitsverlaufs im TCL-KO-Mausmodell gegenüber dem TCL1-Modell ist die deutlich reduzierte Überlebenszeit der TCL1-NFAT2k.o.-Tiere zu nennen. Wie ein Langzeitversuch über 400 Tage zeigte, wies die TCL1-NFAT2k.o.-Kohorte eine deutlich reduzierte mediane Überlebensdauer von ca. 200 Tagen auf, wohingegen die TCL1-Kohorte ohne NFAT2-Knockout eine mediane Überlebensdauer von 325 Tagen zeigte. Aus der Kontrollkohorte verstarb kein Tier während des Beobachtungszeitraums.[75]



⁵ **Abbildung 1: Überlebenskurven der verschiedenen Mauslinien**

Kaplan-Maier Blot: Langzeitstudie über 400 Tage zum Überleben von TCL1- und TCL1- NFAT2k.o.-Mäusen (n=10), Kontrolle mit WT-Mäusen (n=5).

Ein weiteres Merkmal bezüglich der B-Zellspezifischen Deletion von NFAT2 im E μ -TCL1-Mausmodell besteht in einer verstärkten Akkumulation (gepaart mit erhöhter Proliferationsrate) von CLL-typischen CD5⁺ B-Zellen.

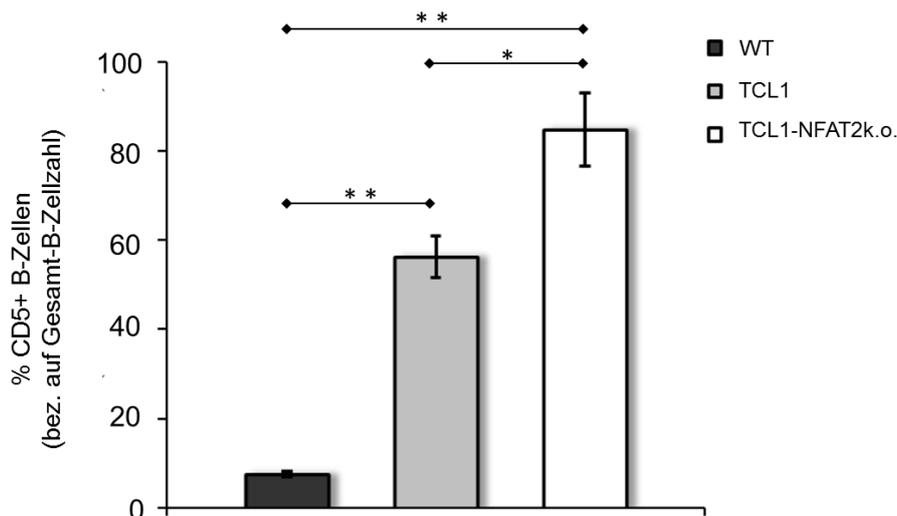
Hierzu wurden in verschiedenen Experimenten und Langzeitversuchen Blut- und Organproben von Mäusen unterschiedlichen Alters untersucht und der Anteil an CD5⁺ B-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es zeigte sich, dass der Verlust von NFAT2 im TCL1-Mausmodell zu einer deutlich erhöhten Anzahl an CD5⁺ B-Zellen im Blut und in der Milz der Mäuse führt.

Die Untersuchung der *in vivo*-Proliferation der CD5⁺ B-Zellen und deren Apoptoserate kam zu dem Ergebnis, dass der Verlust von NFAT2 im TCL1-Mausmodell zu einer gesteigerten Proliferation und reduzierten Apoptoserate der CD5⁺ Zellen in adulten Tieren führt.

Abbildung 2 zeigt den Anteil an CD5⁺ B-Zellen bezogen auf die Gesamt-B-Zellzahl in der Milz der WT-Kohorte und den beiden Leukämiekohorten. Untersucht wurden Milzproben von Mäusen im Alter von sieben Monaten; der Anteil an CD5⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

⁵ Abbildung 1 basiert auf Daten von M. Märklin und wurde in ähnlicher Form in folgender Publikation bereits veröffentlicht: Märklin, M., *Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL*, M.-N.F.d.E.K.U. Tübingen, Editor. 2015: Tübingen. p. 56.

Für WT-Tiere lag der durchschnittliche Anteil an CD5⁺ B-Zellen bei 7,46 % (n=5, SEM=0.973), wogegen der Anteil in der TCL1-Mauslinie ohne NFAT2-Knockout bei durchschnittliche 56,30 % lag (n=5, SEM=6,753). Eine weitere deutliche Steigerung zeigte sich im TCL1-Modell mit NFAT2-Deletion, in dem durchschnittlich 84,80 % aller B-Zellen CD5 exprimierten und sich somit als CLL-typisch herausstellten (n=4, SEM=6,274).



⁶ **Abbildung 2: Anteil an CD5⁺ B-Zellen der untersuchten Milzproben**

Dargestellt ist der Anteil an CD5⁺ B-Zellen bezüglich der untersuchten Gesamt-B-Zellzahl der Milz in den jeweiligen Mauslinien. Alter der Mäuse = 7 Monate, MW, SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, WT / TCL1 n=5, TCL1-NFAT2k.o. n=4

Mäuse der TCL1-NFAT2k.o.-Kohorte weisen demnach eine deutlich erhöhte Prävalenz an CD5⁺ CLL-typischen B-Zellen als Tiere des herkömmlichen TCL1-Mausmodells ohne NFAT2-Deletion auf.

1.4.2. Aktivitätsmuster der exprimierten BCR im E μ -TCL1- und E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mausmodell

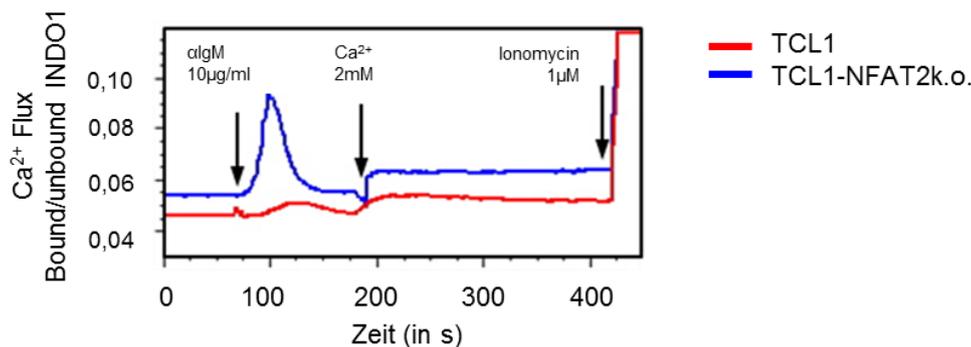
Um Aufschluss über die molekularbiologischen Auswirkungen des NFAT2-Knockouts in den CLL-typischen B-Zellen zu erhalten, wurden Genexpressionsanalysen mittels Microarray in CD5⁺ B-Zellen mit und ohne NFAT2-Deletion durchgeführt. Gene und

⁶ Abbildung 2 basiert auf Daten von M. Märklin.

Signalwege, die durch den Knockout von NFAT2 beeinflusst werden, sollten durch die Expressionsanalysen identifiziert werden.

Es zeigte sich, dass im besonderen Gene innerhalb des Zellzyklus und der BCR-Signalkaskade durch den NFAT2-Knockout beeinflusst werden. Durch diese und weitere Beobachtungen veranlasst, wurde in einem weiteren Schritt die Reaktivität der B-Zellen untersucht. Hierzu wurden aus Milzproben von 5 Monate alten Mäusen die CD5⁺ B-Zellen der beiden Leukämiekohorten mit α IgM stimuliert und die intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisation als Folge der BCR-Stimulation erfasst. Initial wurde für 60 s die basale intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration der B-Zellen gemessen, bevor anschließend die Rezeptorstimulation mit α IgM erfolgte. In der TCL1-Kohorte ohne NFAT2-Knockout war als Folge auf die Rezeptorstimulation nahezu kein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration messbar. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse ergab sich für die malignen CD5⁺ B-Zellen das phänotypische Bild der Anergie, bei dem auf eine Rezeptorstimulation keine oder eine sehr eingeschränkte Reaktion folgte. Eine ausführliche Erklärung hierzu findet sich in der Dissertation von Melanie Märklin.[75]

In starkem Kontrast zur Anergie der untersuchten CD5⁺ B-Zellen im TCL1-Mausmodell steht die verstärkte Reaktivität des BCR nach Stimulation von CD5⁺ B-Zellen mit NFAT2-Knockout. In diesen Zellen war der intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg im Vergleich zur anergen Reaktion der malignen B-Zellen ohne NFAT2-Deletion deutlich erhöht (siehe Abbildung 3).



⁷ **Abbildung 3: Intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration nach BCR-Stimulation**
Dargestellt ist der Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in CD5⁺ B-Zellen mit und ohne NFAT2-Deletion (Alter der Mäuse bei Probenentnahme: 5 Monate; B-Zellisolation aus Milzproben). Die Stimulation mit αIgM erfolgte nach 60 s. Die Gabe von Ionomycin diente als Positivkontrolle durch unspezifische Stimulation der Ca²⁺-Kanäle.

Melanie Märklin konnte zeigen, dass NFAT2 von entscheidender Bedeutung für den Zustand der Anergie in CD5⁺ B-Zellen ist.[74] Der Verlust von NFAT2 geht mit dem Verschwinden jenes anergen Phänotyps einher, sodass CD5⁺ B-Zellen mit NFAT2-Deletion einen hochreaktiven BCR gegenüber Antigenstimulation aufweisen.

Zusammenfassend soll aus den Vorarbeiten festgehalten werden, dass sich die B-Zell-spezifische Deletion von NFAT2 im TCL1-Mausmodell in einem aggressiven Krankheitsverlauf mit verkürztem Überleben, mit einer gesteigerten Proliferation CLL-typischer CD5⁺ B-Zellen und mit einem hochreaktiven Phänotyp der exprimierten BCR manifestiert.

1.5. Der B-Zell-Rezeptor (BCR)

1.5.1. Allgemeines zur B-Zelle

Das Immunsystem von Säugetieren besteht aus angeborenen und im Laufe der Entwicklung erworbenen (adaptiven) Abwehrmechanismen. Zu letzteren werden T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) gezählt.[76] Mithilfe ihres auf

⁷ Abbildung 3 basiert auf Daten von M. Märklin und wurde in ähnlicher Form in folgender Publikation bereits veröffentlicht: Märklin, M., et al., *NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Commun, 2017. 8(1): p. 755.

der Zelloberfläche exprimierten Antigenrezeptors können B-Zellen an Antigene binden und infolge der Rezeptorstimulation durch Differenzierung und Proliferation Plasmazellen bilden, die den B-Zell-Rezeptor in seiner löslichen Form als spezifische Antikörper produzieren.[77]

In der Maus können B-Zellen anhand von phänotypischen und funktionellen Merkmalen klassifiziert und in verschiedene Subgruppen unterteilt werden. Dabei spielt die topografische Verteilung der Zellen in unterschiedlichen Geweben und Körperregionen eine Rolle.[55, 56] Mit den B-1 und B-2 Zellen werden zwei unterschiedliche B-Zellpopulationen unterschieden, von denen anteilmäßig die B-2 Zellen die bedeutend größere Population darstellen.[56, 78] Zu den B-2 Zellen werden alle rezirkulierenden B-Zellen, wie sie überwiegend in Lymphknoten und in den Lymphfollikeln der Milz anzutreffen sind, gezählt. Durch die Interaktion mit T-Zellen sind B-2 Zellen für die effektive und hochspezialisierte Immunabwehr gegenüber Fremdanitigenen im Rahmen der T-Zell-abhängigen Immunantwort verantwortlich.[78, 79]

Ebenfalls zur B-2 Population werden nicht zirkulierende B-Zellen in der Marginalzone (MZ-Zellen) der Milz gezählt. Ihre Funktion ist ähnlich wie die der im Folgenden beschriebenen B-1 Zellen und trägt zur frühen Immunantwort bei.[80]

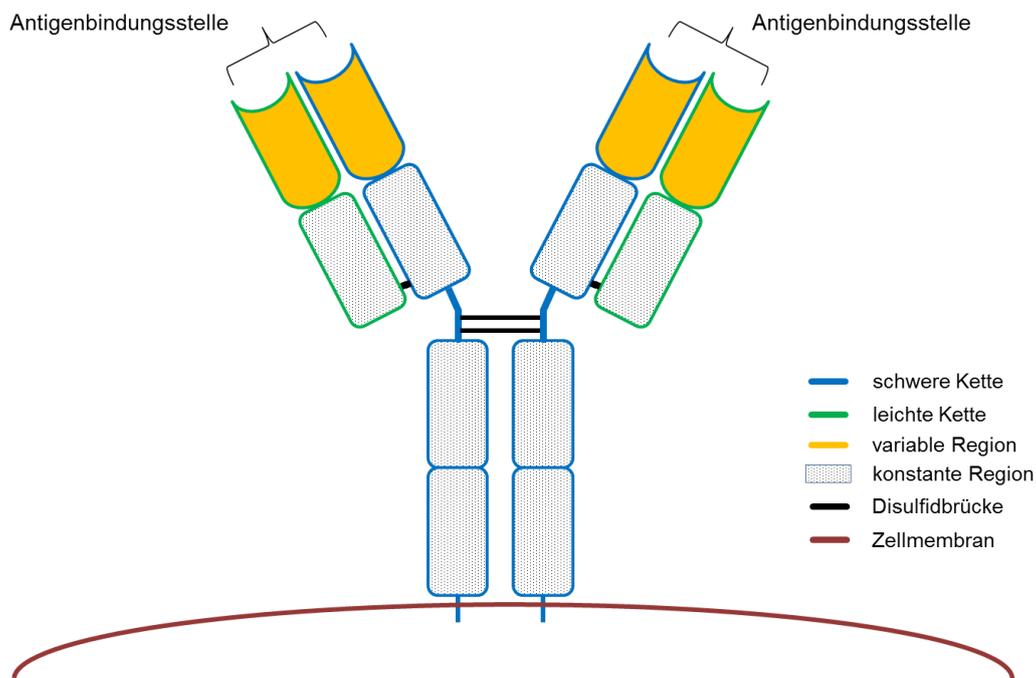
Ein charakteristisches Merkmal der B-1 Zellen ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, während B-2 Zellen durch lymphatische Progenitorzellen des Knochenmarks neu gebildet werden.[81, 82] Ein gehäuftes Vorkommen von B-1 Zellen wurde in der Peritoneal- und Pleurahöhle von Mäusen festgestellt.[83] Anhand des Expressionsmusters bestimmter Oberflächenproteine können B-1 Zellen phänotypisch in CD5⁺ B-1a und CD5⁻ B-1b Zellen unterteilt werden.[84]

Da sowohl B-1 als auch MZ-Zellen im Vergleich zu rezirkulierenden B-2 Zellen eine erniedrigte Schwelle nach Antigenbindung ihres BCR für die Zellaktivierung, Proliferation und Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen aufweisen, werden sie als tragende Hauptakteure während der frühen Immunantwort durch die schnelle Produktion von Immunglobulinen angesehen.[78, 79]

1.5.2. Struktur und physiologische Funktion des BCR

Der Antigenrezeptor einer B-Zelle besteht aus einem an der Zellmembran gebundenen Antikörpermolekül (Immunglobulin). Im Umkehrschluss und unter Berücksichtigung der biologischen Chronologie bezüglich der Entstehung von Antikörpern kann auch gesagt werden, dass Antikörper die sezernierte Form des B-Zellrezeptors sind.[85]

Strukturell ähnelt die Form des BCR einem Y, welches als Tetramer mit einer relativen Molekülmasse von ca. 150 kDa aus vier Polypeptidketten besteht. Jeweils zwei der vier Polypeptidketten sind identisch und werden aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes als schwere (*heavy*) Ketten alias H-Ketten (ca. 50 kDa) und leichte (*light*) Ketten alias L-Ketten bezeichnet.[85, 86] In Abbildung 4 sind die Struktur und verschiedenen Untereinheiten eines BCR graphisch veranschaulicht.



⁸ **Abbildung 4: Schematische Darstellung eines BCR**

Ein BCR besteht als membrangebundenes Immunglobulin aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die beiden identischen Antigenbindungsstellen liegen im Bereich der variablen Region.

Zwischen den beiden schweren Ketten sorgen Disulfidbrücken für strukturelle Stabilität, während die beiden leichten Ketten ebenfalls durch eine Disulfidbrücke sowie nichtkovalente Wechselwirkungen mit jeweils einer der schweren Ketten verbunden

⁸ Abbildung 4 gezeichnet in Anlehnung an Abbildungen aus: K. Murphy, P.T., M. Walport, *Die Struktur eines typischen Antikörpermoleküls*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 144-145

sind. Jede der vier Polypeptidketten besteht aus einer variablen Region (V-Region) und einer konstanten Region (C-Region), von denen jeweils die V-Region einer schweren und einer leichten Kette die antigenbindende Stelle eines Antikörpers bildet. Da jeder BCR aus zwei schweren und zwei leichten Ketten besteht, besitzt er folglich zwei identische Antigenbindungsstellen.[85]

Die Antigenbindungsstelle selbst besteht aus verschiedenen Regionen mit auffällig gesteigerter Sequenzvariabilität (sog. *hypervariable Regionen*), welche von Gerüstregionen geringerer Variabilität (*framework regions*) flankiert werden. So existiert jede V-Region einer leichten und einer schweren Kette aus drei hypervariablen Regionen (HV1, HV2 und HV3) und insgesamt vier Gerüstregionen (FR1, FR2, FR3 und FR4). Die räumliche Anordnung der hypervariablen Regionen von leichter und schwerer Kette ergibt die Antigenbindungsstelle, welche durch ihre einzigartige Oberflächenstruktur die Antigenpezifität eines Immunglobulins bestimmt. Aus diesem Grund werden die hypervariablen Regionen auch als *komplementaritätsbestimmende Regionen* (*complementarity determining regions*, CDR1, CDR2 und CDR3) bezeichnet.[87, 88]

Die konstante Region einer Polypeptidkette bestimmt den Isotyp der Kette. Während für die leichten Ketten zwei Isotypen - Kappa (κ) und Lambda (λ) - bekannt sind, existieren für die schweren Ketten fünf verschiedene Isotypen, anhand derer eine Einteilung der Immunglobuline in fünf Hauptklassen - Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE) vorgenommen werden kann. Die C-Region bzw. der Isotyp der schweren Kette determiniert zudem die funktionellen Eigenschaften eines Immunglobulins. Die Struktur des BCR (membrangebundenes Immunglobulin) ist nahezu identisch zu seiner im Blutplasma vorzufindenden löslich-sezernierten Form. Eine Ausnahme hierbei bildet ein kleiner Abschnitt am carboxyterminalen Ende der C-Region der schweren Kette. Beim BCR besteht sie aus einer hydrophoben Sequenz zur Verankerung des Immunglobulins in der Zellmembran, während im freien Antikörpermolekül eine hydrophile Sequenz die Sekretion ins Blutplasma ermöglicht.[85]

Die Funktion des BCR besteht im Erkennen und Binden von zumeist körperfremden Antigenen, welche von unterschiedlichster Struktur und Substanz sein können. Nach Bindung eines Antigens an die Antigenbindungsstelle wird der BCR aktiviert und setzt über den B-Zellrezeptor-Komplex (bestehend aus dem membrangebundenen Immunglobulin sowie zwei akzessorisch verknüpften Proteinketten I α und I β) eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang. Diese kann zu Zellwachstum, Teilung und Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen führen.[86, 89]

Das Spektrum der vom BCR erkannten Antigenen ist mit Proteinen, DNA-Strukturen, Polysacchariden und anderen Molekülen extrem vielfältig.[86] Um diese Vielfalt an unterschiedlichen Antigenen zu erfassen, muss eine äquivalente Diversität unter den antigenbindenden BCR vorherrschen. Auf den zugrundeliegenden genetischen Mechanismus zur Ausbildung der BCR- und damit einhergehender Antikörper-Diversität⁹ soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

1.5.3. Genetische Kodierung des BCR

Das große Spektrum an unterschiedlichen BCR und löslichen Immunglobulinen basiert auf einem komplexen genetischen Mechanismus, der *somatischen Rekombination*. Der Begriff beschreibt, dass während der Entstehung und Entwicklung der BCR auf einzigartige Weise Genumlagerungen auf Ebene der DNA der kodierenden Gensegmente der V-Region in B-Lymphozyten stattfinden, sodass eine andere Anordnung der Immunglobulin-Gen-DNA in B-Zellen im Vergleich zur genomischen Keimbahn-DNA von nichtlymphoiden Zellen vorzufinden ist.[90]

Die variable Region des BCR wird von mehreren Gensegmenten kodiert. Während die V-Region der leichten Kette von zwei Gensegmenten gebildet wird (genannt als V_L- und J_L-Gensegment), wird die V-Region der schweren Kette von drei Gensegmenten kodiert (V_H-, D_H- und J_H-Gensegment). Während die CDR1 und CDR2 vollständig von dem V-Gen einer schweren oder leichten Kette kodiert wird, fällt die CDR3 in die

⁹ Beim Menschen wird ein Antikörperrepertoire von mindestens 10¹¹ verschiedenen Antikörpermolekülen angenommen. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Primäre Umlagerung von Immunglobulingenen*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 182-198.

Verknüpfungszone der V(D)J-Rekombinationssequenz und verfügt dadurch über das höchste Maß an Variabilität unter den drei CDR.[87, 88]¹⁰ Für jedes der drei V-, D- und J-Gensegmente liegen in der Keimbahn-DNA multiple Kopien vor, von denen im Umlagerungsprozess bei der somatischen Rekombination jeweils ein Gensegment nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wird.[90] In verschiedenen Spezies differiert die Anzahl an unterschiedlichen V-, D- und J-Gensegmenten. Je nach Literatur findet man Angaben von rund 40 funktionsfähigen V_H-Gensegmenten, 25 D_H-Gensegmenten und 6 J_H-Gensegmenten in menschlichen Immunglobulin-DNA-Loci.[90, 91] In Mäusen hingegen wird von ungefähr 100 funktionellen V_H-Gensegmenten, 13 D_H-Gensegmenten und 4 J_H-Gensegmenten ausgegangen.¹¹[92, 93]

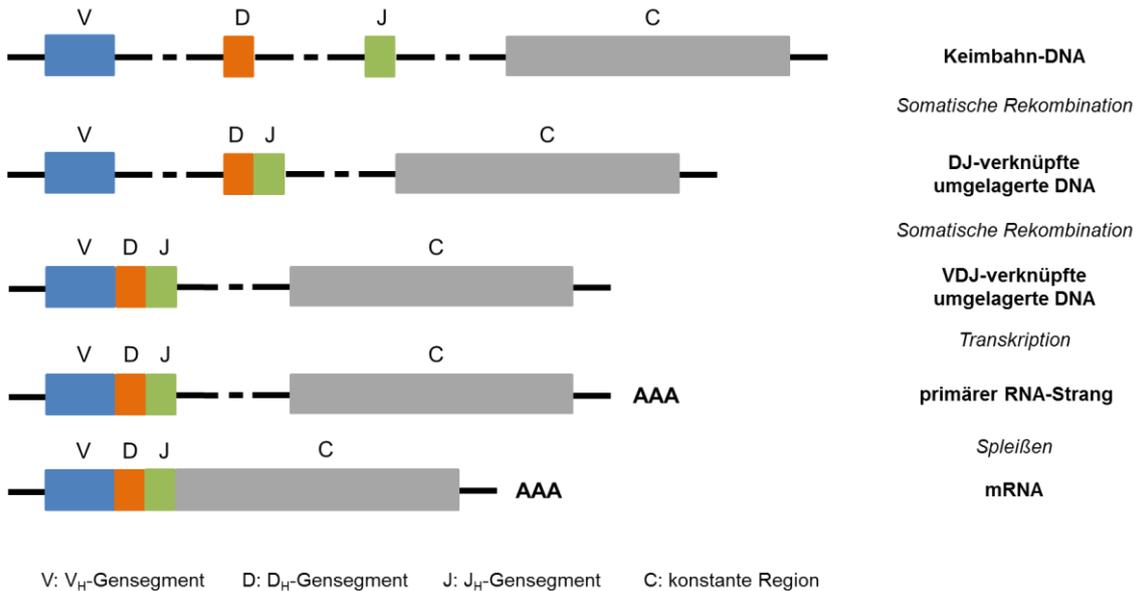
Bei der Entstehung des BCR im Knochenmark durchläuft die B-Zelle verschiedene Entwicklungsstadien. In einem ersten Schritt wird ein D-Gensegment der schweren Kette (D_H) mit einem J_H-Gensegment verknüpft. Anschließend kommt es zu einer Verknüpfung der DJ_H-Rekombination mit einem V_H-Gensegment, sodass schließlich ein vollständiges Exon für die variable Region der schweren Kette als VDJ-Rekombination vorliegt. Die jeweilige VDJ-Verknüpfung der schweren Kette eines BCR ist hochcharakteristisch für die jeweilige B-Zelle. Da statistisch das Auftreten eines identischen BCR zweier Lymphozyten durch zufällig dieselbe VJD-Rekombination nahezu ausgeschlossen werden kann, wird die VDJ-Rekombinationssequenz als hochspezifisches Klonalitätsmerkmal einer B-Zelle verstanden - im Sinne, dass alle B-Zellen, die denselben BCR exprimieren bzw. dieselbe VDJ-Rekombination aufweisen, als Population (*Klon*) einer gemeinsamen Vorläuferzelle angesehen werden.[88, 90, 94]

Katalysiert wird die somatische Rekombination durch einen Komplex aus verschiedenen DNA-modifizierenden Enzymen, unter denen die beiden Enzyme *RAG-1* und *RAG-2* eine besonders wichtige Rolle spielen.[90, 95] Da von jedem Genotyp multiple Kopien vorliegen, die während einer Rekombination jeweils unterschiedlich

¹⁰ vgl. Absatz 1.5.2 "Struktur und physiologische Funktion des BCR"

¹¹ Die tatsächliche Anzahl an Immunglobulin-Gensegmenten in der Keimbahn-DNA liegt in Wirklichkeit bei einem deutlich höheren Wert. Neben funktionellen Gensegmenten existiert eine erhebliche Anzahl an sog. *Pseudogenen* (nichtfunktionelle Gensegmente, die zu keiner Expression eines funktionsfähigen Proteins führen), die jedoch für die Bildung von BCR oder Antikörper keine Rolle spielen.90. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Primäre Umlagerung von Immunglobulingenen*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 182-198.

miteinander verknüpft werden können, entsteht eine große Vielfalt an möglichen VDJ-Rekombinationen (die sog. *kombinatorische Diversität*). Zusätzlich kommt es während des Rekombinationsprozesses an den Verknüpfungsstellen zur Einfügung oder Entfernung einzelner Nukleotide (*junktionale Vielfalt*), was das Repertoire an unterschiedlichen BCR weiter steigert.[90]



¹² **Abbildung 5: Schematische Darstellung der somatischen Rekombination einer Schweren Kette**
 Bei der Entstehung der variablen Region des BCR finden Genumlagerungen (somatische Rekombinationsprozesse) auf Ebene der Keimbahn-DNA statt, die zu einer anderen Anordnung der Immunglobulin-Gen-DNA in B-Zellen im Vergleich zur genomischen Keimbahn-DNA von nichtlymphoiden Zellen führt. In einem ersten Schritt wird ein D-Gensegment der schweren Kette (DH) mit einem JH-Gensegment verknüpft. Anschließend kommt es zu einer Verknüpfung der DJH-Rekombination mit einem VH-Gensegment, sodass schließlich ein vollständiges Exon für die variable Region der schweren Kette als VDJ-Rekombination vorliegt. Nach erfolgter Transkription und dem Spleißvorgang, bei dem der kodierende RNA-Abschnitt der konstanten Region an die variable Region (VDJ-Rekombination) angelagert wird, erfolgt die Translation mit dem Resultat der schweren Kette des Prä-BCR.

Das Exon der V-Region sowie der kodierende Genabschnitt für die C-Region werden transkribiert und durch Spleißen der RNA zusammengelagert. Durch die Translation der so entstandenen mRNA entsteht eine Polypeptidkette - die schwere Kette des BCR -, welche als Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BCR) von der Prä-B-Zelle auf der Zelloberfläche exprimiert wird.[90, 96] Nicht jede VDJ-Rekombination erweist sich als funktionsfähig

¹² Abbildung 5 wurde in Anlehnung an "Abbildung 4.2" gezeichnet in: K. Murphy, P.T., M. Walport, *Primäre Umlagerung von Immunglobulingenen*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 185.

für die Expression einer intakten schweren Kette, weshalb eine Testung der Funktionalität in Form des exprimierten Prä-BCR stattfindet. Die Expression eines funktionsfähigen Prä-BCR führt die Prä-B-Zelle in ein weiteres Entwicklungsstadium und signalisiert den Beginn für die Genumlagerung der leichten Kette.[96] Diese erfolgt ähnlich wie die somatische Rekombination der schweren Kette, wobei nur zwei Gensegmente (ein V_L - und ein J_L -Gensegment) miteinander verknüpft werden.[90, 95]

Eine funktionsfähige leichte Kette führt gemeinsam mit einer funktionsfähigen schweren Kette zur Expression eines vollständigen BCR der Klasse IgM, was das charakteristische Merkmal einer "unreifen-reifen" (transitional stage T1) B-Zelle darstellt.[96, 97] Der letzte Entwicklungsschritt einer B-Zelle vom "unreifen" zum "reifen" Stadium ist schließlich durch die Koexpression eines weiteren BCR-Typs gekennzeichnet. Durch alternatives Spleißen der schweren Kette produzieren reife B-Zellen neben dem Typ IgM einen BCR der Klasse IgD, dessen Koexpression gemeinsam mit dem IgM-BCR ein Erkennungsmerkmal von reifen B-Zellen darstellt.[96]

Jede reife B-Zelle exprimiert zunächst auf ihrer Oberfläche membrangebundene Immunglobuline IgM und IgD. Nach Aktivierung durch Antigenkontakt erfolgt eine weitere Differenzierung und Proliferation der B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen des Typs IgM (Frühphase der Immunantwort), während andere Zellen einen sog. *Klassenwechsel* vollziehen und BCR einer anderen Klasse exprimieren.[98] Der Klassenwechsel, auch Isotypwechsel genannt, trägt zur sekundären Diversifikation des Antikörperrepertoires eines Organismus bei und beschreibt den molekulargenetischen Vorgang, dass während dem Verlauf einer Immunantwort ein V_H -Exon mit verschiedenen C_H -Genen assoziiert und exprimiert werden kann. Eine aktivierte B-Zelle exprimiert in Folge des Klassenwechsels einen BCR der Klasse IgG, IgA oder IgE, bevor sie weiter zu einer antikörperproduzierenden Plasmazelle desselben Immunglobulin-Typs differenzieren kann. Da die konstante Region der schweren Kette (C_H) für die Effektoreigenschaft eines Antikörpers verantwortlich ist, kann durch den Klassenwechsel eine breitere Immunantwort durch unterschiedliche Effektorfunktionen bei gleichbleibender Antigenpezifität erzielt werden (die für die Antigenpezifität

verantwortliche V_H-Region bleibt identisch, während die für die Effektorfunktion verantwortliche C_H-Regionen verändert wird).[99]

Ein weiterer Mechanismus, der zur strukturellen Modifikation und damit sekundären Diversifikation des Antikörperrepertoires beiträgt, ist die *somatische Hypermutation*. Hierbei kommt es durch Punktmutationen im Bereich des Exons der variablen Region der schweren und leichten Ketten zu einer veränderten Bindungsfähigkeit des BCR zu seinem speziellen Antigen. BCR, deren Antigenaffinität durch entsprechende Mutationen verbessert wurden, werden selektiert und proliferieren zu antikörperproduzierenden Plasmazellen, deren Antikörper über eine optimierte Antigenaffinität verfügen, oder differenzieren sich zu B-Gedächtniszellen (*memory B cells*).[99-101] In CLL-Zellen ist es von starker prognostischer Bedeutung, ob die IGVH-Gene unmutiert oder mit somatisch hypermutierten Sequenzen (mutiert) vorliegen.[21] Anhand des Vorkommens von somatischen Mutationen können Rückschlüsse auf den Ursprung eines CLL-Klons gezogen werden. So haben CLL-Klone mit mutierten BCR das Keimzentrums eines sekundären lymphatischen Organs bereits durchwandert, während bei CLL-Klonen ohne somatische Hypermutationen die maligne Transformation noch vor Durchlaufen der Keimzentrumsphase erfolgte. CLL-Patienten mit unmutierten IGVH-Genen zeigen im Gegensatz zu Patienten mit mutierten IGVH-Genen eine wesentlich schlechtere Verlaufsform mit ungünstiger Ansprechrate auf Chemotherapie und verkürztem Überleben.[21, 22]

Wie der Klassenwechsel findet die somatische Hypermutation erst nach Aktivierung einer reifen B-Zelle durch ein Antigen statt. Ein essenzielles Enzym für den Ablauf beider Prozesse ist die *Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase* (AID). AID desaminiert Cytidinreste in einzelsträngiger DNA zu Uracilresten und wird spezifisch in B-Zellen exprimiert. Die Desaminierung findet vor allem in den V-Regionen (somatische Hypermutation) und in speziellen *switch*-Regionen (Klassenwechsel) der kodierenden Immunglobulin-DNA statt. Ein Defekt oder die Abwesenheit von AID in einem Organismus geht mit schwerwiegenden Immundefizienzen einher, da das gesamte Antikörperrepertoire aufgrund des ausfallenden Klassenwechsels auf

Antikörper der Klasse IgM ohne Affinitätsreifung durch somatische Hypermutationen beschränkt ist.[99, 100]

1.6. Ziele dieser Arbeit

In der Pathogenese der humanen CLL spielt der B-Zellrezeptor eine zentrale Rolle. Es ist bekannt, dass BCR in CLL-Patienten in gewissem Maß über eine strukturelle Stereotypie verfügen und autoreaktiv sind. Zudem dient der Mutationsstatus der IGVH-Gene als wichtiger prognostischer Faktor für den Verlauf der CLL. Eine gefürchtete Komplikation im Krankheitsverlauf der CLL ist die Richter-Transformation in ein aggressives B-Zelllymphom mit ausgeprägter Therapieresistenz und sehr ungünstiger Prognose. Viele der während der Transformation stattfindenden molekularbiologischen Ereignisse sind noch unverstanden.

Ein valides Modell zur Erforschung der CLL bietet das transgene E μ -TCL1-Mausmodell. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von NFAT2 im E μ -TCL1-Mausmodell zu einer Akzeleration der CLL mit einer Transformation in ein aggressives B-Zelllymphom führt.[74] Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkung des Verlusts von NFAT2 auf das exprimierte BCR-Repertoire im E μ -TCL1-Mausmodell zu untersuchen und eine strukturelle Charakterisierung der BCR vorzunehmen. Insbesondere soll überprüft werden, ob der Knockout von NFAT2 zu einer strukturellen Selektion bestimmter BCR führt und ob hierbei der Mutationsstatus der IGVH-Gene von Relevanz ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu führen, die Rolle von NFAT2 in der CLL und in der von Märklin et al. beschriebenen Transformation weiter zu definieren und damit insgesamt das Verständnis der Pathogenese der CLL zu vertiefen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

DNA Retardation Gels (6%), 1.0 mm, 10 well	<i>Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt</i>
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml; 1,5 ml	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
gentle MACS™ C-tubes	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach</i>
PCR Single Cap 8er-Soft Strips 0,2 ml	<i>Biozym, Hessisch Oldendorf</i>
Pipettenspitzen:	
20 µl, farblos	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
ep.T.I.P.S.® Standard 50-1000 µl	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
ep.T.I.P.S.® Standard/Bulk 50-1250 µl	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Typ „E“: 1-200 µl; 100-1000 µl	<i>ratiolab GmbH, Dreieich</i>
Röhrchen:	
Falcon® 50 ml High Clarity PP Centrifuge Tube	<i>Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam</i>
CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen 15 ml	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
Stabpipetten:	
CELLSTAR® serological pipette 5 ml	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
costar® serological 2 ml, 10 ml	<i>Corning Life Science, Tewksbury, MA</i>
Sterilfilterspitzen:	
Biosphere® Fil.Tip 20 neutral; 0,1-20 µl	<i>SARSTEDT, Nümbrecht</i>
SafeSeal SurPhob® Filterspitze 10 µl extra lang	<i>Biozym, Hessisch Oldendorf</i>
SafeSeal SurPhob® Filterspitze 100 µl	<i>Biozym, Hessisch Oldendorf</i>
SafeGuard Filterspitzen 50-1250 µl	<i>peqlab VWR International GmbH, Erlangen</i>
Zellkulturschalen:	
100x20 mm	<i>Corning Incorporated, New York, USA</i>
TC-Schale 100,Cell+	<i>SARSTEDT, Nümbrecht</i>
Zellsieb: Falcon®, 40 µm Cell Strainer, Blue	<i>Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam</i>

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Agar-Agar, Kobe I	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Agarose NEE0 Ultra-Qualität	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
dNTP Mixture	<i>TaKaRa Bio Europe/SAS,</i>

Ethanol absolute, AnaLar NORMAPUR® ACS	<i>Saint-Germain-en-Laye(FR)</i>
Fötale Kälberserum (FCS)	<i>VWR International GmbH, Darmstadt</i>
Kanamycin A K-4000	<i>Biochrom, Merck Millipore, Darmstadt</i>
Midori Green Advance	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Nuclease-Free Water	<i>NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren</i>
Orange G	<i>Promega, Mannheim</i>
PBS-Puffer:	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺ D8537	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
PureYield™ Plasmid Midiprep Start-Up Kit, 220 V Electrical	<i>Promega, Mannheim</i>
PureYield™ Plasmid Midiprep System	<i>Promega, Mannheim</i>
Quick-Load® 100 bp DNA Ladder	<i>New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.</i>
RNeasy® Plus Mini Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
Superscript™II Reverse Transkriptase 5X First-Strand Buffer	<i>Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt</i>
0,1 M DTT	
SYBR® Safe DNA Gel Stain (10,000X in DMSO)	<i>Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt</i>
TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version	<i>TaKaRa Bio Europe/SAS,</i>
10X Ex Taq Buffer (Mg ²⁺ plus)	<i>Saint-Germain-en-Laye(FR)</i>
TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing K4575-J10	<i>Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt</i>
Ultra Pure Water	<i>Biochrom GmbH, Berlin</i>
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	<i>Promega, Mannheim</i>

2.1.3. Geräte und Zubehör

Absaugsystem Vacusafe comfort	<i>Integra Biosciences, Chur CH</i>
Chirurgisches Einmal Skalpell (carbon steel #11)	<i>Braun, Aesculap AG, Tuttlingen</i>
Eppendorf Thermomixer® comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Erlenmeyerkolben DRUAN® 500ml	<i>SCHOTT AG, Mainz</i>
Geldokumentationssystem E-BOX VX2 2.0 MP	<i>peqlab, Erlangen</i>
gentle MACS™ Dissociator	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach</i>
Mastercycler®	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

Mediware Einmalpinzetten – steril	<i>servoprax GmbH, Wesel</i>
Mikrobiologischer Inkubator HERAtherm™	<i>Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig</i>
Mikrowelle	<i>LG Electronics Deutschland, Ratingen</i>
Mischzylinder 250:2ml	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt</i>
MS2 Minishaker IKA®	<i>IKA Works, Wilmington, NC</i>
PCR-Cooler	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pipetten:	
Eppendorf Research® Plus	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	
Pipettierhilfe pipetus®	<i>Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt</i>
Präzisionswaage KERN EW600-2M	<i>KERN & SOHN GmbH, Balingen</i>
Schüttler KS 250 basic	<i>IKA®-Werke GmbH, Staufen</i>
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	<i>Heraeus, Hanau</i>
Spannungsgeräte:	
BluePower 500 Plus	<i>SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>
Consort Electrophoresis Power Supply, E835	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Power PAC 300TM	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000	<i>peqlab, Erlangen</i>
Sub-Cell® GT 10-Well Comb (1,5mm)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Sub-Cell® GT Cell	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Sub-Cell® GT Gel Caster	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray (15x15cm)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Tischorbitalschüttler MaxQ™ 4450	<i>Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig</i>
UVsolo TS Gel Documentation System	<i>Biometra GmbH, Göttingen</i>
Wasserbad W6	<i>Labortechnik Medingen, Arnsdorf</i>
Western Blot Incubation Box (11,5 x 8,8cm)	<i>LI-COR® Biotechnology-GmbH, Bad Homburg</i>
XCell SureLock® Mini-Cell	<i>Novex® Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Zentrifugen:	
5415R	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
5804 R	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Heraeus Biofuge Fresco	<i>Heraeus Holding GmbH, Hanau</i>
IEC, Centra GP8R	<i>IEC Centra</i>
Multifuge 3 S-R Heraeus	<i>Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig</i>
Sprout Minizentrifuge	<i>Biozym, Hessisch Oldendorf</i>

2.1.4. Puffer und Medien

Ammoniumchlorid Puffer (1 l)	0,8% NH ₄ Cl in ddH ₂ O, 0,1 mM EDTA gepuffert mit KHCO ₃ auf pH 7,4
LB-Medium (Luria/Miller)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
TBE-Puffer:	
Novex® TBE Running Buffer (5X)	<i>Novex® Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
UltraPure™ TBE Buffer, 10X	<i>Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>

2.1.5. Primer

Mouse Ig-Primer Set	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
---------------------	------------------------------

2.2. Gewinnung von Milzproben aus Wildtyp- und transgenen E μ -TCL1-Mäusen

Zur Gewinnung von Milzproben der verschiedenen Maus-Genotypen wurde je Versuchstier die Peritonealhöhle eröffnet und die Milz entnommen. Die Homogenisierung des Organs erfolgte mit 5ml PBS Puffer inkl. 2 % Fötalen Kälber Serums (FCS) durch Einsatz des Geräts GentleMACS. Die Zellsuspension wurde gefiltert und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C). Nach Verwurf des Flüssigkeitsüberstandes wurden die Splenozyten in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und vorhandene Erythrozyten mit 9 ml Ammoniumchlorid-Puffer während einer Inkubationszeit von 30 s lysiert.

Es folgten zwei Waschgänge mit PBS-Puffer, nach denen die Splenozyten zur Pelletierung in PBS-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Sammelgefäße überführt wurden. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min (4 °C) wurde der Flüssigkeitsüberstand abgesaugt und das Pellet möglichst trocken bei -150 °C gelagert.

2.3. Amplifikation der hypervariablen DNA-Regionen des B-Zell-Rezeptors (BCR) aus isolierten Milzproben

2.3.1. mRNA-Isolation aus Splenozyten

Für die Isolierung der mRNA aus den tiefgefrorenen Milzproben wurde das RNeasy® Plus Mini Kit von Qiagen verwendet: Die Splenozyten wurden in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert und das Lysat zur Filtration der genomischen DNA auf eine entsprechende gDNA Säule pipettiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 s wurde der Durchlauf in 600 µl 70%igem Ethanol resuspendiert und anschließend 600 µl der Lösung zur Filtration der RNA auf eine RNeasy Mini Säule pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 s, nach welcher der Durchlauf im 2 ml Sammelgefäß (siehe Kit-Angaben) verworfen wurde. Mit den verbliebenen 600 µl des RLT-Puffer/Ethanol - Gemischs wurde zur Filtration der RNA nach demselben Muster verfahren, indem das Gemisch ein zweites Mal auf dieselbe RNeasy Mini Säule pipettiert und anschließend zentrifugiert wurde. Erneut wurde der Durchlauf verworfen. Es folgte ein Waschvorgang mit 700 µl RW1-Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 s. Das 2 ml Sammelgefäß wurde mitsamt seinem Inhalt verworfen und die RNeasy Mini Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gestellt. In einem weiteren Waschschrift wurden 500 µl RPE-Puffer auf die RNeasy Mini Säule pipettiert und wiederum bei 10.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Nach der Entleerung des Sammelgefäßes wiederholte sich der beschriebene Waschvorgang mit weiteren 500 µl RPE-Puffer, die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 13.000 rpm für 2 min.

Die RNeasy Mini Säule wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Sammelgefäß gestellt und die gebundene RNA in ca. 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Bei der Elution erfolgte nach Zugabe des RNase-freien Wassers auf die RNeasy Mini Säule eine Inkubation von 1 - 2 min bei Raumtemperatur, bevor die RNeasy Mini Säule mitsamt dem 1,5 ml Eppendorf-Sammelgefäß abschließend für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde.

Die Messung des RNA-Gehalts in den gewonnenen RNA-Elutionsvolumina erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop™ 2000 der Firma Peqlab. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

2.3.2. cDNA-Synthese des BCRs aus isolierter mRNA

Für die Synthese der zyklischen DNA als Template für die nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen wurde 0,5 µg (20 pmol) RNA¹³, 2 µl eines 3'-Primers (siehe 2.3.3 "Polymerase-Kettenreaktionen mit Ig-Mouse Primer Set (Novagen)") in ein 1,5 ml Eppendorf-Sammelgefäß pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl verdünnt.

Zur Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA folgte eine Inkubation bei 70 °C für 10 min. Nach kurzer Zentrifugation wurde das RNA-Primer-Gemisch zur Kühlung auf Eis gelagert.

Aus folgenden Substanzen wurde eine Mastermix-Lösung hergestellt und 8,5 µl des Mastermix zum Volumen von 12,5 µl RNA-Primer-Gemisch zugegeben:

4 µl	5X First Strand Buffer (invitrogen)
2 µl	0,1M DTT (invitrogen)
2 µl	dNTP Mixture (2,5 mM each) (TaKaRa)
0,5 µl	Superscript®II Reverse Transkriptase (invitrogen)

Der Reaktionsansatz wurde für 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 70 °C für 5 min. Bis zur weiteren Verwendung wurde die synthetisierte cDNA bei -20 °C gelagert.

2.3.3. Polymerase-Kettenreaktionen mit Ig-Mouse Primer Set (Novagen)

Zur Amplifikation der hypervariablen Regionen der murinen B-Zellrezeptoren wurde das Mouse Ig-Primer Set der Firma Novagen® Merck KGaA verwendet.

Das Mouse Ig-Primer Set besteht aus 18 verschiedenen Primern, mit welchen die hypervariablen Regionen der schweren Ketten IgM und IgG und der leichten Ketten κ (kappa) und λ (lambda) durch Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) amplifiziert werden können.

¹³ Bei drei der untersuchten Wildtyp- und einem Eµ-TCL1-Tier (ohne NFAT2-Deletion) konnte aufgrund der geringen RNA-Gesamt-Menge, welche aus den Milzproben isoliert werden konnte, nur eine Menge < 0,5 µg RNA für die cDNA Synthese verwendet werden. Bei einem weiteren Eµ-TCL1-Tier wurde eine RNA-Menge > 0,5 µg verwendet.

Bedingt durch die Anzahl an unterschiedlichen 5'-Primern (siehe Tabelle 1 auf Seite 35) sind für die Untersuchung der schweren Ketten IgM und IgG insgesamt sechs PCRs, für die leichte Kette κ sieben und für λ eine PCR notwendig. In dieser Arbeit beschränkten wir uns auf die Amplifikation der hypervariablen Regionen von IgM. Nach Herstellerinformation binden die verschiedenen 5'-Primer an der jeweiligen Signalsequenz upstream einer variablen Region des BCRs, wogegen die 3'-Primer in der konstanten Region proximal der variablen Regionen des BCRs binden.

Für Polymerase-Kettenreaktionen mit den 5'-Primern A/B und C bis G wurden von Novagen® unterschiedliche Reaktionsprotokolle empfohlen. Es wurden je Versuchstier und PCR jeweils 5 μ l cDNA in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgegeben.

PCRs mit den 5'-Primern A/B:

Aus folgenden Substanzen wurde eine Mastermix-Lösung hergestellt und 45,5 μ l des Mastermix' zum Volumen von 5 μ l cDNA zugegeben:

33,25 μ l	Nuclease-Free Water (Promega)
5 μ l	10X Ex Taq Buffer (TaKaRa)
4 μ l	dNTP Mixture (2,5 mM each) (TaKaRa)
2,5 μ l	Ig 5'-leader primer (10 pmol/ μ l)
0,5 μ l	Ig 3'-primer
0,25 μ l	TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa)

Zur Aktivierung der Taq Polymerase wurde der Reaktionsansatz initial für 2 min bei 95 °C inkubiert. Die Denaturierung erfolgte pro Zyklus bei 94 °C für 30 s, die Primerhybridisierung bei 50 °C für 45 s und die Elongation bei 72 °C für 1 min. Nach insgesamt 40 Zyklen erfolgte eine abschließende Elongation bei 72 °C für 6 min.

PCRs mit den 5'-Primern C bis G:

Aus folgenden Substanzen wurde eine Mastermix-Lösung hergestellt und 45,5 μ l des Mastermix zum Volumen von 5 μ l cDNA zugegeben:

Material und Methoden: 2.3 Amplifikation der hypervariablen DNA-Regionen des B-Zell-Rezeptors (BCR) aus isolierten Milzproben

34,75 µl	Nuclease-Free Water (Promega)
5 µl	10X Ex Taq Buffer (TaKaRa)
4 µl	dNTP Mixture (2,5 mM each) (TaKaRa)
1 µl	Ig 5'-leader primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Ig 3'-primer
0,25 µl	TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa)

Zur Aktivierung der Taq Polymerase wurde der Reaktionsansatz initial für 2 min bei 95 °C inkubiert. Die Denaturierung erfolgte pro Zyklus bei 94 °C für 30 s, die Primerhybridisierung bei 60 °C für 45 s und die Elongation bei 72 °C für 1 min. Nach insgesamt 40 Zyklen erfolgte eine abschließende Elongation bei 72 °C für 6 min.

Alle PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Jede PCR beinhaltete neben den cDNA-Proben der zu untersuchenden Mäuse jeweils eine Negativkontrolle (Nuclease-Free Water) sowie eine Positivkontrolle (Bestandteil des Mouse Ig Primer Sets). Je PCR wurden anfangs 2,5 µl Positivkontrolle einer Verdünnung von 1:100 verwendet, im Laufe des Projekts wurde zur Vermeidung unspezifischer PCR-Amplifikationsprodukte jeweils 2,5 µl einer 1:10000 Verdünnung verwendet.

Tabelle 1: Ig-Mouse Primer Set (Novagen) zur Amplifikation von IgM¹⁴

Spezies	Kette	Klasse	Summe an benötigten PCRs	5'-Primer	3'-Primer	erwartete Amplifikation der Positiv Kontrolle	Bezeichnung der PCR in Dissertation
MOUSE	schwer	IgM	6	MuIgV _H 5'-A	MuIgMV _H 3'-1	ja	IgM-A
				MuIgV _H 5'-B	MuIgMV _H 3'-1	nein*	IgM-B
				MuIgV _H 5'-C	MuIgMV _H 3'-1	nein*	IgM-C
				MuIgV _H 5'-D	MuIgMV _H 3'-1	nein*	IgM-D
				MuIgV _H 5'-E	MuIgMV _H 3'-1	ja	IgM-E
				MuIgV _H 5'-F	MuIgMV _H 3'-1	nein*	IgM-F

* Das Template der Positiv-Kontrolle wird bei einer PCR unter Verwendung dieser Primer-Kombination nicht amplifiziert. Jegliche beobachtete Amplifikation der Positiv-Kontrolle könnte entweder auf suboptimale PCR Bedingungen (z.B. sehr hohe PCR-Zyklusanzahl) oder auf eine Verunreinigung im Versuchsablauf zurückzuführen sein.

¹⁴ Tabelle gezeichnet nach Novagen® User Protocol TB326 Rev. C 0308, S.5

2.4. Klonierung der PCR-Produkte in E. coli

2.4.1. Gelelektrophorese zur Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Gelelektrophorese der PCR-Produkte wurden 200 ml einer 1:10 Verdünnung des UltraPure™ TBE Puffer (Gibco), 3 g Agarosepulver NEEO (Carl Roth) und 10 µl Midori Green (NIPPON Genetics) zu einem 1,5%igen Agarosegel gegossen. Für den Guss wurden ein Sub-Cell® GT Gel Caster, ein Sub-Cell® GT UV-Transparent Gel Tray (15 x 15 cm) und zwei Sub-Cell® GT 10-Well Combs der Dicke 1,5 mm (alles Produkte der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet.

Zu den PCR-Produkten wurde jeweils 10 µl Ladepuffer Orange G (Sigma-Aldrich) zugegeben und anschließend jede Geltasche mit 55 µl gepuffertem PCR-Produkt beladen. Alternativ wurden die Geltaschen mit 6 - 10 µl Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs GmbH) beladen.

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate im Agarosegel erfolgte in der Elektrophorese-Kammer Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH) unter einer Spannung von ca. 120 V für 60 min. Die Agarosegele wurden mithilfe des Geldokumentationssystems E-BOX VX2 2.0 MP der Firma peqlab analysiert und unter UV-Beleuchtung fotografiert.

2.4.2. DNA-Isolation aus Agarosegel

Mithilfe des UVsolo TS Gel Documentation System von Biometra wurden unter UV-Beleuchtung die Gelbanden der Größe ± 450 bp (Größenbestimmung erfolgte durch Vergleich mit Quick-Load® 100 bp DNA Ladder) aus dem Agarosegel mobilisiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Sammelgefäß überführt. Bei PCR-Reaktionen, bei denen laut Ig Primer Set ein Signal der Positivkontrolle zu erwarten war (vgl. Tabelle 1 auf S. 35, lag dieses in der Größenordnung um ca. 450 bp. Diese Beobachtung war ursächlich für die Isolation der Gelbanden der Größe ± 450 bp. Eventuell weiter auftretende Gelbanden, die jedoch deutlich different zu dieser Größenordnung waren, wurden als unspezifische PCR-Gelbanden betrachtet und verworfen.

DNA-Isolation aus Gelkissen

Zur Isolation der DNA aus den mobilisierten Agarose-Gelbanden wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega verwendet. Entsprechend dem Gewicht der Gelstücke wurden je 10 mg Gelgewicht 10 µl Membrane Binding Solution zugegeben. Anschließend wurde das Gelstück bei einer Temperatur von 50 – 60 °C geschmolzen. Zur Beschleunigung des Schmelzvorgangs wurden die Reaktionsansätze während der Inkubationsphase bei ca. 450 rpm geschüttelt und zusätzlich gevortext. Nach erfolgter Einschmelzung wurde das Schmelzprodukt zur Bindung der in der Suspension gelösten DNA auf eine Wizard® SV Minicolumn pipettiert, welche zuvor in ein 2 ml Collection Tube (siehe Kitangaben) gestellt worden war. Nach Zugabe des Schmelzprodukts auf die Wizard® SV Minicolumn erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für ca. 1 min und anschließend eine Zentrifugation bei 13.000 rpm. Maximal 700 µl des Schmelzprodukts wurden in einem Arbeitsschritt auf die Minicolumn überführt; bei einem Gesamtvolumen > 700 µl Schmelzprodukt erfolgten mehrere Pipettier- und Zentrifugationsschritte hintereinander, wobei immer dieselbe Wizard® SV Minicolumn je isolierter Gelbande verwendet wurde.

Die Wizard® SV Minicolumn wurde durch Zugabe von 700 µl Membrane Wash Solution gewaschen und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf im 2 ml Collection Tube wurde verworfen und der Waschvorgang mit 500 µl Membrane Wash Solution wiederholt. Die Zentrifugation erfolgte in diesem Fall für 5 min bei 13.000 rpm. Nach Verwurf des Durchlaufs im Collection Tube folgte zur vollständigen Alkoholverdunstung eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min bei geöffneter Zentrifugen-Schutzabdeckung. Anschließend wurde die Wizard® SV Minicolumn in ein 1,5 ml Eppendorf Sammelgefäß gestellt und die DNA in ca. 30 µl Nuclease-Free Water eluiert. Die Elution erfolgte nach Zugabe des Wassers auf die Wizard® SV Minicolumn nach einer Inkubationszeit von ca. 60 s durch eine abschließende Zentrifugation von 1 min bei 13.000 rpm. Der DNA-Gehalt im gewonnenen Elutionsvolumen wurde durch das Spektralphotometer NanoDrop™ 2000 der Firma Peqlab quantifiziert.

2.4.3. Klonierung in pCR™4-TOPO® Vektor (Invitrogen) und Transformation in E. coli

Die aufgereinigten PCR-Amplifikationen wurden in den pCR™4-TOPO® Vektor von Invitrogen™ Life Technologies kloniert und anschließend in kompetente Zellen (Bakterium E. coli) transformiert. Hierfür wurde das TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (K4575-J10) von Invitrogen™ Life Technologies verwendet; die Klonierung und Transformation erfolgte bis auf wenige Eigenmodifikationen nach Herstellerprotokoll.

Für die Klonierung wurden die verschiedenen PCR-Amplifikationen je Maus für die schwere Kette IgM gepoolt, wobei je vorhandenem PCR-Produkt MuIgVH5'-[A-F] / MuIgMVH3'-1 mengenmäßig 22,8 ng DNA verwendet wurden. Der DNA-Pool wurde nach Bedarf mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 6 µl aufgefüllt.

Klonierung in pCR™4-TOPO® Vektor

Für die Klonierung wurden folgende Substanzen in ein PCR-Mikrotube pipettiert und gemischt:

3 µl	DNA-Pool
1 µl	Salzlösung (Kitbestandteil)
1 µl	pCR™4-TOPO® Vektor (Kitbestandteil)
1 µl	nuklease freies Wasser

Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min, bevor das Klonierungsgemisch anschließend auf Eis gelagert wurde.

Transformation in TOPO 10 One Shot® Chemically Competent cells (Invitrogen)

Zur Transformation in Escherichia coli wurden TOPO 10 One Shot® Chemically Competent cells (Kitbestandteil) auf Eis aufgetaut und 2 µl des Klonierungsprodukts zugegeben. Nach Durchmischung wurden die Zellen für ca. 5 min auf Eis gelagert und anschließend im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach 30 s wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gelagert und 250 µl von SOC Medium zugegeben. Nach einstündiger

Inkubation bei 37 °C und 300 rpm im Eppendorf Thermomixer® comfort wurden jeweils 40 µl des Transformationsmix' auf vier vorgewärmten Agarplatten ausplattiert.

Die Agarplatten wurden im Vorfeld mit autoklaviertem LB-Medium inklusive 15 g/l Agar-Agar und 50 µg/ml Kanamycin in Zellkulturschalen gegossen. Die beimpften Agarplatten wurden für ca. 18 h bei 37 °C in einem mikrobiologischen Brutschrank inkubiert.

2.4.4. Plasmid-Isolation aus E.coli Kolonien

Kultivieren von Bakterien-Kolonien in LB-Medium

Nach Inkubation im mikrobiologischen Brutschrank wurden die Bakterienkolonien einzeln gepickt und in ca. 35 ml LB-Medium inklusive 50 µg/ml Kanamycin über Nacht in einem 50 ml Falcon® Röhrchen kultiviert (bei 37 °C im Tischorbitalschüttler MaxQ™ 4450 von Thermo Fisher Scientific Germany).

Plasmid-Präparation mit PureYield™ Plasmid Midiprep System

Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep Start-Up Kit 220V Electrical von Promega verwendet. Die Isolation erfolgte bis auf wenige Eigenmodifikationen nach Herstellerprotokoll. Alle Bearbeitungs- und Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die in LB-Medium kultivierten Bakterienkolonien wurden für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml Cell Resuspension Solution resuspendiert. Nach Zugabe von 3 ml Cell Lysis Solution und Durchmischen durch Inversion des 50 ml Falcon® Röhrchens erfolgte eine 3 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 5 ml Neutralization Solution zugegeben. Es folgte eine 45 minütige Zentrifugation bei 5000 x g.

Der Flüssigkeitsüberstand wurde nach Zentrifugation auf eine Pure Yield™ Clearing Column gegossen, welche zuvor auf eine Pure Yield™ Binding Column gesteckt und an einem der Ansaugstutzen der Vakuumpumpe von Promega befestigt wurde. Durch Vakuumerzeugung wurde die Flüssigkeit durch die Clearing und Binding Column gesaugt. Nach Verwurf der Pure Yield™ Clearing Column wurden 5 ml Endotoxin

Removal Wash Solution auf die Pure Yield™ Binding Column pipettiert und die Flüssigkeit erneut durch Vakuumerzeugung durch die Säule gesaugt. Es folgte ein Waschschrift mit 20 ml Column Wash Solution nach demselben Schema. Anschließend wurde die Pure Yield™ Binding Column durch Vakuumsog getrocknet und zur vollständigen Flüssigkeitsretention trocken getupft. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 400 µl Nuklease-freiem Wasser in ein 1,5 ml Eppendorf Sammelgefäß. Der DNA-Gehalt im Eluat wurde am Spektralphotometer NanoDrop™ 2000 gemessen.

2.5. Sequenzierung der hypervariablen Regionen des B-Zell-Rezeptors

2.5.1. Sequenzierung der präparierten Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA wurde als Dienstleistung durch 4base lab GmbH, Reutlingen durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte im Single Pass STANDARD (incl. Editing und ggf. Wiederholung) Modus, Stand 2015¹⁵. Die Ausgabe der Plasmidsequenzen erfolgte im AB1- und FASTA-Format.

2.5.2. Sequenzierung von DNA (isoliert aus Agarosegel) mittels Next-Generation-Sequencing

Die im Agarosegel gereinigten PCR-Produkte (siehe 2.4.1 dieser Arbeit) wurden durch das Biotechnologieunternehmen c.ATG, Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik Tübingen, nach folgenden Angaben sequenziert: Amplicon Sequencing with Nextera library on HiSeq. 2500 (Illumina), Paired End-Sequenzierung, 2 x 75 Cycles¹⁶. Das Processing der Rohdaten wurde in enger Absprache durch die Bioinformatik des c.ATG-Unternehmens durchgeführt.

¹⁵Single Pass STANDARD Modus nach Angaben von 4base lab GmbH: DNA-Sequenzierung nach Sanger (Kit: *BigDye v. 3.1*), Sequencer: *ABI3130xl*, Software für die Auswertung: *Sequence Analysis Software*, Gerät, Software und die Reagenzien: Produkte der Firma ThermoFisher ehemals Applied Biosystems.

¹⁶ nach Angaben von c.ATG: DNA Library Preparation: 5 ng/µl für Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina), 12 PCR Cyclen; Sequenzierung: mittels HiSeq 2500 (Illumina), Beladung der FlowCell mit 9 pM äquimolarer Librarypool, Paired End-Sequenzierung mit 2 x 75 Cycles.

2.6. DNA Sequenzanalyse der hypervariablen Regionen des B-Zell-Rezeptors

2.6.1. Analyse der Plasmid-Sequenzen mittels *IMGT/V-QUEST* (imgt)

Die Nukleotidsequenzen der Plasmide (vgl. Abschnitt 2.5.1 dieser Arbeit) wurden mit dem Online-Programm *IMGT/V-QUEST* des International Immunogenetics Information System® (<http://www.imgt.org>) analysiert, um das kodierte V-, D- und J-Gen einer jeden Sequenz zu bestimmen und Informationen über das jeweilige VDJ-Rearrangement zu erhalten. Das Alignment der Plasmid-Sequenzen an die *IMGT* Gendatenbank erfolgte mit der Programmversion *IMGT/V-QUEST* program version 3.3.6, *IMGT/V-QUEST* reference directory release 201613-2.

Als Parameter für die Sequenzanalyse wurden gewählt:

Species: *Mus musculus*
Receptor type or locus: *IG*
IMGT directory reference set: *F+ORF; with all alleles*
Search for insertions and deletions: *yes*
Parameters for *IMGT/JunctionAnalysis*: *default* [Voreinstellung für alle Wahlfelder belassen]

Folgende Einstellungen des Programms wurden für den Suchlauf und die gewünschten Alignments ergebnisse gewählt:

1. Summary
2. *IMGT*-gapped-nt-sequences
3. nt-sequences
4. *IMGT*-gapped-AA-sequences
5. AA-sequences
6. Junction
7. V-REGION-mutation-and-AA-change-table
8. V-REGION-nt-mutation-statistics
9. V-REGION-AA-change-statistics
10. V-REGION-mutation-hotspots
11. Parameters

Für die weitere Auswertung der Alignmentergebnisse (siehe Abschnitt 3.2 "Ergebnisse der Plasmid-Sequenz-Analyse" dieser Arbeit) wurden nur solche Plasmid-Sequenzen verwendet, die ein - durch das Alignmentergebnis bestätigtes - "productive"¹⁷ und damit expressionsfähiges VDJ-Rearrangement kodierten.

Zudem wurden alle Plasmid-Sequenzen ausgeschlossen, deren Alignment ergebnislos verlief, oder für die kein oder nur ein nicht eindeutiges V-, D- oder J-Gen bestimmt werden konnte. Ausgenommen hiervon waren Plasmide, deren Alignmentergebnis ein V- und J-Gen eindeutig identifizieren konnte, jedoch kein D-Gen bestimmen konnte. Diese Plasmid Sequenzen blieben in der Basis der weiteren Auswertung.

2.6.2. Analyse der Next-Generation-Sequencing-Ergebnisse mittels IMGT/HighV-Quest (imgt)

Die Sequenzanalyse der NGS-Ergebnisse erfolgte mit dem Online-Programm IMGT/HighV-Quest program version 1.5.1 des International Immunogenetics Information System® (<http://www.imgt.org>).

Als Parameter für die Sequenzanalyse wurden gewählt:

Species: *Mus musculus*
Receptor type or locus: *IGH*
Sequences are from a single individual: *yes*

Folgende Einstellungen des Programms wurden für den Suchlauf und die gewünschten Alignmentergebnisse gewählt:

Menüpunkt "B. Files in CSV":

1. Summary

¹⁷ Als *productive* wird ein expressionsfähiges Rearrangement bezeichnet, das ein funktionsfähiges Protein kodiert. Störungen auf verschiedenen Ebenen, wie beispielsweise durch die Umlagerung eines *non-sense* kodierenden Pseudogens oder durch bestimmte Insertionen bzw. Deletionen von Nukleotiden im Rahmen des somatischen Rekombinationsprozesses verursacht, können dazu führen, dass die kodierte Information der DNA-Sequenz verloren geht und kein funktionsfähiges Protein exprimiert werden kann.

Da in diesem Projekt die Struktur exprimierter, reifer BCR untersucht werden sollte, deren mRNA aus Splenozyten isoliert wurde, war davon auszugehen, dass die in Frage kommenden DNA-Sequenzen allesamt *productive* sein müssten. Alle *unproduktiven* Sequenzen wurden deshalb durch einen Filterschritt ausgeschlossen.

2. IMGT-gapped-nt-sequences
3. nt-sequences
4. IMGT-gapped-AA-sequences
5. AA-sequences
6. Junction
7. V-REGION-mutation-and-AA-change-table
8. V-REGION-nt-mutation-statistics
9. V-REGION-AA-change-statistics
10. V-REGION-mutation-hotspots
11. Parameters

Menüpunkt "Advanced parameters":

Selection of IMGT reference directory set:	<i>F+ORF, with all alleles</i>
Search for insertions and deletions:	<i>yes</i>
Parameters for IMGT/JunctionAnalysis	<i>default</i> [Voreinstellung für alle Wahlfelder belassen]

Die Alignmentergebnisse wurden in einem ersten Schritt nach "productive"¹⁸ Alignments gefiltert. Darauf aufbauend wurden in zwei weiteren Filterschritten alle eindeutigen VDJ-Alignments bzw. eindeutigen V-Gene zur weiteren Auswertung herausgefiltert. Die zugehörigen Programmier-Skripte wurden in PHP erstellt.

¹⁸ vgl. Fußnote 17 auf S. 42

3. Ergebnisse

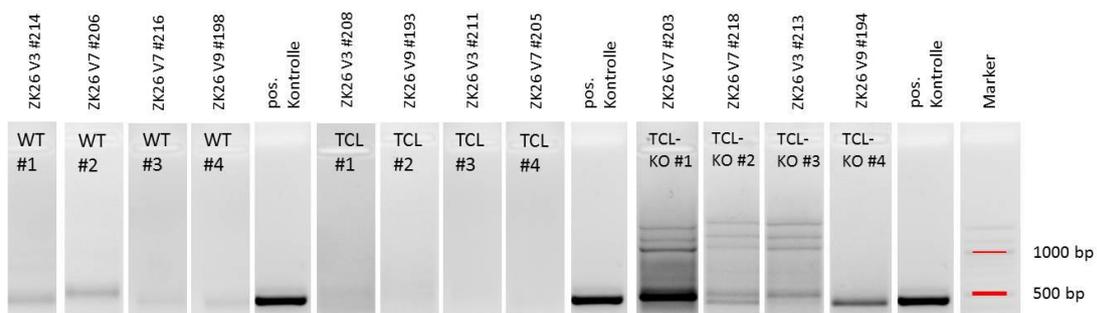
3.1. Etablierung der Methodik

3.1.1. Etablierung der Multiplex PCRs mit Ig-Mouse Primer Set (Novagen)

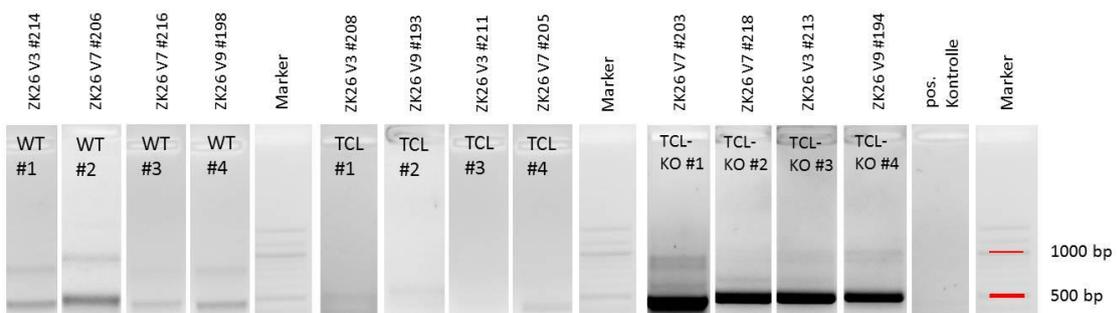
Wie im Abschnitt "Material und Methoden" dieser Arbeit beschrieben, wurden für jeweils vier Versuchsmäuse der Genotypen Wildtyp, TCL1 und TCL1-NFAT2k.o. aus Splenozyten RNA isoliert, die entsprechende cDNA synthetisiert und mittels des Ig-Mouse Primer Sets von Novagen die hypervariablen Regionen der schweren Kette IgM der BCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach Protokoll in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und das Muster der Gelbanden mit dem Geldokumentationssystem E-BOX VX2 2.0 MP unter UV-Beleuchtung fotografiert.

Im Folgenden sind die Gelbanden der untersuchten Tiere der PCRs "IgM A-F" dargestellt. Die entsprechenden Primer Kombinationen aus 5'- und 3'-Primer können der Tabelle 1 auf S. 35 entnommen werden.

IgM-A



IgM-B



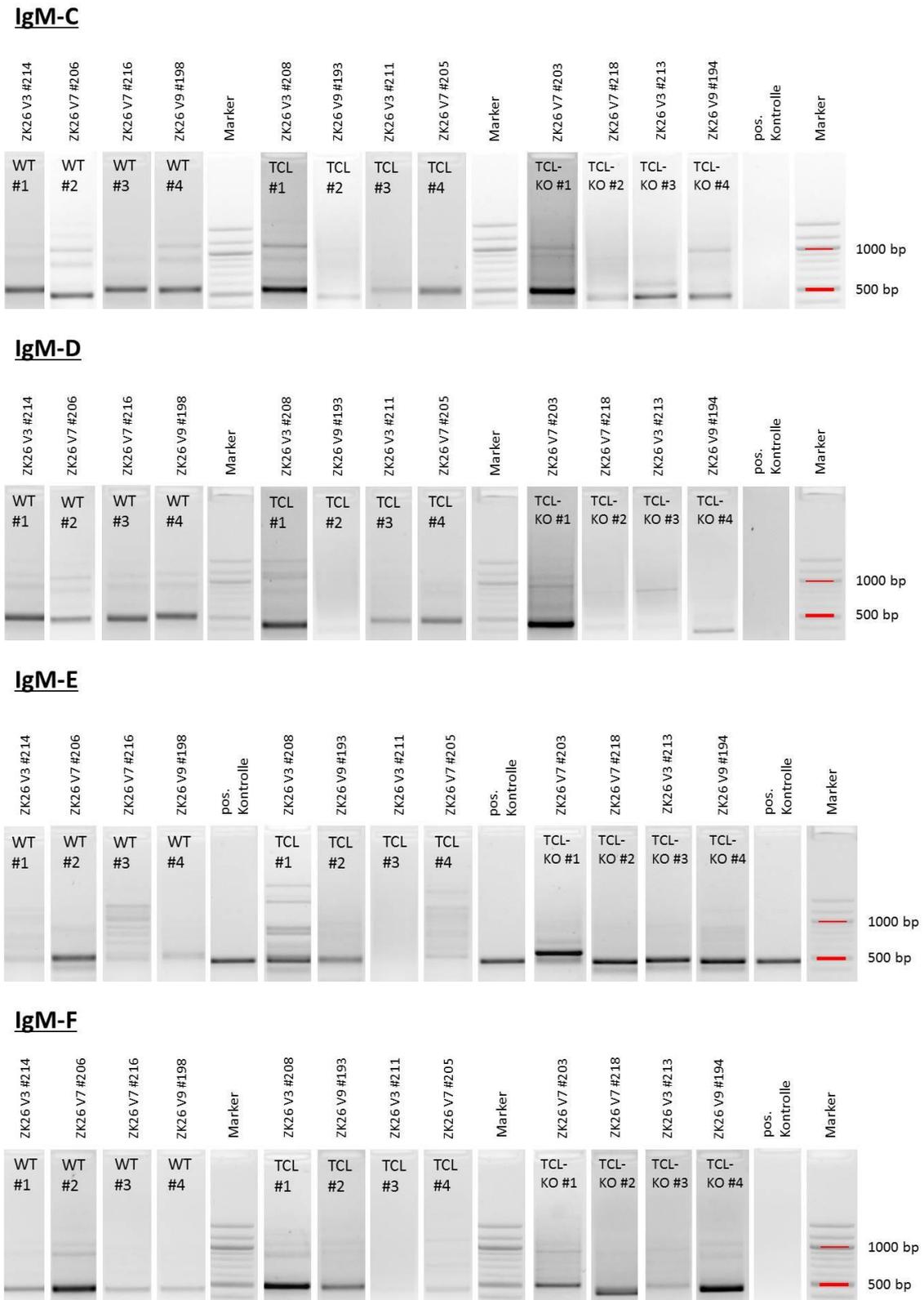


Abbildung 6: Gelbilder der PCR-Produkte "IgM-A bis IgM-F"

Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese im 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und das Muster der Gelbanden mit dem Geldokumentationssystem E-BOX VX2 2.0 MP unter UV-Beleuchtung fotografiert. Zur besseren Orientierung wurden die 500 bp und 1000 bp Banden im abschließenden

Muster des Markers gekennzeichnet und die einzelnen PCRs nach Genotypen getrennt. Den einzelnen Bildausschnitten liegen unterschiedliche Belichtungsverhältnisse zugrunde, weshalb in dieser Darstellung kein quantitativer Vergleich möglich ist. Vielmehr soll der Nachweis bzw. Nicht-Nachweis der PCR-Produkte für die verschiedenen Tiere veranschaulicht werden. Entsprechend den Herstellerinformationen des Ig-Mouse Primer Sets war bei den PCRs IgM-B/-C/-D und -F kein Signal der Positivkontrolle zu erwarten (vgl. Tabelle 1 auf S.35).

Das Bandenmuster der untersuchten Mäuse wurde in den Abbildungen nach ihrem Genotyp geordnet. Zur Skalierung der Banden wurde für IgM-A und IgM-E zwischen den Genotypen das Muster der Positivkontrolle und für IgM-B, IgM-C, IgM-D und IgM-F das Muster eines 100 bp Markers eingefügt. Zur Orientierung wurden im abschließenden Muster des Markers rechts einer jeden Zeile die 1000 bp und 500 bp Banden markiert.

Innerhalb eines Genotyps zeigte sich ein überwiegend einheitliches Bandenmuster. Den Positivkontrollen aus IgM-A und IgM-E war zu entnehmen, dass die erwarteten Gelbanden in einer Größenordnung von ungefähr 400 - 500 bp liegen würden. In manchen Fällen entsprachen alle Tiere eines Genotyps mit einheitlichem Bandenmuster dieser Erwartung (z.B. WT # 1-4 in IgM-F). Andere Gelbilder variierten hinsichtlich der Positionen der Banden im Agarosegel und lagen etwas näher oder entfernter von der markierten 500 bp Referenz-Marke (vgl. TCL-KO # 2 in IgM-F gegenüber den anderen TCL-KO-Tieren). In den meisten Fällen konnte jedoch eine "Hauptbande" im erwarteten Größenbereich von 400 bis 500 bp identifiziert werden. Die "Hauptbanden" der Größe \pm 400 - 500 bp wurden unter UV-Licht mobilisiert und die DNA isoliert (entsprechend Abschnitt 2.4.2).

Bei einigen Mäusen konnte in einzelnen PCRs keine oder nur sehr undeutliche Gelbanden generiert werden. Manchmal war eine DNA-Bande im Gelbild lediglich zu erahnen; trotzdem wurde eine Isolation der DNA aus dem Agarosegel versucht. Lag die Konzentration der DNA nach Isolation unter 10 ng/ μ l, so wurde die isolierte DNA als unspezifisches Isolat des PCR-Produkts aus dem Agarosegel bewertet.

In folgenden PCRs konnte keine "Hauptbande" amplifiziert werden bzw. wurde die isolierte DNA als unspezifisches Isolat verworfen:

TCL #1: IgM-A, IgM-B

TCL #2: IgM-A, IgM-B

TCL #3: IgM-A, IgM-B, IgM-E

TCL #4: IgM-A

Es zeichnete sich ab, dass bei Tieren der TCL1-Kohorte ohne NFAT2-Deletion gewisse PCRs zu keiner Amplifikation der hypervariablen Regionen des BCR führten. Bei allen untersuchten Mäusen der TCL1-Kohorte (TCL # 1-4) lieferten die PCRs "IgM-A" und - mit Ausnahme von TCL # 4 - auch die PCRs "IgM-B" kein Ergebnis. Bei TCL # 3 konnte zusätzlich für IgM-E keine DNA aus dem Agarosegel isoliert werden. Alle Mäuse der Kohorten Wildtyp und TCL1-NFAT2k.o. zeigten ein vollständiges Bandenmuster für die PCRs "IgM-A" bis "IgM-F".

3.1.2. Etablierung der Klonierung in pCR™4-TOPO® Vektor (invitrogen)

Die Klonierung und anschließende Plasmid-Sequenzierung, wie auch die NGS-Analyse (beschrieben in Kapitel 2.4 bis 2.6 dieser Arbeit) erfolgte an jeweils zwei Mäusen je Genotyp. Dafür wurden die Mäuse eines Genotyps ausgewählt, die die höchste Rate an CD5⁺ B-Lymphozyten bezogen auf die Gesamtmenge aller B-Lymphozyten in der untersuchten Milzprobe aufwiesen. Eine ausführliche Schilderung der Phänotypen von Wildtyp-, TCL1- und TCL1-NFAT2k.o.-Tieren findet sich auf S. 12 unter 1.4 "Darlegung des Phänotyps der untersuchten Mauslinien".

Bei folgenden Mäusen wurde die Klonierung, Plasmid-Sequenzierung und NGS-Analyse durchgeführt:

Tabelle 2: Mausliste - Projektübersicht

Übersicht über die Mäuse, bei denen die Klonierung, Plasmid-Sequenzierung und NGS-Analyse durchgeführt wurden, sowie deren Prozentwert an CD5⁺ B-Lymphozyten bezogen auf die Gesamtzahl aller B-Lymphozyten.

Genotyp	Maus-Bezeichnung	CD5⁺ B-Lymphozyten (in %)
<u>Wildtyp:</u>	WT # 1	8,8
	WT # 2	7,8
<u>Eμ-TCL1:</u>	TCL # 1	63,0
	TCL # 2	65,5

<u>TCL1-NFAT2k.o.:</u>	TCL-KO # 1	98,3
	TCL-KO # 2	92,0

Die isolierte DNA aus dem Agarosegel wurde wie in 2.4.3 dieser Arbeit beschrieben für jedes Tier gepoolt und in den pCRTM4-TOPO® Vektor (Invitrogen) kloniert. Die Transformation in kompetente E. coli-Bakterien sowie die Kultivierung einzelner Bakterienstämme mit anschließender Plasmid-Isolation erfolgte wie in 2.4.3 und 2.4.4 dieser Arbeit beschrieben.

3.2. Ergebnisse der Plasmid-Sequenz-Analyse

3.2.1. Klonalitätsmuster in den untersuchten Mauslinien

Die Plasmid-DNA-Sequenzen wurden nach in 2.6.1 skizzierten Schema analysiert. Die Auswertung beruht auf einer Basis von $n = 30$ für die Auswertung geeigneter Plasmid-DNA-Sequenzen je Maus, wobei im Vorfeld für die Auswertung ungeeignete Plasmid-DNA-Sequenzen aussortiert wurden (beispielsweise aufgrund eines nicht eindeutigen Alignment-Ergebnisses). Die untersuchten Plasmid-DNA-Sequenzen wurden in eine online-Gendatenbank eingestellt und können bei NCBI GenBank eingesehen werden (siehe Verweis im Anhang). Insgesamt war für die Generierung der Basis von besagten 30 auswertbaren Plasmid-DNA-Sequenzen ein Alignment von deutlich mehr als 30 Plasmid-Sequenzen je Maus nötig.

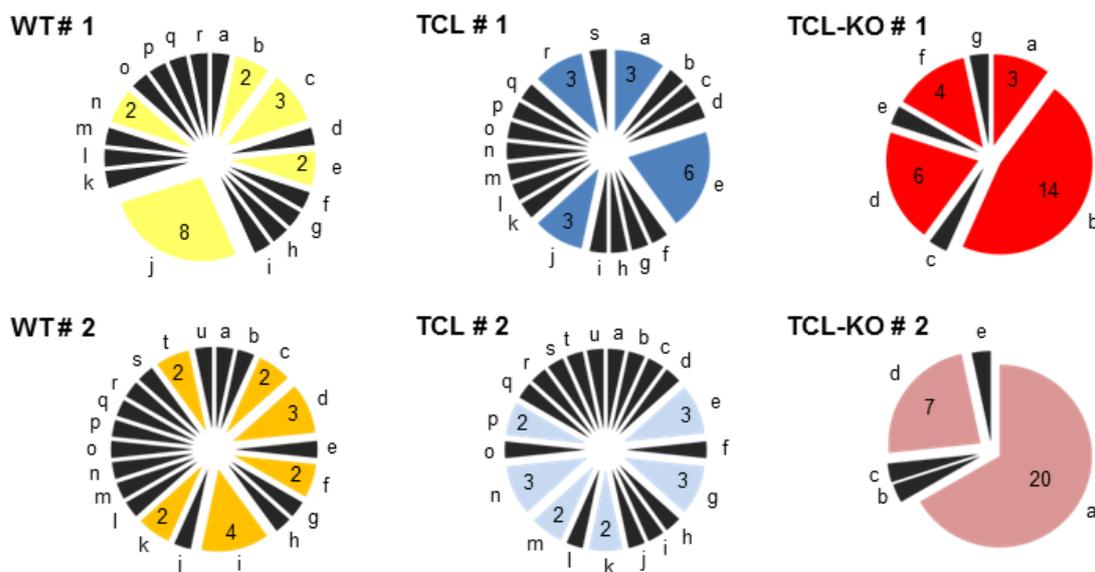
Die Ergebnisse dieser Auswertung sind wie folgt dargestellt:

Für jede Maus zeigt ein Kreisdiagramm die detektierten VDJ-Klone, die durch die Plasmid-Sequenz-Analyse mittels der IMGT-Datenbank identifiziert werden konnten. Die VDJ-Klone sind im Kreisdiagramm durch Buchstaben (a,b,c,d,...) kodiert, wobei jeder Buchstabe innerhalb einer Maus für das Vorkommen eines individuellen Klons steht.

Manche VDJ-Klone wurden je Maus mehrmals identifiziert. Im Diagramm sind die Kreisabschnitte solcher Klone farblich hinterlegt und die absolute Anzahl, mit der ein Klon in der untersuchten Basis von $n = 30$ DNA-Plasmid-Sequenzen gefunden wurde,

als Ziffer im Kreissegment notiert. Klone, die mit einer Häufigkeit von 1/30 detektiert wurden, sind durch ein schwarz gefärbtes Kreissegment gekennzeichnet.

Zusätzlich ist für jede Maus eine Tabelle abgedruckt, welche den Code des zugehörigen Säulendiagramms entschlüsselt. Unter jedem Buchstaben, der im Diagramm für einen individuellen Klon steht, ist in der zugehörigen Tabelle je Tier die Bezeichnung des genauen VDJ-Arrangements zu finden. Die Genbezeichnungen entsprechen hierbei den IMGT-Alignment-Ergebnissen, welche sich bezüglich ihrer Nomenklatur und der zugrunde liegenden Systematik am IMGT-ONTOLOGY 'CLASSIFICATION'-Konzept orientieren.[102]



¹⁹ **Abbildung 7: Plasmid-Sequenz-Analyse: VDJ-Klone und ihre absolute Anzahl**

Je Maus sind die detektierten VDJ-Klone und ihre absolute Anzahl nach Plasmid-Sequenz-Analyse ($n = 30$) dargestellt. Jeder Buchstabe kodiert je Maus einen eigenen VDJ-Klon, die zugrundeliegenden Genbezeichnungen sind den Tabellen der jeweiligen Tiere (siehe Tabelle 3 bis Tabelle 8) zu entnehmen. Für Klone, die mehr als einmal innerhalb einer Maus detektiert wurden, ist die absolute Detektionsanzahl im jeweiligen Kreisabschnitt notiert. Schwarz gefärbte Kreisabschnitte wurden mit einer Häufigkeit von 1/30 detektiert.

¹⁹ Abbildung 7 wurde bereits in folgender Publikation des Autors veröffentlicht: Müller, D.J., et al., *Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia*. J Leukoc Biol. 2019 Mar;105(3):531-538.

Klonalitätsmuster in Maus WT # 1

Tabelle 3: Genbezeichnung der VDJ-Klone für WT # 1

Klonbezeichnung	VDJ-Arrangement
a	Musmus IGHV1-9*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD4-1*01 F
b	Musmus IGHV1-26*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD1-1*02 F
c	Musmus IGHV1-53*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD2-3*01 F
d	Musmus IGHV1S29*02 F_Musmus IGHJ4*01 F_D?
e	Musmus IGHV1S81*02 [F]_Musmus IGHJ4*01 F_D?
f	Musmus IGHV2-9-1*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
g	Musmus IGHV3-1*02 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-2*01 F
h	Musmus IGHV3-8*02 F_Musmus IGHJ1*01 F_Musmus IGHD1-1*02 F
i	Musmus IGHV3-8*02 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD3-2*01 F
j	Musmus IGHV5-4*02 F_Musmus IGHJ1*01 F_Musmus IGHD2-4*01 F
k	Musmus IGHV5-6-3*01 F_Musmus IGHJ1*01 F_Musmus IGHD2-1*01 F
l	Musmus IGHV5-16*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-2*01 F
m	Musmus IGHV7-1*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_D?
n	Musmus IGHV7-1*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
o	Musmus IGHV7-3*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD4-1*01 F
p	Musmus IGHV8-12*01 F_Musmus IGHJ1*01 F_Musmus IGHD2-2*01 F
q	Musmus IGHV14-3*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-3*01 F
r	Musmus IGHV14-3*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F

Für WT # 1 wurden insgesamt 41 Plasmid-Sequenzen mit der IMGT-Datenbank abgeglichen, um die Basis von n = 30 auswertbaren Sequenzen zu erreichen. Für sieben Plasmide konnte kein Alignment-Ergebnis erzielt werden, weshalb diese Sequenzen aussortiert wurden. Zusätzlich war in zwei Fällen das V-Gen und in einem Fall das J-Gen nicht eindeutig bestimmbar, sodass diese Plasmid-Sequenzen für die Auswertung ebenfalls ausschieden, wie auch eine weitere Sequenz mit fehlendem J- und D-Alignment.

Unter den 30 auswertbaren Plasmid-Sequenzen war in vier Fällen (Klone d, e und m) kein D-Gen zu identifizieren. Für Klon e mit seiner VJ-Konstellation ohne identifiziertes D-Gen ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob die beiden Sequenzen tatsächlich dieselben VDJ-Arrangements sind. Dies wäre der Fall, wenn das nicht bestimmbare D-Gen für beide Klone dasselbe wäre. Bei 30 ausgewerteten Plasmid-Sequenzen wären dann insgesamt 18 unterschiedliche VDJ-Klone für WT # 1 registriert worden. Sollte das D-Gen der beiden Klone e jedoch unterschiedlich sein, so wären 19 unterschiedliche VDJ-Klone festzuhalten.

Die Klone b, e und n wurden mit einer absoluten Anzahl von 2/30 Plasmid-Sequenzen registriert. Klon c wurde insgesamt 3-mal identifiziert und am häufigsten wurde Klon j mit einer Quote von 8/30 erfasst.

Klonalitätsmuster in Maus WT # 2

Tabelle 4: Genbezeichnung der VDJ-Klone für WT # 2

Klonbezeichnung	VDJ-Arrangement
a	Musmus IGHV1-9*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
b	Musmus IGHV1-9*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
c	Musmus IGHV1-9*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD3-1*01 F
d	Musmus IGHV1-53*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD2-3*01 F
e	Musmus IGHV1-53*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD2-1*01 F
f	Musmus IGHV1-85*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
g	Musmus IGHV2-9-1*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
h	Musmus IGHV5-2*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD2-5*01 F
i	Musmus IGHV5-4*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD2-1*01 F
j	Musmus IGHV5-4*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
k	Musmus IGHV5-4*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-10*01 F
l	Musmus IGHV5-4*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
m	Musmus IGHV5-4*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-2*01 F
n	Musmus IGHV5-12*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD2-3*01 F
o	Musmus IGHV7-3*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-2*01 F
p	Musmus IGHV7-3*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_D?
q	Musmus IGHV7-3*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-1*01 F
r	Musmus IGHV9-3*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD2-10*02 F
s	Musmus IGHV9-3*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
t	Musmus IGHV10-3*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD3-3*01 F
u	Musmus IGHV10-3*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-4*01 F

Für die Basis von n = 30 auswertbaren Sequenzen war bei WT # 2 das Alignment von 43 Plasmid-Sequenzen notwendig. Für fünf Plasmide konnte kein eindeutiges V-Gen bestimmt werden, sowie bei zweien kein J- und D-Gen. Für weitere vier Sequenzen konnte gar kein Alignment-Ergebnis erzielt werden und in zwei Fällen war das Alignment-Ergebnis "unproductive", sodass insgesamt 13 Plasmid-Sequenzen nicht für die Auswertung verwendet werden konnten.

Für Klon p war kein D-Gen zu identifizieren. Da jedoch die gefundenen V- und J-Gene (Musmus IGHV7-3*01 F und Musmus IGHJ3*01 F) in gleicher Konstellation im Klon q auftauchen, ist Klon p nicht mit Sicherheit von Klon q abzugrenzen. Sollte Klon p über dasselbe D-Gen wie Klon q verfügen, so wären von 30 ausgewerteten Plasmid-Sequenzen 20 unterschiedliche VDJ-Klone gefunden worden. Sind die D-Gene jedoch nicht identisch, so liegt die Anzahl an unterschiedlichen VDJ-Klonen für WT # 2 bei 21.

Die Klone c, f, k und t wurden mit einer absoluten Anzahl von 2/30 Plasmid-Sequenzen registriert. Klon d wurde mit einer Häufigkeit von 3/30 identifiziert und Klon i mit einer Häufigkeit von 4/30 Plasmid Sequenzen.

Klonalitätsmuster in Maus TCL # 1

Tabelle 5: Genbezeichnung der VDJ-Klone für TCL # 1

Klonbezeichnung	VDJ-Arrangement
a	Musmus IGHV1-55*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-1*01 F
b	Musmus IGHV1S81*02 [F]_Musmus IGHJ2*01 F_D?
c	Musmus IGHV1S127*01 [F]_Musmus IGHJ1*01 F_D?
d	Musmus IGHV2-9*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-4*01 F
e	Musmus IGHV3-2*02 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-2*01 F
f	Musmus IGHV3-8*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD2-13*01 F
g	Musmus IGHV4-1*02 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD4-1*01 F
h	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD3-3*01 F
i	Musmus IGHV5-17*02 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
j	Musmus IGHV7-3*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-14*01 F
k	Musmus IGHV7-3*02 F_Musmus IGHJ1*01 F_Musmus IGHD1-2*01 F
l	Musmus IGHV7-3*02 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-1*01 F
m	Musmus IGHV7-3*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
n	Musmus IGHV7-3*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD1-2*01 F
o	Musmus IGHV7-3*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-12*01 F
p	Musmus IGHV7-3*02 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD4-1*01 F
q	Musmus IGHV9-3-1*01 F_Musmus IGHJ1*01 F_Musmus IGHD1-2*01 F
r	Musmus IGHV14-2*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-2*01 F
s	Musmus IGHV14-3*02 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-1*01 F

Bei TCL # 1 war das Alignment von vier Plasmid-Sequenzen ergebnislos und in zwei Fällen war das Alignment-Ergebnis "unproductive". Somit wurden 36 Plasmide eingesetzt um 30 auswertbare Plasmid-Sequenzen zu erreichen. Von diesen 30 Plasmid-Sequenzen konnte für zwei Sequenzen kein D-Gen bestimmt werden (Klone b und c). Da beide Klone aufgrund ihrer V-J Konstellation eindeutig voneinander und auch von allen anderen bestimmten VDJ-Klonen abzugrenzen waren, beträgt die Anzahl an unterschiedlichen VDJ-Klonen für TCL # 1 bei n = 30 ausgewerteten Plasmid-Sequenzen 19 differente VDJ-Klone.

Klon a, j und r wurden mit einer Häufigkeit von 3/30 registriert; Klon e wurde als häufigster VDJ-Klon von TCL # 1 insgesamt sechs Mal unter beschriebenen 30 Plasmid-Sequenzen detektiert.

Klonalitätsmuster in Maus TCL # 2

Tabelle 6: Genbezeichnung der VDJ-Klone für TCL # 2

Klonbezeichnung	VDJ-Arrangement
a	Musmus IGHV1-53*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD2-4*01 F
b	Musmus IGHV1-53*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-14*01 F
c	Musmus IGHV1-55*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
d	Musmus IGHV1-69*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD4-1*01 F
e	Musmus IGHV1-74*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD3-1*01 F
f	Musmus IGHV1-72*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-5*01 F
g	Musmus IGHV3-1*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*02 F
h	Musmus IGHV4-1*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-14*01 F
i	Musmus IGHV4-1*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-4*01 F
j	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
k	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*02 F
l	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-3*01 F
m	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD2-4*01 F
n	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
o	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-3*01 F
p	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
q	Musmus IGHV5-17*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD2-10*02 F
r	Musmus IGHV9-1*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD2-2*01 F
s	Musmus IGHV9-3*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
t	Musmus IGHV14-1*01 F_Musmus IGHJ3*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
u	Musmus IGHV14-2*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F

Für TCL # 2 wurden 38 Plasmide eingesetzt: für vier Sequenzen verlief das Alignment ergebnislos und für weitere vier Sequenzen war das Ergebnis "unproductive". Unter den verbleibenden 30 auswertbaren Plasmid-Sequenzen konnten 21 unterschiedliche, vollständige VDJ-Klone identifiziert werden. Drei Klone (k, m und p) wurden mit einer Häufigkeit von 2/30 registriert, und weitere drei Klone (e, g und n) mit einer Häufigkeit von 3/30.

Klonalitätsmuster in Maus TCL-KO # 1

Tabelle 7: Genbezeichnung der VDJ- Klone für TCL-KO # 1

Klonbezeichnung	VDJ-Arrangement
a	Musmus IGHV1-55*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
b	Musmus IGHV1-81*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
c	Musmus IGHV3-8*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
d	Musmus IGHV5-4*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
e	Musmus IGHV6-6*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
f	Musmus IGHV7-3*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD4-1*01 F
g	Musmus IGHV14-3*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F

In Maus TCL-KO # 1 verliefen zwei Alignments ergebnislos und eine weitere Plasmid-Sequenz stellte sich als "unproductive" heraus. Somit wurden insgesamt 33 Plasmid-Sequenzen für die erforderliche Basis von 30 auswertbaren Plasmid-Sequenzen eingesetzt. Dabei wurden sieben unterschiedliche VDJ-Klone detektiert. Mit Klon b konnte ein dominanter Hauptklon identifiziert werden, der sich mit einer Häufigkeit von 14/30 deutlich von Klon d (6/30), Klon f (4/30) und Klon a (3/30) abhob. Die Klone c, e und g wurden jeweils einmal identifiziert.

Klonalitätsmuster in Maus TCL-KO # 2

Tabelle 8: Genbezeichnung der VDJ-Klone für TCL-KO # 2

Klonbezeichnung	VDJ-Arrangement
a	Musmus IGHV1-55*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
b	Musmus IGHV5-4*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
c	Musmus IGHV5-12*01 F_Musmus IGHJ2*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F
d	Musmus IGHV5-16*01 F_Musmus IGHJ1*03 F_Musmus IGHD1-1*01 F
e	Musmus IGHV6-6*01 F_Musmus IGHJ4*01 F_Musmus IGHD1-1*01 F

Für TCL-KO # 2 führte das Alignment von vier Plasmid-Sequenzen zu keinem Ergebnis. Für die geforderte Basis von n = 30 auswertbaren Plasmid-Sequenzen wurden deshalb insgesamt 34 Plasmid-Sequenzen eingesetzt. Es wurden fünf unterschiedliche VDJ-Klone gefunden, von denen die Klone b, c und e jeweils einmalig registriert wurden. Klon d trat mit einer Häufigkeit von 7/30 auf und Klon a wies eine stark erhöhte proportionale Häufigkeit von 20/30 auf.

Die Analyse des Klonalitätsmusters der exprimierten BCR in den drei Mauslinien ergab, dass hinsichtlich der Variabilität der detektierten Klone (Anzahl an

unterschiedlichen VDJ-Rekombinationen) und ihrer Häufigkeit (absolute Anzahl eines VDJ-Klons, mit der er innerhalb der 30 untersuchten Plasmid-Sequenzen detektiert wurde) zwischen der WT- und der TCL1-Kohorte ohne NFAT2-Deletion im Alter von sieben Monaten kein wesentlicher Unterschied festzustellen war. Beide Kohorten wiesen ein relativ breites Spektrum an unterschiedlichen VDJ-Klonen auf, von denen manche Klone im Gegensatz zu anderen mehrmals detektiert wurden. In Mäusen der TCL1-Kohorte mit NFAT2-Knockout zeigte sich hingegen ein deutlich eingeschränktes Klonalitätsmuster mit dominanten Hauptklonen.

3.2.2. Mutationsgrad der detektierten IGVH-Gene

Durch das Alignment der Plasmid-Sequenzen mittels dem IMGT/V-QUEST online tool (vgl. 2.6.1 in dieser Arbeit) konnte für jede Plasmid-Sequenz der Mutationsgrad des IGVH-Gens gegenüber der jeweiligen Keimbahn-Referenzsequenz bestimmt werden. Jedes IGVH-Gen, das in mindestens einer Nukleotidposition gegenüber der Referenzsequenz der IMGT-Datenbank variierte, wurde in dieser Auswertung als "mutiert" definiert. Abbildung 8 zeigt den prozentualen Anteil an mutierten IGVH-Genen bezogen auf die ausgewerteten n = 30 Plasmid-Sequenzen je Maus und Genotyp.

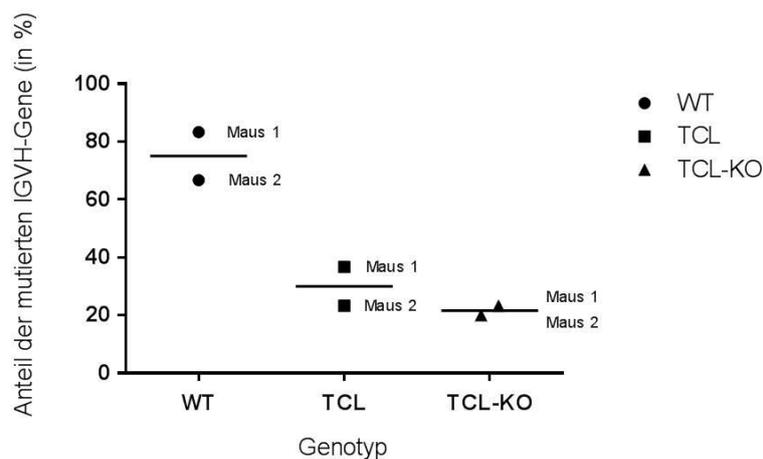


Abbildung 8: Mutierte IGVH-Gene je Genotyp (Plasmid-Sequenz-Analyse)

Darstellung des prozentualen Anteils an mutierten IGVH-Genen bezogen auf n = 30 ausgewerteten Plasmid-Sequenzen je Maus und Genotyp. Jedes IGVH-Gen, das in mindestens einer Nukleotidposition gegenüber der Referenzsequenz variierte, wurde als "mutiert" definiert.

In WT # 1 zeigten 25 der 30 untersuchten IGVH-Gene mindestens eine Variation gegenüber der Keimbahn-Referenzsequenz, was einem Prozentwert von 83,3 % entspricht. In WT # 2 waren 20 von 30 IGVH-Genen mutiert, was einem Prozentwert von 66,7 % entspricht. In der TCL1-Kohorte ohne NFAT2-Knockout zeigten sich deutlich weniger IGVH-Gene mutiert. So lag in Maus TCL # 1 der Anteil an mutierten IGVH-Genen bei 36,7 % (11/30) und in Maus TCL # 2 bei 23,3 % (7/30).

Auch die beiden TCL1-NFAT2k.o.-Mäuse zeigten überwiegend nicht-mutierte IGVH-Gene: In TCL-KO # 1 waren lediglich 7/30 IGVH-Gene mutiert (entspricht 23,3 %) und in TCL-KO # 2 mit 6/30 Genen nur 20,0 % aller IGVH-Gene.

Für eine weiterführende differenzierte Betrachtung des Mutationsstatus der einzelnen Plasmid-Sequenzen wurden die einzelnen Sequenzen je Maus anhand ihres Mutationsgrades in vier verschiedene Kategorien eingeteilt.

Die Kategorie "*truly unmutated*" umfasst alle Sequenzen, die keinerlei Nukleotid-Aberrationen aufweisen und somit zu 100% mit der Keimbahn-Referenzsequenz übereinstimmen. Die Kategorie "*minimally mutated*" beinhaltet alle Sequenzen, die nur sehr spärlich somatische Hypermutationen aufweisen und eine Übereinstimmung von 99 - 99,9 % mit der Keimbahn-Referenzsequenz zeigen. Als "*borderline mutated*" wurden alle Sequenzen definiert, deren Übereinstimmung mit der Referenzsequenz zwischen 98 und 98,9 % betrug, und als "*mutated*", diejenigen Sequenzen, welche zu einem Anteil von > 2 % mutiert waren (Übereinstimmung mit Referenzsequenz < 98 %).

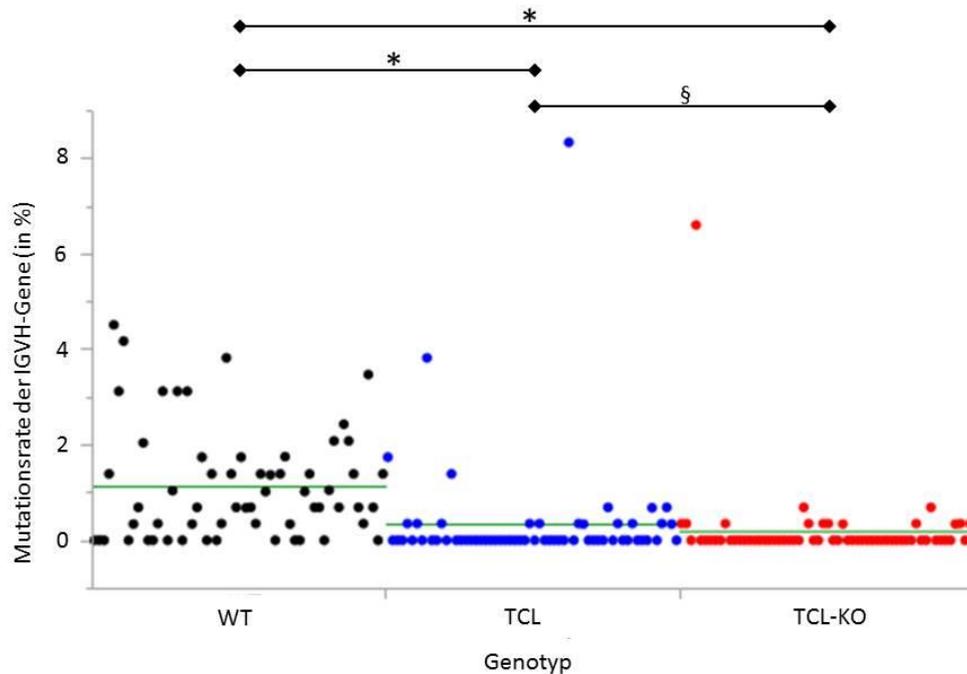
Tabelle 9: Statistik zu IGVH-Gen-Mutationsanalyse

Die Plasmid-Sequenzen je Maus wurden anhand ihres Mutationsgrades in vier verschiedene Kategorien eingeteilt: "truly unmutated" bedeutet eine Übereinstimmung mit der Referenz-Keimbahnsequenz zu 100 %, "minimally mutated" entspricht einer Übereinstimmung zu 99 - 99,9 %, "borderline mutated" zu 98 - 98,9 % und "mutated" < 98 %.

	WT # 1		WT # 2		arithm. Mittel	
	Anzahl Sequenzen	prozentualer Anteil	Anzahl Sequenzen	prozentualer Anteil	Anzahl Sequenzen	prozentualer Anteil
truly unmutated	5	16,7 %	10	33,3 %	7,5	25,0 %
minimally mutated	10	33,3 %	7	23,3 %	8,5	28,3 %
borderline mutated	11	36,7 %	5	16,7 %	8	26,7 %
mutated	4	13,3 %	8	26,7 %	6	20,0 %
TCL # 1						
	TCL # 1		TCL # 2		arithm. Mittel	
truly unmutated	19	63,3 %	23	76,7 %	21	70,0 %
minimally mutated	10	33,3 %	4	13,3 %	7	23,3 %
borderline mutated	0	0 %	2	6,7 %	1	3,3 %
mutated	1	3,3 %	1	3,3 %	1	3,3 %
TCL-KO # 1						
	TCL-KO # 1		TCL-KO # 2		arithm. Mittel	
truly unmutated	23	76,7 %	24	80,0 %	23,5	78,3 %
minimally mutated	7	23,3 %	5	16,7 %	6	20,0 %
borderline mutated	0	0 %	0	0 %	0	0 %
mutated	0	0 %	1	3,3 %	0,5	1,7 %

Das arithmetische Mittel des WT wies für alle Kategorien mit Ausnahme der *truly unmutated* Sequenzen den höchsten Wert auf. In Kategorie *truly unmutated* war der Wert des WT im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen am geringsten. Entgegengesetzt verhielt sich das arithmetische Mittel des TCL-KO-Modells. Hier lagen die IGVH-Gene mit 78,3 % in maximaler Häufigkeit *truly unmutated* vor, wogegen alle weiteren Mutationsgrade vergleichend zum WT- und TCL-Modell mit geringster Häufigkeit vorlagen.

Im TCL-Modell lagen die IGVH-Gene mit 70,0 % ebenfalls wie im TCL-KO-Modell überwiegend *truly unmutated* vor; auch die Anteile der IGVH-Gene an den Kategorien "*minimally mutated, borderline mutated*" und "*mutated*" waren entsprechend gering.



²⁰ **Abbildung 9: Mutationsstatus der IGVH-Gene**
 Darstellung des Mutationsgrades der IGVH-Gene bezogen auf $n = 60$ ausgewertete Plasmid-Sequenzen je Genotyp ($n = 30$ Sequenzen je Maus). MW, $*p < 0,0005$; $\S p = 0,4133$.

Abbildung 9 veranschaulicht die in Tabelle 9 dargelegte differenzierte Mutationsanalyse der untersuchten IGVH-Gene. Je Genotyp wurde für 60 untersuchte IGVH-Gene der jeweilige Mutationsgrad des IGVH-Gens als Punkt im Diagramm dargestellt (je Genotyp zwei Mäuse, $n = 30$ Plasmid-Sequenzen je Maus). Wie deutlich zu sehen ist, weisen im WT die meisten IGVH-Gene somatische Hypermutationen auf. Die Spannweite der Mutationsraten betrug 0 % bis 4,5 %, wobei die gemittelte Mutationsrate bei 1,1 % lag.

²⁰ Abbildung 9 wurde bereits in folgender Publikation des Autors veröffentlicht: Müller, D.J., et al., *Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia*. J Leukoc Biol. 2019 Mar;105(3):531-538.

In der TCL-Kohorte ohne NFAT2-Knockout zeigten sich die IGVH-Gene überwiegend unmutiert oder wiesen zumindest eine Mutationsrate $< 1\%$ auf. Lediglich bei vier Sequenzen war die Mutationsrate höher als 1% ; bei zwei Sequenzen variierte die Mutationsrate mit $3,8\%$ und $8,3\%$ ungewöhnlich stark im Vergleich zum übrigen Kollektiv. Der Mittelwert der Mutationsraten betrug $0,4\%$.

Im TCL-KO-Modell zeigten sich ähnliche Mutationsraten wie in der TCL-Kohorte. Eine Sequenz wies mit $6,6\%$ eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate auf, jedoch war im Allgemeinen die Neigung der IGVH-Gene hin zu vollständig nicht-mutiertem Status im Vergleich zur entsprechenden Keimbahn-Referenzsequenz weiter verstärkt, sodass die gemittelte Mutationsrate der IGVH-Gene bei nur $0,2\%$ lag.

Die Mutationsmittelwerte der Genotypen wurden mittels Welch-t-Test auf statistisch signifikante Ungleichheit geprüft. Sowohl der Vergleich der Mittelwerte zwischen WT- und TCL-Kohorte, als auch zwischen WT- und TCL-KO-Kohorte ergab statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,0004$ bzw. $p = 0,000002$). Der Vergleich zwischen TCL- und TCL-KO-Kohorte ergab indes keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,4133$). Eine Testung unter Berücksichtigung von Clustering auf Maus-Ebene (vgl. `t.test.cluster` in Harrell 2018 [103]) führte zu demselben Ergebnis.

3.3. Ergebnisse der NGS-Analyse

3.3.1. Rohdaten-Processing und Filterung der IMGT-Alignments

Die Rohdaten der Next-Generation-Sequenzierung wurden wie in 2.6.2 beschrieben analysiert und gefiltert. Durch die notwendigen Filterschritte wurde das ursprüngliche Volumen der Rohdaten auf eine solide Auswertungsbasis reduziert. Das ursprüngliche Datenvolumen der Rohdaten sowie die Datenvolumina nach den jeweiligen Filterschritten sind in Tabelle 10 auf S. 65 aufgeführt.

Vergleicht man die Werte einer Zeile, so fällt eine deutliche Reduktion des Datenvolumens von Filterschritt 1 zu Filterschritt 2 auf. Dies war bedingt durch die gewählte Leseweite von 2 x 75 bp der Pair-End Next-Generation-Sequenzierung bei einer Gesamtlänge der zu sequenzierenden DNA-Sequenz von ca. 400 bp. Es konnten für die weitere Auswertung nur jene Sequenzen verwendet werden, deren CDR3-Region durch die Sequenzier-Leseweite soweit abgedeckt wurde, dass die Identifikation einer eindeutigen VDJ-Rekombination möglich war (*unique VDJ-Alignments*). Alle Reads, deren CDR3-Region durch die Sequenzier-Leseweite nicht oder nur unvollständig abgedeckt wurde, wurden verworfen.

Die Anzahl der *unique VH-Gene-Alignments* (Spalte 6 in Tabelle 10) ist im Vergleich zur Anzahl der *unique VDJ-Alignments* höher, da hierbei das Kriterium lediglich in einem eindeutig alignierten IGVH-Gen bestand. Es konnten also zusätzlich zu den eindeutigen VDJ-Alignments alle Sequenzen eingeschlossen werden, bei denen die Abdeckung durch die Sequenzier-Leseweite für eine eindeutige Identifizierung des IGVH-Gens ausreichte, auch wenn die CDR3-Region nicht vollständig erfasst war.

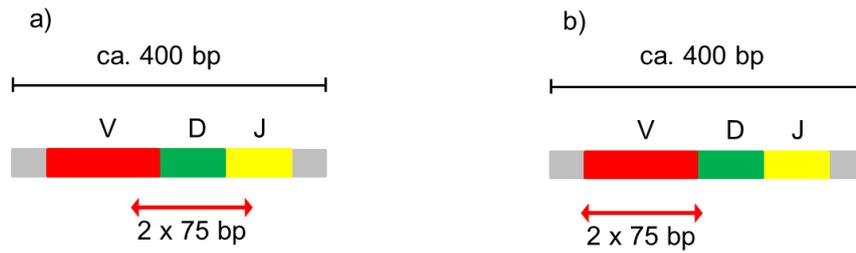


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Rohdaten-Processing bedingt durch die Leseweite von 2 x 75 bp der Pair-End Next-Generation-Sequenzierung

Gesamtlänge der zu sequenzierenden DNA-Sequenzen: ca. 400 bp; Leseweite der Pair-End Next-Generation-Sequenzierung: 2 x 75 bp; V D J: VDJ-Rekombinationssequenz inkl. CDR3-Region.

a) Zur Auswertung der VDJ-Rekombinationen wurden alle Sequenzen verwendet, deren CDR3-Region durch die Sequenzier-Leseweite für eine eindeutige VDJ-Rekombinations-Identifikation ausreichend abgedeckt war (unique VDJ-Alignments).

b) Für die Auswertung der IGVH-Gene (unique VH-Gene-Alignments) wurden zusätzlich zu allen eindeutigen VDJ-Alignments alle Sequenzen eingeschlossen, bei denen eine eindeutige Identifizierung des IGVH-Gens möglich war.

Tabelle 10: Übersicht über den Verlauf des Datenvolumens des NGS-Rohdatensatzes bis hin zur Auswertungsbasis

Die Rohdaten des NGS-Datensatzes wurden wie in 2.6.2 beschrieben prozessiert und gefiltert. Die Werte der einzelnen Spalten wurden in absoluter Anzahl angegeben. Vgl. zugehörige Legende auf Folgeseite.

Maus	PCR-Produkt	Reads	productive Alignments	unique VDJ-Alignments	unique VH-Gene-Alignments
WT # 1	IgM-A	726909	60492	9606	14403
	IgM-B	870879	72633	19157	24424
	IgM-C	1171043	93414	27511	37807
	IgM-D	1370241	134451	29504	48490
	IgM-E	1198884	79979	21298	28429
	IgM-F	1072092	181087	67370	88076
WT # 2	IgM-A	1180058	100653	9162	10770
	IgM-B	1077273	59273	19063	23837
	IgM-C	1154133	89976	33154	37793
	IgM-D	748710	92220	25255	38379
	IgM-E	1755203	103729	21507	25641
	IgM-F	951922	137974	61725	72777
TCL # 1	IgM-C	1052301	121160	45199	51508
	IgM-D	965253	122327	31855	41762
	IgM-E	1015843	75358	24709	30057
	IgM-F	887084	160360	32176	41267
TCL # 2	IgM-C	890068	92611	35600	42229
	IgM-D	848777	120597	34053	42319
	IgM-E	1189897	80463	18604	22921
	IgM-F	602500	108337	44453	53286
TCL-KO # 1	IgM-A	995794	137765	2078	2542
	IgM-B	410001	55805	15710	17519
	IgM-C	860555	99482	26856	33827
	IgM-D	673278	89469	45640	50850
	IgM-E	1000952	100080	9236	15580
	IgM-F	761690	99523	25720	29736
TCL-KO # 2	IgM-A	65	0	0	0
	IgM-B	1866648	158788	17465	24636
	IgM-C	885827	48412	17072	18744
	IgM-D	673357	66021	23343	31143
	IgM-E	1094417	115756	11497	16078
	IgM-F	1045597	197894	67946	70298

Legende zu Tabelle 10:

Für jede Maus ist zu jeder PCR (vgl. Absatz 2.3.3 dieser Arbeit) das ursprüngliche Rohdatenvolumen, die Datenvolumina im Verlauf der Filterung bis hin zum Datenvolumen der verbleibenden Auswertungsbasis aufgeführt. Die Werte sind in absoluter Anzahl angegeben.

Reads: absolute Anzahl an generierten Sequenzen nach NGS

productive Alignments: Anzahl an Sequenzen, deren IMGT-Alignment als "productive" gekennzeichnet war (1. Filterschritt)

unique VDJ-Alignments: Anzahl an Sequenzen, für die eine eindeutige VDJ-Rekombination bestimmt werden konnte (2. Filterschritt, erfolgte ausgehend von *productive Alignments*; vgl. 3.3.2 in dieser Arbeit)

unique VH-Gene-Alignments: Anzahl an Sequenzen, für die ein eindeutiges VH-Gen bestimmt werden konnte (alternativer 2. Filterschritt, erfolgte ausgehend von *productive Alignments*; vgl. 3.3.3 in dieser Arbeit)

Wie sich herausstellte, lieferte die Sequenzierung des PCR-Produkts "IgM-A" für Maus TCL-KO # 2 kein Ergebnis, obwohl eine messbare Konzentration an DNA im Eluat aus dem Agarosegel gewonnen werden konnte.

3.3.2. Klonalitätsmuster in den untersuchten Mauslinien

Für die weitere Auswertung und Datensichtung wurden die prozessierten PCR-Alignmentergebnisse (*unique VDJ-Alignments*; vgl. 3.3.1 in dieser Arbeit) je Maus zusammengefasst und jeder individuelle VDJ-Klon unter Beachtung der Häufigkeit, mit der er in der Basis der *unique VDJ-Alignments* vertreten war, erfasst. Um eine bessere Vergleichbarkeit hinsichtlich der Quantität der einzelnen Klone innerhalb einer Maus zu erzielen, wurde die absolute Anzahl je Klon durch ein Normalisierungsverfahren im Sinne einer FPKM²¹-Normalisierung in eine normalisierte Anzahl umgewandelt. Die entsprechende Formel lautet:

$$\text{Normalisierte Read-Counts für Verbindung } A = \frac{(\text{Anzahl Reads in Verbindung } A * 1000000)}{(\text{Gesamtzahl Reads der Probe} * \text{Gesamtlänge Verbindung } A)}$$

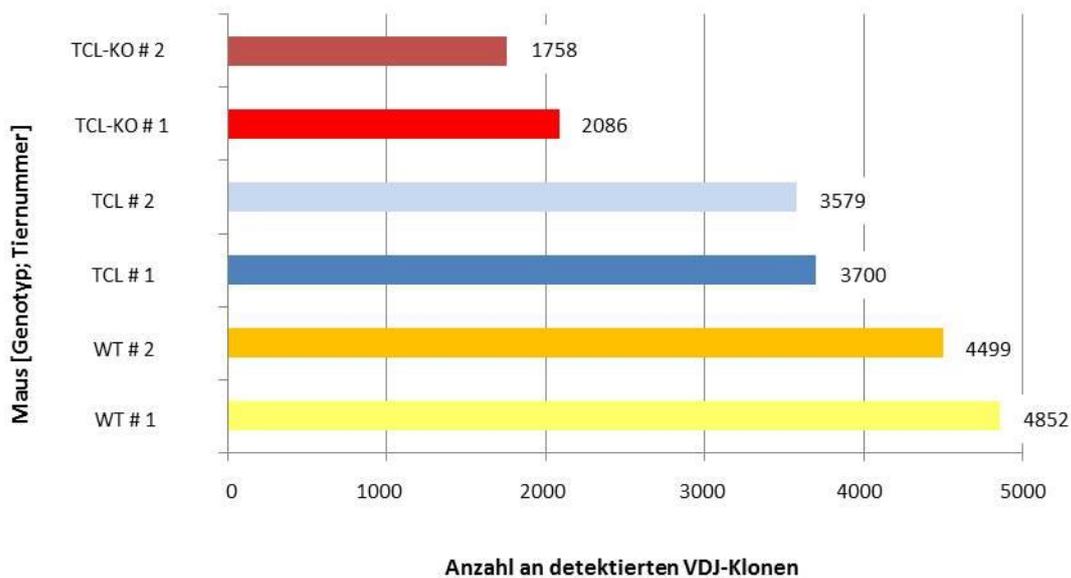
Letztlich wurde für jede Maus eine Liste an detektierten VDJ-Klonen unter Angabe ihrer absoluten Häufigkeit und eines normalisierten Prozentwertes des jeweiligen Klons

²¹ Um von der bloßen Anzahl an detektierten Sequenzier-Reads eines Gens auf die tatsächliche Expressionshöhe rückzuschließen, müssen entsprechende Normalisierungsalgorithmen angewendet werden. Die FPKM-Normalisierung (FPKM: *Fragments per Kilobase Million*) für Paired End-Sequenzierungen ist die abgewandelte Form der RPKM-Normalisierung (RPKM: *Reads per Kilobase Million*), die für Single Read-Sequenzierungen entwickelt wurde. 104. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods, 2008. 5(7): p. 621-8. 105. ran-seqblog. <https://www.rna-seqblog.com/rpkm-fpkm-and-tpm-clearly-explained/>. 2015 [cited 2018 08.12.2018].

an der Gesamtheit aller - innerhalb der jeweiligen Maus detektierten - VDJ-Klone erstellt.

3.3.2.1. Anzahl an detektierten VDJ-Klonen

In Abbildung 11 wurde je Maus die Anzahl an unterschiedlichen VDJ-Klonen, die durch die NGS-Analyse detektiert wurden, mittels Balkendiagramm dargestellt.



²² **Abbildung 11: Darstellung der Anzahl an unterschiedlichen VDJ-Klonen je untersuchter Maus**
Je Maus wurde die Anzahl an unterschiedlichen VDJ-Klonen registriert und im Balkendiagramm veranschaulicht.

In Maus WT # 1 wurden 4852 unterschiedliche VDJ-Klone identifiziert. In WT # 2 waren es 4499 unterschiedliche Klone. Bei der TCL-Kohorte lag die Anzahl an registrierten Klonen merklich geringer bei 3700 (TCL # 1) und 3579 (TCL # 2) unterschiedlichen VDJ-Klonen. Am deutlichsten war der Unterschied hinsichtlich der registrierten Klonanzahl in der TCL-KO-Kohorte ausgeprägt. So wurden in Maus TCL-KO # 1 insgesamt 2086 und in Maus TCL-KO # 2 nur 1758 verschiedene VDJ-Klone detektiert.

²² Abbildung 11 wurde bereits in folgender Publikation des Autors veröffentlicht: Müller, D.J., et al., *Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia*. J Leukoc Biol. 2019 Mar;105(3):531-538.

3.3.2.2. Quantität der detektierten VDJ-Klone

Zur Verdeutlichung der Quantität, mit der jeder einzelne VDJ-Klon erfasst wurde, ist in Abbildung 12 je Maus kumulativ der normalisierte Prozentwert eines jeden Klons im Säulendiagramm dargestellt.

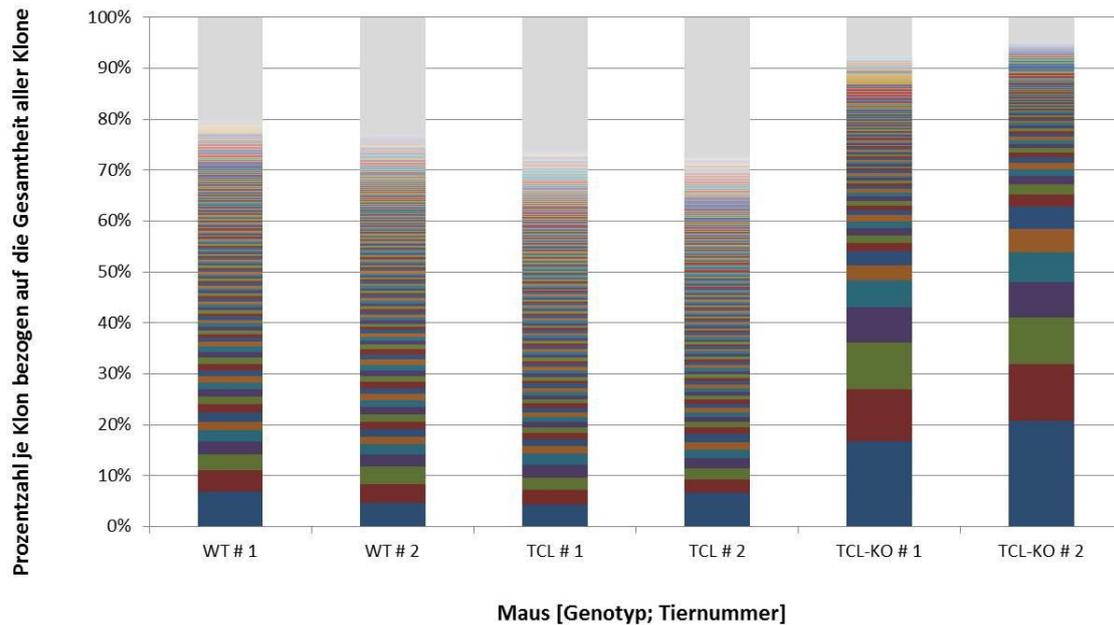


Abbildung 12: Kumulative prozentuale Darstellung der detektierten VDJ-Klone

Für jede Maus wurden kumulativ die Prozentwerte eines jeden Klons bezogen auf die Gesamtheit aller detektierten VDJ-Klone im Säulendiagramm dargestellt. Die Klone wurden nach der Größe ihres Prozentwertes in absteigender Reihenfolge geordnet, sodass sich Klone mit maximaler Häufigkeit an der Basis einer Säule befinden. Jeder Balken steht für jede Maus für einen individuellen Klon. Die 250 häufigsten Klone je Maus wurden als individuelle Balken dargestellt; die grau gefärbten Säulenabschnitte fassen alle weiteren Klone je Maus (Klone \geq # 251) mit geringer Häufigkeit zusammen.

Sowohl im WT als auch im TCL-Modell wurden einige VDJ-Klone registriert, die mit einer etwas erhöhten Häufigkeit gegenüber den übrigen Klonen auftraten. Insgesamt fiel die Häufigkeit der einzelnen Klone jedoch rasch auf ein homogenes niedriges Niveau ab.

Im TCL-KO-Modell zeigte sich demgegenüber ein deutlich differentes Bild. Im Gegensatz zur WT- und TCL-Kohorte wurden dominante VDJ-Klone identifiziert, die im Vergleich zu den übrigen Klonen mit einer stark erhöhten Häufigkeit erfasst wurden.

Um einen detaillierteren Eindruck über die Häufigkeitsverteilung der registrierten Klone inklusive der VDJ-Klone mit gesteigerter Häufigkeit zu vermitteln, sind in Tabelle 11 zur Übersicht die prozentualen Häufigkeiten der 20 häufigsten VDJ-Klone je Maus aufgelistet. Die VDJ-Klone wurden je Maus nach ihrer prozentualen Häufigkeit in absteigender Größe geordnet und durchnummeriert (vgl. Rangbezeichnung im Folgenden: der VDJ-Klon mit der höchsten prozentualen Häufigkeit belegt hierbei Rang 1).

Tabelle 11: Prozentuale Häufigkeit der 20 häufigsten VDJ-Klone

Für jede Maus sind die normalisierten Prozentwerte der 20 häufigsten Klone angegeben. Die Klone wurden der Häufigkeit nach in absteigender Größe geordnet. Rot hinterlegte Werte kennzeichnen den Rang, an welchem die prozentuale Häufigkeit der VDJ-Klone je Maus unter 2 % sank. Gelb hinterlegte Werte kennzeichnen den Rang, an welchem die prozentuale Häufigkeit der VDJ-Klone je Maus unter 1 % sank. Vgl. auch Tabelle 12.

top 20 VDJ-Klone	WT # 1	WT # 2	TCL # 1	TCL # 2	TCL-KO # 1	TCL-KO # 2
Rang 1	6,8529	4,5990	4,3533	6,6064	16,7443	20,7192
Rang 2	4,2353	3,7866	2,7938	2,6293	10,2002	11,1647
Rang 3	3,0519	3,5007	2,5039	2,2459	9,0924	9,1301
Rang 4	2,5774	2,3530	2,4930	1,9805	6,9815	6,9874
Rang 5	2,1701	1,9521	2,2300	1,5883	5,4267	5,9381
Rang 6	1,7562	1,5339	1,4515	1,5795	2,9380	4,5032
Rang 7	1,7062	1,4770	1,3807	1,5752	2,6301	4,3895
Rang 8	1,6359	1,4413	1,1319	1,2632	1,6651	2,3848
Rang 9	1,5421	1,4334	1,1275	1,1072	1,5552	2,0518
Rang 10	1,3657	1,4071	1,1261	0,9730	1,4605	1,6237
Rang 11	1,3260	1,3391	0,9399	0,8718	1,2620	1,2853
Rang 12	1,2413	1,2104	0,8849	0,8623	1,1580	1,2656
Rang 13	1,2298	1,1954	0,8818	0,8411	1,0213	1,0921
Rang 14	1,2133	1,1692	0,8774	0,8010	0,9035	0,9350
Rang 15	1,2123	1,1310	0,7908	0,7755	0,8902	0,8769
Rang 16	1,1935	1,1268	0,7733	0,7671	0,8897	0,7805
Rang 17	1,0206	1,0880	0,7680	0,7418	0,7986	0,7104
Rang 18	0,9279	1,0458	0,7547	0,6839	0,6040	0,6970
Rang 19	0,7745	1,0191	0,7481	0,6741	0,5726	0,6405
Rang 20	0,7557	0,9994	0,7013	0,6514	0,5572	0,5669

In Maus WT # 1 betrug die maximale Häufigkeit eines VDJ-Klons gerundet 6,9 %. In WT # 2 kam der meist registrierte Klon auf 4,6 %. Auch im TCL-Modell ohne NFAT2-Knockout lagen die maximalen Häufigkeiten in derselben Größenordnung (TCL # 1 mit 4,4 % und TCL # 2 mit 6,6 %). In beiden Kohorten wurde kein Klon mit der Häufigkeit eines zweistelligen Prozentwertes registriert. Demgegenüber wurden in beiden TCL-KO-Mäusen jeweils zwei VDJ-Klone erfasst, deren prozentuale Häufigkeit zum Teil deutlich mehr als 10 % betrug (vgl. Rang 1 und 2 von TCL-KO # 1 und TCL-KO # 2). Mit Rang 1 von TCL-KO # 2 wurde sogar ein VDJ-Klon mit einer prozentualen Häufigkeit von über 20 % (20,7 %) identifiziert.

Der eigentliche Unterschied bezüglich der Häufigkeitsverteilung der registrierten VDJ-Klone zwischen den verschiedenen Maus-Genotypen wird erst aus der Zusammenschau der prozentualen Häufigkeiten der einzelnen "Hauptklone" (Klone mit auffällig erhöhter Häufigkeit gegenüber den übrigen Klonen) und ihres gemeinsamen Anteils an der Gesamtheit aller VDJ-Klone je Maus ersichtlich. Dies soll mit Tabelle 12 verdeutlicht werden.

Tabelle 12: Gemeinsamer Anteil der Hauptklone an Gesamtheit aller VDJ-Klone

Für jede Maus ist der Rang desjenigen Klons angegeben, ab welchem fortfolgend die prozentuale Häufigkeit der Klone kleiner 1 bzw. 2 % beträgt sowie die Summe der Prozentwerte aller Klone, die mit einer Häufigkeit ≥ 1 bzw. ≥ 2 % registriert wurden. Vgl. untenstehende Legende.

Maus	Klon < 1 %	Summe "Klone ≥ 1 %"	Klon < 2 %	Summe "Klone ≥ 2 %"
WT # 1	Rang 18	35,3 %	Rang 6	18,9 %
WT # 2	Rang 20	33,8 %	Rang 5	14,2 %
TCL # 1	Rang 11	20,6 %	Rang 6	14,4 %
TCL # 2	Rang 10	20,6 %	Rang 4	11,5 %
TCL-KO #1	Rang 14	62,1 %	Rang 8	54,0 %
TCL-KO #2	Rang 14	72,5 %	Rang 10	67,3 %

Legende zu Tabelle 12:

Klon < 1 %: Rang des Klons, ab welchem fortfolgend die prozentuale Häufigkeit der individuellen Klone jeweils unter 1 % liegt.

Summe "Klone ≥ 1 %": Summe der Prozentwerte aller Klone, die mit einer Häufigkeit ≥ 1 % registriert wurden (entspricht dem Anteil der "Hauptklone ≥ 1 %" an Gesamtheit aller VDJ-Klone je Maus).

Klon < 2 %: Rang des Klons, ab welchem fortfolgend die prozentuale Häufigkeit der individuellen Klone jeweils unter 2 % liegt.

Summe "Klone ≥ 2 %": Summe der Prozentwerte aller Klone, die mit einer Häufigkeit ≥ 2 % registriert wurden (entspricht dem Anteil der "Hauptklone ≥ 2 %" an Gesamtheit aller VDJ-Klone je Maus).

In Tabelle 12 ist für jede Maus der Rang desjenigen Klons angegeben, ab welchem nachfolgend die prozentuale Häufigkeit aller weiteren Klone jeweils unter 1 % lag. Die Prozentwerte dieser Klone wurden in Tabelle 11 zusätzlich gelb hinterlegt. Um den gemeinsamen Anteil der Klone an der Gesamtheit aller VDJ-Klone je Maus zu erfassen, die mit einer Häufigkeit $\geq 1\%$ auftraten, wurde in Spalte 3 der Tabelle der Summenwert der Prozentwerte der einzelnen Klone gebildet.

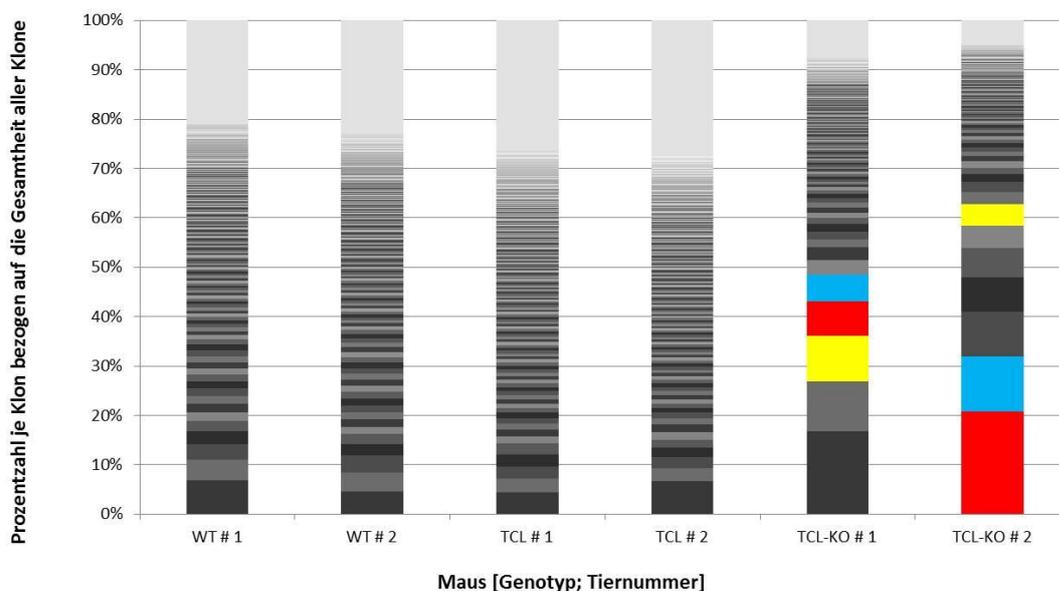
Der Tabelle ist zu entnehmen, dass im WT gemittelt 18 VDJ-Klone mit einer Häufigkeit $\geq 1\%$ erfasst wurden, die gemeinsam 34,6 % der Gesamtheit aller VDJ-Klone abdecken. Im TCL-Modell ohne NFAT2-Knockout traten gemittelt 9,5 VDJ-Klone mit einer Häufigkeit $\geq 1\%$ auf, deren gemeinsamer Anteil an identifizierten VDJ-Klonen 20,6 % beträgt. In der TCL-KO-Kohorte wurden für jedes Tier 13 VDJ-Klone erfasst, deren prozentuale Häufigkeit $\geq 1\%$ betrug. Der Anteil dieser 13 identifizierten Klone an der Gesamtheit aller registrierter VDJ-Klone je Maus stellte sich mit 62,1 % (TCL-KO # 1) und 72,5 % (TCL-KO # 2) bedeutend größer dar als in der WT- und TCL-Kohorte. Noch deutlicher wird dieser Unterschied bei der Auswertung aller Klone mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$. In Tabelle 12 sind analog zur Spalte zwei in Spalte vier der Rang derjenigen Klone aufgeführt, ab welchen nachfolgend die prozentuale Häufigkeit aller weiteren Klone jeweils unter 2 % lag (rot hinterlegte Werte in Tabelle 11). Analog zur Spalte drei sind in Spalte fünf die Summen der Prozentwerte der Klone "Häufigkeit $\geq 2\%$ " notiert. Es fällt auf, dass in der WT-Kohorte gemittelt lediglich 4,5 VDJ-Klone eine Häufigkeit $\geq 2\%$ aufwiesen, während es im TCL-Modell gemittelt 4 VDJ-Klone waren. Demgegenüber traten in Maus TCL-KO # 1 sieben Klone und in Maus TCL-KO # 2 neun verschiedene VDJ-Klone mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ auf.

Auch bezüglich des Anteils der Klone mit gesteigerter Häufigkeit an der Gesamtheit aller VDJ-Klone verdeutlicht die Auswertung der Klone mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ den Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen. Während der Anteil der Klone mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ an der Gesamtheit aller VDJ-Klone im WT gemittelt 16,6 % und im TCL-Modell 12,9 % betrug, stellte er sich im TCL-KO-Modell im Vergleich zum

WT mit 54,0 % um mehr als das Dreifache (TCL-KO # 1) bzw. mit 67,3 % um mehr als das Vierfache (TCL-KO #2) erhöht dar.

Zusammenfassend wurden in den sieben Monate alten TCL-KO-Mäusen dominante Hauptklone registriert, deren gemeinsamer Anteil mit über 50 % aller registrierten VDJ-Klone je Maus mehrheitlich ins Gewicht fielen. Im WT und TCL-Modell ohne NFAT2-Knockout wurden zwar ebenfalls einige Klone mit leicht erhöhter Häufigkeit gegenüber den übrigen VDJ-Klonen registriert, jedoch wurde der überwiegende Großteil aller VDJ-Klone je Maus durch Klone mit geringer Häufigkeit gebildet.

3.3.2.3. Identische VDJ-Rekombinationen unter identifizierten "Hauptklonen"



²³**Abbildung 13: Identische VDJ-Klone in Mäusen des TCL-KO-Modells**

Ausgehend von der kumulativen, prozentualen Darstellung der detektierten VDJ-Klone (vgl. Abbildung 12) wurden jeweils innerhalb eines Genotyps für die WT-, TCL- und TCL-KO-Kohorte alle Klone mit einer prozentualen Häufigkeit $\geq 2\%$ je Maus miteinander verglichen und identische Klone mit derselben Farbe markiert.

²³ Abbildung 13 wurde bereits in folgender Publikation des Autors veröffentlicht: Müller, D.J., et al., *Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia*. J Leukoc Biol. 2019 Mar;105(3):531-538.

In einem weiteren Schritt wurden alle Klone innerhalb eines Genotyps, die eine prozentuale Häufigkeit $\geq 2\%$ aufwiesen, vergleichend auf identische VDJ-Rekombinationen überprüft. Identische VDJ-Klone wurden in Abbildung 13 mit derselben Farbe markiert.

Tabelle 13: Übersicht über die Klone, die auf identische VDJ-Rekombinationen überprüft wurden
Gelistet sind alle Klone je Maus mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ unter Nennung ihrer exakten Genbezeichnung, ihres Rangs und der prozentualen Häufigkeit. Identische Klone sind farbig markiert.

Maus	VDJ-Klon	Rang	prozentuale Häufigkeit
WT # 1	IGHV6-6*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ2*01 F	1	6,8529
	IGHV5-17*01 F - IGHD1-1*02 F - IGHJ1*03 F	2	4,2353
	IGHV3-8*02 F - IGHD1-1*02 F - IGHJ1*01 F	3	3,0519
	IGHV6-6*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ4*01 F	4	2,5774
	IGHV5-4*02 F - IGHD2-4*01 F - IGHJ1*01 F	5	2,1701
WT # 2	IGHV1-53*01 F - IGHD2-3*01 F - IGHJ4*01 F	1	4,5990
	IGHV6-6*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ1*03 F	2	3,7866
	IGHV1-53*01 F - IGHD2-1*01 F - IGHJ4*01 F	3	3,5007
	IGHV5-17*01 F - IGHD2-3*01 F - IGHJ4*01 F	4	2,3530
TCL # 1	IGHV1-55*01 F - IGHD2-1*01 F - IGHJ2*01 F	1	4,3533
	IGHV1-55*01 F - IGHD2-2*01 F - IGHJ4*01 F	2	2,7938
	IGHV1S22*01 F - IGHD2-1*01 F - IGHJ2*01 F	3	2,5039
	IGHV3-2*02 F - IGHD1-2*01 F - IGHJ2*01 F	4	2,4930
	IGHV1S22*01 F - IGHD3-3*01 F - IGHJ2*01 F	5	2,2300
TCL # 2	IGHV6-6*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ2*01 F	1	6,6064
	IGHV3-8*01 F - IGHD3-2*02 F - IGHJ2*01 F	2	2,6293
	IGHV5-17*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ3*01 F	3	2,2459
TCL-KO # 1	IGHV1-81*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ4*01 F	1	16,7443
	IGHV8-2*01 ORF - IGHD1-1*01 F - IGHJ4*01 F	2	10,2002
	IGHV8-2*01 ORF - IGHD1-1*01 F - IGHJ1*03 F	3	9,0924
	IGHV1-55*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ1*03 F	4	6,9815
	IGHV1-55*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ4*01 F	5	5,4267
	IGHV6-6*01 F - IGHD4-1*01 F - IGHJ3*01 F	6	2,9380
	IGHV14-3*01 F - IGHD2-4*01 F - IGHJ2*01 F	7	2,6301
TCL-KO # 2	IGHV1-55*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ1*03 F	1	20,7192
	IGHV1-55*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ4*01 F	2	11,1647
	IGHV2-9-1*01 F - IGHD2-4*01 F - IGHJ4*01 F	3	9,1301
	IGHV8-8*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ1*03 F	4	6,9874
	IGHV6-6*01 F - IGHD1-1*02 F - IGHJ3*01 F	5	5,9381
	IGHV3-1*02 F - IGHD3-2*02 F - IGHJ2*01 F	6	4,5032
	IGHV8-2*01 ORF - IGHD1-1*01 F - IGHJ1*03 F	7	4,3895
	IGHV8-8*01 F - IGHD1-1*01 F - IGHJ4*01 F	8	2,3848
	IGHV3-2*02 F - IGHD3-2*02 F - IGHJ2*01 F	9	2,0518

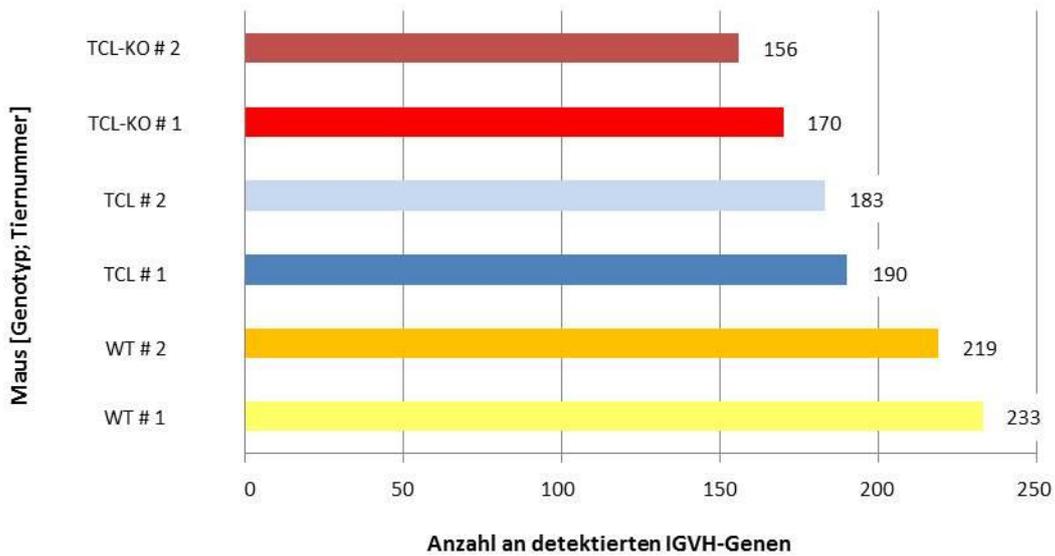
In Tabelle 13 sind für jede Maus die entsprechenden Klone, die für die Auswertung eingeschlossen wurden, unter Angabe der exakten Genbezeichnung, des Rangs und der prozentualen Häufigkeit aufgelistet. Während weder in der WT-Kohorte noch in der TCL-Kohorte identische VDJ-Rekombinationen unter den Klonen einer Häufigkeit $\geq 2\%$ identifiziert werden konnten, wurden in der TCL-KO-Kohorte drei identische VDJ-Rekombinationen unter den dominanten Hauptklonen entdeckt. Die Klone der Ränge 3, 4 und 5 von TCL-KO # 1 stimmen mit den Rängen 7, 1 und 2 von TCL-KO # 2 überein.

3.3.3. Häufigkeitsverteilung der detektierten IGVH-Gene

Neben der Analyse der *unique VDJ-Alignments* wurde im NGS-Datensatz im Folgenden speziell das Vorkommen der IGVH-Gene bestimmt. Dazu wurden wie für die Auswertung der *unique VDJ-Alignments* (vgl. Kapitel 3.3.2 dieser Arbeit) alle Sequenzen, deren Alignment ein eindeutiges IGVH-Gen identifizierte (*unique VH-Gene-Alignments*; vgl. 3.3.1 dieser Arbeit), je Maus zusammengefasst und jedes individuelle IGVH-Gen unter Beachtung der Häufigkeit, mit der es in der Basis der *unique VH-Gene-Alignments* vertreten war, erfasst. Analog zur Auswertung der *unique VDJ-Alignments* wurde für die IGVH-Gene ebenfalls eine FPKM-Normalisierung mit dem Ergebnis eines normalisierten Prozentwertes je IGVH-Gen zur besseren quantitativen Vergleichbarkeit durchgeführt.

3.3.3.1. Anzahl an registrierten IGVH-Genen

In Abbildung 14 wurde die Anzahl an unterschiedlichen IGVH-Genen je untersuchter Maus in einem Balkendiagramm dargestellt. Tabelle 14 zeigt ergänzend zur Anzahl an detektierten IGVH-Genen je Maus das arithmetische Mittel des jeweiligen Genotyps. Mit durchschnittlich 226 differenten IGVH-Genen je Maus konnte im WT das breiteste IGVH-Gen-Spektrum nachgewiesen werden. Im TCL-Modell war das IGVH-Gen-Repertoire mit durchschnittliche 186,5 IGVH-Genen je Maus um 17,5 % im Vergleich zum WT vermindert. In der TCL-KO-Kohorte wurde mit durchschnittlich 163 IGVH-Genen die geringste Anzahl an IGVH-Genen je Maus erfasst; das IGVH-Gen-Repertoire war vergleichend zum WT um 27,9 % vermindert.



²⁴ **Abbildung 14: Darstellung der Anzahl an unterschiedlichen IGVH-Genen je untersuchter Maus**
Je Maus wurde die Anzahl an unterschiedlichen IGVH-Genen registriert und im Balkendiagramm veranschaulicht.

Tabelle 14: Detektierte Anzahl an unterschiedlichen IGVH-Genen je Maus

Gelistet ist die Anzahl der registrierten IGVH-Gene je Maus sowie das arithmetische Mittel für jeden Genotyp. Darauf aufbauend ist für jeden Genotyp das IGVH-Gen-Repertoire im Vergleich zum WT angegeben.

Genotyp	Maus	IGVH-Gene	arithm. Mittel	IGVH-Gen-Repertoire im Vgl. zum WT
WT	# 1	233	226	100 %
	# 2	219		
TCL	# 1	190	186,5	82,5 %
	# 2	183		
TCL-KO	# 1	170	163	72,1 %
	# 2	156		

²⁴ *Abbildung 14 wurde bereits in folgender Publikation des Autors veröffentlicht: Müller, D.J., et al., Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. J Leukoc Biol. 2019 Mar;105(3):531-538.*

3.3.3.2. Quantität der detektierten IGVH-Gene

Um die Quantität der einzelnen IGVH-Gene je Maus darzustellen, zeigt das folgende Säulendiagramm (Abbildung 15) kumulativ die normalisierten Prozentwerte der IGVH-Gene je Maus.

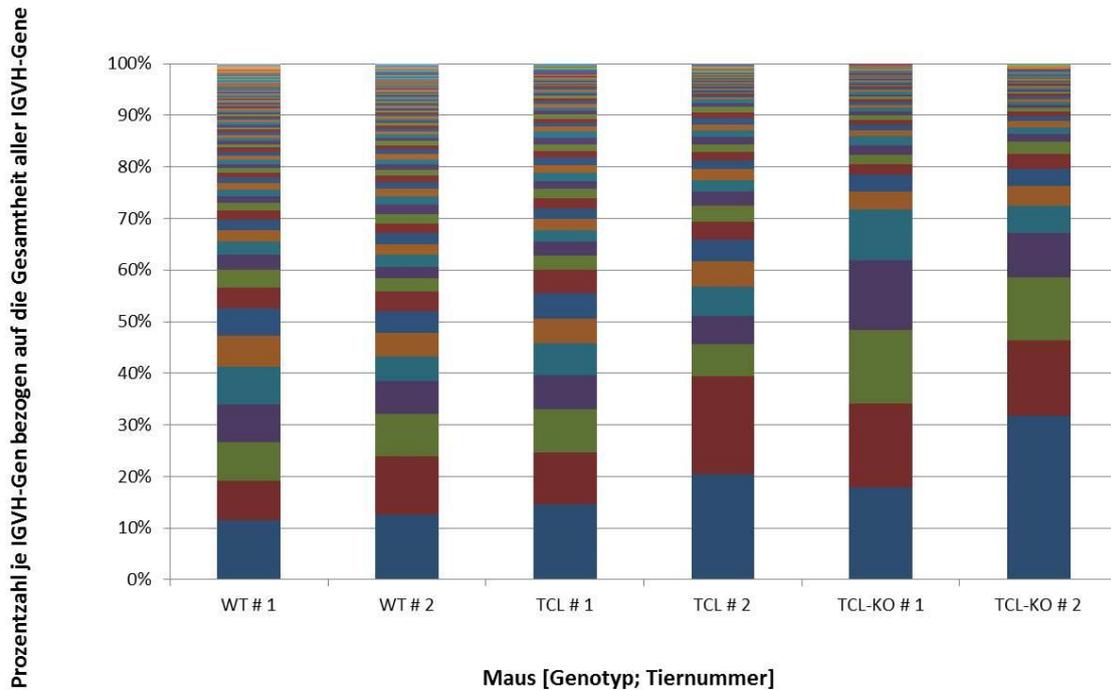


Abbildung 15: Kumulative prozentuale Darstellung der detektierten IGVH-Gene

Für jede Maus wurden kumulativ die Prozentwerte eines jeden IGVH-Gens bezogen auf die Gesamtheit aller detektierten IGVH-Gene im Säulendiagramm dargestellt. Die Gene wurden nach der Größe ihres Prozentwertes in absteigender Reihenfolge geordnet, sodass sich Gene mit maximaler Häufigkeit an der Basis einer Säule befinden. Jeder Balken steht je Maus für ein individuelles IGVH-Gen.

In allen drei Genotypen zeigte sich, dass bestimmte IGVH-Gene eine erhöhte prozentuale Häufigkeit gegenüber der überwiegenden Mehrheit an registrierten IGVH-Genen je Maus aufwiesen. Während die Säulendiagramme der beiden WT-Mäuse sowie Maus TCL # 1 bezüglich der Anordnung und Stärke der einzelnen Balken vergleichbar waren, hob sich Maus TCL # 2 hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der IGVH-Gene von TCL # 1 insbesondere bezüglich der Häufigkeit der beiden meistdetektierten IGVH-Gene deutlich ab. Auch in den Mäusen TCL-KO # 1 und TCL-KO # 2 wurden IGVH-Gene registriert, die mit einer überdurchschnittlichen Häufigkeit in der Basis der untersuchten IGVH-Gen-Alignments auftraten.

Eine Übersicht über die prozentualen Häufigkeiten der 20 häufigsten IGVH-Gene je Maus ist im Folgenden in Tabelle 15 abgedruckt. Sowohl in WT # 1 als auch WT # 2 wurden 13 IGVH-Gene mit einer prozentualen Häufigkeit $\geq 2\%$ registriert. Auch die TCL-Kohorte zeigte mit 14 bzw. 12 IGVH-Genen für Maus TCL # 1 und TCL # 2 eine ähnliche Anzahl an IGVH-Genen mit der Häufigkeit $\geq 2\%$. In der TCL-KO-Kohorte lag die Anzahl an IGVH-Genen $\geq 2\%$ mit 8 bzw. 9 IGVH-Genen merklich geringer als im WT und TCL-Modell.

Tabelle 15: Prozentuale Häufigkeit der 20 häufigsten IGVH-Gene

Für jede Maus sind die normalisierten Prozentwerte der 20 häufigsten IGVH-Gene angegeben. Die Gene wurden der Häufigkeit nach in absteigender Größe geordnet. Blau hinterlegte Werte kennzeichnen den Rang, an welchem die prozentuale Häufigkeit der IGVH-Gene je Maus unter 2 % sank.

top 20 IGVH-Gene	WT # 1	WT # 2	TCL # 1	TCL # 2	TCL-KO # 1	TCL-KO # 2
Rang 1	11,5394	12,4920	14,6095	20,4664	17,9184	31,7958
Rang 2	7,6212	11,3173	9,9681	18,8768	16,2102	14,5651
Rang 3	7,4492	8,3718	8,3930	6,2180	14,2838	12,1510
Rang 4	7,3231	6,3513	6,5379	5,6199	13,4998	8,6729
Rang 5	7,2596	4,6226	6,2399	5,6025	9,7938	5,2087
Rang 6	6,0512	4,5946	4,8824	4,8164	3,4467	3,8457
Rang 7	5,2216	4,2971	4,8787	4,2914	3,2515	3,2911
Rang 8	4,0239	3,7356	4,4768	3,5419	2,0607	3,0337
Rang 9	3,5397	2,5366	2,8118	3,0794	1,9025	2,2739
Rang 10	2,8520	2,3069	2,7174	2,6224	1,8617	1,4080
Rang 11	2,6949	2,2496	2,1910	2,3264	1,7149	1,3209
Rang 12	2,1411	2,1711	2,1670	2,1677	1,0950	1,2949
Rang 13	2,0616	2,1678	2,0726	1,6482	1,0697	1,0235
Rang 14	1,8472	1,8350	2,0271	1,6214	1,0339	0,8245
Rang 15	1,3623	1,8084	1,6940	1,5001	0,7990	0,7650
Rang 16	1,2922	1,7107	1,5655	1,3223	0,7373	0,5822
Rang 17	1,2708	1,6428	1,5346	1,2843	0,6951	0,5674
Rang 18	1,2296	1,4555	1,5070	1,1958	0,6114	0,5385
Rang 19	1,1154	1,3350	1,4359	1,1835	0,5722	0,4769
Rang 20	0,9441	1,3270	1,3764	1,1581	0,5127	0,4696

Wie bei Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der VDJ-Klone (vgl. 3.3.2 dieser Arbeit) sollte die Interpretation der Häufigkeitsverteilung der registrierten IGVH-Gene weniger anhand der absoluten Anzahl an registrierten IGVH-Genen einer bestimmten Häufigkeit erfolgen als vielmehr aus der Zusammenschau der prozentualen Häufigkeiten der einzelnen IGVH-Gene, die mit einer erhöhten Häufigkeit detektiert wurden, und ihres gemeinsamen Anteils an der Gesamtheit aller IGVH-Gene je Maus. Dieser Aspekt soll mit Tabelle 16 beleuchtet werden.

Tabelle 16: Gemeinsamer Anteil der IGVH-Gene "erhöhter Häufigkeit" an der Gesamtheit aller IGVH-Gene

Für jede Maus ist der Rang desjenigen IGVH-Gens angegeben, ab welchem nachfolgend die prozentuale Häufigkeit der IGVH-Gene kleiner 2 % betrug sowie die Summe der Prozentwerte aller IGVH-Gene, die mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ registriert wurden. Vgl. untenstehende Legende.

Maus	IGVH-Gen < 2 %	Summe "IGVH-Gene $\geq 2\%$ "
WT # 1	Rang 14	69,8 %
WT # 2	Rang 14	67,2 %
TCL # 1	Rang 15	74,0 %
TCL # 2	Rang 13	79,6 %
TCL-KO # 1	Rang 9	80,5 %
TCL-KO # 2	Rang 10	84,8 %

Legende zu Tabelle 16:

IGVH-Gen < 2 %: Rang des IGVH-Gens, ab welchem nachfolgend die prozentuale Häufigkeit der individuellen IGVH-Gene jeweils unter 2 % lag.

Summe "IGVH-Gene $\geq 2\%$ ": Summe der Prozentwerte aller IGVH-Gene, die mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ registriert wurden (entspricht dem Anteil der "IGVH-Gene $\geq 2\%$ " an der Gesamtheit aller IGVH-Gene je Maus).

In beiden WT-Mäusen wurden 13 IGVH-Gene registriert, die mit einer prozentualen Häufigkeit von $\geq 2\%$ auftraten. Gemeinsam umfassten besagte 13 IGVH-Gene 69,8 % (WT # 1) bzw. 67,2 % (WT # 2) der Gesamtheit aller registrierten IGVH-Gene in der jeweiligen Maus. In Maus TCL # 1 wiesen 14 IGVH-Gene die gesuchte Häufigkeit $\geq 2\%$ auf, wobei sie insgesamt 74,0 % aller IGVH-Gene abdeckten. In TCL # 2 lag der Anteil an IGVH-Genen $\geq 2\%$ etwas höher bei 79,6 %, wobei nur 12 IGVH-Gene eine Häufigkeit $\geq 2\%$ zeigten. Auffällig war, dass der höchste Anteil der IGVH-Gene mit einer prozentualen Häufigkeit $\geq 2\%$ an der Gesamtheit aller registrierten IGVH-Gene im TCL-KO-Modell vorgefunden wurde, obwohl hier die absolute Anzahl an IGVH-Genen, die eine Häufigkeit $\geq 2\%$ aufwiesen, mit 8 bzw. 9 Genen (TCL-KO # 1 und TCL-KO # 2) am geringsten war. So lag der Anteil an IGVH-Genen $\geq 2\%$ an der Gesamtheit aller registrierten IGVH-Gene in TCL-KO # 1 bei 80,5 % und in TCL-KO # 2 bei 84,8 %.

3.3.3.3. Genvergleich der detektierten IGVH-Gene zwischen WT, TCL- und TCL-KO-Modell

Um zu prüfen, ob es bei den registrierten IGVH-Genen im TCL- und TCL-KO-Modell durch die hämatologische Erkrankung zu einer Selektion bestimmter IGVH-Gene kam, wurden im Folgenden die IGVH-Gene der Häufigkeit $\geq 2\%$ des TCL- und TCL-KO-Modells mit den IGVH-Genen des WT verglichen.

In Tabelle 17 sind für beide TCL- und TCL-KO-Mäuse alle IGVH-Gene der Häufigkeit $\geq 2\%$ unter Angabe des Ranges²⁵ und prozentualer Häufigkeit aufgeführt. Jedes aufgelistete IGVH-Gen der TCL- und TCL-KO-Mäuse wurde im gesamten Spektrum an identifizierten IGVH-Genen in WT # 1 und WT # 2 gesucht und der Rang des jeweiligen Gens mit zugehöriger prozentualer Häufigkeit für beide WT-Mäuse angegeben.

Tabelle 17: Vergleich der IGVH-Gene "Häufigkeit $\geq 2\%$ " zwischen WT, TCL- und TCL-KO-Kohorte
Gelistet sind alle IGVH-Gene beider TCL- und TCL-KO-Mäuse, deren Häufigkeit $\geq 2\%$ betrug (unter Angabe des Rangs und der prozentualen Häufigkeit). Jedes gelistete IGVH-Gen der TCL- und TCL-KO-Tiere wurde im gesamten Spektrum an identifizierten IGVH-Genen in WT # 1 und WT # 2 gesucht und der Rang des jeweiligen Gens mit zugehöriger prozentualer Häufigkeit für beide WT-Mäuse notiert.

Maus	IGVH-Gen	Rang	Prozent	WT # 1		WT # 2	
				Rang	Prozent	Rang	Prozent
TCL # 1	IGHV5-17*02 F	1	14,6095	9	3,5397	112	0,0250
	IGHV6-6*01 F	2	9,9681	1	11,5394	2	11,3173
	IGHV1-55*01 F	3	8,3930	24	0,7979	48	0,2545
	IGHV1S22*01 F	4	6,5379	64	0,1348	29	0,6043
	IGHV6-6*02 F	5	6,2399	14	1,8472	20	1,3270
	IGHV8-8*01 F	6	4,8824	12	2,1411	6	4,5946
	IGHV3-2*02 F	7	4,8787	25	0,7894	-	-
	IGHV3-8*02 F	8	4,4768	6	6,0512	151	0,0061
	IGHV8-5*01 F	9	2,8118	48	0,2449	66	0,1226
	IGHV5-17*01 F	10	2,7174	3	7,4492	3	8,3718
	IGHV1-64*01 F	11	2,1910	4	7,3231	24	0,9701
	IGHV14-3*02 F	12	2,1670	11	2,6949	45	0,2633
	IGHV14-2*01 F	13	2,0726	22	0,8129	21	1,1041

²⁵ Zur Angabe und Bedeutung des Ranges der IGVH-Gene: die IGVH-Gene wurden je Maus nach ihrer prozentualen Häufigkeit in absteigender Größe geordnet und durchnummeriert. Das IGVH-Gen mit der höchsten prozentualen Häufigkeit belegt hierbei Rang 1.

Ergebnisse: 3.3 Ergebnisse der NGS-Analyse

	IGHV3-8*01 F	14	2,0271	15	1,3623	9	2,5366
<hr/>							
TCL # 2	IGHV6-6*01 F	1	20,4664	1	11,5394	2	11,3173
	IGHV5-17*01 F	2	18,8768	3	7,4492	3	8,3718
	IGHV1-53*01 F	3	6,2180	2	7,6212	1	12,492
	IGHV3-8*01 F	4	5,6199	15	1,3623	9	2,5366
	IGHV8-8*01 F	5	5,6025	12	2,1411	6	4,5946
	IGHV14-4*01 F	6	4,8164	51	0,2244	4	6,3513
	IGHV1-72*01 F	7	4,2914	16	1,2922	26	0,8289
	IGHV14-2*01 F	8	3,5419	22	0,8129	21	1,1041
	IGHV4-1*01 F	9	3,0794	61	0,1509	16	1,7107
	IGHV1S22*01 F	10	2,6224	64	0,1348	29	0,6043
	IGHV1-50*01 F	11	2,3264	28	0,6294	44	0,2684
	IGHV1-69*01 F	12	2,1677	52	0,2234	58	0,1908
<hr/>							
TCL-KO # 1	IGHV8-2*01 ORF	1	17,9184	53	0,2213	76	0,0828
	IGHV1-81*01 F	2	16,2102	29	0,5764	55	0,2009
	IGHV6-6*01 F	3	14,2838	1	11,5394	2	11,3173
	IGHV1-55*01 F	4	13,4998	24	0,7979	48	0,2545
	IGHV5-17*01 F	5	9,7938	3	7,4492	3	8,3718
	IGHV7-3*01 F	6	3,4467	106	0,0376	34	0,4320
	IGHV14-3*01 F	7	3,2515	36	0,4481	17	1,6428
	IGHV2-3*01 F	8	2,0607	18	1,2296	11	2,2496
<hr/>							
TCL-KO # 2	IGHV1-55*01 F	1	31,7958	24	0,7979	48	0,2545
	IGHV8-8*01 F	2	14,5651	12	2,1411	6	4,5946
	IGHV2-9-1*01 F	3	12,1510	54	0,2174	10	2,3069
	IGHV6-6*01 F	4	8,6729	1	11,5394	2	11,3173
	IGHV3-1*02 F	5	5,2087	17	1,2708	215	0,0007
	IGHV5-17*01 F	6	3,8457	3	7,4492	3	8,3718
	IGHV8-2*01 ORF	7	3,2911	53	0,2213	75	0,0828
	IGHV3-2*02 F	8	3,0337	25	0,7894	-	-
	IGHV14-4*01 F	9	2,2739	51	0,2244	4	6,3513

Beim Vergleich der IGVH-Gene der TCL- und TCL-KO-Kohorte bezüglich des Ranges und des Prozentwertes mit den entsprechenden Daten der beiden WT-Tiere fiel auf, dass

einige IGVH-Gene, die im TCL- bzw. TCL-KO-Modell mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ auftraten, im WT nicht unter den Genen "Häufigkeit $\geq 2\%$ " vorkamen. Dabei war zu beobachten, dass manche IGVH-Gene der TCL- / TCL-KO-Kohorte in beiden WT-Mäusen nicht unter den IGVH-Genen "Häufigkeit $\geq 2\%$ " aufzufinden waren (z.B. IGHV1-55*01 F in TCL # 1), während in anderen Fällen das entsprechende IGVH-Gen in einer der beiden WT-Mäuse mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$, jedoch in der anderen WT-Maus mit einer geringeren Häufigkeit auftrat (z.B. IGHV5-17*02 F in TCL # 2).

In Abbildung 16 wurden alle IGVH-Gene der TCL- und TCL-KO-Kohorte farblich markiert, deren prozentuale Häufigkeit $\geq 2\%$ betrug und die nicht unter den IGVH-Genen "Häufigkeit $\geq 2\%$ " in einem der beiden WT-Tiere zu finden waren. Balken identischer Farben stehen für identische IGVH-Gene.

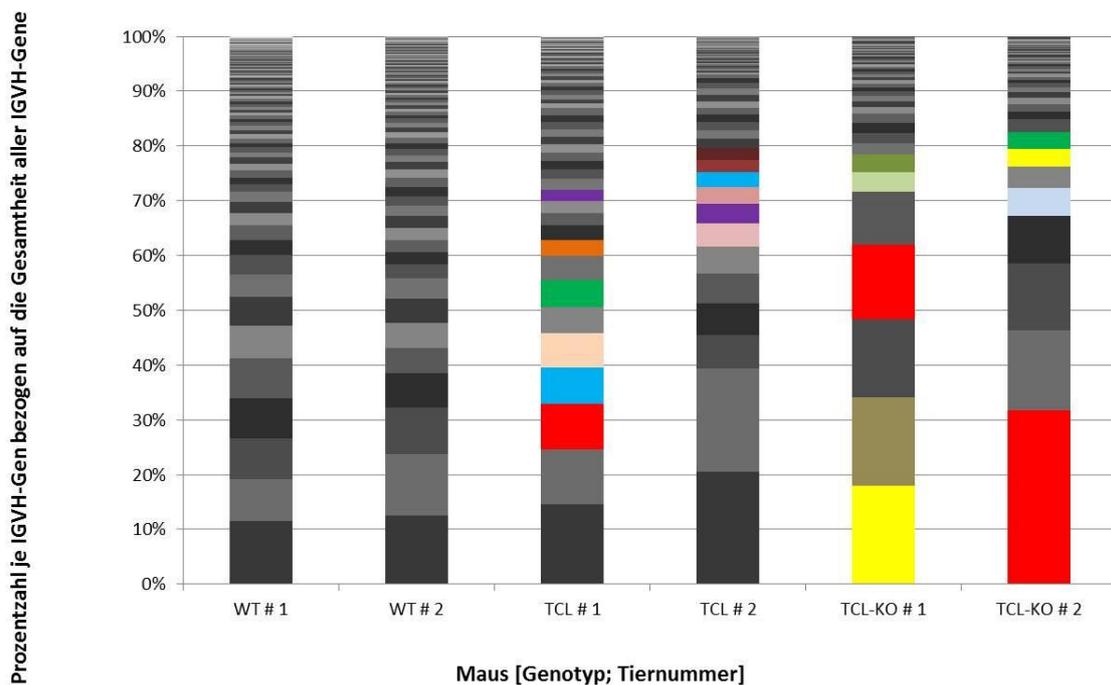


Abbildung 16: Differente IGVH-Gene im TCL- und TCL-KO-Modell im Vergleich zum WT
 Ausgehend von der kumulativen, prozentualen Darstellung der detektierten IGVH-Gene (vgl. Abbildung 15) wurden die IGVH-Gene mit einer prozentualen Häufigkeit $\geq 2\%$ der TCL- und TCL-KO-Mäuse mit den IGVH-Genen (Häufigkeit $\geq 2\%$) des WT verglichen. Alle IGVH-Gene, die im WT nicht vorkamen, wurden farblich markiert. Identische Farben stehen für identische IGVH-Gene.

In Maus TCL # 1 konnten sechs der insgesamt 14 IGVH-Gene "Häufigkeit $\geq 2\%$ " nicht unter den IGVH-Genen entsprechender Häufigkeit der beiden WT-Tiere nachgewiesen werden; in Maus TCL # 2 waren es sechs von 12 IGVH-Genen. In der TCL-KO-Kohorte belief sich die Anzahl an IGVH-Genen "Häufigkeit $\geq 2\%$ ", die nicht unter den IGVH-Genen entsprechender Häufigkeit des WT auffindbar waren, bei fünf von acht (TCL-KO # 1) bzw. bei vier von neun (TCL-KO # 2).

Die unter dem obig beschriebenen Aspekt fokussierten IGVH-Gene der TCL- und TCL-KO-Kohorte wurden in Tabelle 18 gesondert gelistet. Die Farben, mit denen die einzelnen Bezeichnungen der IGVH-Gene hinterlegt sind, entsprechen den Farben in Abbildung 16 und visualisieren die Zusammengehörigkeit der gelisteten IGVH-Gene in Tabelle 18 und der entsprechenden Balken im Säulendiagramm. Wie in Tabelle 18 ist jedes IGVH-Gen der TCL- bzw. TCL-KO-Mäuse unter Angabe des Ranges und des zugehörigen Prozentwertes, sowie vergleichend dazu die entsprechenden Angaben von WT # 1 und WT # 2, aufgeführt. Zusätzlich wurde für jedes aufgeführte IGVH-Gen ein Quotient aus dem Prozentwert von TCL bzw. TCL-KO und dem Prozentwert von WT # 1 (ergibt Ratio 1 (R1)) sowie dem Prozentwert WT # 2 (ergibt Ratio 2 (R2)) gebildet.

Tabelle 18: Vergleich bestimmter IGVH-Gene zwischen der TCL- /TCL-KO-Kohorte und dem WT

Gelistet sind diejenigen IGVH-Gene beider TCL- und TCL-KO-Mäuse, deren Häufigkeit $\geq 2\%$ beträgt und die nicht unter den IGVH-Genen der Häufigkeit $\geq 2\%$ im WT zu finden waren (unter Angabe des Rangs und der prozentualen Häufigkeit) Die farbigen Hinterlegungen entsprechen den farbigen Balken in Abbildung 16 und visualisieren die Zusammengehörigkeit der gelisteten IGVH-Gene mit den entsprechenden Balken des Säulendiagramms. Jedes gelistete IGVH-Gen der TCL- und TCL-KO-Tiere wurde im gesamten Spektrum an identifizierten IGVH-Genen in WT # 1 und WT # 2 gesucht und der Rang des jeweiligen Gens mit zugehöriger prozentualer Häufigkeit für beide WT-Mäuse angegeben.

Ratio 1 (R1) beschreibt den Quotienten aus Prozentwert TCL bzw. TCL-KO und Prozentwert WT # 1; Ratio 2 (R2) beschreibt den Quotienten aus Prozentwert TCL bzw. TCL-KO und Prozentwert WT # 2.

Maus	IGVH-Gen	Rang	%	WT # 1			WT # 2		
				Rang	%	R1	Rang	%	R2
TCL # 1	IGHV1-55*01 F	3	8,3930	24	0,7979	10,5	48	0,2545	33,0
	IGHV1S22*01 F	4	6,5379	64	0,1348	48,5	29	0,6043	10,8
	IGHV6-6*02 F	5	6,2399	14	1,8472	3,4	20	1,3270	4,7
	IGHV3-2*02 F	7	4,8787	25	0,7894	6,2	-	-	
	IGHV8-5*01 F	9	2,8118	48	0,2449	11,5	66	0,1226	22,9
	IGHV14-2*01 F	13	2,0726	22	0,8129	2,6	21	1,1041	1,9
TCL # 2	IGHV1-72*01 F	7	4,2914	16	1,2922	3,3	26	0,8289	5,2
	IGHV14-2*01 F	8	3,5419	22	0,8129	4,4	21	1,1041	3,2
	IGHV4-1*01 F	9	3,0794	61	0,1509	20,4	16	1,7107	1,8
	IGHV1S22*01 F	10	2,6224	64	0,1348	19,5	29	0,6043	4,3
	IGHV1-50*01 F	11	2,3264	28	0,6294	3,7	44	0,2684	8,7
	IGHV1-69*01 F	12	2,1677	52	0,2234	9,7	58	0,1908	11,4
TCL-KO # 1	IGHV8-2*01 ORF	1	17,9184	53	0,2213	81,0	75	0,0828	216,4
	IGHV1-81*01 F	2	16,2102	29	0,5764	28,1	55	0,2009	80,7
	IGHV1-55*01 F	4	13,4998	24	0,7979	16,9	48	0,2545	53,0
	IGHV7-3*01 F	6	3,4467	106	0,0376	91,7	34	0,4320	8,0
	IGHV14-3*01 F	7	3,2515	36	0,4481	7,3	17	1,6428	2,0
TCL-KO # 2	IGHV1-55*01 F	1	31,7958	24	0,7979	39,8	48	0,2545	124,9
	IGHV3-1*02 F	5	5,2087	17	1,2708	4,1	215	0,0007	7441,0
	IGHV8-2*01 ORF	7	3,2911	53	0,2213	14,9	75	0,0828	39,7
	IGHV3-2*02 F	8	3,0337	25	0,7894	3,8	-	-	

Vergleicht man die einzelnen Ränge der IGVH-Gene zwischen den TCL- bzw. TCL-KO-Tieren und den beiden WT-Mäusen, so fällt auf, dass die Rangwerte für die

einzelnen Gene im WT in aller Regel deutlich höher sind als in der jeweiligen TCL- oder TCL-KO-Maus (z.B. *IGHV8-2*01 ORF* liegt in TCL-KO # 1 auf Rang 1 bzw. in TCL-KO # 2 auf Rang 7, wogegen es in WT # 1 auf Rang 53 und in WT # 2 auf Rang 75 liegt). Teilweise ist zwischen den Rangwerten der beiden WT-Mäuse eines IGVH-Gens ein deutlicher Unterschied festzustellen, wie beispielsweise für *IGHV3-1*02 F*. Während dieses Gen in WT # 1 auf Rang 17 mit einer Häufigkeit von 1,27 % liegt, belegt es in WT # 2 Rang 215 mit einer Häufigkeit von 0,0007 %. Extreme Abweichungen sind jedoch Ausnahmen.

Ein IGVH-Gen konnte nur in einem der beiden WT-Tiere nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um *IGHV3-2*02 F*, das in TCL # 1 den Rang 7 und in TCL-KO # 2 den Rang 8 belegte. In WT # 1 lag es auf Rang 25, wogegen es in WT # 2 unter den insgesamt registrierten 219 IGVH-Genen nicht vorhanden war.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich durch die gebildeten Quotienten R1 und R2 ab. Die IGVH-Gene wurden hierbei anhand ihres Prozentwertes verglichen. Für alle analysierten IGVH-Gene in Tabelle 18 ergab sich entsprechend den Auswahlkriterien der untersuchten IGVH-Gene ein positiver Wert > 1 für R1 und R2. Ein Wert $R1 = 1$ bzw. $R2 = 1$ würde bedeuten, dass die Häufigkeit des jeweiligen Gens in den beiden verglichenen Mäusen gleich groß ist. Bei den meisten aufgeführten Genen sahen wir ein hohes vielfaches von 1 für R1 und R2, was bedeutet, dass die Häufigkeit des Gens im TCL- bzw. TCL-KO-Modell um ein vielfaches höher war als im WT. Jedoch zeigte sich auch, dass die Werte von R1 und R2 für manche Gene relativ gering zu 1 differierten (z.B. *IGHV14-2*01 F* in TCL # 1 mit $R1 = 2,6$ und $R2 = 1,9$), während R1 und R2 für andere Gene deutlich höhere Wert annahmen (z.B. *IGHV8-2*01 ORF* für TCL-KO # 1 mit $R1 = 81,0$ und $R2 = 216,4$). Weiterhin war zu beobachten, dass für viele Gene eine manifeste Differenz zwischen R1 und R2 vorlag (z.B. *IGHV7-3*01 F* in TCL-KO # 1 mit $R1 = 91,7$ und $R2 = 8,0$). Für Gen *IGHV3-2*02 F* in TCL # 1 und TCL-KO # 2 war die Bildung des Quotienten R2 nicht möglich, da dieses Gen in WT # 2 nicht nachgewiesen werden konnte.

4. Diskussion

In der Pathogenese der humanen CLL spielt der B-Zellrezeptor eine zentrale Rolle. In den klonalen Zellen der Patienten sind einzelne variable Ketten des BCR überrepräsentiert. Es ist von starker prognostischer Bedeutung, ob Keimbahnsequenzen oder somatisch hypermutierte Sequenzen vorliegen.[21] Zwischen unterschiedlichen Patienten werden identische stereotype CDR3-Regionen und eine Autoreaktivität der exprimierten BCR gefunden.[106, 107] Zudem ist die Blockade des BCR-Signalweges (über die Kinasen BTK oder PI3K δ) ausreichend, um eine Krankheitskontrolle zu erreichen.[108]

Bei physiologischen B-Zellen ist der BCR für die positive und die negative Selektion unreifer B-Zellen notwendig. Er beeinflusst die Differenzierung in unterschiedliche B-Zellsubpopulationen wie Marginalzonen-B-Zellen, folliculären B-Zellen oder B-1b Zellen. CD5⁺ B-1a Zellen werden als Ursprungszellen der humanen CLL diskutiert.

Im Jahr 2002 gelang der Gruppe um R. Bichi und C.M. Croce durch die B-Zell-spezifische Expression des Onkogens *TCL1* die Etablierung eines transgenen Mausmodells (E μ -TCL1-Mausmodell), welches den phänotypischen Merkmalen der humanen CLL-Erkrankung sehr nahe kommt.[68] Im transgenen E μ -TCL1-Mausmodell für die CLL liegt eine Alteration des BCR-Signalweges vor. TCL1 moduliert hierbei die Aktivität der Serin/Threonin-Kinase *Akt*. Diese Modulation ist hinreichend um eine CLL-typische Erkrankung der Tiere zu verursachen.[109] Nicht geklärt ist, ob es hierbei ebenfalls zu einer Selektion spezifischer BCR „upstream“ der TCL1 modulierten Akt-Aktivität kommt.

Die Transkriptionsfaktoren NFAT spielen eine wichtige Rolle in Prozessen der Zellaktivierung und -differenzierung, insbesondere auch im hämatopoetischen System.[43] Es ist bekannt, dass eine Dysregulation des NFAT-Signalweges mit verschiedenen Tumorerkrankungen assoziiert ist.[44]

In B-Zellen ist NFAT2 maßgeblich an der Zelldifferenzierung von B1a-Zellen [53] und im Prozess der BCR-Signaltransmission [54] beteiligt und deshalb aus Sicht der CLL-Forschung von besonderem Interesse.

M. Märklin publizierte 2017, dass der B-Zell-spezifische Knockout von NFAT2 im E μ -TCL1-Mausmodell zu einer deutlichen Akzeleration der CLL-ähnlichen Erkrankung mit drastisch verkürztem Überleben, einer verstärkten Akkumulation und einer erhöhten Proliferationsrate von CD5⁺ B-Zellen führt.[74] Der Phänotyp dieser Erkrankung ähnelt der humanen Richter-Transformation im Sinne einer Entwicklung der CLL hin zu einem hochmalignen, diffus großzelligen B-Zell-Lymphom. Genexpressionsanalysen mittels Microarray von CD5⁺ B-Zellen mit und ohne NFAT2-Knockout ergaben, dass durch den NFAT2-Knockout insbesondere die Expression von Genen des Zellzyklus und der BCR-Signalkaskade beeinflusst wird. Ca²⁺-Mobilitätsmessungen als Antwort auf α IgM-Rezeptorstimulation zeigten, dass die BCR im TCL-KO-Modell eine hohe Reaktivität gegenüber Stimulation aufweisen, während im TCL-Modell ohne NFAT2-Knockout die Reaktivität - im Sinne einer Anergie - fehlte.

Vor diesem Hintergrund wurde im durchgeführten Projekt untersucht, ob Hinweise auf die von Märklin beschriebenen Unterschiede hinsichtlich des NFAT2-Knockouts und des beobachteten, differenten BCR-Reaktivitätsmusters auch auf Strukturebene der BCR zu finden sind. Die Ergebnisse dieses Projekts werden hierzu vor der Fragestellung diskutiert, ob TCL1-transgene Mäuse differente BCR gegenüber WT-Mäusen nutzen und ob der Knockout von NFAT2 die Selektion bestimmter BCR-Klone begünstigt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob möglicherweise bestehende Selektionsprozesse zu einer Stereotypie der BCR führen könnten.

Zur Bearbeitung der skizzierten Fragestellung wurden aus Splenozyten zweier WT-Mäuse, zweier TCL1-Mäuse ohne NFAT2-Knockout und zweier TCL1-NFAT2k.o.-Mäuse die hypervariablen Regionen der schweren Kette IgM der BCR mittels verschiedener Multiplex-PCR amplifiziert. Die PCR-Amplifikationen wurden nach Aufreinigung mittels Gelelektrophorese zum einen direkt mittels NGS analysiert. Zum anderen erfolgte eine Vektor-Klonierung mit anschließender Generierung von Plasmid-

Sequenzen. Es erfolgte der Abgleich der NGS-Daten und der Plasmid-Sequenzen mit einer Immun-Gendatenbank, bei der die VDJ-Rekombinationen der DNA-Sequenzen entschlüsselt wurden.

4.1. Die Klonalitätsanalyse des BCR-Repertoirs in NFAT2-deletierten CLL-Zellen

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob das Transgen TCL1 bzw. der zusätzliche Knockout von NFAT2 die Selektion bestimmter BCR-Klone begünstigt, wurden sowohl der NGS-Datensatz als auch die generierten Plasmid-Sequenzen hinsichtlich des Spektrums an auftretenden VDJ-Rekombinationen für alle drei Maus-Genotypen analysiert.

Bei Vorstellung des E μ -TCL1-Mausmodells durch die Gruppe um R. Bichi wurde eine expandierende CD5⁺ B-Zellpopulation in der Milz von 3-5 Lebensmonate alten TCL1-Mäusen und das Vorherrschen dominanter Klone ab dem Alter von 7 Lebensmonaten beschrieben [68]. Damit bestand die Hypothese, in der Klonalitätsanalyse ein polyklonales BCR-Muster innerhalb der WT-Tiere und ein oligoklonales BCR-Muster innerhalb der TCL1-Kohorte vorzufinden, welches durch den Knockout von NFAT2 zusätzlich verstärkt sein könnte.

Diese Annahme konnte nur partiell bestätigt werden. Die Klonalitätsanalyse im Fall der untersuchten Plasmid-Sequenzen zeigte sowohl im WT als auch in der TCL-Kohorte ohne NFAT2-Knockout ein relativ breites Spektrum an unterschiedlichen VDJ-Klonen, von denen einige Klone im Gegensatz zu anderen mehrmals detektiert wurden. Unter der Annahme, dass dem WT ein physiologisches polyklonales BCR-Muster zugrunde liegt, konnte im Vergleich zur TCL-Kohorte im Lebensalter von 7 Monaten keine Oligoklonalität festgestellt werden.

Auch die Auswertung des NGS-Datensatzes lieferte ein ähnliches Ergebnis. In beiden Kohorten wurden einige wenige Klone mit etwas erhöhter Häufigkeit gegenüber den übrigen Klonen registriert, wobei insgesamt die Häufigkeit der einzelnen Klone rasch

auf ein homogen niedriges Niveau abfiel. Eine Oligoklonalität der TCL-Kohorte im Vergleich zum WT konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Lediglich die Auswertung des NGS-Datensatzes hinsichtlich der absoluten Anzahl an detektierten VDJ-Klonen der beiden Genotypen ergab für die TCL-Kohorte eine verminderte Anzahl an detektierten Klonen. So konnten im WT ca. 4700 Klone je Maus identifiziert werden, während es in der TCL-Kohorte lediglich 3600 VDJ-Klone waren. Anzumerken ist hierbei, dass für beide TCL-Mäuse im Vergleich zum WT lediglich 4 statt 6 PCR-Produkte für die Sequenzierung generiert werden konnten (IgM-C bis IgM-F, vgl. Abschnitt 3.1.1 (S.44)). Es bleibt dabei fraglich, ob die verminderte Anzahl an VDJ-Klonen im TCL-Modell auf die hämatologische Erkrankung der Mäuse zurückzuführen ist, oder ob die verminderte Anzahl an PCR-Produkten ursächlich gewesen sein könnte. In der TCL-Kohorte mit NFAT2-Knockout zeigte sich hingegen sowohl hinsichtlich der absoluten Anzahl an detektierten VDJ-Klonen als auch bezüglich der Quantität der einzelnen VDJ-Klone in der Plasmid- und NGS-Analyse ein markant differentes Bild. Bereits die Auswertung der Plasmid-Analyse zeigte, dass im TCL-KO-Modell ein deutlich eingeschränktes VDJ-Spektrum mit dominanten Hauptklonen vorlag. Auch die NGS-Analyse bestätigte mit durchschnittlich 1900 registrierten VDJ-Klonen je Maus, verbunden mit dem Auftreten dominanter Hauptklone, ein charakteristisches Klonalitätsmuster im TCL-KO-Modell. Teilweise dominierten einzelne Klone mit einer individuellen Häufigkeit von bis zu 20 %. Zudem machten dominante Klone zusammen zwischen 50 - 70 % aller VDJ-Klone innerhalb einer Maus aus. Das markant differente Klonalitätsmuster im TCL1-NFAT2k.o.-Modell im Vergleich zum WT und herkömmlichen TCL1-Modell ohne NFAT2-Knockout, kann zusammenfassend dahingehend interpretiert werden, dass der Knockout von NFAT2 im TCL1-Mausmodell bereits im Lebensalter von 7 Monaten zu einer verminderten Variabilität an exprimierten VDJ-Klonen und somit zu einem eingeschränkten BCR-Repertoire führt. Gleichzeitig scheint es in den untersuchten Mäusen unter dem Knockout von NFAT2 zu einer Dominanz von Hauptklonen zu kommen, deren gemeinsamer Anteil über 50 % an der Gesamtheit aller registrierten VDJ-Klone je Maus ausmacht.

Es stellt sich allerdings die Frage, wie die Ergebnisse des nahezu identischen Klonalitätsmusters der WT und TCL-Kohorte interpretiert werden können, insbesondere

da die nicht nachweisbare Oligoklonalität im TCL-Modell im Widerspruch zu den publizierten Ergebnissen von Bichi et al. steht. Eine mögliche Erklärung kann im unterschiedlich methodischen Vorgehen beider Arbeiten liegen. Beiden Projekten gemein war die Amplifikation der hypervariablen Regionen der BCR mittels PCR-Technik. Es wurden jedoch unterschiedliche Primerkombinationen zur Amplifikation der gesuchten Ig-Gen-Rearrangements verwendet. Weiter wurden die PCR-Amplifikate unterschiedlich analysiert. Während Bichi et al. für den Nachweis der Klonalität die Southern-Blot-Untersuchung verwendete, wurde hier das PCR-Amplifikat mittels NGS analysiert bzw. in Plasmide kloniert und Sanger-sequenziert. Bei den von Bichi et al. publizierten Southern-Blot-Gelbildern zum Nachweis der Oligoklonalität im E μ -TCL1 Mausmodells kann kritisch angemerkt werden, dass bei einer abgrenzbaren Gelbande, wie sie auch in einer TCL-Maus im Gegensatz zur WT-Kontrolle nachgewiesen werden konnte, nicht zwangsläufig von einer bestehenden Klonalität ausgegangen werden muss. Mono- oder Oligoklonalität, definiert als dominantes Auftreten einer (mono) oder mehrerer (oligo) B-Zellpopulationen mit einheitlicher BCR-Spezifität im Sinne von identischen V(D)J-Rekombinationen, ist strenggenommen nur dann erwiesen, wenn gezeigt wurde, dass die im Gelbild exponierten Banden hauptsächlich aus B-Zellen identischer V(D)J-Rekombination bestehen. Die methodische Stärke der in dieser Arbeit durchgeführten Klonalitätsuntersuchung liegt somit in der direkten Bestimmung der VDJ-Rekombinationen durch Sequenzierung der PCR-Amplifikate mit anschließender Genidentifizierung. Somit wurden Aussagen bezüglich einer bestehenden Klonalität in den unterschiedlichen Mauslinien nicht durch die Interpretation von Gelbildern getroffen, sondern durch die direkte Bestimmung der vorherrschenden VDJ-Klone. Doch auch die hier gewählte Methodik muss bezüglich möglicher systematischer Fehler diskutiert werden. Während der Amplifikation der BCR-Regionen kann eine PCR-bedingte Selektion einzelner VDJ-Klone erfolgen. Dies könnte durch eine ungleichmäßige Amplifikation der einzelnen DNA-Templates geschehen. Um diesem methodisch bedingten Fehler vorzubeugen, können jetzt *unique molecular identifiers (UMIs)*²⁶ verwendet werden, die zu Projektbeginn allerdings noch nicht bekannt waren.

²⁶ *UMIs* sind kurze DNA-Sequenzen zufälliger Nukleotidabfolge, welche noch vor Zugabe der PCR-Primer jedes zu amplifizierende DNA-Template mit einem individuellen "Nukleotid-Barcode" versehen. Durch das Auszählen von unterschiedlichen *UMIs* derselben VDJ-Rekombination nach erfolgter PCR

Eine weitere Ursache für eine PCR-bedingte Selektion einzelner VDJ-Klone besteht in einer ungleichen bis fehlenden Affinität der Primer zur Template-DNA. VDJ-Klone mit höherer Primer-Affinität hätten somit einen Amplifikationsvorteil gegenüber Klonen mit geringerer Primer-Affinität. Auch die Verwendung von *UMIs* würde diese methodische Limitation nicht entschärfen, da hierbei das initiale Primer-Annealing unbeeinflusst bliebe. Zudem besteht eine methodische Limitation in der Sequenziertiefe des NGS. Auch bei hoher Sequenziertiefe kann nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass alle VDJ-Rekombination (v.a. jene mit geringer Häufigkeit) detektiert werden. Durch eine direkte mRNA-Sequenzierung (RNAseq) könnten Amplifikationsfehler minimiert werden, allerdings wäre auch hier die Sequenziertiefe limitierend, da neben den VDJ-Genen alle andere mRNA unselektiv sequenziert werden müsste.

Durch das doppelgleisig methodische Vorgehen (Plasmid-DNA-Sequenzierung und NGS-Analyse) und die Wahl der Kontrollgruppen besteht in dieser Arbeit eine interne Validation der Ergebnisse. Durch die NGS-Analyse gelang durch die Generierung von 130000 - 170000 VDJ-Sequenzen je Maus erstmals eine Untersuchung des BCR-Repertoires in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen, E μ -TCL1-Mäusen und E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mäusen, die in diesem Umfang und Konstellation bislang nicht publiziert wurde. Die Stärke der Daten liegt im Vergleich der drei untersuchten Genotypen. Hierdurch lassen sich Fehlinterpretationen vermeiden - wie beispielsweise die Interpretation des Klonalitätsmusters in der TCL-Kohorte ohne Beachtung des WT mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Fehlinterpretation im Sinne von Oligoklonalität geführt hätte. Veröffentlichungen, die ihre Ergebnisse nur auf die Analyse einer Mauslinie stützen - wie beispielsweise X. Yan et al. in entsprechender Publikation über das E μ -TCL1-Mausmodell [112] -, müssen deshalb im Bewusstsein von systematischen Fehlern interpretiert werden.

lässt sich somit genauer und sicherer auf die Anzahl an B-Zellen schließen, die tatsächlich die entsprechende VDJ-Rekombination aufwiesen, als das ohne UMI der Fall wäre.110. Pabst, O., H. Hazanov, and R. Mehr, *Old questions, new tools: does next-generation sequencing hold the key to unraveling intestinal B-cell responses?* Mucosal Immunol, 2015. **8**(1): p. 29-37, 111. Greiff, V., et al., *Bioinformatic and Statistical Analysis of Adaptive Immune Repertoires*. Trends Immunol, 2015. **36**(11): p. 738-49.

Zusammenfassend führt der Knockout von NFAT2 im TCL1-Mausmodell im Vergleich zum WT und zum herkömmlichen TCL1-Modell ohne NFAT2-Knockout im Alter von 7 Lebensmonaten zu einer verminderten Variabilität an exprimierten VDJ-Klonen. Die Dominanz von einzelnen Hauptklonen im TCL-KO-Modell entspricht dabei der Selektion und Expansion von singulären B-Zellen mit ihrem individuellen BCR oder der parallelen Selektion und Expansion unterschiedlicher B-Zellen mit identischer VDJ-Rekombination ihres BCR. Es bleibt jedoch offen, ob der Knockout von NFAT2 kausal für den beobachteten Selektionsprozess im TCL-KO-Modell verantwortlich gemacht werden kann. Es ist nicht auszuschließen, dass im TCL-Modell ohne NFAT2-Knockout im weiteren Krankheitsverlauf ebenfalls klonale Selektionsprozesse stattfinden, sodass sich das Klonalitätsmuster der TCL-Kohorte mit fortschreitendem Krankheitsstadium dem Klonalitätsmuster der TCL-KO-Kohorte im Alter von 7 Lebensmonaten angleichen könnte. Wenn auch keine Kausalität für einen Selektionsprozess durch den NFAT2-Knockout im E μ -TCL1-Mausmodell durch die Ergebnisse dieser Arbeit belegt werden konnte, so kann doch beansprucht werden, dass der Knockout von NFAT2 zu einer akzelerierten klonalen Evolution im Alter von sieben Lebensmonaten führt, die durch dieses Projekt gezeigt wurde.

4.2. Der Mutationsstatus des B-Zell-Rezeptor in NFAT2-deletierten CLL-Zellen

Bei Langzeituntersuchungen zur Erforschung der Rolle von NFAT2 auf die Pathogenese der CLL im transgenen E μ -TCL1-Mausmodell wurde von Fr. Dr. Märklin ein markant aggressiver Krankheitsverlauf mit reduzierter Überlebenszeit für Mäuse der TCL-KO-Kohorte beschrieben.[74] Da in der humanen CLL für Patienten abhängig vom Mutationsstatus ihrer IGVH-Gene eine prognostische Einschätzung ihres weiteren Krankheitsverlaufs möglich ist, wurde in dieser Arbeit eine mögliche Korrelation zwischen dem Erkrankungsverlauf und dem IGVH-Mutationsstatus im E μ -TCL1-Mausmodell untersucht. Nicht-mutierte IGVH-Gene sind in der humanen CLL mit einer schlechten Prognose mit ungünstigem Ansprechen auf Chemotherapie und verkürztem Überleben assoziiert.[20-22] In dieser Arbeit sollte die Frage näher beleuchtet werden, ob sich auch im E μ -TCL1-Mausmodell die differente Dynamik des Krankheitsverlaufs

abhängig des NFAT2-Knockouts auf Ebene des IGVH-Mutationsstatus der BCR widerspiegelt. Dazu wurde von 60 Plasmidsequenzen aller drei Mauskohorten der Mutationsstatus der IGVH-Gene durch den Abgleich mit der zugrundeliegenden Keimbahn-Referenzsequenz bestimmt. In der WT-Kohorte wiesen durchschnittlich 75 % aller IGVH-Gene Mutationen im Vergleich zur Keimbahn-Referenzsequenz auf; demgegenüber waren nur 30 % der IGVH-Gene der TCL- und nur 22 % der TCL-KO-Mäuse mutiert. Ähnlich wie bei der Klonalitätsanalyse müssen mögliche methodische Fehler einkalkuliert werden, da Nukleotidaberrationen der Plasmid-Sequenzen durch Sequenzierungsfehler zustande gekommen sein könnten. Es ist davon auszugehen, dass sich dies als systematischer Fehler über alle Genotypen gleichmäßig erstrecken würde, sodass durch den Vergleich der Genotypen eine valide Aussage möglich ist.

Mit der Kenntnis um die Prozesse während der B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Reifung ist es naheliegend, die detektierten DNA-Variationen als *somatische Hypermutationen* zu interpretieren.[113]. In WT-Mäusen zeigte der Großteil aller nachgewiesenen IGVH-Gene somatische Hypermutationen, während im E μ -TCL1-Mausmodell der überwiegende Großteil aller IGVH-Gene unabhängig des NFAT2-Knockouts in nicht-mutierter Form vorlag. Dies bestätigt die Daten von Yan et al., dass die IGVH-Gene im E μ -TCL1-Mausmodell unmutiert vorliegen und damit dem Mutationsstatus der prognostisch schlechten Verlaufsform der humanen CLL entsprechen.[112] Märklin et al. beschrieben für das E μ -TCL1-Mausmodell durch den Verlust von NFAT2 eine Transformation der CLL-ähnlichen Erkrankung in ein aggressives B-Zelllymphom.[74] Die Mutationsanalyse dieser Arbeit zeigte, dass auch hier nicht-mutierte Keimbahnsequenzen exprimiert werden.

Die hohe Mutationsrate der WT-Mäuse wird als physiologische somatische Hypermutationen im Sinne der adaptiven Immunantwort gedeutet. Während der Generierung der sekundären BCR-Diversität und Memory-Bildung kommt es zu einer Selektion von mutierten, hochspezifischen BCR mit hoher Antigenaffinität. Diese sind in einem physiologischen Organismus zu erwarten und konnten entsprechend im WT der untersuchten Mauslinien detektiert werden.

Im Folgenden soll noch auf die in dieser Auswertung zugrunde gelegten Referenzwerte zur Einteilung in "mutiert" bzw. "unmutiert" eingegangen werden. In der durchgeführten Mutationsanalyse wurden Sequenzen, die in mindestens einer Nukleotidposition gegenüber der Keimbahn-Referenzsequenz variierten, als "mutiert" definiert. Für den "unmutiert" Rezeptorstatus wurde in diesem Zusammenhang eine 100%ige Übereinstimmung mit der Keimbahn-Referenzsequenz gefordert. Gewöhnlich wird bezüglich des IGVH-Mutationsstatus als prognostischem Marker in der humanen CLL ein Mutationsgrad von 2 % als Grenze zur Einteilung in "mutiert" versus "unmutiert" herangezogen (vgl. z.B. Damle et al. 1999).[22] Dieser Grenzwert zur Unterteilung des Mutationsstatus wurde Anfang der 1990er Jahre basierend auf verschiedenen Publikationen empirisch ermittelt [114], noch bevor der Mutationsstatus der IGVH-Gene als prognostischer Marker gegen Ende der 1990er Jahre hinsichtlich des Erkrankungsverlaufs relevant wurde.[21, 22] Mit dem Mutationsgrad $\geq 2\%$ als Definitionsmerkmal eines mutierten Rezeptorstatus sollten potentiell bestehende genetische Polymorphismen der IGVH-Gene berücksichtigt und einer falschen Interpretation als somatische Hypermutation vorgebeugt werden.[21, 114]

Die bei der Mutationsanalyse dieser Arbeit geforderte 100%ige Übereinstimmung zwischen Gen- und Keimbahn-Referenzsequenz als Kriterium eines unmutierten IGVH-Status kann angesichts möglicherweise vorhandener genetischer Polymorphismen kritisch gesehen werden. Um potentiell vorhandene genetische Polymorphismen zu berücksichtigen, findet gewöhnlich auch im E μ -TCL1-Mausmodell der 2 %-Grenzwert Beachtung [112], wenngleich es keine unmittelbare Evidenz dafür gibt, dass der im Menschen ermittelte Grenzwert in selber Weise auf die Maus zu übertragen ist. Die in dieser Arbeit durchgeführte Mutationsanalyse der IGVH-Gene lässt eine direkte Übertragung des 2 %-Grenzwertes auf die Maus zur Einteilung in einen "mutierten" versus "unmutierten" IGVH-Genstatus fraglich erscheinen. Im WT wurden erheblich mehr Aberrationen der IGVH-Gene gegenüber der Keimbahn-Referenz detektiert als im TCL- und TCL-KO-Modell. Viele der "mutierten" IGVH-Gene wiesen hierbei einen Mutationsgrad $< 2\%$ auf. In der Annahme, dass genetische Polymorphismen unabhängig vom Genotyp in allen Mäusen gleichmäßig vorkommen, würde eine Verzerrung der Mutationsanalyse durch die Missinterpretation genetischer

Polymorphismen als somatische Hypermutationen alle drei Genotypen gleichmäßig betreffen. Dies konnte jedoch mit der signifikant erhöhten Mutationsrate des WT gegenüber dem TCL- und TCL-KO-Modell nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse können als Hinweis dafür gedeutet werden, dass der in der humanen CLL etablierte Mutations-Grenzwert von 2 % auf das Mausmodell nur bedingt übertragbar sein dürfte. Auch in der humanen CLL deuten Studien darauf hin, dass nicht alle Abweichungen eines IGVH-Gens von < 2 % gegenüber der Keimbahn-Referenzsequenz genetischen Polymorphismen entsprechen dürften. So berichtet Bomben et al. in einem Studien-Update, dass eine signifikante Unterscheidung der Patienten hinsichtlich des Krankheitsverlaufs in "mutierten" vs. "unmutierten" IGVH-Status auch anhand des Mutationsgrades von 0,2 % möglich war.[115] Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der etablierte 2 %-Cut-off nicht als streng notwendiges Kriterium zur Einteilung des BCR-Mutationsstatus in "mutiert" vs. "unmutiert" (insbesondere auch im Tiermodell) zu betrachten ist.

Zusammenfassend liegt der Großteil der IGVH-Gene im E μ -TCL1-Mausmodell in unmutierter Form vor. Dass der Knockout von NFAT2 eine direkte Auswirkung auf den Mutationsstatus der IGVH-Gene hat, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Um diese Frage tiefgreifend und weitreichender beurteilen zu können, wäre eine größere Fallzahl an untersuchten Mäusen sowie eine größere Anzahl an untersuchten IGVH-Genen notwendig. Die Mutationsanalyse der IGVH-Gene des generierten NGS-Datensatzes konnte nicht verwendet werden, da mit der gewählten Paired End-Sequenzierung von 2 x 75 bp nicht die gesamte IGVH-Region abgedeckt wurde. Eine vollständige Analyse der IGVH-Gen-Sequenz ist jedoch für die Bestimmung des Mutationsgrades der IGVH-Gene notwendig.

Märklin et al. haben eine verstärkte Genexpression des Enzyms *Activation-Induced-Cytidine-Deaminase (AID)* im E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Mausmodell beschrieben.[74] Das Enzym AID spielt bei der somatischen Hypermutation und der Class-Switch-Rekombination im Rahmen der adaptiven Immunantwort eine essenzielle Rolle.[100] Angesichts der niedrigen Mutationsrate der TCL-KO-Kohorte stellt sich die Frage nach der Funktion von AID im TCL-KO-Modell. Es bleibt die Überlegung, ob

gegebenenfalls die in diesem Projekt nicht untersuchten, leichten Ketten λ und κ der BCR durch die verstärkte Expression von AID vermehrt somatische Hypermutationen aufweisen könnten, oder ob das erhöhte Level an AID in Form eines verstärkten Klassensprungs der exprimierten Immunglobulin-Rezeptoren zum Ausdruck kommen könnte. Für die AID ist zudem eine epigenetische Funktion über die Demethylierung von DNA beschrieben.[116] Denkbar wäre eine Rolle von AID in der Pathogenese des TCL-KO-Modells durch epigenetische Regulation von Zielgenen. Methylierungsanalysen im TCL-KO-Modell könnten hier weiterführende Erkenntnisse über zugrundeliegende molekularbiologische Vorgänge liefern.

4.3. Charakterisierung eines stereotypen BCR-Musters in NFAT2-deletierten CLL-Zellen

Abschließend soll angesichts des ausgeprägten Klonalitätsmusters im TCL-KO-Modell diskutiert werden, ob der Knockout von NFAT2 im Rahmen einer klonalen Selektion zu einer Stereotypie der BCR führt. Für die humane CLL konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass es in leukämischen Zellen zu einer präferenziellen Selektion bestimmter Immun-Gene im Vergleich zu den exprimierten Immun-Genen in physiologischen B-Zellen kommt.[21, 114, 117, 118] Zwar wird auch im Rahmen des physiologischen Rearrangement-Prozesses ein unterschiedlich häufiges Auftreten verschiedener IGVH-Gene beobachtet [119], jedoch konnte für CLL-Patienten eine signifikante Über- bzw. Unterrepräsentation für gesamte IGVH-, IGJH- und IGDH-Genfamilien [117, 120, 121], sowie für einzelne Immun-Gene nachgewiesen werden (z.B. für V_H 1-69).[21, 121] Das präferenzielle Auftreten bestimmter Immun-Gene scheint insbesondere deshalb bedeutsam zu sein, da eine ätiologisch relevante B-Zellstimulation durch Antigenkontakt in der Pathogenese mancher CLL-Fälle diskutiert wird.[122, 123] Die Entdeckung von CLL-typischen Immun-Genen bei der Analyse des B-Zell-Rezeptorrepertoires in CLL-Patienten kann hierbei als Indiz für eine mögliche BCR-Selektion durch (Auto-)Antigenkontakt gewertet werden. Insbesondere zeigen verschiedene Arbeiten, dass diese Rezeptoren sich selbst als Autoantigen binden.[107] Das Vorfinden identischer VDJ-Rekombinationen in CLL-Patienten, sowie der Nachweis einer strukturellen Ähnlichkeit der für die Antigenbindung bedeutsamen

CDR3-Region verschiedener CLL-Klone, untermauern die Annahme einer Stereotypie der BCR gewisser CLL-Klone.[106, 121, 124]

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Hinweise für ein stereotypes BCR-Muster auch im E μ -TCL1-Mausmodell zu finden sind und inwiefern der Knockout von NFAT2 eine mögliche Stereotypie der BCR beeinflusst. Dazu wurde der generierte NGS-Datensatz hinsichtlich der Anzahl und der Häufigkeitsverteilung der detektierten IGVH-Gene in allen drei Mauskohorten ausgewertet. Mit durchschnittlich 226 differenten IGVH-Genen je Maus konnte im WT das breiteste IGVH-Gen-Spektrum nachgewiesen werden. Demgegenüber war das Gen-Repertoire der TCL-Kohorte mit durchschnittlich 186,5 IGVH-Genen je Maus um 17,5 % vermindert. Eine weitere Einschränkung war in der TCL-KO-Kohorte festzustellen. Im Vergleich zum WT war dort das IGVH-Gen-Repertoire mit durchschnittlich 163 Genen je Maus um 27 % vermindert. Die Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass es durch die hämatologische Erkrankung im E μ -TCL1-Mausmodell zu einem eingeschränkten Repertoire an exprimierten IGVH-Genen kommt, welches durch den Knockout von NFAT2 verstärkt wird. Eine solche Interpretation steht im Einklang mit den Ergebnissen der beschriebenen Klonalitätsanalyse, auch wenn analog dazu nicht sicher auszuschließen ist, dass die verminderte Anzahl an detektierten IGVH-Genen im TCL-Modell ohne NFAT2-Knockout weniger auf die hämatologische Erkrankung als auf die verminderte Anzahl an PCR-Produkten zurückzuführen sein könnte (vgl. entsprechende Ausführung in Abschnitt 4.1 auf S. 89 dieser Diskussion).

Die detektierten IGVH-Gene wurden zudem auf die Quantität ihres Auftretens untersucht. In allen drei Genotypen zeigte sich, dass bestimmte IGVH-Gene eine erhöhte prozentuale Häufigkeit gegenüber dem Rest an registrierten IGVH-Genen aufwiesen. Während die Quantität der einzelnen Gene der beiden WT-Mäuse sowie Maus TCL # 1 vergleichbar waren, war die Quantität der beiden meistdetektierten IGVH-Gene in Maus TCL # 2 durch eine gesteigerte Häufigkeit different. Auch in den Mäusen der TCL-KO-Kohorte wurden IGVH-Gene registriert, die mit einer überproportional hohen Häufigkeit in der Basis der untersuchten IGVH-Gene auftraten. Die Ergebnisse der Quantitätsanalyse der IGVH-Gene innerhalb der WT-Kohorte

stärken die Hypothese, dass auch im physiologischen Rearrangement-Prozess verschiedene IGVH-Gene mit unterschiedlicher Häufigkeit exprimiert werden, wie es sowohl im Menschen als auch in der Maus vorbeschrieben wurde.[93, 119] Zwar konnten die von Collins et al. 2015 veröffentlichten Prozentwerte der einzelnen IGVH-Gene nicht in gleicher Form bestätigt werden [93], jedoch lag die Häufigkeit des meistdetektierten IGVH-Gens dieser Arbeit mit 11,5 % bzw. 12,5 % für WT # 1 bzw. WT # 2 in derselben Größenordnung wie das meistdetektierte IGVH-Gen bei Collins et al (10,38 %). Die Gene als solche waren indes nicht dieselben (IGHV1-64*01 bei Collins et al., IGHV6-6*01 in WT # 1 und IGHV1-53*01 in WT # 2).

Um zu prüfen, ob es durch die hämatologische Erkrankung im TCL- und TCL-KO-Modell zu einer Selektion bestimmter IGVH-Gene kommt, wurden alle IGVH-Gene, die mit einer Häufigkeit ≥ 2 % im Kollektiv der identifizierten IGVH-Gene der TCL- und TCL-KO-Kohorte auftraten, mit den IGVH-Genen des WT verglichen. In beiden TCL-Mäusen wurden einige IGVH-Gene der Häufigkeit ≥ 2 % detektiert, die nicht unter den IGVH-Genen entsprechender Häufigkeit der beiden WT-Tiere nachgewiesen werden konnten (6 von 14 IGVH-Genen für TCL # 1 bzw. 6 von 12 IGVH-Genen für TCL # 2). In der TCL-KO-Kohorte lag die Anzahl entsprechender IGVH-Gene für TCL-KO # 1 bei 5 von 8 IGVH-Genen bzw. für TCL-KO # 2 bei 4 von 9 IGVH-Genen. Der Vergleich der einzelnen Rangwerte der IGVH-Gene zwischen den TCL- bzw. TCL-KO-Tieren und den beiden WT-Mäusen zeigte, dass die Rangwerte der einzelnen Gene im WT in aller Regel deutlich höher lagen als in der jeweiligen TCL- und TCL-KO-Maus. Dies weist darauf hin, dass die im TCL- und TCL-KO-Modell identifizierten IGVH-Gene der Häufigkeit ≥ 2 % im WT physiologisch nur mit geringer Häufigkeit auftreten und erst ein Selektionsprozess zum verstärkten Auftreten der Gene im TCL- und TCL-KO-Modell führen könnte. Allerdings war bei vielen Genen innerhalb der WT-Kohorte bezüglich der Rangwerte eines IGVH-Gens als auch zwischen den gebildeten Quotienten R1 und R2²⁷ eine manifeste Differenz festzustellen, sodass in der Gesamtkonstellation aus inhomogenem Auftreten der IGVH-Gene innerhalb des WT

²⁷ Für jedes IGVH-Gen der Häufigkeit ≥ 2 %, welches nicht unter den IGVH-Genen entsprechender Häufigkeit der beiden WT-Tiere nachgewiesen werden konnten, wurde ein Quotient aus dem Prozentwert (beschreibt die Häufigkeit des IGVH-Gens im untersuchten Gen-Kollektiv) von TCL bzw. TCL-KO und dem Prozentwert von WT # 1 (ergibt Ratio 1 (R1)) sowie dem Prozentwert WT # 2 (ergibt Ratio 2 (R2)) gebildet. Nähere Erläuterungen zu den gebildeten R1 und R2 im Abschnitt 3.3.3.3 des Ergebnisteils.

bei insgesamt kleiner Fallzahl an untersuchten Mäusen Aussagen zur etwaigen Selektion einzelner IGVH-Gene im TCL- oder TCL-KO-Modell nicht näher getroffen werden können. Eine Selektion bestimmter IGVH-Gene ließ sich statistisch aufgrund der kleinen Fallzahl an untersuchten Mäusen in dieser Arbeit nicht belegen.

Ein abschließend starker Hinweis für eine vorherrschende Stereotypie der BCR im TCL-KO-Modell gelang durch den Nachweis von identischen VDJ-Rekombinationen innerhalb der beiden untersuchten TCL-KO-Mäuse. Dazu wurden alle Klone innerhalb eines Genotyps, die mit einer Häufigkeit $\geq 2\%$ im Kollektiv an untersuchten VDJ-Klonen auftraten, auf identische VDJ-Rekombinationen untersucht. In der TCL-KO-Kohorte wurden im Gegensatz zur WT- und TCL-Kohorte drei identische VDJ-Klone nachgewiesen, die in beiden Mäusen mit den Rängen # 3-5 (TCL-KO # 1) und Rängen # 1, 2 und 7 (TCL-KO # 2) eine dominante Häufigkeit aufwiesen. Obwohl in dieser Arbeit die CDR3-Regionen der identifizierten VDJ-Klone nicht näher ausgewertet wurden und die Strukturanalyse lediglich auf die schwere Kette des Immunglobulin-Rezeptors begrenzt war, kann das Vorfinden der identischen VDJ-Klone trotzdem als starkes Indiz dafür gewertet werden, dass im TCL-KO-Modell eine Stereotypie der exprimierten BCR vorherrscht und somit eine Ähnlichkeit zur beschriebenen Stereotypie der BCR in der humanen CLL besteht.[106, 121, 124]

5. Zusammenfassung

Wie Märklin et al. 2017 zeigten, präsentiert sich der Knockout von NFAT2 im E μ -TCL1-Mausmodell mit einem dramatisch akzelerierten Krankheitsverlauf bei deutlich reduzierter Überlebenserwartung der Mäuse.[74] Anhand Ca²⁺-Mobilitätsmessungen konnte eine hohe BCR-Aktivität gegenüber Stimulation im E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Modell im Gegensatz zum herkömmlichen E μ -TCL1-Modell festgestellt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Modell durch den Knockout von NFAT2 zu einem ausgeprägten oligoklonalen Muster an exprimierten BCR kommt, welches weder im WT noch im E μ -TCL1-Modell ohne NFAT2-Knockout bei gleichem Lebensalter der Mäuse beobachtet werden konnte. Da nicht auszuschließen ist, dass es zu einem späteren Zeitpunkt im E μ -TCL1-Modell zu einem ähnlich oligoklonalen BCR-Muster wie bei Tieren des E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Modells im Alter von 7 Lebensmonaten kommt, kann für den Knockout von NFAT2 aufgrund dieser Arbeit keine Kausalität hinsichtlich der klonalen Evolution im E μ -TCL1-Mausmodell beansprucht werden. Wenngleich keine Kausalität gezeigt werden konnte, so ist der Knockout von NFAT2 mit einer deutlichen Beschleunigung des klonalen Selektionsprozesses assoziiert. Da mit dem Nachweis identischer VDJ-Klone innerhalb der E μ -TCL1-NFAT2k.o.-Kohorte eine Stereotypie der BCR im Rahmen der klonalen Selektion nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass es „upstream“ der TCL1-modulierten *Akt*-Aktivität auch im transgenen E μ -TCL1-Modell zu einer Selektion von BCR kommt. Dies bestätigt die Rolle von stereotypen BCR in der Pathogenese der CLL.

Durch den Nachweis eines klonalen BCR-Musters bei Stereotypie der BCR gelang es in zwei wesentlichen Punkten, die Analogie zur humanen CLL herzustellen, wodurch die Eignung der E μ -TCL1-Maus als valides Modell für die humane CLL weiter bekräftigt wird. Die Mutationsanalyse der IGVH-Gene zeigte für das E μ -TCL-Modell unabhängig des Knockouts von NFAT2 einen unmutierten Rezeptorstatus. In der Zusammenschau aus aggressivem Krankheitsverlauf, der akzelerierten klonalen Evolution mit Hinweisen auf Stereotypie der BCR bei unmutiertem Rezeptorstatus im E μ -TCL1-NFAT2k.o.-

Modell können die Erkenntnisse dieser Arbeit als Hinweis auf eine mäßigende, bremsende Rolle von NFAT2 bezüglich der Krankheitsdynamik in der CLL gedeutet werden. Der Verlust von NFAT2 führt zur Aufhebung des regulatorischen Effekts, was sich in einer Akzeleration der Krankheitsdynamik im Sinne einer Transformation²⁸ in ein aggressives B-Zell-Lymphom widerspiegelt.

²⁸ Zur Transformation der CLL durch den Verlust von NFAT2 siehe Märklin et al. 2017. 74. Märklin, M., et al., *NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 755.

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Überlebenskurven der verschiedenen Mauslinien.....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 2: Anteil an CD5+ B-Zellen der untersuchten Milzproben.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 3: Intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration nach BCR-Stimulation.....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung eines BCR.....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der somatischen Rekombination einer Schweren Kette.....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 6: Gelbilder der PCR-Produkte "IgM-A bis IgM-F".....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 7: Plasmid-Sequenz-Analyse: VDJ-Klone und ihre absolute Anzahl.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 8: Mutierte IGVH-Gene je Genotyp (Plasmid-Sequenz-Analyse).....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 9: Mutationsstatus der IGVH-Gene.....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 10: Schematische Darstellung des Rohdaten-Processing bedingt durch die Leseweite von 2 x 75 bp der Pair-End Next-Generation-Sequenzierung</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 11: Darstellung der Anzahl an unterschiedlichen VDJ-Klonen je untersuchter Maus.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 12: Kumulative prozentuale Darstellung der detektierten VDJ-Klone.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 13: Identische VDJ-Klone in Mäusen des TCL-KO-Modells.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 14: Darstellung der Anzahl an unterschiedlichen IGVH-Genen je untersuchter Maus.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 15: Kumulative prozentuale Darstellung der detektierten IGVH-Gene.....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 16: Differente IGVH-Gene im TCL- und TCL-KO-Modell im Vergleich zum WT.....</i>	<i>83</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Ig-Mouse Primer Set (Novagen) zur Ampflikation von IgM</i>	35
<i>Tabelle 2: Mausliste - Projektübersicht</i>	47
<i>Tabelle 3: Genbezeichnung der VDJ-Klone für WT # 1.....</i>	50
<i>Tabelle 4: Genbezeichnung der VDJ-Klone für WT # 2.....</i>	52
<i>Tabelle 5: Genbezeichnung der VDJ-Klone für TCL # 1</i>	54
<i>Tabelle 6: Genbezeichnung der VDJ-Klone für TCL # 2</i>	55
<i>Tabelle 7: Genbezeichnung der VDJ- Klone für TCL-KO # 1</i>	56
<i>Tabelle 8: Genbezeichnung der VDJ-Klone für TCL-KO # 2</i>	56
<i>Tabelle 9: Statistik zu IGVH-Gen-Mutationsanalyse</i>	60
<i>Tabelle 10: Übersicht über den Verlauf des Datenvolumens des NGS-Rohdatensatzes bis hin zur Auswertungsbasis.....</i>	65
<i>Tabelle 11: Prozentuale Häufigkeit der 20 häufigsten VDJ-Klone.....</i>	69
<i>Tabelle 12: Gemeinsamer Anteil der Hauptklone an Gesamtheit aller VDJ-Klone</i>	70
<i>Tabelle 13: Übersicht über die Klone, die auf identische VDJ-Rekombinationen überprüft wurden</i>	74
<i>Tabelle 14: Detektierte Anzahl an unterschiedlichen IGVH-Genen je Maus</i>	76
<i>Tabelle 15: Prozentuale Häufigkeit der 20 häufigsten IGVH-Gene</i>	79
<i>Tabelle 16: Gemeinsamer Anteil der IGVH-Gene "erhöhter Häufigkeit" an der Gesamtheit aller IGVH-Gene</i>	80
<i>Tabelle 17: Vergleich der IGVH-Gene "Häufigkeit $\geq 2\%$" zwischen WT, TCL- und TCL-KO-Kohorte.....</i>	81
<i>Tabelle 18: Vergleich bestimmter IGVH-Gene zwischen der TCL- /TCL-KO-Kohorte und dem WT</i>	85

Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten, R.K.I. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_node.html. 2014 06.12.2017.
2. Dores, G.M., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology*. Br J Haematol, 2007. **139**(5): p. 809-19.
3. Zenz, T., et al., *From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 37-50.
4. Shanafelt, T.D., et al., *Age at diagnosis and the utility of prognostic testing in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Cancer, 2010. **116**(20): p. 4777-87.
5. Nabhan, C. and S.T. Rosen, *Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review*. JAMA, 2014. **312**(21): p. 2265-76.
6. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2375-90.
7. Jaffe, E., Harris NL., Stein H., Vardiman JW., *Pathology and Genetics of Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. WHO Classification of Tumors. 2001, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
8. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5446-56.
9. Ginaldi, L., et al., *Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias*. J Clin Pathol, 1998. **51**(5): p. 364-9.
10. Moreau, E.J., et al., *Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b)*. Am J Clin Pathol, 1997. **108**(4): p. 378-82.
11. McCarron, K.F., J.P. Hammel, and E.D. Hsi, *Usefulness of CD79b expression in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders*. Am J Clin Pathol, 2000. **113**(6): p. 805-13.
12. Marti, G.E., et al., *Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis*. Br J Haematol, 2005. **130**(3): p. 325-32.
13. Rawstron, A.C., et al., *Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts*. Blood, 2002. **100**(2): p. 635-9.
14. Ghia, P., et al., *Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2337-42.
15. Rawstron, A.C., et al., *Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2008. **359**(6): p. 575-83.
16. Herold, G., *Herold Innere Medizin*, ed. G. Köln: Herold. 2017, München: Elsevier ; © 2017. 994.
17. Kay, N.E., *Predicting clinical outcome in B-chronic lymphocytic leukemia*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2012: p. 394-8.
18. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. **46**(2): p. 219-34.

19. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. *Cancer*, 1981. **48**(1): p. 198-206.
20. Parikh, S.A., et al., *Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis*. *Blood*, 2016. **127**(14): p. 1752-60.
21. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
22. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 1840-7.
23. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(26): p. 1910-6.
24. Eyre, T.A. and A. Schuh, *An update for Richter syndrome - new directions and developments*. *Br J Haematol*, 2017.
25. Rossi, D. and G. Gaidano, *Richter syndrome: pathogenesis and management*. *Semin Oncol*, 2016. **43**(2): p. 311-9.
26. Rossi, D., V. Spina, and G. Gaidano, *Biology and treatment of Richter syndrome*. *Blood*, 2018. **131**(25): p. 2761-2772.
27. Padma, V.V., *An overview of targeted cancer therapy*. *Biomedicine (Taipei)*, 2015. **5**(4): p. 19.
28. *Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials*. *CLL Trialists' Collaborative Group*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(10): p. 861-8.
29. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment*. *Am J Hematol*, 2017. **92**(9): p. 946-965.
30. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 278-87.
31. Perosa, F., et al., *CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases*. *Autoimmun Rev*, 2005. **4**(8): p. 526-31.
32. Grillo-Lopez, A.J., et al., *Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma*. *Semin Oncol*, 1999. **26**(5 Suppl 14): p. 66-73.
33. Czuczman, M.S., et al., *Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(1): p. 268-76.
34. Byrd, J.C., et al., *Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011*. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 49-53.
35. Sharma, S. and K.R. Rai, *Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options*. *Cancer*, 2019.
36. Lozanski, G., et al., *Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions*. *Blood*, 2004. **103**(9): p. 3278-81.
37. Stevenson, F.K., et al., *B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2011. **118**(16): p. 4313-20.

38. Jerkeman, M., et al., *Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies*. J Intern Med, 2017.
39. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment*. Am J Hematol, 2015. **90**(5): p. 446-60.
40. *Venetoclax Yields Strong Responses in CLL*. Cancer Discov, 2016. **6**(2): p. 113-4.
41. Shustik, C., et al., *Advances in the treatment of relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia*. Ann Hematol, 2017.
42. Shaw, J.P., et al., *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science, 1988. **241**(4862): p. 202-5.
43. Muller, M.R. and A. Rao, *NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 645-56.
44. Mancini, M. and A. Toker, *NFAT proteins: emerging roles in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 810-20.
45. McCaffrey, P.G., et al., *Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp*. Science, 1993. **262**(5134): p. 750-4.
46. Northrop, J.P., et al., *NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation*. Nature, 1994. **369**(6480): p. 497-502.
47. Hoey, T., et al., *Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins*. Immunity, 1995. **2**(5): p. 461-72.
48. Lopez-Rodriguez, C., et al., *NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7214-9.
49. Miyakawa, H., et al., *Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2538-42.
50. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
51. Beals, C.R., et al., *Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1930-4.
52. Okamura, H., et al., *A conserved docking motif for CKI binding controls the nuclear localization of NFAT1*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4184-95.
53. Berland, R. and H.H. Wortis, *Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13459-64.
54. Winslow, M.M., et al., *The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B cell responses*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 141-52.
55. Hayakawa, K., et al., *The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice*. J Exp Med, 1983. **157**(1): p. 202-18.
56. Kantor, A.B., et al., *Adoptive transfer of murine B-cell lineages*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **651**: p. 168-9.
57. Neal, J.W. and N.A. Clipstone, *A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17246-54.
58. Shou, J., et al., *Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment*. Cancer Lett, 2015. **361**(2): p. 174-84.

59. Tripathi, P., et al., *Activation of NFAT signaling establishes a tumorigenic microenvironment through cell autonomous and non-cell autonomous mechanisms*. *Oncogene*, 2014. **33**(14): p. 1840-9.
60. Gregory, M.A., et al., *Wnt/Ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph+ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(1): p. 74-87.
61. Robbs, B.K., et al., *Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(23): p. 7168-81.
62. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
63. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. *Cancer Res*, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
64. Jauliac, S., et al., *The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(7): p. 540-4.
65. Chen, Z.L., et al., *Expression and unique functions of four nuclear factor of activated T cells isoforms in non-small cell lung cancer*. *Chin J Cancer*, 2011. **30**(1): p. 62-8.
66. Liu, J.F., S.H. Zhao, and S.S. Wu, *Depleting NFAT1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human lung cancer cells*. *Cancer Cell Int*, 2013. **13**(1): p. 41.
67. Fougere, M., et al., *NFAT3 transcription factor inhibits breast cancer cell motility by targeting the Lipocalin 2 gene*. *Oncogene*, 2010. **29**(15): p. 2292-301.
68. Bichi, R., et al., *Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(10): p. 6955-60.
69. Virgilio, L., et al., *Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12530-4.
70. Pekarsky, Y., C. Hallas, and C.M. Croce, *The role of TCL1 in human T-cell leukemia*. *Oncogene*, 2001. **20**(40): p. 5638-43.
71. Narducci, M.G., et al., *TCL1 is overexpressed in patients affected by adult T-cell leukemias*. *Cancer Res*, 1997. **57**(24): p. 5452-6.
72. Said, J.W., et al., *TCL1 oncogene expression in B cell subsets from lymphoid hyperplasia and distinct classes of B cell lymphoma*. *Lab Invest*, 2001. **81**(4): p. 555-64.
73. Sternberg, N. and D. Hamilton, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites*. *J Mol Biol*, 1981. **150**(4): p. 467-86.
74. Marklin, M., et al., *NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 755.
75. Marklin, M., *Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL*, M.-N.F.d.E.K.U. Tübingen, Editor. 2015: Tübingen. p. 137.
76. Lüllmann-Rauch, R., *Lymphatische Organe*, in *Histologie*, R. Lüllmann-Rauch, Editor. 2009, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 287-329.
77. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Grundlagen der angeborenen und der erworbenen Immunität*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 5-37.
78. Kearney, J.F., *Development and Function of B Cell Subsets*, in *Molecular Biology of B Cells*, F.W.A. T. Honjo, M.S. Neuberger, Editor. 2004, Elsevier Academic Press: London. p. 155-160.

79. Martin, F. and J.F. Kearney, *B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 70-9.
80. Martin, F. and J.F. Kearney, *Marginal-zone B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 323-35.
81. Krop, I., et al., *Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19*. Eur J Immunol, 1996. **26**(1): p. 238-42.
82. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Überleben und Heranreifen von Lymphozyten in den peripheren Lymphgeweben*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 378-391.
83. Yenson, V. and N. Baumgarth, *Purification and immune phenotyping of B-1 cells from body cavities of mice*. Methods Mol Biol, 2014. **1190**: p. 17-34.
84. Hardy, R.R., *B-1 B cell development*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 2749-54.
85. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Die Struktur eines typischen Antikörpermoleküls*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 143-150.
86. M. Reth, J.W., *Structure and Function of B Cell Antigen Receptor Complexes*, in *Molecular Biology of B Cells*, F.W.A. T. Honjo, M.S. Neuberger, Editor. 2004, Elsevier Academic Press: London. p. 161-169.
87. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Die Wechselwirkung des Antikörpermoleküls mit einem spezifischen Antigen*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 151-156.
88. Saada, R., et al., *Models for antigen receptor gene rearrangement: CDR3 length*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(4): p. 323-32.
89. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Signale der Antigenrezeptoren und die Aktivierung von Lymphozyten*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 286-308.
90. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Primäre Umlagerung von Immunglobulingenen*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 182-198.
91. Matsuda, F., *Human Immunoglobulin Heavy Chain Locus*, in *Molecular Biology of B Cells*, F.W.A. T. Honjo, M.S. Neuberger, Editor. 2004, Elsevier Academic Press: London. p. 1-17.
92. Riblet, R., *Immunoglobulin Heavy Chain Genes of Mouse*, in *Molecular Biology of B Cells*, F.W.A. T. Honjo, M.S. Neuberger, Editor. 2004, Elsevier Academic Press: London. p. 19-26.
93. Collins, A.M., et al., *The mouse antibody heavy chain repertoire is germline-focused and highly variable between inbred strains*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015. **370**(1676).
94. Langerak, A.W., et al., *EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations*. Leukemia, 2012. **26**(10): p. 2159-71.
95. J. Sekiguchi, F.W.A., M. Oettinger, *The Mechanism of V(D)J Recombination*, in *Molecular Biology of B Cells*, F.W.A. T. Honjo, M.S. Neuberger, Editor. 2004, Elsevier Academic Press: London. p. 61-82.
96. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Entwicklung der B-Lymphozyten*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 327-345.

97. Agrawal, S., et al., *Transitional B cell subsets in human bone marrow*. Clin Exp Immunol, 2013. **174**(1): p. 53-9.
98. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Strukturvariationen der konstanten Immunglobulinregionen*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 203-211.
99. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Sekundäre Diversifikation des Antikörperrepertoires*, in *Janeway Immunologie*, P.T. K. Murphy, M. Walport, Editor. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 211-221.
100. Methot, S.P. and J.M. Di Noia, *Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination*. Adv Immunol, 2017. **133**: p. 37-87.
101. De Silva, N.S. and U. Klein, *Dynamics of B cells in germinal centres*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 137-48.
102. Giudicelli, V. and M.P. Lefranc, *Ontology for immunogenetics: the IMGT-ONTOLOGY*. Bioinformatics, 1999. **15**(12): p. 1047-54.
103. Harrell, F.E.J., *Harrell Miscellaneous*. 2018, 4.1-1: p. 351.
104. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 621-8.
105. ran-seqblog. <https://www.rna-seqblog.com/rpkm-fpkm-and-tpm-clearly-explained/>. 2015 [cited 2018 08.12.2018].
106. Stamatopoulos, K., et al., *Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations*. Blood, 2007. **109**(1): p. 259-70.
107. Minici, C., et al., *Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15746.
108. Arnason, J.E. and J.R. Brown, *Targeting B Cell Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Curr Oncol Rep, 2017. **19**(9): p. 61.
109. Noguchi, M., et al., *Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt*. FASEB J, 2007. **21**(10): p. 2273-84.
110. Pabst, O., H. Hazanov, and R. Mehr, *Old questions, new tools: does next-generation sequencing hold the key to unraveling intestinal B-cell responses?* Mucosal Immunol, 2015. **8**(1): p. 29-37.
111. Greiff, V., et al., *Bioinformatic and Statistical Analysis of Adaptive Immune Repertoires*. Trends Immunol, 2015. **36**(11): p. 738-49.
112. Yan, X.J., et al., *B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11713-8.
113. Laffleur, B., et al., *AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate*. Oncotarget, 2014. **5**(5): p. 1118-31.
114. Schroeder, H.W., Jr. and G. Dighiero, *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire*. Immunol Today, 1994. **15**(6): p. 288-94.
115. Bomben, R., et al., *Mutational status of IgV(H) genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and prognosis: percent mutations or antigen-driven selection?* Leukemia, 2005. **19**(8): p. 1490-2.
116. Dominguez, P.M. and R. Shaknovich, *Epigenetic function of activation-induced cytidine deaminase and its link to lymphomagenesis*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 642.

117. Fais, F., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors*. J Clin Invest, 1998. **102**(8): p. 1515-25.
118. Widhopf, G.F., 2nd, et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2499-504.
119. Brezinschek, H.P., et al., *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**(10): p. 2488-501.
120. Duke, V.M., et al., *V(H) gene usage differs in germline and mutated B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2003. **88**(11): p. 1259-71.
121. Maurer, K., et al., *Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2005. **129**(4): p. 499-510.
122. Scarfo, L., A.J. Ferreri, and P. Ghia, *Chronic lymphocytic leukaemia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **104**: p. 169-82.
123. Duhren-von Minden, M., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 309-12.
124. Agathangelidis, A., et al., *Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies*. Blood, 2012. **119**(19): p. 4467-75.

Anhang

Die in dieser Arbeit generierten DNA-Sequenzierungsdaten wurden online in Gendatenbanken hinterlegt. Die Plasmidsequenzen können bei NCBI GenBank mit den Zugangsnummern BankIt2095645: MH115010-MH115189 eingesehen werden. Die NGS-Daten wurden im European Nucleotide Archive (ENA) unter www.ebi.ac.uk/ena mit der Zugangsnummer PRJEB25107 eingestellt.

Erklärung zum Eigenanteil

Herr D. J. Müller war für alle labortechnischen Arbeitsschritte ab Generierung der tiefgefrorenen Splenozyten-Zellpellets verantwortlich. Er führte eigenständig und selbstverantwortlich die Aufarbeitung der Splenozyten-DNA zur Sequenzierung mittels NGS und Sanger-Sequenzierung durch (mRNA-Isolation, cDNA-Synthese, Durchführung der PCRs, Aufreinigung der PCR-Produkte, Fotodokumentation der Gelbilder, Klonierung der PCR-Produkte in *E. coli*-Bakterien, Kultivieren von *E. coli*-Kolonien, DNA-Isolation aus *E. coli*-Kulturen). Die Organisation der Sequenzierung, das Versenden der DNA-Proben und Entgegennehmen der Sequenzierungsergebnisse waren in seiner Verantwortung. D. J. Müller führte die Analyse der DNA-Sequenzen mittels des IMGT/V-Quest (Sanger-Sequenzierung) und IMGT/HighV-Quest (NGS) Online Tools sowie alle Filterschritte und die Auswertung der Plasmid-Alignmentergebnisse durch. Er übernahm die Koordination der bioinformatischen Interpretation des NGS-Datensatzes und wertete die Alignmentergebnisse des NGS-Datensatzes nach durchgeführten Filterschritten weiter aus. Die Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Ausnahme von Abb. 1 und 3 von ihm erstellt. Die Daten für Abb. 2 stellte M. Märklin zur Verfügung. D. J. Müller war an der Konzeption der Studie maßgeblich beteiligt. Die Dissertationsschrift wurde selbständig von ihm verfasst.

Frau Dr. M. Märklin übernahm und organisierte im Vorfeld der Studie die Mausezucht. Sie und das Labor team führten die Präparation der Mausekadaver sowie das Erstellen der tiefgefrorenen Zellpellets aus Splenozyten durch. M. Märklin erstellte bis auf wenige Modifikationen Abb. 1 und 3 und lieferte die Daten für Abb. 2. Sie betreute die labortechnische Durchführung dieses Projekts, trug maßgeblich zur Konzeption der Studie bei und korrigierte das Manuskript.

Herr Dr. S. Wirths und Herr PD Dr. Dr. M. Müller waren maßgeblich an der Konzeption der Studie beteiligt; sie betreuten die Arbeit und korrigierten das Manuskript.

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde als Dienstleistung durch das Biotechnologieunternehmen 4base lab GmbH, Reutlingen durchgeführt. Die Sequenzierung mittels NGS wurde als Dienstleistung durch das Biotechnologieunternehmen c.ATG, Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik Tübingen, durchgeführt. Das Processing der Rohdaten sowie die Filterung der Alignmentergebnisse der NGS-Daten erfolgte durch die Bioinformatik des c.ATG-Unternehmens.

Die statistische Auswertung der Mutationsanalyse der IGVH-Gene wurde unter der Koordination von D. J. Müller von Herrn Dr. C. Müller (ehem. Universität Mannheim, Department of Economics) vorgenommen.

Die aus dem Dissertationsprojekt hervorgehende Publikation "*Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia.*" *J Leukoc Biol.* 2019 Mar;105(3):531-538 wurde von D. J. Müller gemeinsam mit S. Wirths, A. R. Fuchs, M. Märklin, J. S. Heitmann, M. Sturm, M. Haap, A. Kirschniak, Y. Sasaki, L. Kanz, H-G. Kopp und M. R. Müller verfasst. Die in der Publikation enthaltenen Graphiken wurden von D. J. Müller erstellt.

Ich, David Johannes Müller, versichere abschließend, diese Dissertationsschrift selbständig nach bestem Wissen verfasst zu haben. Alle Quellen, die ich für das Erstellen dieser Arbeit verwendet habe, wurden im Literaturverzeichnis bzw. an entsprechender Stelle im Text zitiert. Ich versichere, dass die Regeln zur "Guten Wissenschaftlichen Praxis" der Medizinischen Fakultät Tübingen bei Erstellung dieser Arbeit von mir gewissenhaft befolgt wurden.

Tübingen, den 27. März 2019

David Johannes Müller

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Müller DJ, Wirths S, Fuchs AR, et al. **Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia.** *J Leukoc Biol.* 2019 Mar;105(3):531-538 (<https://doi.org/10.1002/JLB.2AB0218-076RR>)

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in Form von Kongressbeiträgen veröffentlicht:

- Jahrestagung der American Society of Hematology, *ASH 2016*, San Diego, CA, Dezember 2016, Posterpräsentation Paper #4369: "**Loss of NFAT2 Leads to an Acceleration of Clonal Evolution in CLL**"

- Jahrestagung der DGHO, OeGHO, SSMO und SGHSSH, Leipzig, Oktober 2016, Vortrag V57: "**Der Verlust von NFAT2 führt zu einer Beschleunigung der klonalen Evolution bei der CLL**"

Danksagung

Ich werde meinen Lehrerinnen und Lehrern die ihnen gebührende Achtung und Dankbarkeit erweisen.

(Satz 2 des Gelöbnisses des Weltärztebundes, Deklaration von Genf)

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Martin Müller und meinem Betreuer Dr. Stefan Wirths für die hervorragende Betreuung und Begleitung während meiner Promotion bedanken. Beim Bearbeiten meines Promotionsprojekts wurde ich fachlich sehr gut betreut, gefördert und bei Entscheidungen bezüglich des Vorgehens im Projekt tatkräftig unterstützt, wobei ich immer großzügigen Freiraum zur selbstverantwortlichen Gestaltung und Umsetzung meines Projekts, sowie die Möglichkeit zum Einbringen eigener Ideen hatte. Neben der fachlich exzellenten Betreuung möchte ich mich zudem für den sehr angenehmen, motivierenden und wertschätzenden Umgang, sowie die einmalige Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Arbeit auf internationalen Konferenzen präsentieren zu können, herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Melanie Märklin, die mir während meiner Laborzeit eine ausgezeichnete Betreuerin im Labor war. Vielen Dank für alles Erklären und Einarbeiten in das methodische Arbeiten, für alle Hilfe und Ratschläge beim praktischen Durchführen der Versuche und für die gute, sehr nette und humorvolle Zusammenarbeit.

Auch bei der gesamten Arbeitsgruppe und dem Laborteam um Alexander Fuchs, Jonas Heitmann, Elke Malenke, Dr. Stefanie Bugl, Natalia Rehband und Manuela Ganser möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit der letzten 4 Jahre bedanken. Ohne euch wäre meine Zeit im Labor nicht zu dem geworden, was sie geworden ist.

Dem IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen (Antragsnummer PK 2015-1-20) danke ich für die finanzielle Förderung und wissenschaftlich-ideelle Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Herrn Dr. Cornelius Müller danke ich für die hilfreiche Diskussion statistischer Fragen bezüglich der Projektdaten.

Neben meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich bei meinen fünf tollen Geschwistern und deren Familien für die schöne Zeit und das gute Verhältnis, das wir bisher miteinander hatten und haben, bedanken. Oft muss ich denken, was für ein Glückspilz man ist, eine Familie wie euch zu haben.

Ein besonders liebevoller Dank gilt meiner wundervollen Partnerin Meike, die mir zum größten Geschenk meiner zurückliegenden Zeit in Tübingen wurde. Vielen Dank für alles, insbesondere auch für dein Verständnis meines Forschungsinteresses und deine Unterstützung in dem (mitunter auch mühsamen) Prozess zur Erstellung meiner Publikation.

Nicht zuletzt geht mein großer und herzlicher Dank an meine Freunde, die mich bisher in meinem Leben begleitet haben. Sei es in meiner Kindheit und Jugend, während meines FSJ oder in den letzten Jahren hier in Tübingen. Ihr alle macht mein Leben reich und ich bin dankbar, euch als Freunde zu haben und zu wissen.

Passend zur methodischen Grundlage meiner Arbeit - der Untersuchung und Interpretation von DNA - möchte ich diese Danksagung mit Worten des renommierten Genetikers Francis S. Collins, dem ehem. Leiter des weltweiten Humangenomprojekts und aktuellen Direktor der National Institutes of Health der USA schließen, mit welchen Collins seinen Respekt und Ehrfurcht vor dem Einen zum Ausdruck bringt, von dem auch ich mich reich gesegnet sehe und dem ich alles zu verdanken habe.

“The God of the Bible is also the God of the genome. He can be worshipped in the cathedral or in the laboratory. His creation is majestic, awesome, intricate, and beautiful.”

(Francis S. Collins)