

*Praktikum Stammzellbiologie 2004,  
Praktikumsteil „DNA Rekombination im Immunsystem“*

**Zeitplan 27. bis 29. September**

**Montag, 27. September**

- 10 Vorbesprechung
- 11 Ansetzen von Oberflächenmarkierungen
- 12 von Lymphozytenpopulationen
- 13 Mittagspause
- 14 Durchflußzytometrie (FACS)
- 15 FACS
- 16 Theorie: Antigenrezeptoren, Signaltransduktion

**Dienstag, 28. September**

- 10 Vorbesprechung
- 11 PCR-Amplifikation von  $V_H-D_HJ_H$  Genumlagerungen
- 12 PCR-Amplifikation von  $V_K-J_K$  und  $V_\lambda-J_\lambda$  Genumlagerungen
- 13 Mittagspause
- 14 Gelelektrophorese von PCR-Produkten
- 15 Klonierung von PCR-Produkten ( $V_H-D_HJ_H$  Genumlagerungen)
- 16 Klonierung von PCR-Produkten ( $V_K-J_K$  und  $V_\lambda-J_\lambda$  Genumlagerungen)
- 17 Theorie: Molekularbiologie der frühen Lymphozytenentwicklung

**Mittwoch, 29. September**

- 10 Vorbesprechung
- 11 PCR-Amplifikation von IGH  $C\delta$ ,  $C\mu$ ,  $C\gamma$ ,  $C\alpha$ ,  $C\epsilon$  Genumlagerungen
- 12 Untersuchung von Bakterienklonen mit PCR
- 13 Mittagspause
- 14 Gelelektrophorese von PCR-Produkten
- 15 Klonierung von PCR-Produkten (IGH  $C\delta$ ,  $C\mu$ ,  $C\gamma$ ,  $C\alpha$ ,  $C\epsilon$  Genumlagerungen)
- 16 Sequenzierungsreaktion ( $V_H-D_HJ_H$ ,  $V_K-J_K$  und  $V_\lambda-J_\lambda$  Genumlagerungen)
- 17 Theorie: Somatische Hypermutation, Immunglobulinklassenwechsel

## Zeitplan 30. September bis 8. Oktober

### Donnerstag, 30. September

- 10 Vorbesprechung
- 11 PCR-Amplifikation von Differenzierungsstadien-abhängigen Transkriptionsfaktoren
- 12 Untersuchung von Bakterienklonen mit PCR (*IGH* C $\delta$ , C $\mu$ , C $\gamma$ , C $\alpha$ , C $\epsilon$  Genumlagerungen)
- 13 Mittagspause
- 14 Gelelektrophorese von PCR-Produkten
- 15 Sequenzierungsreaktion (*IGH* C $\delta$ , C $\mu$ , C $\gamma$ , C $\alpha$ , C $\epsilon$  Genumlagerungen)
- 16 Theorie: Sequenzanalyse von Immunglobulin-Genen
- 17 Sequenzanalyse von V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>, V $\kappa$ -J $\kappa$  und V $\lambda$ -J $\lambda$  Genumlagerungen

### Freitag, 1. Oktober

- 10 Vorbesprechung
- 11 Sequenzanalyse von V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>, V $\kappa$ -J $\kappa$  und V $\lambda$ -J $\lambda$  Genumlagerungen
- 12 Übersicht über bisherige Ergebnisse: Transkriptionsfaktoren, Immunglobulin-Genumlagerungen
- 13 Abschlußbesprechung

### Freitag, 8. Oktober

- 14 Vorbesprechung
- 15 Sequenzanalyse von *IGH* C $\delta$ , C $\mu$ , C $\gamma$ , C $\alpha$ , C $\epsilon$  Genumlagerungen
- 16 Testat

### Kontakt: Abteilung für Molekulare Stammzellbiologie

Univ.-Prof. Dr. Markus Mueschen, 0211-811-9964, [markus.mueschen@uni-duesseldorf.de](mailto:markus.mueschen@uni-duesseldorf.de)

Dipl.-Biol. Niklas Feldhahn, [niklas.feldhahn@uni-duesseldorf.de](mailto:niklas.feldhahn@uni-duesseldorf.de)

Dipl.-Biol. Stefanie Liedtke, [stefanie.liedtke@uni-duesseldorf.de](mailto:stefanie.liedtke@uni-duesseldorf.de)

Dipl.-Biol. Mieke Sprangers, [mieke.sprangers@uni-duesseldorf.de](mailto:mieke.sprangers@uni-duesseldorf.de)

Jana Mooster BSc, [jana.mooster@uni-duesseldorf.de](mailto:jana.mooster@uni-duesseldorf.de)

Peter Wurst, [peter.wurst@uni-duesseldorf.de](mailto:peter.wurst@uni-duesseldorf.de)

Stefanie Jauch, [Stefanie.jauch@uni-duesseldorf.de](mailto:Stefanie.jauch@uni-duesseldorf.de)

Weitere Informationen: <http://www.lymphocytes.de/>

## Tag I

### *Durchflußzytometrische Analyse (FACS) der Expression von Oberflächenantigenen auf Lymphozytenpopulationen*

#### **Verwendete Antikörper: Konfiguration von Oberflächen-Immunglobulin**

Anti-VpreB Surrogat-Leichtkette prä-B Zellen (PE)

Anti-Ig $\kappa$   $\kappa$ -Leichtkette Reife B Zellen (PE)

Anti-Ig $\lambda$   $\lambda$ -Leichtkette Reife B Zellen (FITC)

Anti-IgD Ig-Isotyp Naive B Zellen (FITC)

Anti-IgM Ig-Isotyp Reife B Zellen (PE)

Anti-IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 Ig-Isotypen Memory-B Zellen und Plasmazellen (nur sekretorisch)

Anti-IgA (Schleimhaut-Ig) Ig-Isotypen Memory-B Zellen und Plasmazellen (nur sekretorisch)

Anti-IgE (Allergie-assoziiert) Ig-Isotypen Memory-B Zellen und Plasmazellen (nur sekretorisch)

Anti-CD19 alle B Zellen (FITC, PE)

Anti-CD5 B1 Zellen (FITC)

Anti-CD27 Memory-B Zellen, Plasmazellen (FITC, PE)

Anti-CD40 Keimzentrums-B Zellen (FITC)

Anti-CD138 Plasmazellen (PE)

#### **Verwendete Zelllinien**

Granta-519

HBL-2

IL7RA-/-

Jeko-1

JJN3

JVM-2

Kiel

LP1

NCEB-1

SP49

SP53

U266

#### **Kombination der verwendeten Antikörper**

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, grün) und Phycoerythrin (PE, rot) markierte Antikörper

#### **Einstellungsfärbungen**

Tube Nr.	Zelllinie	FITC	PE	Data
1	Jeko-1	-	-	1
2	Jeko-1	-	CD19	2
3	Jeko-1	CD19	-	3
4	Jeko-1	CD19	CD19	4

## Tag I (Fortsetzung)

Durchflußzytometrische Analyse (FACS) der Expression von Oberflächenantigenen auf Lymphozytenpopulationen

Tube Nr.	Zelllinie	FITC	PE	Data
5	Granta-519	IgM	vpreB	5
6	HBL-2	IgM	vpreB	6
7	IL7RA-/-	IgM	vpreB	7
8	Jeko-1	IgM	vpreB	8
9	JJN-3	IgM	vpreB	9
10	JVM-2	IgM	vpreB	10
11	KIEL	IgM	VpreB	11
12	LP-1	IgM	vpreB	12
13	NCEB-1	IgM	vpreB	13
14	SP49	IgM	vpreB	14
15	SP53	IgM	vpreB	15
16	U-266	IgM	vpreB	16
17	Granta-519	λ	κ	17
18	HBL-2	λ	κ	18
19	IL7RA-/-	λ	κ	19
20	Jeko-1	λ	κ	20
21	JJN-3	λ	κ	21
22	JVM-2	λ	κ	22
23	KIEL	λ	κ	23
24	LP-1	λ	κ	24
25	NCEB-1	λ	κ	25
26	SP49	λ	κ	26
27	SP53	λ	κ	27
28	U-266	λ	κ	28
29	Granta-519	CD5	CD19	29
30	HBL-2	CD5	CD19	30
31	IL7RA-/-	CD5	CD19	31
32	Jeko-1	CD5	CD19	32
33	JJN-3	CD5	CD19	33
34	JVM-2	CD5	CD19	34
35	Kiel	CD5	CD19	35
36	LP-1	CD5	CD19	36
37	NCEB-1	CD5	CD19	37
38	SP49	CD5	CD19	38
39	SP53	CD5	CD19	39
40	U-266	CD5	CD19	40
41	Granta-519	CD27	CD138	41
42	HBL-2	CD27	CD138	42
43	IL7RA-/-	CD27	CD138	43
44	Jeko-1	CD27	CD138	44
45	JJN-3	CD27	CD138	45
46	JVM-2	CD27	CD138	46
47	Kiel	CD27	CD138	47
48	LP-1	CD27	CD138	48
49	NCEB-1	CD27	CD138	49
50	SP49	CD27	CD138	50
51	SP53	CD27	CD138	51
52	U-266	CD27	CD138	52

## Tag I (Fortsetzung)

*Durchflußzytometrische Analyse (FACS) der Expression von Oberflächenantigenen auf Lymphozytenpopulationen*

Tube Nr.	Zelllinie	FITC	PE	Data
53	Granta-519	IgD	IgG	53
54	HBL-2	IgD	IgG	54
55	IL7RA-/-	IgD	IgG	55
56	Jeko-1	IgD	IgG	56
57	JJN-3	IgD	IgG	57
58	JVM-2	IgD	IgG	58
59	Kiel	IgD	IgG	59
60	LP-1	IgD	IgG	60
61	NCEB-1	IgD	IgG	61
62	SP49	IgD	IgG	62
63	SP53	IgD	IgG	63
64	U-266	IgD	IgG	64
65	Granta-519	CD40	IgA	65
66	HBL-2	CD40	IgA	66
67	IL7RA-/-	CD40	IgA	67
68	Jeko-1	CD40	IgA	68
69	JJN-3	CD40	IgA	69
70	JVM-2	CD40	IgA	70
71	Kiel	CD40	IgA	71
72	LP-1	CD40	IgA	72
73	NCEB-1	CD40	IgA	73
74	SP49	CD40	IgA	74
75	SP53	CD40	IgA	75
76	U-266	CD40	IgA	76
77	Granta-519	IgE	CD38	77
78	HBL-2	IgE	CD38	78
79	IL7RA-/-	IgE	CD38	79
80	Jeko-1	IgE	CD38	80
81	JJN-3	IgE	CD38	81
82	JVM-2	IgE	CD38	82
83	Kiel	IgE	CD38	83
84	LP-1	IgE	CD38	84
85	NCEB-1	IgE	CD38	85
86	SP49	IgE	CD38	86
87	SP53	IgE	CD38	87
88	U-266	IgE	CD38	88

## Tag I (Fortsetzung)

### *Durchflußzytometrische Analyse (FACS) der Expression von Oberflächenantigenen auf Lymphozytenpopulationen*

#### **Färbeprotokoll**

Zellen bei 3.000 rpm (kleine Tischzentrifuge) für 2 Minuten abzentrifugieren.

Überstand verwerfen, Zellen mit Drahtgitter resuspendieren

Je Zelllinie insgesamt 7 Färbeansätze zu je 20 µl Zellsuspension vorbereiten (140 µl plus Reserve also etwa 160 µl), also für 12 Zelllinien insgesamt 84 Färbungen und 4 Färbungen für FACS-Einstellungen (mit Jeko1-Zellen)

Je 2 µl des FITC- und 2 µl des PE-markierten Antikörpers oder 2 µl eines unkonjugierten Primärantikörpers hinzufügen

15 Minuten bei Raumtemperatur auf Schüttler inkubieren

In 300 µl PBS (für FACS, mit EDTA) resuspendieren, Zellen bei 3.000 rpm (kleine Tischzentrifuge) für 2 Minuten abzentrifugieren.

Überstand verwerfen, Zellen mit Drahtgitter resuspendieren

#### Bei unkonjugierten Primärantikörpern zusätzlich:

je 2 µl des FITC- bzw. 2 µl des PE-markierten Sekundärantikörpers hinzufügen

15 Minuten bei Raumtemperatur auf Schüttler inkubieren

In 300 µl PBS (für FACS, mit EDTA) resuspendieren

Zellen bei 3.000 rpm (kleine Tischzentrifuge) für 2 Minuten abzentrifugieren, Überstand verwerfen

#### Für alle Antikörpermarkierungen:

Propidiumjodid (PJ)-Stammlösung (0,1 mg/ml) 1:500 in PBS verdünnen

Zellen in PJ/PBS Lösung resuspendieren und in FACS-Meßröhrchen überführen

#### **Normale Populationen: Polyklonal**

##### *Knochenmark*

Prä-B Zellen: CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, VpreB<sup>+</sup>

##### *Peripheres Blut*

Naive B Zellen: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>

Memory-B Zellen: CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>, IgG<sup>+</sup>

##### *Lymphknoten, Tonsillen, Milz*

Keimzentrums B Zellen CD19<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, Ig-Isotypen variabel

#### **Leukämien: Klonal**

##### *Knochenmark, Peripheres Blut*

Prä-B akute lymphoblastische Leukämie: CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, VpreB<sup>+</sup>

#### **Lymphome: Klonal**

##### *Lymphknoten, Tonsillen, Milz*

Hodgkin-Lymphom: CD15<sup>+</sup>, CD30<sup>+</sup>, kein Oberflächen-Ig exprimiert

Non-Hodgkin-B Zell Lymphome:

Mantelzonen B Zell Lymphom: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, Ig-Isotypen meist: IgD<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>

Burkitt Lymphom: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, Ig-Isotypen meist IgM<sup>+</sup> oder IgG<sup>+</sup>

Diffus-großzelliges B Zell Lymphom CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, Ig-Isotypen meist IgM<sup>+</sup> oder IgG<sup>+</sup>

Multiple Myelome CD19<sup>-</sup>, CD138<sup>+</sup>, Ig-Isotypen IgG<sup>+</sup> aber auch IgA und IgE, selten Oberflächenexpression

## Tag II

### Analyse der Konfiguration von IGH, IGK und IGL Loci

#### Normale Populationen: Polyklonal (alle V-Genfamilien beteiligt, heterogenes Bandenmuster)

Zelltyp	IGH	IGK	IGL	TCRB
T Zellen	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	VDJ
Prä-B Zellen	VDJ	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn
Naive B Zellen	VDJ	VJ	VJ	Keimbahn
Keimzentrums B Zellen	VDJ	VJ	VJ	Keimbahn
Memory-B Zellen	VDJ	VJ	VJ	Keimbahn
Plasmazellen	VDJ	VJ	VJ	Keimbahn

#### Leukämien: Klonal (nur wenige V-Genfamilien beteiligt, einzelne Banden)

#### Lymphome: Klonal (nur wenige V-Genfamilien beteiligt, einzelne Banden)

#### Verwendete cDNAs

Granta-519, HBL-2, IL7RA-/-, Jeko-1, JJN3, Jurkat, JVM-2, KIEL, LP1, MCL214, MCL239, MCL478  
MCL601, MCL898, MCL942, NCEB-1, SP49, SP53, U266,

#### PCR-Protokolle:

##### V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> Genumlagerungen

2 µl dNTP (10 mM)  
5 µl 10 x PCR-Puffer  
2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl Taq DNA-Polymerase  
3 µl J<sub>H</sub>-Primermix  
33 µl H<sub>2</sub>O  
1 µl Template  
3 µl V<sub>H</sub>-Primer (6 unterschiedliche)

##### Cyclereinstellungen:

1. 95 °C 60 sec  
2. 95 °C 50 sec  
3. 63 °C 30 sec 40 x  
4. 72 °C 60 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 10 °C pause

##### V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub> Genumlagerungen

1 µl dNTP (10 mM)  
5 µl 10 x PCR-Puffer  
2,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl Taq DNA-Polymerase  
2,5 µl J<sub>K</sub>-Primermix  
35,5 µl H<sub>2</sub>O  
1 µl Template  
2,5 µl V<sub>K</sub>-Primer (6 verschiedene)

##### Cyclereinstellungen:

1. 95 °C 2 min  
2. 95 °C 50 sec  
3. 61 °C 30 sec 45 x  
4. 72 °C 60 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C pause

## Tag II (Fortsetzung)

### Analyse der Konfiguration von IGH, IGK und IGL Loci

#### PCR-Protokolle:

##### V $\lambda$ -J $\lambda$ Genumlagerungen

1  $\mu$ l dNTP (10 mM)  
5  $\mu$ l 10 x PCR-Puffer  
1,5  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1  $\mu$ l Taq DNA-Polymerase  
2,5  $\mu$ l J $\lambda$ -Primermix  
35,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
1  $\mu$ l Template  
2,5  $\mu$ l V $\lambda$ -Primer (8 verschiedene V $\lambda$ -Mixe,  
da V $\lambda$ 3A und V $\lambda$ 3B)

##### Cyclereinstellungen:

1. 95 °C 2 min  
2. 95 °C 50 sec  
3. 63 °C 30 sec 45 x  
4. 72 °C 60 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C pause

#### Gelektrophorese

2 g Agarose je 100 ml TAE Puffer abwiegen und aufkochen (Mikrowelle)

In 50 ml Falcon-Röhrchen abfüllen und je 3  $\mu$ l Ethidiumbromid (krebserregend) zumischen. Falconröhrchen in Gelträger (mit Gummisteckteilen) entleeren, Blasen entfernen und erstarren lassen.

Auf Parafilm oder auf Plastik je 1  $\mu$ l Blaumarker mit 5  $\mu$ l PCR Produkt mischen, 5  $\mu$ l auftragen, etwa 15 Minuten bei 120 V laufen lassen. Größenstandard: 100-bp Ladder, jeweils 0.8  $\mu$ l mit Blaumarker auftragen.

#### Klonierung und Transformation

Frisches PCR-Produkt wird durch Enzymaktivität der DNA Topoisomerase in einen Klonierungsvektor ligiert. Dafür werden 1  $\mu$ l Topo-Vektor und 1  $\mu$ l Salzlösung (Invitrogen) mit 4  $\mu$ l PCR-Produkt zusammengegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden chemokompetente E. coli Bakterien mit dem Vektor transformiert: zu 25  $\mu$ l kompetenten Zellen 2,5  $\mu$ l Topo-Produkt zugeben und 20 Minuten auf Eis stellen. Danach werden die Zellen 90 Sekunden bei 42°C inkubiert (Heat Shock) und gleich wieder auf Eis gestellt für mindestens 2 Minuten. 200  $\mu$ l SOC-Medium zufügen und 45 Minuten bei 37°C inkubieren. Jetzt können die Zellen auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen werden (75  $\mu$ l und 150  $\mu$ l Zellen pro Platte). Die Bakterienklone wachsen über Nacht und werden am nächsten Tag mit einer PCR überprüft, ob sie den Vektor mit kloniertem PCR-Produkt tragen.

---

#### Frequenz somatischer Mutationen in umgelagerten V<sub>H</sub> Gensegmenten in Prozent

Zelltyp	IGH	IGK	IGL
Prä-B Zellen	0	Keimbahn	Keimbahn
Naive B Zellen	0	0	0
Keimzentrums B Zellen	3-5	2-5	2-5
Memory-B Zellen	3-7	2-7	2-7
Plasmazellen	3-25	2-15	2-15

---

## Tag III

### Untersuchung von Immunglobulin-Klassenwechsel-Rekombination

#### Normale Populationen: Polyklonal (zum Teil verschiedene Isotypen beteiligt, heterogenes Bandenmuster)

Zelltyp	IgM	IgD	IgG1-4, IgA, IgE
T Zellen	-	-	-
Prä-B Zellen	$\mu$ -chain	-	-
Naive B Zellen	+	+	-
Keimzentrums B Zellen	+	+	+
Memory-B Zellen	+	selten	+
Plasmazellen			
nur zytoplasmatisch	+	+	+++

#### Leukämien: Klonal (nur wenige V-Genfamilien beteiligt, einzelne Banden)

#### Lymphome: Klonal (nur wenige V-Genfamilien beteiligt, einzelne Banden)

#### Verwendete cDNAs

Granta-519, HBL-2, IL7RA-/-, Jeko-1, JLN3, Jurkat, JVM-2, KIEL, LP1, MCL214, MCL239, MCL478  
MCL601, MCL898, MCL942, NCEB-1, SP49, SP53, U266

#### Verwendete Primer für VDJC<sub>H</sub>-Transkripte

VH1-6

C $\mu$ , C $\delta$ , C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4, C $\epsilon$ , C $\alpha$

#### Vorgehensweise

1. Identifizierung des umgelagerten V<sub>H</sub>-Segments aufgrund des bisherigen PCR-Ergebnisses
2. Gezielte Untersuchung der konstanten Region mit einem V<sub>H</sub>-spezifischen Primer und verschiedenen C<sub>H</sub>-spezifischen Primern

#### PCR-Protokoll

1  $\mu$ l dNTP (10 mmol/l)  
5  $\mu$ l 10 x PCR-Puffer  
2  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1  $\mu$ l Taq DNA-Polymerase  
2  $\mu$ l V<sub>H</sub>-Primer  
2  $\mu$ l C<sub>H</sub>-Primer  
36,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
0,5  $\mu$ l Template

#### Cyclereinstellungen:

1. 95 °C 2 min  
2. 95 °C 1 min  
3. 63 °C 1 min 45 x  
4. 72 °C 1 min  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C pause

#### Gelelektrophorese

wie oben

#### Klonierung und Transformation

wie oben

## Tag III (Fortsetzung)

### Untersuchung von Immunglobulin-Klassenwechsel-Rekombination

#### Screen von Bakterienkolonien mit PCR, Protokoll

~100 reactions, 25µl each:

2 µl H<sub>2</sub>O

250 µl 10x BV Buffer

125 µl dNTP (10mM)

125 µl DMSO

5 µl M13 Forward Primer (100 mM)

5 µl M13 Reverse Primer (100 mM)

20 µl Taq Polymerase

#### Cyclereinstellungen:

1. 94 °C 2 min

2. 94 °C 30s

3. 55 °C 1 min 33 x

4. 70 °C 1 min

5. 70 °C 5 min

6. 4 °C pause

#### DNA Fällung:

Mit H<sub>2</sub>O bis auf 200 µl auffüllen

1µl Glycogen

133 µl 7.5 Mol/l Ammoniumazetat

1000 µl 100% Ethanol

-80°C für 45 min

13.200 rpm für 25 min zentrifugieren, Überstand entfernen

1000 µl (-20°C) 70% Ethanol

13.200 rpm für 15 min zentrifugieren, Überstand entfernen, lufttrocknen

#### Sequenzierungsreaktion, Protokoll

2 µl BigDye

1 µl H<sub>2</sub>O

1 µl BigDye Puffer

1 µl 2.5 mmol/l M13 primer

5 µl Template

#### Cyclereinstellungen:

1. 96 °C 1 min

2. 96 °C 10s

3. 58 °C 5s 25 x

4. 60 °C 4 min

5. 4 °C pause

## Tag IV

### Untersuchung von Differenzierungsstadien-spezifischen Molekülen

---

#### Normale Populationen:

Zelltyp	PAX5	AID	BCL6	XBP1
T Zellen	-	-	-	-
Prä-B Zellen	+	-	-	-
Naive B Zellen	+	-	-	-
Keimzentrums B Zellen	+	+	+	-
Memory-B Zellen	+	-	-	-
Plasmazellen	-	-	-	+

---

## Tag IV (Fortsetzung)

### *Untersuchung von Differenzierungsstadien-spezifischen Molekülen*

#### Verwendete cDNAs

Granta-519, HBL-2, IL7RA-/-, Jeko-1, JJN3, Jurkat, JVM-2, KIEL, LP1, MCL214, MCL239, MCL478  
MCL601, MCL898, MCL942, NCEB-1, SP49, SP53, U266

#### PCR-Protokoll für BCL6

1 µl dNTP (10 mmol/l)  
5 µl 10 x PCR-Puffer  
2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl Taq DNA-Polymerase  
2 µl forward-Primer  
2 µl reverse-Primer  
36,5 µl H<sub>2</sub>O  
0,5 µl Template

#### Cyclereinstellungen:

1. 95 °C 2 min
2. 95 °C 1 min
3. 63 °C 1 min 45 x
4. 72 °C 1 min
5. 72 °C 5 min
6. 4 °C pause

#### PCR-Protokoll für AID

1 µl dNTP (10 mmol/l)  
5 µl 10 x PCR-Puffer  
1,8 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl Taq DNA-Polymerase  
2 µl forward-Primer  
2 µl reverse-Primer  
36,7 µl H<sub>2</sub>O  
0,5 µl Template

#### Cyclereinstellungen:

1. 95 °C 2 min
2. 95 °C 1 min
3. 64 °C 1 min 45 x
4. 72 °C 1 min
5. 72 °C 5 min
6. 4 °C pause

#### PCR-Protokoll für PAX5 und XBP1

1 µl dNTP (10 mmol/l)  
5 µl 10 x PCR-Puffer  
2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl Taq DNA-Polymerase  
2 µl forward-Primer  
2 µl reverse-Primer  
36,5 µl H<sub>2</sub>O  
0,5 µl Template

#### Cyclereinstellungen:

1. 95 °C 2 min
2. 95 °C 1 min
3. 63 °C 1 min 45 x
4. 72 °C 1 min
5. 72 °C 5 min
6. 4 °C pause

## Tag V

### Sequenzanalyse

#### V-Regionen

Sequenzdateien werden als Textdateien (Editor) geöffnet. Für die Analyse von  $V_H$ ,  $V_K$  und  $V_\lambda$  Genumlagerungen wird das IMGT-Programm (M.-P. Lefranc, Montpellier, Frankreich) verwendet: <http://imgt.cines.fr:8104/cgi-bin/IMGTdnap.jv?livret=0&Option=humanlg>

Dazu muß von der Rohsequenz (Text-Editor) die gesamte Vektorsequenz, sowie Sequenzanteile geringer Qualität entfernt werden. Weiterhin liegt statistisch gesehen die Hälfte aller Sequenzdateien in revers-komplementärer Leserichtung vor. Um IMGT nutzen zu können müssen diese Sequenzen daher invertiert werden. Dazu wird eine Internetanwendung eingesetzt: [http://bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

#### C<sub>H</sub>-Regionen

Immunglobulingene mit konstanten Regionen werden am besten mit NCBI-BLAST analysiert: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

Hier: Auswahl „blastn“ und Einstellung „Homo sapiens“ statt „ALL Organisms“