

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Leiter: Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink

**Verlaufsuntersuchung und
Heterogenität
der somatischen Mutationen
des B-Zell-Rezeptors
beim folliculären Lymphom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Julia Schoof
aus Baden-Baden

Würzburg, Mai 2005

Referent: Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink
Koreferent: Prof. Dr. med. H. Einsele
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	B-Lymphozyten	1
1.1.1	B-Zell-Ontogenese	1
1.1.2	Der B-Zell-Rezeptor	2
1.1.3	Rekombination der schweren und leichten Immunglobulinkette	3
1.1.4	Der Aufbau der variablen Region der schweren Immunglobulinkette, die Keimzentrumsreaktion	4
1.2	Non-Hodgkin-Lymphome	5
1.2.1	Das folliculäre Lymphom	6
2	Ziel und Fragestellung der Arbeit	8
3	Material und Methode	
3.1	Material	9
3.1.1	Patienten und immunhistologische Untersuchungsbefunde	9
3.2	Methode	11
3.2.1	DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe	11
3.2.2	DNA-Isolierung aus in Paraffin eingebettetem Gewebe	11
3.2.3	PCR zur Bestimmung geeigneter Tumoren und ihrer optimalen Verdünnungsstufe	11
3.2.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese	13
3.2.5	PCR zur Bestimmung der VH-Familie	13
3.2.6	Schnitt und Anfärbung der kryoasservierten Biopsien	14
3.2.7	Mikrodissektion einzelner Follikel und Verdau	15
3.2.8	VH-familienpezifische PCR der einzelnen Follikel	15
3.2.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel	17

3.2.10	Klonierung	18
3.2.11	Klon-Picking und Übernachtkultur	18
3.2.12	Minipräparation von Plasmid-DNA aus E.coli	18
3.2.13	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	19
3.2.14	Cycle sequencing von DNA und Auswertung über ABI 373	20
3.2.15	Sequenzauswertung	20
3.2.16	Mutationsanalysen der variablen Region	21
3.2.17	Konstruktion der phylogenetischen Stammbäume	22
4	Ergebnisse	
4.1	Patient 1 - Tumor I	23
4.1.1	Mutationsanalyse	25
4.1.2	Intraklonale Diversität	28
4.1.3	Genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone	29
4.1.4	Andere Keimbahnfamilien	32
4.2	Patient 2 - Tumor II	33
4.2.1	Mutationsanalyse	35
4.2.2	Intraklonale Diversität	40
4.2.3	Genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone	41
4.2.4	Andere Keimbahnfamilien	44
4.3	Patient 3	
4.3.1	Tumor III 1	46
4.3.1.1	Mutationsanalyse	48
4.3.1.2	Intraklonale Diversität	50
4.3.1.3	Genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone	51
4.3.1.4	Andere Keimbahnfamilien	52

4.3.2	Tumor III 2	53
4.3.2.1	Mutationsanalyse	55
4.3.2.2	Intraklonale Diversität	58
4.3.2.3	Genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone	59
4.3.2.4	Andere Keimbahnfamilien	61
4.3.3	Vergleich Tumor III 1 mit III 2	62
4.4	Patient IV	
4.4.1	Tumor IV 1	63
4.4.1.1	Mutationsanalyse	65
4.4.1.1.1	VH4-34.1-Subklone	65
4.4.1.1.2	VH4-30.1-Subklone	72
4.4.1.2	Intraklonale Diversität	74
4.4.1.2.1	VH4-34.1-Subklone	74
4.4.1.2.2	VH4-30.1-Subklone	76
4.4.1.3	Genetische Verwandtschaft	79
4.4.1.4	Andere Keimbahnfamilien	82
4.4.2	Tumor IV 2	83
4.4.2.1	Mutationsanalyse	83
4.4.2.2	Intraklonale Diversität	84
4.4.3	Tumor IV 3	86
4.4.3.1	Mutationsanalyse	86
4.4.3.2	Intraklonale Diversität	86
4.4.4	Vergleich Tumor IV 1, IV2 und IV 3	87

5	Diskussion	
5.1	Methodenkritische Diskussion	88
5.1.1	Gewebeproben zur DNA-Gewinnung	88
5.1.2	Mikrodissektion	88
5.1.3	Primer , PCR und Sequenzierreaktion	89
5.1.4	Mutationsanalyse und phylogenetische Software	90
5.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse	91
5.2.1	Migrationsverhalten der Tumorsubklone im folliculären Lymphom	91
5.2.2	Ongoing Mutations	96
5.2.3	Antigenabhängige Hypermutation	97
5.2.4	Nicht neoplastisches Begleitinfiltrat	100
6	Zusammenfassung	101
7	Literaturverzeichnis	103
8	Anhang	
8.1	Material	110
8.1.1	Arbeitsgeräte und Hilfsmittel	110
8.1.2	Puffer und Lösungen	111
8.1.3	Enzyme und Antikörper	112
8.1.4	Plasmide und Oligonukleotide	112
8.1.5	Bakterienstämme und Medien	114
8.2	Sequenzen	
8.2.1	Tumor I	115
8.2.2	Tumor II	119
8.2.3	Tumor III 1	125

Inhaltsverzeichnis

8.2.4	Tumor III 2	128
8.2.5	Vergleich Tumor III 1 und III 2	131
8.2.6	Tumor IV 1	132
8.2.7	Tumor IV 2	137
8.2.8	Tumor IV 3	138
8.2.9	Vergleich Tumor IV 1, IV 2, IV 3	139
8.3	Abkürzungsverzeichnis	141

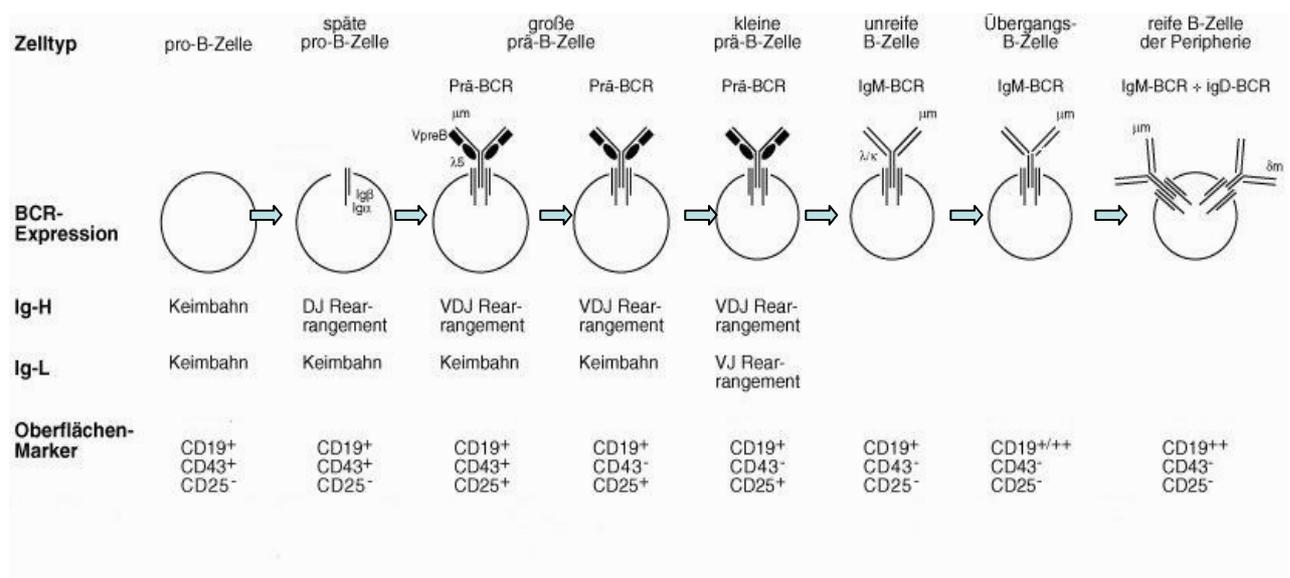
1. Einleitung

1.1 B-Lymphozyten

1.1.1 B-Zell-Ontogenese

Schon früh während der Ontogenese bilden sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen B-Zell-Vorläuferzellen. Diese B-Zell-Generation beginnt beim Menschen während der 8.-9. Entwicklungswoche im paraaortalen Gewebe, in Leber und Milz. Nach der Geburt ist sie hauptsächlich auf das Knochenmark beschränkt, wo sie mit abnehmender Aktivität das ganze Leben lang anhält (1). Dort im Knochenmark erfolgt die Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle zum unreifen B-Lymphozyten. Am Ende der B-Zell-Differenzierung im Knochenmark entsteht ein unreifer B-Lymphozyt, der an seiner Oberfläche einen für ihn charakteristischen B-Zell-Rezeptor trägt. Diese naive B-Zelle gelangt über die Blut- und Lymphgefäße zu den lymphatischen Organen, wo durch das Zusammenspiel von Antigen-präsentierenden Zellen und T-Helferzellen die weiteren, endgültigen Differenzierungsschritte eingeleitet werden.

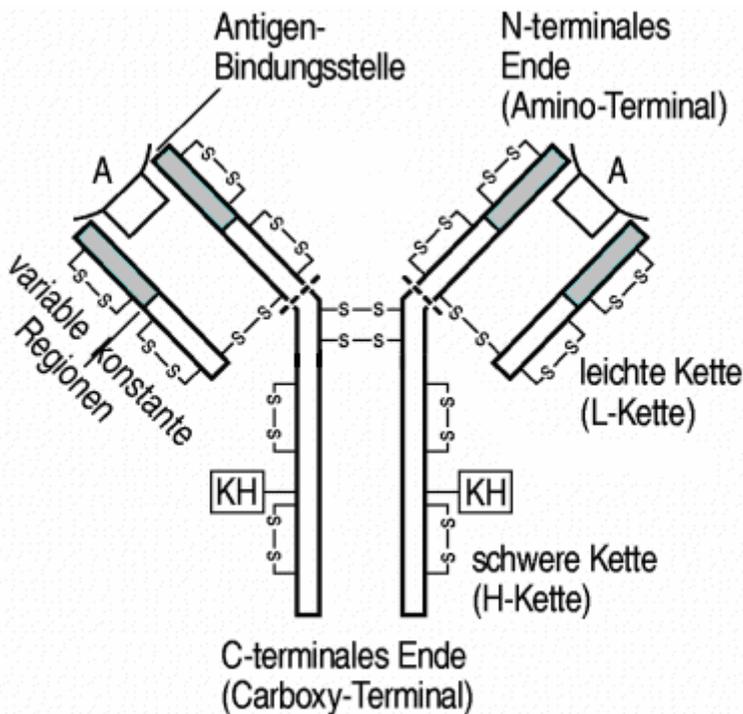
Abb. 1 – Reifungsschritte der B-Zell-Ontogenese, modifiziert nach Sauerhout R, Freudig D: Lexikon der Biologie, Spektrum akademischer Verlag, 1999-2002



1.1.2 Der B-Zell-Rezeptor

Der B-Zell-Rezeptor entspricht einem membrangebundenem Immunglobulin. Das Immunglobulinmolekül setzt sich aus vier Polypeptidketten zusammen, die sich in je zwei identische schwere (H) und leichte (L) Ketten aufteilen (2). Die H- und L-Ketten werden über kovalente Disulfidbrücken verbunden. Sowohl die H- als auch die L-Ketten setzen sich aus je einer NH₂-terminalen variablen (V) Region und einer COOH-terminalen konstanten (C) Region zusammen. Die V-Region ist für die Antigenbindung, die C-Region für die Effektorfunktion verantwortlich. Die V-Region lässt sich noch weiter aufteilen: In der schweren Kette wird sie durch drei Gene (V (*variable*), D (*diversity*), J (*joining*)) kodiert, in der leichten Kette durch zwei Gene (V, D). Die V-Regionen beider Ketten bestimmen den Ideotyp eines Antikörpers. Die C-Region ist ebenfalls ein Produkt mehrerer Gene. Durch sie wird die Antikörperklasse, der Isotyp, bestimmt. Bei den Antikörpern der Klasse IgM und IgE besteht die C-Region aus vier, bei den Antikörpern der Klassen IgG, IgA und IgD aus drei konstanten Domänen.

Abb. 2 – Aufbau eines Antikörpermoleküls am Beispiel des IgG, modifiziert nach Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 258. Aufl. Berlin: De Gruyter, 1998



KH : Kohlenhydratkomponente

1.1.3 Rekombination der schweren und leichten Immunglobulinkette

Die grundlegenden Mechanismen bei der Entstehung der Vielfalt der Antigenrezeptoren wurden 1983 von Tonegawa beschrieben (3). Auf genomischer Ebene kommt es zu einer Rekombination der V-, D- und J-Gene der schweren Immunglobulinkette bzw. V- und J-Gene der leichten Kette. Die V-, D- und J-Gene der schweren Kette liegen als *Cluster* auf Chromosom 14q23 in dieser Reihenfolge vor. Dabei besitzt der Mensch 51 funktionelle V_H -Gene, ca. 30 D_H -Gene und 6 J_H -Gene. Bei der physiologischen Rekombination kann jedes Segment eines Typs mit jedem beliebigen Segment eines anderen Typs in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden, indem die dazwischen liegende DNA mit Hilfe der VDJ-Rekombinase herausgeschnitten wird.

Die VDJ-Rekombinase setzt sich aus einem Komplex von Schneide- und Reparaturenzymen zusammen. Im ersten Schritt der Rekombination wird zunächst ein D-Fragment an ein J_H -Fragment gefügt, es entsteht ein DJ_H -Fragment (3-5). Im nächsten Schritt wird das DJ_H -Fragment mit einem der V_H -Fragmente rekombiniert und eine komplette V-Region der schweren Kette ist fertig gestellt. Während dieser beiden Rekombinationsschritte werden noch zusätzlich kurze DNA-Abschnitte von 5-20 Nukleotiden durch ein Enzym namens TdT (terminale Desoxynucleotidyltransferase) zwischen den jeweils zu verknüpfenden Fragmenten eingefügt (6). Die Diversität der Antigenbindungsstelle wird dadurch nochmals vervielfältigt. Ähnlich verläuft der Rekombinationsprozess der leichten Kette. Hier setzt sich allerdings die V-Region aus nur einem V_L - und J_L -Segment zusammen. Die Gene sind auf zwei Chromosomen verteilt: die der κ -Kette liegen auf Chromosom 2, die der λ -Kette auf Chromosom 22.

Diese Prozesse der Rekombination werden als VDJ- bzw. VJ-*Rearrangement* bezeichnet. Sie bilden den Grundbaustein der Antikörpervielfalt.

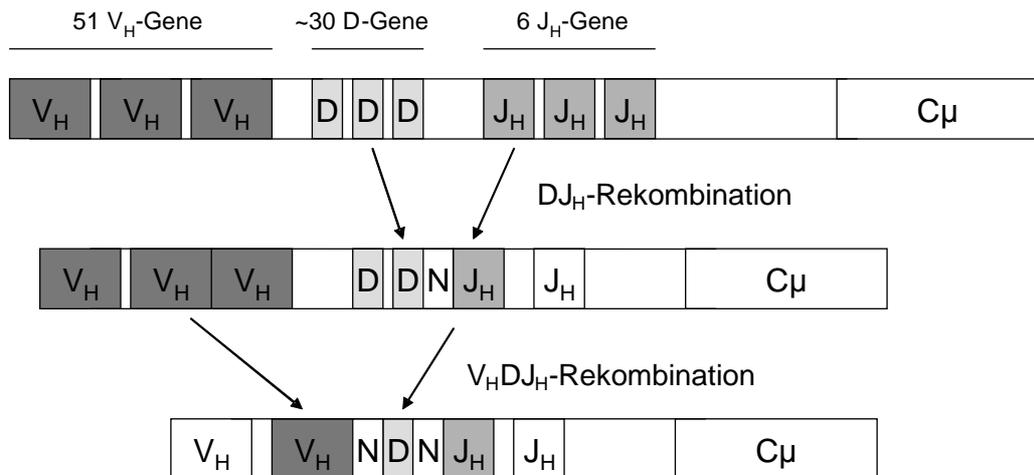


Abbildung 3: Der Mechanismus des VDJ-Rearrangements der schweren Kette eines Immunglobulins. Im ersten Schritt (DJ_H -Rekombination) wird ein D-Segment an ein J_H -Segment gefügt. Im zweiten Schritt (V_HDJ_H -Rekombination) wird ein V_H -Segment an das neu entstandene DJ_H -Segment gefügt. Durch das Enzym TdT werden noch zusätzliche Nukleotide (N) zwischen die Segmente eingebaut.

1.1.4 Der Aufbau der variablen Region der schweren Immunglobulinkette, die Keimzentrumsreaktion

Das beim *rearrangement* entstandene VDJ-Exon wird auf DNS-Ebene noch weiter unterteilt. Zwischen vier *Framework*-Regionen (FRs) sind drei *complementarity determining regions* (CDRs) angeordnet (7,8). Die FRs kodieren für das strukturelle Gerüst der variablen Region, die CDRs für die Antigenbindungsstelle (siehe auch Abb. 4).



Abbildung 4: Aufbau der variablen Region einer schweren Immunglobulinkette auf genomischer Ebene nach VDJ-rearrangement. L: *leader region*, FR: *framework region*, CDR: *cluster of differentiation region*

Mutationsanalysen der variablen Region der schweren Immunglobulinkette können über den Reifungszustand einer B-Zelle Aufschluss geben: Unreife B-Zellen, die noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten, weisen eine unmutierte, der Keimbahnkonfiguration entsprechende VH-Region auf. Liegen die CDRs gehäuft mutiert vor, so handelt es sich um einen Lymphozyten, der noch in Kontakt mit einem Antigen steht oder schon gestanden hat, also eine reife B-Zelle. Der Reifungsprozess spielt sich in den reaktiven Keimzentren ab, die nach Immunisation eines Follikels mit T-Zell-abhängigen Antigenen entstehen. Dabei kommt es zum expansiven Wachstum einer oligoklonalen Population von aktivierten B-Zellen. Einige dieser B-Zellen wandern ins Innere des Keimzentrums, wo sie der somatischen Mutationsmaschinerie ausgesetzt sind. Die Mutationen treten hierbei bevorzugt in den CDRs auf, während die FRs kaum verändert werden (9,10,11). Daraus resultiert eine Affinitätsänderung des BCR. Nur die B-Zellen mit hoher Affinität zu den im Keimzentrum präsentierten Antigenen werden selektioniert und entgehen so dem programmierten Zelltod (12).

1.2 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome umfassen eine klinisch, biologisch und pathohistologisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal die Abstammung von Zellen des lymphatischen Systems ist. Klinisch manifestieren sich maligne Erkrankungen dieser Zellen als Leukämien, Plasmozytome oder als Lymphome. Über 90% der malignen Lymphome sind B-Zell-Lymphome, nur ca. 10% sind den T- oder NK-Zell-Lymphomen zuzurechnen (13,14).

Obwohl die NHL mit einer Inzidenz von ca. 10 Neuerkrankung pro 100.000 im Vergleich zu Karzinomen relativ selten sind, so kam es doch in den westlichen Industrieländern in den letzten drei Dekaden zu einem raschen Anstieg der Inzidenz, deren Gründe noch nicht bekannt sind.

Die zunehmende Inzidenz von Non-Hodgkin-Lymphomen und die Entdeckung verschiedener, bislang unbekannter Lymphomsubtypen, machte eine neue Lymphomklassifikation notwendig. 1994 wurden die bis dahin in Europa (Kiel Klassifikation (15)) und Nordamerika (*working formulation* (16)) gebräuchlichen Klassifikationen durch die von der ILSG (*International Lymphoma Study Group*) ausgearbeiteten REAL Klassifikation abgelöst (13), die auf morphologischen und immunologischen Kriterien basierte. In Kooperation mit der Weltgesundheitsorganisation (*WHO*) wurde 1997 eine neue, sich auf die REAL

Klassifikation stützende Klassifikation durch die ILSG erarbeitet, die 2001 als offizielle WHO-Klassifikation veröffentlicht wurde (13,14) und international angewendet wird. Hier wird zwischen Lymphomen der B- und T-Zell-Reihe unterschieden, sowie eine Einteilung nach dem jeweiligen Differenzierungsstadium der lymphatischen Zelle vorgenommen, der das Lymphom morphologisch entspricht.

1.2.1 Das folliculäre Lymphom

Folliculäre Lymphome (FL) machen etwa 25-40% der Non-Hodgkin-Lymphome aus (13,17). Die Erkrankung ist bei Diagnose meist fortgeschritten (klinisches Stadium III oder IV nach der Ann Arbor Klassifikation). Prognostisch zeigen die folliculären Lymphome meist einen günstigen Verlauf mit nur langsamer Progredienz. Bei den selten diagnostizierten limitierten Stadien (Ann Arbor I und II) werden die Patienten einer kurativen Radiatio zugeführt, bei der in ca. 50% der Fälle mit einer Rezidivfreiheit auch nach 10 Jahren gerechnet werden kann (18,19). In fortgeschrittenen Stadien gilt das folliculäre Lymphom trotz eines in der Regel guten Ansprechens auf Radio- und Chemotherapie als unheilbar.

In histologischer und genetischer Hinsicht zeigt das FL eine ausgeprägte Dynamik und Tumorstabilität: zu verschiedenen Zeitpunkten und an unterschiedlichen Lokalisationen gewonnene Biopsien können eine sehr unterschiedliche Morphologie zeigen. Während an einer Stelle das Bild von kleinen Zellen und rein folliculärem Wachstumsmuster bestimmt sein kann, findet sich eventuell an einer anderen Lokalisation eine folliculäre und diffuse Morphologie oder sogar eine Transformation in ein DLBL.

Die Tumorzelle folliculärer Lymphome gleicht morphologisch der Keimzentrumszelle der Lymphfollikel (13) und hat dieses biologisch und funktionell durchlaufen. Die Tumorzellen weisen eine Hypermutation der variablen Bereiche in der schweren und leichten Kette des Immunglobulins auf. In den mutierten variablen Bereichen zeigt sich eine intraklonale Diversität (20-23), was als Ausdruck einer fortschreitenden somatischen Mutation (*ongoing mutation*) zu deuten ist. Diese Befunde weisen auf einen bereits erfolgten Antigenkontakt hin und belegen die Ähnlichkeit mit dem „normalen“ Pendant des folliculären Lymphomes, der Keimzentrums-B-Zelle.

FL weisen typischerweise die genetische Translokation t(14;18) auf (24,25), bei der das Gen für das bcl-2-Protein (auf Chromosom 18) unter den Einfluss des Promoters für das Immunglobulin-Schwerkettengen (auf Chromosom 14) kommt. Dieses *rearrangement* führt

zu einer unphysiologischen Expression von funktionsfähigem, antiapoptotisch wirkendem bcl-2-Protein (26-32). Für die von dieser Translokation betroffenen Tumorzellen resultiert daraus ein verlängertes Überleben (33-35) mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, weitere genetische Aberrationen zu erwerben. Inwieweit eine Weitermutation der einzelnen Tumorzellen in Abhängigkeit von lokalen Faktoren der neoplastischen Follikel („Mikromilieu“) erfolgt, ist dabei ebenso weitgehend ungeklärt, wie die Frage, ob und gegebenenfalls welche Determinanten auf genetischer Ebene für die Induktion einer Transformation zu einem DLBL bestehen.

2. Ziel und Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war einerseits, den Einfluss verschiedener Keimzentren eines von einem FL befallenen Lymphknotens auf die darin enthaltenen Tumorzellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte in Fällen, in denen es zu einer Progression der Erkrankung gekommen war und in denen daher Biopsien zu mehreren Zeitpunkten vorlagen, geklärt werden, ob die nachgewiesenen Tumorzellen im Verlauf der Erkrankung in ihrem Mutationsmuster konstant blieben, weitere Aberrationen erwarben oder es zu einer Selektion bestimmter Tumorzellen kam.

Dazu wurde eine Mutationsanalyse des B-Zell-Rezeptors (BCR) der neoplastischen Lymphozyten durchgeführt.

Für jeden Tumor wurde mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion Tumorgewebe aus jeweils 10-15 Follikeln entnommen und die darin enthaltene DNA isoliert. Die VH-Region der schweren Kette des BCR-Genes wurde für alle dissezierten Zellen jedes Follikels amplifiziert, kloniert und sequenziert, um so die Klonalität und den Reifungszustand der neoplastischen Lymphozyten auf molekularer Ebene zu bestimmen.

Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Tumorzellen während der Lymphomentstehung eine antigenabhängige Affinitätsreifung innerhalb eines Keimzentrums durchliefen und ob sich dies auf genomischer Ebene in der variablen Region der schweren Immunglobulinkette widerspiegelte. Darüber hinaus sollten die Tumor-Subklone auf genetischer Ebene bezüglich einer intraklonalen Diversität bzw. möglicher genealogischer Zusammenhänge untersucht werden. Berücksichtigung sollte dabei auch das reaktive Begleitinfiltrat nicht neoplastischer Lymphozyten finden.

Die erhaltenen Ergebnisse sollten mit der Morphologie und dem jeweiligen Graden des FL korreliert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

kopf

Die verwendeten Arbeitsgeräte, Hilfsmittel, Puffer, Lösungen, Enzyme, Antikörper, Plasmide, Oligonukleotide und Bakterienstämme sind im Anhang unter Kapitel 8.1 ausführlich dargestellt.

3.1.1 Patienten und immunhistologische Untersuchungsbefunde

Es wurde Tumorgewebe von vier verschiedenen Patienten untersucht. Dabei standen bei zwei Patienten Biopsien aus verschiedenen Zeiträumen zur Verfügung. Von den Patienten 1 und 2 wurde nur einmalig eine Biopsie gewonnen (Pat.1:Tumor I, Pat.2:Tumor II). Bei dem Patienten 3 konnte Tumorgewebe in zeitlicher Progression zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gewonnen werden (Tumor III₁ + III₂). Der Patient 4 wurde zu 3 Zeitpunkten biopsiert (Tumor IV₁ + IV₂ + IV₃). Bei allen Biopsien handelt es sich, mit Ausnahme von Tumor IV₃, um kryoasserviertes Material.

Tab. 1 – Übersicht über die Patienten bzw. Tumore

	Pat.: 1	Pat.: 2	Pat.: 3		Pat.: 4 113		
	Tumor I	Tumor II	Tumor III ₁	Tumor III ₂	Tumor IV ₁	TumorIV ₂	TumorIV ₃
Klinische Daten	♀ 61 Jahre	♂ 72 Jahre	♀ 38 Jahre		♀ 58 Jahre		
Gewebeprobe	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, Paraffin
Morphologie	follikulär	follikulär	follikulär	follikulär	follikulär	diffus	diffus
Grad	1	2-3	2	2	3	3	3
Intervall zu vorangehender Biopsie	-	-	-	34m	-	21m	11m
Bcl-2	+	-	+	+	+	+	+
Ki-67-Index/ Proliferationsindex	20%	60%	30-40%	15-30%	30-40%	50%	40%
CD20	+	+			+	+	+
CD 22			+				
CD10	+	-	+			+	+
CD23		-				+	(+)
CD30					(+)		
CD5			-	(+)		+	-
CD3	+					+	-
CD11						+	
p53-Hyperexpressivität	(+)	(+)			(+)		(+)
IgM						+	
IgD						-	

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe

Für die DNA-Extraktion des kryoasservierten Tumormaterials wurden pro Tumor je zehn 20 µm dicke Schnitte mit je 50 µl DNA-Extraktionspuffer und je 2,5 µl Proteinase bei 55°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteinase durch 10-minütiges Erwärmen auf 95° C inaktiviert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (14000 rpm, 5 min) aus dem Überstand entfernt.

3.2.2 DNA-Isolierung aus in Paraffin eingebettetem Gewebe

Aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden drei bis acht 6 µm dicke Schnitte entparaffinisiert. Dazu wurden zu jedem Schnitt 800 µl Xylol gegeben. Im Anschluss wurde dieses mit 96%-igem Alkohol ausgewaschen. Die Proben wurden bei 50°C im Thermoblock so lange inkubiert, bis sie vollständig getrocknet waren. Nach Zugabe von 100-300 µl des DNA-Extraktionspuffers und 5 µl Proteinase zu jeder Probe wurden diese bei 55°C über Nacht inkubiert. Dann wurde die Proteinase durch 10minütiges Erwärmen auf 95°C inaktiviert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (14000 rpm, 5 min) aus dem Überstand entfernt.

3.2.3 PCR zur Bestimmung geeigneter Tumoren und ihrer optimalen Verdünnungsstufe

Zur Evaluierung der verschiedenen Tumorgewebe für den Versuchsansatz und für die Bestimmung der optimalen DNA-Konzentration wurden Tumor-DNS-Verdünnungen von 1:10, 1:30 und 1:90 hergestellt; anschließend wurde aus allen Verdünnungsstufen eine PCR mit einem Gemisch aus je 6 V_H-familienspezifischen 5'-Primern und einem an das J_H-Segment bindenden 3'-Primer durchgeführt. Dabei wurde sowohl ein Gemisch mit den von *Küppers et al.* (11) als auch ein Gemisch mit den von *Campbell et al.* (36) beschriebenen familienspezifischen 5'-Primern verwendet. Für den Ansatz mit den *Küppers* Primern wurde als 3'-Primer der JHa(24)-Primer gewählt, bei den *Campbell*-Primern wurde der JHa(19)-Primer eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer und ihre

Ansatzstellen sind in den Tabellen 53 und 54 und der Abbildung 30 im Kapitel 8.1.4 aufgeführt.

Ein Ansatz umfasst 25 μl und setzt sich wie folgt zusammen:

5,0	μl	<i>DNA-template</i> in verschiedenen Verdünnungsstufen
2,4	μl	10 x PCR Buffer II von Roche (Mannheim)
4,5	μl	25 mM MgCl_2 von Roche (Mannheim)
3,2	μl	10 mM dNTP (each dNTP 2,5 mM)
2,5	μl	des VH-5'-Primer-Gemisches mit je 2,5 μM Primer
2,5	μl	15 μM JH-3'-Primer
0,15	μl	AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase (5 U/ μl) von Roche (Mannheim)
4,75	μl	H_2O

Die PCR erfolgte in der PCR-Maschine *Mastercycler® gradient* von Eppendorf (Hamburg), pro Ansatz wurden dabei 35 Amplifikationszyklen durchgeführt:

94°	15'	} 35 Zyklen
95°	1'	
61°	1'	
72°	1'50''	
72°	10'	
4°	∞	

3.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese

Die amplifizierten V-Regionen wurden anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt. Dabei betrug die Gel-Konzentration standardmäßig 2,4%. Das Gel wurde mit 0,5 x TBE und Ethidiumbromid gegossen, wobei für je 100 ml TBE 5µl Ethidiumbromid eingesetzt wurden. Es wurde je 4 µl der DNS-Amplifikate und 2-4 µl eines 100bp-Größenstandards auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE. Das Gel lief 30 – 40 Minuten unter einer Spannung von 130 V. Die erhaltenen Banden wurden anschließend über eine Videoauswerteeinheit der Firma MWG (Ebersberg) dokumentiert.

3.2.5 PCR zur Bestimmung der VH-Familie

Bei positivem Ergebnis der Gelelektrophorese wurde jeweils die DNS-Verdünnung ermittelt, bei der die stärkste Bande aufgetreten war. Mit dieser wurde dann weitergearbeitet, um die VH-Familie des jeweiligen Tumors zu bestimmen. Dazu wurden pro Tumor 12 Ansätze gemacht: für jede der 6 Tumorfamilien wurde je ein spezifischer VH-5'-Primer sowohl der *Küppers*- als auch der *Campbell*-Oligonukleotide eingesetzt. Wiederum wurden die *Küppers*-Primer mit den JHa(24)-3'-Primern und die *Campbell*-Primer mit den JHa(19)-Primern kombiniert. Jeder 25 µl-Ansatz beinhaltete:

5,0	µl	<i>DNA-template</i> in optimaler Verdünnungsstufe
2,4	µl	10 x PCR Buffer II von Roche (Mannheim)
4,5	µl	25 mM MgCl ₂ von Roche (Mannheim)
3,2	µl	10 mM dNTP (each dNTP 2,5 mM)
0,7	µl	15 µM VH-5'-Primer
0,7	µl	15 µM JH-3'-Primer
0,15	µl	AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase (5 U/µl) von Roche (Mannheim)
8,35	µl	H ₂ O

Im Anschluss wurde im genannten *Mastercycler® gradient* nach folgendem Schema amplifiziert:

94°	15'	} 35 Zyklen
95°	1'	
X°	1'	
72°	1'50''	
72°	10'	
4°	∞	

Die *Annealing*-Temperatur X° betrug bei den *Campbell*-Primern immer 61°, bei den *Küppers*-Primern nur im Falle der Familien 1,2,5 und 6; Bei Familie 3 und 4 der *Küppers*-Primer wurde mit der *Annealing*-Temperatur X von 65° gearbeitet. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz verwandt, der statt des *template* eine entsprechende Menge an Wasser enthielt. Die Amplifikate wurden dann nach oben beschrieben Schema über Gelelektrophorese aufgetrennt, visualisiert und die Tumorfamilie bestimmt.

3.2.6 Schnitt und Anfärbung der kryoasservierten Biopsien

Zunächst wurden silanisierte Objektträger mit je einem 1 x 2 cm messenden Stück PEN-Folien beklebt. Auf die so vorbereiteten Objektträger wurden die 6-8 µm dicken Gefrierschnitte aufgetragen. Nach 1 h Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Proben zunächst mit dem Primärantikörper Maus-anti-human T-Zell CD3-Antikörper (1:100) für 3 Minuten bei 42°C inkubiert. Dann wurde mit 0,1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurde mit dem *DAKO Chem Mate TM* Detektionskit K5001 weiter gearbeitet. Als Sekundärantikörper dienten biotinylierte Ziege-Anti-Maus Antikörper. Wiederum nach 3-minütiger Inkubation bei 42°C wurde mit 0,1x PBS gewaschen. Nun wurde der Peroxidase-Streptavidin-Komplex an das Biotin durch 3-minütige Inkubation bei 42°C gebunden. Für die folgende Farbreaktion wurde zuerst DAB im Verhältnis 1:50 zu HRP, einer Wasserstoffperoxyd enthaltenden Pufferlösung hinzu pipettiert. Mit dieser als Chromogensubstrat dienenden Lösung wurden die Schnitte dann für 1-3 min bei 42°C inkubiert. Zuletzt wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.7 Mikrodissektion einzelner Follikel und Verdau

Unter visueller Kontrolle mit einem *Olympus® Umkehrmikroskop IX70* wurden pro Fall zehn bis fünfzehn Follikel mittels des *PALM® Robot-Micro Beam* mikrodisseziert. Mittels einer Kanülenspitze wurde je ein ausgeschnittener Follikel in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 25 µl DNA-Extraktionspuffer und 1,25 µl Proteinase K (14 mg/ml) (Roche, Mannheim) überführt. Nach einer Inkubation bei 50°C über Nacht wurden die Proben zehn Minuten lang bei 95°C im Thermoblock zur Inaktivierung der Proteinase erwärmt und anschließend ungelöste Gewebeanteile fünf Minuten lang bei 14000 rpm abzentrifugiert.

3.2.8 VH-familienspezifische PCR der einzelnen Follikel

Zur Amplifikation der rearrangierten Immunglobulingene der Tumorzellen jedes einzelnen Follikels wurde eine zweistufige, *nested* PCR gewählt. In beiden Runden wurde mit je 2 verschiedenen, familienspezifischen VH-5'-Primern gearbeitet: In der ersten Runde mit den *Campbell*-Primern und den selbst kreierten VH-5'-S_{ex} Primern, in der zweiten Runde mit den *Küppers*-Primern und den selbst entworfenen VH-5'-S_{in} Primern. Der 3'-Konsensus-Primer der ersten Runde war der JHa19-Primer, in der zweiten Runde wurde der JHb-Primer verwendet. Die Nukleotidsequenz der VH-5'-S_{ex}- und VH-5'-S_{in}-Primer ist in Tabelle 53 in Kapitel 8.1.4 dargestellt.

In der ersten Runde umfasste der Ansatz 25 µl, bestehend aus:

- 5,0 µl DNA-*template* eines Follikels
- 2,4 µl 10 x PCR Buffer II von Roche (Mannheim)
- 4,5 µl 25 mM MgCl₂ von Roche (Mannheim)
- 3,2 µl 10 mM dNTP (jedes dNTP 2,5 mM)
- 0,7 µl 15 µM familienspezifischer VH-5'-Primer
- 0,7 µl 15 µM JHa19-Primer
- 0,15 µl AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase (5 U/µl) von Roche (Mannheim)
- 8,35 µl H₂O

Anschließend wurden die Proben im *Mastercycler® gradient* nach folgendem Schema amplifiziert:

94°	15'	} 35 Zyklen
95°	1'	
X°	1'	
72°	1'50''	
72°	10'	
4°	∞	

Die *Annealing*-Temperatur X° betrug bei den Campbell-Primern 61°, bei den VH-S_{ex}-Primern 62°. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben wie oben beschrieben auf 2,4% TBE-Gel aufgetragen, über Elektrophorese aufgetrennt und visualisiert.

In der zweiten Runde wurden als *DNA-template* die in der ersten Runde amplifizierten VH-Fragmente verwendet. Mit folgendem 50 µl-Ansatz wurde die PCR ausgeführt:

2,0	µl	DNA- <i>template</i> aus der ersten Runde
4,8	µl	10 x PCR Buffer II von Roche (Mannheim)
9,0	µl	25 mM MgCl ₂ von Roche (Mannheim)
6,4	µl	10 mM dNTP (jedes dNTP 2,5 mM)
1,4	µl	15 µM familienspezifischer VH-5'-Primer
1,4	µl	15 µM JH _b -Primer
0,3	µl	AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase (5 U/µl) von Roche (Mannheim)
24,7	µl	H ₂ O

Es wurde das gleiche PCR-Protokoll verwendet wie in der ersten Runde, die *Annealing*-Temperatur X° betrug allerdings bei den *Küppers*-Primern 65° C (alle Tumoren gehören der Familie 3 oder 4 an), bei den S_{in}-Primern 64° C. Im Anschluss wurden die Proben durch eine Gelelektrophorese visualisiert, um so den Erfolg der PCR zu überprüfen.

Eine Übersicht über die bei den einzelnen Tumoren jeweils verwendeten Primer zeigt Tab. 2.

Tabelle 2 – Übersicht über die bei den einzelnen Tumoren verwendete Primer

	Pat.: 1	Pat.: 2	Pat.: 3		Pat.: 4		
	Tumor I	Tumor II	Tumor III ₁	Tumor III ₂	Tumor IV ₁	Tumor IV ₂	Tumor V ₃
Gewebeprobe	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, nativ	nl, Paraffin
Morphologie	follikulär	follikulär	follikulär	follikulär	follikulär	diffus	diffus
Grad	1	2-3	2	2	3	3	3
Intervall zu vorangegangener Biopsie	-	-	-	34m	-	21m	11m
VH-Familie	3	3	4	4	4	4	4
PCR 1.R 5'Pr.	VH3-C	VH3-C	VH4-S-ex	VH4-S-ex	VH4-S-ex/ <i>VH4-C</i> ¹⁾	VH4-C	VH4-C
PCR 1.R 3'Pr.	JHa-19	JHa-19	JHa-19	JHa-19	JHa-19	JHa-19	JHa-19
PCR 2.R 5'Pr.	VH3-K	VH3-K	VH4-S-in	VH4-S-in	VH4-S-in/ <i>VH4-K</i> ¹⁾	VH4-K	VH4-K
PCR 2.R 3'Pr.	JHb	JHb	JHb	JHb	JHb	JHb	JHb
Follikel	1-6	1-10	1-5	1-6	<i>1,2,3,4,</i> ¹⁾ <i>5,6,7,8</i>	Diffuses Wachstum	Diffuses Wachstum

¹⁾ die kursiv gedruckten Follikel wurden mit VH4-C-Primern in der ersten Runde und mit VH4-K-Primern in der zweiten Runde amplifiziert. nl = *nodulum lymphaticum*/Lymphknoten.

3.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel

Die in der *nested* PCR amplifizierten DNA-Fragmente der einzelnen Follikel wurden auf ein 2,0 % TAE-Gel aufgetragen und nach 10-minütiger Einlaufzeit bei 100 V weitere 2-3 Stunden bei 60 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden dann unter UV-Licht ausgeschnitten und unter Verwendung des *QIAEX® II Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) entsprechend den Vorschriften des Herstellers gereinigt und anschließend zur Klonierung eingesetzt.

3.2.10 Klonierung

Für die Klonierung wurde das *TOPO TA-Cloning® Kit for Sequencing* von Invitrogen (Groningen, Niederlande) verwendet, welches den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] beinhaltet. 4µl PCR-Produkt wurden gemäß den Angaben des Herstellers in den Vektor ligiert und 2µl der Ligationreaktion in *One Shot®TOP10 (chemically competent)* E.coli den Vorschriften des Herstellers entsprechend transformiert. Das Produkt wurde in 2 verschiedenen Konzentrationen auf Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.11 Klon-Picking und Übernachtskultur

Für die Minipräparation der Plasmid-DNA wurde jeweils eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in je 3 ml mit Ampicillin versehenes LB-Medium überimpft. Für jeden Fokkel wurden 9 Klone gepickt. Die Suspensionskulturen wurden über Nacht bei 37°C und 200-250 rpm schüttelnd inkubiert.

3.2.12 Minipräparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Lösungen/Puffer:

GET	50 mM Glucose 10 mM EDTA pH 8,0 25 mM Tris/HCl pH 8,0
LYSE	0,2 M NaOH 1% SDS
KaliumAcetat	3 M Kalium 5 M Acetat pH 4,8

Zur Minipräparation der Plasmid-DNA wurden 2,0 ml aus einer 3 ml-Übernachtskultur entnommen und bei 8 000 rpm 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand

abpipettiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml GET aufgenommen und mit der Pipette resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 μ l Lysispuffer; die erhaltene Lösung wurde mehrmals invertiert und für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden 150 μ l 3 M Kalium-Acetat-Lösung hinzugegeben, die Lösung wieder mehrmals invertiert und nochmals 5 min auf Eis gestellt. Im Anschluss folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14 000 rpm. Der erhaltene Überstand wurde in ein frisches Cap überführt. Durch Zugabe von 1000 μ l 100 % Ethanol und 10 min Zentrifugation bei 14 000 rpm wurde die Plasmid-DNA bei RT gefällt. Zu dem DNA-Pellet wurden anschließend 400 μ l 70 % Ethanol hinzugefügt, dann wurde mehrmals invertiert und bei 14 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde nun bei 65°C 5 min im Thermoblock getrocknet. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA in 35 μ l *low* TE mit 20 μ g/ml RNase gelöst.

3.2.13 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Erfolg einer Klonierung wurde durch einen Restriktionsverdau überprüft. Für einen Verdau von Plasmid-DNA aus einer Minipräparation wurden 4 μ l des 35 μ l-Ansatzes verwendet. Je Restriktionsverdau wurde folgender Standardansatz pipettiert:

4	μ l	Plasmid-DNA
1	μ l	10 x Puffer für EcoR I
2,5	U	EcoR I
ad 10	μ l	H ₂ O

Der Restriktionsverdau erfolgte während 2 h bei 37°C im *Mastercycler*[®] *gradient*. Anschließend wurden die Proben auf ein 2,4 % TBE-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert.

3.2.14 Cycle sequencing von DNA und Auswertung über ABI 373

Für die Sequenzierreaktion der VH-Plasmide nach dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren nach Sanger (37) wurde der *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* von Perkin Elmer (Weiterstadt) verwendet. Standardmäßig wurde folgender Ansatz pipettiert:

2-5	µl	Plasmid-DNA aus der Minipräparation
5	µl	Sequenzier-Master-Mix
0,2	µl	100 µM Primer
ad 20	µl	H ₂ O

Die Amplifizierung erfolgte im *Mastercycler® gradient* von Eppendorf (Hamburg) unter folgendem Programm: (96°C, 15 sec/ X°C, 15 sec/ 60°C, 4 min) x 30; 4° C ∞, wobei X° der *Annealing*-Temperatur des jeweiligen Primers entsprach.

Anschließend wurde der Sequenzieransatz mittels einer Sephadex G50 Säule in einer Filterspitze (20 µl) aufgereinigt und aus dem Eluat die amplifizierte DNS mit 2,5 µl 3 M Natrium-Acetat-Lösung, pH 5,2 und 130 µl reinem Ethanol 10 min auf Eis gefällt. Dann wurde in der Kühlzentrifuge *Biofuge fresco* von Heraeus (Hanau) bei 4° C während 20 min bei 13.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und das Pellet mit 50 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Mit der Tischzentrifuge *Centrifuge 5415C* von Eppendorf (Hamburg) wurde bei 14.000 rpm nochmals für 5 min zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Das Pellet wurde nun im Thermoblock Thermometer *compact* von Eppendorf (Hamburg) bei 65°C 5 min lang getrocknet. Bis zum Laden des denaturierenden Polyacrylamid-Sequenziergels wurde das Pellet bei 4°C aufbewahrt.

3.2.15 Sequenzauswertung

Zur Identifizierung der erhaltenen VH-Segmente wurden diese mittels der Programme

NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und

DNAPlot (http://www.dnaplot.de/input/human_v.html)

mit allen bekannten Keimbahngenen verglichen und dasjenige Segment mit der größten Homologie für die weiteren Auswertungen verwendet. Für die Sequenzanalyse wurden die

Programme *Sequence Navigator* für Macintosh (Applied Biosystems, Weiterstadt), *DNAMAN Version 4.0* (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada) und *BioEdit Version 5.0.9* (by Tom Hall, North Carolina State University, U.S.A) verwendet.

Die Sequenzen aller Tumorzellen wurden miteinander verglichen. Die Mutationen, welche bei allen Zellen auftraten (*common mutations*), wurden einer putativen Vorläuferzelle zugeschrieben, von der aus, so die Hypothese, sich dann die einzelnen Zellen durch weitere Mutationen (*ongoing mutations*) fortentwickelt haben.

Alle Tumorzellen wurden einer Analyse ihrer Mutationen unterworfen. Dabei müssen mögliche Artefakte, die durch einen Taq-Polymerasefehler hervorgerufen wurden, berücksichtigt werden. Bei einer ungefähren Länge der amplifizierten Segmente von 300 bp liegt die Wahrscheinlichkeit einer durch die Taq-Polymerase falsch eingebauten Base in unserem Labor bei 30 PCR-Zyklen bei 0,21% und bei 35 Zyklen bei 0,24%. Da sämtliche Mutationsraten der Tumoren deutlich höher lagen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass durch Fehler beim Amplifizieren mit der verwendeten Taq-Polymerase die Ergebnisse nennenswert verfälscht wurden, gering.

3.2.16 Mutationsanalysen der variablen Region

Ob eine Punktmutation auf Nukleotidebene zu einem Aminosäureaustausch führt (*replacement*) oder nicht (*silent*), wird durch den genetischen Code bestimmt, der durch die Mutation verändert wurde. Gehäufte Austauschmutationen in den antigenbindenden Domänen (CDR) bzw. *Silent*-Mutations in den nicht-antigenbindenden Domänen (FR) deutet auf eine antigenabhängige Reifung und positive Selektion der B-Lymphozyten hin (9, 10, 11). Hierzu dient als Maßstab die R/S-Ratio, d.h. der Quotient aus Anzahl der *replacement* durch *silent mutations*. Dabei muss diese Ratio aber mit der intrinsischen R/S-Ratio des rekombinierten Keimbahngens verglichen werden, die der Wahrscheinlichkeit einer Sequenzänderung durch eine spontane Punktmutation entspricht. Liegt die beobachtete R/S-Ratio im Bereich der CDRs höher als die intrinsische, so gilt dies als Indikator für eine antigen-abhängige positive Selektion. Im Bereich der FRs spricht eine unter der intrinsischen R/S-Ratio liegende R/S-Ratio für eine Konservierung der Immunglobulin-Struktur im Sinne einer negativen Selektion.

Die Bestimmung der R- und S-Mutationen fand anhand der Nukleotidsequenzen statt, wobei eine S-Mutation, die im gleichen Codon wie eine R-Mutation vorkam, nicht gewertet wurde.

Zwei R-Mutationen in einem Codon wurden als nur eine *replacement mutation* gerechnet, da dabei nur eine Aminosäure verändert wurde (38). $p(\text{CDR})$ bzw. $p(\text{FR})$ steht für die Wahrscheinlichkeit, dass die vorliegenden R-Mutationen in den CDRs bzw. FRs nur zufällig so verteilt sind. Je höher also $p(\text{CDR})$ bzw. $p(\text{FR})$, desto weniger wahrscheinlich handelt es sich um eine Antigen-gerichtete Mutation. Zur Berechnung dieser Wahrscheinlichkeiten verwendeten wir das unter <http://www-stat.stanford.edu/immunoglobulin> zu findende JAVA *applet*, welches auf dem von *Lossos et al.* vorgeschlagenem multinominalen Distributionsmodell basiert (39). Um die Möglichkeit zu vermeiden, eine durch einen PCR-Fehler artifiziell hervorgerufene Mutation als B-Zell-eigene Mutation zu interpretieren, wurden nur jene Mutationen in der R-S-Analyse berücksichtigt, welche in mehr als einer Sequenz vorkamen.

Doch nicht nur die Anzahl und die Art (R- vs. S-Mutationen), sondern auch das Verteilungsmuster innerhalb der untersuchten Zellen eines Tumors ist für die Bestimmung des Reifungszustandes einer B-Zelle wichtig. So verrät das Vorhandensein von *ongoing mutations*, dass der Hypermutations-Mechanismus der B-Zelle noch nicht abgeschlossen ist, es sich dabei also um eine Keimzentrums-B-Zelle handelt. Weisen dagegen alle tumorspezifischen VH-Fragmente die gleiche Veränderung auf, so spricht das dafür, dass der Hypermutationsmechanismus schon abgeschlossen ist; es handelt sich dann um postgerminale Zellen (Gedächtniszellen) (11).

Durch das Verfahren der PCR mit für alle Follikel separaten Ansätzen und der Klonierung dieser Fragmente, konnten wir indirekt über die VH-Region einzelner B-Zellen Auskunft geben, ohne dabei die genaue Lokalisation der Zelle innerhalb des Follikels angeben zu können.

3.2.17 Konstruktion der phylogenetischen Stammbäume

Die phylogenetischen Stammbäume konstruierten wir mit Hilfe der *Clustal X*-Software (40). Dabei wurden zum Teil die Sequenzen modifiziert (im Sinne einer Rückmutation bei nur einmalig vorkommenden Austauschmutationen sowie im Sinne der Annahme, dass gleiche Mutationen in unterschiedlichen Zellen unabhängig voneinander stattgefunden haben), um offensichtliche Fehler bei der Baumkonstruktion durch die Software auszugleichen.

4 Ergebnisse

4.1 Patient 1 – Tumor I

Die VH-Region der B-Zell-Rezeptoren des Tumor I gehört der VH3-Familie an.

Von 15 mikrodisssezierten Follikeln wählten wir die sechs Follikel für die Klonierung aus, die in der Gelelektrophorese nach der familienspezifischen PCR die stärksten Banden zeigten: Follikel 1, 2, 3, 4, 5 und 6. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen ein histologisches Präparat des Tumor I mit den jeweils markierten Follikeln vor und nach der Mikrodissektion.

Abbildung 5 – Tumor I , HE-Färbung, 20x Vergrößerung, vor Dissektion

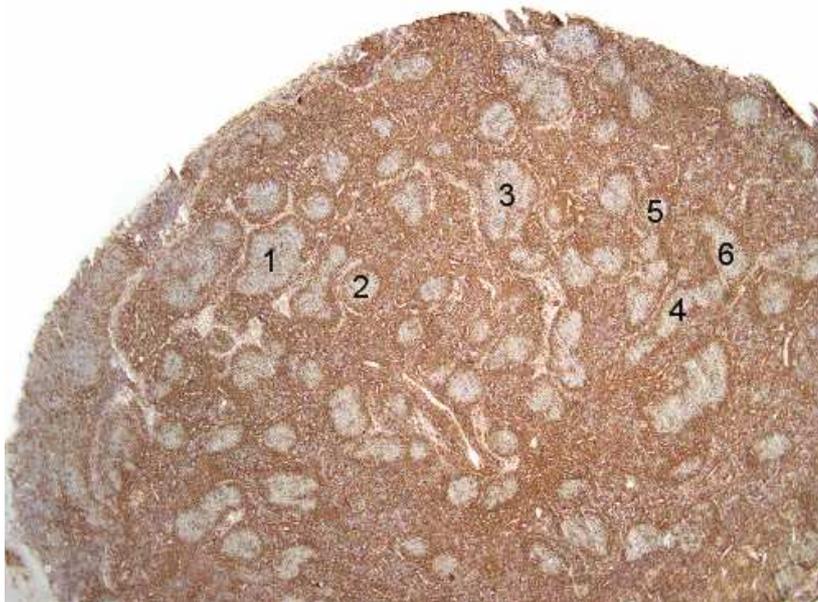


Abbildung 6 - Tumor I, CD3-Färbung, 20x Vergrößerung, nach Mikrodissektion



Pro Follikel überimpften wir 9 Kolonien in eine Kurzzeitkultur („Picken“). Nach Übernachtkultur, Minipräparation der Plasmide und Restriktionsanalyse wurden die VH-Fragmente der positiven Klone mit den Universalprimern M13 *forward* und T3 bidirektional sequenziert. Anhand der Mutationszahl und -verteilung innerhalb der VH-Fragmente konnten diese neoplastischer oder nicht neoplastischer Herkunft zugeordnet werden. Diese Zuordnung zeigt Tabelle 3.

Tab. 3 – Tumor I: Verteilung der Subklone neoplastischen und nicht neoplastischen Ursprungs innerhalb der einzelnen Follikel

Follikel-Nr.	Gesamtanzahl analysierter Subklone	Anzahl der Subklone neoplastischen Ursprungs	Anzahl der Subklone nicht neoplastischen Ursprungs
1	5	5 (4,5,7,8,12)	0
2	3	3 (1,2,4)	0
3	4	3 (1,5,6)	1 (3)
4	7	0	7 (2,3,4,5,7,8,9)
5	8	8 (2-9)	0
6	7	7 (1-5,8,9)	0
Summe	34	26	8

Hinter der Anzahl der pro Follikel gefundenen VH-Segmente neoplastischen bzw. nicht neoplastischen Ursprungs sind in Klammern die jeweiligen Nr. der Subklone angegeben.

Das Keimbahngen der höchsten Homologie zu dem VH-Gen aller Tumorsubklone war VH3-15.1. Die nicht neoplastischen Subklone aus Follikel 3 gehören zu VH3-7.1, aus Follikel 4 zu VH3-30, VH3-74.2 und VH3-11.1. Tab. 4 veranschaulicht die Verteilung der einzelnen VH-Familien innerhalb der Follikel.

Tab. 4 – Tumor I, Prozentuale Aufteilung der Subklone jedes Follikels auf die VH-Familien

	VH3-15.1	VH3-7.1	VH3-11.1	VH3-30	VH3-74.2
Follikel 1	5 (100%)	-	-	-	-
Follikel 2	3 (100%)	-	-	-	-
Follikel 3	3 (75%)	1 (25%)	-	-	-
Follikel 4	-	-	1 (≈14%)	2 (≈29%)	4 (≈57%)
Follikel 5	8 (100%)	-	-	-	-
Follikel 6	7 (100%)	-	-	-	-
	≈76%	≈3%	≈3%	≈6%	≈12%

Hinter der absoluten Anzahl der Subklone einer VH-Familie in einem Follikel steht in Klammern, welchem Prozentsatz diese Anzahl an der Gesamtzahl der analysierten Subklone in diesem Follikel entspricht. In der letzten Zeile der Tabelle findet sich der prozentuale Anteil, den alle Subklone einer VH-Familie jeweils an der Gesamtzahl aller analysierten Rezeptoren bilden.

Die Sequenzen der analysierten VH-Fragmente werden in im Anhang unter Kapitel 8.2.1 gezeigt.

4.1.1 Mutationsanalyse

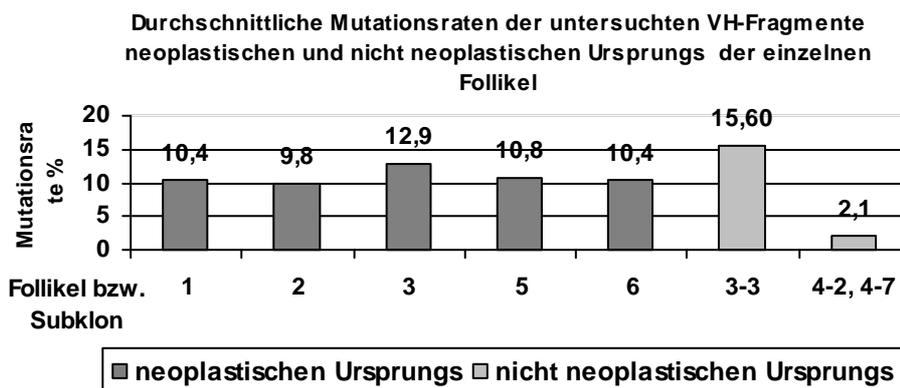
Sämtliche analysierten Tumorsubklone zeigten somatische Punktmutationen im Vergleich zu der Keimbahnsequenz VH3-15.1.

In der Tabelle 5 wird die Mutationsrate innerhalb der einzelnen Follikel angegeben, wobei der Subklon mit der jeweils niedrigsten Mutationsrate dem mit der höchsten gegenübergestellt wird. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz aller Tumorsubklone beträgt 10,7%. In Abb. 7 wird die durchschnittliche Mutationsfrequenz nach den einzelnen Follikeln aufgetrennt dargestellt. Sie liegt in allen Follikeln über 9%. Die Tumorsubklone sind also hypermutiert. Ihnen gegenübergestellt ist die Mutationsfrequenz desjenigen VH-Segmentes des nicht neoplastischen Begleitinfiltrates, welche am höchsten ist.

Tab. 5 – Tumor I, Mutationsraten der VH-Fragmente der Tumorzellpopulation

Follikel	Durchschnittswert aller VH-Fragmente	Höchstwert	Tiefstwert
1	10,4%	11,3%	9,0%
2	9,8%	10,4%	9,0%
3	12,9%	14,9%	10,8%
5	10,8%	11,7%	9,5%
6	10,4%	11,7%	9,0%

Abb. 7 – Mutationsraten Tumor I



Tab. 6 – Tumor I, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
1-4	CDRs	3	1	6	2	3,0	3,0	-	0,017	8,11
	FRs	10	3	6	4	3,3	1,5	+	0,047	
1-5	CDRs	3	1	6	2	3,0	3,0	-	0,035	7,66
	FRs	10	3	5	4	3,3	1,3	+	0,009	
1-7	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,112	9,91
	FRs	13	4	5	10	3,3	0,5	+	0,000	
1-8	CDRs	3	1	6	1	3,0	6,0	+	0,035	7,66
	FRs	10	3	6	4	3,3	1,5	+	0,029	
1-12	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,112	9,91
	FRs	13	4	5	10	3,3	0,5	+	0,000	
2-1	CDRs	13	1	5	3	3,0	1,7	-	0,060	8,11
	FRs	10	3	5	5	3,3	1,0	+	0,003	
2-2	CDRs	3	1	4	2	3,0	2,0	-	0,237	7,66
	FRs	10	3	6	5	3,3	1,2	+	0,029	
2-4	CDRs	3	1	5	1	3,0	5,0	+	0,124	8,11
	FRs	10	3	7	5	3,3	1,4	+	0,049	
3-1	CDRs	4	1	6	2	4,0	3,0	-	0,092	9,46
	FRs	12	4	6	7	3,0	0,9	+	0,003	
3-5	CDRs	4	1	7	2	4,0	3,5	-	0,045	9,46
	FRs	12	4	5	7	3,0	0,7	+	0,002	
3-6	CDRs	4	1	7	2	4,0	3,5	-	0,045	9,46
	FRs	12	4	5	7	3,0	0,7	+	0,002	
5-2	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,075	9,01
	FRs	11	4	7	6	2,8	1,2	+	0,018	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,05) (41);

Tab. 7 – Tumor I, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
5-3	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,060	8,56
	FRs	11	4	7	5	2,8	1,4	+	0,030	
5-4	CDRs	3	1	5	1	3,0	5,0	+	0,124	8,11
	FRs	10	3	6	6	3,3	1,0	+	0,017	
5-5	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,092	9,46
	FRs	12	4	7	7	3,0	1,0	+	0,011	
5-6	CDRs	3	1	5	2	3,0	2,5	-	0,102	7,66
	FRs	10	3	6	4	3,3	1,5	+	0,029	
5-7	CDRs	3	1	5	2	3,0	2,5	-	0,124	8,11
	FRs	10	3	7	4	3,3	1,8	+	0,049	
5-8	CDRs	3	1	5	2	3,0	2,5	-	0,124	8,11
	FRs	10	3	7	4	3,3	1,8	+	0,049	
5-9	CDRs	4	1	6	2	4,0	3,0	-	0,075	9,01
	FRs	11	4	7	5	2,8	1,4	+	0,018	
6-1	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,075	9,01
	FRs	11	4	9	4	2,8	2,3	+	0,112	
6-2	CDRs	3	1	5	2	3,0	2,5	-	0,101	7,66
	FRs	10	3	6	4	3,3	1,5	+	0,029	
6-3	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,092	9,46
	FRs	12	4	8	6	3,0	1,3	+	0,031	
6-4	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,092	9,46
	FRs	12	4	8	6	3,0	1,3	+	0,031	
6-5	CDRs	3	1	5	0	3,0	∞	+	0,102	7,66
	FRs	10	3	7	5	3,3	1,4	+	0,078	
6-8	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,075	9,01
	FRs	11	4	7	6	2,8	1,2	+	0,018	
6-9	CDRs	4	1	6	1	4,0	6,0	+	0,092	9,46
	FRs	12	4	9	5	3,0	1,8	+	0,076	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,05) (41);

In allen der 26 untersuchten Tumorsubklone zeigt sich, dass die beobachtete R/S-Ratio im Bereich der FRs niedriger ist, als der nach Formel von *Chang* und *Casali* (41) berechnete Wert. In der Tabelle wird dies durch eine „+“ in der Spalte „Selektion“ im Bereich der FRs markiert. Dies ist ein Indikator für eine in diesem Tumor herrschende negative Selektion. Mit Ausnahme der Tumorsubklone 6-1, 6-8 und 6-9 liegen die p-Werte für die FRs bei sämtlichen Tumorsubklonen unter 0.05, so dass von einer statistischen Signifikanz ausgegangen werden muss. Im Bereich der CDRs zeigt sich anhand des R/S-Verhältnisses in 14 Tumorsubklonen (entspricht 54%) eine für eine positive Selektion charakteristische Verteilung (die entsprechenden Subklone sind durch ein „+“ in der Spalte „Selektion“ gekennzeichnet). Nach dem multinominalen Ansatz (39) von *Lossos et al.* statistisch signifikant ist der entsprechende p-Wert jedoch nur bei 5 Tumorsubklonen (1-4, 1-5, 1-8, 3-5, 3-6).

4.1.2 Intraklonale Diversität

Im Kapitel 8.2.1 im Anhang sind die Sequenzen aller Tumorsubklone des Tumors I vergleichend untereinander dargestellt. Dabei finden sich allen Subklonen gemeinsame *common mutations*, die follikelübergreifend auftreten. Diese 7 *common mutations* werden hier aufgeführt:

Tab. 8 - Tumor I, *common mutations*

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutations</i> -Nukleotid	Art der Mutation
35	3	FR II	C	T	<i>silent</i>
49	3	FR II	C	T	<i>silent</i>
50	3	FR II	T	C	<i>silent</i>
58	3	CDR II	G	A	<i>silent</i>
82	2	FR III	A	T	<i>replacement</i>
94	2	FR III	C	G	<i>replacement</i>
97	3	FR III	C	T	<i>silent</i>

Tab. 8 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Neben diesen sieben *common mutations* finden sich noch zahlreiche weitere Mutationen, die zufällig auf die einzelnen Subklone verteilt sind. Es handelt sich dabei ausschließlich um Austauschmutationen. Die sieben *common mutations*, die allen Tumorsubklonen gemeinsam

sind, charakterisieren die postulierte Ursprungszelle, aus der sich die einzelnen Tumorsubklone durch *ongoing mutations* weiterentwickelt haben.

Aus den übrigen, von den *common mutations* abweichenden Mutationen ergibt sich eine intraklonale Variation von **3,6 Mutationen/Subklon**. Das heißt, dass jeder Tumorsubklon im Durchschnitt neben den *common mutations* zusätzlich 3,6 Mutationen aufweist, die er nicht mit den anderen Tumorsubklonen teilt. Bei der in unserem Labor bei 35 PCR-Zyklen beobachteten Fehlerrate von 0,24% würde man bei dieser Basenlänge ca. 0,5 durch PCR-Fehler vorgetäuschte Mutationen pro amplifiziertem Fragment erwarten. Dieser Wert liegt deutlich unter der hier beobachteten intraklonalen Variation, so dass von statistischer Signifikanz ausgegangen werden muss.

4.1.3 Genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone

Um Abstammung und genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone aller Follikel des Tumors I graphisch zu visualisieren, konstruierten wir mit Hilfe der Clustal X-Software (40) einen phylogenetischen Stammbaum. Dabei wurden zum Teil die Sequenzen modifiziert (im Sinne einer Rückmutation bei nur einmalig vorkommenden Austauschmutationen; ebenso im Sinne der Annahme, dass gleiche Mutationen in unterschiedlichen Subklonen unabhängig voneinander stattgefunden haben), um offensichtliche Fehler bei der Baumkonstruktion durch die Software auszugleichen.

Die Abb. 8 präsentiert den für den Tumor I konstruierten Stammbaum. Dabei kommt die Ähnlichkeit der Basensequenzen der unterschiedlichen Tumorsubklone untereinander sowie zur angenommenen Vorläuferzelle im räumlichen Abstand graphisch zum Ausdruck: Je ähnlicher die Sequenzen zweier Subklone sind, desto geringer ist in dieser graphischen Darstellung der Abstand voneinander.

Es wird deutlich, dass alle untersuchten Tumorsubklone sich durch eine Anzahl von Mutationen von der zugehörigen Keimbahnsequenz VH3-15.1 unterscheiden. Die putative Vorläuferzelle Z, welche die allen Tumorsubklonen gemeinsamen Sequenzmutationen (*common mutations*) aufweist, ist Ausgangszelle für die Weitermutation der einzelnen Tumorsubklone.

Durch zahlreiche Mutationen besonders weit entfernt von VH3-15.1 und Z haben sich dabei die Subklone des dritten Follikels. Aus dem Subklon 3-1, der sich durch 11 Mutationen von der putativen Vorläuferzelle Z unterscheidet, gehen durch weitere Mutationen die Subklone

3-5 (8 Mutationen) und 3-6 (1 Mutation) hervor. Die deutlichen Sequenzunterschiede gegenüber den anderen Tumorsubklonen zeigt sich graphisch in der Länge dieses Astes.

Weiterhin findet sich ein *Clustering* von Subklonen des fünften Follikels (Ast rechts unten mit den Subklonen 5-4, 5-3, 5-5, 5-8 und 5-9). Die übrigen Tumorsubklone des fünften Follikels finden sich jedoch in der phylogenetischen Abbildung an anderer Stelle wieder: 5-6 und 5-7 liegen auf einem eigenen Zweig (links unten). 5-2 steht separat davon (Ast links), gehört aber zum selben übergeordneten *Cluster* wie 5-6 und 5-7. So zeigt sich eine Sequenz-Verwandtschaft der Subklone 5-6, 5-7 und 5-2, wobei sich in diese verwandtschaftliche Gruppe zahlreiche weitere Subklone anderer Follikel mischen, die entlang der Zweige angeordnet sind, welche aus dem besagten kurzen Ast entspringen. Die Subklone des fünften Follikels lassen sich also in zwei Gruppen genetischer Verwandtschaft einreihen.

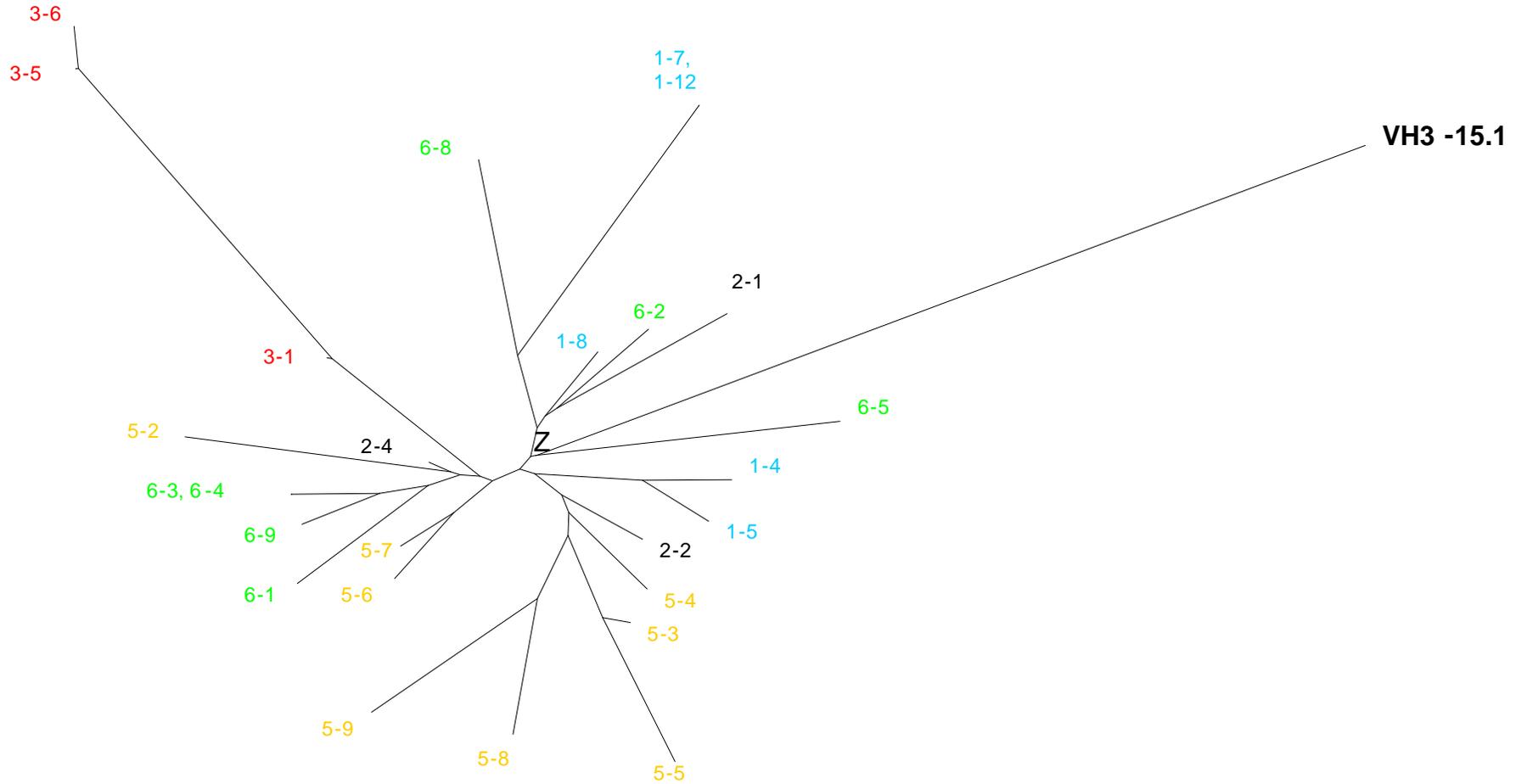
Ein *Splitting* in Gruppen sieht man auch bei den Subklonen des sechsten Follikels. Hier zeigen die Subklone 6-1, 6-9, 6-3 und 6-4 eine deutliche Sequenzverwandtschaft (Ast links). Die restlichen Tumorsubklone dieses Follikels weisen jedoch deutliche Unterschiede sowohl gegenüber den eben erwähnten vier Subklonen, als auch untereinander auf.

Besonders auffällig sind die Tumorsubklone 1-12 und 1-7, da sie sich deutlich von den anderen Subklonen ihres Follikels unterscheiden. Diese beiden Tumorsubklone sind sequenzidentisch und weisen 8 Mutationen auf, die die anderen Subklone nicht haben. Am nächsten verwandt mit ihnen ist der Tumorsubklon 6-8, der 3 der oben erwähnten acht Mutationen aufzeigt.

Die übrigen Tumorsubklone unterscheiden sich von der putativen Vorläuferzelle Z aller Subklone nur durch wenige Mutationen, so dass genetische Aussagen über die Sequenz-Verwandtschaft nur mit Vorsicht gestellt werden sollten.

Resümierend lässt sich bei Tumor I feststellen, dass es einzelne Gruppen von Tumorsubklonen gibt, die auf gewisse Follikel beschränkt sind. Im dritten Follikel ist dies am deutlichsten. Aber auch das *Clustering* eines Teiles der oben erwähnten Subklone des fünften und sechsten Follikels macht dies deutlich. Doch herrscht in diesen Follikeln nicht nur ein follikelspezifisches Mutationsmuster vor, sondern es finden sich auch Subklone, die mit Tumorsubklonen anderer Follikel Sequenzmutationen teilen.

Abb.8: Tumor I, genealogische Verwandtschaft der Tumorzellpopulation



0.01

4.1.4 Andere Keimbahnfamilien

Da nicht mit tumorspezifischen Primern gearbeitet wurde, war es zu erwarten, dass auch Subklone sequenziert werden würden, die nicht zur Tumorzellpopulation zählen. So fanden sich bei Tumor I, wie schon oben erwähnt, in den Follikeln 3 und 4 Subklone, die nicht der VH3-15.1-Familie der Tumorzellpopulation angehören. Unter 8.2.1 im Anhang und in Tab. 9 sind diese Subklone aufgelistet.

Tab. 9 – Tumor I, andere VH-Familien, Mutationsfrequenz

VH-Familie	Subklon	Mutationsanzahl	Mutationsfrequenz
VH3-7.1	3-3	34/218	15,6%
VH3-30	4-2 und 4-5	0/243	0%
VH3-74.2	4-3, 4-8 und 4-9	2/243	0,8%
	4-7	5/243	2,1%
VH3-11.1	4-4	5/243	2,1%

In Follikel 3 ist der Subklon 3-3 der Keimbahnsequenz VH3-7.1 zuzuordnen. Dieser Subklon weist 34 Mutationen auf. Angesichts der hohen Mutationsrate wurde eine tabellarische Mutationsanalyse durchgeführt. Dabei ergeben sich folgende p(FR) und p(CDR)-Werte:

Tab. 10 - Tumor I, Subklon 3-3, Mutationsanalyse

Subklon	VH-Keimbahngen	Region	Beobachtete R	Beobachtete S	R/S-Ratio	P	Mutationsrate
3-3	3-7.1	CDR	5	1	5,0	0,407	15,6%
		FR	13	9	1,4	0,071	

Da nur ein Subklon dieser Familie vorliegt, können Polymerasefehler nicht ausgeschlossen werden. Der hohe p-Wert im Bereich der CDRs spricht gegen das Wirken einer positiven Selektion. Im Bereich der FRs ist bei einem niedrigen p-Wert eine negative Selektion nicht unwahrscheinlich. Im 4. Follikel finden sich unter den 7 untersuchten Subklonen nur andere Keimbahnfamilien als die der Tumorzellpopulation vertreten. 2 Subklone (4-2 und 4-5) sind identisch mit der Keimbahnsequenz VH3-30. 4 Subklone (4-3, 4-7, 4-8 und 4-9) zeigen große Homologien zu VH3-74.2. Schließlich findet sich im Follikel vier noch ein Subklon (4-4), der der Keimbahnsequenz VH3-11.1 zuzurechnen ist, von der er sich durch 5 Mutationen unterscheidet. Abschließend lässt sich feststellen, dass von den nicht neoplastischen Subklonen nur der Subklon 3-3 mit einer Mutationsfrequenz von 15,6% höher mutiert ist, als die neoplastischen Subklone (siehe auch Abb. 6). Die übrigen Subklone waren entweder unmutiert (Subklone 4-2 und 4-5) oder lagen mit ihrer Mutationsfrequenz deutlich unter der Mutationsrate der Tumorsubklone (Subklone 4-3, 4-4, 4-7, 4-8 und 4-9).

4.2 Patient 2 – Tumor II

Die B-Zell-Rezeptoren der Tumorsubklone des Tumors II weisen eine VH-Region auf, die der dritten Familie zuzuordnen ist. 10 Follikel wurden untersucht, deren Lokalisation im Tumor die Photos in Abb. 9 und 10 demonstrieren.

Abb. 9 – Tumor II, CD3-Färbung, 20x Vergrößerung, vor Dissektion

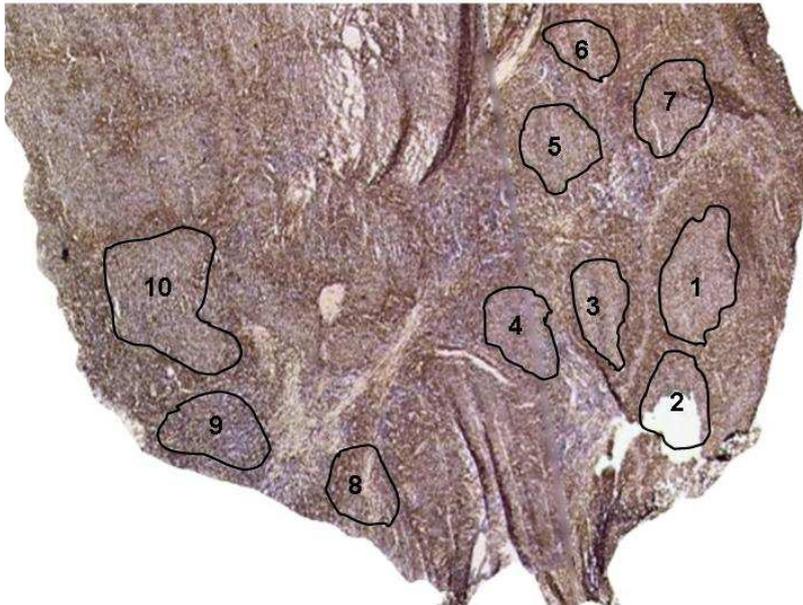
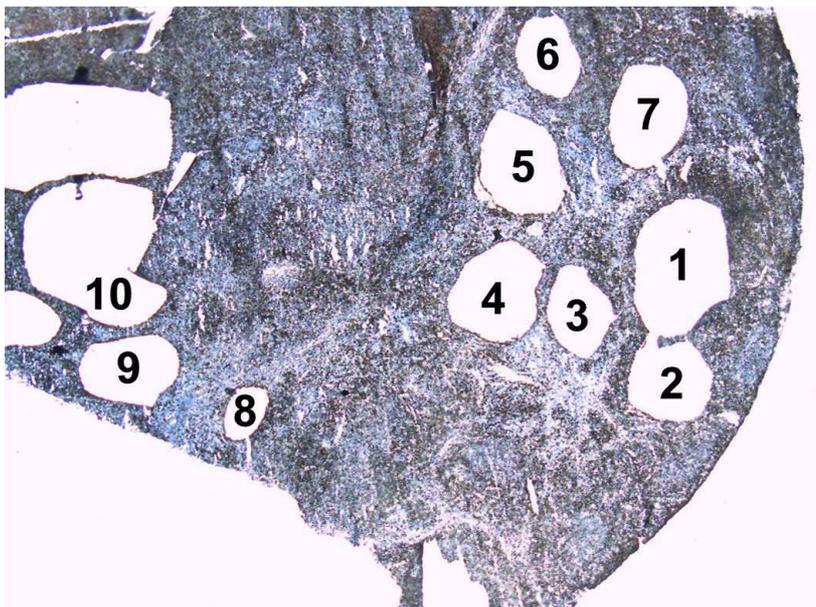


Abb. 10 - Tumor II, CD3-Färbung, 20x-Vergrößerung, nach Mikrodissektion



Tab. 11 zeigt eine Übersicht:

Tab. 11 – Tumor II, Verteilung der Subklone neoplastischen und nicht neoplastischen Ursprungs innerhalb der einzelnen Follikel

Follikel-Nr.	Gesamtanzahl der analysierten Subklone	Anzahl der Subklone neoplastischen Ursprungs	Anzahl der Subklone nicht neoplastischen Ursprungs
1	9	8 (1,2,3,4,5,6,7,8)	1 (9)
2	9	2 (5,6)	7 (1,2,3,4,7,8,9)
3	5	4 (6,7,8,9)	1 (4)
4	9	1 (4)	8 (1,2,3,5,6,7,8,9)
5	6	6 (1,2,3,6,8,9)	0
6	5	5 (4,5,6,7,9)	0
7	4	4 (2,4,7,8)	0
8	7	1 (1)	6 (2,3,5,7,8,9)
9	9	0	9 (1,2,3,4,5,6,7,8,9)
10	6	6 (2,3,4,5,6,7)	0
Summe	69	37	32

Hinter der Anzahl der pro Follikel gefundenen VH-Segmente neoplastischen bzw. nicht neoplastischen Ursprungs sind in Klammern die jeweiligen Nr. der Subklone angegeben.

Das Keimbahngen der höchsten Homologie zu dem VH-Gen aller Tumorsubklone war VH3-23.1. Die Nicht-Tumorsubklone konnten verschiedenen Keimbahngen zugeordnet werden: In Follikel 1 VH3-49.1, in Follikel 2 VH3-30 und VH3-74.2, in Follikel 3 VH3-49.1, in Follikel 4 VH3-72.1 und VH3-7.1, in Follikel 8 VH3-30 und VH3-74.2, in Follikel 9 VH3-11.1 und VH3-30.1. Tab.12 veranschaulicht die Aufteilung der VH-Familien auf die einzelnen Follikel.

Tab. 12 – Tumor II, Prozentuale Aufteilung der Subklone jedes Follikels auf die VH-Familien

	VH3-23.1	VH3-7.1	VH3-11.1	VH3-30	VH3-30.1	VH3-49.1	VH3-72.1	VH3-74.1
Follikel 1	8(≈89%)	-	-	-	-	1(≈11%)	-	-
Follikel 2	2(≈22%)	-	-	4(≈44%)	-	-	-	3(≈33%)
Follikel 3	4 (80%)	-	-	-	-	1 (20%)	-	-
Follikel 4	1(≈11%)	3(≈33%)	-	-	-	-	5(≈56%)	-
Follikel 5	6 (100%)	-	-	-	-	-	-	-
Follikel 6	5 (100%)	-	-	-	-	-	-	-
Follikel 7	4 (100%)	-	-	-	-	-	-	-
Follikel 8	1(≈14%)	-	-	2(≈29%)	-	-	-	4(≈57%)
Follikel 9	-	-	6(≈67%)	-	3(≈33%)	-	-	-
Follikel10	6 (100%)	-	-	-	-	-	-	-
	≈54%	≈4%	≈9%	≈9%	≈4%	≈3%	≈7%	≈10%

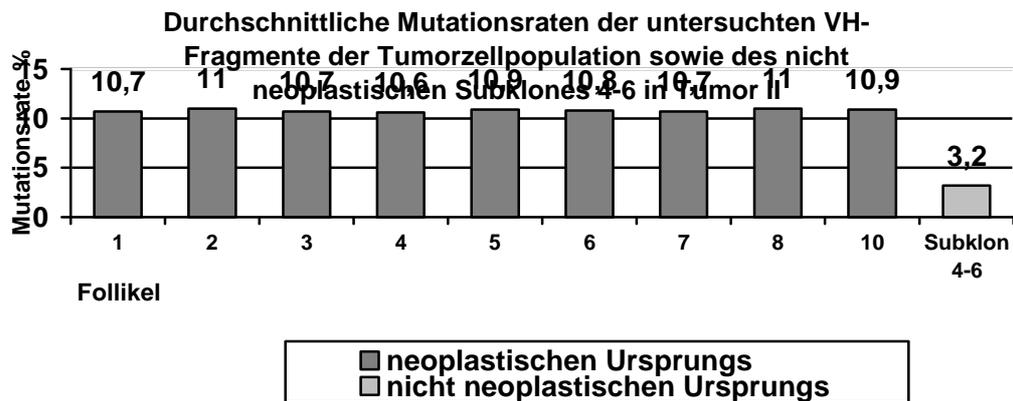
Hinter der absoluten Anzahl der Subklone einer VH-Familie in einem Follikel steht in Klammern, welchem Prozentsatz diese Anzahl an der Gesamtzahl der analysierten Subklone in diesem Follikel bildet. In der letzten Zeile der Tabelle findet sich der prozentuale Anteil, den alle Subklone einer VH-Familie jeweils an der Gesamtzahl aller analysierten Rezeptoren bilden.

Im Anhang sind unter 8.2.2 die Sequenzen aller Tumorsubklone aufgelistet. Dabei ist festzuhalten, dass im vierten und achten Follikel jeweils nur ein Subklon der Tumorzellpopulation angehört.

4.2.1 Mutationsanalyse

Alle Tumorsubklone enthalten somatische Punktmutationen im Vergleich zu der Keimbahnsequenz VH3-23.1. In Abb. 11 ist die durchschnittliche Mutationsrate der Tumorsubklone jeweils nach Follikeln aufgetrennt dargestellt. Dabei gibt es im Follikel vier und acht jeweils nur ein Tumorsubklon. Die durchschnittliche Mutationsrate liegt in allen Follikeln über 10%. Der Tumor ist also hypermutiert.

Abb. 11 – Mutationsraten Tumor II



Tab. 13 zeigt die unterschiedliche Mutationsbreite innerhalb der einzelnen Follikel.

Tab. 13 – Tumor II, Mutationsraten der VH-Fragmente der Tumorzellpopulation

Follikel	Durchschnittswert aller VH-Fragmente	Höchstwert	Tiefstwert
1	10,7%	1-1 11,9%	1-2, 1-3 10,1%
2	11,0%	2-6 11,5%	2-5 10,6%
3	10,7%	3-9 11,5%	3-6, 3-7 10,1%
4	10,6%	4-4 10,6%	4-4 10,6%
5	10,9%	5-1 11,5%	5-9 10,1%
6	10,8%	6-4 11,5%	6-5,6-6,6-7 10,6%
7	10,7%	7-8 11,0%	7-2,7-4,7-7 10,6%
8	11,0%	8-1 11,0%	8-1 11,0%
10	10,9%	10-6 11,5%	10-5 10,1%

Tab. 14 bis 16 fassen die Mutationsanalyse der Tumorsubklone zusammen. Auch hier wurden, um Polymerase-Fehler zu vermeiden, nur Mutationen berücksichtigt, die in mindestens zwei Subklonen auftreten. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass erst ab dem 25. Basentriplett Mutationen berücksichtigt wurden. Die Mutation, welche bei allen Subklonen im 24. Triplett auftaucht, konnte nicht für die R/S-Mutations-Analyse verwertet werden, da die erste Position dieses Triplets durch den Primer schon vorgegeben war. Bei der Berechnung der Mutationsrate wurden die Mutation im 24. Triplett allerdings berücksichtigt.

Ergebnisse

Tab. 14: Tumor II, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
1-1	CDRs	3	1	3	4	3,0	0,8	-	0,583	9,63
	FRs	12	4	9	4	3,0	2,3	+	0,104	
1-2	CDRs	3	1	1	5	3,0	0,2	-	0,920	8,72
	FRs	11	4	9	4	2,8	2,3	+	0,153	
1-3	CDRs	3	1	1	4	3,0	0,3	-	0,906	8,72
	FRs	11	3	9	4	3,7	2,3	+	0,218	
1-4	CDRs	3	1	1	5	3,0	0,2	-	0,920	9,17
	FRs	11	4	9	4	2,8	2,3	+	0,153	
1-5	CDRs	3	1	1	4	3,0	0,3	-	0,920	9,17
	FRs	11	4	10	4	2,8	2,5	+	0,282	
1-6	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
1-7	CDRs	3	1	1	4	3,0	0,3	-	0,920	9,17
	FRs	11	4	10	4	2,8	2,5	+	0,282	
1-8	CDRs	3	1	1	4	3,0	0,3	-	0,920	9,17
	FRs	11	4	10	4	2,8	2,5	+	0,282	
2-5	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
2-6	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,765	9,17
	FRs	11	4	9	4	2,8	2,3	+	0,153	
3-6	CDRs	3	1	1	4	3,0	0,3	-	0,906	8,72
	FRs	11	3	9	4	3,7	2,3	+	0,218	
3-7	CDRs	3	1	1	4	3,0	0,3	-	0,920	9,17
	FRs	11	4	10	4	2,8	2,5	+	0,282	

R: *Replacement-/Austauschmutation*; S: *Silent-/stille Mutation*; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,1) (41);

Ergebnisse

Tab. 15: Tumor II, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone

Tumorsubklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
3-8	CDRs	4	1	2	5	4,0	0,4	-	0,816	10,09
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,145	
3-9	CDRs	4	1	2	5	4,0	0,4	-	0,816	10,09
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,145	
4-4	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	11	3	3,0	3,7	-	0,350	
5-1	CDRs	4	1	2	4	4,0	0,5	-	0,816	10,09
	FRs	12	4	11	4	3,0	2,8	+	0,264	
5-2	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,765	9,17
	FRs	11	4	10	3	2,8	3,3	-	0,282	
5-3	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
5-6	CDRs	3	1	3	4	3,0	0,8	-	0,583	9,63
	FRs	12	4	9	4	3,0	2,3	+	0,104	
5-8	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,765	9,17
	FRs	11	4	9	4	2,8	2,3	+	0,153	
5-9	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,765	9,17
	FRs	11	4	9	4	2,8	2,3	+	0,153	
6-4	CDRs	4	1	2	4	4,0	0,5	-	0,816	10,09
	FRs	12	4	11	4	3,0	2,8	+	0,264	
6-5	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
6-6	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment.

Ergebnisse

Tab. 16: Tumor II, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
6-7	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,765	9,17
	FRs	11	4	9	4	2,8	2,3	+	0,153	
6-9	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
7-2	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
7-4	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
7-7	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
7-8	CDRs	4	1	2	5	4,0	0,4	-	0,816	10,09
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,145	
8-1	CDRs	4	1	2	4	4,0	0,5	-	0,816	9,63
	FRs	12	4	11	4	3,0	2,8	+	0,264	
10-2	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,17
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
10-3	CDRs	4	1	2	4	4,0	0,5	-	0,816	10,09
	FRs	12	4	11	4	3,0	2,8	+	0,264	
10-4	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
10-5	CDRs	3	1	1	4	3,0	0,3	-	0,920	9,17
	FRs	11	4	10	4	2,8	2,5	+	0,282	
10-6	CDRs	3	1	1	5	3,0	0,2	-	0,931	9,17
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	
10-7	CDRs	3	1	2	4	3,0	0,5	-	0,792	9,63
	FRs	12	4	10	4	3,0	2,5	+	0,205	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment.

Es zeigt sich, dass keiner der 37 untersuchten Tumorsubklone anhand des Vergleiches zwischen erwarteter und beobachteter R/S-Ratio im Bereich der CDRs das Bild einer positiven Selektion bietet. Auch die hohen p-Werte für diese Region zeugen von einer zufälligen Verteilung der Mutationen. Im Bereich der FRs hingegen finden sich beim Vergleich der R/S-Ratios bei 35 der 37 Subklone eine niedrigere Ratio als man sie bei einem zufälligen Verteilungsvorgang erwarten würde. Dabei ist der Unterschied zwischen den jeweiligen Ratios nur gering. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass dieser Zustand durch eine niedrigere als erwartete Anzahl von R-Mutationen und nicht durch eine höhere als erwartete Anzahl von S-Mutationen bedingt ist. Nur bei den Tumorsubklonen 1-3 und 3-6 finden wir eine S-Mutation mehr als man rein theoretisch erwarten würde. Die p-Werte für die FRs liegen jedoch allesamt jenseits der Grenze statistischer Signifikanz.

4.2.2 Intraklonale Diversität

Beim Vergleich aller Tumorsubklone fällt auf, dass es zahlreiche *common mutations* gibt. Tab. 17 gibt eine Übersicht:

Tab. 17 – Tumor II, *common mutations*

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation</i> -Nukleotid	Art der Mutation
27	3	CDR I	C	T	<i>silent</i>
28	3	CDR I	C	T	<i>silent</i>
30	3	CDR I	C	T	<i>silent</i>
31	3	CDR I	C	A	<i>replacement</i>
35	3	FR II	C	T	<i>silent</i>
50	1,2,3	FR II	GCT	AGG	<i>replacement</i>
55	3	CDR II	T	C	<i>silent</i>
67	2	FR III	G	A	<i>replacement</i>
70	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
76	3	FR III	G	C	<i>replacement</i>
79	1	FR III	C	G	<i>replacement</i>
85	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
88	2	FR III	C	A	<i>replacement</i>
89	3	FR III	G	T	<i>replacement</i>
95	2	FR III	A	T	<i>replacement</i>

Tab. 17 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Es finden sich insgesamt 17 solcher *common mutations*. Aus den übrigen, von den *common mutations* abweichenden Mutationen ergibt sich eine durchschnittliche Häufigkeit von zusätzlich einer Mutation pro Tumorsubklon (intraklonale Variation = **1,0**/Subklon). Der Wert ist statistisch signifikant (die durch PCR-Fehler Anzahl vorgetäuschter Mutationen läge bei ca. 0,5 Mutationen/Subklon) und gilt als Hinweis auf den Prozess der *ongoing mutations*.

4.2.3 Genetische Verwandtschaft

Für die 37 Tumorsubklone im Tumor II wurde ebenfalls ein phylogenetischer Stammbaum konstruiert (Abb. 12, vergrößerter Ausschnitt in Abb. 13).

Die Subklone des Tumors II zeigen ein wesentlich homologeres Mutationsbild als die Subklone des Tumors I. Dabei zeigt die putative Vorläuferzelle Z, aus der sich die einzelnen Tumorsubklone entwickelt haben, mit 17 Mutationen eine deutliche Distanz zur ursprünglichen Keimbahnzelle VH3-23.1. Im Vergleich zu Tumor I weisen die Tumorsubklone im Tumor II eine deutlich größere Sequenzähnlichkeit untereinander auf, was an der engeren Nähe zueinander graphisch zum Ausdruck kommt. Es zeigt sich eine klonale Evolution im Follikel 1 mit Zunahme der Anzahl von Mutationen gegenüber der putativen Vorläuferzelle Z: 1-3 (5 Mutationen), 1-4 (6 Mutationen), 1-2 (6 Mutationen) sowie 10-6 (10 Mutationen), die von ihrem genetischen Profil zu diesem *Zell-Cluster* gehört, jedoch im Follikel 10 gefunden wurde. Die übrigen Subklone aus Follikel 1 finden sich in größerer Nähe zur Vorläuferzelle Z. Der Sequenzvergleich der Subklone aus den übrigen Follikeln zeigt eine diffuse Verteilung der Subklone über die Follikel, so dass eine Übereinstimmung der genetischen Verwandtschaft mit der Lokalisation in den einzelnen Follikeln (mit Ausnahme von Follikel 1) nicht nachweisbar ist.

Abb. 12: Tumor II, phylogenetischer Stammbaum

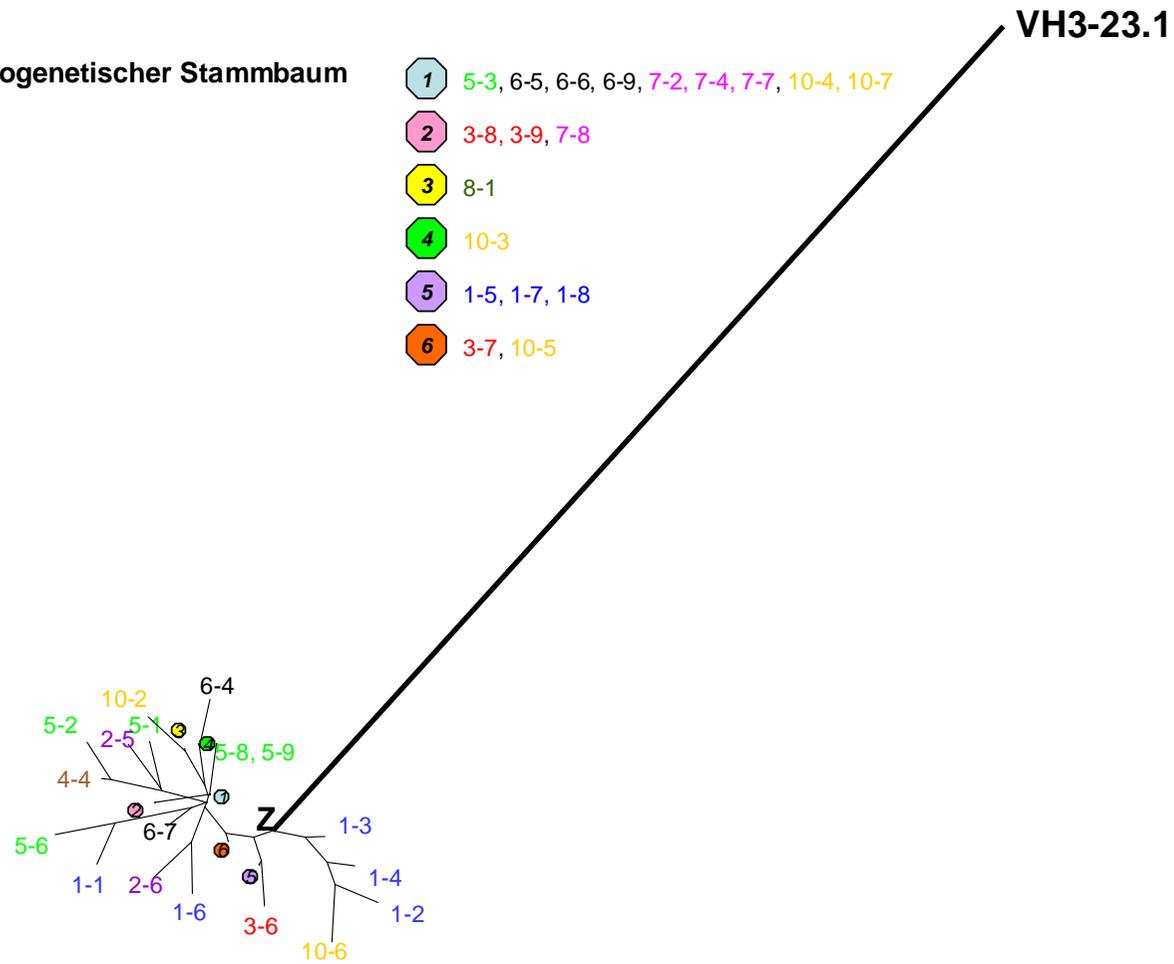
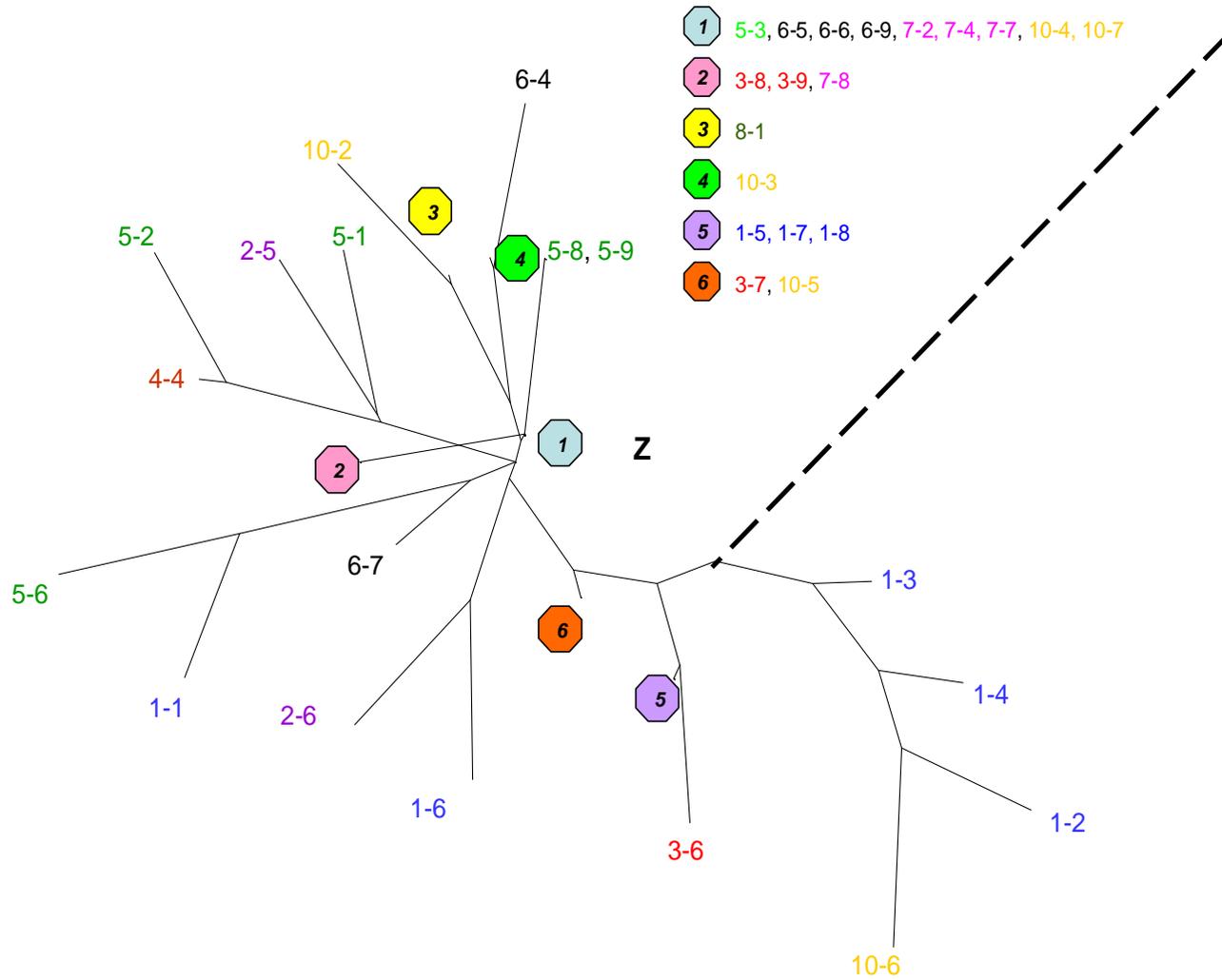


Abb. 13: Vergrößerter Ausschnitt des phylogenetischen Stammbaumes Tumor II

VH3-23.1



4.2.4 Andere Keimbahnfamilien

In 8.2.2 im Anhang sind die Sequenzen der Subklone des Tumors II dargestellt, die anderen Keimbahnfamilien als VH3-23.1 angehören. Tab. 18 gibt die Lokalisation und Zugehörigkeit zur jeweiligen VH-Familie sowie die Mutationsrate an.

Tab. 18 – Tumor II, andere VH-Familien, Mutationsfrequenz

VH-Familie	Subklon	Mutationsanzahl	Mutationsfrequenz
VH3-7.1	4-5	2/218	0,9%
	4-6	7/218	3,2%
	4-7	2/218	0,9%
VH3-11.1	9-1	1/218	0,5%
	9-2	0/218	0%
	9-3	1/218	0,5%
	9-5	1/218	0,5%
	9-6	1/218	0,5%
	9-7	0/218	0%
VH3-30	2-1	0/218	0%
	2-2	1/218	0,5%
	2-4	1/218	0,5%
	2-9	0/218	0%
	8-2	1/218	0,5%
	8-5	0/218	0%
VH3-30.1	9-4	1/218	0,5%
	9-8	0/218	0%
	9-9	0/218	0%
VH3-49.1	1-9	3/224	1,3%
	3-4	3/224	1,3%
VH3-72.1	4-1	0/224	0%
	4-2	0/224	0%
	4-3	0/224	0%
	4-8	0/224	0%
	4-9	2/224	0,9%
VH3-74.2	2-3	0/218	0%
	2-7	1/218	0,5%
	2-8	3/218	1,4%
	8-3	1/218	0,5%
	8-7	4/218	1,8%
	8-8	1/218	0,5%
	8-9	1/218	0,5%

Im vierten und neunten Follikel sind dabei VH-Familien vertreten, die sich sonst in keinem anderen Follikel finden. So sind es im Follikel 4 die VH3-7.1- und VH3-72.1-Familie, im Follikel 9 die VH3-11.1- und VH3-30-Familie. Der zweite und achte Follikel weisen beide Subklone auf, die der VH3-30- und VH3-74.2-Familie angehören. Die VH3-49.1-Familie ist jeweils mit einem Subklon in den Follikeln 1 und 3 vertreten.

Die nicht neoplastischen Subklone weisen alle Mutationsfrequenzen auf, welche niedriger als die der Tumorsubklone sind. Davon liegen 12 Subklone in ihrer Keimbahnkonfiguration vor, weitere 12 weisen jeweils nur eine Mutation auf. Jeweils drei Subklone weisen zwei bzw. drei Mutationen auf. Ein Subklon (8-7) hat vier Mutationen. Der Subklon 4-6 ist mit 7 Mutationen (3,2% entsprechend) am höchsten von den nicht neoplastischen Subklonen mutiert. Diese Mutationsfrequenz wurde exemplarisch in Abbildung 11 den Mutationsfrequenzen der Tumorsubklone gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass die Mutationsfrequenz des Subklons 4-6 weit unter der Frequenz der Tumorsubklone liegt.

4.3 Patient 3

4.3.1 Tumor III 1

Die Tumorzellpopulation des Tumors III 1 exprimiert einen B-Zell-Rezeptor, welcher der vierten VH-Familie zuzurechnen ist. Es wurden 5 Follikel untersucht (Follikel 1, 2, 3, 4, 5). Folgende Photos vor und nach der Mikrodisektion zeigen die Lokalisation der untersuchten Follikel.

Abb. 14: Tumor III 1, CD3-Färbung, 20-fach-Vergrößerung vor Dissektion

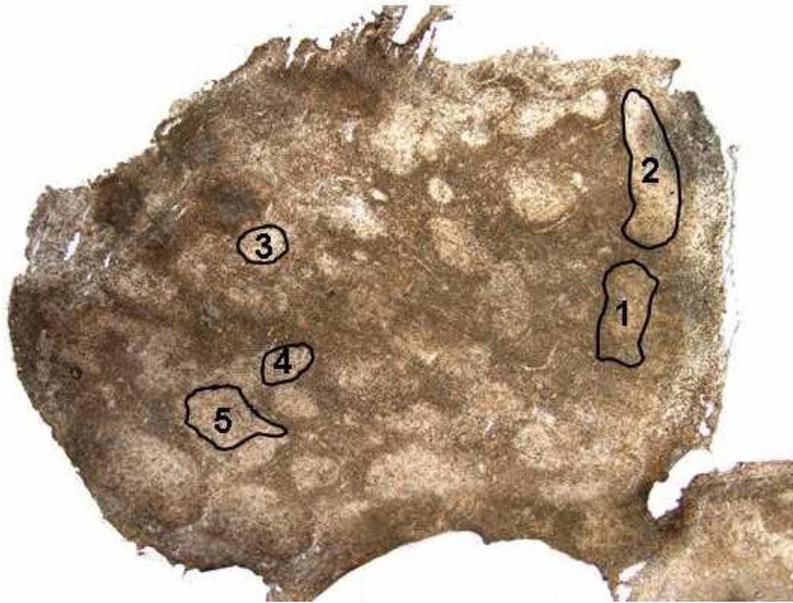


Abb. 15: Tumor III 1, CD3-Färbung, 20-fach-Vergrößerung, nach Mikrodisektion



Die analysierten Subklone werden in Tab. 19 dargestellt.

Tab. 19: Tumor III 1, Verteilung der Subklone neoplastischen und nicht neoplastischen Ursprungs innerhalb der einzelnen Follikel

Follikel-Nr.	Gesamtanzahl analysierter Subklone	Anzahl der Subklone neoplastischen Ursprungs	Anzahl der Subklone nicht neoplastischen Ursprungs
1	1	0	1 (8)
2	6	0	6 (2,3,6,7,8,9)
3	6	0	6 (1,2,3,4,6,8)
4	5	3 (1,3,7)	2 (4,5)
5	1	0	1 (1)
Summe	19	3 (16%)	16 (84%)

Hinter der Anzahl der pro Follikel gefundenen VH-Segmente neoplastischen bzw. nicht neoplastischen Ursprungs sind in Klammern die jeweiligen Nr. der Subklone angegeben.

Nur Follikel 4 enthält Subklone, die der Tumorzellpopulation zuzurechnen sind. Die Tumorsubklone entstammen der Familie VH4-34.1. Die übrigen Subklone sind kaum mutiert und somit als nicht neoplastisch anzusehen. Sie sind folgenden VH-Keimbahngenen zuzurechnen: VH4-b.1, VH4-34.1, VH4-61.1, VH4-4.1. Tab. 20 stellt die in jedem Follikel vertretenen Keimbahnfamilien und die jeweilige Häufigkeit pro Follikel dar.

Tab. 20 – Tumor III 1, Prozentuale Aufteilung der Subklone jedes Follikels auf die VH-Familien

	VH4-34.1	VH4-b.1	VH4-4.1	VH4-61.1
Follikel 1	-	1 (100%)	-	-
Follikel 2	4 (≈67%)	1 (≈17%)	-	1 (≈17%)
Follikel 3	-	-	6 (100%)	-
Follikel 4	4 (80%)	1 (20%)	-	-
Follikel 5	1 (100%)	-	-	-
	≈47%	≈16%	≈32%	≈5%

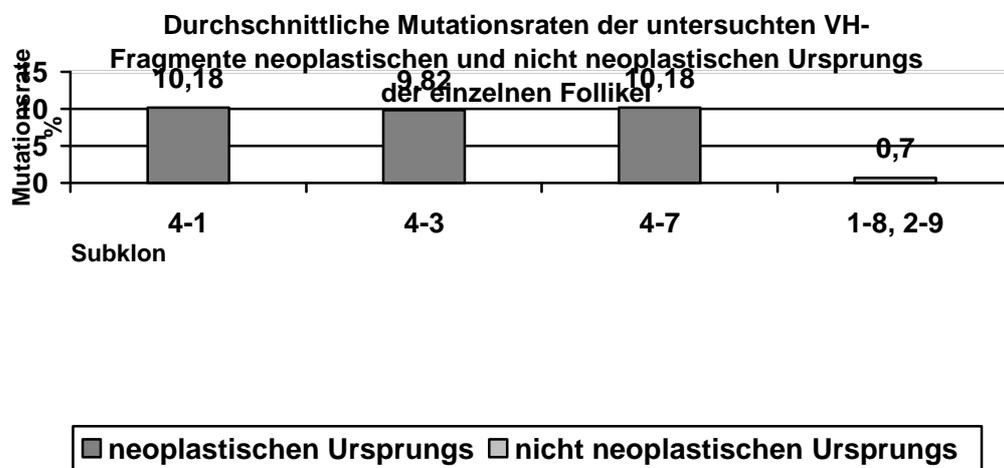
Hinter der absoluten Anzahl der Subklone einer VH-Familie in einem Follikel steht in Klammern, welchem Prozentsatz diese Anzahl an der Gesamtzahl der analysierten Subklone in diesem Follikel bildet. In der letzten Zeile der Tabelle findet sich der prozentuale Anteil, den alle Subklone einer VH-Familie jeweils an der Gesamtzahl aller analysierten Rezeptoren bilden.

Im Anhang werden in 8.2.3 die Sequenzen aller Tumorsubklone des Follikels vier sowie die Sequenzen der restlichen, nicht neoplastischen Subklone demonstriert.

4.3.1.1 Mutationsanalyse

Die Mutationsfrequenz der drei Tumorsubklone ist in Abb. 16 dargestellt. Alle Subklone weisen eine Mutationsrate auf, die über 9,8% liegt. Die Subklone sind hypermutiert. Die am höchsten mutierten Subklone der nicht neoplastischen Zellpopulation sind den Tumorsubklonen gegenübergestellt. Sie weisen eine viel niedrigere Mutationsfrequenz von 0,7% auf.

Abb. 16 – Mutationsraten Tumor III 1



Tab. 21 fasst die Mutationsanalyse der Tumorsubklone zusammen. Da insgesamt nur drei Subklone vorliegen, wurden auch nur einfach vorkommenden Mutationen mit in der Analyse berücksichtigt; es besteht zwar die Möglichkeit, dass die Einzelmutationen durch Polymerasefehler hervorgerufen wurden, würde man jedoch, wie bei Tumor I und II geschehen, nur Mehrfachmutationen berücksichtigen, ginge angesichts der geringen Anzahl von Tumorsubklone zu viel Information verloren.

Tab. 21: Tumor III 1, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
4-1	CDR	3	1	4	2	3,0	2,0	-	0,257	10,18
	FR	18	6	12	6	3,0	2,0	+	0,103	
4-3	CDR	3	1	4	1	3,0	4,0	+	0,232	9,82
	FR	18	6	12	6	3,0	2,0	+	0,150	
4-7	CDR	3	1	4	1	3,0	4,0	+	0,257	10,18
	FR	18	6	12	7	3,0	1,7	+	0,103	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion).
 Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment.

In allen drei Subklonen zeigt sich im Bereich der FRs bei einer tatsächlich niedrig liegender R/S-Ratio als der erwartete Wert das Bild einer negativen Selektion. Doch liegt angesichts der hohen p-Werte keine statistische Signifikanz vor. Auch im Bereich der CDRs finden sich jenseits der Grenze statistischer Signifikanz liegende p-Werte.

4.3.1.2 Intraklonale Diversität

Die Sequenzen der drei Tumorsubklone bieten ein homogenes Bild. Den Subklonen 4-1, 4-3 und 4-7 sind insgesamt 28 *common mutations* gemeinsam. Tab. 22 listet deren Lokalisation und die Art des Austausches auf.

Tab. 22 - Tumor III 1, *common mutations*

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation</i> -Nukleotid	Art der Mutation
4	1	FR I	C	T	<i>Silent</i>
14	1	FR I	C	G	<i>Replacement</i>
18	2	FR I	T	C	<i>Replacement</i>
25	2	FR I	A	C	<i>Silent</i>
30	2	CDR I	G	A	<i>Replacement</i>
31	2, 3	CDR I	GGT	GCC	<i>Replacement</i>
32	2	CDR I	A	T	<i>Replacement</i>
35	1,2	FR II	AGC	GCC	<i>Replacement</i>
49	3	FR II	G	A	<i>Silent</i>
50	1	FR II	G	C	<i>Replacement</i>
52	1,2	CDR II	AAT	TCT	<i>Replacement</i>
56	3	CDR II	C	T	<i>Silent</i>
58	2,3	FR III	AAC	AGG	<i>Replacement</i>
60	2	FR III	A	G	<i>Replacement</i>
70	3	FR III	A	T	<i>Silent</i>
71	1	FR III	G	A	<i>Replacement</i>
73	2	FR III	C	T	<i>Replacement</i>
74	1	FR III	T	G	<i>Replacement</i>
77	3	FR III	G	A	<i>Silent</i>
79	2	FR III	C	T	<i>Replacement</i>
81	1,3	FR III	AAG	GAC	<i>Replacement</i>
83	2	FR III	G	C	<i>Replacement</i>
92	3	FR III	G	C	<i>Silent</i>

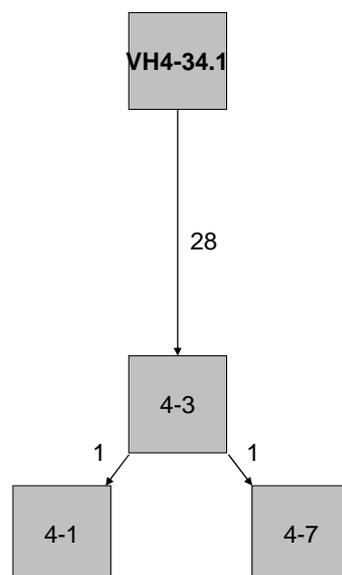
Tab. 22 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Der Subklon 4-3 hat darüber hinaus keine weiteren Mutationen. Die Subklone 4-1 und 4-7 haben jeweils noch eine weitere Mutation. Daraus ergibt sich eine intraklonale Variation von **0,6/Subklon**, was ungefähr der in unserem Labor beobachteten Taq-Error-Quote (0,17%, was einer Mutationsanzahl von 0,5 bei ca. 300 bp entspricht) bei dieser Basenpaarlänge gleichkommt. Diese Quote ist als Grenzwert der statistischen Signifikanz anzusehen.

4.3.1.3 Genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone

Da sich im Tumor III 1 nur 3 Subklone sich neoplastischen Ursprungs zuordnen lassen, sind nähere Aussagen über phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse nicht sinnvoll. Unter der Annahme, dass den zwei zusätzlichen Einzelmutationen kein Polymerasefehler zugrunde liegt, ergibt sich der in Abb. 17 demonstrierte Stammbaum.

Abb. 17 – Tumor III 1, Stammbaum



4-3 weist im Vergleich zur Keimbahnzelle VH4-34.1 28 zusätzliche Mutationen auf. Von 4-3 entwickelten sich mit je einer zusätzlichen Mutation die Subklone 4-1 und 4-7 weiter.

4.3.1.4 Andere Keimbahnfamilien

Neoplastische Klone finden sich in Tumor III 1 nur im Follikel vier. In allen anderen Follikeln lassen sich nur nicht neoplastische Subklone anderer Keimbahnfamilien nachweisen. Eine tabellarische Übersicht über die Mutationsraten in den jeweiligen Subklonen und die Auflistung der Sequenzen nach Keimbahnfamilien geordnet sind in Tab. 23 bzw. unter 8.2.3 im Anhang dargestellt.

Tab. 23 – Tumor III 1, andere VH-Familien, Mutationsfrequenz

VH-Familie	Subklon	Mutationsanzahl	Mutationsfrequenz
VH4-b1	1-8	2/288	0,7%
	2-7	0/288	0%
	4-5	1/288	0,3%
VH4-4.1	3-1	0/285	0%
	3-2	0/285	0%
	3-3	0/285	0%
	3-4	0/285	0%
	3-6	0/285	0%
	3-8	1/285	0,4%
VH4-34.1	2-2	0/285	0%
	2-3	0/285	0%
	2-6	0/285	0%
	2-8	1/285	0,4%
	4-4	0/285	0%
	5-1	0/285	0%
VH4-61.1	2-9	2/291	0,7%

Wie schon in Abb. 16 gezeigt, liegen die Mutationsfrequenzen (Höchstwert 0,7% bei Subklon 1-8 und 2-9) dieser Subklone deutlich unter der der Tumorzellpopulation.

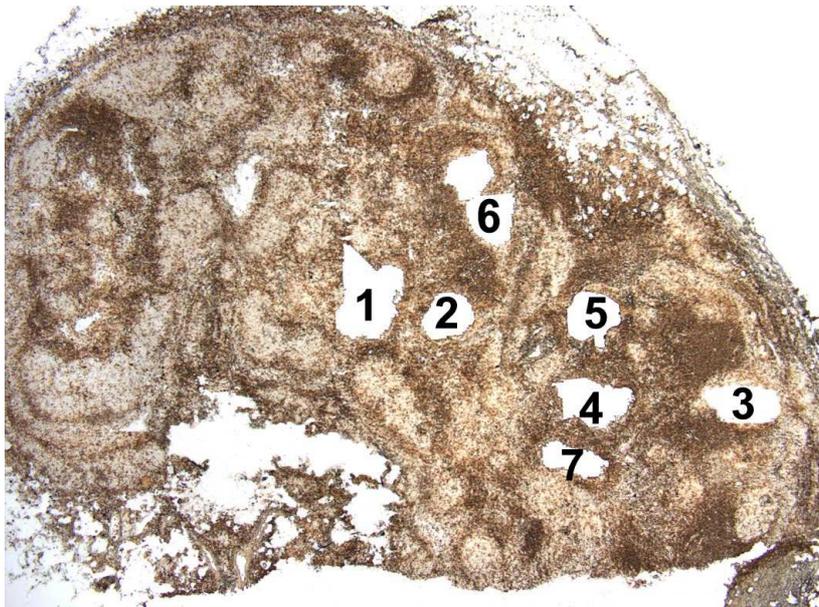
4.3.2 Tumor III 2

Im Tumor III 2 wurden insgesamt 6 Follikel untersucht (Follikel 1 bis 6). Das VH-Segment des BCR ist überwiegend der vierten VH-Familie zuzurechnen. Die folgenden Photos sollen die Lokalisation der einzelnen Follikel vor und nach der Mikrodissektion veranschaulichen.

Abb. 18 - Tumor III 2, CD3-Färbung, 20-fach-Vergrößerung, vor Mikrodissektion



Abb. 19 - Tumor III 2, CD3-Färbung, 20-fach-Vergrößerung, nach Mikrodissektion



Tab. 24 gibt eine Übersicht über die analysierten Subklone:

Tab. 24 – Tumor III 2, Verteilung der Subklone neoplastischen und nicht neoplastischen Ursprungs innerhalb der einzelnen Follikel

Follikel-Nr.	Gesamtanzahl analysierter Subklone	Anzahl der Subklone neoplastischen Ursprungs	Anzahl der Subklone nicht neoplastischen Ursprungs
1	9	0	9 (1,2,3,5,6, 7,9,11,12)
2	4	2 (3,14)	2 (1,10)
3	5	3 (4,7,9)	2 (1,3)
4	2	2 (1,4)	0
5	3	3 (2,4,5)	0
6	7	1 (2)	6 (1,4,5,6,8,9)
Summe	30	11	19

Hinter der Anzahl der pro Follikel gefundenen VH-Segmente neoplastischen bzw. nicht neoplastischen Ursprungs sind in Klammern die jeweiligen Nr. der Subklone angegeben.

Die analysierten Subklone der einzelnen Follikel gehören unterschiedlichen Unterklassen der VH4-Familie an, wobei die Familien VH4-34.1 (37%) und VH4-30.1 (57%) am häufigsten vertreten sind. Die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen VH-Familien innerhalb der einzelnen Follikel und insgesamt wird in Tab. 25 zusammengefasst:

Tab. 25 – Tumor III 2, Prozentuale Aufteilung der Subklone jedes Follikels auf die VH-Familien

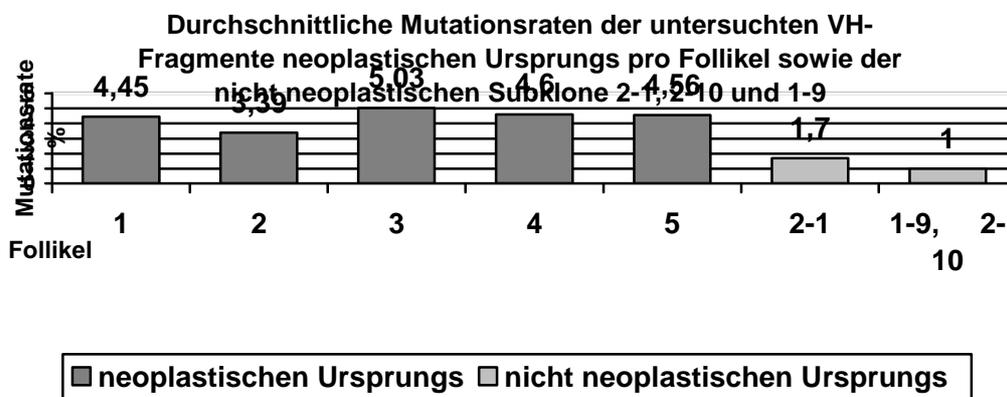
	VH4-34.1	VH4-30.1	VH4-b.1	VH4-59.1
Follikel 1	-	8 (≈89%)	-	1(≈11%)
Follikel 2	2(50%)	1(25%)	1(25%)	-
Follikel 3	3(60%)	2(40%)	-	-
Follikel 4	2(100%)	-	-	-
Follikel 5	3(100%)	-	-	-
Follikel 6	1(≈14%)	4(≈57%)	2(≈29%)	-
	≈37%	50%	10%	≈3%

Hinter der absoluten Anzahl der Subklone einer VH-Familie in einem Follikel steht in Klammern, welchem Prozentsatz diese Anzahl an der Gesamtzahl der analysierten Subklone in diesem Follikel bildet. In der letzten Zeile der Tabelle findet sich der prozentuale Anteil, den alle Subklone einer VH-Familie jeweils an der Gesamtzahl aller analysierten Rezeptoren bilden.

4.3.2.1 Mutationsanalyse

Die VH-Sequenzen der analysierten Subklone werden unter 8.2.4 im Anhang dargestellt. Die höchsten Mutationsraten weisen die Subklone der VH4-34.1-Familie auf. Sie liegen durchschnittlich bei 4,33 %. Dieser Wert liegt unter dem üblicherweise bei hypermutierten Subklonen gefundenen Wert. Vielmehr entspricht er dem bei normalen Gedächtniszellen gefundenen Durchschnittswert (42-44). Die Subklone, die anderen VH-Familien angehören, weisen noch deutlich niedrigere Mutationsfrequenzen auf. Abb. 20 stellt die Mutationsraten der analysierten Subklone dar.

Abb. 20 – Mutationsraten Tumor III 2



Tab. 26 – Tumor III 2, Mutationsraten der VH-Fragmente der Tumorzellpopulation

Follikel	Durchschnittswert aller Tumorsubklone	Höchstwert	Tiefstwert
2	4,9%	2-14 5,1%	2-3 4,7%
3	4,1%	3-4 5,5%	3-7 2,5%
4	5,0%	4-1 5,5%	4-4 4,6%
5	4,8%	5-2 5,1%	5-4, 5-5 4,7%
6	4,6%	6-2 4,6%	

Tab. 27 zeigt eine Übersicht der Mutationsanalyse der 11 Tumorsubklone. Es ist zu berücksichtigen, dass bei den Subklonen 3-9, 4-4 und 6-2 *Primer*-bedingt die vollständige Sequenz von der FR I an vorliegt, wohingegen bei den übrigen Subklonen die Sequenz erst ab dem Triplet 17 vorliegt. 10 der 11 untersuchten Subklone zeigen gemäß der beobachteten R/S-Ratio, welche unter dem errechneten Wert liegt, eine Mutationsverteilung, welche mit dem Vorhandensein eines negativen Selektionsdruckes vereinbar wäre. Doch bei keinem der Subklone zeigt sich ein statistisch signifikanter p-Wert. Der Subklon 3-4 zeigt im Bereich der FRs genau die Anzahl von R- und S-Mutationen, die bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet werden würde.

Im Bereich der CDRs fällt auf, dass keine einzige *silent mutation* vorliegt. Somit ergibt sich im R/S-Quotienten jeweils der rechnerische Wert von ∞ . Anhand des Vergleiches der R/S-Ratio zeigen folgende Subklone dabei einen höheren Wert als den rein rechnerisch erwarteten: 2-14, 4-1, 5-2, 5-4 und 5-5. Dabei beruht die höhere R/S-Ratio jedoch mit Ausnahme des Subklones 4-1 nicht auf einer erhöhten Anzahl von R-Mutationen als man bei einem zufälligen Prozess erwarten würde, denn die beobachteten Werte entsprechen den erwarteten. Vielmehr trägt dazu die oben erwähnte Tatsache bei, dass hier statt der einen erwarteten S-Mutation keine zu finden ist. Nur der Subklon 4-1 weist zusätzlich eine R-Mutation mehr auf als erwartet. Die hohen p-Werte im Bereich der CDRs zeigen, dass keine statistische Signifikanz vorliegt.

Tab. 27: Tumor III 2, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
2-3	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,321	4,24
	FRs	6	2	4	4	3,0	1,0	+	0,105	
2-14	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,368	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,166	
3-4	CDRs	1	0	1	0	∞	∞	-	0,538	3,39
	FRs	5	2	5	2	2,5	2,5	-	0,536	
3-7	CDRs	1	0	0	0	∞	∞	-	0,813	2,54
	FRs	4	1	4	2	4,0	2,0	+	0,603	
3-9	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,314	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,075	
4-1	CDRs	2	1	3	0	2,0	∞	+	0,216	5,51
	FRs	8	3	6	4	2,7	1,5	+	0,156	
4-4	CDRs	2	0	2	0	∞	∞	-	0,352	4,56
	FRs	8	3	6	5	2,7	1,2	+	0,117	
5-2	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,368	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,166	
5-4	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,368	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,166	
5-5	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,368	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,166	
6-2	CDRs	2	0	2	0	∞	∞	-	0,352	4,56
	FRs	8	3	6	5	2,7	1,2	+	0,117	

R: *Replacement-/Austauschmutation*; S: *Silent-/stille Mutation*; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion).
Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment

4.3.2.2 Intraklonale Diversität

Beim Vergleich der Sequenzen aller Subklone der VH4-34.1-Familie zeigt sich nur eine *common mutation*: Im Triplet 82 (FR III) findet sich an erster Position statt C ein T (*replacement*). Alle Subklone bis auf 3-4 und 3-7 weisen 9 weitere gemeinsame Mutationen auf. Tab. 28 listet die Lokalisation und Art dieser Mutationen auf:

Tab. 28 - Tumor III 2, gemeinsame Mutationen der Subklone 2-3, 2-14, 3-9, 4-1, 4-4, 5-2, 5-4, 5-5, 6-2 (VH4-34.1-Familie)

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	Nukleotid der gemeinsamen Mutation	Art der Mutation
23	3	FR I	T	A	<i>silent</i>
28	1	CDR I	T	G	<i>replacement</i>
33	2	CDR I	A	T	<i>replacement</i>
35	2	FR II	G	C	<i>replacement</i>
40	1	FR II	C	T	<i>replacement</i>
42	2	FR II	G	A	<i>replacement</i>
60	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
62	3	FR III	C	A	<i>silent</i>
73	2	FR III	C	T	<i>replacement</i>

Tab. 28 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Neben diesen Mutationen finden sich nur wenige zusätzliche Mutationen bei diesen Subklonen. Der durchschnittliche Wert dieser zusätzlichen Mutationen beträgt **0,7/Subklon**. Dieser Wert liegt nur knapp über in unserem Labor beobachteten Anzahl von Polymerasefehlern bei dieser Basenlänge (0,68/Subklon), so dass dieser Wert nicht als statistisch signifikant gelten kann.

Die Subklone 3-4 und 3-7 weisen ein von den anderen Subklonen distinktes Mutationsmuster auf. Gemeinsam tragen sie folgende in Tab. 29 aufgelistete Mutationen:

Tab. 29 – Tumor III 2, gemeinsame Mutationen der Subklone 3-4 und 3-7

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	Nukleotid der gemeinsamen Mutation	Art der Mutation
69	3	FR III	A	G	<i>replacement</i>
71	3	FR III	A	G	<i>silent</i>
73	1	FR III	A	T	<i>replacement</i>
76	2	FR III	A	G	<i>replacement</i>
77	3	FR III	G	C	<i>replacement</i>

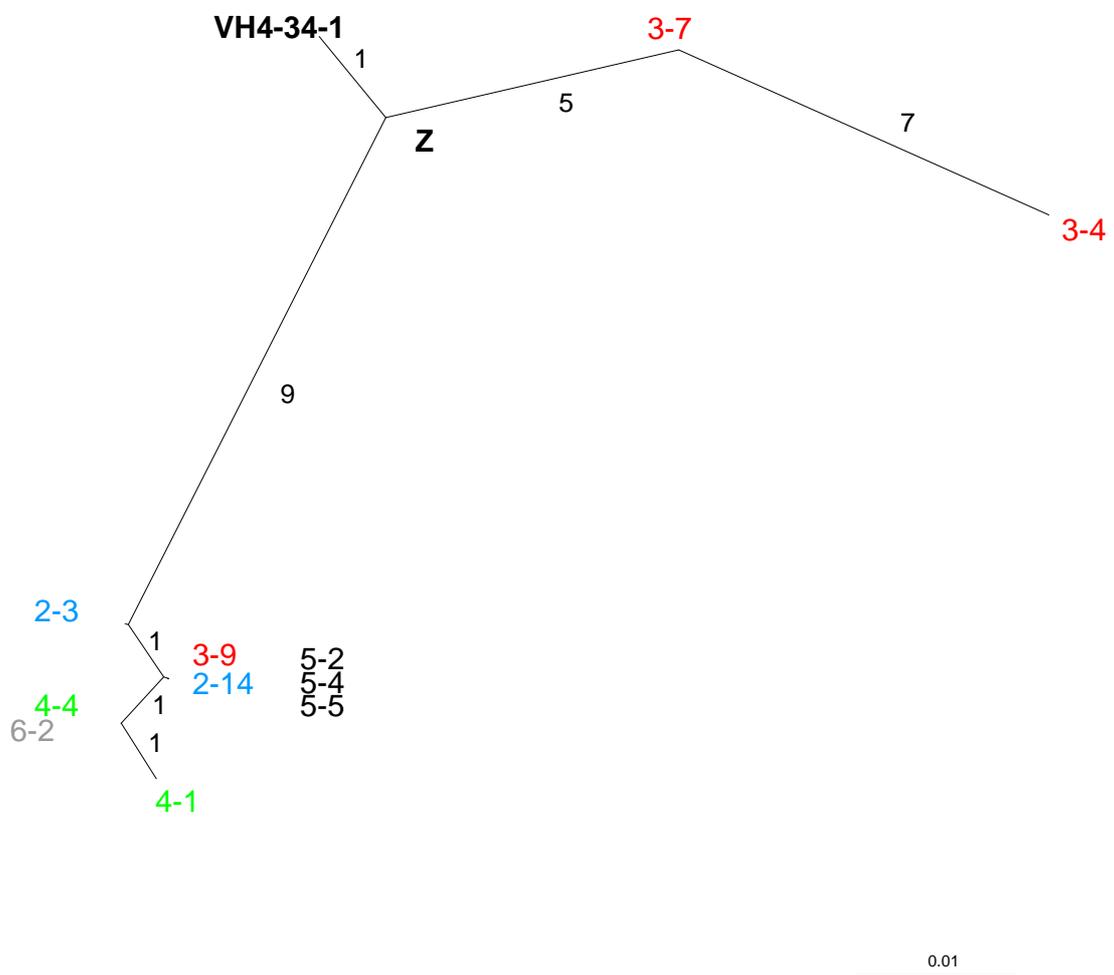
Tab. 29 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

4.3.2.3 Genetische Verwandtschaft der Tumorzellpopulation

Die durch Sequenzvergleich der 11 Tumorsubklone errechnete genetische Verwandtschaft wurde in einem Stammbaum (Abb. 21) dargestellt. Dabei wurden die ersten 17 Triplets, die *Primer* bedingt nur von den Subklonen 3-9, 4-4 und 6-2 vorliegen, nicht in das *multiple alignment* mit einbezogen.

In der graphischen Darstellung wird deutlich, dass sich die beiden Subklone 3-4 und 3-7 des Follikels 3 deutlich von allen anderen Subklonen unterscheiden. In einer Entfernung von 5 Mutationen zur putativen Vorläuferzelle ist Subklon 3-7 lokalisiert. Aus diesem Subklon hat sich durch weitere sieben Mutationen der Subklon 3-4 weiterentwickelt. Der ebenfalls im Follikel 3 gefundene Subklon 3-9 zeigt keine genetische Verwandtschaft mit den beiden genannten Subklonen und „clustert“ mit anderen Subklonen. Diese befinden sich in einer „Entfernung“ von 9 bis 11 Mutationen von der Vorläuferzelle Z und zeigen eine enge Verwandtschaft untereinander sowie eine weitgehende Beschränkung auf einzelne Follikel. So sind die in Follikel 5 gefundenen Subklone 5-2, 5-4 und 5-5 genetisch identisch. Aber auch die anderen Subklone unterscheiden sich voneinander nur durch eine bis zwei Mutationen in 236 Basenpaaren.

Abb. 21: Tumor III 2, genetische Verwandtschaft



4.3.2.4 Andere Keimbahnfamilien

Im Tumor III 2 sind nur ca. 37% der Subklone der Tumorzellpopulation zuzurechnen. Die anderen Subklone sind auf die VH-Familien VH4-30.1, VH4-b.1 und VH4-59.1 aufgeteilt. Die Familie VH4-30.1 ist dabei am häufigsten vertreten (ca. 50% aller Subklone). Tab. 30 zeigt die Verteilung der einzelnen Subklone auf die jeweiligen Familien und die Mutationsfrequenzen der einzelnen Subklone. Die Sequenzen der Subklone sind unter 8.2.4 im Anhang zu finden.

Tab. 30 – Tumor III 2, andere VH-Familien, Mutationsfrequenz

VH-Familie	Subklon	Mutationsanzahl	Mutationsfrequenz
VH4-b.1	2-10	3/288	1,0%
	6-4	0/288	0%
	6-6	0/288	0%
VH4-30.1	1-1	2/291	0,7%
	1-2	2/291	0,7%
	1-3	1/291	0,3%
	1-5	1/291	0,3%
	1-7	1/291	0,3%
	1-9	3/291	1,0%
	1-11	1/291	0,3%
	1-12	1/291	0,3%
	2-1	5/291	1,7%
	3-1	2/291	0,7%
	3-3	0/291	0%
	6-1	1/291	0,3%
	6-5	1/291	0,3%
	6-8	1/291	0,3%
	6-9	1/291	0,3%
VH4-59.1	1-6	0/285	0%

Die Mutationsraten liegen niedrig. Den höchsten Wert weist der Subklon 2-1 mit 1,7% auf. Die Subklone 1-9 und 2-10 sind mit einer Mutationsfrequenz von 1,0% am zweit höchsten mutiert. Abb.20 (s.o.) zeigt die Mutationsraten dieser Subklone exemplarisch den Mutationsraten der Tumorsubklone gegenübergestellt.

4.3.3 Vergleich Tumor III 1 und Tumor III 2

Zwischen den Probeentnahmen von Tumor III 1 und Tumor III 2 des Patienten 3 lag ein Intervall von 34 Monaten. Als Tumorzellpopulation in Tumor III 1 lassen sich nur 3 Subklone in Follikel 4 identifizieren. Es liegt das Bild hypermutierter Subklone vor, die zur VH4-34.1-Familie gehören. Diese Mutationsmuster ist im Rezidiv-Tumor III 2 nicht aufzufinden. Die Subklone, welche hier zur VH4-34.1-Familie gehören, zeigen eine ganz andere Mutationsverteilung. Lediglich in 2 Triplets finden sich Übereinstimmungen zwischen beiden Tumorzellgruppen:

- Triplett 35, FR II, 2. Position, G→C
- Triplett 73, FR III, 2.Position, C→T

Die Mutationsfrequenz liegt deutlich unter der des Ausgangtumors.

Im Anhang sind unter 8.2.5 die Subklone beider Tumore untereinander dargestellt.

4.4 Patient 4

4.4.1 Tumor IV 1

Untersucht wurden 8 Follikel des Tumors IV 1 (Nummer 1 bis 8), deren Lokalisation in den Abb. 22 und 23 vor und nach der Mikrodissektion dargestellt sind.

Abb. 22 - Tumor IV 1- HE-Färbung, 20x Vergrößerung, vor Mikrodissektion

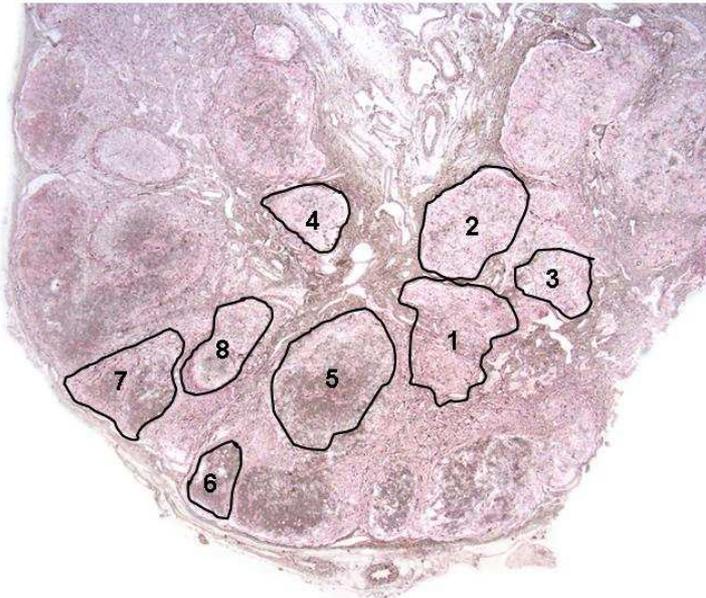
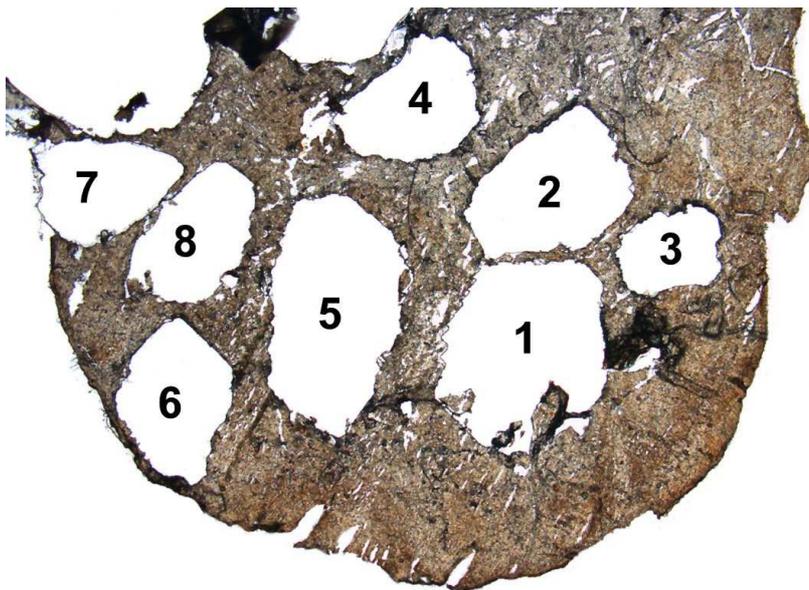


Abb. 23 - Tumor IV 1- CD3-Färbung, 20x Vergrößerung, nach Mikrodissektion



Das B-Zell-Rezeptor-Gen des gewonnenen DNS-Materials war überwiegend der VH4-Familie zuzurechnen. Eine Übersicht aller analysierten Subklone bietet Tab. 31:

Tab. 31 – Tumor IV 1, Verteilung der Subklone neoplastischen und nicht neoplastischen Ursprungs innerhalb der einzelnen Follikel

Follikel-Nr.	Gesamtanzahl analysierter Subklone	Anzahl der VH4-34.1-Fragmente neoplastischen Ursprungs	Anzahl der VH4-30.1-Fragmente	Anzahl der Subklone anderer VH-Familien
1	9	4 (1,4,5,9)	5 (2,3,6,7,8)	0
2	8	6 (1,2,3,4,5,7)	1 (6)	1 (9)
3	7	5 (3,4,5,6,8)	0	2 (2,7)
4	8	6 (1,3,5,6,7,9)	1 (4)	1 (2)
5	9	6 (3,4,5,7,8,9)	1 (4)	2 (2,6)
6	4	3 (1,3,4)	0	1 (2)
7	8	8 (1,2,3,4,7,9,11,12)	0	0
8	8	8 (2,4,5,6,7,8,9,10)	0	0
Summe	61	46	8	7

Hinter der Anzahl der pro Follikel gefundenen VH-Segmente neoplastischen bzw. nicht neoplastischen Ursprungs sind in Klammern die jeweiligen Nr. der Subklone angegeben.

Die BCR-Gene der Subklone aus Tumor IV 1 sind unterschiedlichen Keimbahnfamilien zugehörig. Tab. 32 zeigt, welche Keimbahnfamilien in welchen Follikeln vorkommen, und wie viele Subklone ihnen jeweils angehören.

Tab. 32 – Tumor IV 1, Prozentuale Aufteilung der Subklone jedes Follikels auf die VH-Familien

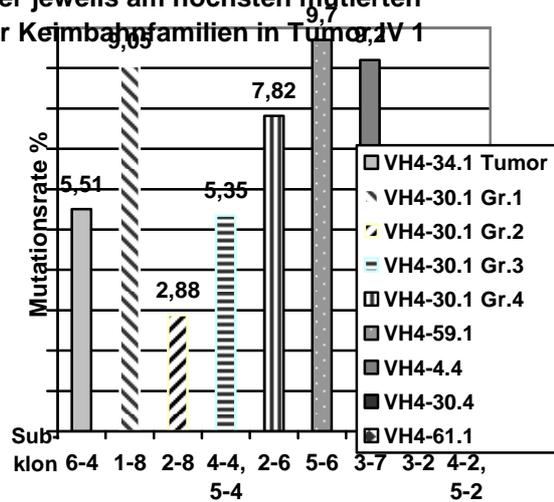
	VH4-34.1	VH4-30.1	VH4-4.4	VH4-30.4	VH4-59.1	VH4-61.1
Follikel 1	4 (44%)	5 (56%)	-	-	-	-
Follikel 2	6 (67%)	1 (22%)	1 (11%)	-	-	-
Follikel 3	5 (63%)	-	1 (13%)	1 (13%)	-	-
Follikel 4	6 (75%)	1 (13%)	-	-	-	1 (13%)
Follikel 5	6 (≈67%)	1 (≈11%)	-	-	1 (≈11%)	1 (≈11%)
Follikel 6	3 (50%)	-	-	-	1 (≈17%)	-
Follikel 7	8 (100%)	-	-	-	-	-
Follikel 8	8 (100%)	-	-	-	-	-
	75%	13%	3%	2%	3%	3%

Hinter der absoluten Anzahl der Subklone einer VH-Familie in einem Follikel steht in Klammern, welchen Prozentsatz diese Anzahl an der Gesamtzahl der analysierten Subklone in diesem Follikel bildet. In der letzten Zeile der Tabelle findet sich der prozentuale Anteil, den alle Subklone einer VH-Familie jeweils an der Gesamtzahl aller analysierten Rezeptoren bilden.

Ca. 75% aller untersuchten positiven Klone im Tumor I gehören zur VH4-34.1-Familie; aufgrund ihres Mutationsmusters, der Verteilung über alle Follikel sowie der Tatsache, dass in den Rezidiven Tumor IV 2 und IV 3 nur diese Keimbahnfamilie vertreten ist, sind sie der Tumorzellpopulation zuzurechnen. Die VH4-30.1-Familie ist mit ca. 13% aller untersuchten Subklone ebenfalls zahlreich vertreten. Abb. 24 stellt vergleichend die Mutationsraten der

jeweils am höchsten mutierten Subklone der verschiedenen Keimbahnfamilien dar. Dabei werden die zur VH4-30.1-Familie gehörenden Subklone aufgrund ihrer Mutationsmuster nochmals in vier Untergruppen eingeteilt. Auf sie wird aufgrund ihres hohen Anteils an den untersuchten Subklonen sowie der hohen Mutationsraten neben den zur VH4-34.1-Familie gehörenden Tumorsubklonen in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden.

Abb. 24, Mutationsraten der jeweils am höchsten mutierten Subklone unterschiedlicher Keimbahnfamilien in Tumors IV 1



4.4.1.1 Mutationsanalyse

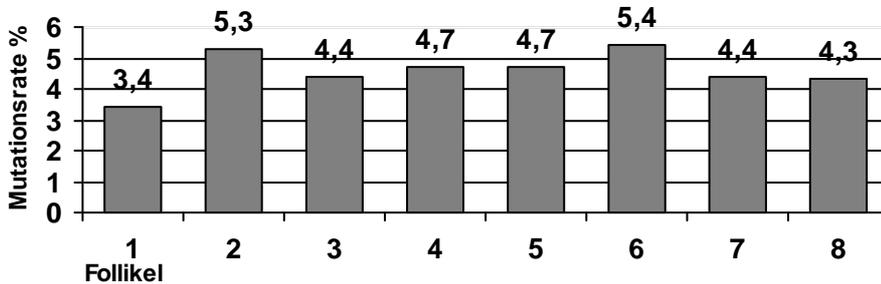
4.4.1.1.1 VH4-34.1-Tumorsubklone

Im Anhang unter 8.2.6 sind alle Subklone der VH4-34.1-Familie des Tumors IV 1 untereinander dargestellt. Die Sequenzen der Subklone des ersten bis sechsten Follikels liegen *Primer*-bedingt erst ab dem Triplet 18 vor. Insgesamt bietet sich bei allen Subklonen ein recht homogenes Bild: 10 Mutationen finden sich in fast allen Subklonen vertreten; auch in den Triplets 1-17, deren Sequenz nur bei den Follikeln sieben und acht vorliegen, sind 2 Mutationen in allen Subklonen vorhanden. Die Subklone des sechsten Follikels dagegen zeigen ein deutlich unterschiedliches Mutationsmuster. Auch im zweiten und fünften Follikel finden sich wenige Subklone, die nicht das dominierende Mutationsbild dieses Tumors aufweisen. Tab. 33 führt die durchschnittlich Mutationsrate sowie Höchst- und Tiefstwerte nach Follikeln aufgetrennt auf. Die Abb. 25 zeigt die Mutationsraten der einzelnen Subklone graphisch. Kein Subklon erweist sich als hypermutiert. Die durchschnittliche Mutationsrate aller Subklone liegt bei ca. 4,5%.

Tab. 33 – Tumor IV 1, Mutationsraten der VH-Fragmente der Tumorzellpopulation

Follikel	Durchschnittswert aller Subklone	Höchstwert	Tiefstwert
1	3,4%	1-4, 1-5: 4,7%	1-9: 0%
2	5,3%	2-7: 6,8%	2-1: 4,3%
3	4,4%	3-5, 3-6: 4,7%	3-3, 3-4, 3-8: 4,3%
4	4,7%	4-1: 4,3%	4-3: 5,1%
5	4,7%	5-9: 7,6%	5-8: 0,4%
6	5,4%	6-4: 6,0%	6-1, 6-3: 5,1%
7	4,4%	7-3: 4,6%	7-7: 3,9%
8	4,3%	8-2,4,5,6,8-10: 4,2%	8-7: 4,9%

Abb. 25, Durchschnittliche Mutationsraten der zur VH4-34.1-Familie gehörenden VH-Fragmente neoplastischen Ursprungs pro Follikel In Tumor IV 1



In den Tab. 34 bis 37 wird die Mutationsanalyse zusammengefasst dargestellt. Dabei wurden nur mehrfach vorkommende Mutationen berücksichtigt. Zwei der VH4-34.1-Subklone sind gänzlich unmutiert (1-9 und 5-8). Sie sind als naive B-Zellen oder unmutierte Mantelzellen zu betrachten. Bei den restlichen 44 Subklonen sprechen im Bereich der CDRs die hohen p-Werte eher gegen das Vorliegen eines positiven Selektionsdruckes. Hier weist keiner der untersuchten Subklone im Bereich der CDRs eine S-Mutation auf, so dass jeweils eine rechnerische R/S-Ratio von unendlich resultiert. Ab einer Mutationsrate < 4,66% würde man bei einer rein zufälligen Mutationsverteilung rechnerisch ebenfalls keine S-Mutation in den CDRs erwarten, so dass auch bei den erwarteten R/S-Ratios hier der Wert unendlich angenommen wird. Darum ist der Vergleich der R/S-Ratios bei der insgesamt niedrigen

Mutationsfrequenz der Subklone nur bedingt aussagekräftig. 24 der 44 Subklone weisen eine R-Mutation mehr auf, als man rechnerisch erwarten würde, die restlichen 20 Subklone entsprechen in ihrer Anzahl der R-Mutationen dem theoretisch erwarteten Wert.

Im Bereich der FRs findet sich bei fast allen Subklonen eine unter dem erwarteten Wert liegende R/S-Ratio, was als Hinweis auf ein Vorhandensein eines negativen Selektionsdruckes mit Konservierung der BCR-Struktur anzusehen ist. Lediglich die Subklone 2-3 und 2-7 bilden Ausnahmen. Sie zeigen keine S-Mutation im Bereich der FRs, welche sie gemeinsam mit anderen Subklonen teilen. Das führt in der Mutationsanalyse, wo nur mehrfach vorkommende Mutationen berücksichtigt werden, zu der beobachteten R/S-Ratio von unendlich. Bei den meisten der Subklone des Follikels 7 (7-2, 7-3, 7-4) sowie beim Subklon 8-7 zeigen sich statistisch signifikante p-Werte. Bei den übrigen Subklonen finden sich keine signifikanten p-Werte im Bereich der FRs.

Tab. 34 –Tumor IV 1, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone der VH4-34.1-Familie

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
1-1	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
1-4	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
1-5	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
1-9	CDRs	0	0	0	0	∞	∞	-	1,00000	0
	FRs	0	0	0	0	∞	∞	-	0,00000	
2-1	CDRs	1	0	1	0	∞	∞	-	0,63207	4,24
	FRs	6	2	5	4	3,0	1,3	+	0,25770	
2-2	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
2-3	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,09674	2,12
	FRs	3	1	3	0	3,0	∞	-	0,48285	
2-4	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
2-5	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,41362	5,08
	FRs	7	2	6	4	3,5	1,5	+	0,23715	
2-7	CDRs	0	0	1	0	∞	∞	-	0,22461	1,27
	FRs	2	1	2	0	2,0	∞	-	0,56260	
3-3	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	

R: *Replacement-/Austauschmutation*; S: *Silent-/stille Mutation*; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion).
Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment.

Tab. 35 – Tumor IV 1, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone der VH4-34.1-Familie

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
3-4	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
3-5	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
3-6	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
3-8	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
4-1	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
4-3	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,41362	5,08
	FRs	7	2	6	4	3,5	1,5	+	0,23715	
4-5	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
4-6	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
4-7	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
4-9	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
5-3	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion).
Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment.

Ergebnisse

Tab. 36 – Tumor IV 1, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone der VH4-34.1-Familie

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
5-4	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
5-5	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
5-7	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	5	4	3,5	1,3	+	0,16568	
5-8	CDRs	0	0	0	0	∞	∞	-	1,00000	0
	FRs	0	0	0	0	∞	∞	-	0,00000	
5-9	CDRs	2	1	2	0	2,0	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	6	3	3,5	2,0	+	0,34630	
6-1	CDRs	2	1	3	0	2,0	∞	+	0,14730	4,66
	FRs	7	2	6	2	3,5	3,0	+	0,34630	
6-3	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,32054	4,24
	FRs	6	2	5	3	3,0	1,7	+	0,25770	
6-4	CDRs	2	1	3	0	2,0	∞	+	0,21570	5,51
	FRs	8	3	7	3	2,7	2,3	+	0,31608	
7-1	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
7-2	CDRs	2	0	2	0	∞	∞	-	0,35172	4,56
	FRs	8	3	5	6	2,7	0,8	+	0,04212	
7-3	CDRs	2	0	2	0	∞	∞	-	0,35172	4,56
	FRs	8	3	5	6	2,7	0,8	+	0,04212	
7-4	CDRs	2	0	2	0	∞	∞	-	0,35172	4,56
	FRs	8	3	5	6	2,7	0,8	+	0,04212	
7-7	CDRs	1	0	1	0	∞	∞	-	0,58502	3,86
	FRs	7	2	5	5	3,5	1,0	+	0,12800	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,05) (41);

Ergebnisse

Tab. 37 – Tumor IV 1, Mutationsanalyse der VH-Fragmente aller untersuchten Tumorsubklone der VH4-34.1-Familie

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
7-9	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
7-11	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
7-12	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
8-2	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
8-4	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
8-5	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
8-6	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
8-7	CDRs	2	0	2	0	∞	∞	-	0,35172	4,56
	FRs	8	3	5	6	2,7	0,8	+	0,04212	
8-8	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
8-9	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	
8-10	CDRs	1	0	2	0	∞	∞	-	0,31351	4,21
	FRs	8	3	5	5	2,7	1,0	+	0,07477	

R: *Replacement-/Austauschmutation*; S: *Silent-/stille Mutation*; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion).

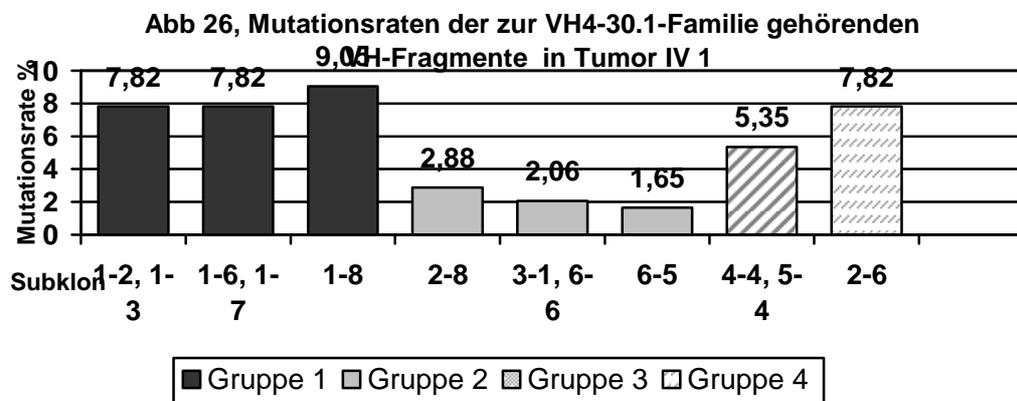
Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion).

Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,05) (41);

4.4.1.1.2 VH4-30.1-Subklone

Subklone der VH4-30.1-Familie finden sich in den Follikeln 1, 2, 4 und 5. Deren Sequenzen sind in 8.2.6 im Anhang aufgeführt.

Die Anordnung erfolgt nach der Ähnlichkeit der Mutationsmuster in vier Gruppen. Die erste Gruppe wird nur aus Subklonen gebildet, die dem Follikel 1 entstammen (1-2, 1-3, 1-6, 1-7 und 1-8). Die Zweite Gruppe setzt sich aus den Subklonen 2-8, 3-1, 6-5 und 6-6 zusammen. In der dritten Gruppe finden sich die in ihrer Sequenz identischen Subklone 5-4 und 5-5. Die vierte Gruppe schließlich wird durch den einzelnen Subklon 2-6 gebildet, welcher ein ganz eigenes Sequenzmuster aufweist. In Abb. 26 sind die Mutationsraten der zur VH4-30.1-Familie gehörenden Subklone dargestellt. Gruppe 1 und 4 weisen die höchsten Mutationsraten auf. Doch nur der Subklon 1-8 mit einer Mutationsrate von 9,05% erweist sich als hypermutiert. Die zur Gruppe 3 gehörenden Subklone liegen mit ihrer Mutationsrate knapp über 5%, die Subklone der Gruppe 2 liegen durchschnittlich bei Werten von nur 2%.



Tab. 38 fasst die Mutationsanalyse der VH4-30.1-Subklone zusammen.

Ergebnisse

Tab. 38 – Tumor IV, Mutationsanalyse der VH-Fragmente der zur VH4-30.1-Familie gehörenden Subklone

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
1-2	CDRs	3	1	4	1	3,0	4,0	+	0,24328	7,82
	FRs	11	4	5	8	2,8	0,6	+	0,00457	
1-3	CDRs	3	1	4	1	3,0	4,0	+	0,24328	7,82
	FRs	11	4	5	8	2,8	0,6	+	0,00457	
1-6	CDRs	3	1	4	1	3,0	4,0	+	0,31256	9,47
	FRs	12	4	7	8	3,0	0,9	+	0,01741	
1-7	CDRs	3	1	4	1	3,0	4,0	+	0,31256	9,47
	FRs	12	4	7	8	3,0	0,9	+	0,01741	
1-8	CDRs	3	1	4	1	3,0	4,0	+	0,27753	9,05
	FRs	11	4	6	8	2,8	0,8	+	0,00939	
2-8	CDRs	1	0	0	1	∞	0,0	-	0,85503	2,88
	FRs	4	1	3	3	4,0	1,0	+	0,20826	
3-1	CDRs	1	0	0	1	∞	0,0	-	0,79351	2,06
	FRs	3	1	3	1	3,0	3,0	-	0,50798	
6-5	CDRs	1	0	0	1	∞	0,0	-	0,75356	1,65
	FRs	2	1	2	1	2,0	2,0	-	0,36688	
6-6	CDRs	1	0	0	1	∞	0,0	-	0,79351	2,06
	FRs	3	1	3	1	3,0	3,0	-	0,50798	
4-4	CDRs	2	1	0	0	2,0	∞	-	0,94984	5,35
	FRs	8	3	6	7	2,7	0,9	+	0,18244	
5-4	CDRs	2	1	0	0	2,0	∞	-	0,94984	5,35
	FRs	8	3	6	7	2,7	0,9	+	0,18244	
2-6	CDRs	3	1	4	2	3,0	2,0	-	0,17857	7,82
	FRs	9	3	8	2	3,0	4,0	-	0,23812	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,05) (41);

Alle zur Gruppe 1 zählenden Subklone zeigen gemäß des Vergleiches der beobachteten mit den erwarteten R/S-Ratios das Bild sowohl einer positiven als auch negativen Selektion. Doch nur im Bereich der FRs finden sich statistisch signifikante p-Werte.

In der zweiten Gruppe findet sich bei dem Subklon 2-8 zwar im Bereich der FRs eine niedrigere R/S-Ratio als man rechnerisch erwarten würde. Doch liegt der p-Wert mit $>0,2$ jenseits der Grenzen statistischer Signifikanz. Die anderen Subklone dieser Gruppe zeigen weder gemäß der R/S-Ratios noch anhand des p-Wertes Eigenschaften, die für das Vorhandensein eines Selektionsdruckes sprächen.

In der Gruppe drei haben beide zugehörigen Subklone 4-4 und 5-4 zwar eine niedrigere R/S-Ratio im Bereich der FRs als man bei einer zufälligen Mutationsverteilung erwarten würde. Doch handelt es sich hier ebenso wenig um statistisch signifikante Ereignisse. Im Bereich der CDRs finden sich hier gar keine Mutationen, was das Vorhandensein einer Selektion sehr unwahrscheinlich macht.

Auch der Subklon 2-6, Vertreter der Gruppe 4, weist keinen Anhalt für das Vorherrschen eines Selektionsdruckes auf: Die p-Werte liegen sowohl im Bereich der CDRs als auch FRs jenseits der Grenze statistischer Signifikanz; die R/S-Ratio liegt im Bereich der CDRs unter und im Bereich der FRs über dem erwarteten Wert.

4.4.1.2 Intraklonale Diversität

4.4.1.2.1 VH4-34.1-Tumorsubklone

Bei den meisten der Subklone der VH4-34.1-Familie findet sich ein recht homogenes Mutationsbild. Die intraklonale Variation im gemeinsamen Mutationsmuster liegt signifikant im Schnitt bei 1,8 pro Subklon; das bedeutet, dass jeder Subklon neben den *common mutations* noch zusätzlich 1,8 Mutationen aufweist (durch Polymerasefehler würde man ca. 0,6 Mutationen/Subklon erwarten). Dabei findet sich eine Spanne von 0 bis 10 abweichenden Mutationen pro Subklon. Tab. 39 zeigt die *common mutations*. Die Subklone 2-7, 6-1 und 6-4 sind hierbei nicht miteinbezogen, da sie ein gänzlich differentes Mutationsmuster aufweisen.

Tab. 39 – Tumor IV 1, common mutations der VH4-34.1-Tumorsubklone ohne 2-7, 6-1 und 6-4

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	common mutation-Nukleotid	Art der Mutation
33	2	CDR I	A	T	<i>replacement</i>
35	2	FR II	G	C	<i>replacement</i>
40	1	FR II	C	T	<i>replacement</i>
42	2	FR II	G	A	<i>replacement</i>

Tab. 39 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Tab. 40 zeigt die Mutationen, die bei fast allen Subklonen zu finden sind. In der letzten Spalte stehen die Subklone, die an dieser Position unmutiert (u) sind bzw. eine andere Mutation (entsprechende Base) aufweisen.

Tab. 40 – Tumor IV 1, VH4-34.1-Tumorsubklone; Mutationen, die sich in fast allen Subklonen finden

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	common mutation-Nukleotid	Art der Mutation	Subklone, die nicht diese Mutation teilen
28	1	CDR I	T	G	<i>replacement</i>	2-1(u), 7-7(u)
60	3	FR III	C	T	<i>silent</i>	2-3(u)
62	3	FR III	C	A	<i>silent</i>	2-3(u)
73	2	FR III	C	T	<i>replacement</i>	2-3(u), 2-4(G)
82	1	FR III	C	T	<i>silent</i>	2-3(A), 2-4(G)
83	2	FR III	G	A	<i>replacement</i>	2-3(u)

Tab. 40 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben. In der letzten Spalte sind die Subklone aufgeführt, die nicht hier entweder keine Mutation aufweisen (u) oder eine andere Mutation zeigen (in Klammern jeweilige Aminosäure).

Die Subklone 2-7, 6-1 und 6-4 weichen mit ihrem Mutationsmuster von den anderen Subklonen der VH4-34.1-Familie ab. Mit 16 Mutationen zeigt der Subklon 2-7 die höchste Mutationsrate von allen Subklonen. Die Subklone 6-1 und 6-4 teilen nur die Mutationen im Triplet 35 und 82 mit den übrigen Subklonen. Darüber hinaus weisen sie beide 10 weitere nur ihnen gemeinsame Mutationen auf. 6-4 beherbergt zusätzlich noch zwei weitere Mutationen. Die gemeinsamen Mutationen der beiden Subklone sind in Tab. 41 dargestellt.

Tab. 41 - Tumor IV 1, VH4-34.1-Subklone, gemeinsame Mutationen von 6-1 und 6-4

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation-Nukleotid</i>	Art der Mutation
30	2	CDR I	G	C	<i>replacement</i>
35	2+3	FR II	AGC	ACG	<i>replacement</i>
51	2	CDR II	A	C	<i>replacement</i>
56	2	CDR II	G	A	<i>replacement</i>
58	3	FR III	C	G	<i>replacement</i>
69	3	FR III	A	G	<i>replacement</i>
71	3	FR III	A	G	<i>silent</i>
73	1	FR III	A	T	<i>replacement</i>
76	2	FR III	A	G	<i>replacement</i>
77	3	FR III	G	C	<i>replacement</i>
82	1	FR III	C	T	<i>silent</i>

Tab. 41 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

4.4.1.2.2 VH4-30.1-Subklone

Wie schon in 4.4.1.1.2 beschrieben, lassen sich bei den VH4-30.1-Subklonen des Tumors IV 1 vier verschiedene Untergruppen erkennen. Allen Subklonen der VH4-30.1-Familie ist dabei nur eine Mutation gemeinsam: Im Triplet 88, 3. Position. Darüber hinaus hat jede Untergruppe ihr eigenes dominierendes Mutationsmuster. In der Gruppe eins, die sich nur aus Subklonen des Follikels eins zusammensetzt, finden sich folgende 17 *common mutations*:

Tab. 42 – Tumor IV 1, VH4-30.1-Subklone, *common mutations* der ersten Gruppe

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation-Nukleotid</i>	Art der Mutation
25	3	FR I	T	C	<i>silent</i>
30	3	CDR I	C	A	<i>replacement</i>
31	2	CDR I	G	T	<i>replacement</i>
32	3	CDR I	T	C	<i>silent</i>
37	2+3	FR II	AGC	AAT	<i>replacement</i>
42	2	FR II	A	G	<i>replacement</i>
50	3	FR II	T	A	<i>silent</i>
51	3	FR II	G	C	<i>silent</i>
56	2	CDR II	G	C	<i>replacement</i>
61	2	FR III	A	C	<i>replacement</i>
70	2	FR III	C	G	<i>replacement</i>
72	3	FR III	A	C	<i>silent</i>
81	3	FR III	C	G	<i>silent</i>
88	3	FR III	T	C	<i>silent</i>
89	1	FR III	G	A	<i>replacement</i>
96	3	FR III	C	T	<i>silent</i>

Die Subklone 1-6, 1-7 und 1-8 weisen zusätzlich folgende weitere Mutationen auf:

Tab. 43 – Tumor IV 1 , VH4-30.1-Subklone, zusätzliche Mutationen 1-6, 1-7, 1-8

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation-</i> Nukleotid	Art der Mutation
58	1+2+3	CDR II	AGC	GAG	<i>replacement</i>
85	2	FR III	G	C	<i>replacement</i>

Tab. 43 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Neben den *common mutations* haben die Subklone der ersten Gruppe zusätzlich noch durchschnittlich **4,2** Mutationen pro Subklon.

In der zweiten Gruppe finden sich nur drei *common mutations*. Sie sind in Tab. 44 aufgeführt.

Tab. 44 – Tumor IV 1 , VH4-30.1-Subklone, *common mutations* 2-8, 3-1, 6-5 und 6-6

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation-</i> Nukleotid	Art der Mutation
39	3	FR II	C	T	<i>silent</i>
59	3	CDR II	C	T	<i>silent</i>
80	1	FR III	T	C	<i>replacement</i>

Tab. 44 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Darüber hinaus finden sich bei den zur Gruppe zwei gehörenden Subklonen durchschnittlich noch **2,0** weitere Mutationen pro Subklon.

Die zur Gruppe drei gehörenden Subklone 4-4 und 5-4 sind in ihrer Sequenz identisch.

Tab. 45 - Tumor IV, VH4-30.1-Subklone, Mutationen in 4-4 und 5-4

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation-</i> Nukleotid	Art der Mutation
23	1	FR I	A	G	<i>replacement</i>
39	3	FR II	C	T	<i>silent</i>
60	1	FR III	T	A	<i>replacement</i>
63	3	FR III	G	C	<i>silent</i>
69	3	FR III	T	C	<i>silent</i>
75	2	FR III	C	G	<i>replacement</i>
76	3	FR III	T	C	<i>silent</i>
84	1	FR III	C	G	<i>replacement</i>
85	2	FR III	G	A	<i>replacement</i>
93	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
94	3	FR III	G	A	<i>silent</i>
96	2	FR III	A	T	<i>replacement</i>

Tab. 45 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Der Subklon 2-6 zeigt ein ganz differentes Mutationsbild und wurde darum einer eigenen Gruppe zugeteilt. Seine Mutationen sind in folgender Tab. 46 aufgeführt.

Tab. 46 - Tumor IV, VH4-30.1-Subklone, Mutation en 2-6

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	<i>common mutation-Nukleotid</i>	Art der Mutation
23	1	FR I	A	G	<i>replacement</i>
30	3	CDR I	C	T	<i>silent</i>
31	1	CDR I	A	G	<i>replacement</i>
32	2	CDR I	G	C	<i>replacement</i>
33	2	CDR I	G	A	<i>replacement</i>
35	3	CDR I	C	T	<i>silent</i>
58	2+3	CDR II	GC	CA	<i>replacement</i>
60	2	FR III	A	T	<i>replacement</i>
62	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
63	1+2	FR III	CC	GT	<i>replacement</i>
70	1	FR III	A	T	<i>replacement</i>
71	3	FR III	A	G	<i>replacement</i>
75	2	FR III	C	T	<i>replacement</i>
80	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
81	2	FR III	C	T	<i>replacement</i>
88	1+3	FR III	ACT	GCC	<i>replacement</i>

Tabelle 46 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

4.4.1.3 Genetische Verwandtschaft

Für die Tumorsubklone der VH4-34.1-Familie wurde ein Stammbaum (Abb. 27) konstruiert. Abb. 28 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Haupt-*Clusters*. Die Subklone 1-9 und 5-8 wurden dabei nicht mit einbezogen, da sie aufgrund des Vorhandenseins keiner bzw. nur einer Mutation nicht zur Tumorzellpopulation gerechnet werden können. Auch die Keimbahnzelle der VH4-34.1-Familie wurde im *multiple alignment* einbezogen. So zeigt sich im Stammbaum, wie sich die einzelnen Subklone von der ursprünglichen Keimbahnsequenz weiterentwickelt haben. Auffällig ist hier, dass die putative Vorläuferzelle Z mit nur einer zusätzlichen Mutation in ihrer Basensequenz der ursprünglichen Keimbahnsequenz VH4-34.1 sehr nahe steht.

Es zeigt sich ein *Clustering* der meisten Subklone in einer Entfernung von 10-11 Mutationen von der putativen Vorläuferzelle Z. 41 von insgesamt 44 untersuchten Subklonen weisen weitgehende Sequenzübereinstimmungen auf. Besonders nah verwandte Subklone sind dabei häufig im selben Follikel lokalisiert. Zwei Subklone aus Follikel 6 (6-1 und 6-4) bilden jedoch einen deutlich distinkten *Cluster* mit anderem Mutationsmuster als der Haupt-*Cluster* der anderen Subklone. Der dritte im sechsten Follikel untersuchte Subklon (6-3), weist wiederum ein dem Haupt-*Cluster* zuzuordnendes Sequenzmuster auf.

Der Subklon 2-7 aus Follikel 2 fällt ebenfalls durch sein deutlich unterschiedliches Mutationsmuster (15 zusätzliche Mutationen gegenüber der putativen Vorläuferzelle Z) auf. Er ist mit keinem anderen in diesem Tumor gefundenen Subklon verwandt.

**Abb. 27: Tumor
IV 1,
phylogenetischer
Stammbaum der
VH4-34.1-
Subklone**

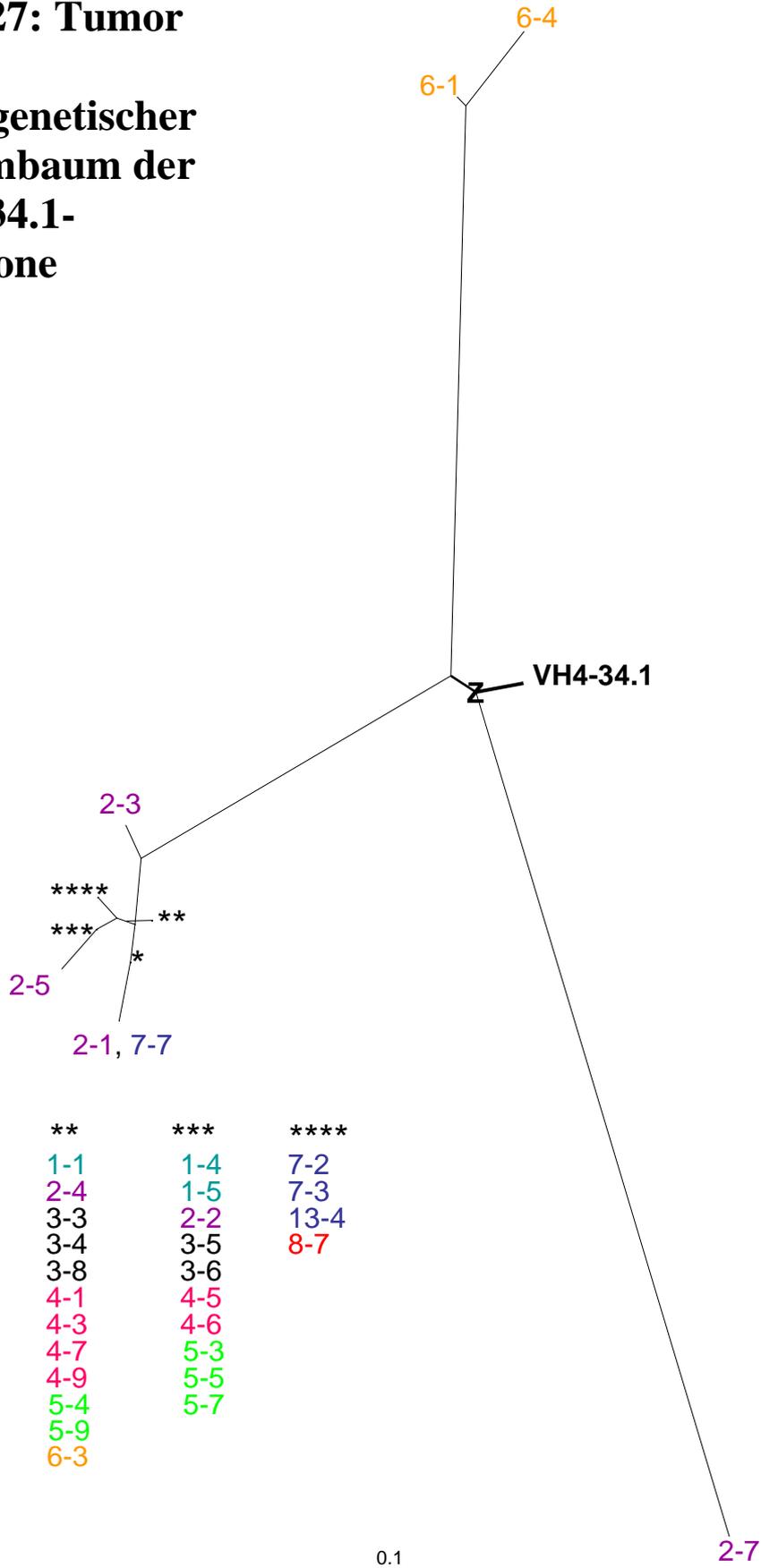
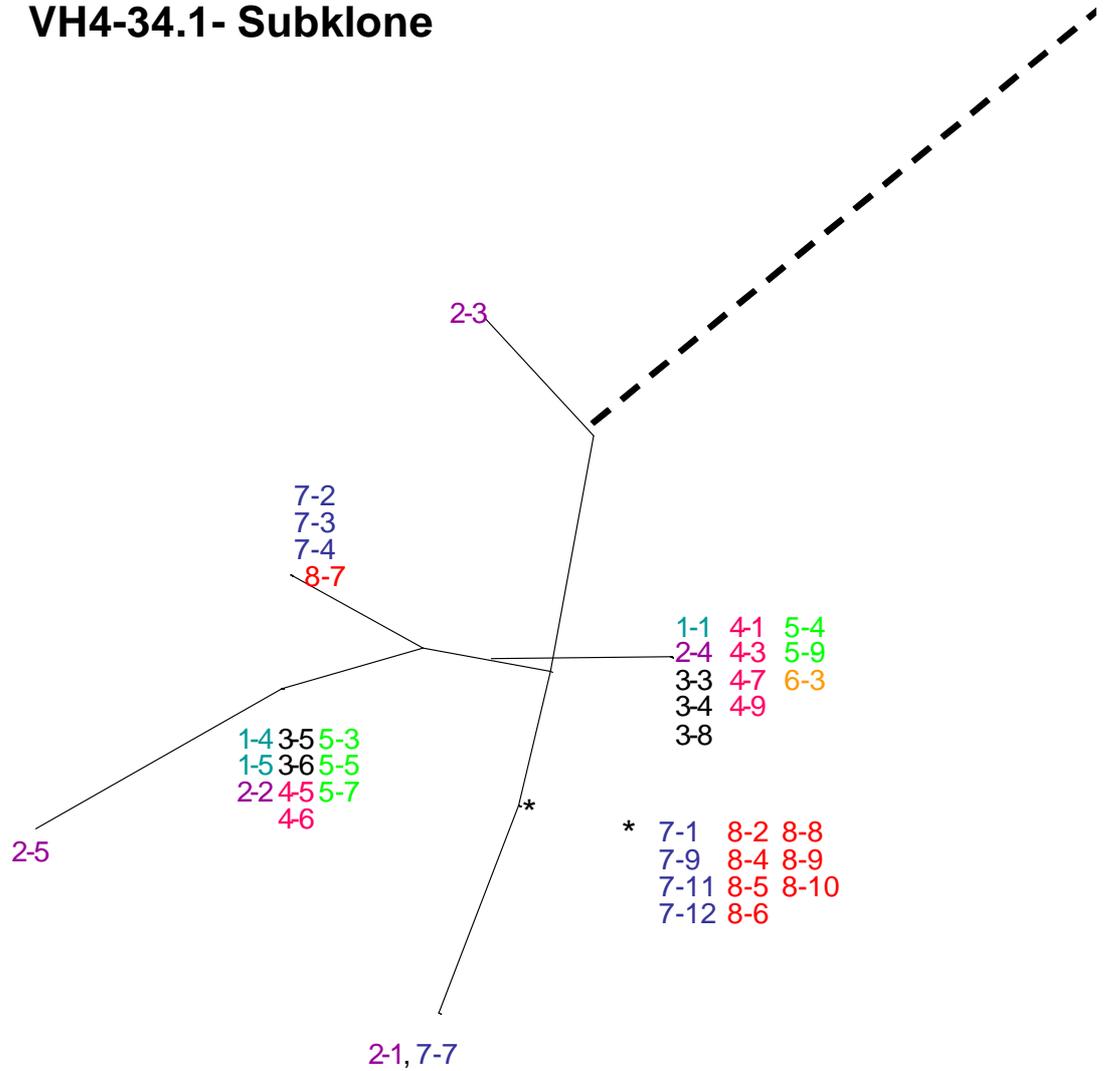


Abb. 28: Hauptcluster Tumor IV 1,
VH4-34.1- Subklone



4.4.1.4 Andere Keimbahnfamilien

Tab. 47 zeigt alle Subklone, die weiteren Keimbahnfamilien angehören. Dabei zeigt sich, dass einige Subklone kaum mutiert sind, andere hingegen bis zu 23 Mutationen aufweisen. Die höchsten Mutationsfrequenzen dieser Subklone wurden in Abb. 24 vergleichend mit den Frequenzen der anderen untersuchten Subklone dargestellt.

Tab. 47 – Tumor IV 1, andere VH-Familien, Mutationsfrequenz

VH-Familie	Subklon	Mutationsanzahl/ <i>base pairs</i>	Mutationsfrequenz
VH4-4.4	2-9	2 / 240	0,8%
	3-7	22 / 240	9,2%
VH4-30.4	3-2	9 / 243	3,7%
VH4-59.1	5-6	23 / 237	9,7%
	6-2	19 / 237	8,0%
VH4-61.1	4-2 und 5-2	1 / 243	0,4%

Die Subklone 4-2 und 5-2 sind in ihrer Sequenz identisch. Die anderen Subklone haben keine gemeinsamen Mutationen, Polymerasefehler können hier nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde nur bei den höher mutierten Subklone eine Mutationsanalyse durchgeführt.

Tab. 48 - Tumor IV 1, andere Keimbahnfamilien, Mutationsanalyse

Subklon	VH-Keimbahngen	Region	Beobachtete R	Beobachtete S	Beobachtete R/S	P	Mutationsrate
3-7	VH4-4.4	CDR	5	0	∞	0,270	9,2%
		FR	10	4	2,5	0,127	
3-2	VH4-30.4	CDR	1	0	∞	0,866	3,7%
		FR	7	1	7	0,627	
5-6	VH4-59.1	CDR	4	0	∞	0,170	9,7%
		FR	10	3	3,3	0,454	
6-2	VH4-59.1	CDR	3	2	1,5	0,398	8,0%
		FR	5	8	0,63	0,003	

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent-/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment. Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,05) (41)

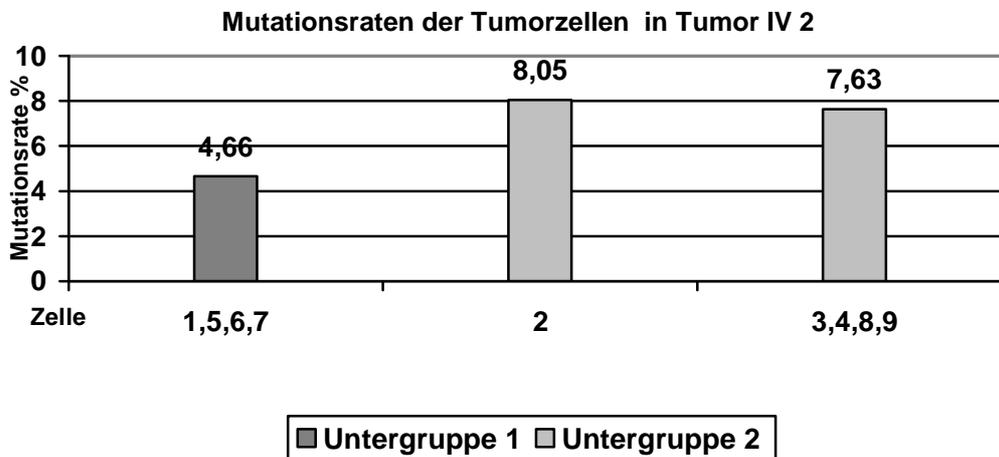
Der Subklon 6-2 zeigt im Bereich der FRs einen statistisch signifikanten p-Wert, was das Vorhandensein eines negativen Selektionsdruckes wahrscheinlich macht. Im Bereich der CDRs dieses Subklon sowie in allen Bereichen der anderen Subklone liegen die p-Werte jedoch außerhalb des Bereiches einer statistischen Signifikanz.

4.4.2 Tumor IV 2

Da Tumor IV 2 ein diffuses Wachstumsmuster aufweist, konnten die 9 untersuchten Subklone nicht einem abgrenzbaren Kompartiment zugeordnet werden. Alle Subklone dieses Tumors gehören der VH4-34.1-Familie an.

4.4.2.1 Mutationsanalyse

Die Sequenzen der Subklone des Tumors IV 2 sind unter 8.2.7 im Anhang untereinander dargestellt. Nur zwei Mutationen sind allen Subklonen dieses Tumors gemeinsam. Es zeigt sich, dass innerhalb der Tumorzellpopulation zwei Untergruppen unterschieden werden können. Die erste Untergruppe wird von den Subklonen 1,5,6 und 7 gebildet. Diese haben acht gemeinsame Mutationen. Die anderen Subklone bilden die zweite Untergruppe. Ihnen sind 21 weitere Mutationen gemeinsam. Abb. 29 veranschaulicht graphisch die Mutationsraten der Tumorsubklone.



Tab. 49 zeigt die Mutationsanalyse der Tumorsubklone. Wieder sind nur mehrfach vorkommende Mutationen berücksichtigt.

Tab. 49 – Tumor IV 2, Mutationsanalyse

Tumor-subklon	Region	Erwartete R	Erwartete S	Beobachtete R	Beobachtete S	Erwartete R/S	Beobachtete R/S	Selektion	P	Mutationsrate
1,5,6,7	CDRs	2	1	2	0	3,2	∞	+	0,36754	4,66
	FRs	7	2	6	3	3,0	2,0	+	0,34630	
2	CDRs	3	1	4	1	3,2	4,0	+	0,23353	8,05
	FRs	11	4	7	7	3,0	1,0	+	0,02136	
3,4,8,9	CDRs	3	1	4	1	3,2	4,0	+	0,20322	7,63
	FRs	11	4	6	7	3,0	0,9	+	0,01182	

R: *Replacement-/Austauschmutation*; S: *Silent-/stille Mutation*; p: Wahrscheinlichkeit, dass der Überschuss an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; In der Spalte „Selektion“ bedeutet ein „+“ im Bereich der CDR, dass die beobachtete R/S-Ratio größer ist als die Ratio, die man bei einer zufälligen Verteilung der Mutationen rechnerisch erwartet hätte (positive Selektion). Im Bereich der FRs bedeutet ein „+“, dass die beobachtete R/S-Ratio kleiner ist als die Ratio, die man bei einer rein zufälligen Verteilung der Mutationen erwartet hätte (negative Selektion). Mutationsrate: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen VH-Gensegment Die **fett** gedruckten p-Werte gelten als signifikant (<0,05) (41);

Dabei sind die Subklone 1,5,6,7, welche die erste Untergruppe bilden, und die Subklone 3,4,8 und 9, welche der zweiten Untergruppe zuzuordnen sind, in einer Zeile zusammengefasst, da sie in ihrer Anzahl an R- und S-Mutationen in den FRs und CDRs übereinstimmen. Alle Subklone haben in ihren CDRs eine höhere bzw. in den FRs eine niedrigere als die erwartete R/S-Ratio, was ein Hinweis für das Vorliegen eines Selektionsdruckes sein könnte. Doch nur im Bereich der FRs der zweiten Untergruppe, also der Subklone 2,3,4,8 und 9 handelt es sich dabei um ein statistisch signifikantes Geschehen.

4.4.2.2 Intraklonale Diversität

Die allen Subklonen gemeinsamen beiden *common mutations* zeigt Tab. 50:

Tab. 50 - Tumor IV 2, common mutations

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	common mutation-Nukleotid	Art der Mutation
35	2	FR II	G	C	<i>replacement</i>
60	3	FR III	C	T	<i>silent</i>

Tab. 50 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Die Mutationen, welche alle Subklone der ersten Untergruppe (1,5,6,7) aufweisen, sind in Tab. 51 zusammengefasst:

Tab. 51 - Tumor IV 2, common mutations der Subklone 1,5,6,7

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	common mutation-Nukleotid	Art der Mutation
28	1	CDR I	T	G	<i>replacement</i>
33	2	CDR I	A	T	<i>replacement</i>
40	1	FR II	C	T	<i>replacement</i>
42	2	FR II	G	A	<i>replacement</i>
62	3	FR III	C	A	<i>silent</i>
73	2	FR III	C	T	<i>replacement</i>
82	1	FR III	C	T	<i>silent</i>
83	2	FR III	G	A	<i>replacement</i>

Tabelle 51 gibt an, an welcher Position in welchem Nukleotidtriplett sich diese Mutationen jeweils befinden. Zugleich werden die Region und der genaue Austausch samt Art der Mutation angegeben.

Zusätzlich zu den *common mutations* weisen die Subklone dieser Untergruppe eine zusätzliche Mutationsrate von **1,25** Mutationen/Subklon auf.

Die zweite Untergruppe, die sich aus den Subklonen 2,3,4,8 und 9 zusammensetzt, weist eine viel höhere Mutationsanzahl auf. Die allen diesen Subklonen gemeinsame Mutationen zeigt Tab. 52:

Tab. 52 – Tumor IV 2, common mutations der Subklone 2,3,4,8,9

Nukleotid-triplett	Position	Region	Keimbahn-nukleotid	common mutation-Nukleotid	Art der Mutation
35	2+3	FR II	AGC	ACT	<i>replacement</i>
41	3	FR II	A	C	<i>silent</i>
42	3	FR II	G	T	<i>silent</i>
48	3	FR II	T	A	<i>silent</i>
51	3	CDR II	C	G	<i>replacement</i>
52	2	CDR II	A	T	<i>replacement</i>
53	3	CDR II	T	C	<i>silent</i>
56	1+2	CDR II	AGC	GCC	<i>replacement</i>
57	2+3	CDR II	ACC	AGA	<i>replacement</i>
58	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
59	1	FR III	T	G	<i>replacement</i>
71	1+3	FR III	GTA	CTT	<i>replacement</i>
76	3	FR III	C	T	<i>silent</i>
78	1	FR III	T	G	<i>replacement</i>
83	2	FR III	G	C	<i>replacement</i>
86	1+2	FR III	ACC	GTC	<i>replacement</i>
92	3	FR III	G	T	<i>silent</i>

Zusätzlich zu den *common mutations* finden sich pro Subklon 0,4 Mutationen. Dieser Wert ist nicht statistisch signifikant, liegt er doch unter dem durch mögliche Polymerasefehler zu berücksichtigendem Wert von ca. 0,6 Mutationen/amplifiziertem Fragment bei dieser Basenlänge.

4.4.3 Tumor IV 3

4.4.3.1 Mutationsanalyse

Aus Tumor IV 3 wurden 6 Subklone untersucht, die sich bei diffusem Wachstumsmuster nicht einem abgrenzbaren Kompartiment zuordnen lassen. Alle Subklone gehören der VH4-34.1-Familie an. Bei Betrachtung der entsprechenden Sequenzen bietet sich ein homogenes Bild (siehe 8.2.8). Es gibt 23 *common mutations*. Diese entsprechen den *common mutations* der zweiten Untergruppe im Tumor IV 2. Somit entsprechen die Werte der Mutationsanalyse des Tumor IV 3 denen der zweiten Untergruppe des Tumors IV 2 und werden darum nicht noch mal gesondert dargestellt.

4.4.3.2 Intraklonale Diversität

Im Tumor IV 3 weisen nur die Subklone 2 und 3 jeweils eine zusätzliche Mutation zu den *common mutations* auf, alle anderen Subklone dieses Tumors haben keine weiteren Mutationen. Daraus ergibt der nicht signifikante durchschnittliche Wert von zusätzlich zu den *common mutations* 0,3 Mutationen/ Subklon.

4.4.4 Vergleich Tumor IV 1, IV 2 und IV 3

Unter 8.2.9 im Anhang sind die Sequenzen der Tumoren IV 1, IV 2 und IV 3 untereinander aufgezeigt. Tumor IV2 entspricht dem Rezidiv des Tumor IV 1, welches 21 Monate nach der ersten Biopsie erneut biopsiert wurde. Es zeigt sich, dass die erste Untergruppe des Tumors IV 2 (Subklone 1,5,6,7) der dominierenden Sequenz der VH4-34.1-Subklone des Tumors IV 1 ast entspricht. Allerdings findet sich bei dreien (1,5,7) der vier zu dieser Untergruppe gehörenden Subklonen des Tumors IV 2 eine Mutation im Triplet 87, welche sich im ersten Tumor IV 1 nicht zeigt. Alle anderen Mutationsmuster der VH4-34.1-Familie sowie die weiteren Keimbahnfamilien, die im Tumor IV 1 vertreten sind, sind im Tumor IV 2 nicht mehr nachweisbar.

Die zweite Untergruppe des Tumors IV 2 findet sich nicht im Vorgänger-Tumor I vertreten. Dafür ist es diese, deren Sequenz auch im Tumor IV 3 nachweisbar ist. Bis auf zwei vereinzelte neue Mutationen im Tumor IV 3 sind die Sequenzen dieser beiden Tumore identisch.

5. Diskussion

5.1. Methodenkritische Diskussion

5.1.1. Gewebeprobe zur DNA-Gewinnung

Die Gewebeprobe fast aller Tumore wurden aus kryoasserviertem Material entnommen. So konnte eine höhere Ausbeute an DNA sichergestellt werden. Lediglich in Tumor IV 3 stand kein kryoasserviertes Material zur Verfügung. Hier wurde in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet.

5.1.2. Mikrodissektion

Das Verfahren der Mikrodissektion ermöglichte, DNA-Material aus getrennten Follikeln zu untersuchen. In vielen vorliegenden Studien (23, 45), waren Analysen nur aus der Gesamt-Tumor-DNA angefertigt worden, so dass über das Migrationsverhalten der Tumorzellen und über das jeweilige Mikromilieu in einem Follikel nicht eingegangen werden konnte. Die „Grenzen“ eines Follikels wurden mittels der Anti-CD3-Färbung, ein T-Zell-Marker, immunhistochemisch markiert. Die zu dissezierenden Follikel wurden histologisch nach tumormorphologischen Gesichtspunkten ausgewählt. Doch lassen sich die Tumorzellen von den Nicht-Tumorzellen morphologisch nicht sicher unterscheiden. Besonders im Tumor III 1 fiel auf, dass viele Follikel keine Tumorzellpopulation aufwiesen, dass also womöglich Follikel disseziert wurden, die gar kein neoplastisches Infiltrat enthielten. Auch ist die Markierung der T-Zellen mit dem CD3-Antikörper als „Negativ-Markierung“ zu sehen. So werden hier nicht die gesuchten B-Zellen, sondern die nicht für die Mikrodissektion erwünschten T-Zellen markiert. Die T-Zellen umgeben zwar üblicherweise ein Keimzentrum, doch kann anhand der Färbung nicht unterschieden werden, ob es sich um einen neoplastischen Follikel handelt oder nicht. Zudem finden sich in neoplastischen Follikeln häufig auch nicht neoplastische B-Zellen (46). Darum zeigen sich in vielen Tumoren in den Follikeln neben der Tumorzellpopulation auch nicht neoplastische Zellen.

Ein Nachteil des Verfahrens der follikulären Mikrodissektion ist es auch, dass keine Aussage über die Lage der untersuchten B-Zelle innerhalb des Follikels gemacht werden konnte. Dies wäre nur durch des Verfahren der *single-cell-microdissection* und –PCR möglich gewesen.

5.1.3. Primer , PCR und Sequenzierreaktion

Als 5'-Primer im Rahmen der *nested* PCR wurden zum einen mit den von Campbell (36) und Küppers (11) entworfenen Primern gearbeitet. Hier zeigte sich als Nachteil, dass durch Ansetzen dieser Primer im Bereich der FR I nicht von Beginn der FR I an amplifiziert wurde und somit nicht die komplette FR I zur Mutationsanalyse zur Verfügung stand. Darum entwarfen wir selbst 5'-Primer, die außerhalb der FR I-Region banden. Doch konnte nicht in allen follikelgetrennten PCR-Ansätzen tatsächlich mit diesen neu konstruierten Primern ein Amplifikat gewonnen werden, so dass hier auf die *Campbell*- und *Küppers*-Primer zurückgegriffen werden musste. Dabei muss man berücksichtigen, dass sich in FL oftmals die Amplifikation der VH-Region als schwierig gestaltet, da häufig auch die Primer-Bindungsstellen Mutationen aufweisen und somit die Primer nicht ansetzen können.

Die 3'-Primer waren so gewählt, dass sie im Bereich der JH-Region ansetzten. Somit wurden aber nicht nur die VH-Segmente der Tumorzellpopulation sondern auch die nicht neoplastischer B-Zellen amplifiziert. Hätte man allein die Tumorzellen untersuchen wollen, so wäre die Konstruktion eines Tumorspezifischen 3'-Primers im Bereich der CDR3 von Nöten gewesen.

In unserer Arbeit wurde für die PCR-Reaktionen als Polymerase die Taq-Polymerase eingesetzt. Diese zeigt den großen Vorteil einer hohen DNA-Syntheserate. Doch neigt sie aufgrund der fehlenden 3'-5' Exonucleaseaktivität zum gehäuften Einbau von falschen Basen. Daraus ergibt sich eine Fehlerrate von ca. $1/10^5$ Basen. Um die mögliche Fehlinterpretation von durch Polymerasefehler vorgetäuschte Mutationen zu vermeiden, wurden in der Mutationsanalyse und Stammbaumkonstruktion nur Mutationen berücksichtigt, die mehr als einmal auftraten. Auch wurden für die Sequenzierreaktion die zu untersuchenden Fragmente sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende her sequenziert. Somit konnte die Übereinstimmung der Sequenzen überprüft werden. Es bleibt jedoch kritisch anzumerken, dass zur Minimierung von Polymerasefehlern die Verwendung einer *proof reading*-Polymerase empfehlenswert wäre. Haben diese doch bei allerdings deutlich niedriger Syntheserate, eine viel geringere Fehlerquote (ca. $1/10^6$ Basen) als die Taq-Polymerase.

5.1.4. Mutationsanalyse und phylogenetische Software

Bei der Mutationsanalyse verwandten wir das von *Lossos et al.* zur Verfügung gestellte JAVA applet (<http://www-stat.stanford.edu/immunoglobulin>), welches mit dem multinominalen Ansatz den vier Verteilungsmöglichkeiten der R- und S-Mutationen auf die CDRs und FRs gerecht wird. Bisherige Arbeiten verwendeten bislang die von *Chang* und *Casali* (41) aufgestellte Formel, welche sich auf das von *Shlomchik et al.* (47) eingeführte binominale Distributionsmodell begründet.

Die phylogenetischen Stammbäume konstruierten wir mit Hilfe der *Clustal-X software* (40). Dabei sollte zur Kenntnis genommen werden, dass das in der *Clustal-X software* verwendete Prinzip des *Neighborhood Joining* sicherlich Ungenauigkeiten in sich trägt. Um genauere Aussagen machen zu können, müssten diffizilere statistische Methoden wie *Maximum Likelihood* (z.B. mittels des PHYLIP-Software-Paketes von *Joseph Felsenstein, Washington, 1986*) angewandt werden.

5.2. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Follikuläre Lymphome (FL) machen etwa 25-40% der Non-Hodgkin-Lymphome aus (13, 17) und werden in der Regel als systemische Erkrankung diagnostiziert (klinisches Stadium III oder IV nach der Ann Arbor Klassifikation). Die selten diagnostizierten limitierten Stadien (Ann Arbor I und II) der Erkrankung zeigen häufig einen nur partiellen Befall der betroffenen Lymphknoten durch das Lymphom. Einzelne Studien (48, 49) haben gezeigt, dass follikuläre Lymphome in diesen frühen Stadien präexistente Follikel kolonisieren („in situ“- Lymphom) und sich dann offenbar auf die übrigen Follikel des Lymphknotens ausbreiten, bevor ein systemischer Befall des gesamten Organismus feststellbar ist.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte zunächst die Frage untersucht werden, auf welchem Weg die Zellen eines Tumorklons die Keimzentren eines Lymphknotens kolonisieren. Dazu wurde die genetische Verwandtschaft der einzelnen Tumorzellen untereinander anhand ihrer intraklonalen Diversität bestimmt. Mit Hilfe von daraus berechneten phylogenetischen Stammbäumen konnte die Ausbreitung der Tumorzellen auf die vorbestehenden Keimzentren nachvollzogen werden.

Zweitens sollte in dieser Studie der Frage nachgegangen werden, ob die Tumorzellen auch unter dem Einfluss der Keimzentrumsumgebung stehen, die in der physiologischen B-Zell-Reifung für die enorme Vielfalt der Antikörperspezifität sorgt (Hypermutation). Anhaltende Mutationen (*ongoing mutations*) innerhalb eines Tumorklons würden auf einen solchen erhaltenen Einfluss der Hypermutationsmaschinerie hinweisen.

Schließlich sollte untersucht werden, ob es auch in follikulären Lymphomen eine antigenabhängige B-Zell-Reifung gibt, wie sie bei der physiologischen „Optimierung“ von Antikörper auf die relevanten Antigene zu finden ist.

5.2.1. Migrationsverhalten der Tumorzellen im follikulären Lymphom

Bislang wurde in nur wenigen Studien das Ausmaß des Austausches von Lymphozyten zwischen den einzelnen Keimzentren eines Lymphknotens unter physiologischen Bedingungen untersucht. In einer Studie (10) fanden sich Hinweise, dass es kaum einen solchen Austausch gäbe. In neoplastischen Lymphozytenpopulationen, z.B. beim follikulären Lymphom scheint dies jedoch anders zu sein: Die Diskussion darüber, wie die Keimzentren im follikulären Lymphomen entstehen, ist noch nicht endgültig geklärt. So vertreten einige

Autoren die Ansicht, dass die neoplastischen Keimzentren von den Tumorzellen *de novo* unter anderem mit Hilfe ihrer an der Zelloberfläche exprimierten Adhäsionsmoleküle gegründet werden könnten (50). In anderen Studien fanden sich Hinweise, dass vorbestehende, sogenannte reaktive Keimzentren von den Lymphomzellen kolonisiert würden. So fanden *Su et al.* (46) in fast allen Keimzentren follikulärer Lymphome reaktives Begleitinfiltrat als Hinweis auf ein präexistentes reaktives Keimzentrum vor Tumorinvasion. *Dogan et al.* (51) stellten fest, dass die Tumorzellen nicht nur Keimzentren, sondern auch interfollikuläre Areale invadieren.

Ausgehend von diesen Resultaten, sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, ob es eine Migration neoplastischer Zellen zwischen den Follikeln gibt und in welchem genetischen Verwandtschaftsverhältnis die Tumorzellen untereinander stehen. Bei der Berechnung der phylogenetischen Stammbäume gingen wir von der These aus, dass gleiche Mutationen, die in verschiedenen Klonen gefunden wurden, auf eine gemeinsame Ursprungszelle zurückzuführen seien, von der sich die Zellen dann durch weitere Mutationen weiterentwickelt haben. Die sequenzierten Tumorzellen zeigten in ihrer Mehrzahl eine Reihe von Mutationen, die an den identischen Basenpositionen zu finden waren und daher den klonalen Ursprung der Tumorzellen widerspiegelte. Die theoretische Möglichkeit, dass gleiche Mutationsmuster in verschiedenen Tumorzellen zufällig entstanden sein könnten und nicht auf einen gemeinsamen Ursprung aus einer Vorläuferzelle zurückzuführen wäre, erscheint demgegenüber unwahrscheinlich.

Die Analyse der phylogenetischen Stammbäume offenbarte im Gegensatz zu nicht neoplastischen Follikeln (10) einen extensiven Austausch von Tumorzellen zwischen den verschiedenen Follikeln.

In einem Fall eines follikulären Lymphoms Grad I (Tumor I) fand sich ein ausgeprägtes „*clustering*“ der Tumorzellen entsprechend den Follikeln, aus denen sie „gepickt“ worden waren. Die Zellen innerhalb eines Follikels wiesen also untereinander eine engere Verwandtschaft als mit Zellen anderer Follikel auf. Die Tumorzellen der einzelnen Follikel unterschieden sich durch zusätzliche Einzelmutationen voneinander, so dass in diesem Fall offenbar nach der Besiedlung der entsprechenden Follikel die Tumorzellen weiterhin dem Einfluss der Hypermutationsmaschinerie des Keimzentrums ausgesetzt waren, wodurch die weiteren Mutationen (*ongoing mutations*) erworben wurden. Dennoch war auch hier ein einzelner Austausch von Zellen zwischen den Follikeln erkennbar.

Im Fall eines folliculären Lymphomes Grad II (Tumor II) war dieser Austausch von Tumorzellen zwischen den Follikeln jedoch deutlich ausgeprägter. Trotzdem konnte auch hier noch ein zumindest rudimentäres *Clustern* der Tumorzellen entsprechend ihrer Follikel festgestellt werden. Beide Fälle wiesen eine hohe Mutationsrate auf (jeweils bis 11%), die auf eine fortbestehende Wirksamkeit der Hypermutationsmaschinerie in beiden Fällen hinweist (11, 44).

Von einem weiteren Patienten mit folliculärem Lymphom Grad II konnten zwei Lymphknotenbiopsien untersucht werden: die zervikale Primärmanifestation und ein 34 Monate später diagnostiziertes Rezidiv in der Axilla. Im Vergleich der beiden Tumore finden sich lediglich zwei übereinstimmende Mutationen, d.h. das klonale Mutationsmuster des Primärtumors (Tumor III 1) lässt sich im Rezidiv (Tumor III 2) nicht wiederfinden. Zum einen könnte dies dadurch erklärt werden, dass der entsprechende Klon im Tumor III 2 zwar vorhanden gewesen sein könnte, aber nicht erfasst wurde. Bei insgesamt 46 untersuchten Zellen (3 neoplastische und 43 reaktive) erscheint dies aber unwahrscheinlich. Umgekehrt wäre es angesichts der nur geringen Anzahl von Tumorzellen, die in der Mutationsanalyse des Primärtumors zur Verfügung gestanden haben, zu diskutieren, ob der dominante Klon der Familie VH4-34.1 des Rezidives bereits im Primärtumor vorhanden war, hier aber nicht detektiert wurde. Dieser Klon könnte dann im Verlauf der Krankheit z.B. auch durch Therapieeinflüsse einen Überlebensvorteil erlangt haben (45). Vom Wachstumsmuster und dem *Clustering* der Tumorzellen in den jeweiligen Follikeln ähnelt der Rezidivtumor III 2 dem zweiten Fall (Tumor II): ein rudimentäres *Clustering* ist zu erkennen, aber der interfollikuläre Austausch ist gegenüber dem folliculären Lymphom Grad I (Tumor I) deutlich erhöht. Vom Primärtumor III 1 dieses Falles (Pat. 3) standen nur drei Zellen der Tumorzellpopulation zur Analyse zur Verfügung, so dass über das Lokalisationsmuster der Tumorzellen bezüglich der einzelnen Follikel keine zuverlässige Aussage möglich ist.

Die Mutationsfrequenz in der Tumorzellpopulation des Rezidives III 2 ist mit 4-5% sehr viel niedriger als die im Primärtumor III 1 (10%). Auch in anderen Arbeiten wurde ein Rückgang der Mutationsrate im Rezidiv eines Tumors beobachtet (23, 45, 52), der auf eine Verminderung der Mutationsfähigkeit hinweisen könnte. Dieses Phänomen könnte man zum einen so erklären, dass Subklone mit niedriger Mutationsrate z.B. durch Therapieeinflüsse besonders selektioniert worden sein könnten. Zum anderen könnte man die Vermutung aufstellen, dass die Tumorzellen in der Progression ihre weitergehende Mutation einstellen. Dem im Laufe des Transformationsprozesses neigen die Tumorzellen dazu, Mutationen zu

erwerben, die zwar einen Wachstumsvorteil mit sich bringen, aber mit der Fähigkeit zur somatischen Hypermutation interferieren können. So werden während des Hypermutationsprozesses auch Mutationen in Nicht-Immunglobulin-Genen, wie z.B. das BCL-6-Gen akquiriert, die als notwendig für eine intakte Keimzentrumsfunktion angesehen werden (84, 85).

Von dem vierten Patienten dieser Studie wurden außer dem Primärtumor IV 1 ein erstes Rezidiv (IV 2) nach 21 Monaten und ein zweites Rezidiv (IV 3) nach weiteren 11 Monaten untersucht. Im Primärtumor IV 1, der histomorphologisch einem Grad II zugeordnet wurde, fand sich eine klonale Tumorzellpopulation, die noch *ongoing mutations* aufwies und damit noch dem Einfluss der Hypermutationsmaschinerie ausgesetzt war. Die Rezidive (Tumor IV 2 und IV 3) des Tumors I zeigten histologisch ein anderes Wachstumsmuster: beide entsprachen mit einem überwiegend diffusen Wachstumsmuster einem folliculären Lymphom Grad IIIa. Solche Änderungen in der Morphologie werden bei Progression von folliculären Lymphomen häufiger beobachtet. In etwa einem Drittel der Fälle kommt es zu einer Transformation zu einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBL) (53), was nach aktueller Meinung als Akzeleration der Lymphomerkrankung angesehen wird (54). Die klinische Bedeutung diffuser Anteile in folliculären Lymphomen wird demgegenüber noch kontrovers diskutiert (55-57).

Die genetische Analyse der VH-Regionen des ersten Rezidives (Tumor IV 2) zeigte bei einer Untergruppe von 4 Tumorzellen (Zellen 1,5,6 und 7) ein mit der Tumorzellpopulation des Primärtumors IV 1 fast identisches Mutationsmuster. Drei dieser Zellen wiesen darüber hinaus übereinstimmend eine zusätzliche Basenmutation auf. Ähnliche Beobachtungen machten *Aarts et al.* (58), wobei sie dieses Phänomen eher der Selektion eines Subklones als einer klonalen Evolution zuschrieben. Angesichts der repräsentativen Anzahl von 44 untersuchten Zellen aus dem Primärtumor, in denen diese zusätzliche Mutation nicht ein einziges Mal festgestellt werden konnte, scheint eine klonale Evolution in diesem Fall aber deutlich wahrscheinlicher.

Neben der beschriebenen Untergruppe von Tumorzellen, die eine solch ausgesprochene Homologie mit der Tumorzellpopulation des Primärtumors zeigten, fand sich im ersten Rezidiv auch eine Gruppe von 5 Tumorzellen derselben VH-Familie mit einem grundsätzlich unterschiedlichen Mutationsmuster. Dieses Muster war im Primärtumor nicht zu finden. Die theoretische Möglichkeit, ob es vielleicht im Primärtumor schon vorhanden war, aber nicht detektiert wurde, erscheint auch hier angesichts der großen Anzahl von untersuchten

Tumorzellen im Primärtumor unwahrscheinlich. Der fehlende Nachweis einer Übergangspopulation zwischen den so unterschiedlichen Mutationsmustern und die geringe Anzahl gemeinsamer Mutationen, lassen eine klonale Verwandtschaft den beiden Untergruppen nicht sehr naheliegend erscheinen.

Die Analyse der Mutationen in den *framework regions* (FR) der zweiten Untergruppe ergab hier deutliche Hinweise auf eine negative Selektion ($p \leq 0,02$), während in der ersten Untergruppe für eine solche Selektion keine ausreichende Signifikanz vorlag ($p = 0,35$).

Da im zweiten Rezidiv dann nur noch das Mutationsmuster der zweiten Untergruppe zu finden war, ist anzunehmen, dass hier ein Überlebensvorteil der zweiten Untergruppe bestand. Ein Zusammenhang mit der negativen Selektion erscheint hierbei möglich. Zur Frage, ob eine Konservierung der Struktur und somit auch der Funktionalität des B-Zell-Rezeptors wichtig für die klonale Expansion des Tumors ist, sind die Diskussionen noch nicht abgeschlossen: Während früher ein intakter B-Zell-Rezeptor als Voraussetzung für das Tumorwachstum galt (52, 70, 71), so wird diese These immer häufiger bezweifelt (23, 45, 59).

Im vorliegenden Fall könnte das alleinige Auftreten der zweiten Tumorzell-Untergruppe aus dem ersten Rezidiv IV 2 im zweiten Rezidiv IV 3 die These stützen, dass der hier funktionale B-Zell-Rezeptor einen Selektionsvorteil bedeutet. Diese zweite Untergruppe von Tumorzellen ist darüber hinaus viel höher mutiert als die erste, was auf das intensive Einwirken der Mutationsmaschinerie hinweist, bei der nicht nur die VH-Regionen der Immunglobulinketten dem somatischen Mutationsprozess unterzogen werden, sondern sich auch an anderen Stellen Mutationen und genetische Alterationen finden, die einen Überlebensvorteil und eine Progression bedingen können. So werden bei folliculären Lymphomen häufig Mutationen in Protoonkogenen beobachtet (60-62).

Die Lokalisation der Tumorzellen des Primärtumors IV 1 in den verschiedenen Follikeln zeigte Ähnlichkeit mit den andern beiden Fällen von folliculären Lymphomen Grad II (Tumor II und Tumor III 2): ein gewisses *Clustering* der Zellen in den jeweiligen Follikeln war zwar erhalten, es fand sich aber eine ausgeprägte Migration der Tumorzellen zwischen den Follikeln. Die beiden untersuchten Rezidivtumoren zeigten morphologisch ein rein diffuses Wachstum, so dass eine Lokalisation der Tumorzellen in abgrenzbaren Kompartimenten hier jeweils nicht möglich war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der interfollikuläre Austausch von Tumorzellen in folliculären Lymphomen in offenbar sehr unterschiedlichem Maße vorhanden sein kann. In der vorliegenden Studie wurden folliculäre Lymphome Grad I bis III untersucht. Dabei wies der Tumor I (Grad I) ein sehr viel stärkeres „*Clustering*“ als alle höhergradigen FL auf;

In Tumor I wurden die Tumorzellen, die durch fortlaufende Mutationen aus einer gemeinsamen Vorgängerzelle hervorgegangen waren, auch weitgehend im selben Follikel aufgefunden. Demgegenüber zeichneten sich die höhergradigen Lymphome durch einen deutlich stärkeren interfollikulären Austausch aus. Hier waren die „verwandten“ Tumorzellen, die ähnliche Mutationsmuster zeigten, über mehrere Follikel verteilt zu finden.

5.2.2. Ongoing Mutations

Das aktuelle Konzept der Tumorgenese der folliculären Lymphome postuliert, dass die Tumorzellen Charakteristika ihres physiologischen Gegenstücks (hier die Keimzentrumszelle) behalten und auch exprimieren soll (21, 52, 70). Vor diesem Hintergrund spricht der Nachweis einer anhaltenden Entstehung von Neumutationen (sogenannten „*ongoing mutations*“) im B-Zell-Rezeptor-Gen der Tumorzellen für einen erhaltenen Einfluss der Hypermutationsmaschinerie, die unter physiologischen Bedingungen die breite Vielfalt im Antikörperrepertoire des Organismus sicherstellt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass in folliculären Lymphomen *ongoing mutations* als Charakteristikum für die Keimzentrumsabstammung nachweisbar sind (21, 52, 63, 70). Im Verlauf einer Tumorprogression findet sich demgegenüber häufig eine Einengung der Variationsbreite der Mutationsmuster (23,45), *ongoing mutations* sind dann nicht mehr nachweisbar. Tumorbologisch entzieht sich das Lymphom mit diesem Befund dem Einfluss der Keimzentrums Umgebung.

In Übereinstimmung mit diesen Daten waren in der vorliegenden Arbeit in allen Primärbiospien mit Ausnahme von Patient 3 (Tumor III 1) *ongoing mutations* nachweisbar. Im Tumor III 1 waren nur drei der untersuchten Zellen der Tumorzellpopulation zugehörig. Darum lässt sich für diesen Fall keine sichere Aussage über das Vorliegen von *ongoing mutations* machen. Bei dem konsekutiv untersuchten Rezidiv dieses Patienten (Tumor III 2) waren keine *ongoing mutations* nachweisbar.

Bei Patient 4 fanden sich im ersten Rezidiv (Tumor IV 2) zwei Subpopulationen von Tumorzellen: die eine hatte ein mit dem Primärtumor weitgehend identisches Mutationsmuster, die zweite entsprach dem Muster des elf Monate später diagnostizierten zweiten Rezidives (Tumor IV 3). Histologisch entsprechen beide Rezidive einem Übergang in Grad 3a mit ausgedehnt diffusum Wachstum. In beiden Rezidiven waren keine *ongoing mutations* mehr feststellbar.

Eine solche intraklonale Evolution von der Heterogenität zur Homogenität, wie sie bei den Patienten 2 und besonders auch 4 zu erkennen ist, findet sich häufig in den Rezidiven der folliculären Lymphome: Nur eine Tumorzellpopulation, die die Fähigkeit zu *ongoing mutations* verloren hat, dominiert das Tumorgeschehen (22). Solche Beobachtungen wurden auch bei der Transformation von folliculären zu diffusen Lymphomen gemacht (64, 65). Ein möglicher Einfluss einer den Rezidiven meist vorangegangener Therapie auf die Selektion einer besonders therapieresistenten Zellpopulation, wird diskutiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *ongoing mutations* als Zeichen für einen erhaltenen Einfluss der Hypermutationsmaschinerie des Keimzentrums nur bei FL Grad I und II (Tumor I, II und IV 1) zu finden waren. In den höhergradigen folliculären Lymphomen (Grad IIIa) und insbesondere in der Tumorprogression fand sich ein „starres“ Mutationsmuster, das die fehlende Beeinflussbarkeit durch die Keimzentrums Umgebung widerspiegelte.

5.2.3. Antigenabhängige Hypermutation

Follikuläre Lymphome zeigen auf morphologischer und genetischer Ebene viele Ähnlichkeiten zu ihren nicht-neoplastischen „Gegenstücken“, den normalen Keimzentrums-B-Zellen (21). Diese können nur durch Antigen-gesteuerte Selektion der Apoptose entgehen. Dieser Mechanismus wird zur Optimierung der Antikörper-Passgenauigkeit eingesetzt. Der unter Antigen-Einfluss ablaufende Hypermutationsprozess zeigt eine charakteristische Verteilung der Mutationen nach einem typischen Muster (66): In den *complementarity determining regions* (CDR) überwiegen *replacement* (R)-Mutationen, bei denen die entstandene Basenmutation zu einem Austausch der betreffenden Aminosäure gegen eine andere führt. Durch die veränderten sterischen Eigenschaften der Antigenbindungsstelle des B-Zell-Rezeptors resultieren u.U. eine veränderte Spezifität und Bindungsstärke.

In den *framework regions* (FR) finden dagegen mehr *silent* (S)-Mutationen statt. Dabei führt die Einzelbasenmutation wegen des sogenannten „degenerierten“ genetischen Codes (mehrere unterschiedliche Basentriplets codieren die gleiche Aminosäure) nicht zu einem Austausch der resultierenden Aminosäure. Das trägt zu einer Konservierung dieser nicht-antigenbindenden, aber für die Struktur des Rezeptors essentiellen Strukturen bei.

In der Vergangenheit wurden in mehreren Studien auch in folliculären Lymphomen solche charakteristischen Verteilungsmuster gefunden, so dass der Schluss nahe liegt, dass es auch in folliculären Lymphomen eine antigen-gesteuerte Hypermutation geben kann (52).

In den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren zeigt nur Tumor I, ein folliculäres Lymphom Grad I, eine gemäß der R/S-Analyse eine Mutationsverteilung, die auf einen extensiven Antigen-Einfluss auf die CDRs zurückgeführt werden kann. Dieser Befund widerspricht nicht den Daten in der Literatur, denn viele der bisher veröffentlichten Arbeiten umfassten nur eine geringe Anzahl von untersuchten Fällen. Bei einer umfangreicheren Studie über 50 folliculäre Lymphome erwies sich ebenfalls nur ein geringer Prozentsatz tatsächlich antigenselektiert (59). Auch in postgerminalen Lymphomen wie dem multiplen Myelom (67), bei denen aufgrund ihrer Abstammung von einer reifen B-Zelle eigentlich eine Antigen-selektierte Hypermutation zu erwarten wäre, war eine solche in nur rund 20 % zu finden (68). *Ziegner et al.* konnten demonstrieren, dass sich in Keimzentren nach Antigen-Stimulation unterschiedliche B-Zell-Reaktionen finden (69): Neben den als charakteristisch beschriebenen Keimzentren von hypermutierten B-Zellen mit hochaffinen B-Zell-Rezeptoren fanden sich auch Keimzentren, die unmutierte B-Zellen oder nur gering mutierte B-Zellen mit willkürlich verteilten Mutationen aufwiesen. Diese Heterogenität von antigenabhängig und –unabhängig mutierten Zellen könnte auch bei folliculären Lymphomen vorhanden sein.

In den für die Rezeptorstruktur wichtigen *framework regions* (FR) weisen alle untersuchten folliculären Lymphome weniger R-Mutationen auf, als man bei einer zufälligen, nicht Antigen-selektierten Mutationsverteilung erwarten würde. Auch wenn nicht bei allen Tumoren statistische Signifikanz vorliegt, so erweisen sich die R/S-Ratios in den FRs als so niedrig, dass von einer noch vorhandenen Funktionalität der Antikörperrezeptoren ausgegangen werden kann: *Shlomchik et al.* (47) gehen davon aus, dass in den FRs bis zu der Hälfte aller möglichen Mutationen R-Mutationen sein können, um noch eine Funktionalität des B-Zell-Rezeptors zu gewährleisten. *Pascual et al.* (43) fanden die Grenze der Funktionsfähigkeit bei 30% aller möglichen Mutationen. Allgemein wird eine R/S-Ratio in den FRs von bis zu 1,5-1,8 als Kriterium der Funktionalität eines VH-Genes angenommen (59). Dies legt die Vermutung nahe, dass zumindest zu einem Zeitpunkt während der Tumorgenese die Expression eines funktionsfähigen B-Zell-Rezeptors wichtig für die Zelle gewesen ist.

Auch in anderen Arbeiten wurde bei folliculären Lymphomen eine allein auf die FRs beschränkte Selektion beobachtet (23, 45, 59). Während früher die Funktionalität des BCR als Voraussetzung für das Tumorwachstum angesehen wurde (52, 70, 71), so scheint dies nach

neueren Ergebnissen nicht in allen Fällen notwendig zu sein: Es wurden neben sIg-negativen folliculären Lymphomen (21) auch solche beobachtet, die ein Stop-Codon in ihrer VH-Region nicht nur im Primärtumor sondern auch im Rezidiv trugen (23). Es besteht zwar die Möglichkeit, dass eine gewisse Anzahl der beobachteten Mutationen stattgefunden haben, bevor es zu einem expansiven Tumorwachstum kam. Dennoch deutet die Präsenz eines funktionsfähigen B-Zell-Rezeptors in allen in dieser Studie untersuchten Tumoren auf eine weiter stattfindende Selektion hin.

Die Evaluierung der erhaltenen Ergebnisse wird durch einige grundsätzliche Überlegungen kompliziert: Bei der Mutationsanalyse wird von der Annahme ausgegangen, dass die CDRs die Regionen repräsentieren, welche mit dem Antigen in Kontakt treten, wohingegen die FRs allein strukturelle Bedeutung für den B-Zell-Rezeptor hätten. Kristallographisch konnte aber gezeigt werden, dass die CDRs zwar ungefähr den an der Oberfläche des Antikörpers liegenden Aminosäure-Schleifen entsprechen, die für die Antigenbindung verantwortlich sind, aber nicht vollständig mit ihnen identisch sind (72). Das bedeutet, dass nicht alle Mutationen in den CDRs tatsächlich eine Affinitätsänderung gegenüber dem relevanten Antigen hervorrufen. Ebenso wurde auch gezeigt, dass in manchen Fällen auch die FRs an der Bindung von Antigenen beteiligt sind (73, 74). Eine geringe Verschiebung der Zuordnung einer Basenmutation zu einem CDR- oder FR-Bereiche für die R-S-Analyse kann aber den berechneten Quotienten drastisch verändern, da es sich meist um statistisch kleine Zahlen handelt. Relativierend auf die Bedeutung der Mutationsanalyse wirkt sich darüber hinaus die Beobachtung aus, dass selbst Antikörper in Keimbahnkonfiguration, d.h. ohne jegliche zusätzliche Mutation, Antigene fest binden können (75) ebenso wie Antikörper, die nur eine einzige Mutation aufweisen (76, 77). Alle zusätzlichen während des Prozesses der somatischen Hypermutation angesammelten Mutationen würden dann zwar strukturell geduldet, trügen aber zur Affinitätsreifung tatsächlich nichts weiter bei.

Im folliculären Lymphom verharren die Tumorzellen sehr viel länger in den Keimzentren als normale B-Zellen. Mit zunehmender Verweildauer im Keimzentrum könnten daher die Tumorzellen so viele zufällige zusätzliche Mutationen akquirieren, dass die Antigenabhängigkeit der Mutationen nicht mehr erkennbar wäre (78, 79). In der Mutationsanalyse könnte dann eine Antigen-unabhängige Mutationsverteilung resultieren, obwohl die Tumovorläuferzellen durchaus dem Antigen-gesteuerten Selektionsdruck ausgesetzt waren und eine Affinität für das entsprechende Antigen aufgewiesen hatten. *Küppers et al.* konnten außerdem in mehreren Fällen zeigen, dass offensichtlich durch Antigen-Einfluss selektionierte Immunglobuline eine Rückmutation von R-Mutationen

zeigten, so dass eine niedrigere R/S-Ratio resultierte. Dadurch aber näherten sich die beobachteten Werte den erwarteten, was das Erkennen der Antigen-gesteuerten Selektion deutlich erschwerte (80). Als weiterer Befund ist von Bedeutung, dass sich die Mutationen, anstatt wahllos über das VH-Segment verteilt zu sein, in so genannten *hot spots* (81) konzentrieren. Hierbei sind bevorzugt das Motiv RGYW in der CDR1 bzw. WRCY in der CDR2 betroffen (82), wobei R für die Purine A und G, Y für die Pyrimidine C und T, W für A und T steht. Natürlich könnten auch *hot spot*-Mutationen durch einen Antigeneinfluss selektioniert worden sein. Die in unterschiedlichen Antikörpern, die als Antwort auf verschiedene Antigene generiert wurden, aber immer wieder auftauchenden gleichen Mutationsmuster weisen auf einen intrinsischen Prozess hin, der Antigen-unabhängig ist, was anhand von Häufungen von S-Mutationen verdeutlicht werden kann. Findet sich also in einem *hot spot* einer CDR beispielsweise eine R-Mutation, so wird sie in die Mutationsanalyse als Kriterium einer positiven Selektion eingehen, obwohl sie wahrscheinlich nicht Antigen-gesteuert ist.

Zusammenfassend fanden wir also nur in einem Fall (Tumor I, FL Grad I) der insgesamt sieben untersuchten follikulären Lymphome eine erhaltene antigen-gesteuerte Hypermutation, wie sie vom nicht-neoplastischen „Gegenstück“, der Keimzentrums-B-Zelle bekannt ist. Alle in dieser Arbeit untersuchten follikulären Lymphome zeigten eine noch intakte Funktionalität des B-Zell-Rezeptors, deren Bedeutung für das Tumorstadium noch kontrovers diskutiert wird. Es ist aber einschränkend zu bemerken, dass die Mutationsanalyse aus den genannten Gründen nicht mit Sicherheit beweisen oder ausschließen kann, in welchem Maße eine antigengesteuerte Hypermutation vorgelegen hat.

5.2.4. Nicht neoplastisches Begleitinfiltrat

Da die Amplifikation der VH-Regionen mit nicht Tumor-spezifischen Primern erfolgte, gingen auch nicht neoplastische B-Zellen in die Untersuchungen mit ein. Aussagen bezüglich Quantität sind aber nicht möglich, da mit VH-familienspezifischen Primern gearbeitet wurde. Bei den nicht neoplastischen B-Zellen handelt es sich zum großen Teil um prägerminale, nur gering mutierte B-Zellen. Reaktive B-Zellen wurden kaum gefunden.

6. Zusammenfassung

Follikuläre Lymphome (FL) machen etwa 25-40% der Non-Hodgkin-Lymphome (13,17) aus und sind in der Regel bereits bei Diagnosestellung nicht mehr auf den Lymphknoten beschränkt, sondern systemische Erkrankungen. In jüngeren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die selten diagnostizierten limitierten Stadien (Ann Arbor I und II) der Erkrankung häufig einen nur partiellen Befall der betroffenen Lymphknoten durch das Lymphom zeigen. In diesen frühen Stadien kolonisieren follikuläre Lymphome präexistente Follikel (*in situ*- Lymphom) und breiten sich dann offenbar auf die übrigen Follikel des Lymphknotens aus, bevor ein systemischer Befall des gesamten Organismus feststellbar ist (48, 49).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst zu untersuchen, auf welchem Weg die Zellen eines Tumorklons im follikulären Lymphom die Keimzentren eines Lymphknotens kolonisieren. Dazu wurde die genetische Verwandtschaft der einzelnen Tumorsubklone untereinander anhand ihrer individuellen Mutationsmuster bestimmt. Mit Hilfe von daraus berechneten phylogenetischen Stammbäumen konnte die Ausbreitung der Subklone auf die vorbestehenden Keimzentren nachvollzogen werden.

Zweitens sollte in dieser Studie der Frage nachgegangen werden, ob die Tumorsubklone auch unter dem Einfluss der Keimzentrumsumgebung stehen, die in der physiologischen B-Zell-Reifung für die enorme Vielfalt der Antikörperspezifität sorgt (Hypermutation). Anhaltende Mutationen (*ongoing mutations*) innerhalb eines Tumorklons würden auf einen solchen erhaltenen Einfluss der Hypermutationsmaschinerie hinweisen.

Schließlich sollte untersucht werden, ob es auch in follikulären Lymphomen eine antigenabhängige B-Zell-Reifung gibt, wie sie bei der physiologischen „Optimierung“ von Antikörpern auf die korrespondierenden Antigene zu finden ist.

Material und Methode: Sieben Fälle von follikulären Lymphomen von vier Patienten (davon einer mit einem und einer mit zwei Rezidiven ihrer Lymphomerkkrankung) wurden morphologisch und immunhistochemisch reevaluiert. Pro Fall wurden bis zu zehn Follikel mikrodisseziert und pro Follikel die VH-Gene von bis zu zehn Subklonen sequenziert. Computerunterstützt wurden sowohl die genetische Verwandtschaft der Tumorsubklone untereinander und ihre Verteilung auf die einzelnen Follikel, als auch das Verhältnis von R-

zu S- Mutationen in den verschiedenen Abschnitten des BCR-Gens und damit ein möglicher Antigen-Einfluss auf die Hypermutation analysiert.

Ergebnisse: Ein FL Grad I zeigte ein deutliches *Clustering* von genetisch miteinander verwandten Tumorsubklonen im selben Follikel. Dennoch fand sich ein moderater interfollikulärer Austausch der Subklone. Bei morphologisch höhergradigen FL (Grad II und IIIa) nahm das *Clustering* deutlich ab und der interfollikuläre Austausch zu, bis im zweiten Rezidiv eines Patienten ein weitgehend diffuses Wachstum resultierte.

Als Ausdruck des erhaltenen Einflusses des Keimzentrums zeigten alle Primärtumoren (FL Grad I und II) noch *ongoing mutations*, während bei FL in Progression keine *ongoing mutations* mehr feststellbar waren.

Eine Häufung von R-Mutationen in den antigenbindenden Domänen des B-Zell-Rezeptors (CDR) und S-Mutationen in den strukturellen Domänen (FR) als Hinweis auf eine antigen-gesteuerte Hypermutation in den Tumorsubklonen fand sich nur in einem FL Grad I. Aus den genetischen Analysen ergaben sich aber Hinweise auf eine erhaltene Funktionalität des B-Zell-Rezeptors in allen sieben Fällen.

7. Literaturverzeichnis

1. Nunez C, Nishimoto N, Gartland GL, Billips LG, Burrows PD, Kubagawa H and Cooper MD: B cells are generated throughout life in humans *J Immunol* 1996; 156: 866 - 872.
2. Porter RR: Lecture for the Nobel Prize for physiology of medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972 [classical article]. *Scand J Immunol* 1991;34(4):381-389
3. Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575
4. Waldmann TA: The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 1987; 40:247-321
5. Tonegawa S: The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1987: Somatic generation of immune diversity [classical article] *Scand J Immunol* 1993;38(4):303-319
6. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, Thomas E, Boss MA, Landau N, Alt FW, Baltimore D: Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 1984; 311:752
7. Padlan EA: Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 1994; 31(3): 169-217
8. Kabat EA, Wu TT: Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 190:382
9. Berek C, Berger A, Apel M: Maturation of the immune response in germinal centres. *Cell* 1991; 67:1121-1129
10. Jacob J, Kelsoe G, Rejewsky K, Weiss U: Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991; 354:389-392
11. Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K: Tracing B cell development in human germinal centers by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 1993;12 (13): 4955-67
12. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan ICM: Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989;342:929
13. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML et al: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994;84:1361-1392
14. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Müller-Hermelink HK: World health organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol* 1999;111(1 Suppl 1):S 8-12

15. Stansfield HG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelenyi G et al: Kiel classification. *Lancet* 1988;1:292-292
16. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. Reproducibility of major classification systems. NCI non-Hodgkin's Classification Project Writing Committee. *Cancer* 1985;55:91-95
17. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849
18. Hiddemann W, Unterhalt M, Sack H: Current status of therapy of follicular germ center lymphoma and mantle cell lymphoma. *Internist (Berl)* 1997;28(2):122-134
19. Yahalom J: Radiation therapy in the treatment of lymphoma. *Curr Opin Oncol* 1999;11(5):370-374
20. Levy S, Mendel E, Kon S, Avnur Z, Levy R: Mutational hot spots in Ig V genes of human follicular lymphomas. *J Exp Med* 1988;168:475
21. Zelenetz AD, Chen TT, Levy R: Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigen selection. *J Exp Med* 1992;176:1137
22. Zhu D, Hawkins RE, Hamblin TJ, Stevenson FK: Clonal history of a human follicular lymphoma as revealed in the immunoglobulin variable region genes. *Br J Haematol* 1994;86:505
23. 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* 1998;91:4292
24. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A: Distinctive chromosomal abnormalities in histological subtypes of non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1982;307:1231-1236
25. Rowley JD: Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14;18 translocation. *J Clin Oncol.* 1988;6:919-925
26. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al.: Cloning the chromosomal breakpoint of the t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41:899-906
27. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229:1390-1393

28. Cleary ML, Sklar J: Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:7439-7443
29. Tsujimoto Y, Croce CM: Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5214-5218
30. Cleary ML, Smith SD, Sklar J: Cloning and structural analysis of cDNA for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986; 47:19-28
31. Bakhshi A, Wright JJ, Graninger W, et al.: Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2396-2400
32. Graninger WB, Seto M, Boutain B, Goldman P, Korsmeyer SJ: Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest* 1987; 80:1512-1515
33. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is a inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-336
34. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al.: Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1998; 57:79-88
35. Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ: Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived haematopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; 144:3602-3610
36. Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R: Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol.* 1992;29(2):193-203
37. Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R.: DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1977) 74:5463
38. Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Bräuninger A, Rajewsky K, Küppers R: Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 1998; 162:261-280
39. Lossos I, Tibshirani R, Balasubramanian N, Levy R: The Inference of Antigen Selection on Ig Genes. *J Immunol*, 2000, 165:5122-5126
40. Thompson, J.D. et alt., Clustal X, Heidelberg, 1997

41. 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* 1994;15:367
42. Klein U, Küppers R, Rajewsky K: Evidence for a large component of IgM-expressing memory B cells in human. *Blood* 1997;89:1288
43. Pascual V, Liu Y-J, Maglaski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD: Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994;180:329
44. Tomlinson IM, Walter G, Jones PT, Dear PH, Sonnhammer ELL, Winter G: The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol Biol* 1996;256:813
45. Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ, Kluin PM, Ooms ECM, Pals ST, van Noesel CJM: Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood* 2000;95:2922-2929
46. Su W, Spencer J, Wotherspoon AC: Relative distribution of tumour cells and reactive cells in follicular lymphoma. *J Pathol* 2001; 193:498-504
47. Shlomchik MJ; Aucoin AH, Pisetsky DS, Weigert MG: Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9150-9154
48. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe E: In situ localisation of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood* 2002; 99:3376-3382
49. Oeschger S, Bräuninger A, Küppers R, Hansmann ML: Tumor cell dissemination in follicular lymphoma. *Blood* 2002, 99:2192-2198
50. Freedman AS, Saporito L, Rhyhart K, Morimoto C, Nadler L: Adhesion of follicular lymphoma cells to lymphoid germinal centres – a potential method of tumour cell homing following autologous transplantation. *Leukemia Lymphoma* 1994; 13: 47-52
51. Dogan A, Du MQ, Aiello A, et al.: Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. *Blood* 1998; 91:4708-4714
52. Bahler DW, Levy R: Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:6770-6774
53. Coupland SE, Dallenbach FE, Stein H: Kleinzellige B-Zell-Lymphome: Differentialdiagnostische Leitlinien. *Pathologe* 2000;21:147-161
54. Müller-Hermelink HK, Zettl A, Pfeifer W, Ott G: Pathology of lymphoma progression. *Histopathology* 2001;38:285-306

55. Miller TP, LeBlanc M, Grogan TM, Fisher RI: Follicular lymphoma: do histological subtypes predict outcome? *Hematol Oncol Clin North Am* 1997;11:893-900
56. Bartlett NL, Rizeq M, Dorfman RF, Hapern J, Horning SJ: Follicular large-cell lymphoma: intermediate or low-grade? *J Clin Oncol* 1994;12:1349-1357
57. Bastion Y, Berger F, Bryon PA et al: Follicular lymphoma: assessment of prognostic factors in 127 patients followed for 10 years. *Ann Oncol* 1991;2(Suppl 2):123-129
58. Aarts W, Bende RJ, Bossenbroek JG, Pals ST, van Noessel CJM: Variable heavy-chain gene analysis of follicular lymphoma: subclone selection rather than clonal evolution over time. *Blood* 2001; 98:238-240
59. Noppe SM, Heirman C, Bakkus MHC, Brissinck J, Schots R, Thielemann K: The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br J Haematol.* 1999;107:625-640
60. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Londo DL, Jaffe ES, Raffeld M: p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993;82:1994-2004
61. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M: MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* 1992;80:758-767
62. Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM: Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutations of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 1996;88:3937-3944
63. Cleary M, Meeker TC, Levy S, Lee E, Trela M, Sklar J, Levy R: Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell* 1986; 44:97
64. Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM, Casali P: Clonal evolution of B cells in transformation from low- to high-grade lymphoma. *Eur J Immunol* 1999;29:1253-1264
65. Zelenetz AD, Chen TT, Levy R: Histological transformation of follicular lymphoma to diffuse lymphoma represents tumor progression by a single malignant B cell. *J exp Med* 1991;173:197
66. Davi F, Maloum K, Michel A, Pritsch O, Magnac C, Macintyre E, Salomon-Nguyen F, Binet J.L, Dighiero G, Merle-Beral H: High frequency of somatic mutations in the VH genes expressed in prolymphocytic leukaemia. *Blood* 1996;88:3953
67. Bakkus MH, Heriman C, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K: Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intracлонаl variation. *Blood* 1992;80:2326-2335

68. Vescio RA, Cao J, Hong CH, Lee JC, Wu CH, Der Danielian M, Wu V, Newman R, Lichtenstien AK, Berenson JR: Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversit. *J Immunol* 1995;155:2487-2497
69. Ziegner M, Steinhauser G, Berek C: Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur J Immunol* 1994;24:2393-2400
70. Bahler DW, Zelenetz AD, Chen TT, Levy R: Antigen selection in human lymphomagenesis. *Cancer Res.* 1992; 52:5547s-5551s
71. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewky K: Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341: 1520-1529
72. 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* 1992;227:799
73. Hilson JL, Karr NS, Oppliger IR, Mannik M, Sasso EH: The structural basis of germline-encoded VH3 Immunoglobulin binding to staphylococcal protein A. *J Exp Med* 1993;178:331
74. Foote J, Winter G: Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol* 1992;224:487
75. PascualV, Victor K, Randen I, Thompson K, Natvig JB, Capra JD: IgM rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis derive from a diverse array of germline immunoglobulin genes and display little evidence of somatic variation. *J Rheumatol* 1992;Suppl 32:50
76. Rudikoff S, Giusti AM, Cook WD, Scharff MD: Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:1979
77. Bruggemann M, Muller HJ, Burger C, Rajewsky K: Idiotypic selection of an antibody mutant with changed hapten binding specificity, resulting from a point mutation in position 50 of the heavy chain. *EMBO* 1986;J 5:1561
78. Wiens GD et al.: Harmful somatic mutations: lessons from the dark side. *Immunol Rev* 1998; 162:197-207
79. Kosmas C et al.: Antigen selection of multiple myeloma clonogenic B cells as evidenced by VH and VL gene mutations. *Blood* 1997; 90:1334-1335
80. 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* 1997;27:1398-1405
81. Betz AG, Neuberger MS, Milstein C: Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol Today* 1993;14:405

82. Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, et al: Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma. *Immunol Today* 2000, 21:298-305
83. Crescenzi M, Seto M, Herzig GP, Weis PD, Griffith RC, Korsmeyer SJ: Thermostable DNA polymerase chain amplification of the t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4869-4873
84. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM: Control of inflammation, cytokine expression and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997; 276:589
85. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al.: The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and the Th2-type inflammation. *Nat Genet* 1997; 16:161

8. Anhang

8.1. Material

8.1.1 Arbeitsgeräte und Hilfsmittel

Kryostat Frigocut Leica, Bensheim; Mikroskope von Zeiss (Jena);

PALM *Robot-Micro Beam* von P.A.L.M. Mikrolasertechnologie (Bernried);

Olympus Umkehrmikroskop IX70 (Hamburg),

PCR-Maschine *Mastercycler[®] gradient* von Eppendorf (Hamburg);

0,2 ml PCR-*Tubes*, ultradünn von Biozym (Oldendorf);

Thermometer compact von Eppendorf (Hamburg);

Zentrifuge Centrifuge 5415C von Eppendorf (Hamburg);

Kühlzentrifuge Biofuge fresco von Heraeus (Hanau),

Elektrophoreseapparatur GNA100 und Powersupply EPS 601 von Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg);

Video-Auswerteeinheit von MWG (Ebersberg);

UV-Schirm UVT 20M/W von Herolab (Wiesloch);

Inkubator von Heraeus (Hanau);

Inkubatorschüttler G25 von New Brunswick Scientific Co, Inc. (Edison, USA);

ABI 373 DNA-Sequencer von Applied Biosystems (Weiterstadt)

Agarose NEEO von Roth (Karlsruhe);

Größenstandard für DNA-Agarosegele: 100bp Leiter von Amersham (Freiburg);

Sephadex[™] G-50 superfine Grade von Amersham (Freiburg);

8.1.2 Puffer und Lösungen

Ampicillin	40 mg/ml in H ₂ O
Ethidiumbromid	40 mg/ml in H ₂ O
Higushi-DNA-Extraktionspuffer	50 mM KCl 10 mM Tris HCl (pH 8,3) 0,1 mg/ml Gelatine 2,5 mM MgCl ₂ 0,45% Nonidet P40 0.45% Tween 20
10 x Ladepuffer	100 mM EDTA pH 8,0 50 % (w/v) Glycerin 1 % (w/v) SDS 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol
Low TE	10 mM Tris HCl (pH 8,0) 0,1 mM EDTA
PBS	0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 8,0 g NaCl mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, ev. mit HCl oder NaOH auf einen pH von 7,4 einstellen. Steril filtrieren.
50 x TAE	2 M Tris-Acetat 0,1M EDTA pH 7,7
5 x TBE	270g Tris-Base, 100ml 0,5M EDTA pH 8.0, 137,5 g Borsäure, H ₂ O dest. ad 5 l
RNAse A	81,4 U/mg, 1 mg/ml Aqua dest.

8.1.3 Enzyme und Antikörper

Enzyme

AmpliTaq Gold [®] DNA-Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Proteinase K	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsenzyme	Amersham, Freiburg
RNAse A	USB TM /Amersham, Freiburg

Antikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper:	Maus-anti-human T-Zell CD3-Antikörper (Part No IM 1304) von der Firma Gallus Immunotech, Fergus, Canada
Sekundärantikörper:	Ziege-anti-Maus Antikörper aus dem Chem Mate TM Detektionskit K5001 von der Firma DAKO, Hamburg

8.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

Plasmide

Für die Klonierung wurden folgende Kits verwendet: TOPO TA-Cloning[®] Kit for Sequencing von Invitrogen (Groningen, Niederlande), welches den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] beinhaltet; sowie das PCR-ScriptTM Amp Cloning Kit von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) mit dem pPCR-Script Amp SK(+) Cloning Vector.

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidprimer wurden in Auftragssynthese von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt.

Tab. 53: Familien-spezifische Primer, 5'-Ende

Nach Küppers (11):			
V _H 1:	5'	CCT CAG TGA AGT YTC CTG CAA GGC	3'
V _H 2:	5'	GTC CTG CGC TGG TGA AAS CCA CAC A	3'
V _H 3:	5'	GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG	3'
V _H 4:	5'	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C	3'
V _H 5:	5'	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A	3'
V _H 6:	5'	ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G	3'
Nach Campbell (36):			
V _H 1:	5'	CCA TGG ACT GGA CCT GGA	3'
V _H 2:	5'	ATG GAC ATA CTT TGT TCC AC	3'
V _H 3:	5'	CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC	3'
V _H 4:	5'	ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT	3'
V _H 5:	5'	ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT	3'
V _H 6:	5'	ATG TCT GTC TCC TTC CTC AT	3'
Selbst entworfene Primer der VH4-Familie:			
VH4-S-ex:	5'	TGA AAC ACC TGT GGT TCT TCC	3'
VH4-S-in:	5'	T<GC>C TGG TGG CAG CTC CCA G	3'

Tab. 54: Primer am 3'-Ende (83)

J _H a (19):	5'	ACC TGA GGA GAC GGT GAC C	3'
J _H a (24):	5'	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	3'
J _H b:	5'	GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG	3'

Tab. 55: Universalprimer

M13 forward	5'	GT AAA ACG ACG GCC AG	3'
T7	5'	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	3'
M13 reverse	5'	CAG GAA ACA GCT ATG AC	3'
T3	5'	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	3'

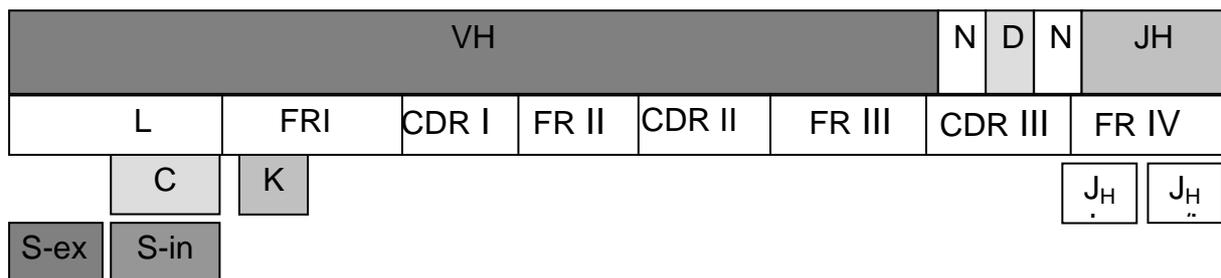


Abb. 30: Ansatzstellen der verschiedenen Primer in der variablen Region der schweren Immunglobulinkette. C: Campbell-Primer, K: Küppers-Primer, L: *leader region*, FR: *framework region*, CDR: *cluster of differentiation region*

8.1.5 Bakterienstämme und Medien

E. coli-Stämme

One Shot [®] TOP10 Chemically Competent	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Epicurian Coli XL 10-Gold Ultracompetent Cells	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

Nährmedien für Bakterien

LB-Medium	Gibco TM BRL [®] (Eggenstein)
LB _{Amp} -Flüssigmedium	25 g/l LB ad 1 l H ₂ O, autoklavieren, nach Abkühlen auf < 50° Zugabe von 1 ml/l Ampicillin in keimfreien Milieu
LB _{Amp} -Festmedium	25 g/l LB, 12 g/l Agar ad 1 l H ₂ O, nach Abkühlen auf < 50° Zugabe von 1 ml/l Ampicillin in keimfreien Milieu

Abb. 32 – Tumor I, andere Keimbahnfamilien, VH3-7.1

FR I																									CDR I							FR II																																																															
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50																																														
VH3-7.1																									VH3-7.1							VH3-7.1																																																															
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG <u>CGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA</u> GCC TCT																									GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT TGG							ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC GCC AAC																																																															
3-3																									---							---																																																															
CDR II								FR III																																																																																							
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96																																																		
VH3-7.1								VH3-7.1																																																																																							
ATA AAG CAA GAT GGA AGT GAG AAA								TAC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT																																																																																							
3-3								---																																																																																							

Abb. 33 – Tumor I, andere Keimbahnfamilien, VH3-11.1

FR I																									CDR I							FR II																																																															
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50																																														
VH3-11.1																									VH3-11.1							VH3-11.1																																																															
CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC AAG CCT GGA <u>CGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA</u> GCC TCT																									GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAC TAC							ATG AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC																																																															
4-4																									---							---																																																															
CDR II								FR III																																																																																							
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96																																																		
VH3-11.1								VH3-11.1																																																																																							
ATT AGT AGT AGT GGT AGT ACC ATA								TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT																																																																																							
4-4								---																																																																																							

Abb. 34 – Tumor I, andere Keimbahnfamilien, VH3-30

		FR I										CDR I										FR II																																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50			
VH3-30		CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	GTG	GTC	CAG	CCT	GGG	AGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAT	GGC	ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA	GTT			
4-2		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4-5		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		CDR II										FR III																																										
		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96							
VH3-30		ATA	TCA	TAT	GAT	GGA	AGT	AAT	AAA	TAC	TAT	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT							
4-2		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
4-5		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			

Abb. 35 – Tumor I, andere Keimbahnfamilien, VH3-74.2

		FR I										CDR I										FR II																																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50						
VH3-74.2		GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTA	GTT	CAG	CCT	GGG	CGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAC	TGG	ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GTG	TGG	GTC	TCA	CGT						
4-3		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4-7		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4-8		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4-9		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		CDR II										FR III																																													
		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96										
VH3-74.2		ATT	AAT	AGT	GAT	GGG	AGT	AGC	ACA	AGC	TAC	GCG	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGT	CTG	AGA	GCC	GAG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT										
4-3		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
4-7		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
4-8		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4-9		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abb. 37, Tumor II, andere Keimbahnfamilien, VH3-7.1

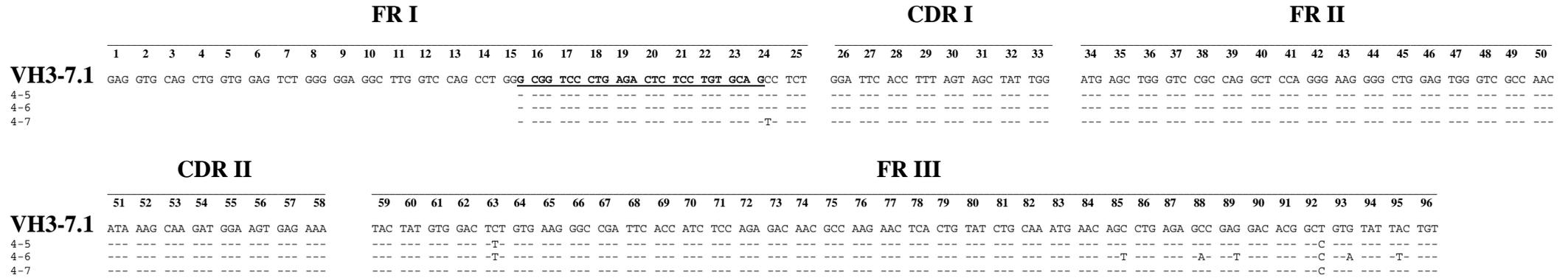


Abb. 38 – Tumor II, andere Keimbahnfamilien, VH3-11.1-Familie

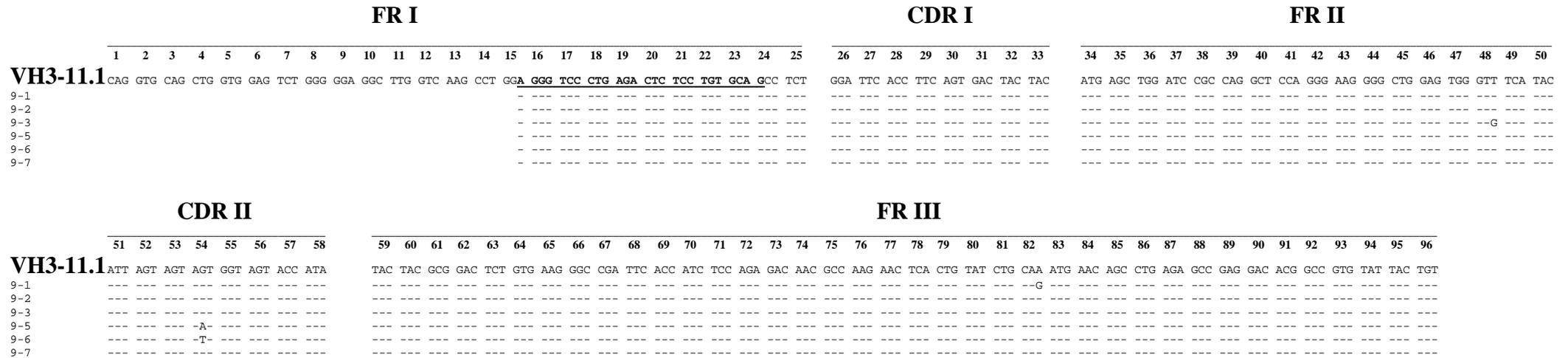


Abb. 41 – Tumor II, andere Keimbahnfamilien, VH3-49.1

FR I																									CDR I							FR II																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
VH3-49.1																																																	
GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTA	CAG	CCA	GGG	CGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	ACA	GCT	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	GGT	GAT	TAT	GCT	ATG	AGC	TGG	TTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTA	GGT	TTC
1-9	-----																								-----							-----																	
3-4	-----																								-----							-----																	

CDR II										FR III																																					
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	96	97
VH3-49.1																																															
ATT	AGA	AGC	AAA	GCT	TAT	GGT	GGG	ACA	ACA	GAA	TAC	ACC	GCG	TCT	GTG	AAA	GGC	AGA	TTC	ACC	ATC	TCA	AGA	GAT	GGT	TCC	AAA	AGC	ATC	GCC	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AAA	ACC	GAG	GAC	ACA	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT
1-9	-----									-----																																					
3-4	-----									-----																																					

Abb. 42 – Tumor II, andere Keimbahnfamilien, VH3-72.1

FR I																									CDR I							FR II																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
VH3-72.1																																																	
GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTC	CAG	CCT	GGA	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	GAC	CAC	TAC	ATG	GAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTT	GGC	CGT
4-1	-----																								-----							-----																	
4-2	-----																								-----							-----																	
4-3	-----																								-----							-----																	
4-8	-----																								-----							-----																	
4-9	-----																								-----							-----																	

CDR II										FR III																																					
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	96	97
VH3-72.1																																															
ACT	AGA	AAC	AAA	GCT	AAC	AGT	TAC	ACC	ACA	GAA	TAC	GCC	GCG	TCT	GTG	AAA	GGC	AGA	TTC	ACC	ATC	TCA	AGA	GAT	GAT	TCA	AAG	AAC	TCA	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AAA	ACC	GAG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT
4-1	-----									-----																																					
4-2	-----									-----																																					
4-3	-----									-----																																					
4-8	-----									-----																																					
4-9	-----									-----																																					

Abb. 43 – Tumor II, andere Keimbahnfamilien, VH3-74.2

FR I																									CDR I								FR II																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
VH3-74.2																																																	
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG <u>CGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC</u> TCT																									GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG								ATG CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT																
2-3	-																								-								-																
2-7	-																								-								-																
2-8	-																								-								-																
8-3	-																								-								-																
8-7	-																								-								-																
8-8	-																								-								-																
8-9	-																								-								-																

CDR II								FR III																																					
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
VH3-74.2																																													
ATT AAT AGT GAT GGG AGT AGC ACA								AGC TAC GCG GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT																																					
2-3	-							-																																					
2-7	-							-																																					
2-8	-							-																																					
8-3	-							-																																					
8-7	-							-																																					
8-8	-							-																																					
8-9	-							-																																					

8.2.3 Tumor III 1

Abb. 44 – Tumor III 1, Sequenzen der Tumorzellpopulation, Follikel 4

	FR I																									CDR I							FR II																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50						
VH4-34.1	CAG	GTG	CAG	CTA	CAG	CAG	TGG	GGC	GCA	GGA	CTG	TTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TAT	GGT	GGG	TCC	TTC	AGT	GGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGC	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAA						
4-1	---	---	---	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	-- T	---	-A-	-CC	-T-	---	---	GC-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	C--					
4-3	---	---	---	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	-A-	-CC	-T-	---	---	GC-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	C--					
4-7	---	---	---	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	-A	-C-	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	-A-	-CC	-T-	---	---	GC-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	C--					
	CDR II							FR III																																																
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95											
VH4-34.1	ATC	AAT	CAT	AGT	GGA	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT											
4-1	---	TC-	---	---	---	-- T	---	-GG	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A--	---	-T-	G--	---	---	-A	---	-T-	---	G-C	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---				
4-3	---	TC-	---	---	---	-- T	---	-GG	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A--	---	-T-	G--	---	---	-A	---	-T-	---	G-C	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	
4-7	---	TC-	---	---	---	-- T	---	-GG	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A--	---	-T-	G--	---	---	-A	---	-T-	---	G-C	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---

Abb. 45 – Tumor III 1, andere Keimbahnfamilien, VH4-b.1

FR I																									CDR I								FR II																		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	
VH4-b.1																																																			
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TCT	GGT	TAC	TCC	ATC	AGC	AGT	GGT	TAC	TAC	TGG	GGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	AGT	
1-8					G-																																														
2-7																																																			
4-5					-G-																																														

CDR II								FR III																																						
52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96		
VH4-b.1																																														
ATC	TAT	CAT	AGT	GGG	AGC	ACC	TAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCA	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT		
1-8																																														
2-7																																														
4-5																																														

Abb. 46 – Tumor III 1, andere Keimbahnfamilien, VH4-4.1

FR I																									CDR I								FR II																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
VH4-4.1																																																	
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGT	AGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	GCC	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	CGT
3-1																																																	
3-2																																																	
3-3																																																	
3-4																																																	
3-6																																																	
3-8																																																	

CDR II							FR III																																							
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95		
VH4-4.1																																														
ATC	TAT	ACC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCC	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATG	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT		
3-1																																														
3-2																																														
3-3																																														
3-4																																														
3-6																																														
3-8																																														

Abb. 51, Tumor III 2, andere Keimbahnfamilien, VH4-b.1

FR I																									CDR I								FR II																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
VH4-b.1																																																		
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TCT	GGT	TAC	TCC	ATC	AGC	AGT	GGT	TAC	TAC	TGG	GGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	AGT
2-10	-----																								-----								-----																	
6-4	-----																								-----								-----																	
6-6	-----																								-----								-----																	

CDR II								FR III																																				
52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
VH4-b.1																																												
ATC	TAT	CAT	AGT	GGG	AGC	ACC	TAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCA	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT
2-10	-----							-----																																				
6-4	-----							-----																																				
6-6	-----							-----																																				

Abb. 52, Tumor III 2, andere Keimbahnfamilien, VH4-59.1

FR I																									CDR I								FR II																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
VH4-59.1																																																	
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGT	AGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAT
1-6	-----																								-----								-----																

CDR II							FR III																																					
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
VH4-59.1																																												
ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCC	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT
1-6	-----						-----																																					

8.2.5 Vergleich Tumor III 1 und III 2

Abb. 53 – Vergleich der VH4-34.1-Subklone von Tumor III 1 und III 2

	FR I																									CDR I							FR II																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50							
VH4-34.1	CAG	GTG	CAG	CTA	CAG	CAG	TGG	GGC	GCA	GGA	CTG	TTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TAT	GGT	GGG	TCC	TTC	AGT	GGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGC	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAA							
4-1	---	---	---	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	-T	---	-A-	-CC	-T-	---	---	GC-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	C--				
4-3	---	---	---	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	-A-	-CC	-T-	---	---	GC-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	C--			
4-7	---	---	---	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	-A	---	-C-	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	-A-	-CC	-T-	---	---	GC-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	C--	
2-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
2-14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
3-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	-CG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3-7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3-9	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
4-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	-C-	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4-4	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
5-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
5-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
5-5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6-2	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	---	---	---	T--	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	CDR II							FR III																																														
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95									
VH4-34.1	ATC	AAT	CAT	AGT	GGA	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT									
4-1	---	TC-	---	---	---	-T	---	-GG	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A--	---	-T-	G--	---	---	-A	---	-T-	---	G-C	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---							
4-3	---	TC-	---	---	---	-T	---	-GG	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A--	---	-T-	G--	---	---	-A	---	-T-	---	G-C	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---							
4-7	---	TC-	---	---	---	-T	---	-GG	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A--	---	-T-	G--	---	---	-A	---	-T-	---	G-C	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---							
2-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---						
2-14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---						
2-4	---	-T	-C-	---	---	-A	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	-G	---	T-	---	---	---	---	-G	-C	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
3-7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	-G	---	T-	---	---	---	---	-G	-C	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
3-9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
4-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
4-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
5-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
5-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
5-5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Die Sequenzen des Tumors III 1 sind dünn, die des Tumors III 2 **fett** gedruckt.

Abb. 56 - Tumor IV 1, andere Keimbahnfamilien, VH-4.4

	FR I																									CDR I								FR II																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
VH4-4.4	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	CCG	GGG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	AGT	AGT	AAC	TGG	TGG	AGT	TGG	GTC	CGC	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAA
2-9																																																			
3-7																																																			
	CDR II								FR III																																										
	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96						
VH4-4.4	ATC	TAT	CAT	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	AAG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT						
2-9																																																			
3-7																																																			

Abb. 57 - Tumor IV 1, andere Keimbahnfamilien, VH-30.4

	FR I																									CDR I										FR II																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
VH4-30.4	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCA	CAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	AGT	GGT	GAT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGC	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGC	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAC
3-2																																																				
	CDR II								FR III																																											
	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97							
VH4-30.4	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	TAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTT	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACT	GCC	GCA	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT							
3-2																																																				

Abb. 58 - Tumor IV 1, andere Keimbahnfamilien, VH-61.1

FR I																									CDR I										FR II																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
VH4-61.1																																																			
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	CAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	GTC	AGC	AGT	GGT	AGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAT
4-2																																																			
5-2																																																			
CDR II								FR III																																											
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97							
VH4-61.1																																																			
ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT							
4-2																																																			
5-2																																																			

Abb. 59 - Tumor IV 1, andere Keimbahnfamilien, VH-59.1

FR I																									CDR I										FR II																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50		
VH4-59.1																																																			
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	CAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGT	AGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAT		
5-6																																																			
6-2																																																			
CDR II							FR III																																												
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95							
VH4-59.1																																																			
ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCC	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT							
5-6																																																			
6-2																																																			

8.2.8 Tumor IV 3

Abb. 61 – Tumor IV 3, Sequenzen

		FR I																								CDR I								FR II																																													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50																												
VH4-34.1		CAG	GTG	CAG	CTA	CAG	CAG	TGG	GGC	GCA	GGA	CTG	TTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TAT	GGT	GGG	TCC	TTC	AGT	GGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGC	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAA																												
1																																																																															
2																																																																															
3																																																																															
4																																																																															
5																																																																															
8																																																																															

		CDR II							FR III																																											
		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95						
VH4-34.1		ATC	AAT	CAT	AGT	GGA	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT						
1																																																				
2																																																				
3																																																				
4																																																				
5																																																				
8																																																				

8.3 Abkürzungen

A	Adenin, eine der vier Basen der DNA
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin, eine der vier Basen der DNA
CDR	<i>cluster of differentiation region</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DLBL	<i>Diffuse large B-cell lymphoma</i>
DNS/DNA	Desoxyribonucleinsäure/-acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat; umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Chelator von divalenten Kationen
FL	Follikuläres Lymphom
FR	<i>framework region</i>
G	Guanin, eine der vier Basen der DNA
HPF	<i>high power field</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
LB	<i>Luria broth</i> (ein Bakterienmedium)
NTP	Nucleosidtriphosphat
ORF	<i>Open reading frame</i> (offenes Leseraster)
p.a.	<i>per absolutem</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>pfu</i>	<i>plaque-forming units</i> (Plaque formende Einheiten)
<i>Primer</i>	Oligonucleotid, welches als Start-Fragment für eine DNA-Synthese dient

RNA	Ribonucleinsäure/ <i>-acid</i>
RNAse	Ribonuclease
rpm	<i>rounds per minute</i> /Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
sIg	lösliches (<i>soluble</i>) Immunglobulin
T	Thymin, eine der vier Basen der DNA
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer; ein Elektrophoresepuffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer; ein Elektrophoresepuffer
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TE	Tris-EDTA-Puffer
<i>Template</i>	Vorlage, Matrize. <i>Template-DNA</i> ist die DNA, die man als Kopiervorlage bei PCR einsetzt
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, wichtige Puffersubstanz in der Molekularbiologie
TTE	Tris-Taurin-EDTA-Puffer; ein Elektrophoresepuffer
U	Uracil
UV	Ultraviolett
VH-	Variable Region der schweren Immunglobulinkette
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid. Substrat der β -Galactosidase

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.-K. Müller-Hermelink für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen sowie für seine konstruktiven Anregungen und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. H. Einsele für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Adam danke ich, dass er *in media res* die Aufgabe meines Betreuers übernahm und somit einen großen Anteil zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beitrug.

Dank gilt auch Fr. Werder, die mir die Arbeit der Mikrodissektion abnahm und immer mit Ratschlägen zur Seite stand.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für die Selbstverständlichkeit danken, mit der sie meine Ausbildung unterstützten.

Lebenslauf

Julia Schoof

Geburtsdatum: 15.02.1976
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1982-1986 Grundschule Steinbach/Baden-Baden
1986-1995 Humanistisches Gymnasium Hohenbaden, Baden-Baden.
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1996 – 2002 Medizinstudium an der Universität Würzburg
1999/2000 Auslandsstudium an der medizinischen Fakultät der Universidad
de Salamanca, Spanien
2002/2003 Praktisches Jahr an der
neurologischen Universitätsklinik Würzburg;
Spital des Sensebezirkes Tafers/Fribourg, Schweiz;
Missionsärztliche Klinik Würzburg
21.10.2003 3.Staatsexamen

Promotion

2001-2005 Anfertigung einer Dissertation am Institut für Pathologie,
Prof. Dr. H.-K. Müller-Hermelink

Ärztliche Berufsausübung

02/04-09/04 ÄIP in der neurologischen Universitätsklinik Würzburg
seit 10/04 Assistenzärztin an der neurologischen Universitätsklinik Würzburg

Würzburg, im Mai 2005