**Universität Ulm**

**Abteilung für Pathologie**

**Leiter Prof. Dr. med. Peter Möller**

# Nachweis und Charakterisierung somatischer Hypermutationen des Immunglobulin-Schwerkettengens primärer mediastinaler B-Zell-Lymphome

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**Martin Gerhard Andreas Bäuerle**

**geboren in Ruit/Filder**

**2005**

**Amtierender Dekan:** **Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin**

**1. Berichterstatter:** **Prof. Dr. Peter Möller**

**2. Berichterstatter:** **Prof. Dr. Thomas Wirth**

**Tag der Promotion:** **21. Juli 2006**

**Meiner Familie gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

**1 Abkürzungsverzeichnis ..... 7**

**2 Einleitung ..... 9**

**2.1 Entwicklung einer normalen B-Zelle ..... 9**

**2.2 Genumlagerungsprozesse im Immunglobulin-Schwerkettengen ..... 9**

**2.3 Somatische Hypermutationen und Affinitätsreifung ..... 13**

**2.4 Maligne Lymphome ..... 14**

**2.5 Maligne B-Zell-Lymphome ..... 15**

**2.6 Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBL) ..... 15**

**2.7 Analyseverfahren ..... 16**

**2.8 Fragestellung ..... 18**

**3 Material und Methodik ..... 19**

**3.1 Patienten- und Gewebsprobencharakteristika ..... 19**

**3.2 DNA-Extraktion ..... 21**

**3.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) ..... 21**

**3.4 Optimierung der PCR-Laufbedingungen ..... 24**

**3.5 Gelelektrophorese ..... 27**

**3.6 Isolierung der DNA aus Agarosegelen ..... 28**

**3.7 Klonierung der DNA-Fragmente ..... 28**

**3.8 Sequenzierung der klonierten DNA-Produkte ..... 29**

**3.9 Analyse der Sequenzdaten ..... 31**

**4 Ergebnisse ..... 37**

**4.1 Detektion klonaler VDJ-Genumlagerungen ..... 37**

**4.2 Hohe Rate an somatischen Hypermutationen ..... 40**

**4.3 Fortgesetzte Mutationen - intraklonale Diversität ..... 42**

**4.4 VH-Genfamilienverteilung ..... 42**

**5 Diskussion ..... 44**

**5.1 Entwicklungsstadien der B-Zelle..... 44**

**5.2 Nachweis monoklonaler VDJ-Umlagerungen ..... 44**

**5.3 Hohe Rate an somatischen Hypermutationen im PMBL ..... 45**

**5.4 Fehlende fortgesetze Mutationen im PMBL ..... 46**

**5.5 Die Rolle des Keimzentrums beim PMBL ..... 48**

**5.6 Selektion eines funktionalen Antikörpers im PMBL..... 49**

**5.7 Die VH-Genfamilienverteilung im PMBL entspricht derjenigen normaler peripherer B-Zellen ..... 52**

**5.8 Kein Hinweis auf eine pathogenetische Rolle von Auto- und Superantigenen im PMBL ..... 52**

**5.9 Die Rolle der B1- und B2-Zelle ..... 53**

**5.10 Die Thymusmedulla als möglicher Entstehungsort des PMBL ..... 54**

**5.11 Das PMBL als eigenständige Subentität der DLBCL ..... 57**

**6 Zusammenfassung ..... 58**

**7 Anhang ..... 59**

**7.1 Sequenzen der einzelnen Fälle**

**8 Literaturverzeichnis ..... 75**

**9 Eigene Publikationen ..... 94**

# 1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| A: | Adenin |
| ABC: | Aktivierte periphere B-Zelle, activated B cell |
| AID: | Aktivierungs-induzierte Cytidin Deaminase, activation induced cytidine deaminase |
| APC: | Antigenpräsentierenden Zelle, antigen presenting cell |
| bp: | Basenpaare, base pairs |
| BZR: | B-Zell-Rezeptor |
| C: | Cytosin |
| CD: | Cluster of Determination |
| CDR: | Complementarity Determining Region |
| CH: | Konstante Region der schweren Ketten |
| cHL: | Klassischer Morbus Hodgkin, classical Hodgkin´s lymphoma |
| CL: | Konstante Region der leichten Ketten |
| CLL: | Chronisch Lymphatische Leukämie |
| C-Segment: | Class Segment, das den Isotyp der Immunglobuline bestimmt |
| ddATP: | Didesoxyadenosintriphosphat |
| ddCTP: | Didesoxycytosintriphosphat |
| ddGTP: | Didesoxyguanintriphosphat |
| ddTTP: | Didesoxythymidintriphosphat |
| DH: | „Diversity" Segment der Schwerkettenregion |
| DLBCL: | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, diffuse large cell B cell lymphoma |
| DMSO: | Dimethylsulfoxid |
| DNA: | Deoxyribonukleinsäure |
| dNTP: | Deoxynukleotidtriphosphat |
| EDTA: | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FCL: | Follikulärzellen-Lymphom, follicular cell lymphoma |
| FR: | Frame Work Region |
| G: | Guanin |
| GALT: | Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe, gut associated lymphoid tissue |
| GCB: | Keimzentrums-B-Zelle, germinal center B cell |

| | |
|---|---|
| Ig: | Immunglobulin |
| IPTG: | Isopropyl-1-thio-ß-D-galaktosid |
| JH: | „Joining“ Segment der Schwerkettenregion |
| MALT: | Mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe, mucosa associated lymphoid tissue |
| mRNA: | Messenger Ribonukleinsäure |
| PCR: | Polymerase Kettenreaktion, polymerase chain reaction |
| PMBL: | Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom |
| PVR. | Perivaskulärer Raum |
| R: | Replacement Mutation, Austauschmutation |
| RNA: | Ribonukleinsäure |
| S: | Stumme Mutation |
| T: | Thymin |
| TAE: | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBE: | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| Temed: | N, N, N´, N´- Tetramethyl-ethylendiamin |
| VH: | Variable Region der schweren Ketten |
| VL: | Variable Region der leichten Ketten |
| X-GAL: | 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-ß-D-galaktosid |

# 2 Einleitung

## 2.1 Entwicklung einer normalen B-Zelle

Zum besseren Verständnis der Lymphomgenese ist es sinnvoll, die Entwicklung einer normalen B-Zelle nachzuvollziehen. Im Knochenmark entwickelt sich aus einer Pro-B-Zelle eine Prä-B-Zelle und daraus eine unreife B-Zelle. Diese unreife B-Zelle verläßt das Knochenmark, wandert ins periphere lymphatische System und entwickelt sich zur naiven reifen B-Zelle. In der parafollikulären Zone eines Lymphknotens entsteht nun eine aktivierte B-Zelle, die sich in das Keimzentrum begibt und sich zur Plasmazelle oder Gedächtniszelle entwickelt. In diesen Entwicklungsstufen spielen zwei Reifungsmechanismen eine herausragende Rolle:

- Schwerketten-Genumlagerung (Rearrangement)

- Somatische Hypermutationen und Affinitätsreifung

## 2.2 Genumlagerunsprozesse im Immunglobulin-Schwerkettengen

Immunglobuline bestehen aus Schwerketten und Leichtketten. Diese setzen sich aus variablen und konstanten Regionen zusammen. In dieser Arbeit wird die variable Region des Schwerkettengens untersucht.

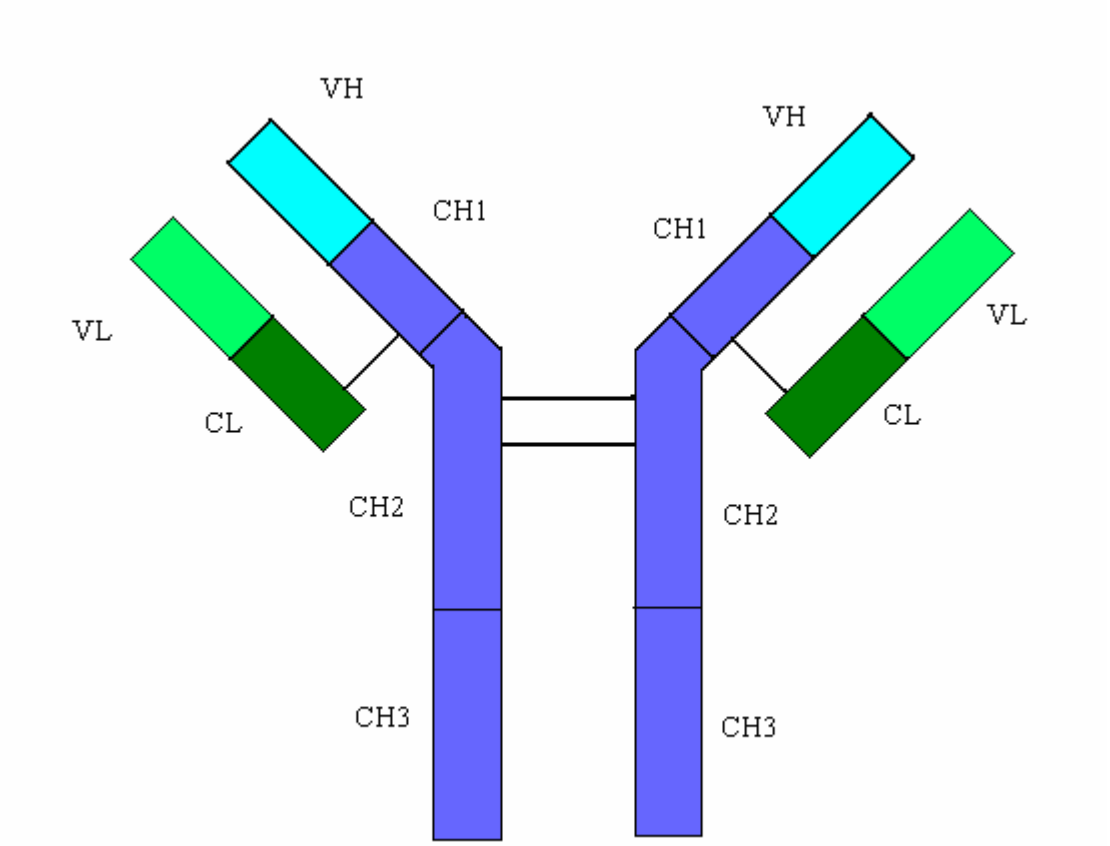



**Abbildung 1: Struktur der Immunglobuline**

Das Immunglobulin besteht aus den Schwerketten H und den Leichtketten L. Die Schwerketten werden aus drei konstanten Region CH1 – CH3 (blau) und einer variablen Region VH (türkis) gebildet. Die Leichtketten sind kürzer als die Schwerketten und bestehen aus einer konstanten Region CL (dunkelgrün) und einer variablen Region VL (hellgrün). Die CH2-Regionen sind durch zwei und die CH3 und die CL-Regionen jeweils durch eine Disulfidbrücke (schwarze Verbindungsstriche) miteinander verbunden.

Das Schwerkettengen des Immunglobulins ist beim Menschen auf Chromosom 14 (**123**) lokalisiert. Im menschlichen Genom existieren ca. 88 VH-Segmente, von denen 51 funktional umgelagert werden können, der Rest sind nicht-funktionale Pseudogene. Dazu kommen noch 30 D-Segmente und 6 JH-Segmente (**128**). Die VH-Segmente lassen sich in 7 verschiedene Familien einteilen, innerhalb derer Homologien der Nukleotidsequenzen mehr als 80% betragen (**123**). Zuerst findet die irreversible Umlagerung eines der D-Segmente mit einem der JH-Segmente in der Phase der Pro-B-Zelle statt. Als nächstes lagert sich in der späten Prä-B-Zelle eines der VH-Segmente um und beendet diesen ersten Reifungsmechanismus der VDJ-Umlagerung. In dieser Phase findet auch die Umlagerung der Leichtkettengene Kappa

oder Lambda (**122**) statt, bei denen nach gleichem Muster eine variable VL-Region mit einem JL-Segment verknüpft werden, D-Segmente existieren hier nicht.
Die Anlagerung der verschiedenen Segmente geschieht ungenau. Es können zusätzlich Nukleotide in den sogenannten N–Regionen eingebaut werden (**103**). Dieser Vorgang erhöht die Diversität zusätzlich. Die VH-Genregion besteht aus drei „Frame Work Regions“ (FR) und zwei „Complementary Determining Regions“ (CDR). Die weitgehend konstante Region der JH-Segmente wird auch als FR4 bezeichnet, wohingegen die sehr variable DH-Region mit den anliegenden N-Regionen die CDR3 bilden. Bei der Genumlagerung wird das D-Segment an beiden Enden verkürzt. Aus den wenigen verbleibenden Basen kann häufig keine sichere Zuordnung des verwendeten DH-Segmentes erfolgen. Die Ungenauigkeit der Genumlagerung und der Einbau von N-Nukleotiden trägt entscheidend zur Diversität des Immunglobulinrepertoirs bei. In der Praxis kann davon ausgegangen werden, daß die CDR3 für einen bestimmten B-Zell-Klon spezifisch ist und diesen eindeutig identifiziert (**25, 129**). Aufgrund ihrer weitgehenden Homologie sind die FR zur Auswahl von PCR-Primern geeignet. Der in dieser Arbeit angewandte FR1c Primer lagert sich in der FR1, der FR2a Primer in der FR2 und der JH bzw. LJH, VLJH Primer in der FR4 an (**8**).

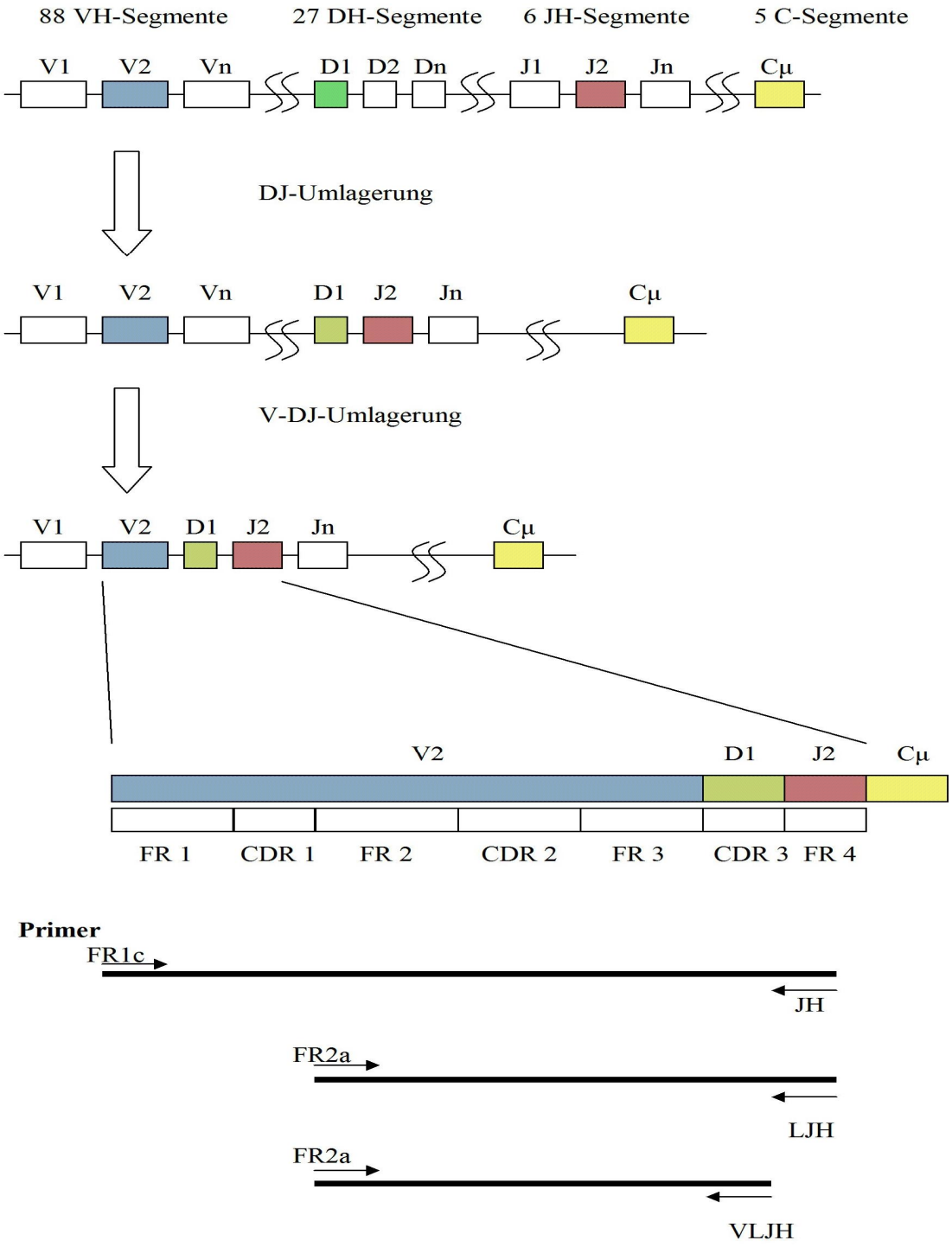



**Abbildung 2: Umlagerungsprozesse der VDJ-Segmente der schweren Ketten in Immunglobulinen (IgH) und Ansatzstellen der PCR Primer**

Bei den VDJ-Umlagerungsprozessen in Immunglobulinen werden zunächst die „diversity“ (DH) und „joining“ (JH) Segmente und anschließend die „variablen“ (VH) Segmente umgelagert. Das VH-Segment ist aus drei „Frame Work Regions“ (FR) und zwei „Complementarity Determining Regions“ (CDR) aufgebaut. In den weitgehend homologen FR lagern sich entsprechend der FR1c und der FR2a Primer an. Das DH-Segment befindet sich in der CDR3. Im JH-Segment bzw. der FR4 lagern sich JH, LJH und VLJH Primer an.

Die konservierten F-Regionen sind durch ihre weitgehende Homologien für den Strukturerhalt der Antikörper zuständig. Die hypervariablen CD-Regionen hingegen sind weniger homolog und sind für die Optimierung der Bindungsaffinität der Antikörper zuständig (**92**).
Es entstehen bei den initialen Genumlagerungsprozessen der IgH-Regionen durch das zufällige Einfügen oder Entfernen von Basen recht häufig Verschiebungen des Leserasters oder gar Stop-Codons. Wird aus diesem Grund die Produktion eines Proteins verhindert, kommt es zur Umlagerung des zweiten Allels. Führt eine Umlagerung des zweiten Allels des Immunglobulin-Schwerkettengens zu keiner für einen funktionalen Antikörper kodierenden Sequenz, wird die B-Zelle der Apoptose zugeführt.

## 2.3 Somatische Hypermutationen und Affinitätsreifung

Bei der primären Immunantwort differenziert sich ein Teil der B-Zellen unter Antigenstimulation mithilfe von T-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen, die Antikörper mit einer relativ geringen Antigenspezifität produzieren (**79**).
Die weitere Diversifizierung erfolgt durch somatische Hypermutationen, die in die Immunglobulingene der sich stark teilenden Zentroblasten der dunklen Zone des Keimzentrums eines Lymphfollikels eingebracht werden. Diese Mutationen dienen der sogenannten Affinitätsreifung, die die Herstellung von Antikörpern mit höherer Affinität zum Ziel hat. Die CDR werden sehr viel häufiger hypermutiert als die FR, da wie bereits oben erwähnt, die CDR fast immer die antigenbindende Struktur darstellen (**92**). Somatische Hypermutationen sind vor allem in der CDR1 für die Diversität der Basensequenzen verantwortlich. Die CDR2 ist bereits unter den verschiedenen VH-Familien recht variabel und die CDR3 erhält die Diversität durch die ungenauen Umlagerungsprozesse in den N-Regionen (**92**). Die Einbringung von somatischen Mutationen in das umgelagerte Immunglobulingen geschieht nicht rein zufällig.
Es werden „hot spots“ bevorzugt, in denen Mutationen mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer Änderung der Bindungsaffinität führen, als dies in anderen Regionen („cold spots“) der Fall ist. Bestimmte Sequenzmuster, insbesondere das RGYW-Motiv, werden besonders häufig hypermutiert. (**92**).
Aus dem hypermutierten Zentroblasten der dunklen Zone wird ein Zentrozyt, der sich in der hellen Zone des Keimzentrums aufhält. B-Zellen mit Mutationen, die sich ungünstig auf die

Antikörperaffinität auswirken, erhalten keine Wachstumssignale von den Keimzentrums-T-Zellen und gehen durch Apoptose zugrunde. Die affineren Zentrozyten, die das mittels follikulärer dendritischer Zellen dargereichte Antigen binden können, werden vor der Apoptose bewahrt. Sie entwickeln sich zu langlebigen Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen (**103**). Somatisch hypermutierte Zellen könnten als B-Gedächtniszellen wieder im Blut zirkulieren oder sich nach einem Isotypenwechsel im Knochenmark als Plasmazelle niederlassen. Sie können außerdem bei erneutem Antigenkontakt wieder ins Keimzentrum eintreten, um erneut zur Bildung affinerer Antikörper somatisch mutiert zu werden (**48**, **61**, **132**). Diese speziellen B-Zellen können auch außerhalb der Keimzentren eine rasche Immunantwort aufbauen (**94, 103**).
In der Regel entstehen im Keimzentrum mehrere Subklone hypermutierter B-Zellen, die eine ähnliche, jedoch nicht identische DNA-Sequenz des Immunglobulingens besitzen. Diese B-Zellklone, die durch Zellteilung im Keimzentrum unter fortlaufender Diversifizierung entstanden sind, unterscheiden sich sowohl untereinander als auch gegenüber der Keimbahnsequenz. Diese fortgesetzten Mutationen kommen durch den weiteren Einbau somatischer Mutationen während der Keimzentrumsreaktion zustande und sind für die intraklonale Diversität verantwortlich (**64**). Vor kurzem publizierte Daten belegen, daß in einem Mausmodell somatische Hypermutationen und Affinitätsreifung auch außerhalb von Keimzentren stattfinden können (**133**). Welche Rolle eine extrafollikuläre Hypermutation bei physiologischen B-Zellreaktionen im humanen System spielt, ist bisher allerdings weitgehend unklar.

## 2.4 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome entstehen durch neoplastische Transformation lymphatischer Zellen. Sie lassen sich anhand histologischer Kriterien in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome einteilen. Zur weiteren Einteilung existieren verschiedene Klassifikationen. Die Kieler Klassifikation (**71**) orientiert sich zusätzlich an dem zytomorphologisch und histologisch bestimmten immunologischen Differenzierungsstadium der Lymphome. Die WHO-Klassifikation (**42**) und die „Revised European American Lymphoma“ Klassifikation (**43**) berücksichtigen zusätzlich molekularbiologische Eigenschaften und den Immunphänotyp. Die WHO-Klassifikation gilt derzeit als Standard für die Einteilung maligner Lymphome.

## 2.5 Maligne B-Zell-Lymphome

Maligne B-Zell-Lymphome stellen die klonale Expansion einer einzigen neoplastisch transformierten B-Zelle dar. Diesen Umstand macht man sich bei der Analyse von Immunglobulin-Schwerkettenregionen (IgVH) zunutze. Die im Zuge der B-Zellreifung und -differenzierung auftretenden immungenetischen Veränderungen können zu genetischen Aberrationen wie Translokationen führen und auf diese Weise die maligne Transformation einer B-Zelle induzieren (**123**). In der Annahme, daß die maligne B-Zelle das Entwicklungsstadium der benignen B-Vorläuferzelle wiederspiegelt, bevor chromosomale Aberrationen die neoplastische Transformation einleiten, ergibt sich die Möglichkeit, durch Analyse der Lymphomzellen Rückschlüsse auf die Ursprungszelle zu ziehen (**60, 123**). Je nach Entwicklungsstadium der Tumorvorläuferzelle unterscheidet man Prä- und Post-Keimzentrums-B-Zell-Lymphome und Keimzentrums-B-Zell-Lymphome. Manche Tumoren wie bestimmte Untergruppen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und der Mantelzell-Lymphome leiten sich von B-Zellen ab, die sich nicht im Keimzentrum aufhielten. Andere hingegen wie das follikuläre Lymphom (FL), das Burkitt Lymphom, MALT (mucosa associated lymphoid tissue) -Lymphome und einige diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (diffuse large cell B cell lymphoma, DLBCL) konservieren charakteristische Eigenschaften von Keimzentrums-B-Zellen (**123**).

## 2.6 Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBL)

In der aktuellen WHO-Klassifikation bilden die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome eine heterogene Gruppe aggressiver B-Zellneoplasien, die mehrere, definierte Subtypen einschließt, so z.B. das zentroblastische Lymphom, das immunoblastische Lymphom, das großzellige anaplastische Lymphom, das T-zellreiche B-Zell-Lymphom und das primäre mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBL) (**42**, **43**). DLBCL umfassen ca. 30-40 % der malignen Lymphome, davon gehören 5% zu den PMBL (**3**, **59**). Das PMBL entsteht in vergleichsweise jungen Patienten mit einem medianen Alter Anfang Dreißig. Frauen erkranken doppelt so häufig wie Männer. Dieser Tumor wächst lokal sehr aggressiv und invadiert häufig benachbarte Strukturen, insbesondere die Lunge, die Vena Cava und das Perikard (**3**). Die großen Tumormassen verursachen dementsprechende Symptome wie Obstruktion der Luftwege, Vena-cava-Syndrom, Phrenikuslähmung, Schluckbeschwerden,

beidseitige Brustschwellung bei Frauen und Brustkorbschmerzen. Rezidive sind häufig mit Fernmetastasen in Leber, Nieren und ZNS assoziiert (**28**, **59**, **70**, **128**).
Die Therapie beinhaltet anthrazyklinhaltige Chemotherapieschemata, ggf. mit anschließender Bestrahlung des Mediastinums (**131**).
Es wird angenommen, daß das PMBL medullären B-Zellen des Thymus entspringt, da B-Zellen im Thymus entdeckt wurden und sich immunphänotypisch große Übereinstimmung zwischen B-Zellen im Thymus und Zellen des PMBL ergaben (**46, 53**). PMBL zeigen einen CD10- CD19+ CD20+ CD21- CD22+.CD23+ CD25- CD37+ CD38- CD39+ CD40+ CD54+ CD79a+ CD95+ Ig- Immunphänotyp (**7**, **16**, **56**, **69, 87, 101**). Mehrere Arbeiten trugen zur genotypischen Differenzierung des PMBL gegenüber anderen DLBCL bei. Wiederholt wurden beim PMBL Instabilitäten auf Chromosom 9p,12p, 12q und Xq (**12**, **54**, **136**) beschrieben. BCL6, ein Onkogen, das an der Reifung von Keimzentrums-B-Zellen beteiligt ist, ist im PMBL selten umgelagert, zeigt aber eine hohe Rate an Punktmutationen (**93**, **102**, **130**). Umlagerungen des BCL2-Gens sind für das PMBL untypisch, jedoch findet sich (**116**, **130**) häufig eine BCL2-Überexpression (**5**, **16**). BCL2, ein Antionkogen, ist für die Verhinderung der Apoptose von naiven B-Zellen und Gedächtniszellen verantwortlich. Die häufige Überexpression des MAL-Gens (**23**) ist eine spezifische onkogene Veränderung bei PMBL. Es wurde nicht in normalen B-Zellen und anderen DLBCL Entitäten exprimiert. Das MAL-Gen wurde vor allem im Zusammenhang mit der T-Zellentwicklung beschrieben (**6**) aber auch bei ausgereiften Post-Keimzentrums-B-Zellen. Die Expression konnte in Schilddrüse, Nieren, Gehirn und Thymus nachgewiesen wserden. Damit kann angenommen werden, daß das MAL-Gen zur Pathogenese des PMBL beiträgt.
Weitere onkogene Veränderungen betreffen Mutationen des p53-Gens, Amplifikation des REL-Protoonkogens und Mutation oder Umlagerung des C-MYC-Gens (**116**, **130**).

## 2.7 Analyseverfahren

Die Analyse umgelagerter Immunglobulin-Schwerkettengene ermöglicht es, monoklonale (identische) maligne B-Zellpopulationen zu detektieren. Eine solche monoklonale Zellpopulation besitzt gleichartig umgelagerte Schwerkettengene, die sich mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifizieren lassen. Auf ein Agarosegel aufgetragen, erscheint das monoklonale PCR-Produkt, das aus DNA-Strängen identischer Länge besteht, als einzelne Bande, wohingegen sich das PCR-Produkt normaler B-Zellen aus einer Vielzahl

unterschiedlich langer DNA-Fragmente zusammensetzt und deshalb als ein diffuser Schmier erscheint. In dieser Arbeit wird die PCR verwendet, um erstens die Monoklonalität der malignen Lymphomproben zu verifizieren und zweitens somatische Hypermutationen und fortgesetzte Mutationen in der VH-Genregion aufzuspüren. Die Analyse der Mutationsmuster gibt Aufschluß über den Differenzierungsgrad der benignen Tumorvorläuferzelle (**60**, **123**). Somatische Hypermutationen betreffen nur Zellen, die Kontakt mit dem Keimzentrum hatten, somit läßt sich differenzieren, ob die Tumorzellpopulation von einer Prä-Keimzentrums-B-Zelle (keine Hypermutationen) oder einer Keimzentrums- bzw. Post-Keimzentrums-B-Zelle (nachweisbare Hypermutationen) abstammt. Zur weiteren Differenzierung dient die Analyse der fortgesetzten Mutationen, die die Unterscheidung zwischen Keimzentrums- und Post-Keimzentrums-B-Zelle erlaubt, da diese Form der nachgesetzten Mutationen nur im Keimzentrum auftritt bzw. bei B-Zellen, die im Differenzierungsstadium der Keimzentrumszelle maligne transformiert wurden (**64**).

Es existieren zahlreiche Arbeiten über solche Analysen an malignen B-Zellen-Lymphomen inklusive des DLBCL. Es gibt aber bis jetzt nur wenige Arbeiten, die gezielt die unterschiedlichen Subklassen der DLBCL untersucht haben (**65**, **111**, **115**).

Die Ermittlung der putativen Vorläuferzelle eines Lymphoms mittels Analyse der somatischen Hypermutationen des IgVH-Gens wird dadurch erschwert, daß weitere Transformationsereignisse in der Entwicklungsgeschichte eines Lymphoms ebenso eine Rolle spielen, die vielleicht die eigentliche Herkunft verschleiern. Dazu gehört beispielsweise der Schutz vor Apoptose mittels BCL2, das in PMBL überexprimiert wird (**5**, **16**, **63**).

## 2.8 Fragestellung

***1. Versuch des Nachweises der Monoklonalität, somatischer Hypermutationen und fortgesetzter Mutationen im PMBL***

In dieser Arbeit werden monoklonale VDJ-Umlagerungen in 13 Fällen mit PMBL und einer PMBL-Zellinie analysiert, um somatische Hypermutationen und fortgesetzte Mutationen nachzuweisen.

***2. Versuch der Bestätigung, daß es sich beim PMBL um eine eigene, in sich homogene Subentität der DLBCL handelt***

Im Vergleich der unter 1. ermittelten Daten mit bereits existierenden Arbeiten soll die Annahme untersucht werden, daß das PMBL eine eigene DLBCL-Subentität darstellt.

***3. Versuch der Eingrenzung der nicht neoplastischen Vorläufer-B-Zelle dieser Tumorentität***

Im Vergleich der unter 1. ermittelten Daten mit bereits existierenden Arbeiten soll untersucht werden, von welcher benignen Vorläuferzelle-B-Zelle das PMBL ausgeht.

# 3 Material und Methodik

## 3.1 Patienten- und Gewebsprobencharakteristika

Es standen tiefgefrorene Gewebsproben von 20 Patienten zur Verfügung, bei denen ein PMBL anhand etablierter Kriterien diagnostiziert wurde (**100**). Diese Kriterien umfassen klinische, histomorphologische und immunphänotypische Aspekte. Von den 20 Patienten konnten in 13 Fällen monoklonale Umlagerungen des IgVH-Gens mittels PCR nachgwiesen werden. Diese 13 Fälle wurden im folgenden näher untersucht. Sechs Patienten waren weiblichen und sieben männlichen Geschlechts mit einem Alter zwischen 21 und 59 Jahren (Mittelwert 38 Jahre) bei Erstdiagnose. Das Krankheitsstadium nach der Ann-Arbor-Klassifikation lag bei allen Patienten zwischen 2 und 4. Im Stadium 2 ist der Tumorbefall auf einer Seite des Zwerchfells lokalisiert, im Stadium 3 beidseits des Zwerchfells ausgebreitet und im Stadium 4 diffus organinfiltrierend. Mit Ausnahme von Fall Nr. 8a und 8b und Fall Nr. 13b stammte das untersuchte Gewebe aus nicht vorbehandelten Primärmanifestationen im Mediastinum. Das Gewebe von Fall Nr. 8a wurde aus einem Lymphomrezidiv in der Lunge entnommen. Aus dessen Tumorgewebe wurde die Zellinie MedB-1 (**86**) generiert (Fall 8b), die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht wird. Eine Besonderheit ist der Fall 13, bei dem Gewebematerial bei Erstdiagnose (Fall 13a) und 1 Jahr später mittels Obduktion bei Progreß nach Chemotherapie (Fall 13b) gewonnen wurde. Alle anderen Patienten hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch keine Chemotherapie erhalten.
Histomorphologisch zeigten diese Lymphome atypische Zellen, die mittelgroß bis groß waren, deren Zytoplasma nur eine schwache Anfärbung zeigte, und deren Kerne keine prominenten Nukleolen aufwiesen. Nekrosen, eine ausgeprägte Sklerosierung und eine diffuse Infiltration des umliegenden Gewebes waren weitere histomorphologische Charakteristika der untersuchten Lymphome. (**100, 127**).
Immunhistochemisch zeigten die Tumorzellen eine Expression folgender Oberflächenmarker: CD10- CD19+ CD20+ CD21- CD22+.CD 23+ CD25- CD 37+ CD38- CD39+ CD40+ CD54+ CD95+ Ig- (**86**, **87**, **100**).

**Tabelle 1: Klinische Daten**

Bei 13 Patienten, die an einem primären mediastinalen B-Zell-Lymphom (PMBL) erkrankten, konnte eine monoklonale Umlagerung des Immunglobulin-Schwerkettengens (VH) detektiert werden. Sieben Patienten waren männlichen und sechs Patienten weiblichen Geschlechts. Das Alter betrug zwischen 21 und 59 Jahren bei Diagnosestellung. Die Mehrzahl der Patienten befand sich im Stadium 2 der Erkrankung mit Tumormassen im Mediastinum. Bei Fall Nr. 8 handelte es sich um eine Rezidiverkrankung in der Lunge. Aus diesem Tumorgewebe wurde die Zellinie MedB-1 generiert. Bei Fall Nr. 13 wurde vom gleichen Patienten post mortem eine Tumorprobe aus einem Lokalrezidivtumor entnommen.

| Fall Nr. | Geschlecht | Alter bei Erstdiagnose | Stadium | Lokalisation |
|---|---|---|---|---|
| 1 | M | 21 | 4 | Mediastinum |
| 2 | M | 43 | 2 | Mediastinum |
| 3 | W | 43 | 2 | Mediastinum |
| 4 | W | 46 | 2 | Mediastinum |
| 5 | M | 38 | 2 | Mediastinum |
| 6 | M | 34 | 2 | Mediastinum |
| 7 | W | 23 | 2 | Mediastinum |
| 8a | M | 27 | 2 | Lungenrezidiv |
| 8b | Zellinie aus 8a | (MedB-1) | | |
| 9 | W | 59 | 4 | Mediastinum |
| 10 | M | 52 | 3 | Mediastinum |
| 11 | W | 30 | Nb | Mediastinum |
| 12 | W | 36 | Nb | Mediastinum |
| 13a | M | 42 | Nb | Mediastinum |
| 13b* | M | 42 | 4 | Mediastinum |

M: männlich

W: weiblich

Nb: Nicht bestimmt

* Autoptische Gewebsprobe aus einem Rezidivtumor ein Jahr nach Entnahme von 13a

## 3.2 DNA-Extraktion

Die Gewebsproben wurden nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -70°C gelagert und auf einem Kryostat Mikrotom in 25 µm dicke Scheibchen geschnitten. Für jeden neuen Fall wurden gereinigte Klingen verwendet, um eine DNA-Kontamination zu verhindern. Pro Fall wurden jeweils 5 Scheibchen gewonnen. Im Falle der Zellinie MedB-1 und einer polyklonalen Kontrollprobe aus Leukozyten des peripheren Blutes von gesunden Spendern (buffy coat) wurden Pellets aus$10^7$ Zellen verwendet.

Die Gewebsproben wurden wie folgt aufbereitet:

1. Proteinase K Verdau (100 µg/ml; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) bei 50°C für 16 Std. in einem Lysepuffer (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 10mM EDTA; 50 mM NaCl; 0,5% SDS)
2. Hinzufügen von vier Volumina einer gesättigten NaCl-Lösung und Zentrifugation bei 10 000 g
3. Ethanolpräzipitation der DNA aus dem Überstand
4. Waschen mit 70%igen Ethanol. Trocknung der DNA
5. Verdünnung der DNA durch Zugabe von $H_2O$ auf eine Konzentration von 100ng/µl

Die so gewonnenen DNA-Proben dienten als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen der umgelagerten Immunglobulin-Schwerkettengene.

## 3.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein relativ einfaches Verfahren, um DNA im Nanogrammbereich zu vervielfältigen. Die PCR wurde erstmals 1985 als enzymatische Amplifikationmethode beschrieben (**113**). Die Entwicklung einer thermostabilen DNA-Polymerase führte schließlich 1987 zur schnellen Verbreitung der PCR (**89**). Das Prinzip besteht darin, zu einem einzelsträngigen DNA-Molekül einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren und diesen Vorgang zyklisch zu wiederholen, so daß theoretisch $2^n$ DNA Kopien entstehen (dabei bezeichnet „n“ die Anzahl der Reaktionszyklen). Die Doppelstränge der genomischen DNA werden zunächst thermisch getrennt (denaturiert). Im zweiten Schritt lagern sich Primer bei niedrigeren Temperaturen an die gewünschte DNA-Sequenz an

(annealing). Primer sind im Regelfall hochspezifische Oligonukleotide, die komplementäre DNA-Einzelstränge erkennen können und gezielt dort hybridisieren. An das 3´ Ende dieser Primer lagern sich die dNTPs mit Hilfe einer thermoresistenten Polymerase an (Elongation). Diese Schritte werden zyklisch wiederholt.

Die Primer zur Amplifikation der VDJ-Umlagerung des IgVH-Gens bestanden aus zwei Sets, jeweils für das 5´ Ende und das 3´ Ende der DNA-Stränge. Das eine Set bestand aus dem 5´ Konsensus-Primer FR1c (**8**), der Sequenzen in der Frame Work Region 1 (FR1) erkennt und der 3´ JH Primermischung, bestehend aus JH1245, JH3 und JH6, die im Bereich des J-Elements hybridisieren und in einem molaren Verhältnis 4:1:1 eingesetzt wurden (**67**). Das andere Set bestand aus dem 5´ Konsensus-Primer FR2a (**104**), der Sequenzen in der Frame Work Region 2 (FR2A) erkennt und den 3´ JH-Konsensus-Primern LJH bzw. VLJH, beide spezifisch für das J-Element. Konsensus-Primer haben die Eigenschaft, an polymorphe bzw. polygene Sequenzen zu binden, die ausreichend homologe DNA-Abschnitte besitzen. Diese Konsensusregionen können in ihrer Sequenz geringfügige Unterschiede aufweisen, wie dies bei den verschieden VH-Familien der IgVH-Genregion der Fall ist. Konsensus-Primer können in diesem Fall sogenannte „Wobble"-Sequenzen aufweisen, die an einer bestimmten Stelle des Oligonukleotids verschiedene Nukleotide enthalten. Diese Art von Primer ist allerdings weniger sensitiv und weniger spezifisch als konventionelle Primer.

**Tabelle 2: Verwendete Primer und deren Sequenzen**

Die Amplifikation des Schwerkettengens (VH) wurde mit zwei Primersets durchgeführt. Das eine Set bestand aus den FR1c und den JH 1245, JH 3, JH 6 Primern. Das andere Set bestand aus den FR2a und den LJH, VLJH Primern, das zum Einsatz kam, wenn mit dem ersten Primerset keine monoklonale Amplifikation des Schwerkettengens gelang. Die Konsensusprimer FR1c und FR2a sind nicht spezifisch für einzelne Schwerkettengen-Familien und enthalten daher mehrere sogenannte „Wobble" Sequenzen, die in Klammern angegeben sind. An diesen Stellen sind verschiedene Nukleotide innerhalb des Oligonukleotids möglich.

| Primer | Sequenz |
|---|---|
| FR1c | 5´-AGGTGCAGCTG(G/C)(A/T)G(G/C)AGTC(G/A/T)GG-3´ |
| JH1245 | 5´-ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3´ |
| JH3 | 5´-TACCTGAAGAGACGGTGACCATTGT-3´ |
| JH6 | 5´-ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3´ |
| FR2a | 5´-TGG(A/G)TCCG(A/C/G)CAG(G/C)C(T/C)CCNGG-3´ |
| LJH | 5´-TGAGGAGACGGTGACC-3´ |
| VLJH | 5´-GGTGACCAGGGTCCCTTGGCCCCAG-3´ |

Für die PCR wurde ein TRIO Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Unter optimierten Laufbedingungen wurde die PCR in einem Standard-50 µl-Reaktionsansatz mit 10x Reaktionspuffer (mit 15mM $MgCl_2$, Amersham Pharmacia Biotech), demineralisiertem Millipore Q Wasser, 12,5 pmol FR1c und JH Mix Primer, 0,2 pmol von jedem dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Amersham Pharmacia Biotech) und 0.5 Einheiten Taq-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Die PCR wurde mit einem sog. „hot start" begonnen. Durch Vorheizen des Reaktionsmixes auf 94 °C vor Hinzufügen der in Reaktionspuffer gelösten Taq Polymerase wurde vermieden, daß unspezifisch angelagerte Primer elongiert werden konnten. Die Reaktionsansätze wurden bei 94°C für weitere 5 Min. denaturiert, ehe die DNA in 35 Zyklen amplifiziert wurde. Nach initialer Denaturierung bei 94 °C für 1 Min. folgte vor jedem Zyklus eine Anlagerung bei 65°C für 1 Min., eine Elongation bei 72°C für 1 Min und eine Denaturierung bei 94°C für 1 Min. Abschließend erfolgte ein Komplettierungsschritt bei 72°C für 10 Min., bevor der Ansatz auf 4°C abgekühlt wurde.

Fälle, die keine klonale Bande ergaben, wurden mittels einer verschachtelten PCR (Semi-Nested-PCR) mit dem FR2a Primer reanalysiert. Bei der Nested-PCR werden in der Reamplifikations-PCR Primer eingesetzt, die an beiden Enden des „Templates" (Ziel-DNA-Abschnitt) weiter „innen" ansetzen. Im Gegensatz dazu wird bei der Semi-Nested-PCR in der Reamplifikations-PCR nur der 3´ Primer ausgetauscht, der sich weiter „innen" anlagert. Bei dieser PCR wurden mit den Primern FR2a und LJH in einer ersten Amplifikationsrunde 35 Zyklen mit 55°C Anlagerungstemperatur durchgeführt. Alle anderen Laufbedingungen waren identisch mit der PCR mit dem FR1c Primer. Für die zweite Amplifikationsrunde wurde 1 µl dieses PCR-Produkts im Sinne einer Semi-Nested-PCR mit 25 Zyklen bei 60°C Anlagerungstemperatur reamplifiziert. Anwendung fanden die Primer FR2a und VLJH, wobei letzterer im Vergleich zu LJH weiter „innen" ansetzt. In beiden Ansätzen wurden je 1 pmol/µl Primer eingesetzt. Umseitig sind die Laufbedingungen schematisch dargestellt:

**FR1c PCR-Laufbedingungen**

| | | |
|---|---|---|
| 94°C | für 4 Min. | |
| 94°C | für 1 Min. | |
| 65°C | für 1 Min. | 35 Zyklen |
| 72°C | für 1 Min. | |
| 72°C | für 10 Min. | |
| 4°C | zur Lagerung | |

**FR2a PCR-Laufbedingungen**

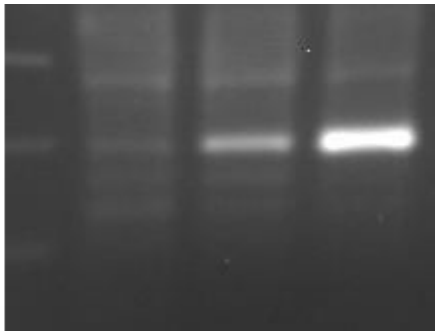
| | | |
|---|---|---|
| 94°C | für 4 Min. | |
| 94°C | für 1 Min. | |
| 55/60°C | für 1 Min. | 35/25 Zyklen |
| 72°C | für 1 Min. | |
| 72°C | für 10 Min. | |
| 4°C | zur Lagerung | |

Die Gefahr der PCR und vor allem der Semi-Nested-PCR mit ihrer enormen Amplifikationsrate besteht in der Kontamination. Deshalb wurde mit Latex Schutzhandschuhen pipettiert und gefilterte Pipettenspitzen (Biozym, Safe Seal-Tips) verwendet. Außerdem wurden alle Schritte bis zum Beginn der Amplifikationsreaktion in einem Labor durchgeführt, in dem zuvor kein PCR-Produkt verarbeitet wurde. Zur Detektion einer möglichen Kontamination wurde bei jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle mitgeführt.
Jede DNA-Probe wurde mindestens zweimal mit der PCR amplifiziert, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

## 3.4 Optimierung der Laufbedingungen

### 3.4.1 Optimierung der Anlagerungstemperatur

Mittels Variation der Anlagerungstemperatur wurde versucht, eine hohe Sensitivität und Spezifität der PCR zu erreichen. Beim Einsatz des FR1c Primers wurden die Anlagerungstemperaturen mit 63°C, 65°C und 67°C variiert. Als optimal ergab sich eine Anlagerungstemperatur von 65°C, die eine gute Sensitivität und Spezifität der Primeranlagerung an der Zielsequenz in der VH-Region zeigte. Die Bande bei 67°C war deutlich stärker als bei 65°C. Dennoch wurde diese höhere Temperatur nicht gewählt, um durch eine zu hohe Spezifität die Amplifikation stark mutierter Gensequenzen nicht zu erschweren. Beim Einsatz der im Ulmer Institut für Pathologie bereits gut etablierten Semi-Nested-PCR waren keine Änderung der Anlagerungstemperaturen notwendig.




M: Molekularmarker

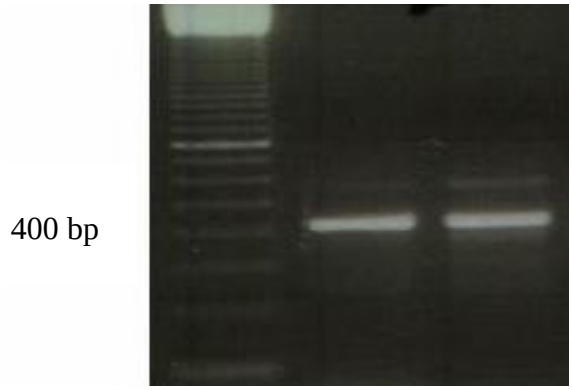
bp: Basenpaare

**Abbildung 3: Optimierung der Anlagerungstemperatur**

Die optimale Anlagerungstemperatur für die DNA bei der Polykettenreaktion (PCR) war 65° C. Bei dieser Anlagerungstemperatur zeigte sich eine distinkte Bande auf dem Elektrophoresegel im Bereich einer Fragmentlänge von 400 Basenpaaren des amplifizierten DNA-Fragments, ohne daß umgebende Banden nicht amplifiziert wurden, die möglicherweise von Bedeutung sein könnten.

### 3.4.2 Optimierung der DNA-Menge

Die Variation der zur PCR eingesetzten DNA-Menge mit 100 ng und 500 ng zeigte, daß 100 ng völlig ausreichten, um ein gutes Bandensignal bzw. ausreichende DNA-Menge zur Klonierung zu erhalten.




M: Molekularmarker

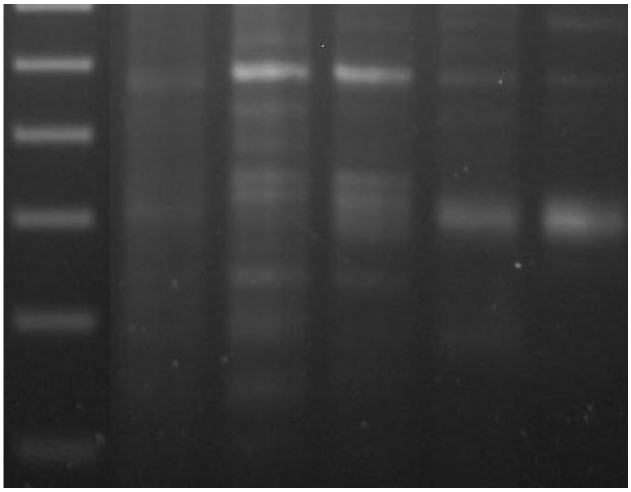
bp: Basenpaare

**Abbildung 4: Optimierung der DNA-Menge**

Der Einsatz einer DNA-Menge von 100 ng bei der Polykettenreaktion (PCR) ergab bei der Gelelektrophorese ein vergleichbar gutes Bandensignal wie der Einatz einer DNA-Menge von 500 ng. In allen weiteren Polykettenreaktionsansätzen wurden daher immer nur 100 ng DNA eingesetzt.

### 3.4.3 Optimierung der Zyklenanzahl

Die Variation der Zyklenanzahl erfolgte bei der PCR mit dem FR1c Primer mit 30, 35 und 40 Zyklen. Ziel war es, aus den 100 ng eingesetzter DNA möglichst viel amplifizierte DNA zu erhalten, ohne daß zu viele unspezifische Bandensignale aufgrund des Einsatzes des Konsensus-Primers FR1c auftraten. 35 Zyklen erwiesen sich als diesbezüglich optimale Zyklenanzahl. Die Variation der Zyklenanzahl war bei der bereits gut etablierten Semi-Nested-PCR ebenfalls nicht notwendig.




M: Molekularmarker

bp: Basenpaare

**Abbildung 5: Optimierung der Zyklenanzahl**

Die Durchführung von 35 Amplifikationszyklen bei der Polykettenreaktion (PCR) erwiesen sich als optimal. Mit 35 Amplifikationszyklen ergab sich ein spezifisches Bandensignal in ausreichender Intensität auf dem Elektrophoresegel im Bereich einer Fragmentlänge von 400 Basenpaaren des amplifizierten DNA-Fragments. 30 Zyklen reichten dafür nicht aus. Bei 40 Zyklen traten zu viele unspezifische Banden auf und führte sogar zur bevorzugten Amplifikation des falschen DNA-Abschnitts.

## 3.5 Gelelektrophorese

Zur Abschätzung der Fragmentlängen und der Klonalität der PCR-Produkte fanden 2%ige Agarosegele (Sigma Deutschland) Verwendung, die mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (entspricht 0,5 µg Ethidiumbromid absolut, Sigma, Deutschland) gegossen wurden, um die Fragmentbanden unter der UV-Lichtlampe sichtbar zu machen. Um die Größe der Fragmentlängen abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (1 kbp, 100 bp Stufen, Sigma, Deutschland) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 4°C in 1xTAE (TRIS HCl/Acetat/EDTA) Laufpuffer bei 100 V für ca. 2 Std. durchgeführt. Die Gele wurden anschließend mit einer Videokamera (ImageMaster VDS, Amersham Pharmacia Biotech) fotografiert und im Computer digitalisiert gespeichert.

## 3.6 Isolierung der DNA aus Agarosegelen

Bei Nachweis einer reproduzierbaren klonalen DNA-Fragmentbande im Bereich von ca. 370 bp (FR1c) bzw. 240 bp (FR2a) wurde das gesamte PCR-Volumen erneut auf ein 2% iges Agarosegel aufgetragen und die distinkte, einem monoklonalen PCR-Produkt entsprechende Bande unter der UV-Lichtlampe (Baihofer, Deutschland, λ = 302 nm, typ IL-350 mW) mit einem gereinigten Skalpell ausgeschnitten. Die direkte UV-Bestrahlung der Proben wurde durch Aluminiumfolie minimiert, um mögliche Alterationen der DNA zu vermeiden. Die DNA wurde mit der Gelchromatographie (QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach vom Hersteller vorgegebenem Protokoll isoliert und gereinigt.

## 3.7 Klonierung der DNA-Fragmente

Die Klonierung ermöglicht die Vervielfältigung von DNA im Mikrogramm-Bereich. Das gewünschte DNA-Fragment (Insert) wird in eine ringförmige Plasmid-DNA eingeschleust (ligiert) und in kompetente Bakterien transformiert, die durch ihr Wachstum diese vervielfältigen. Nach Lyse der Bakterien und entsprechender Aufreinigung kann das im Plasmid verankerte DNA-Fragment wieder gewonnen werden.
Der Ligationsansatz des verwendeten pGEM-T-Vektor-Systems (Promega, Mannheim, Deutschland) enthielt Insert und Vektor in einem molaren Verhältnis von 3:1. Nach erfolgter Ligation der Insert-DNA in die Plasmide mittels T4-Ligase bei 4 °C über Nacht wurden die Plasmide in kompetente JM 109 Bakterien mittels Hitzeschock (bei 42°C für 45 Sek.) transformiert. Die Bakterien wurden zunächst für 1,5 Std. in flüssigem autoklaviertem SOC-Medium (pro Liter Aqua dest. 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 0,25 M KCl, 5ml 2 M MgCl2, 20 ml 1 M Glucose, pH 7,0) unter Schütteln bei 37°C kultiviert und anschließend auf Luria Bertani (LB)-Agar-Platten (1 Liter LB Medium, siehe unten, + 1,5 % Agar + 100 µg Ampicillin) mit den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen an X-Gal (Sigma Aldrich) und IPTG (Sigma Aldrich) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Weiße Kolonien, die das Insert enthalten, wurden mit einer hitzesterilisierten Drahtöse von den Platten geerntet. Das lacZ-Gen, das durch ein Insert unterbrochen wird, kann kein α-Fragment der ß-Galaktosidase bilden, so daß trotz Anwesenheit des lac Promoters und IPTG sowie des Substrats X-Gal keine Blaufärbung der Kolonien stattfindet.

Mittels Restriktionsenzymanalyse mit den Enzymen SacI und ApaI, die an entgegengesetzten Enden der Multiple-Cloning-Site des Plasmids schneiden, wurde überprüft, ob das Insert enthalten war. Die Multiple-Cloning-Site enthält 10 – 20 Schnittstellen, die nur einmal im Vektor vorkommen. Die Plasmide wurden bei 30°C mit ApaI und 37°C mit SacI jeweils zwei Stunden inkubiert und anschließend die Enzyme bei 70°C in 5 Min. denaturiert. Die geschnittenen Fragmente wurden auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch sichtbar gemacht.
Jeweils eine geerntete Bakterienkolonie wurde über Nacht bei 37 °C in LB Medium (pro Liter Aqua dest10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH pH 7,5) inkubiert und anschließend zentrifugiert, um ein Bakterienpellet zu erhalten. Die Plasmid-DNA wurde nach einem alkalischen Lyseprotokoll (Modifizierung der Methoden nach Birnboim und Doly (1979) und Ish-Horowicz und Burke (1981)) wie folgt präpariert und bei –20°C konserviert:

1. Lösung des Bakterienpellets mit 50 mM Glucose, 25mM TRIS. Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)
2. Hinzufügen von 0,2 n NaOH und 1% SDS
3. Hinzufügen einer eiskalten Lösung mit 5 M Kaliumacetat, Essigsäure und $H_2O$
4. Zentrifugation mit 12 000g zur Separation der Zelltrümmer und Überstand
5. Alkoholfällung des Überstandes

## 3.8 Sequenzierung der klonierten DNA-Produkte

Die Sequenzierung ermöglicht das Lesen der Basenabfolge eines DNA-Abschnitts. Die Sequenzierung nach Sanger wurde erstmals 1977 beschrieben (**114**). Bis heute hat sich an dieser Methode grundlegend nichts geändert. Nach Denaturierung des DNA-Segments lagert sich der Primer an den DNA-Strang an, und eine Polymerase verlängert ihn mit dNTPs wie bei einer PCR. Beim Einbau eines 2´3´ddNTPs wird die Elongation abgebrochen. Der Einbau der ddNTPs erfolgt nach statistischen Gesetzen, und so entstehen unterschiedlich lange Fragmente. Im Gegenatz zur PCR wird nur ein Primer eingesetzt. Es kommt daher nicht zur exponentiellen sondern nur zur linearen Amplifikation der DNA. Beim autozyklischen Sequenzieren sind entweder der Primer oder die ddNTP floureszenzmarkiert. Die Primer und ddNTP lagern sich an die Einzelstränge an, und das Reaktionsprodukt wird auf ein

hochauflösendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Via Laser erzeugen die markierten Primer ein optisches Signal, aus der die Basensequenz bestimmt wird.
Der CY5-Auto Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) fand Anwendung für die Markierungsreaktion. Beide Plasmid-Einzelstränge wurden sequenziert, indem jeweils in getrennten Reaktionsansätzen ein floureszenzmarkierter „forward“ Primer ALFred M13-40 und „reverse“ Primer ALFred M13 eingesetzt wurden. In getrennten Reaktionsgefäßen wurden ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP hinzugefügt, so daß pro Plasmid acht Reaktionen notwendig waren.
Dem protokollgemäßen Reaktionsansatz mit dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer, dem Primer und DMSO wurde ein 1 µl klonierte Plasmid-DNA zugefügt. Sämtliche Pipettierarbeiten wurden auf Eis durchgeführt, um die Elongation unspezifisch angelagerter Primer zu verhindern. Die Laufbedingungen für die PCR erfolgten ebenfalls laut Protokoll. Nach Beendigung der PCR wurde eine Stop-Lösung (Formamid/Blue Dextran Farblösug) in die Reaktionsgefäße pipettiert, um weitere unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Vor dem Beladen des Polyacrylamidgels erfolgte die Denaturierung der DNA-Stränge für 2-3 Minuten bei 95 °C mit anschließender Lagerung auf Eiswasser.
Für das sechsprozentige Polyacrylamidgel wurde 10x TBE Puffer (108 g TRIS/55 g Borat/ 40 ml EDTA (0,5 M pH 8,0)), Harnstoff und Long Ranger Gel Lösung (50%) (FMC Bio Products, Birmingham, USA) verwendet. Zur Vermeidung feinster Bläschen im Gel erfolgte vor der chemischen Polymerisationsinduktion mit APS (10 %) und Temed eine Entgasung durch manuelle Vakuumfiltration. Hierzu wurde die Gellösung auf eine 60 ml Spritze aufgezogen, auf die ein 45 µm Mikrofilter (Schleicher-Schuell, Deutschland) gesteckt war. Nach Auffüllen der Gelkassette erfolgte die Polymerisation des Geles für mindestens 90 Min. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Alf Express Sequencer AM V 3.0 (Amersham Pharmacia Biotech) bei 1500 V, 38 mA über 12 Std. Die Gelkassette war konstant auf 50°C temperiert.

## 3.9 Analyse der Sequenzdaten

Die ermittelte Basenabfolge, die mittels der Alf Express Sequencer AM V 3.0 Software in graphischer Form und als Basenabfolge dargestellt wurde, mußte nochmals „handverlesen“ werden, um die Stellen mit unklaren Basensignalen zu ergänzen, in denen die Software keine Entscheidung treffen konnte.

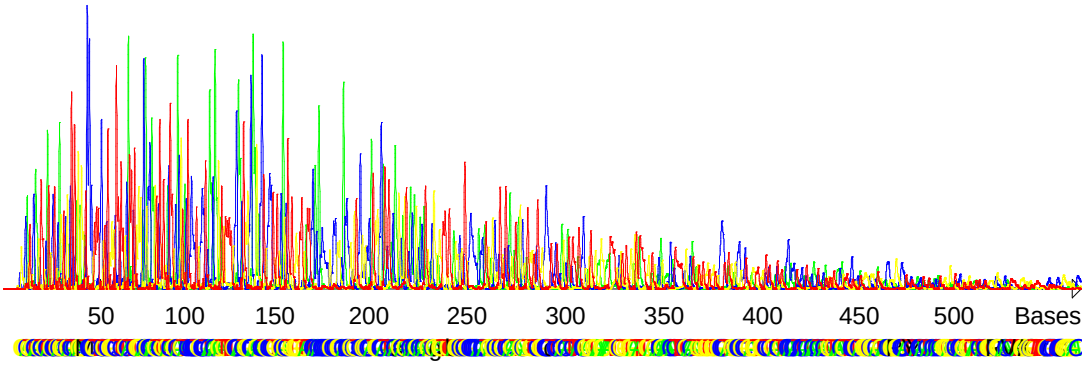



**Abbildung 6: Graphische und alphanumerische Darstellung einer Sequenzieranalyse im Überblick**
Der ALF Express Sequencer detektiert die fluoreszenzmarkierten Nukleotide mittels Laserstrahl im Elektrophoresegel und generiert aus den Signalen sowohl eine farbkodierte graphische als auch eine alphanumerische Basensequenz, die anschließend mit den Daten der Genbanken verglichen werden kann.

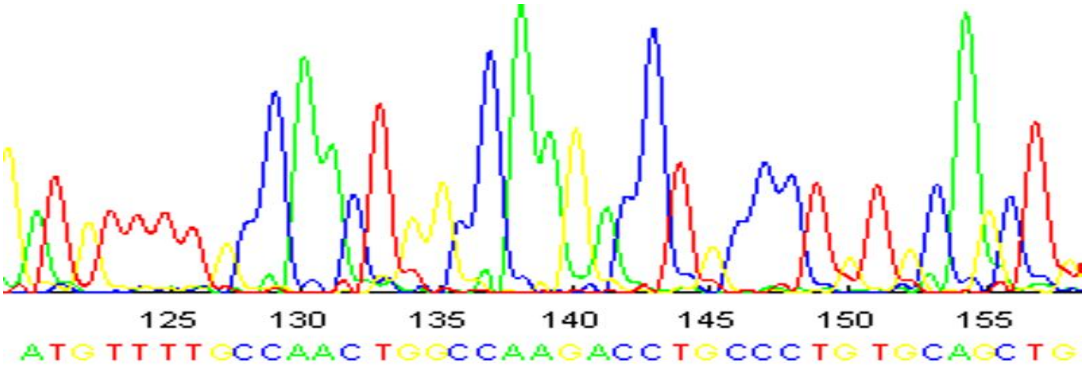



**Abbildung 7: Darstellung eines Sequenzanalyseausschnitts**
Die farbkodierten Kurven stellen die detektierte Basenabfolge graphisch dar. Die roten Kurven stellen Signale der fluoreszenzmarkierten Thymine (T), die blauen der Cytosine (C), die gelben der Guanine (G) und die grünen der Adenosine (A) dar. Die zeitlich unterschiedlich auftretenden Signale werden zusätzlich als alphanumerische Sequenzabfolge dargestellt.

Pro Fall erfolgte zunächst der Vergleich der „forward“ und „backward“ Sequenz jedes Klones mittels einer dafür geeigneten, im Internet verfügbaren Software (BLAST 2 Sequences, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html). Die nach manueller Korrektur erhaltene Klonsequenz wurde anschließend durch gleichzeitige Mehrfachanlagerung im Internet unter „BCM Search Launcher Multiple Sequence Alignments“ (ClustalW1.8 Software, (http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html)) mit den weiteren Klonsequenzen desselben Falls verglichen, um eventuelle Basenaustausche feststellen zu können. Für jeden Fall wurde analog zu verschiedenen Publikationen eine ausreichende Anzahl von Klonen sequenziert und Mutationen nur als solche gewertet, wenn sie in mindestens zwei Klonen gefunden wurden (**77**, **95**).

Basenaustausche können auch durch Lesefehler der Taq Polymerase verursacht werden und unter Umständen zu falsch-positiven Resultaten führen (**77**). In unserem Labor betrug diese Fehlerrate 1,3 bp/1000 bp (0,13 %) und ist vergleichbar mit der anderer Studien (**95**, **96**).

```
Klon 1          TAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCACTC 60
Klon 2          TAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGCCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCACTC 60
Klon 3          TAGGTGCAGCTGGAGGAGTCGGGCCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCACTC 60
Klon 4          TAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGCCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCACTC 60
Klon 5          TAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGCCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCACTC 60
Klon 6          TAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCACTC 60
Klon 7          TAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCACTC 60
                ************  * **** ************************************

Klon 1          TCCTGCGTTGTGTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTTGCCTACTTCTGGGCCTGGTTCCGC 120
Klon 2          TCCTGCGTTGTGTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTTGCCTACTTCTGGGCCTGGTTCCGC 120
Klon 3          TCCTGCGTTGTGTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTTGCCTACTTCTGGGCCTGGTTCCGC 120
Klon 4          TCCTGCGTTGTGTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTTGCCTACTTCTGGGCCTGGTTCCGC 120
Klon 5          TCCTGCGTTGTGTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTTGCCTACTTCTGGGCCTGGTTCCGC 120
Klon 6          TCCTGCGTTGTGTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTTGCCTACTTCTGGGCCTGGTTCCGC 120
Klon 7          TCCTGCGTTGTGTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTTGCCTACTTCTGGGCCTGGTTCCGC 120
                ************************************************************

Klon 1          CAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTCTCTATACTGGGAGAACTTCCTAC 180
Klon 2          CAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTCTCTATACTGGGAGAACTTCCTAC 180
Klon 3          CAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTCTCTATACTGGGAGAACTTCCTAC 180
Klon 4          CAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTCTCTATACTGGGAGAACTTCCTAC 180
Klon 5          CAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTCTCTATACTGGGAGAACTTCCTAC 180
Klon 6          CAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTCTCTATACTGGGAGAACTTCCTAC 180
Klon 7          CAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTCTCTATACTGGGAGAACTTCCTAC 180
                ************************************************************

Klon 1          TACAACTCATCCCTCAAGAGTCGAGTGACCGTTTCCGTTGACACGTCCAAGAGTCAGTTC 240
Klon 2          TACAACCCATCCCTCAAGAGTCGAGTGACCGTTTCCGTTGACACGTCCAAGAGTCAGTTC 240
Klon 3          TACAACCCATCCCTCAAGAGTCGAGTGACCGTTTCCGTTGACACGTCCAAGAGTCAGTTC 240
Klon 4          TACAACCCATCCCTCAAGAGTCGAGTGACCGTTTCCGTTGACACGTCCAAGAGTCAGTTC 240
Klon 5          TACAACCCATCCCTCAAGAGTCGAGTGACCGTTTCCGTTGACACGTCCAAGAGTCAGTTC 240
Klon 6          TACAACCCATCCCTCAAGAGTCGAGTGACCGTTTCCGTTGACACGTCCAAGAGTCAGTTC 240
Klon 7          TACAACCCATCCCTCAAGAGTCGAGTGACCGTTTCCGTTGACACGTCCAAGAGTCAGTTC 240
                ****** ******************************************************

Klon 1          TCCCTGAAGGTGACCTCTGTGACCGCCTCGGACTCGGGTCTTTATTTTTGTGCGAGACAT 300
Klon 2          TCCCTGAAGGTGACCTCTGTGACCGCCTCGGACTCGGGTCTTCATTTTTGTGCGAGACAT 300
Klon 3          TCCCTGAAGGTGACCTCTGTGACCGCCTCGGACTCGGGTCTTTATTTTTGTGCGAGACAT 300
Klon 4          TCCCTGAAGGTGACCTCTGTGACCGCCTCGGACTCGGGTCTTTATTTTTGTGCGAGACAT 300
Klon 5          TCCCTGAAGGTGACCTCTGTGACCGCCTCGGACTCGGGTCTTTATTTTTGTGCGAGACAT 300
Klon 6          TCCCTGAAGGTGACCTCTGTGACCGCCTCGGACTTGGGTCTTTATTTCTGTGCGAGACAT 300
Klon 7          TCCCTGAAGGTGACCTCTGTGACCGCCTCGGACTTGGGTCTTTATTTCTGTGCGAGACAT 300
                ********************************** ******* **** ************

Klon 1          AATTCCAACTGGGAGCTTGACACTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 360
Klon 2          AATTCCAACTGGGAGCTTGACACTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 360
Klon 3          AATTCCAACTGGGAGCTTGACACTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 360
Klon 4          AATTCCAACTGGGAGCTTGACACTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 360
Klon 5          AATTCCAACTGGGAGCTTGACACTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 360
Klon 6          AATTCCAACTGGGAGCTTGACACTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 360
Klon 7          AATTCCAACTGGGAGCTTGACACTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 360
                ************************************************************
```

**Abbildung 8: Mehrfachanlagerung aller Klonsequenzen desselben Falls mit der CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments Software**

Die Mehrfachanlagerung aller Klonsequenzen dient der Ermittlung von Mutationen im sequenzierten DNA-Abschnitt. Die Sternchen unterhalb der Sequenzen zeigen an, daß diese Basen an der entsprechenden Sequenzstelle in allen Klonen übereinstimmten. Mutationen wurden nur als solche gewertet, wenn sie in mindestens zwei Klonen vorkamen. Die Primer-Sequenzen sind grau unterlegt, da Mutationen im Primer-Bereich nicht relevant sind.

Die Konsensussequenzen der klonalen VDJ-Umlagerungen wiederum wurden mit im Internet veröffentlichten Keimbahnsequenzen des IgVH-Gens verglichen. Zur Verfügung standen DNAPLOT Version 2.0.1 und die VBASE Datenbank Version 1.0, die ausschließlich Keimbahnsequenzen enthalten und im Internet unter „http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk“ aufrufbar sind.

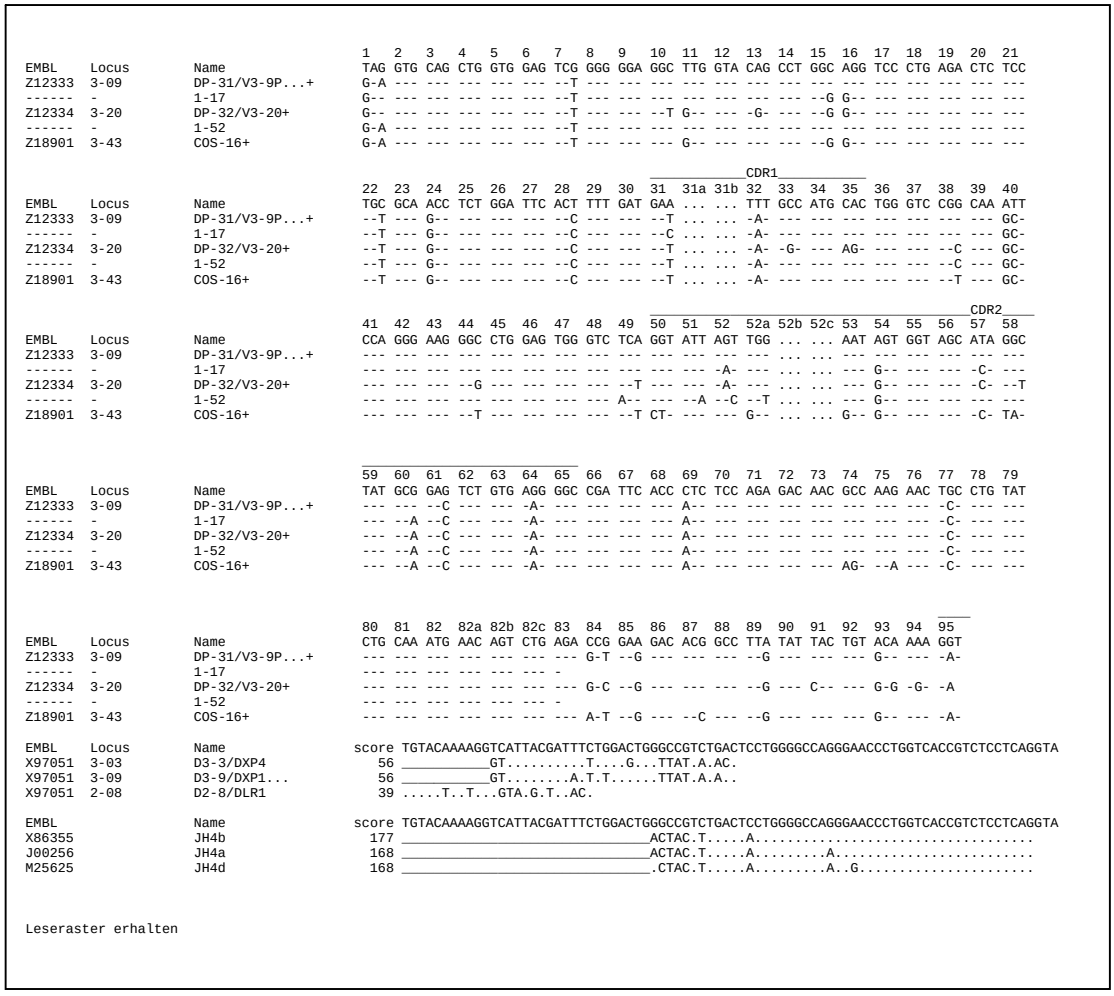



**Abbildung 9: Vergleich der ermittelten Konsensussequenz des Falles 4 mit Keimbahnsequenzen aus den Genbanken des Internets**

Der Vergleich der Konsensussequenz mit den Keimbahnsequenzen ermöglicht die Ermittlung der korrespondierenden Keimbahn der Schwerkettenregion und die Ermittlung von Punktmutationen. Die Keimbahnsequenz mit der größten Homologie wird an oberster Stelle angeführt, gefolgt von denen mit weniger Homologien. Bindestriche zeigen identische Basen an, ausgetauschte Basen werden durch den entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Die CDR (Complementary Determining Regions) sind durch Linien oberhalb der Konsensussequenz angegeben. Locus bezeichnet die korrespondierende Keimbahn mit ensprechendem Namen und Genbankcodenummer (EMBL).

Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit und in der Absicht, fortgesetzte Mutationen (intraklonale Diversität) zu entdecken, wurden pro Fall mehrere Klone sequenziert. Mit drei Ausnahmen im Fall 9, 12 und 13b war die Anzahl der sequenzierten lymphomspezifischen PCR-Klone vergleichbar mit der anderer Studien, die nach fortgesetzten Mutationen suchten (**1**, **10**, **19**).

**Tabelle 3: Anzahl der analysierten Klone pro Fall**

Pro Fall wurden mindestens drei Klone sequenziert, um mögliche Abweichungen der Basensequenz innerhalb eines Falls im Sinne fortgesetzter Mutationen detektieren zu können.

| Fall | Anzahl der sequenzierten Klone |
|---|---|
| 1 | 7 |
| 2 | 8 |
| 3 | 8 |
| 4 | 7 |
| 5 | 8 |
| 6 | 9 |
| 7 | 6 |
| 8a | 8 |
| 8b | 7 |
| 9 | 3 |
| 10 | 6 |
| 11 | 5 |
| 12 | 3 |
| 13a | 5 |
| 13b | 3 |

Der Fall 3 ergab keine übereinstimmende IgVH-Keimbahnsequenz (alignment) im DNAPLOT aufgrund von Sequenzdeletionen. Die Analyse erfolgte in diesem Fall mit IgBLAST-Software, die unter „http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/“ aufrufbar ist.

Um zu bestimmen, ob die Mutationen des IgVH-Gens zufällig oder unter Selektionsdruck zustande gekommen waren, wurde das Verhältnis von beobachteten Austauschmutationen (R)

zu beobachteten stummen Mutationen (S) in den Frame Work Regionen bestimmt und mit dem zu erwartenden R/S Verhältnis verglichen (**17**).

Ein Computerprogramm ermittelte zunächst, wieviele stumme Mutationen und wieviele Austauschmutationen zu erwarten waren, also rein zufällig ohne Selektionsprozeß aufgetreten wären. Dazu wurden die korrespondierende VH-Keimbahnsequenz und die Anzahl der gefundenen Mutationen eingegeben. Anschließend wurde das Signifikanzniveau (p-Wert) bestimmt, um die Abweichung zwischen zu erwartender und tatsächlich vorhandener Mutationen als zufällig oder nicht zufällig einordnen zu können.

Das Computer-Anwendungsprogramms Inh Sus Calc V 1.0 and RS Probability wurde freundlicherweise von Dr. Paolo Casali und Dr. Hong Zan (Abteilung für Molekulare Immunologie des Instituts für Pathologie, Cornell University Medical College, New York, USA) bereitgestellt.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Detektion klonaler VDJ-Genumlagerungen

Das FR1c/JH Primerset erbrachte in acht der 13 klonal umgelagerten Fälle (61,5 %) ein monoklonales Bandensignal. Die restlichen fünf Fälle (38,5 %) ergaben zunächst kein klonales Signal mit dieser Primerkombination. Das vielfach etablierte FR2a/LJH/VLJH Primerset, ergab in diesen Fällen ein klonales Signal.

**Tabelle 4: Fallabhängig verwendete 5´ Primer**

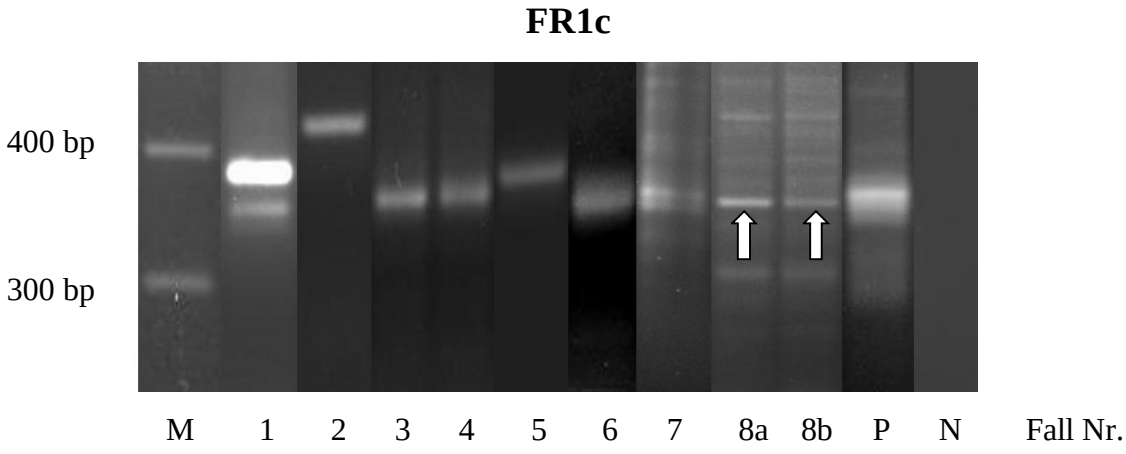
In den Fällen 1 bis 8b gelang mit dem FR1c/JH Primerset eine monoklonale Amplifikation der Ziel-DNA. In den Fällen 9 bis 13b gelang dies mit dem FR2a/LJH/VLJH Primerset.

| Fall Nr. | Primer Set |
|---|---|
| 1 | FR1c |
| 2 | FR1c |
| 3 | FR1c |
| 4 | FR1c |
| 5 | FR1c |
| 6 | FR1c |
| 7 | FR1c |
| 8a | FR1c |
| 8b | FR1c |
| 9 | FR2a |
| 10 | FR2a |
| 11 | FR2a |
| 12 | FR2a |
| 13a | FR2a |
| 13b | FR2a |

Insgesamt zeigten sich in 13 der 20 Fälle (65%) klonale IgVH-Genumlagerungen. Sieben der 20 Proben (35%) erzeugten kein klonales Signal, sondern lediglich polyklonale Banden bei der Gelelektrophorese.

Alle 13 Fälle mit klonaler Genumlagerung waren monoallelisch. In den Fällen 8a, 8b und 11 wurden zwar mehrere Banden amplifiziert, nach Sequenzanalyse stellten sich diese zusätzliche Banden aber als unspezifisch heraus.

Die Fragmentlängen betrugen ca. 370 bp für die PCR Produkte, die mit dem FR1c Primerset und ca. 240 bp, die mit dem FR2a Primerset erstellt wurden.




M: Molekularmarker

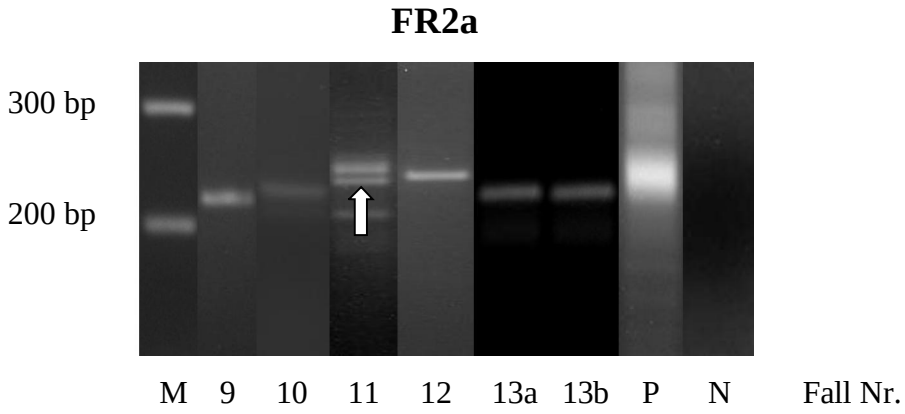
bp: Basenpaare

P: Positivkontrolle

N: Negativkontrolle

**Abbildung 10: Nachweis monoklonaler Schwerkettengenumlagerungen in den Fällen 1 bis 8b**

In den Fällen 1 bis 8b ergab die Polykettenreaktion (PCR) mit der FR1c Primerkombination ein monoklonales Bandensignal im Bereich einer Fragmentlänge von 370 Basenpaaren. Fälle 9 bis 13b ergaben kein monoklonales Bandensignal mit dieser Primerkombination. Im Fall 8a und 8b zeigte sich nach Sequenzanalyse nur die mit Pfeil markierte Bande als spezifisches Schwerkettengenprodukt. Die Positivkontrolle mit normalen B-Zellen (buffy coat) zeigte ein polyklonales Bandensignal. Die Negativkontrolle ergab keine Kontamination des PCR-Reaktionsansatzes mit Fremd-DNA.




M: Molekularmarker

bp: Basenpaare

P: Positivkontrolle

N: Negativkontrolle

**Abbildung 11: Nachweis monoklonaler Schwerkettengenumlagerungen in den Fällen 9 bis 13b**

In den Fällen 9 bis 13b ergab die Polykettenreaktion (PCR) mit der FR2a Primerkombination ein monoklonales Bandensignal im Bereich einer Fragmentlänge von 240 Basenpaaren. Im Fall 11 zeigte sich nach Sequenzanalyse nur die mit Pfeil markierte Bande als spezifisches Schwerkettengenprodukt. Die Positivkontrolle mit normalen B-Zellen (buffy coat) zeigte ein polyklonales Bandensignal. Die Negativkontrolle ergab keine Kontamination des PCR Reaktionsansatzes mit Fremd-DNA.

## 4.2 Hohe Rate an somatischen Hypermutationen

Die Homologie zu den entsprechenden Keimbahnsequenzen betrug 69,1 % bis 94,4 % (Mittelwert 87 %). Somit wiesen alle Fälle eine hohe Mutationsrate auf (5.6% bis 30.9%; Mittelwert: 13.0%). Der stark mutierte Fall 3 (18,8%) zeigte eine Deletion von 19 bp am Übergang zwischen der FR1 und CDR1 und von 8 bp innerhalb der FR3. Die Codons 26 – 31a und 72 – 75 der korrespendierenden VH4-30.4 Keimbahnsequenz waren durch diese Deletionen betroffen. Durch diese Deletionen wurde das Leseraster verschoben und zwei Stop-Codons entstanden, so daß keine Kodierung für ein funktionales Immunglobulin möglich gewesen wäre. Diese Deletionen entstanden vermutlich im Rahmen der somatischen Hypermutationsvorgänge. Jeweils zwei Proben der Fälle 8a und 8b und 13a und 13b hatten eine gleich hohe Mutationsrate mit 16,9 % bzw. 17,3 %. Auch sie gehören zu den stärker mutierten Fällen, die aber eine noch potentiell funktionale Genumlagerung zeigten.
In 12 der 13 Fälle war das Leseraster der VDJ-Umlagerungen erhalten, d.h. die Sequenzen waren potentiell funktional. Nur bei Fall 3 war das Leseraster nicht erhalten. In 10 der 12 Fälle (83%) mit potentiell funktionaler Umlagerung traten Austauschmutationen signifikant ($p<0.05$) seltener auf, als dies per Zufall zu erwarten gewesen wäre. Der Mittelwert der ermittelten R/S Verhältnisse betrug 1,4 (Schwankungsbreite: 0,7 – 3,4).

## Tabelle 5: Mutationsverteilung in den Schwerkettengenen (VH)

Die beobachten Mutationen in den Frame Work Regions (FR) unterteilen sich in Austauschmutationen (R) und stumme Mutationen (S). Der beobachtete und der erwartete Quotient aus beiden wurden miteinander verglichen. In den Codons mit 2 oder 3 ersetzten Basen wurde jede Mutation getrennt als R oder S Mutation im Vergleich mit der entsprechenden Keimbahnsequenz klassifiziert. Bis auf Fall 3 war bei allen Sequenzen das Leseraster erhalten und waren daher potentiell funktional. Alle Fälle zeigten eine hohe Mutationsrate zwischen 5,6 und 30,9 %. Das Verhältnis der beobachteten Austauschmutationen zu stummen Mutationen war bei allen Fällen außer Fall 4 und 6 signifikant kleiner (p-Wert < 0,05) als durch Zufall zu erwarten gewesen wäre.

| Fall Nr. | Leseraster erhalten | Prozentsatz an Mutationen | beobachtete Mutationen in FR | | R/S beobachtet | R/S erwartet | p-Wert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | R | S | | | |
| 1 | + | 7.4 | 7 | 5 | 1.4 | 2.8 | 0.0327 |
| 2 | + | 5.6 | 4 | 3 | 1.3 | 2.9 | 0.0156 |
| 3 | - | 18.8 | na | na | na | na | na |
| 4 | + | 6.3 | 8 | 5 | 1.6 | 3.0 | 0.1434 * |
| 5 | + | 14.4 | 17 | 5 | 3.4 | 3.3 | 0.0252 |
| 6 | + | 6.7 | 7 | 3 | 2.3 | 2.9 | 0.0651 * |
| 7 | + | 9.3 | 7 | 7 | 1.0 | 3.0 | 0.0026 |
| 8a | + | 16.9 | 14 | 14 | 1.0 | 2.6 | 0.0007 |
| 8b | + | 16.9 | 14 | 14 | 1.0 | 2.6 | 0.0007 |
| 9 | + | 14.9 | 8 | 12 | 0.7 | 2.8 | 0.0069 |
| 10 | + | 10.5 | 4 | 7 | 0.6 | 3.2 | 0.0088 |
| 11 | + | 30.9 | 21 | 12 | 1.8 | 3.2 | 0.0396 |
| 12 | + | 10.5 | 9 | 10 | 0.9 | 3.4 | 0.0339 |
| 13a | + | 17.3 | 8 | 7 | 1.1 | 3.2 | 0.0033 |
| 13b | + | 17.3 | 8 | 7 | 1.1 | 3.2 | 0.0033 |

* p-Wert > 0,05 => nicht signifikant

na: nicht analysiert, da nicht funktional

R: Austauschmutationen (Replacement)

S: Stumme Mutationen

Die Sequenzen wurden in der EMBL/Gen Bank/DDBJ Datenbank unter der Zugangsnummer AJ292059-AJ202070 hinterlegt.

## 4.3 Fortgesetzte Mutationen - intraklonale Diversität

Es wurde in keinem der PMBL-Fälle außer der MedB-1 Zellinie (Fall 8b) eine intraklonale Heterogenität des IgVH-Gens beobachtet, so daß kein Anhalt für fortgesetzte Mutationen besteht. In den Fällen 9 und 12 ist die Signifikanz der Aussage über die fehlende intraklonale Diversität eingeschränkt, weil jeweils nur drei Klone analysiert wurden. Eine eventuell besonders niedrige Rate an fortgesetzten Mutationen könnte dieser Analyse entgangen sein. Die Amplifikation der Fallproben 13a und 13b, die von demselben Patienten stammten, ergaben identische VDJ-Sequenzen. Eine Probe wurde vor und eine nach Chemotherapie gewonnen. Die Zellinie MedB-1 wies eine geringe intraklonale Heterogenität auf. Zwei ausgetauschte Basen in den Klonen 3 und 6, eine in Codon 87 und eine in Codon 91 waren mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf einen Taq-Fehler zurückzuführen.

```
          86  87  88  89  90  91  92
VH4-39    GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT
          ***  **  *  *  *  ***  *  ***
Klon 1    GAC TCG GGT CTT TAT TTT TGT
Klon 2    --- --- --- --- --- --- ---
Klon 3    --- -T- --- --- --- --C ---
Klon 4    --- --- --- --- --- --- ---
Klon 5    --- --- --- --- --- --- ---
Klon 6    --- -T- --- --- --- --C ---
Klon 7    --- --- --- --- --- --- ---
```

**Abbildung 12: Der Nachweis fortgesetzter Mutationen im Fall 8 b (MedB-1 Zellinie)**
Sieben Klonsequenzen der MedB-1 Zellinie wurden simultan angelagert und mit der Keimbahnsequenz VH4-39 verglichen, die am meisten Homologien zeigte. Zwischen den Codons 86 und 92 fielen im Klon 3 der Austausch eines Cytosins (C) durch ein Thymin (T) und im Klon 6 der Austausch eines Thymin (T) durch ein Cytosin (C) auf. Fortgesetzte Mutationen waren dafür wahrscheinlich die Ursache. Die Sternchen stellen homologe Basen zur Keimbahnsequenz und Bindestriche homologe Basen innerhalb der Klonsequenzen dar.

## 4.4 VH-Genfamilienverteilung

Mitglieder der VH3-Familie wurden in sechs der 12 potentiell funktionalen VDJ-Sequenzen (50%) umgelagert und stellten somit den größten Anteil dar. VH4-Sequenzen wurden in 2 Fällen (16,7%) gefunden, von denen eine Probe der VH4-34-Genfamilie zugehörig war. Der bevorzugte Gebrauch der VH4-34-Familie wurde im Zusammenhang mit dem Einfluß von Auto- bzw. Superantigenen bei der B-Zellentwicklung beschrieben. VH1 wurde ebenfalls

zweimal (16,7%) und VH2 und VH5 je einmal gefunden (8,3%). Somit ergab sich kein Hinweis auf bevorzugte Verwendung der VH4-Familie.

**Tabelle 6: Korrespondierende Keimbahnsequenzen der Schwerketten (VH) zu den Fällen**

Die Zuordnung der Schwerkettengensequenzen (VH) zu den korrespondierenden Keimbahnsequenzen zeigte nur in zwei Fällen Homologien zur VH4-Familie und konnte daher keine Hinweise zur Bevorzugung der VH4-Familie bei der Genumlagerung geben. Der Fall 3 lag außerhalb des Leserasters und wurde daher nicht mitgerechnet.

| Fall Nr. | korrespondierende $V_H$ Keimbahn |
|---|---|
| 1 | VH3-21 |
| 2 | VH3-48 |
| 3 | VH4-30.4 |
| 4 | VH3-09 |
| 5 | VH5-a |
| 6 | VH3-33 |
| 7 | VH1-69 |
| 8a | VH4-39 |
| 8b | VH4-39 |
| 9 | VH4-34 |
| 10 | VH2-05 |
| 11 | VH3-30 |
| 12 | VH1-02 |
| 13a | VH3-20 |
| 13b | VH3-20 |

# 5 Diskussion

## 5.1 Entwicklungsstadien der B-Zelle

Der Reifungsprozeß von B-Zellen läßt sich in vier Abschnitte aufteilen (**76**). Im ersten Abschnitt ist die Vorläuferzelle im VH-Gen nicht umgelagert im Unterschied zum zweiten Abschnitt, in dem eine VDJ-umgelagerte naive B-Zelle vorliegt. Im dritten Abschnitt findet die größte Veränderung des Immunglobulingens statt, welches im Keimzentrumsmilieu dem Einfluß von somatischen Hypermutationen, Affinitätsreifung und Isotypenwechsel unterliegt (**74**). Die Präsenz an T-Zellen und follikulären dendritischen Zellen ist für die Affinitätsreifung notwendig (**78**). Im vierten Abschnitt findet die Differenzierung zur B-Gedächtniszelle oder zur Plasmazelle außerhalb des Keimzentrums statt. Der dritte Abschnitt birgt ein hohes Potential für eine mögliche neoplastische Transformation, da er mit einer hohen Proliferationsrate und der Einfügung von Genmutationen einhergeht. Die Untersuchung somatischer Hypermutation des PMBL ist Gegenstand dieser Arbeit.

## 5.2 Nachweis monoklonaler VDJ-Umlagerungen

In 13 der insgesamt 20 bearbeiteten Fälle (65 %) konnte ein monoklonales Amplifikat erzeugt werden. Dabei konnte nur ein Teil der amplifizierbaren Genumlagerungen (61,5 %) mit der FR1c Primerkombination erfasst werden. Dies könnte an der höheren Anlagerungstemperatur bei der PCR mit dem FR1c Primer liegen, die eine Primerhybridisierung an mutierte Zielsequenzen erschwert. Eine weitere Möglichkeit ist ein unterschiedliches Ausmaß der Sequenzhomologie in der FR1 im Vergleich zur FR2A. Beide Primerkombinationen binden an DNA-Sequenzen mit vergleichbarer Anzahl an Guanin- oder Cytosinbasen und damit verbundener Sekundärstruktur. Die Anzahl der „Wobble“-Sequenzen ist ebenfalls identisch, so daß die GC-Sequenzen keinen theoretischen Erklärungsansatz bieten. GC-Basenpaare stellen stabilere Bindungen dar, weil sie drei Wasserstoffbrückenbindungen enthalten im Vergleich zu AT-Basenpaaren, die nur zwei enthalten.
In 35 % der Fälle ließ sich keine monoklonale Genumlagerungen der VDJ-Segmente detektieren. Vermutlich waren dafür das Tumorgewebe infiltrierende polyklonal reaktive B-Zellen verantwortlich (**77**). Eine Rate von 30% - 50% falsch negativen Ergebnissen ist nichts ungewöhnliches bei der Analyse von VDJ-Umlagerungen, bei der Konsensus-Primer für die

PCR eingesetzt werden (**84**). In einer Studie konnten bei 40 % der DLBCL keine klonalen VDJ-Umlagerungen amplifiziert werden, obwohl VH-genfamilienspezifische Primer Anwendung fanden und damit Primer, die sich potentiell spezifischer anlagern als Konsensus-Primer. Alterationen an den Ziel-DNA-Sequenzen können durch somatische Hypermutationen verursacht werden und dazu führen, daß die Primer sich nicht an die DNA (template) anlagern können (**110**).

## 5.3 Hohe Rate an somatischen Hypermutationen im PMBL

Alle untersuchten Fälle des PMBL zeigten als Merkmal eine hohe Rate an somatischen Hypermutationen. Sie ist im Durchschnitt mit 13,0 % deutlich höher als bei normalen Keimzentrums-B-Zellen und B-Gedächtniszellen und etwas höher als bei der Gruppe der übrigen DLBCL (**47**, **65**, **97**). Im Fall 11 fand sich mit 30,9% sogar eine äußerst hohe Mutationsrate. Demnach fand die maligne Transformation bei den untersuchten PMBL vermutlich im Stadium der Keimzentrumszelle statt, oder nachdem das Keimzentrum bereits durchlaufen wurde. Um eine derart hohe Anzahl an Genmutationen zu akkumulieren, müßten bislang unbekannte Prozesse die B-Zelle für eine längere Zeitspanne im Keimzentrum festgehalten haben als dies im Rahmen der normalen B Zellentwicklung vorkommt. Hätte sich die maligne Transformation ohne prolongierten Aufenthalt im Keimzentrum im Stadium einer B-Gedächtniszelle ereignet, in dem Hypermutationsvorgänge üblicherweise nicht mehr stattfinden, ergäbe sich theoretisch eine Mutationsfrequenz wie bei B-Gedächtniszellen.
Der molekulare Mechanismus der somatischen Hypermutation konnte erst kürzlich durch die Beschreibung der Aktivierungs-induzierten Cytidin Deaminase (AID) und der sich daran anschließenden Untersuchungen näher erhellt werden. Demnach bindet AID vermutlich während des Transkriptionsprozesses an Einzelstrang-DNA und deaminiert Cytidin, wodurch Hypermutationen initiert werden (**29**). Gene wie das IgVH-Gen, die eine hohe Transkriptionsrate zeigen, könnten AID-vermittelt verstärkt hypermutieren. Einzelsträngige DNA, die das Substrat von AID darstellt, entsteht üblicherweise bei der Gentranskription (**13**). Das vor kurzem beschriebene Replikationsprotein A (RPA) bildet dabei in aktivierten B-Zellen einen AID-RPA Proteinkomplex und bindet anschließend an die Einzelstrang-DNA, wodurch AID zur Deaminierung des Cytidins befähigt wird (**20**). Das durch Cytidin-Deaminierung entstandene Uracil wird bei der DNA-Replikation wie Thymin behandelt und als solches fixiert, wodurch C-T Mutationen entstehen. Beim Versuch, die fehlerhafte G-U

Paarung zu korrigieren, werden aus bislang noch ungenügend verstandenen Gründen bevorzugt DNA-Reperaturenzyme eingesetzt, die eine hohe Irrtumsrate aufweisen und auf diese Weise Mutationen in der Umgebung des deaminierten Cytidins plazieren (**20**, **82**, **29**).

Die Aktivierungs-induzierte Cytidin Deaminase (AID) könnte dabei eine Rolle bei der Entstehung von somatischen Hypermutationen in PMBL spielen. Untersuchungen an AID-defizienten Mäusen und Patienten mit Hyper-IgM Syndrom zeigen, daß ohne eine AID-Funktion die somatische Hypermutationsrate stark eingeschränkt ist und keine Isotypenwechsel stattfinden (**90**, **107**). Eine Arbeit an verschiedenen B-NHL Entitäten u.a. auch 22 Fälle von DLBCL fand heraus, daß in DLBCL in 32 % eine meßbare und in 9 % eine hohe AID-Expressionsrate auftritt (**117**). Eine weitere Studie fand in allen untersuchten DLBCL eine AID-Expression (**40**). Es ist sehr wahrscheinlich, daß AID auch bei der somatischen Hypermutation von PMBL eine zentrale Rolle spielt. Bis dato existieren jedoch keine Untersuchungen über die AID-Expression speziell im PMBL. Somatische Hypermutationen sind nicht nur auf den Ig-Locus begrenzt, sondern betreffen als sogenannte aberrante somatische Hypermutation auch weitere Gene wie BCL6, CD95 und Proto-Onkogene wie C-MYC, PIM-1, PAX-5 und TTF-1 (**80**, **98**, **99**). Eine kürzlich publizierte Arbeit über Mutationen des BCL6 Gens in PMBL stellte fest, daß sich PMBL bezüglich des Mutationsspektrums in BCL6 von anderen DLBCL unterscheidet (**80**). Inwieweit AID daran beteiligt ist bzw. zu welchem B-Zellentwicklungsstadium diese Mutationen unter dem Einfluß von AID eingefügt werden, ist noch nicht geklärt (**117**).

## 5.4 Fehlende fortgesetze Mutationen im PMBL

Eine weitere mögliche Erklärung für die hohe Rate an somatischen Hypermutationen wären fortgesetzte Mutationen (ongoing mutations) nach neoplastischer Transformation, wie sie beim follikulären Lymphom regelmäßig auftreten (**9**, **96**) und auch bei manchen Fällen von Burkitt-Lymphomen beschrieben wurden (**18**). Fortgesetzte Mutationen konnten allerdings bei den hier untersuchten PMBL nicht nachgewiesen werden. Lediglich in der Zellinie Med-B1 (Fall 8b) fanden sich in geringem Ausmaß fortgesetzte Mutationen. Möglicherweise kommt es aber in vitro zu einer Reaktivierung des Mutationsapparates, so daß dadurch artifiziell fortgesetzte Mutationen entstehen. Eine fehlende intraklonale Heterogenität läßt vermuten, daß der Mutationsprozeß bereits stillgelegt wurde, bevor die B-Zelle in einem

späten Stadium der B-Zellentwicklung maligne transformiert wurde (**76**). Es kann daher angenommen werden, daß der Mutationsapparat im PMBL ausgeschaltet ist. Dies kann auf eine Abstammung des PMBL von Post-Keimzentrumszellen hinweisen, in denen normalerweise keine somatische Hypermutation stattfindet. Ebenfalls ist es möglich, daß der molekulare Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung somatischer Hypermutation erforderlich ist, im Zuge der neoplastischen Transformation beschädigt wurde und aus diesem Grund nicht mehr aktiv sein kann. Eine dritte Möglichkeit ist eine Supprimierung der Mutationsaktivität durch fehlende externe Signale, die normalerweise durch T-Zellen im Keimzentrum bereitgestellt werden.

Die fixierten Mutationsmuster der PMBL zeigen sich unbeeinflußt von chemotherapeutischer Behandlung und Krankheitsprogreß. Eine Einengung des klonalen Spektrums unter Chemotherapie ist beschrieben worden (**96**), so daß die fehlende intraklonale Diversität durch eine entsprechende medikamentöse Behandlung hervorgerufen sein kann. In der großen Mehrzahl der von uns untersuchten Fälle wurde jedoch Tumorgewebe von unbehandelten Patienten analysiert.

In der Literatur sind die Angaben über fortgesetzte Mutationen bei DLBCL unterschiedlich. Einige Autoren beschrieben deren Existenz bei DLBCL (**49**, **51, 96**). Andere hingegen zeigten keine fortgesetzten Mutationen bei verschiedenen DLBCL Entitäten (**26, 37, 64, 125**), bei Rezidiven nach durchgeführter Zytostatikatherapie oder bei einem Progreß von DLBCL (**47**, **95**, **96**).

Möglicherweise ist die Ursache dieser Unterschiede methodischer Art. Die Untersuchung zu weniger Klone pro Fall könnte eine geringgradige intraklonale Heterogenität verschleiern (falsch negative Befunde). Andererseits könnte der Fehler der Taq-Polymerase fälschlicherweise als eine Mutation interpretiert werden (falsch positive Befunde) (**77**).

Eine Arbeitsgruppe konnte DLBCL in eine größere Untergruppe mit bestehenden fortgesetzten Mutationen und in eine kleinere ohne diese Eigenschaft unterteilen (**76**). Eine Unterteilung der DLBCL in Lymphome, die Keimzentrums-B-Zellen ähneln und Lymphome, die aktivierten B-Zellen ähneln, wurde durch die Analyse von Genexpressionsmustern mittels Microarray möglich (**77**). Zum direkten Vergleich der Genexpressionsmuster mit der Existenz oder Nichtexistenz fortgesetzter Mutationen wurde eine Folgestudie durchgeführt (**65**). Es traten fortgesetzte Mutationen nur bei Lymphomen auf, deren Genexpressionsmuster Keimzentrums-B-Zellen ähnlich (germinal center B cell (GCB)-like DLBCL) waren. Lymphome hingegen, die aktivierten peripheren B-Zellen (activated B cell (ABC)-like DLBCL) ähnelten, wiesen keine fortgesetzten Mutationen auf. Das Ausmaß und die

Verteilung der Mutationen unterschieden sich in beiden Gruppen nicht signifikant. Die gleiche Verteilung von Austauschmutationen und stummen Mutationen in den FR/CDR in beiden Gruppen läßt vermuten, daß die B-Zellen beider Gruppen im Verlaufe ihrer Entwicklung Kontakt mit dem Keimzentrum hatten. In der Annahme, daß diese Beobachtungen auf alle Entitäten an DLBCL übertragbar sind, würde das PMBL aufgrund der fehlenden fortgesetzten Mutationen eher den aktivierten B-Zellen oder B-Zellen zugeschrieben werden, die das Keimzentrum bereits durchlaufen haben (**76**). Eine weitere Arbeitsgruppe analysierte mittels Microarrays die Genexpression in DLBCL. Bei dieser Untersuchung erwies sich das PMBL aufgrund seines Expressionsprofils als eine distinkte Entität, die sich sowohl von den Keimzentrums-artigen als auch den aktivierten B-Zell-artigen DLBCL abgrenzen ließ. (**111**, **135**). Interessanterweise zeigte die Untergruppe der PMBL das beste 5-Jahres-Überleben mit 64 % versus 30 % bei den aktivierten B-Zell-ähnlichen DLBCL und 59% bei den Keimzentrums-B-Zell-ähnlichen DLBCL (**111**).

## 5.5 Die Rolle des Keimzentrums beim PMBL

Keimzentren sind der Ort, an dem die Selektion und Affinitätsreifung der B-Zellen mit Hilfe von T-Helferzellen und antigenpräsentierenden Zellen stattfinden. Zur Klärung, in welchem Differenzierungsstadium und insbesondere, in welcher Beziehung zum Keimzentrum sich die Vorläuferzelle eines B-Zell-Lymphoms befindet, wird die Expression aussagefähiger Oberflächenantige herangezogen. CD10 ist ein wichtiger Marker, da er selektiv von Keimzentrums-B-Zellen exprimiert wird. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß PMBL in der Regel einen Verlust des CD10 Keimzentrumsmarkers aufweisen (**7**, **57**, **87**). Diese Tatsache spräche gegen die Annahme, daß sich PMBL von Keimzentrums-B-Zellen ableiten, die aufgrund maligner Transformation bereits im Keimzentrum die Fähigkeit zur somatischen Mutation verloren hatten und daher keine fortgesetzten Mutationen mehr anhäufen konnten.

Möglicherweise wurden die PMBL-Zellen im Zuge ihrer malignen Transformation nur vorübergehend im Keimzentrum arretiert, wo sie genügend Zeit zur Anhäufung ausgeprägter somatischer Hypermutationen hatten. Dabei könnten erste Transformationsvorgänge zur Aktivierung somatischer Mutationsprozesse in der Vorläuferzelle geführt haben, während die Zelle im Keimzentrum proliferiert. Die noch inkomplette Transformation hätte eine Retention der B-Zelle im Keimzentrum bewirken können. Auf diese Weise hätte die teiltransformierte

B-Zelle Gelegenheit bekommen, vermehrt somatische Mutationen anzuhäufen (**65**). Möglich wäre auch eine Hyperaktivierung der Mutationsvorgänge durch die Transformationsvorgänge. Es wäre denkbar, daß sich diese teiltransformierte Zelle noch aus dem Keimzentrum entfernen könnte (**123**). Anschließend würden die Mutationsvorgänge abgeschaltet werden und die B-Zelle außerhalb des Keimzentrums mit der Differenzierung fortfahren. Finale Transformationsereignisse würden schließlich die Differenzierung beenden und die neoplastische Transformation vervollständigen.
Zwei Untersuchungen des BCL6-Onkogens stellte eine vermehrte Mutation dieses Gens in PMBL fest (**80**, **102**). Das würde die Annahme eines Keimzentrumseinflusses in der Entstehung des PMBL stützen, da das BCL6-Onkogen während der B-Zellreifung im Keimzentrum exprimiert wird und so dem AID-vermittelten Mutationsprozeß ausgesetzt ist (**80**, **93**, **102**).

## 5.6 Selektion eines funktionalen Antikörpers im PMBL

Die Analyse der Sequenzierungsdaten ergaben in 10 von 12 Fällen (83 %) eine Selektion für einen funktionalen Antikörper, d.h. der Selektionsdruck hatte solche Mutationen der umgelagerten Schwerkettengene bevorzugt, die die Antikörperstruktur erhielten.
Dies äußerte sich dergestalt, daß das beobachtete Verhältnis von Austauschmutationen zu stummen Mutationen (R/S) in den FR mit durchschnittlich 1,4 niedriger war als das statistisch zu erwartende Verhältnis. Dieses Verhältnis ist mit demjenigen normaler B-Gedächtniszellen und Plasmazellen vergleichbar, bei denen davon ausgegangen werden kann, daß sie bereits eine Affinitätsselektion durchlaufen haben (**60**). Diese Resultate erhärten die Annahme, daß im Laufe der Tumorentwicklung antikörpervermittelter Selektionsdruck die Gesamtstruktur des Immunglobulins in PMBL aufrecht erhält, um einer negativen Selektion zu entgehen. Wären die Austauschmutationen zufällig, ohne zugrundliegenden Selektionsmechanismus aufgetreten, hätten Änderungen der Aminosäuresequenz in den FR den Strukturerhalt des Antikörpers zu sehr gefährdet. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß der Selektionsprozeß in den FR stumme Mutationen begünstigt und Austauschmutationen benachteiligt. Andere Untersuchungen demonstrierten ebenfalls eine selektive Erhaltung der Antikörperstruktur in DLBCL (**26**, **31**, **65**, **77**, **96**).
Von zwei Autoren wird außerdem eine Anhäufung an R-Mutationen in den CDR (**9**, **11**) als Argument für die Selektion eines funktionalen Antikörperproteins angeführt.

Mutationsmuster innerhalb der hypervariablen CDR sind jedoch schwierig zu interpretieren (**60**). Manche Austauschmutationen haben je nach betroffenen Aminosäuren in den CDR eventuell wenig Auswirkung auf die Antikörperaffinität. Andere wiederum, die in bereits für die Selektion günstig mutierten IgVH-Genen die Bindungsaffinität drastisch verschlechtern, könnten zur negativen Selektion der mutierten Sequenz führen. Aus diesem Grund konzentrierte sich in der vorliegenden Arbeit die Sequenzanalyse auf die FR, während die CDR nicht berücksichtigt wurde.

Welche Antigene möglicherweise Einfluß auf die Prozesse der klonalen Selektion in DLBCL haben, ist unbekannt (**77**). Derartige Untersuchungen erfordern in der Regel die Expression des Immunglobulins in einem geeigneten System und eine genauere Kenntnis der in Frage kommenden Antigene. Es ist noch nicht geklärt, aus welchem Grund die vollständig transformierte PMBL-Zelle keine Immunglobulinexpression zeigen, obwohl das Antikörpermolekül für das Überleben normaler B-Zellen eine essentielle Bedeutung hat. Eine naheliegende Begründung wäre, daß Mechanismen wie eine Störung physiologischer Signaltransduktionswege (**85**) oder eine Überexpression von BCL2 die Lymphomzelle am Leben halten könnten (**63**). Ebenfalls ist auffällig, daß durch die fehlende Immunglobulinexpression den PMBL genau die Struktur fehlt, über die der Selektionsdruck vermittelt wird. Wie bereits ausgeführt, hat eine Selektion des Antikörperproteins in der Mehrzahl der PMBL mit hoher Wahrscheinlichkeit stattgefunden. Dieses scheinbare Paradoxon ließe sich dadurch erklären, daß der Verlust der Ig-Expression erst in einem späten Stadium der Lymphomentstehung eingetreten ist, in dem der Selektionsprozeß bereits abgeschlossen wurde und die Tumorzelle durch zunehmende Transformationsereignisse von B-Zell-Rezeptor-vermittelten Überlebenssignalen unnabhängig geworden ist (**68**).

In 17 % (3 von 12 analysierbaren Fälle) der potentiell funktional umgelagerten VH-Genen war der R/S Quotient nicht signifikant kleiner, als aufgrund zufällig erfolgter, nicht selektionierter Mutationen zu erwarten wäre, so daß in diesen Fällen eine antigenunabhängige Tumorentwicklung vermutet werden kann. Der Mechanismus der antigenunabhängigen somatischen Mutationen der VH-Gene wurde ebenfalls bei naiven B-Zellen in den Peyer´schen Plaques (GALT = gut associated lymphoid tissue) von Schafen beschrieben (**108**).

Andererseits könnten auch Mutationen an Nicht-Immunglobulin-Genen den Einfluß von Antigenen regulieren oder vermindern. Mutationen der Gene, die für die zytoplasmatischen Proteine B29 (Igß, CD 79b) und mb1 (Iga, CD 79a) des B-Zell-Rezeptors kodieren, werden als sog. Nicht-Ig-Gene zu 30 – 40 % in normalen peripheren B-Zellen und zu 80 – 100 % in

verschiedenen B-Zell-Lymphomen somatisch hypermutiert, die dem Keimzentrum oder dem Post-Keimzentrum entstammen (u.a. DLBCL). Insbesondere B29 könnte dazu beitragen, daß bestimmte B-Zell-Rezeptorsignale begrenzt werden, die zur Apoptose der B-Zelle führen würden und so ein Überlebensvorteil entsteht. Insbesondere B-Zell-Lymphome könnten sich diesen Mechanismus zunutze machen. CD79a und CD79b gehören zu den bisher einzig bekannten Nicht-Ig-Genen, die einer somatischen Hypermutation unterliegen und weder ein Protoonkogen noch ein Tumorsuppressorgen darstellen. Vermutlich sind sie indirekt durch o.g. Mechanismen an der Tumorentstehung beteiligt (**39**).

Eine weiteres malignes Lymphom, das keine Immunglobulinexpression zeigt, ist der klassische Morbus Hodgkin. Es gilt heute als erwiesen, daß es sich beim klassischen Morbus Hodkgin in der überwiegenden Mehrzahl um eine B-Zell-Neoplasie handelt. (**49**, **50**, **66**). Die Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen, welche die neoplastische Zellpopulation beim klassischen Morbus Hodgkin bilden, weisen in einigen Lymphomen sogenannte verstümmelnde Mutationen in ihrem VH-Genlokus auf (**49**, **57**, **58**). Diese führen zu Stop-Codons oder zu schweren Alterationen in regulatorischen Genabschnitten und verhindern auf diese Weise eine Expression des B-Zell-Rezeptors. Verstümmelnde Mutationen scheinen jedoch bei PMBL keine Rolle zu spielen, da in unserer Untersuchungsreihe 12 von 13 IgVH Gene potentiell funktional umgelagert wurden. Wir können allerdings nicht ausschließen, daß verkrüppelnde Mutationen in nicht-translatierten Genregionen oder im Leichtkettengen vorhanden sind. Beim stark mutierten Fall 3 mit zwei Deletionenen wurde das Leseraster verschoben, so daß keine Kodierung für ein funktionales Immunglobulin möglich gewesen wäre. Wahrscheinlich erfolgten diese Sequenzveränderungen im Zuge der somatischen Hypermutation (**38**), da diese nicht nur Punktmutationen, sondern in seltenen Fällen auch Deletionen und Insertionen hervorrufen kann (**64**). Ein fehlerhafter Transkriptionsapparat wird als alternative Ursache für die ausbleibende Immunglobulinexpression beim klassischen Morbus Hodgkin diskutiert (**55**, **81**, **120**). Derartige Veränderungen konnten beim PMBL allerdings bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden (**109**). Möglicherweise supprimieren extrinsische Signale die Ig-Expression bei PMBL (**73**, **105**). Deratige Signale könnten Zytokine oder ähnliche Mediatoren sein, die von den tumorinfiltrierenden, reaktiven T-Zellen gebildet werden.

## 5.7 Die VH-Genfamilienverteilung im PMBL entspricht derjenigen normaler peripherer B-Zellen

Verschiedene Untersuchungen über die Verwendung bestimmter VH-Familien in DLBCL zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Es fanden sich vermehrt VH4-Umlagerungen, v.a. des VH4-34-Gens beim DLBCL (**36**, **47**), aber auch anderen Lymphomentitäten (**124**). Allerdings wird in einer Arbeit nicht differenziert, welche Lymphomgewebsproben tatsächlich DLBCL repräsentierten (**124**) und in einer anderen zwar DLBCL untersucht, aber keine Differenzierung bezüglich des klinischen Status (unbehandelt – behandelt - Rezidiv) durchgeführt (**36**). Eine Arbeit zeigte eindeutig eine VH4-34 Präferenz bei DLBCL Rezidiven (**47**). Die chemotherapeutische Vorbehandlung könnte allerdings zu einer Einengung des Spektrums der VH-Familien geführt haben. Eine andere Untersuchung konnte an 71 unbehandelten DLBCL-Fällen, keine Bevorzugung der VH4-Familien nachweisen (**77**). Dieses Ergebnis wurde in weiteren Studien bestätigt (**24**, **110**, **124**). Eine Überexpression des VH4-34-Gens zeigte sich nicht nur in B-Zell-Lymphomen, sondern auch im normalen humanen B-Zellenrepertoire (**62**).
Wir fanden unter den 12 potentiell funktionalen Umlagerungen lediglich zwei Fälle aus der VH4-Gen-Familie (16,7%). VH1 wurde ebenfalls zweimal (16,7%) und VH2 und VH5 je einmal gefunden (8,3%). Die Auswahl der IgVH-Gene bei PMBL reflektiert somit die normaler peripherer B-Zellen und B-Zellen aus Lymphknoten (**14**, **22**, **41**, **42**, **75**).

## 5.8 Kein Hinweis auf eine pathogenetische Rolle von Auto- und Superantigenen im PMBL

Die Aktivierung somatischer Mutationen in malignen Lymphomzellen (**27**) und naiven B-Zellen der Tonsille (**106**) ist in vitro an die Vernetzung von Oberflächen-Immunglobulinen und die Anwesenheit von T-Zell-Signalen geknüpft. Eine Vernetzung des B-Zell-Rezeptors kann zum einen durch spezifisches Antigen erreicht werden, das in typischer Weise von den CDR-kodierten Bindungsstellen des Immunglobulins gebunden wird. Alternativ können bestimmte Makromoleküle, insbesondere mikrobielle Antigene (z.B. Staphylokokken Protein A, HIV gp 120 und Staphylokokken-Enterotoxine) den B-Zell-Rezeptor über die FR1 binden und auf diese Weise eine VH-familienspezifische B-Zellenantwort induzieren. Diese als Superantigene bezeichneten Moleküle könnten so negativen Selektionsdruck auf die FR ausüben, ohne positiven Selektionsdruck auf die CDR auszuüben (**77**). Superantigene weisen

deshalb eine Spezifität für bestimmte VH-Elemente auf. Dies gilt in ähnlicher Weise für einige Autoantigene Beim Menschen ist besonders die VH4-Familie die Zielstruktur von Super- und Autoantigenen. Das i/I Antigen roter Blutkörperchen induziert als Autoantigen VH-genspezifisch eine Immunantwort (**30**). Diese Kälteagglutinine benützen universell die VH4-34- und VH4-21-Gensegmente, wobei FR1 und die CDR3 die Bindung vermitteln (**72**). MALT Lymphome des Magens sind ein Beispiel dafür, daß bakterielle Superantigene des Helicobacter pylori antigenrezeptorvermittelt das Tumorzellwachstum unterstützen. Die Eradikation des Helicobacters führt manchmal sogar zum Verschwinden dieses Tumors (**134**).

## 5.9 Die Rolle der B1- und B2-Zelle

B-Zellen lassen sich anhand unterschiedlicher Kriterien in B1- und B2-Zellen einteilen. Diese Einteilung ist vor allem im Maussystem etabliert, kann aber auch mit gewissen Einschränkungen auf das humane System übertragen werden. In der Maus sind B1-Zellen durch die Expression von CD5 charakterisiert. Beim Menschen ist dieses Oberflächenmolekül nur bedingt zur Unterscheidung zwischen B1- und B2- Zellen geeignet. Während B1-Zellen T-Zell-unabhängig meist polymeres Antigen erkennen, IgM exprimieren und nur selten einen Ig-Klassenwechsel durchmachen, werden B2-Zellen T-Zell-abhängig von Peptidantigenen aktiviert und besitzen oftmals einen gewechselten Ig-Isotyp. Im Gegensatz zu B2-Zellen durchlaufen B1-Zellen in der Regel keine Keimzentrumsreaktion und weisen daher auch keine nennenswerten somatischen Hypermutationen des Immunglobulingens auf. B1-Zellen erscheinen ontogenetisch zuerst und werden bereits im fetalen Knochenmark gebildet. Im Laufe der Zeit nimmt die relative Anzahl der B2- Zellen zu, während die der B1- Zellen abnimmt. B1-Zellen sind die Hauptvertreter der Lymphozyten in den Körperhöhlen (Peritoneum und Pleura) (**44**). B1-Zellen bilden als erste Gegenwehr bei Infektionen einen „natürlichen Antikörper“ bevor eine Immunisierung stattfand und sezernieren IgM niedriger Affinität, das der Keimbahn sehr ähnlich ist (**22**, **35**, **101**, **112, 119**). Durch ihren polyreaktiven Charakter ermöglichen die B1-Zellen die Antikörperbildung gegen eine große Vielfalt an Antigenen. B-1 Zellen wurden auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und malignen Lymphomen, insbesondere der CLL, gebracht (**15**, **91**, **112**). Es ist noch unklar, ob sich aus einer gemeinsamen Progenitorzelle B1-Zellen oder B2-Zellen abhängig von B-Zell-Rezeptorsignalen entwickeln, oder ob es sich um bereits bei der B-Zellentwicklung im Knochenmark determinierte Linien handelt (**112**). Im murinen

System, in dem die B1-Subpopulation durch CD5-Expression charakterisiert ist, wurde eine CD5- Expression in thymischen B-Zellen beschrieben (**32**, **52**, **126**). Da sich das PMBL mutmaßlich von thymischen B-Zellen ableitet, wäre es von Interesse, PMBL in Hinblick auf eine Zugehörigkeit zur B1-B-Zellpopulation zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine ausgeprägte somatische Hypermutation des PMBL nachgewiesen werden. Dies steht jedoch im Gegensatz zu der fehlenden oder geringen somatischen Hypermutation in B1-Zellen. Insgesamt weist die ausgeprägte somatische Hypermutation des PMBL darauf hin, daß die Vorläuferzelle dieses Lymphoms eher einer B2-Zelle als einer B1-Zelle entspricht. CD5+ thymische B Zellen, wie sie in der Maus beschrieben wurden, kommen daher für eine mögliche Vorläuferzelle der PMBL eher nicht in Frage.

## 5.10 Die Thymusmedulla als möglicher Entstehungsort des PMBL

Stammzellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein. T-Zellen durchlaufen dort den Prozeß der Reifung und Selektion. Diese Prozesse finden in engem Kontakt mit epithelialen Zellen des Thymus statt. Daß B-Zellen dabei eine Rolle spielen, war lange Zeit nicht bekannt. B-Zellen im Thymus wurden zuerst in der Medulla beschrieben und machen dort ein Drittel der Lymphozyten aus (**118**, **121**). Sie binden rosettenförmig an Thymozyten und sind vermutlich an der negativen Selektion autoreaktiver T-Zellen beteiligt (**45**). Es wird angenommen, daß thymische B-Zellen an der zentralen Toleranz von T-Zellen gegenüber B-Zell-spezifischen Proteinen beteiligt sind.
Hypothetisch betrachtet, könnten PMBL einer bestimmten Subpopulation von B-Zellen der Thymusmedulla entstammen, geht man vom Thymus als möglichen Ursprungsort der PMBL aus. Die Hypothese stützt sich auf der klinischen Beobachtung, daß diese Lymphome im vorderen Mediastinum lokalisiert und von Thymusresten umgeben sind (**2**).
Die mögliche Vorläuferzelle des PMBL könnte sich in der Thymusmedulla (**2**, **45**) aber auch im perivaskulären Raum befinden (PVR) (**34**). Der Thymus besteht aus einem epithelialen Raum und einem perivaskulären Raum. Zum epithelialen Raum gehören die Medulla und der Kortex. Durch eine Basalmembran getrennt, umgibt der perivaskuläre Raum Blutgefäße im Thymus (**34**, **45**, **121)**. Die T-Lymphopoiese spielt sich vor allem im epithelialen Raum ab. Der PVR hingegen scheint eher ein Teil des peripheren Immunsystems zu sein (**34**). B-Zellen im PVR könnten dabei der Medulla oder der Peripherie entstammen. Allerdings wurde in bisherigen Untersuchungen die Trennung dieser beiden Kompartimente nicht berücksichtigt,

so daß der Ursprungort der B-Zellen bzw. der malignen B-Zell-Lymphome dahingehend nicht weiter spezifiziert wurde. Bei Patienten, die an Myasthenia gravis erkrankt sind, findet sich eine erhöhte Anzahl an B-Zellen im PVR des Thymus. Diese Population steigt mit zunehmendem Lebensalter auch im Thymus gesunder Erwachsener an (**34**). Diese Tatsache läßt vermuten, daß B-Zellen im PVR zur erhöhten Inzidenz von Thymus-B- Zell-Lymphomen im mittleren bis höheren Erwachsenenalter beitragen. Sequenzanalysen der IgVH-Regionen ergaben somatische Mutationen in B-Zellen des PVR und der Medulla. Diese Zellen sind demnach nicht mehr naiv. Das Auffinden klonal verwandter IgH-Sequenzen in medullären B-Zellen und Keimzentrumszellen des PVR und peripherer lymphatischer Organen zeigt, daß es einen Austausch zwischen beiden Kompartimenten gibt und daß die B-Zellendifferenzierung auch im Thymus fortgesetzt wird (**4**, **34**). Es finden sich auch B-Zellen im Thymus, die noch keine somatische Hypermutation durchlaufen haben. Im murinen Sytem dürften diese unmutierten B-Zellen der CD5+ B1 Zellpopulation entsprechen.

Der Thymus besitzt im Gegensatz zum PVR im epithelialen Raum (Kortex, Medulla) keine Keimzentren. Manche B-Zellen reifen möglicherweise anfänglich direkt im epithelialen Kompartiment des Thymus und wandern von dort in den PVR, um dort Kontakt zum Keimzentrum aufzunehmen, und dann wieder in die Medulla zurückzuwandern. Eine alternative Möglichkeit ist, daß B-Zellen des Thymus von peripheren B-Zellen abstammen, die in den PVR und noch weiter in die Medulla gewandert sind (**34**). Obwohl auch das Auftreten somatischer Mutationen außerhalb von Keimzentren beschrieben worden ist (**83**), legt die räumliche Nähe zwischen PVR und Medulla eher den Schluß nahe, daß ein B-Zellenaustausch zwischen beiden Kompartimenten stattfindet, so daß somatische Mutationen in den Keimzentren der PVR entstehen könnten (**34**).

B-Zellen des PVR enthalten VH-Regionen mit einer leicht gesteigerten somatischen Mutationsrate und zeigten ein signifikantes Ausmaß an intraklonaler Heterogenität (**34**). Demgegenüber weisen die meisten Genumlagerungen medullärer thymischer B-Zellen eine Keimbahnkonfiguration des VH-Gens auf, während weniger als 20% eine mäßige Mutationsrate zeigen (**32**).

B-Zellen des Thymus stellen somit bezüglich ihrer VDJ-Umlagerungen und Mutationsrate eine heterogene Gruppe dar.

Thymische B-Zellen des Menschen wurden zunächst global als CD19+ CD20+ CD21- CD 22+ IgM+ phänotypisiert (**33**, **46, 53**). Eine weiterführende immunhistochemische Untersuchung differenzierte die Expressionsmuster der Thymus-B-Zellen nach deren Lokalisation in Medulla oder PVR. Perivaskuläre B-Zellen und medulläre B-Zellen

exprimieren CD 20+ CD22+ CD35+. Perivaskuläre B-Zellen sind zudem CD 21+ CD 37+ CD72+ (**34**). Der große Teil medullärer B-Zellen, zeigt dagegen keine Expression dieser Oberflächenmarker. In der unmittelbar an den PVR angrenzenden Medulla findet sich jedoch eine kleine Population von CD 21+ CD 37+ CD 72+ B-Zellen, was die Vermutung nahelegt, daß diese Population aus dem PVR eingewandert sein könnte, also ein Austausch zwischen beiden Kompartimenten stattfindet.
Das Expressionsmuster des PMBL CD10- CD19+ CD20+ CD21- CD22+.CD23+ CD25- CD37+ CD38- CD39+ CD40+ CD54+ CD79a+ CD95+ Ig- (**7**, **16**, **56**, **69, 87, 101**) entspricht am ehesten demjenigen PVR-ferner, medullärer B-Zellen des Thymus. Abweichungen im Phänotyp des Lymphoms gegenüber dieser Population thymischer B-Zellen können im Rahmen der neoplastischen Transformation entstanden sein, oder auch einer bisher noch nicht beschriebenen B-Zell-Population entsprechen. (**53**, **88**).

Die Befunde meiner Arbeit, nach denen im PMBL fast ausschließlich funktionale Genumlagerungen vorliegen, hohe somatische Mutationsraten auftreten und fortgesetzte Mutationen fehlen sind mit einer Abstammung des PMBL medullärer thymischer B-Zellen vereinbar (**23**). Die Beobachtung, daß die somatische Mutationsrate in perivaskulären B-Zellen des Thymus etwas höher ist als in der der Medulla (**34**) widerlegt meines Erachtens diese Einschätzung nicht, da das PMBL aus einer B-Zell-Subpopulation der Thymusmedulla stammen könnte, die ihre somatischen Hypermutationen im vorübergehenden Keimzentrumskontakt im PVR erworben hat.
Im PVR könnte die B-Zelle zunächst durch frühe Transformationsvorgänge im Keimzentrum festgehalten werden und somatische Mutationen anhäufen, um schließlich das Keimzentrum zu verlassen und in die Medulla zurückzuwandern, wo die maligne Transformation komplettiert und die Mutationsmaschinerie abgeschaltet würde. Der nur vorübergehende Kontakt im Keimzentrum des PVR könnte die im PMBL fehlende Expression der Keimzentrumsantigene CD10 und CD21 erklären.

## 5.11 Das PMBL als eigenständige Subentität der DLBCL

In kürzlich publizierten Expressionsanalysen auf Microarray-Basis ließ sich eine klare Abgrenzung des PMBL von anderen, genetisch definierten Subentitäten des DLBCL erreichen (**111**). In der vorliegenden Arbeit konnte das Fehlen fortgesetzter Mutationen und die hohe Rate an somatischen Hypermutationen, als wesentliche Eigenschaften des PMBL identifiziert werden. Bemerkenswert ist dabei, daß ausnamslos alle der hier untersuchten Genumlagerungen des PMBL diese Charakteristika aufweisen, was eine ausgeprägte Homogenität dieses Lymphomtyps belegt.

# 6 Zusammenfassung

Die Sequenzanalyse der Immunglobulin-Schwerkettengene in malignen Lymphomen ermöglicht die Bestimmung der Differenzierungsstufe der entsprechenden Tumorvorläuferzelle. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels immungenetischer Untersuchungen die präneoplastische Vorläuferzelle des primären mediastinalen B-Zell-Lymphoms (PMBL) zu identifizieren und die Beziehung dieses Lymphomtyps zu anderen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) zu definieren. Es wurden 13 PMBL-Fälle einschließlich der aus Lymphomgewebe generierten Zellinie MedB-1 hinsichtlich Monoklonalität, somatischer Hypermutationen und intraklonaler Heterogenität untersucht.
In 13 von 20 Fällen (65%) ließ sich die Monoklonalität nachweisen. Mit einer Ausnahme waren alle Genumlagerungen potentiell funktional. Die Rate an somatischen Hypermutationen war hoch und betrug im Mittelwert 13,0%. In zehn der potentiell funktionalen Genumlagerungen ergab sich in den Frame Work Regionen (FR) eine weitaus geringere Rate an Austauschmutationen, als aufgrund einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre. Dieses deutet auf eine stattgehabte Affinitätsselektion hin, durch die der Erhalt der Gesamtstruktur des B-Zell-Rezeptors gewährleistet wurde. In keinem der 13 untersuchten Lymphome fand sich eine fortgesetzte Mutation. Nur in der Med-B1 Zellinie ließ sich eine minimale intraklonale Heterogenität nachweisen.
Die Rate an somatischen Hypermutationen des PMBL erwies sich als geringfügig höher als bei anderen DLBCL-Entitäten. Die hohe Rate somatischer Mutationen bei fehlender intraklonaler Heterogenität sprechen dafür, daß sich das PMBL von einer Post-Keimzentrums-B-Zelle ableitet, die durch inkomplette Transformation im Keimzentrum zurückgehalten wurde und dort somatische Mutationen akkumuliert hat. Eine Komplettierung der malignen Transformation dürfte außerhalb des Keimzentrums nach Ausschalten der Hypermutationsmaschinerie eingetreten sein. Es gibt keinen Anhalt dafür, daß Autoantigene oder Superantigene in der Lymphomgenese der PMBL eine Rolle spielen, da die Auswahl der umgelagerten VH-Familien mit derjenigen normaler peripherer B-Zellen übereinstimmt PMBL zeigen vergleichbare Eigenschaften wie ihre mutmaßliche B-Vorläuferzelle der Thymusmedulla. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, sind vereinbar mit einer Herkunft des PMBL aus der Medulla des Thymus. Die konsistenten immungenetischen Eigenschaften des PMBL untermauern dessen distinkten Charakter und rechtfertigen eine Einordnung als eigenständige Lymphomentität.

# 7 Anhang

Die Numerierung der Codons erfolgt in der VH-Region gemäß Chothia et al (**21**).

## 7.1 Sequenzen der einzelnen Fälle

### 7.1.1 Fall 1

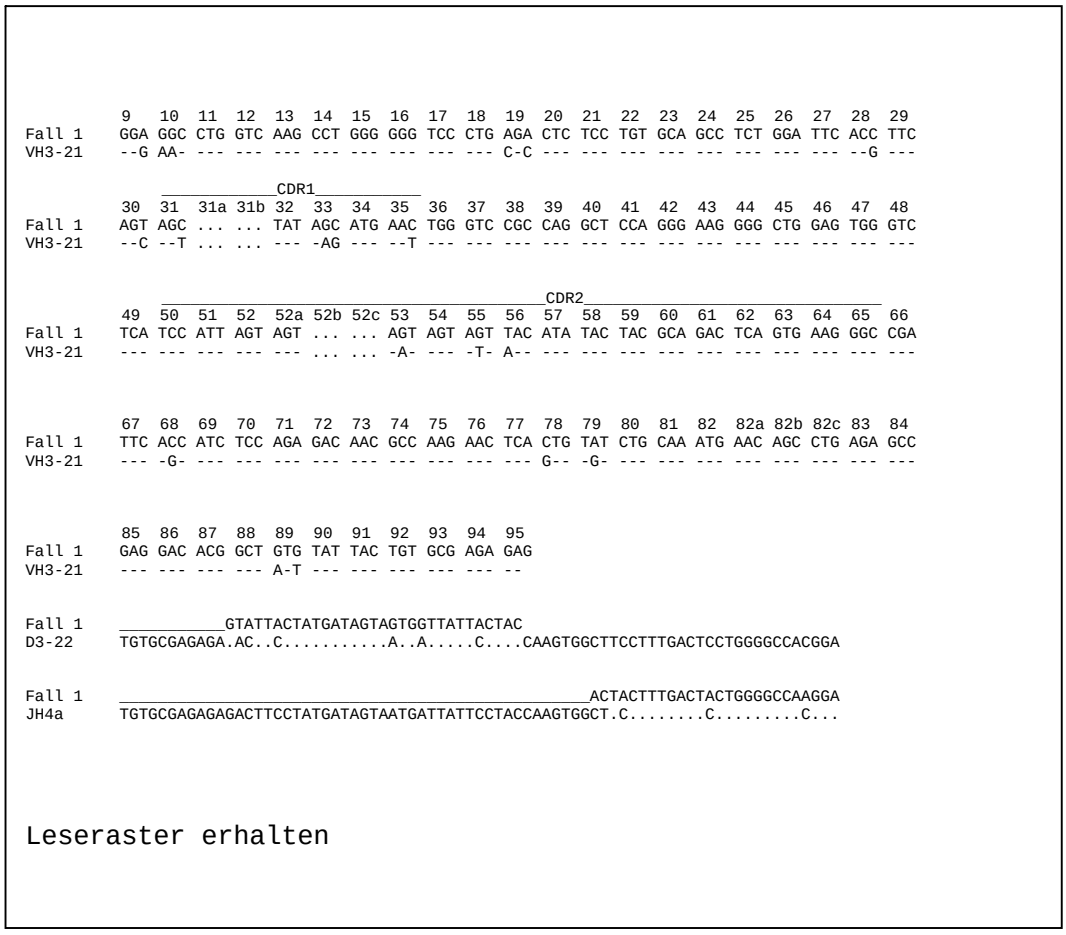



**Abbildung 13: Sequenzanalyse des Falles 1**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 1 zeigte die größte Homologie mit der VH3-21 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 12 Punktmutationen auf.

### 7.1.2 Fall 2

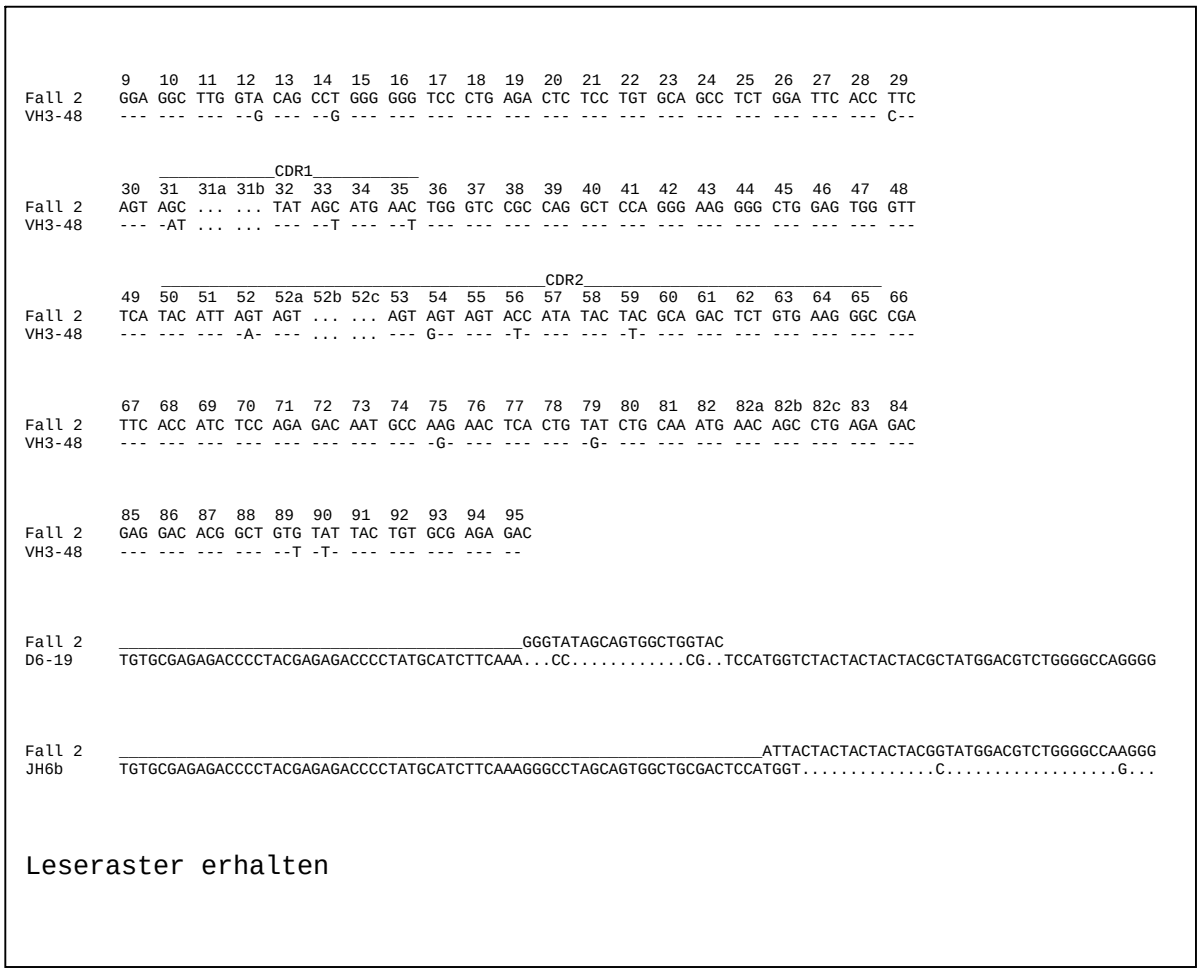



**Abbildung 14: Sequenzanalyse des Falles 2**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 2 zeigte die größte Homologie mit der VH3-48 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 7 Punktmutationen auf.

### 7.1.3 Fall 3

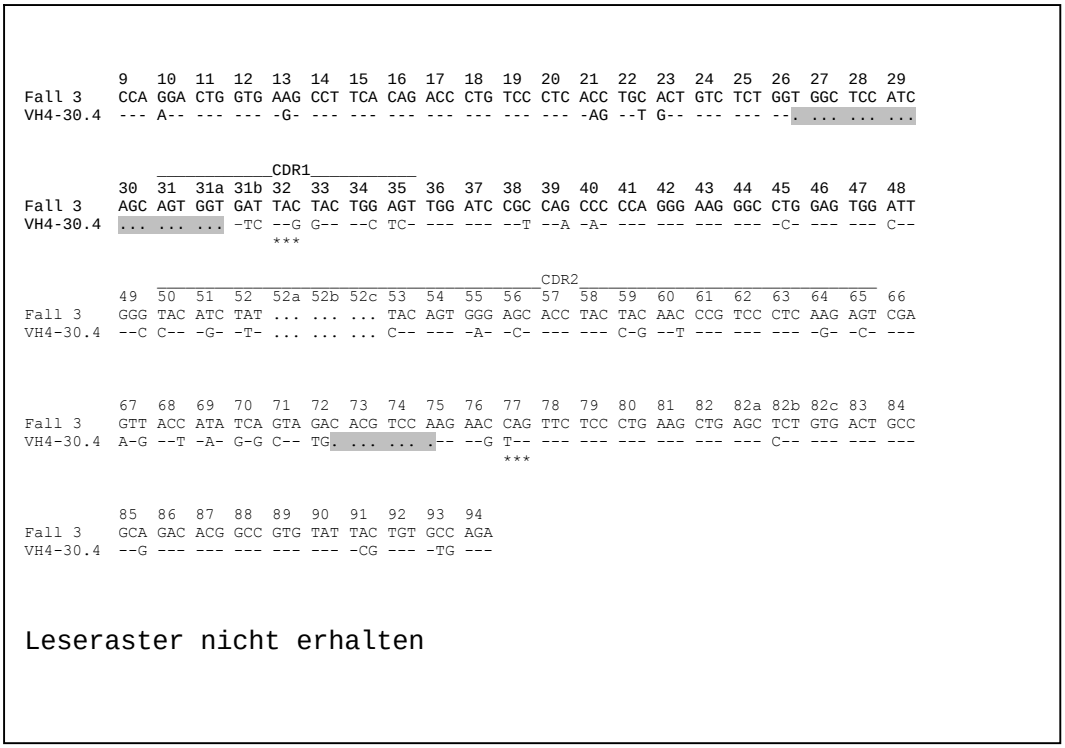



**Abbildung 15: Sequenzanalyse des Falles 3**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt. Deletionen sind grau unterlegt und mit Punkten gekennzeichnet und Stop Codons mit Sternchen markiert.

Der Fall 3 zeigte die größte Homologie mit der VH4-30.4 Keimbahnsequenz. Es traten zwei Deletionen und zwei Stop Codons in diesem Fall auf. Eine Deletion zeigte sich am Übergang der FR 1 zur CDR1, betraf Codon 26 – 31a und umfaßte 19 Basenpaare. Die zweite Deletion zeigte sich in der FR3, betraf Codon 72 – 75 und umfaßte acht Basenpaare. Dies ist der einzige Fall in dieser Arbeit, bei dem die VDJ-Umlagerung außerhalb des Leserasters lag.

### 7.1.4 Fall 4

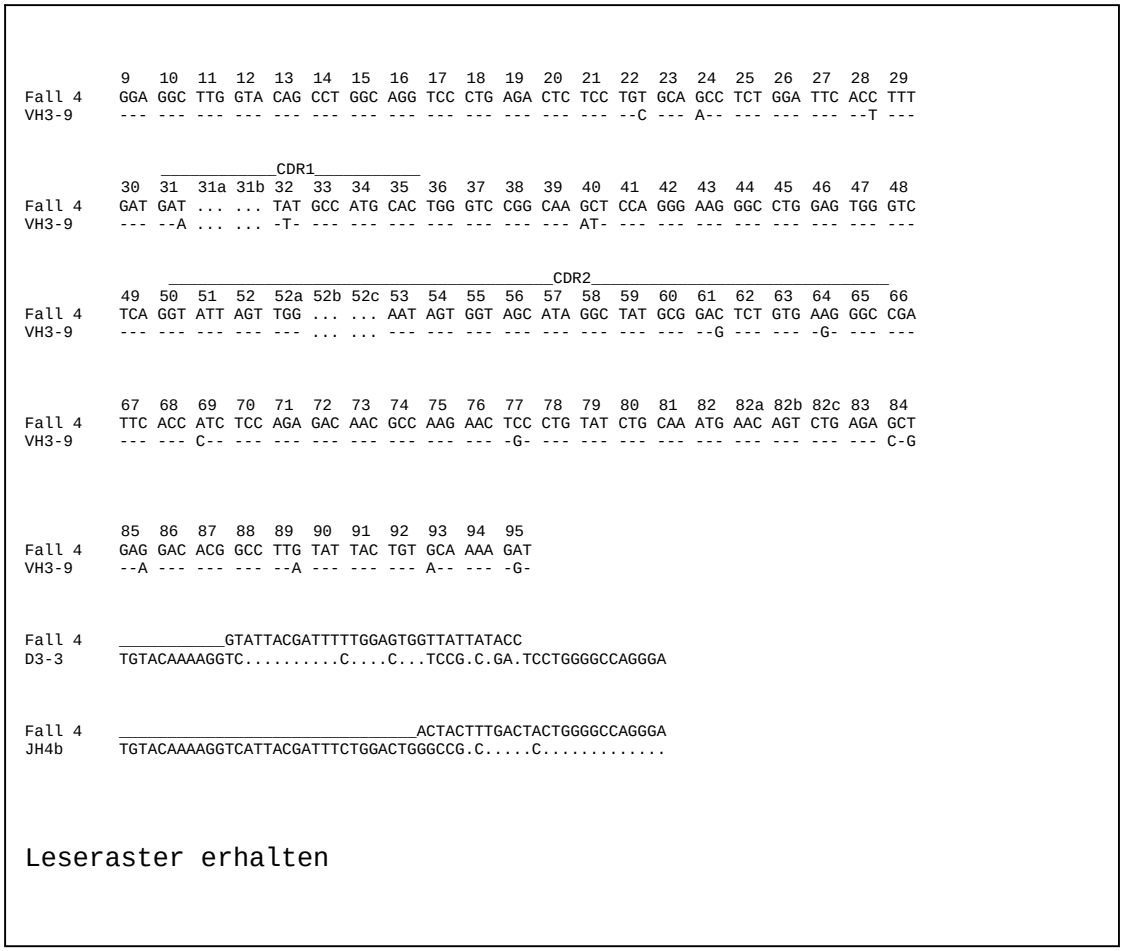



**Abbildung 16: Sequenzanalyse des Falles 4**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 4 zeigte die größte Homologie mit der VH3-9 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 13 Punktmutationen auf.

### 7.1.5 Fall 5

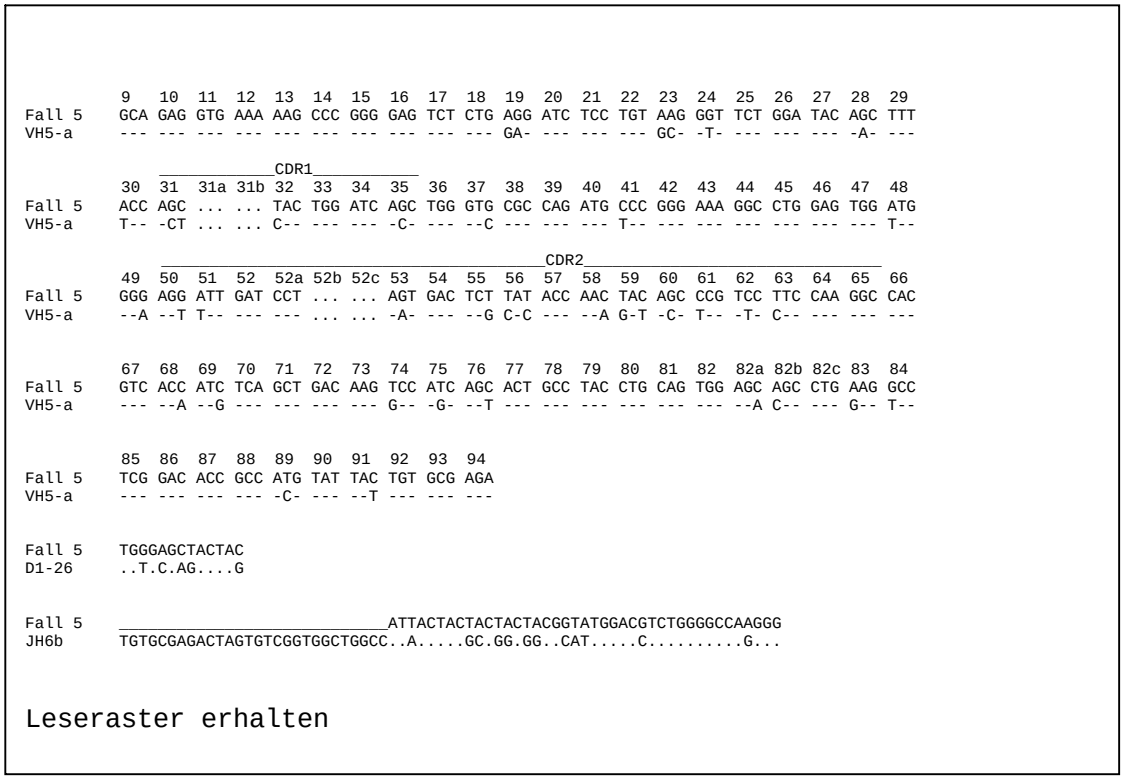



**Abbildung 17: Sequenzanalyse des Falles 5**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 5 zeigte die größte Homologie mit der VH5-a Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 22 Punktmutationen auf.

### 7.1.6 Fall 6

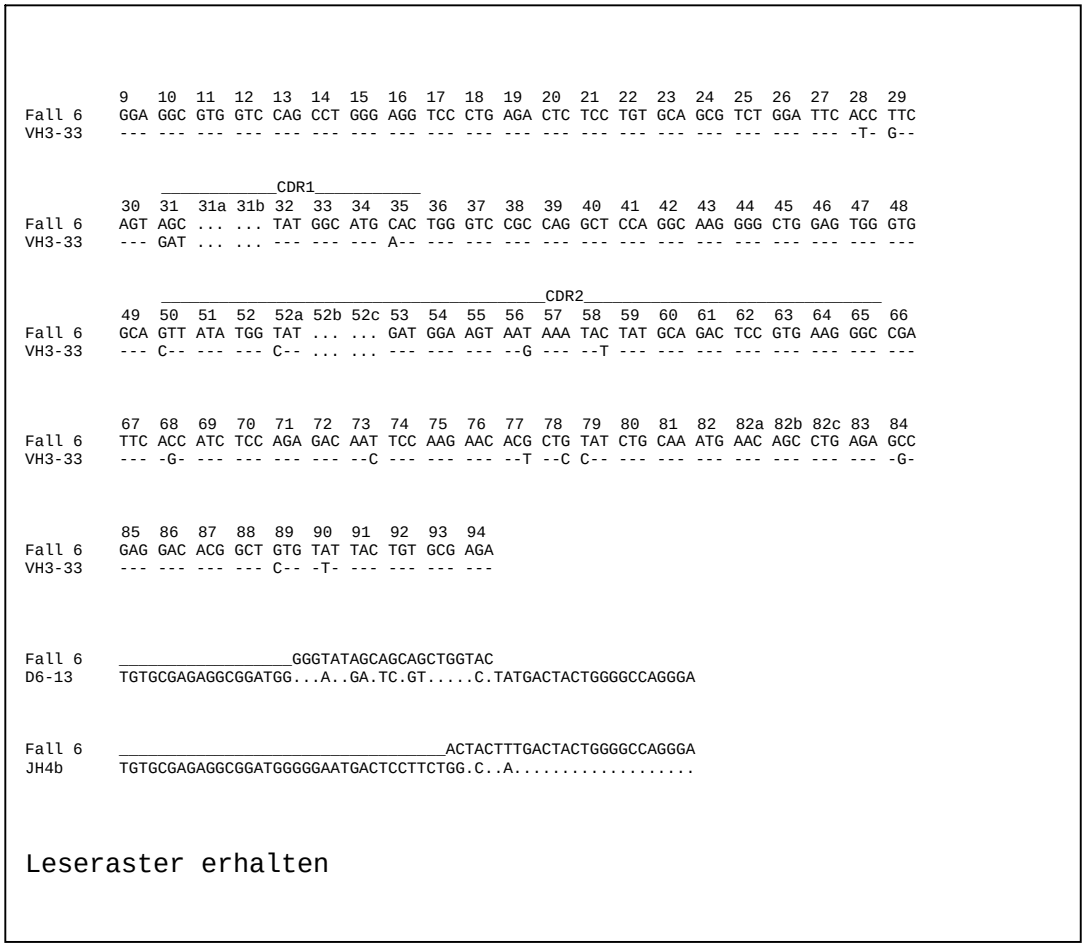



**Abbildung 18: Sequenzanalyse des Falles 6**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 6 zeigte die größte Homologie mit der VH3-33 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 94 wiesen insgesamt 10 Punktmutationen auf.

### 7.1.7 Fall 7

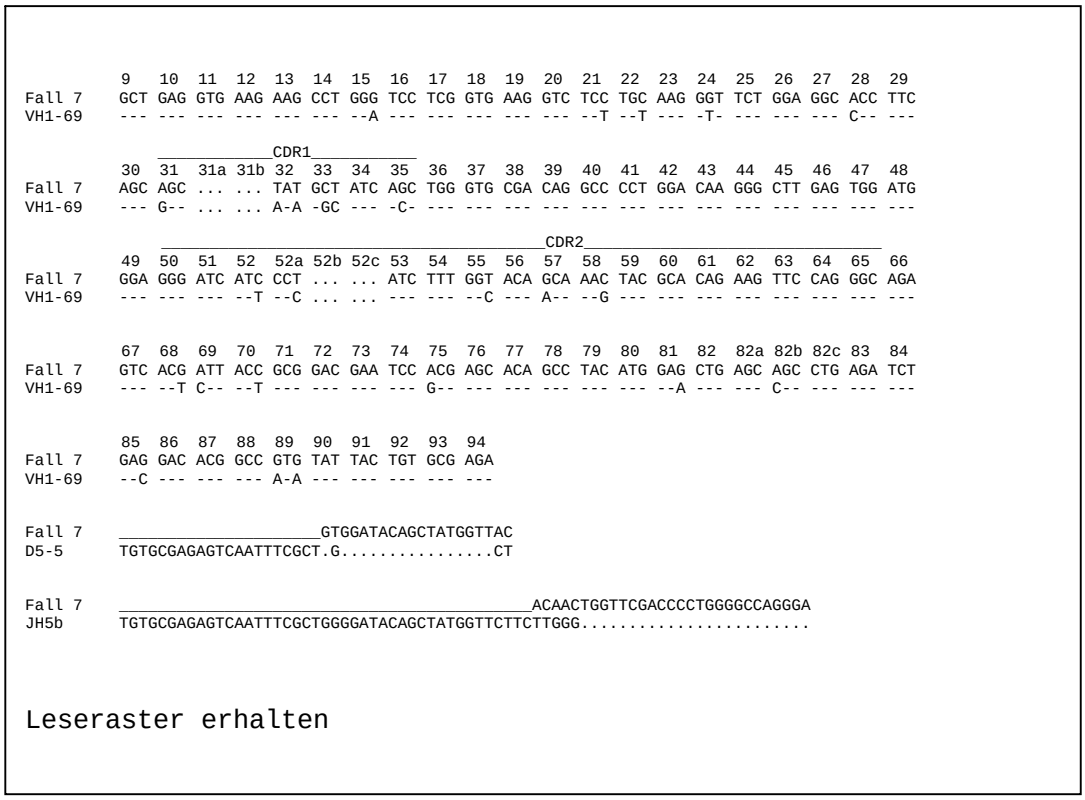



**Abbildung 19: Sequenzanalyse des Falles 7**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 7 zeigte die größte Homologie mit der VH1-69 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 94 wiesen insgesamt 14 Punktmutationen auf.

### 7.1.8 Fall 8a

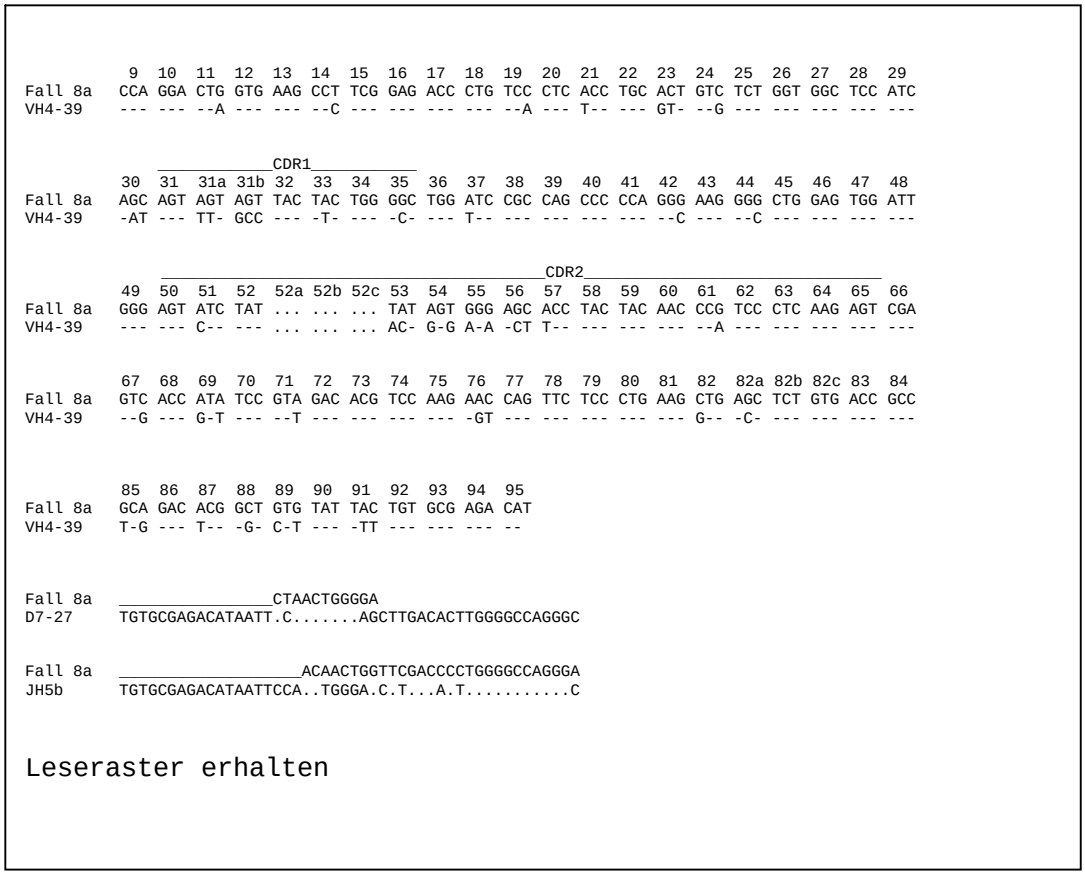



**Abbildung 20: Sequenzanalyse des Falles 8a**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 8a zeigte die größte Homologie mit der VH3-48 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 28 Punktmutationen auf.

### 7.1.9 Fall 8b (Zellinie Med-B1) ohne fortgesetzte Mutationen

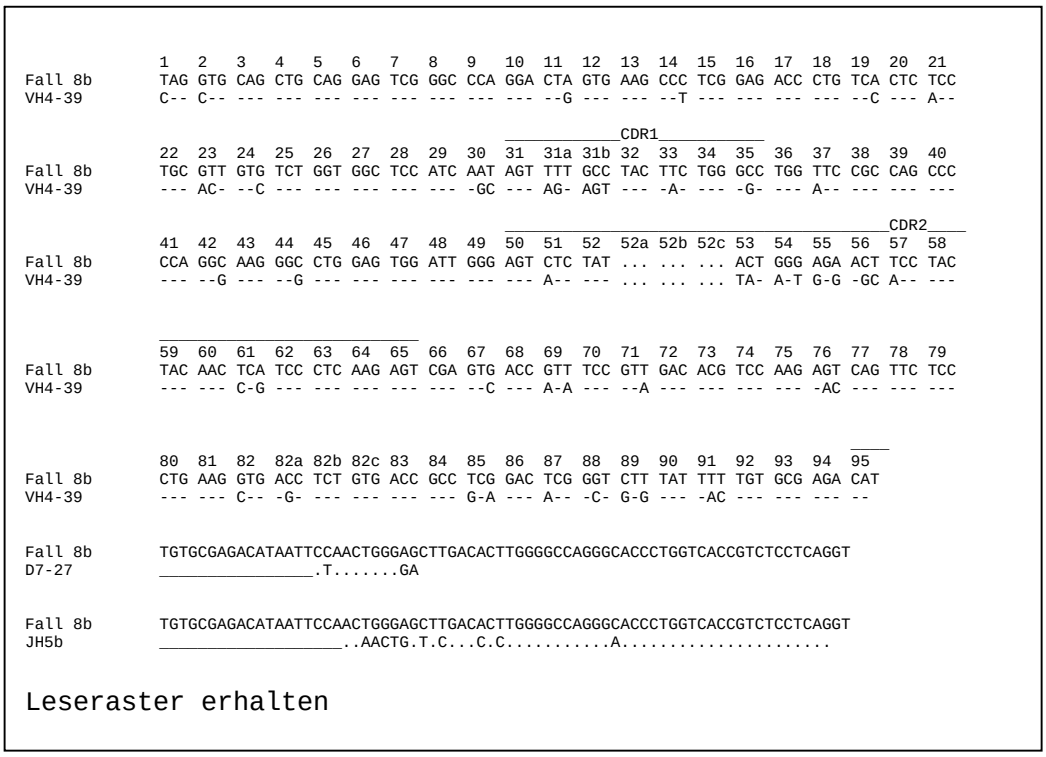



**Abbildung 21: Sequenzanalyse des Falles 8b (Zellinie Med-B1) ohne fortgesetzte Mutationen**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Fall 8b war die aus Fall 8a generierte Zellinie MedB-1 und zeigte die größte Homologie mit der VH4-39 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 28 Punktmutationen auf. In fünf analysierten Klonen des Falles 8b zeigte sich keine intraklonale Diversität im Sinne von fortgesetzten Mutationen.

### 7.1.10 Fall 8b (Zellinie Med-B1) mit fortgesetzten Mutationen

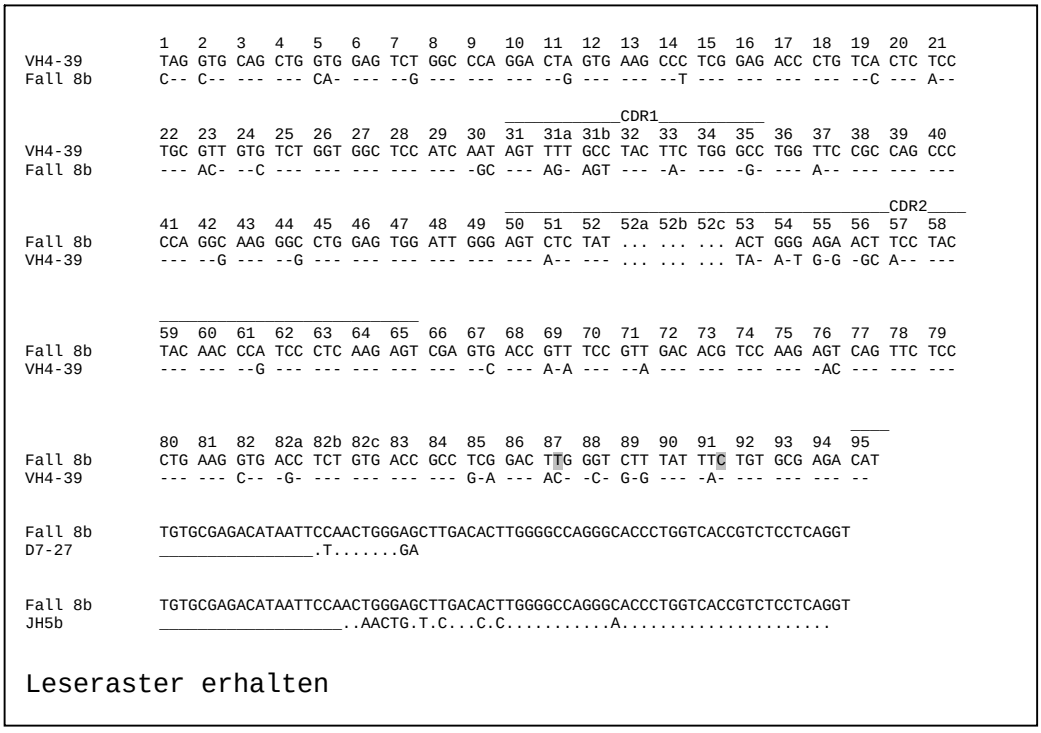



**Abbildung 22: Sequenzanalyse des Falles 8b (Zellinie Med-B1) mit fortgesetzten Mutationen**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt..

Fall 8b war die aus Fall 8a generierte Zellinie MedB-1 und zeigte die größte Homologie mit der VH4-39 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 9 bis 30, 36 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 28 Punktmutationen auf. In zwei analysierten Klonen des Falles 8b zeigte sich eine intraklonale Diversität im Sinne von fortgesetzten Mutationen. Die fortgesetzten Mutationen im Codon 87 und 91 sind grau unterlegt.

### 7.1.11 Fall 9

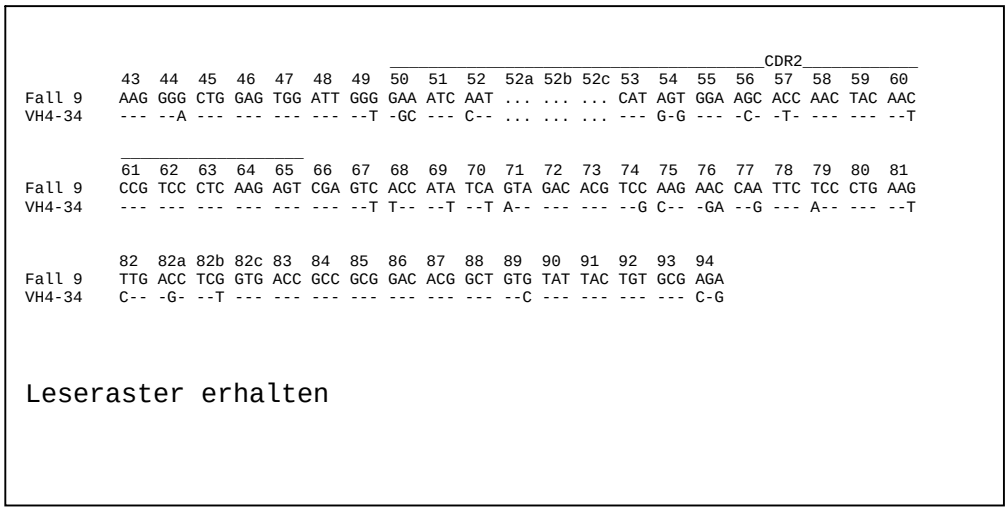



**Abbildung 23: Sequenzanalyse des Falles 9**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 9 zeigte die größte Homologie mit der VH4-34 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 43 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 20 Punktmutationen auf.

### 7.1.12 Fall 10

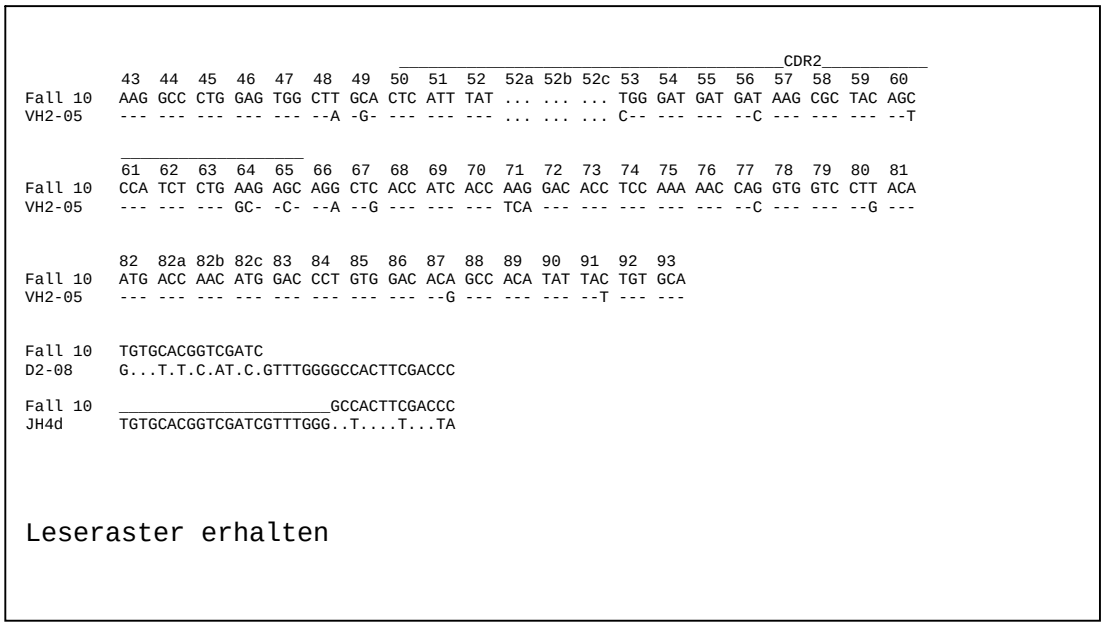



**Abbildung 24: Sequenzanalyse des Falles 10**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 10 zeigte die größte Homologie mit der VH2-05 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 43 bis 49 und 66 bis 93 wiesen insgesamt 11 Punktmutationen auf.

### 7.1.13 Fall 11

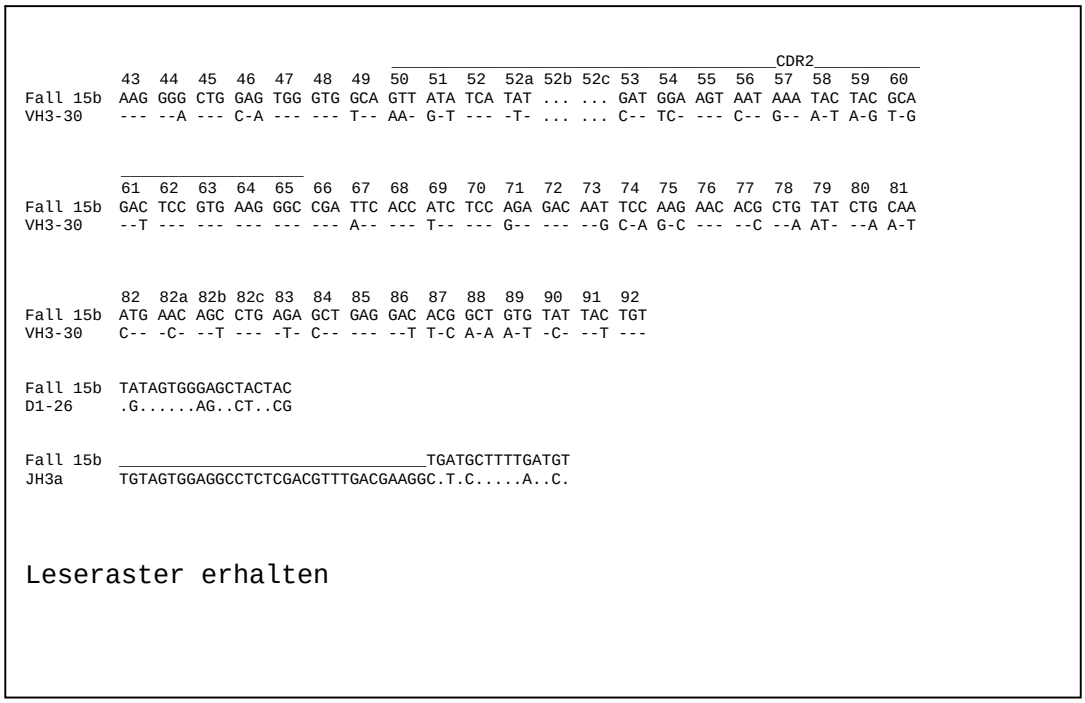



**Abbildung 25: Sequenzanalyse des Falles 11**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 11 zeigte die größte Homologie mit der VH3-30 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 43 bis 49 und 66 bis 92 wiesen insgesamt 33 Punktmutationen auf.

### 7.1.14 Fall 12

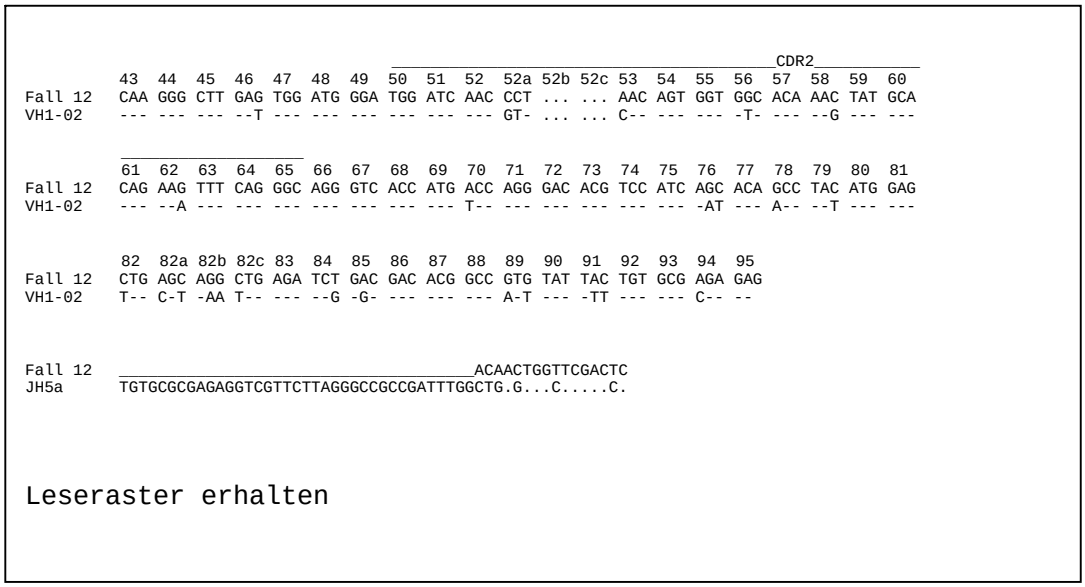



**Abbildung 26: Sequenzanalyse des Falles 12**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 12 zeigte die größte Homologie mit der VH1-02 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 43 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 19 Punktmutationen auf.

### 7.1.15 Fall 13a

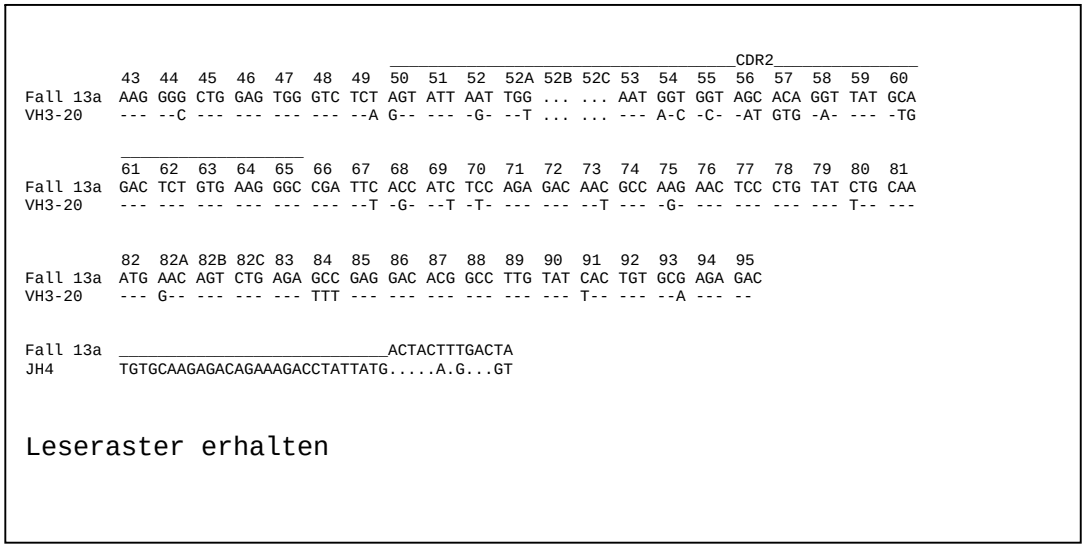



**Abbildung 27: Sequenzanalyse des Falles 13a**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 13a zeigte die größte Homologie mit der VH3-20 Keimbahnsequenz. Die Schwerkettengen-umlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 43 bis 49 und 66 bis 95 wiesen insgesamt 15 Punktmutationen auf.

### 7.1.16 Fall 13b

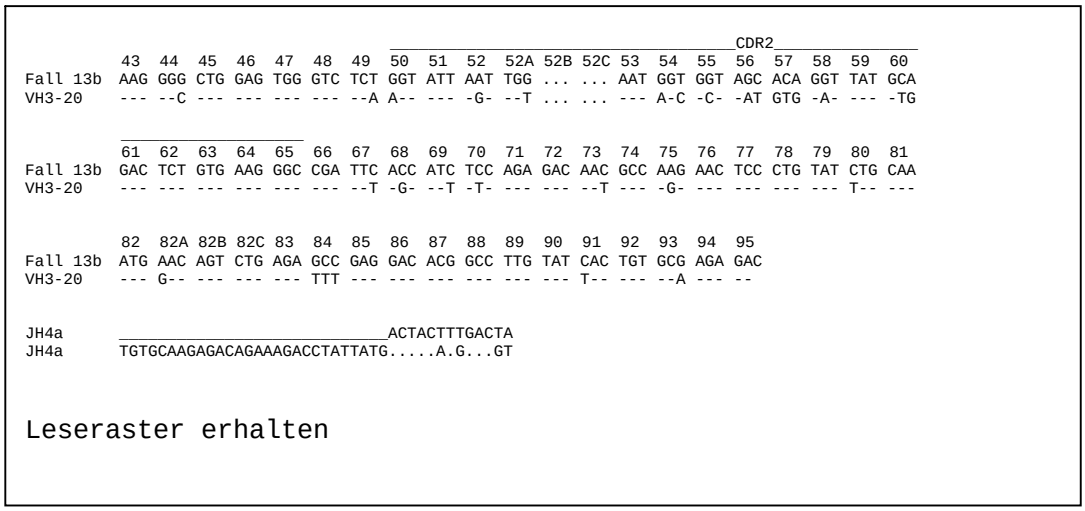



**Abbildung 28: Sequenzanalyse des Falles 13b**

Die Bezeichnung der entsprechenden Schwerkettenfamilie (VH-Segment), des D-Segments und des J-Segments ist am linken Rand der Sequenz angegeben. Übereinstimmungen der Fallsequenzen mit der ähnlichsten Keimbahnsequenz sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Bei jeder Mutation ist das entsprechende Nukleotid explizit angegeben. Die Codons sind durchnumeriert. Mutationen in den Complementarity Determining Regions (CDR) wurden nicht berücksichtigt.

Der Fall 13b zeigte die größte Homologie mit der VH3-20 Keimbahnsequenz. In diesem Fall wurde Tumorgewebe eines Lokalrezidivs vom selben Patienten 1 Jahr nach Erstdiagnose untersucht. Die Schwerkettengenumlagerungen waren potentiell funktional, da das Leseraster bei den Genumlagerungsvorgängen erhalten blieb. Die Frame Work Regions in den Codons 43 bis 49 und 66 bis 92 wiesen insgesamt 15 Punktmutationen auf. Eine intraklonale Diversität im Sinne fortgesetzter Mutationen traten in diesem Fall nicht auf.

# 8 Literaturverzeichnis


**(1)** Aarts WM, Willemze R, Bende RJ, Meijer CJ, Pals ST, van Noesel CJ: VH gene analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: evidence for ongoing somatic hypermutation and isotype switching. Blood 92: 3857-3864 (1998)

**(2)** Addis BJ, Isaacson PG: Large cell lymphoma of the mediastinum: A B-cell tumour of probable thymic origin. Histopathology 10: 379-390 (1986)

**(3)** Aisenberg AC: Primary large cell lymphoma of the mediastinum. Semin Oncol. 26: 251-258 (1999)

**(4)** Akashi K, Richie LI, Miyamoto T, Carr WH, Weismann L: B lymphopoiesis in the thymus. J Immunol. 164: 5221-5226 (2000)

**(5)** Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 403: 503-511 (2000)

**(6)** Alonso MA, Weissman SM: cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 84: 1997-2001 (1987)

**(7)** Al-Sharabati M, Chittal S, Duga-Neulat I, Laurant G, Mazerolles C, Al-Saati T, Brousset P, Delsol G: Primary anterior mediastinal B-cell lymphoma. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 16 cases. Cancer 67: 2579-2587 (1991)

**(8)** Aubin J, Davi F, Nguyen-Salomon F, Leboeuf D, Debert C, Taher M, Valensi F, Canioni D, Brousse N, Varet B**,** Flandrin G, Macintyre EA: Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. Leukemia 9: 471-479 (1995)

**(9)** Bahler DW, Levy R: Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. Proc Natl Acad Sci 89: 6770-6774 (1992)

**(10)** Bahler DW, Miklos JA, Swerdlow SH: Ongoing Ig gene hypermutation in salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas. Blood 89: 3335-3344 (1997)

**(11)** Bahler DW, Zelenetz AD, Chen TT, Levy R: Antigen selection in human lymphomagenesis. Cancer Res. 52: 5547-5551 (1992)

**(12)** Bentz M, Barth T, Brüderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, Joos S, Viardot A, Feller AC, Müller-Hermelink HK, Lichter P, Döhner H, Möller P: Gain on chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B cell lymphoma (MBL) - a comprehensive molecular cytogenetic and presentation of a novel MBL line. Genes Chromosomes Cancer 30: 393-401 (2001)

**(13)** Bransteitter R, Pham P, Scharff MD, Goodman MF: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci USA 100: 4102-4107 (2003)

**(14)** Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE: Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. J Immunol 155: 190-202 (1995)

**(15)** Calligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, Janossy G: Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 155: 623 - 628 (1982)

**(16)** Cazals-Hatem D, Lepage E, Brice P, Ferrant A, d'Agay MF, Baumelou E, Brière J, Blanc M, Gaulard P, Biron P, Schlaifer D, Diebold J, Audouin J: Primary mediastinal large B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 nonmediastinal large B-cell lymphomas, a GELA ("Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte") study. Am J Surg Pathol 20: 877-888 (1996)

**(17)** Chang B, Casali P: The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. Immunol Today 15: 367-373 (1994)

**(18)** Chapman CJ, Mockridge CI, Rowe M, Rickinson AB, Stevenson FK: Analysis of V(H) genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity. Blood 85: 2176 - 2181 (1995)

**(19)** Chapman CJ, Zhou JX, Gregory C, Rickinson AB, Stevenson FK: VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intraclonal heterogeneity, and a role for antigen selection. Blood 88: 3562-3568 (1996)

**(20)** Chaudhuri J, Khuong C, Alt FW: Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. Nature 430: 992-998 (2004)

**(21)** Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G: Structural repertoire of the human VH segments. J Mol Biol 227: 799-817 (1992)

**(22)** Cook GP, Tomlinson IM: The human immunoglobulin V(H) repertoire. Immunol Today 16: 237-242 (1995)

**(23)** Copie-Bergman C, Gaulard P, Maouche-Chretien L, Briere J, Haioun C, Alonso MA, Romeo PH, Leroy K: The MAL gene is expressed in primary mediastinal large B-cell lymphoma. Blood 94: 3567-3575 (1999)

**(24)** Daley MD, Berinstein NL, Siminovitch KA: Immunoglobulin heavy chain variable gene utilization in human large cell and Burkitt's lymphoma cell lines. Clin Invest Med 17: 522-530 (1994)

**(25)** Deane M, Norton JD: Detection of immunoglobulin gene rearrangement in B lymphoid malignancies by polymerase chain reaction gene amplification. Br J Haematol 74: 251-256 (1990)

**(26)** Delecluse HJ, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Stein H: Common and HIV-related diffuse large B-cell lymphomas differ in their immunoglobulin gene mutation pattern. J Pathol 188: 133-138 (1999)

**(27)** Denépoux S, Razanajaona D, Blanchard D, Meffre G, Capra JD, Banchereau J, Lebecque S: Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. Immunity 6: 35-46 (1997)

**(28)** Depuydt P, Van Hoof A, Selleslag D, Criel A, Hidayat M, Louwagie A: Mediastinal B-cell lymphoma with sclerosis: Clinical features and treatment results in 10 patients. Acta Clin Belg 50: 137-143 (1995)

**(29)** Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN: AID Mediates Hypermutation by Deaminating Single Stranded DNA. J Exp Med 197: 1291-1296 (2003)

**(30)** Domiati-Saad R, Lipsky PE: B cell superantigens: potential modifiers of the normal B cell repertoire. Int Rev Immunol 14: 309-324 (1997)

**(31)** Driessen A, Tierens A, Ectors N, Stul M, Pittaluga S, Geboes K, Delabie J, De Wolf-Peeters C: Primary diffuse large B cell lymphoma of the stomach: analysis of somatic mutations in the rearranged immunoglobulin heavy chain variable genes indicates antigen selection. Leukemia 13: 1085-1092 (1999)

**(32)** Dunn-Walters DK, Howe CJ, Isaacson PG, Spencer J: Location and sequence of rearranged immunoglobulin genes in human thymus. Eur J Immunol 25: 513-519 (1995)

**(33)** Fend F, Nachbaur D, Oberwasserlechner F: Phenotype and topography of human thymic B cells. An immunohistologic study. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 60: 381-388 (1991)

**(34)** Flores KG, Li J, Hale LP: B Cells in Epithelial and Perivascular Compartments of Human Adult Thymus. Hum Pathol 32: 926-934 (2001)

**(35)** Forster I, Rajewski K: Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. Eur J Immunol 17: 521-528 (1987)

**(36)** Funkhouser WK, Warnke RA: Preferential IgH V4-34 gene segment usage in particular subtypes of B-cell lymphoma detected by antibody 9G4. Hum Pathol 29: 1317-1321 (1998)

**(37)** Gellrich S, Golembowski S, Audring H, Jahn S, Sterry W: Molecular analysis of the immunoglobulin VH gene rearrangement in a primary cutaneous immunoblastic B-cell lymphoma by micromanipulation and single-cell PCR. J Invest Dermatol 109: 541-545 (1997)

**(38)** Goossens T, Klein U, Küppers R: Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. Proc Natl Acad Sci 95: 2463-2468 (1998)

**(39)** Gordon MS, Kanegai CM, Doerr JR, Wall R: Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igβ, CD79b) and mb1 (Igα, CD 79a). Proc Natl Acad Sci USA 100: 4126-4131 (2003)

**(40)** Greeve J, Philipsen A, Krause K, Klapper W, Heidorn K, Castle BE, Janda J, Marcu KB, Parwaresch R: Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. Blood 101: 3574 – 3580 (2003)

**(41)** Guigou V, Cuisinier AM, Tonnelle C, Moinier D, Fougereau M, Fumoux F: Human immunoglobulin VH and VK repertoire revealed by in situ hybridization. Mol Immunol 27: 935-940 (1990)

**(42)** Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. J Clin Oncol 17: 3835-3849 (1999)

**(43)** Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 84: 1361-1392 (1994)

**(44)** Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA: The "Ly-1B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. J Exp Med 157: 202-218 (1983)

**(45)** Haynes BF, Hale LP: The human thymus: a chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. Immunol Res 18: 175-192 (1998)

**(46)** Hofmann WJ, Momburg F, Möller P: Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. Hum Pathol 19: 1280-1287 (1988)

**(47)** Hsu FJ, Levy R: Preferential use of the VH4 Ig gene family by diffuse large-cell lymphoma. Blood 86: 3072-3082 (1995)

**(48)** Huang C, Steward AK, Schwartz RS, Stollar BD: Immunoglobulin heavy chain gene expression in peripheral blood B lymphocytes. J Clin Invest 89: 1331-1343 (1992)

**(49)** Hummel M: Nachweis somatischer Mutationen in den umgelagerten Immunglobulin-Schwerkettengenen maligner Lymphome. Medizinische Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin (1998)

**(50)** Hummel M, Ziemann K, Lammert H, Pileri S, Sabattini E, Stein H: Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells. N Engl J Med 333: 901-906 (1995)

**(51)** Hyland J, Lasota J, Jasinski M, Petersen RO, Nordling S, Miettinen M: Molecular pathological analysis of testicular diffuse large cell lymphomas. Hum Pathol 29: 1231-1239 (1998)

**(52)** Inaba M, Inaba K, Adachi Y, Nango K, Ogata H, Muramatsu S, Ikehara S: Functional analyses of thymic CD5+ B cells. Responsiveness to major histocompatibility complex class II-restricted T blasts but not to lipopolysaccharide or anti-IgM plus interleukin 4. J Exp Med 171: 321-326 (1990)

**(53)** Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ: The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. Lancet 2: 1488-1491 (1987)

**(54)** Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Brüderlein S, du Manoir S, Bentz M, Möller P, Lichter P: Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. Blood 87: 1571-1578 (1996)

**(55)** Jox A, Zander T, Küppers R, Irsch J, Kanzler H, Kornacker M, Bohlen H, Diehl V, Wolf J: Somatic mutations within the untranslated regions of rearranged Ig genes in a case of classical Hodgkin's disease as a potential cause for the absence of Ig in the lymphoma cells. Blood 93: 3964-3972 (1999)

**(56)** Kanavaros P, Gaulard P, Charlotte F, Martin N, Ducos C, Lebezu M, Mason DY: Discordant expression of immunoglobulin and its associated molecule mb-1/CD79a is frequently found in mediastinal large B cell lymphomas. Am J Pathol 146: 735-741 (1995)

**(57)** Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. J Exp Med 184: 1495-1505 (1996)

**(58)** Kanzler H, Küppers R, Helmes S, Wacker HH, Chott A, Hansmann ML, Rajewsky K: Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia represent the outgrowth of single germinal-center B-cell-derived clones: potential precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. Blood 95: 1023-1031 (2000)

**(59)** Kirn D, Mauch P, Shaffer K, Pinkus G, Shipp MA, Kaplan WD, Tung N, Wheeler C, Beard CJ, Canellos GP: Large-cell and immunoblastic lymphoma of the mediastinum: Prognostic features and treatment outcome in 57 patients. J Clin Oncol 11: 1336-1343 (1993)

**(60)** Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Küppers R: Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. Immunol Rev 162: 261-280 (1998)

**(61)** Klein U, Küppers R, Rajewski K: Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. Blood 89: 1288-1298 (1997)

**(62)** Kraj P, Friedman DF, Stevenson F, Silberstein LE: Evidence for the overexpression of the VH4-34 (VH4.21) Ig gene segment in the normal adult human peripheral blood B cell repertoire. J Immunol 154: 6406-6420 (1995)

**(63)** Kroemer G: The proto-oncogene Bcl-2 and ist role in regulating apoptosis. Nat Med 3: 614-620 (1997)

**(64)** Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K: Cellular origin of human B-cell lymphomas. N Engl J Med 341: 1520-1529 (1999)

**(65)** Küppers R, Rajewsky K, Hansmann ML: Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. Eur J Immunol 27: 1398-1405 (1997)

**(66)** Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. Proc Natl Acad Sci USA 91: 10962-10966 (1994)

**(67)** Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K: Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. EMBO J 12: 4955-4967 (1993)

**(68)** Lam KP, Kuhn R, Rajewsky K: In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. Cell 90: 1073-1083 (1997)

**(69)** Lamarre L, Jacobson JO, Aisenberg AC, Harris NL: Primary large cell lymphoma of the mediastinum: A histologic and immunophenotypic study of 29 cases. Am J Surg Pathol 13: 730-739 (1989)

**(70)** Lazzarino M, Orlandi E, Paulli M, Boveri E, Morra E, Brusamolino E, Kindl S, Rosso R, Astori C, Buonanno MC: Primary mediastinal B-cell lymphoma with sclerosis: An aggressive tumor with distinctive clinical and pathologic features. J Clin Oncol 11: 2306-2313 (1993)

**(71)** Lennert K, Stein H, Kaiserling E: Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. Br J Cancer 31: 29-43 (1975)

**(72)** Li Y, Spellerberg MB, Stevenson FK, Capra JD, Potter KN: The I binding specificity of human VH 4-34 (VH 4-21) encoded antibodies is determined by both VH framework region 1 and complementarity determining region 3. J Mol Biol 256: 577-589 (1996)

**(73)** Lipsky PE: The control of antibody production by immunomodulatory molecules. Arthritis Rheum 32: 1345-1355 (1989)

**(74)** Liu YJ, Arpin C: Germinal center development. Immunol Rev 156: 111-126 (1997)

**(75)** Logtenberg T, Schutte ME, Inghirami G, Berman JE, Gmelig-Meyling FH, Knowles DM, Alt FW: Immunoglobulin VH gene expression in human B cell lines and tumors: biased VH gene expression in chronic lymphocytic leukemia. Int Immunol 1: 362-366 (1989)

**(76)** Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, Chan WC, Brown PO, Botstein D, Staudt LM, Levy R: Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 10209-10213 (2000)

**(77)** Lossos IS, Okada CY, Tibshirani R, Warnke R, Vose JM, Greiner TC, Levy R: Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. Blood 95: 1797-1803 (2000)

**(78)** Mac Lennan IC: Germinal centers. Annu Rev Immunol 12: 117-139 (1994)

**(79)** MacLennan IC, Gray D: Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. Immunol Rev 91: 61-85 (1986)

**(80)** Malpeli G, Barbi S, Moore PS, Scardoni M, Chilosi M, Scarpa A, Menestrina F: Primary mediastinal B-cell lymphoma: hypermutation of the BCL6 gene targets motifs different from those in diffuse large B-cell and follicular lymphomas. haematologica 89: 1091-1099 (2004)

**(81)** Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Lammert H, Demel G, Theil J, Wirth T, Stein H: Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. Blood 95: 1443-1450 (2000)

**(82)** Martin A, Scharff M D: Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. Proc Natl Acad Sci 99: 12304-12308 (2002)

**(83)** Matsumoto M, Lo SF, Carruthers CJ: Affinity maturation without germinal centers in lymphotoxin alpha deficient mice. Nature 382: 462-466 (1996)

**(84)** Medeiros LJ, Carr J: Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. Arch Pathol Lab Med 123: 1189-1207 (1999)

**(85)** Melzner I, Bucur AJ, Brüderlein S, Dorsch K, Hasel C, Barth TF, Leithäuser F, Möller P: Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. Blood 105: 2535-2542 (2005)

**(86)** Möller P, Brüderlein S, Sträter J, Leithäuser F, Hasel C, Bataille F, Moldenhauer G, Pawlita M, Barth TF: MedB-1, a human tumor cell line derived from a primary mediastinal large B cell lymphoma. Int J Cancer 92: 348-353 (2001)

**(87)** Möller P, Lammler B, Eberlein-Gonska M, Feichter GE, Hofmann WJ, Schmitteckert H, Otto HF: Primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 409: 79-92 (1986)

**(88)** Möller P, Moldenhauer G, Momburg F, Lammler B, Eberlein-Gonska M, Kiesel S, Dorken B: Mediastinal lymphoma of clear cell type is a tumor corresponding to terminal steps of B cell differentiation. Blood 69: 1087-1095 (1987)

**(89)** Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350 (1987)

**(90)** Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T: Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell 102: 553-563 (2000)

**(91)** Nakamura N, Hashimoto Y, Kuze T, Tasaki K, Sasaki Y, Sato M, Abe M: Analysis of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma. Lab Invest 79: 925-933 (1999)

**(92)** Neuberger MS, Milstein C: Somatic hypermutation: Current Opinion in Immunology 7: 248-254 (1995)

**(93)** Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, Kuroda T, Kazama A, Kanazawa N, Sato K, Kato T, Ota H, Mori S: BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. Blood 86: 28-37 (1995)

**(94)** Oprea M, Perelson AS: Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. J Immunol 158: 5155-5162 (1992)

**(95)** Ottensmeier CH, Stevenson FK: Isotype switch variants reveal clonally related subpopulations in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 96: 2550-2556 (2000)

**(96)** Ottensmeier CH, Thompsett AR, Zhu D, Wilkins BS, Sweetenham JW, Stevenson FK: Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. Blood 91: 4292-4299 (1998)

**(97)** Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD: Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. J Exp Med 180: 329-339 (1994)

**(98)** Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, Chaganti R SK, Klein U, Küppers R, Rajewsky R, Dalla-Favera R. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. Proc Natl Acad Sci USA 95: 11816-11821 (1998)

**(99)** Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Küppers R, Dalla-Favera R: Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. Nature 412: 341-346 (2001)

**(100)** Paulli M, Sträter J, Gianelli U, Rousset MT, Gambacorta M, Orlandi E, Klersy C, Lavabre-Bertrand T, Morra E, Manegold C, Lazzarino M, Magrini U, Möller P: Mediastinal B-cell lymphoma: a study of its histomorphologic spectrum based on 109 cases. Hum Pathol 30: 178-187 (1999)

**(101)** Pennell CA, Arnold LW, Haughton G, Clarke SH. Restricted Ig variable region gene expression among Ly-1+ B-cell lymphomas. J Immunol 141: 2788-2796 (1988)

**(102)** Pileri SA, Gaidano G, Zinzani PL, Falini B, Gaulard P, Zucca E, Pieri F, Berra E, Sabattini E, Ascani S, Piccioli M, Johnson PWM, Giardini R, Pescarmona E, Novero D, Piccaluga PP, Marafioti T, Alonso MA, Cavalli F: Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: High Frequency of BCL-6 Mutations and Consistent Expression of the Transcription Factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the Absence of Immunoglobulins. Am J Pathol 162: 243–253 (2003)

**(103)** Rajewsky K: Clonal selection and learning in the antibody system. Nature 381: 751-758 (1996)

**(104)** Ramasamy I, Brisco M, Morley A: Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. J Clin Pathol 45: 770-775 (1992)

**(105)** Ranger AM, Hodge MR, Gravallese EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby M, Glimcher LH: Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4 driven responses produced by inactivation of NF-ATc. Immunity 8: 125-134 (1998)

**(106)** Razanajaona D, Denepoux S, Blanchard D, de Bouteiller O, Liu YJ, Banchereau J, Lebecque S: In vitro triggering of somatic mutation in human naive B cells. J Immunol 159: 3347-3353 (1997)

**(107)** Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Labelouse R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A: Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). Cell 102: 565-575 (2000)

**(108)** Reynaud CA, Garcia C, Hein WR, Weill JC: Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. Cell 80: 115-125 (1995)

**(109)** Ritz O, Leithäuser F, Hasel C, Brüderlein S, Ushmorov A, Möller P, Wirth T: Downregulation of internal enhancer activity contributes to abnormally low immunoglobulin expression in the MedB-1 mediastinal B-cell lymphoma cell line. J Pathol 205: 336-348 (2005)

**(110)** Rosenquist R, Lindström A, Holmberg D, Lindh J, Roos G: V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. Eur J Haematol 62:123-128 (1999)

**(111)** Rosenwald A , George Wright G, Karen Leroy K, Xin Yu X, Philippe Gaulard P, Randy D. Gascoyne RD, Wing C. Chan WC, Tong Zhao T, Corinne Haioun C, Timothy C. Greiner TC, Dennis D. Weisenburger DD, James C. Lynch JC, Julie Vose J, James O. Armitage JO, Erlend B. Smeland EB, Stein Kvaloy S, Harald Holte H,Jan Delabie J, Elias Campo E, Emili Montserrat EE, Armando Lopez-Guillermo A, German Ott G, H. Konrad Muller-Hermelink HK, Joseph M. Connors JM, Rita Braziel R, Thomas M. Grogan TM, Richard I. Fisher RI, Thomas P. Miller TP, Michael LeBlanc M, Michael Chiorazzi M, Hong Zhao H, Liming Yang L, John Powell J, Wyndham H. Wilson WH, Elaine S. Jaffe ES, Richard Simon R, Richard D. Klausner RD, Louis M. Staudt LM: Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma. J Exp Med 198: 851-862 (2003)

**(112)** Rothstein TL: Cutting Edge Commentary. Two B-1 or Not To Be One. J.Immunol 168: 4257-4261 (2002)

**(113)** Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354 (1985)

**(114)** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Nat Acad Sci USA 74: 5463-5467 (1977)

**(115)** Savage KJ, Monti S, Jeffery L. Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, de Leval L, Kurtin P, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F, Aguiar RCT, Li S, Salles G, Berger F, Jing W, Pinkus GS, Habermann T, Dalla-Favera R, Harris NL, Aster JC, Golub TR, Shipp MA: The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. Blood 102: 3871-3879 (2003)

**(116)** Scarpa A, Borgato L, Chilosi M, Capelli P, Menestrina F, Bonetti F, Zamboni G, Pizzolo G, Hirohashi S, Fiore-Donati L: Evidence of c-myc gene abnormalities in mediastinal large B-cell lymphoma of young adult age. Blood 78: 780-788 (1991)

**(117)** Smit LA, Bende RJ, Aten J, Guikema JEJ, Aarts WM, van Noesel CJM: Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase is Confined to B-Cell Non-Hodgkin´s Lymphomas of Germinal-Center Phenotype. Cancer Research 63: 3894-3898 (2003)

**(118)** Spencer J, Choy M, Hussell T, Papadaki L, Kington JP, Isaacson PG: Properties of human thymic B cells. Immunology 75: 596-600 (1992)

**(119)** Stall AM, Wells SM, Lam KP: B-1 Cells: unique origins and functions. Sem Immunol 8: 45-59 (1996)

**(120)** Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, Wirth T, Demel G, Falini B: Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. Blood 97: 496-501 (2001)

**(121)** Steinmann GG: Changes in the human thymus during aging. Curr Top Pathol 75: 43-48 (1986)

**(122)** Steinmetz M, Altenburger W, Zachau HG: A rearranged DNA sequence possibly related to the translocation of immunoglobulin gene segments. Nucleic Acids Res 8: 1709-1720 (1980)

**(123)** Stevenson F, Sahota S, Zhu D, Ottensmeier C, Chapman C, Oscier D, Hamblin T: Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. Immunol Rev 162: 247-259 (1998)

**(124)** Stevenson FK, Spellerberg MB, Treasure J, Chapman CJ, Silberstein LE, Hamblin TJ, Jones DB: Differential usage of an Ig heavy chain variable region gene by human B-cell tumors. Blood 82: 224-230 (1993)

**(125)** Stiernholm N, Kuzniar B, Berinstein NL: Absence of immunoglobulin variable region hypermutation in a large cell lymphoma after in vivo and in vitro propagation. Blood 80: 738-743 (1992)

**(126)** Than S, Inaba M, Inaba K, Fukuba Y, Adachi Y, Ikehara S: Origin of thymic and peritoneal Ly-1 B cells. Eur J Immunol 22: 1299-1303 (1992)

**(127)** Todeschini G, Ambrosetti A, Meneghini V, Pizzolo G, Menestrina F, Chilosi M, Benedetti F, Veneri D, Cetto GL, Perona G: Mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: A clinical study of 21 patients. J Clin Oncol 8: 804-808 (1990)

**(128)** Tomlinson IM, Walter G, Jones PT, Dear PH, Sonnhammer EL, Winter G: The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. J Mol Biol 256: 813-817 (1996)

**(129)** Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA: Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by thew polymerase chain reaction. Blood 78: 192-196 (1991)

**(130)** Tsang P, Cesarman E, Chadburn A, Liu YF, Knowles DM: Molecular characterization of primary mediastinal B cell lymphoma. Am J Pathol 148: 2017-2025 (1996)

**(131)** van Besien K, Kelta M, Bahaguna P: Primary mediastinal B-cell lymphoma: A review of pathology and management. J Clin Oncol 19: 1855-1864 (2001)

**(132)** van Es JH, Gmelig Meyling FHJ, Logtenberg T: High frequency of somatically mutated IgM molecules in the human adult blood B cell repertoire. Eur J Immunol 22: 2761-2764 (1992)

**(133)** William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ: Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. Science 297: 2066-2070 (2002)

**(134)** Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG: Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue after eradication of Helicobacter pylori. Lancet 342: 575-577 (1993)

**(135)** Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM: A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 100: 9991–9996 (2003)

**(136)** Yousem SA, Weiss LM, Warnke RA: Primary mediastinal non-Hodgkin's lymphomas: a morphologic and immunologic study of 19 cases. Am J Clin Pathol 83: 676-680 (1985)

# 9 Eigene Publikationen

Leithäuser F, Bäuerle M, Quang Huynh M, Möller P: Isotype-switched immunoglobulin genes with a high load of somatic hypermutation and lack of ongoing mutational activity are prevalent in mediastinal B-cell lymphoma. Blood 98: 2762-2770 (2001)

# Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Mentor Herrn Dr. med. Frank Leithäuser, der mich unablässig und mit großem Engagement bei meiner Forschungsarbeit unterstützt hat. Er hat es mir ermöglicht, eine Fragestellung systematisch wissenschaftlich anzugehen und in eine wissenschaftliche Publikation umzusetzen.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des molekularbiologischen Laboratoriums, die mir immer bereitwillig aus ihrem großen Erfahrungsschatz Hilfestellung für die Durchführung meines Projektes gaben. Dr. rer. nat. Ingo Melzner und MTA Silvia Röderer zeigten mir geduldig die korrekte Durchführung und Optimierung gängiger molekularbiologischer Methoden.

Großer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. med. Peter Möller, der mir diese einzigartige Sammlung an Lymphomproben von Patienten mit mediastinalen B-Zell-Lymphomen zur Verfügung stellte und mir die Möglichkeit verschaffte, die Laboratorien seiner Abteilung für Pathologie der Universität Ulm zu benützen.

Mit keinen Worten läßt sich der Dank ausdrücken, den meiner Frau Patrícia und meinen Kindern gebührt, die mich viele Stunden entbehren mußten.