Aus der Dermatologischen Universitätsklinik und Poliklinik
der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin
Direktor Prof. Dr. med. W. Sterry

Digitale Dissertation

DISSERTATION

MIKROMANIPULATION UND EINZELZELLANALYSEN AN KUTANEN B-ZELL-LYMPHOMEN

MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER IMMUNGLOBULINGENE

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Sven Golembowski
geb. am 16.09.1967 in Bernburg

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter:
1. PD Dr. S. Jahn
2. Prof. Dr. A. Radbruch
3. UD Dr. L. Cerroni

eingereicht: im Mai 1997
Datum der Promotion: 01. Dezember 1997

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 3

1.1 DAS KUTANE B-ZELL-LYMPHOM 3

1.1.1 DIE GESCHICHTE 3

1.1.2 DIE KLASSIFIKATION DER KUTANEN B-ZELL-LYMPHOME 4

1.1.3 KLINIK DER PRIMÄR KUTANEN B-ZELL-LYMPHOME 5

1.1.3.1 Das kutane Keimzentrumszell-Lymphom 7

1.1.3.2 Das kutane Immunozytom 8

1.1.3.3 Das großzellige kutane B-Zell-Lymphom der unteren Extremität 9

1.1.3.4 Das kutane Plasmozytom 9

1.1.3.5 Das intravaskuläre großzellige B-Zell-Lymphom 10

1.1.4 DAS MODELL DER ANTIGENGETRIEBENEN MALT-LYMPHOME - DIE ARBEITSHYPOTHESE 10

1.2 DIE B-LYMPHOZYTEN 12

1.2.1 DIE ENTWICKLUNG DER B-LYMPHOZYTEN 12

1.2.2 DIE ENTSTEHUNG DER ANTIKÖRPERDIVERSITÄT 13

1.2.3 DER B-ZELL-REZEPTOR, DER ANTIKÖRPER 15

2 AUFGABENSTELLUNG 18

3 MATERIAL UND METHODEN 19

3.1 CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN PATIENTEN 19

3.1.1 PATIENT UK - KUTANES KEIMZENTRUMSZELL-LYMPHOM AM BEHAARTEN KOPF 19

3.1.2 PATIENTIN IL - GROßZELLIGES KUTANES B-ZELL-LYMPHOM DER UNTEREN EXTREMITÄT 21

3.2 VERWENDETE GERÄTE, REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN 24

3.2.1 FÜR DIE FÄRBUNG 24

3.2.2 FÜR DIE MIKROMANIPULATION 24

3.2.3 FÜR DEN PROTEINASE-VERDAU UND DIE PCR 24

3.2.4 FÜR DIE SEQUENZIERUNG 25

3.2.5 FÜR DIE DNA-EXTRAKTION UND KLONIERUNG 25

3.3 DIE METHODEN 27

3.3.1 SCHNITT UND ANFÄRBUNG DER KRYOKONSERVIERTEN BIOPTATE 27

3.3.2 DIE MIKROMANIPULATION DER EINZELZELLEN 27

3.3.3 DIE EINZELZELL-PCR 28

3.3.4 DIE DIREKTSEQUENZIERUNG 30

3.3.5 DIE DNA-EXTRAKTION, PCR, KLONIERUNG 31

3.3.6 DIE KEIMBAHNGEN-ANALYSE 32

4 ERGEBNISSE 34

4.1 ETABLIERUNG DER METHODE 34

4.1.1 DIE HYBRIDOMZELLINIE CB03 34

4.1.2 REAKTIVE B-LYMPHOZYTEN AUS EINEM KUTANEN T-ZELL-LYMPHOM 35

4.2 SEQUENZANALYSE VON TUMORZELLEN AUS KUTANEN B-ZELL-LYMPHOMEN 38

4.2.1 LYMPHOMZELL-ANALYSE DES PATIENTEN UK 40

4.2.1.1 Keimbahngen-Analyse für Patient UK 41

4.2.1.2 Mutationsanalyse der Immunglobulingene der Lymphomzellen des Patienten UK 44

4.2.2 LYMPHOMZELL-ANALYSE DER PATIENTIN IL 44

4.2.2.1 Keimbahngen-Analyse für Patientin IL 45

4.2.2.2 Mutationsanalyse der Immunglobulingene der Lymphomzellen der Patientin IL 46

5 DISKUSSION 52

5.1 MUTATIONSANALYSE 52

5.1.1 MUTATIONSFREQUENZ 52

5.1.2 ANDAUERNDE MUTATIONEN (*ONGOING MUTATION*) UND INTRAKLONALE DIVERSITÄT 54

5.1.3 MUTATIONSMUSTER 57

5.2 EINORDNUNG DER DATEN IN DIE GEGENWÄRTIGE KLASSIFIKATION PRIMÄR KUTANER LYMPHOME 62

5.2.1 KEIMZENTRUMSZELL-LYMPHOM *VS.* MARGINALZONENZELL-LYMPHOM 62

5.2.2 HIGH-GRADE VS. LOW-GRADE TUMORZELLEN 63

5.2.3 ROLLE DES *BCL-2* PROTEINS 64

5.3 ZUR METHODE 66

5.3.1 EINZELZELL- *VS.* POPULATIONSANALYSEN 66

5.3.2 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER PCR-DIAGNOSTIK 68

5.3.3 (UN-)ZUVERLÄSSIGKEIT DER DATEN 69

6 ZUSAMMENFASSUNG 72

7 LITERATURVERZEICHNIS 74

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 83

1 EINLEITUNG

B-Zell-Lymphome sind Neoplasien der Lymphozyten, die vor allem im Knochenmark (***b**one marrow*) heranreifen, was als Äquivalent der ***B**ursa fabricii* der Vögel gilt. Sie kommen nur selten in der Haut vor. Wegen der lange Zeit vorherrschenden Auffassung, kutane B-Zell-Lymphome seien ausschließlich sekundär disseminierte systemische Lymphome, begann man erst relativ spät, sich gesondert mit ihnen zu beschäftigen. Wie schon die mehrfachen mühevollen Versuche, die systemischen Lymphome zu systematisieren, vermuten lassen, ist auch die Klassifizierung der kutanen Lymphome ein schwieriges Unterfangen, was unter anderem während des im Dezember 1996 in München stattgefundenen Meetings der *Cutaneous Lymphoma Project Group* der *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) deutlich wurde.

Mit der vorliegenden Arbeit soll durch die Anwendung moderner molekularbiologischer Methoden ein Baustein zur Verfügung gestellt werden, um der Ätiologie und der Pathogenese des kutanen B-Zell-Lymphoms ein Stück näher zu kommen.

1.1 DAS KUTANE B-ZELL-LYMPHOM

1.1.1 Die Geschichte

Für das Immunsystem gesunder Haut konnte bisher noch keine B-Zell-Population nachgewiesen werden. [1] Wenn lichtmikroskopisch B-Lymphozyten erkennbar waren, gab es hierfür lange Zeit nur zwei plausible Erklärungen. Entweder waren sie als Reaktion auf einen anderen Prozeß (wie z.B. entzündliche Hauterkrankungen oder Tumoren) in die Haut eingewandert oder, wenn ihre Zellmorphologie oder ihr Anordnungsmuster verdächtig erschien, wurden sie als Absiedlung von systemischen Lymphomen gewertet. Es fiel aber auf, daß die Lymphome in der Haut sich klinisch anders verhielten als ihre systemischen Äquivalente. Wären die in der Haut gefundenen B-Lymphozyten Manifestationen systemischer Lymphome, würde das in der Regel nicht mit einer guten Prognose vereinbar sein. Einige der von Dermatologen betreuten Lymphome aber blieben lange Zeit topographisch beschränkt, zeigten keine systemische Aussaat, eventuell sogar Regressionen und waren alles

in allem als niedrig maligne einzustufen. Diesen Widerspruch umgehend wurde der Begriff des Pseudolymphoms geprägt.

Der gutartige Verlauf der B-Zell-Proliferationen in der Haut ließ noch 1974 CLARK zweifeln, ob es überhaupt echte primäre Lymphome in der Haut gäbe, oder ob es sich generell um reaktive Prozesse handele. [2] Erst gegen Ende der 70er Jahre unseres Jahrhunderts mit der Entwicklung immunhistochemischer und molekularbiologischer Techniken begann man damit, sich intensiver den kutanen B-Zell-Lymphomen zu widmen und wenig später erstmals von *primär* kutanen B-Zell-Lymphomen zu sprechen. [3-5]

1.1.2 Die Klassifikation der kutanen B-Zell-Lymphome

Mit der Akzeptanz der kutanen B-Zell-Lymphome (KBZL) als eigenständige Entität begann das Problem der Klassifizierung. Die Morphologie der lymphoiden Infiltratzellen beschreibend, versuchte SCHMOECKEL im Jahre 1979 Analogien zu den systemischen Lymphomen zu ziehen und kam zu dem Schluß, daß die Übertragung der damals verwendeten Kiel-Klassifikation von 1974 auf kutane Lymphome gerechtfertigt sei. [6] Demnach gab es vier Typen: den lymphozytischen, lymphozytoiden, lymphoplasmozytoiden und den zentroblastischen / zentrozytischen Typ. Für die Folgejahre war somit die Anlehnung an die Klassifikation der systemischen Lymphome vorgezeichnet. Aktualisierungen und neuartige Klassifizierungs-modelle versuchte man zu übernehmen. In den USA war es vor allem die *Working Formulation*, [7] die ab 1982 Einzug hielt, während in Europa die Kiel-Klassifikation und später ihre überarbeitete Version [8] dominierte. 1994 machte sich die *International Lymphoma Study Group* daran, eine klinisch anwendbare Synthese aus der *Working Formulation* und der Kiel-Klassifikation mit dem Namen *Revised European American Lymphoma (REAL) Classification* zu konstruieren, um eine international akzeptierte Basis für den Erfahrungsaustausch der Hämatopathologen und die Vergleichbarkeit klinischer Studien zu schaffen. [9]

Neuere immunhistochemische, zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen an den kutanen B-Zell-Lymphomen und exakte Fallstudien haben zu der Auffassung geführt, daß sich in der Haut nicht nur primär B-Zell-Lymphome entwickeln können, sondern daß sich diese Lymphome in vielerlei Hinsicht auch von den nodalen Lymphomen des gleichen histologischen Subtyps unterscheiden. Deshalb hat sich die *Cutaneous Lymphoma Study Group*

der EORTC trotz der Vielzahl bereits vorhandener Modelle für eine eigene Klassifikation der primär kutanen Lymphome entschieden [10] (Tabelle 1).

Indolent	• *Keimzentrumszell-Lymphom*
	• *Immunozytom (einschl. Marginalzonen B-Zell-Lymphom)*
Intermediär	• *Großzelliges B-Zell-Lymphom der unteren Extremität*
Provisorisch	• *Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom*
	• *Plasmozytom*

Tabelle 1 EORTC-Klassifikation der primär kutanen B-Zell-Lymphome, [10] detaillierte Beschreibung der einzelnen Entitäten in Kap. 1.1.3

Es fällt die Einfachheit und Übersichtlichkeit dieser Einteilung auf. Auf rein histologische Subklassifizierungen wurde bewußt verzichtet, da sie für den Verlauf, Therapie und Prognose der Erkrankung irrelevant sind. Die Einteilung basiert auf einer Kombination von klinischen, histologischen und immunophenotypischen Kriterien. Der Kliniker soll durch die Anwendung dieses Schemas in die Lage versetzt werden, sich eindeutig für das weitere Procedere wie Staging und Therapie zu entscheiden. Die Prognose ist aus der Einteilung ersichtlich. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Subtypen erfolgt im nachstehenden Kapitel.

1.1.3 Klinik der primär kutanen B-Zell-Lymphome

Von einem primär kutanen Lymphom spricht man, wenn zum Zeitpunkt der Diagnose einer malignen Lymphozytenpopulation in der Haut und während der nachfolgenden sechs Monate trotz intensiver Durchuntersuchung keine extrakutane Beteiligung nachweisbar ist. [10] Die geforderte Zeitkarenz ist ein rein empirischer Wert. Es können daher die Zweifel, ob in der Haut proliferierende B-Lymphozyten nicht doch Absiedlungen eines minimalen und daher unerkannt bleibenden systemischen Prozesses sind, noch nicht eindeutig widerlegt werden. Bis zu vielen Jahren währende, gutartige, auf die Haut beschränkte Verläufe [11,12] sprechen allerdings für die Existenz primär kutaner Lymphome.

Obwohl die primär kutanen Lymphome nach den primär gastrointestinalen Lymphomen die häufigste Gruppe der nicht-nodalen Non-Hodgkin-Lymphome darstellt, [13] ist ihre Inzidenz mit ca. 1 / 100 000 / Jahr eher gering. Der Anteil der kutanen B-Zell-Lymphome daran ist lange Zeit unterschätzt worden und wird heute mit ca. 25% angegeben. [14]

Wie bereits angedeutet, muß, um die Diagnose eines primär kutanen B-Zell-Lymphoms stellen zu können, eine umfassende Untersuchung durchgeführt werden. Nur der sichere Ausschluß einer extrakutanen Beteiligung läßt die im allgemeinen gute Prognose des rein kutanen Lymphoms zu und rechtfertigt das in der Regel wenig aggressive therapeutische Vorgehen. Für die Ausbreitungsdiagnostik werden von der EORTC folgende Mindestmaßnahmen empfohlen: [14] Klinische Untersuchung (Inspektion, Palpation der Lymphknotenstationen, Milz und Leber) mit Photodokumentation der Hauterscheinungen, Differentialblutbild, Leber- und Nierenparameter, Röntgen des Thorax, Abdomen-CT bzw. -Sonografie, Biopsie vergrößerter Lymphknoten und eine Knochenmarkbiopsie. Das *Staging* erfolgt entweder nach der TNM-B,BM-Klassifikation (T: Hautbefall, N: Lymphknoten, M: *Viscera*, B: Blut, BM: *bone marrow*) [14,15] oder nach der *Ann-Arbor*-Klassifikation, [13] reichend von Stadium I_E (Befall eines extralymphatischen Organs) bis Stadium IV (disseminierter Organbefall) ± B-Symptomatik. [16]

Die Differentialdiagnose zum Pseudolymphom stellte vor allem in der Vergangenheit ein großes Problem dar. KERL wie auch SLATER und SANTUCCI sind der Auffassung, daß viele der diagnostizierten „Pseudolymphome“ tatsächlich maligne Proliferationen und zu den KBZL zu zählen sind. [12,14,17] Beschreibungen von Fällen, wonach Lymphome aus Pseudolymphomen hervorgegangen sind, [18,19] scheinen diese These zu stützen. Trotz einigen (unsicheren! [20]) histologischen Merkmalen (polymorphes Zellinfiltrat: neben Lymphozyten vor allem auch Eosinophile, Plasmazellen und Histiozyten; Konzentration des Infiltrats in den oberen Dermisschichten (*top-heavy*); häufiges Vorkommen von scharf begrenzten sekundären Lymphfollikeln), [21] die für einen reaktiven Prozeß sprechen, ist eine sichere Differenzierung zwischen Lymphom und Pseudolymphom rein histologisch nicht möglich. Moderne diagnostische Verfahren (Immunhistochemie, *southern blot*, PCR; Übersicht in STERRY, 1995 [22]) ermöglichen heute eindeutige Klonalitätsnachweise. Der alte, ausweichende Begriff „Pseudolymphom“ mit seinen unzähligen Synonymen (Spiegler-Fendt Sarcoid, *Lymphadenosis circumscripta*, etc.) sollte deshalb nicht mehr verwendet und statt dessen die allgemeine Bezeichnung „kutane lymphoide Hyperplasie“ als Oberbegriff für reaktive (=polyklonale) Prozesse unbekannter Ätiologie favorisiert werden. [13,17] Erst bei bekannter Ätiologie bzw. für wohldefinierte klinikopathologische Entitäten sollten spezifische Termini, wie z.B. *Lymphadenosis cutis benigna* (Bäfverstedt) (=Lymphozytom) für die *Borrelia burgdorferi*-assoziierten Infiltrate, zum Einsatz kommen. [23]

Trotz des für die überwiegende Anzahl der kutanen B-Zell-Lymphome ähnlichen Verlaufs gibt es einige Besonderheiten, die nach Meinung der *Cutaneous Lymphoma Study Group* der EORTC - entgegen widersprüchlicher Auffassungen [12,24]- eine Subklassifizierung notwendig macht: [10]

1.1.3.1 Das kutane Keimzentrumszell-Lymphom

In der Kiel-Klassifikation wurden die nodalen Lymphome, deren Zellen den Zentrozyten und Zentroblasten der Keimzentren reaktiver Lymphfollikel ähnelten, als zentroblastisch / zentrozytische Lymphome bezeichnet und zu den *low-grade* (d.h. kleinzelligen! [25]) Lymphomen gezählt. [8] Die REAL-Klassifikation [9] nennt diese am häufigsten vorkommenden Non-Hodgkin-Lymphome Keimzentrums-Lymphome, neuerdings Keimzentrumszell-Lymphome, [26] und beschreibt sie durch folgende Kriterien: Das Wachstumsmuster kann z.T. diffus sein, neoplastische Follikelstrukturen sind dagegen immer vorhanden. Die Tumorzellen stellen eine Mischung aus vorrangig Zentrozyten, durchsetzt mit einem unterschiedlichen (aber obligatorisch vorhandenem) Anteil an Zentroblasten, dar. Sie sind sIg^+, $CD10^+$, $CD5^-$ und exprimieren ein dereguliertes *bcl-2* Protein, meist aufgrund einer t(14;18)-Translokation. Der Verlauf ist im allgemeinen indolent, korreliert aber zum zytologischen *Grading:* Grad 1 (vorwiegend kleinzellig) und 2 (gemischtzellig) werden als indolent, Grad 3-Lymphome (überwiegend großzellig) als moderat aggressiv beschrieben. [27]

Die neoplastischen Zellen der primär kutanen Keimzentrumszell-Lymphome (KKZL) sind auch Zentrozyten (kleine und große Zellen mit gekerbten Kernen) und Zentroblasten (große Zellen mit hellen rundlichen Kernen und prominenten membranständigen *Nucleoli*), wobei in frühen und kleinen Läsionen die Zentrozyten und reaktiven T-Zellen überwiegen (=*low-grade*), in fortgeschrittenem Stadium und großen und schnell wachsenden Läsionen vorrangig große Keimzentrumszellen und eventuell auch Immunoblasten (=*high-grade*) zu finden sind. Plasmazytisch differenzierte Zellen sind häufig in frühen Läsionen anzutreffen. [12] Die Prognose korreliert aber nicht mit dem *Grading*. Das Wachstumsmuster kann nodulär oder diffus sein, wobei neoplastische Follikel extrem selten sind. Gelegentlich werden reaktive Follikel bzw. deren Reste beobachtet. [10] Das Infiltrat spart die Epidermis aus. Zwischen beiden ist eine sogenannte „Grenzzone“ sichtbar. [11-13] Die Tumorzellen exprimieren die B-Zell-assoziierten Antigene (CD19, 20, 22, 79a), aber nicht CD5 und CD10. In der Expression von sIg sind sie eher negativ und die t(14;18)-Translokation und das *bcl-2* Protein sind nicht zu finden.

Patienten mit diesem häufigsten kutanen B-Zell-Lymphom (ca. 65% im Register der *Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group (DCLWG)* [10]) stellen sich mit nicht-schuppenden, solitären oder gruppierten Papeln, Plaques oder Tumoren (oft mit Umgebungserythem) vor, die in der Regel am Kopf / Hals oder am Stamm (ältere Bezeichnung: Crosti's Retikulohistiozytom des Rückens) lokalisiert sind. Der Tumor wächst sehr langsam und eine extrakutane Disseminierung ist selten. Die Therapie der Wahl stellt die lokale Bestrahlung oder die Exzision dar, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 97%.

1.1.3.2 Das kutane Immunozytom

Das weniger häufige kutane Immunozytom ist definiert durch eine Proliferation von kleinen Lymphozyten, lymphoplasmazytoiden Zellen (reichliches basophiles Zytoplasma, aber lymphozytentypischer *Nucleus*) und Plasmazellen, bei denen sich auf Paraffinschnitten monotypisches zytosolisches Ig (vorrangig IgG [28]) nachweisen läßt. [10] IgM-Paraproteine (charakteristisch für die Makroglobulinämie Waldenström) sind trotz möglicher Hypergammoglobulinämie und im Gegensatz zu den nodalen und sekundär kutanen Immunozytomen nicht nachweisbar. Das Wachstumsmuster ist dicht nodulär oder diffus, oftmals perivaskulär konzentriert, wobei die neoplastischen Zellen in der Peripherie des Infiltrats zu suchen sind. Die Epidermis ist, wie bei den KKZL, durch eine „Grenzzone" vom Infiltrat getrennt. Reaktive Follikel sind oft vorhanden. [28] Die Zellen sind negativ für die B-Zell-Marker CD20 und CD22 [28], sowie für CD5 und CD10. PAS-positive intranukleäre („*Dutcher bodies*") und zytosolische („Russell-Körperchen") Einschlüsse sind häufig. Der Tumor entsteht meistens an den Extremitäten, und eine *Borrelia burgdorferi*-Infektion ist mit der Pathogenese in Zusammenhang gebracht worden. [29,30] Radiotherapie ist auch hier die Therapie der Wahl und die Prognose ist exzellent (5-Jahres-Überlebensrate 100%).

Die kutanen Immunozytome sollen den Immunozytomen der Kiel-Klassifikation bzw. den Marginalzonen-Zell-Lymphomen der REAL-Klassifikation entsprechen. Die Vergleichbarkeit zu den genannten Lymphom-Klassifikationen wird aber dadurch erschwert, daß einerseits das Marginalzonen-Zell-Lymphom der REAL-Klassifikation nicht dem Kieler Immunozytom entspricht [9] und andererseits noch Unklarheiten über die Ursprungszelle dieser Lymphomentität bestehen. ISAACSONs Maltome (s. Abschnitt 1.1.4) wurden noch 1990 am besten als lymphoplasmazytische Immunozytome Kieler Klassifikation charakterisiert, [31] welche den lymphoplasmozytoiden (neuerdings auch lymphoplasmazytischen [32]) Lymphomen der REAL-Klassifikation äquivalent sind. [9] Die Maltome sind in der REAL-Klassifikation den

Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen zugeordnet. Die Bezeichnung Immunozytom (=lymphoplasmazytisches Lymphom) stellt in der REAL-Klassifikation eine Ausschlußdiagnose dar, [33] da die unterschiedlichsten B-Zell-Tumoren einen Anteil an Zellen mit lymphoplasmazytoider Differenzierung (cIg^+) aufweisen können. [9]

Das seltene **Marginalzonen-B-Zell-Lymphom** (MZBZL) der Haut wird in der aktuellen EORTC-Klassifikation gemeinsam mit dem Immunozytom aufgeführt. Ursache ist das derzeitig noch bestehende Problem, beide eindeutig zu differenzieren und das Vorliegen widersprüchlicher Veröffentlichungen bzw. die Verwendung unterschiedlicher Termini. (Selbst die primär KKZL werden von einigen Autoren als MZBZL diskutiert. [17,24,34]) Die Zusammenlegung geschieht vermutlich auch in Anlehnung an ISAACSON, [13] der beide als die *low-grade* Tumoren der Haut zusammenfaßt und den häufigen *high-grade* Lymphomen gegenüberstellt, wobei die lymphoplasmazytischen Zellen (des Immunozytoms) eine Differenzierungsstufe der *Centrocyte-like Cells* (des MZBZL) darstellen sollen, wie es bei den Maltomen der Fall ist (s. Kapitel 1.1.4).

1.1.3.3 Das großzellige kutane B-Zell-Lymphom der unteren Extremität

In bezug auf die Ursprungszelle handelt es sich auch hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach um ein Keimzentrumszell-Lymphom, wobei aber die Zentroblasten, Immunoblasten und großen Zentrozyten das histologische Bild dominieren. Trotz der histologischen Ähnlichkeit zu den späten großzelligen Keimzentrumszell-Lymphomen wird diese erst kürzlich beschriebene Neoplasie der Haut [35] als eigene Entität mit einer intermediären Prognose klassifiziert. Die ungünstigere Prognose (5-Jahres-Überlebensrate ca. 50% vs. 97% beim KKZL) und eine notwendige aggressivere Therapie (Polychemotherapie) rechtfertigen eine Extrastellung. Hervorzuheben ist die vorhandene *bcl-2* Expression (ohne t(14;18)-Translokation! [36]) der Tumorzellen. Prädilektionsstellen sind die Beine; betroffen sind vor allem Frauen älter als 70 Jahre. Die Häufigkeit ist mit ca. 10% der im Register der DCLWG notierten KBZL ähnlich der des Immunozytoms.

1.1.3.4 Das kutane Plasmozytom

Die meisten der kutanen Plasmozytome sind Hautmanifestationen von multiplen Myelomen, den Plasmazellentartungen im *Myelos*, dem Knochenmark. Primär kutane Plasmozytome sind extrem selten. Histologisch sind sie klar definiert (reife Plasmazellen, im Gegensatz zum Immunozytom ohne Durchmischung von anderen klonalen Lymphozyten), können aber in der

klinisch orientierten EORTC-Klassifikation nur als provisorische Entität erscheinen, da aufgrund ihrer geringen Prävalenz noch nicht genügend zu verallgemeinernde Daten vorliegen.

1.1.3.5 Das intravaskuläre großzellige B-Zell-Lymphom

Große neoplastische B-Zellen akkumulieren im Gefäßinneren, was in der Vergangenheit als Angioendotheliomatose fehlgedeutet wurde. Die Informationen sind auch hier nicht ausreichend. Der Tumor kann klinisch nicht eindeutig klassifiziert werden.

Mantelzell-Lymphome, charakterisiert durch kleine B-Zellen, die das CD5-Antigen und das Cyclin D1 Protein exprimieren, sind nicht in die Klassifikation der primär kutanen B-Zell-Lymphome aufgenommen worden, da sie die Haut in der Regel sekundär befallen. Bisher wurde nur ein Fall eines primär kutanen Mantelzell-Lymphoms beschrieben. [37]

1.1.4 Das Modell der antigengetriebenen MALT-Lymphome - die Arbeitshypothese

Abgesehen von der *Mykosis fungoides* und dem Sézary-Syndrom waren in den älteren Lymphomklassifikationen keine extranodalen Lymphome aufgeführt. Es ist im wesentlichen der Arbeit des Londoner Histopathologen P.G. ISAACSON zu verdanken, daß seit der REAL-Klassifikation [9] extranodale Lymphome eine offiziell anerkannte Entität repräsentieren. Seine Forschungen konzentrieren sich seit dem Ende der 70er Jahre auf primär im Gastrointestinal-trakt entstandene Lymphome, [38] und durch ihn wurde auch der Begriff der MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*)-Lymphome geprägt, [39] nachdem er feststellte, daß primäre Lymphome in Organen, die wie der Darm auch Schleimhautanteile mit immunologischer Funktion besitzen (IgA-Sekretion) bzw. embryologisch aus dem primitiven Darm hervorgegangen sind (Lunge, Speicheldrüse, Schilddrüse), Gemeinsamkeiten aufwiesen. [40] MALT muß nicht physiologischerweise an dem Ort der Lymphomentstehung vorhanden sein. MALT ist überhaupt nur eindeutig als GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) für den Darm beschrieben worden. Viel öfter kommt es aufgrund von chronischen Entzündungsstimuli zum sogenannten Erwerb von MALT mit der Möglichkeit der nachfolgenden Entartung. Diese Entzündungsreize können infektiöser oder autoimmuner Natur sein. So führen eine *Helicobacter pylori*-assoziierte Gastritis im Magen, das Sjögren-Syndrom in den Speicheldrüsen, die Hashimoto-Thyreoiditis in der Schilddrüse und die follikuläre Bronchiolitis in der Lunge zu Ansammlungen von MALT-ähnlichem lymphatischen Gewebe, das im gesunden Organ nicht gefunden wird. [41]

Der beobachtete Zusammenhang zwischen chronisch-entzündlichem Gewebe und der Entstehung von Lymphomen brachte die Theorie hervor, daß eine dauerhafte antigene Stimulation von Lymphozyten deren Entartung hervorrufen oder unterstützen kann. Diese Vermutung konnte exemplarisch am Beispiel der *low-grade* MALT-B-Zell-Lymphome des Magens bewiesen werden. In einem Artikel aus dem Jahre 1991 zeigten WOTHERSPOON *et al.*, [42] daß sich bei 28% der Patienten mit einer *Helicobacter pylori* (früher *Campylobacter p.*)-assoziierten Gastritis lymphatisches Gewebe im Magen nachweisen ließ, das in seiner Struktur den Peyerschen Plaques des terminalen Ileums, dem klassischen Vertreter des MALT, ähnelt. Weiterhin fanden sie *H. pylori* in 101 / 110 (92%) der von ihnen untersuchten primären MALT-Lymphome des Magens. Da die allgemeine Durchseuchung mit diesem Erreger bei nur 50-60% liegt, wurde ein Zusammenhang zwischen *H. pylori* und den Maltomen des Magens geschlußfolgert. Folgerichtig schlossen sich Versuche an, die die Regression des Lymphoms nach antibiotischer Eradikation von *H. pylori* nachwiesen. [43] Wie stimuliert der Erreger das Tumorwachstum im Detail? Mittels Proliferationsassays konnten HUSSELL *et al.* die Stimulierbarkeit der Tumorzellen durch *H. pylori in vitro* nachweisen, interessanterweise aber nur so lange, wie die T-Lymphozyten, die auch aus dem Tumorgewebe stammten, nicht aus der Kultur entfernt worden waren. [44] Das B-Zell-Maltom des Magens ist also von Ag-spezifischen T-Lymphozyten und deren Interleukinen (IL-2 im Überstand und CD25, der IL-2 Rezeptor, wurden in der zitierten Arbeit untersucht) abhängig. Die Spezifität der von den entarteten B-Zellen exprimierten Immunglobuline wurde mit Hilfe von Antiidiotyp-Antikörpern nachgewiesen, indem sie die vom Tumor sezernierten Antikörper aufspürten. [45] Diese konnten auf körpereigenem Gewebe der Patienten (z.B. auf follikulären dendritischen Zellen, Darmepithel und postkapillären Venulen), also Autoantigenen, gefunden werden. Kreuzreaktivität mit *H. pylori* bestand nicht. Sequenzanalysen der Immunglobulingene in Maltomen wiesen die entarteten B-Zellen als hypermutierte *postgerminal center*-Zellen aus [46] bzw. postulierten aufgrund beobachteter intraklonaler Sequenzvariationen einen noch vorhandenen Antigenkontakt der B-Zellen bei der Progression von *low-grade*-Maltomen des Magens. [47] Die von den Tumorzellen verwendeten Keimbahn-V_H-Gene werden häufig in Autoantikörpern exprimiert (z.B. V_H4.18, V_H4-21).

Histologisch ähneln die *low-grade* B-Zell-Maltome des Magens den Peyerschen Plaques des terminalen Ileums. [41] Reaktive, nichtneoplastische Follikel mit Keimzentrum und Mantelzone werden von kleinen bis mittelgroßen Tumorzellen mit unregelmäßigem Zellkern diffus

umgeben, was der Marginalzone entspricht. Diese Zellen wurden mit den kleinen eingekerbten Zentrozyten der Keimzentren verglichen, was ihnen den Namen *Centrocyte-like* (CCL) *Cells* gab. Sie sind sIg^{+} (M>A,G), CD32^{+} (=KB61) und CD5^{-}, CD10^{-}. Charakteristisch ist das Vorhandensein von lymphoepithelialen Läsionen (Einwanderung und Zerstörung der Magendrüsen durch die CCL), von zu Plasmazellen differenzierten Tumorzellen und von reaktiven Follikeln, die mit Tumorzellen durchmischt sind oder vollständig durch diese verdrängt wurden (follikuläre Kolonisation). Interessanterweise exprimieren die Tumorzellen der kolonisierten Follikel kein *bcl-2* Protein, was die extrafollikulär gelegenen CCL-Zellen (ohne t(18;14)!) tun. [48] Im Gegensatz dazu sind die *high-grade* B-Zell-Maltome des Magens, die durch blastische Transformation aus den *low-grade* Formen hervorgehen können, [49] durch zu Clustern zusammengelagerte große Zellen gekennzeichnet, die den Zentroblasten ähneln können. Es sind hier weniger reaktive Follikel vorhanden. Das klinische Verhalten der Magenmaltome ist indolent. Eine Aussaat des Tumors über die Lymphknoten des Magens hinaus und eine Knochenmarkbeteiligung sind sehr selten, eine lokale Eradikationstherapie wird als primäre Therapie der *low-grade* Maltome empfohlen. [43] Zu der Frage, ob sich *high-grade* Maltome langfristig klinisch ungünstiger verhalten, gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben (Zusammenfassung in ISAACSON, 1994 [41]). Die Maltome (extranodal) und die monozytoiden B-Zell-Lymphome (nodal) sind in der REAL-Klassifikation zu den Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen zusammengefaßt worden. [9]

1.2 DIE B-LYMPHOZYTEN

Lymphozyten zeichnen sich durch eine Eigenschaft aus, die sie von allen anderen Zellen unterscheidet: Kein ausgereifter Lymphozyt gleicht genetisch dem anderen. Grund dafür ist die Rearrangierung des individuellen Antigenrezeptors im Verlauf der Lymphozytenontogenese. Diese Tatsache ermöglicht eindeutige Klonalitätsbeweise, wesentliches Kriterium für die Diagnosestellung von Neoplasien.

1.2.1 Die Entwicklung der B-Lymphozyten

Da es für die Untersuchung der Ätiologie von B-Zell-Lymphomen von Bedeutung ist, in welchem Entwicklungsstadium sich die B-Zelle zum Zeitpunkt ihrer Entartung befunden hat, ist das Verständnis der physiologischen Lymphopoese notwendig. Sie beginnt während der achten Schwangerschaftswoche in der fötalen Leber und wird später vollständig vom Knochenmark übernommen. [50] Ein noch nicht bis ins Detail aufgeklärtes Wechselspiel

ausgewählter Wachstums- und Transkriptionsfaktoren determiniert eine pluripotente hämatopoetische Stammzelle für die weitere B-Zell-Entwicklung (*lineage commitment*). Die nachfolgenden Entwicklungsstadien, die durch die stufenweise Rekombination der Immunglobulingene (im Kapitel 1.2.2 näher erläutert) und durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle definiert sind, werden in der Abbildung 1 schematisch dargestellt:

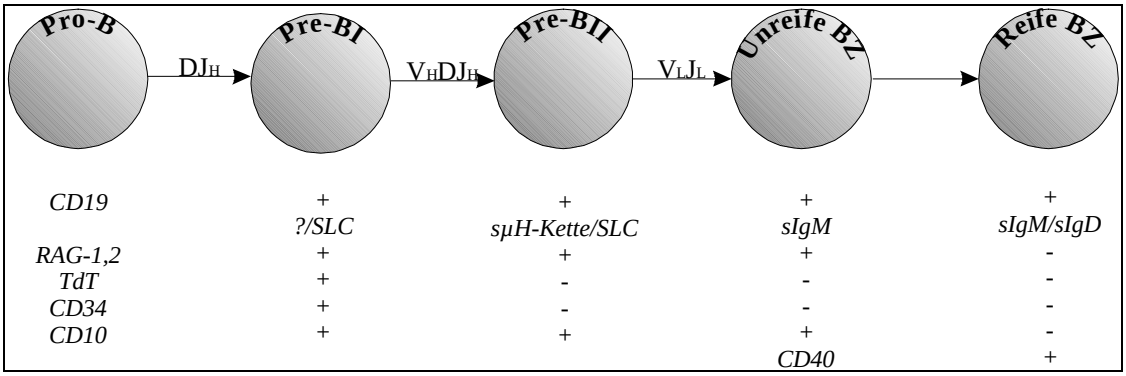

Abbildung 1 B-Zell-Ontogenese im Knochenmark, nach ROLINK *et al.* [51], Daten teilweise postuliert in Anlehnung an Experimente mit murinen Lymphozyten; *RAG*...Rekombinase aktivierende Gene, *TdT*...terminale Desoxynucleotidyl-Transferase, SLC...*surrogate light chain*

1.2.2 Die Entstehung der Antikörperdiversität

Unabhängig voneinander entstandene reife B-Zellen des in Abbildung 1 skizzierten Schemas gleichen sich nicht. Die Unterschiede zwischen den B-Lymphozyten bestehen im Antigenrezeptor (B-Zell-Rezeptor, Immunglobulin; siehe Abbildung 3, Seite 16), den die reife B-Zelle auf ihrer Oberfläche trägt, bzw. in der Zusammensetzung der Gene, die ihn kodieren. Die grundlegenden Mechanismen bei der Entstehung der Vielfalt der B-Zell-Rezeptoren wurden 1983 von dem japanischen Molekularbiologen TONEGAWA beschrieben, [52] der für seine Arbeiten mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde. Die nachfolgende Abbildung, die sich aus einem Abschnitt des Chromosoms 14 herleitet, skizziert die Rekombination der Gene für die schwere Kette eines Immunglobulins.

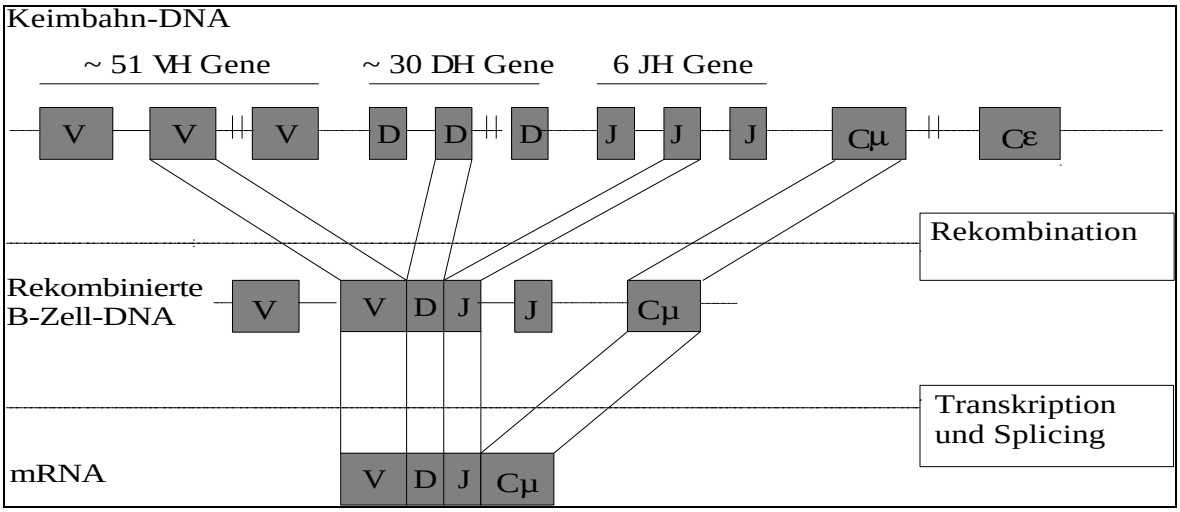

Abbildung 2 V(D)J-Rekombination der Gene für den variablen Teil der schweren Kette eines Immunglobulins

Die leichten Ketten werden nach ähnlichem Muster generiert. Ihre Gene befinden sich auf den Chromosomen 2 für die κ- und 22 für die λ-Kette. Allerdings fehlen hier die D-Elemente.

Die variable Domäne der schweren Kette des Antikörpers („V_H“ in Abbildung 3) wird durch drei verschiedene Gene kodiert: dem V_H-Gen (V für *variable* und H für *heavy*), dem D-Gen (D für *diversity*) und dem J_H-Gen (J für *joining*). Zur Verfügung steht ein Pool aus 51 funktionellen V_H-Genen, ca. 30 D-Genen und 6 J_H-Genen. Allein hierdurch ergeben sich 9180 Kombinationsmöglichkeiten für einen Prozeß, der, zusammen mit der Rearrangierung der T-Zell-Rezeptorgene, einzigartig in humanen Zellen ist: die gesteuerte Umlagerung und sogar Deletion von genetischem Material, also die Veränderung der Keimbahnkonfiguration. Während des Aneinanderfügens der Gensegmente wird teilweise nicht ganz „sauber“ gearbeitet, was die Vielfalt der entstehenden Kombinationen erhöht. So sind z.B. während des Vorgangs Exonukleasen aktiv, die von den einzelnen Bausteinen die Enden abspalten. Das macht zum einen das Bild an den Fugen V_H-D und D-J_H bunter und bringt zum anderen Verschiebungen des Leserahmens der 3’ nachfolgenden Sequenzen mit sich. Ein weiteres Enzym, die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT), die im Knochenmark (aber nicht in der fötalen Leber) während der Rekombination exprimiert wird, fügt matritzenunabhängig die sogenannten N-Sequenzen in die Fugen ein. [53] Da auch die leichte Kette des Antikörpers zur Antigenspezifität beiträgt, wird die insgesamt mögliche Vielfalt noch einmal beträchtlich erhöht. So verläßt die reife (naive) B-Zelle das Knochenmark und wandert in die sekundären lymphatischen Organe ein.

Schließlich wird die Diversitätsentstehung durch den Prozeß der somatischen Hypermutation vervollständigt. Dieser findet antigen- und T-Zell-abhängig in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe statt und wird durch den Primärkontakt der naiven B-Zellen mit einem Antigen initiiert. Es entstehen B-Zell-Blasten. Stochastisch eingefügte somatische Mutationen führen, in Abhängigkeit vom genetischen Code, zu stummen oder zu Austauschmutationen, wobei durch letzteres die Proteinstruktur des Antigenrezeptors verändert wird. Trägt die veränderte Struktur zur Antigenbindung bei, kann es zur Affinitätsänderung des B-Zell-Rezeptors gegenüber seinem Antigen kommen. B-Lymphozyten mit höher affinem B-Zell-Rezeptor werden positiv selektioniert. Durch Mutationen niedrig affiner oder funktionsuntüchtig gewordene Zellen werden durch den programmierten Zelltod (Apoptose) ausgemustert. [54] Die Expression des *bcl-2*-Gens infolge der Stimulation des B-Zell-Rezeptors spielt für das Überleben spezifischer funktionstüchtiger B-Zellen eine herausragende Rolle. [54]

1.2.3 Der B-Zell-Rezeptor, der Antikörper

Im Ergebnis der Affinititätsreifung entsteht eine positiv selektionierte B-Zell-Population, die das Antigen spezifisch und fest binden kann. Die B-Zellen entwickeln sich dann entweder zu Gedächtniszellen oder zu den Effektorzellen, den Plasmazellen, weiter. Die Entwicklungsrichtung wird vermutlich durch die Stimulation des CD40-Rezeptors der B-Zellen mit dem sogenannten CD40-Liganden der T-Zellen im Keimzentrum bestimmt: Stimulation bewirkt die Differenzierung zu Gedächtniszellen, das Fehlen des CD40-Liganden generiert Plasmazellen. [55] Plasmazellen wandern zur Antikörperproduktion vorrangig in die Milz und ins Knochenmark, B-*memory*-Zellen besiedeln vermutlich die Marginalzone der Milz. [56,57] Die Plasmazellen benötigen keinen B-Zell-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche mehr. Statt dessen werden diese Moleküle nun extrazellulär sezerniert und fungieren als Antikörper.

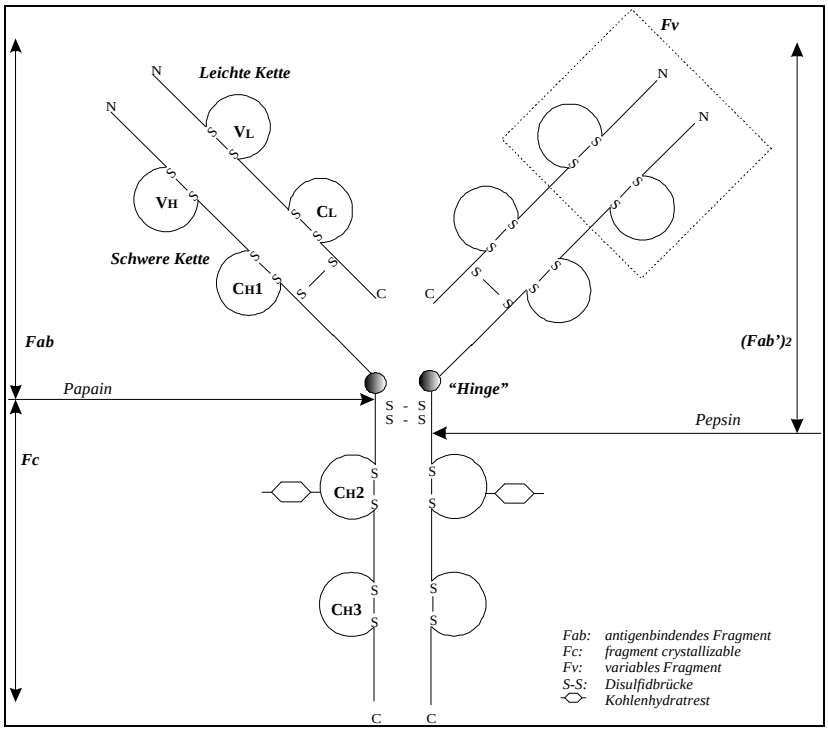

Abbildung 3 Das Antikörpermolekül am Beispiel des IgG

Das Antikörperprotein (siehe Abbildung 3) besteht aus einer schweren (H) und einer leichten (L) Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, wobei sich beide Ketten in eine NH_2-terminale variable (V) Region für die Ag-Bindung und eine COOH-terminale konstante (C) Region für die Effektorfunktionen unterteilen lassen. Zwei identische solcher H-L Paare sind nahe der *hinge*-Region der schweren Kette wiederum durch zwei Disulfidbrücken gekoppelt und bilden so einen bivalenten Antikörper mit zwei Antigenbindungsstellen. Die V-Region der schweren Kette wird durch die drei Gene V, D und J kodiert. Sie bestimmt gemeinsam mit der entsprechenden Region der leichten Kette den Idiotyp des Antikörpers. Die C-Region ist auch ein Multigenprodukt und bestimmt die Antikörperklasse, den Isotyp. Bei den Immunglobulinen der Klassen D, G und A besteht sie aus drei und bei IgM und IgE aus vier konstanten Domänen. Die für die Antigenbindung entscheidenden Bereiche der V-Domäne wurden durch KABAT rein statistisch durch Mutationsanalysen der damals bekannten Sequenzen postuliert und mündeten in der noch heute angewendeten Einteilung der V(D)J-Sequenzen in vier *framework regions (FR)* und drei *complementarity determining regions (CDR)*. [58] Für die CDRs konnte eine höhere Variabilität festgestellt werden („hypervariable Segmente"), was ihre Funktion bei der spezifischen Ag-Bindung wahrscheinlich machte. Spätere proteinchemische Untersuchungen determinierten die räumlichen Strukturen der Antikörper, was eine neue Nomenklatur (*loops* H1-3 bzw. L1-3) bzw. eine z.T. veränderte Durchnumerierung der Aminosäurenpositionen (Insertion an Position 31A,B anstelle von 35A,B) notwendig

machte. [59] Neuere Bindungsstudien haben die Positionen ermittelt, die tatsächlich an der Antigenbindung beteiligt sind, genannt *contact definition*. [60] In der vorliegenden Arbeit werden die CDRs, die *loops* und die Kontaktbereiche gekennzeichnet; die Numerierung erfolgt nach CHOTHIA. [59]

2 AUFGABENSTELLUNG

Primär kutane B-Zell-Lymphome sind Neoplasien, bei denen sich eine monoklonale B-Lymphozytenpopulation in der Haut nachweisen läßt. Die Ursachen für die Entstehung dieser extranodalen Lymphome sind bis heute unbekannt. Es ist unklar, zu welchem Zeitpunkt ihrer Entwicklung B-Lymphozyten sich der Wachstumskontrolle entziehen und warum in wenigen Fällen diese Zellen einen Tumor gerade in der Haut ausbilden. Fand das transformierende Ereignis extra- oder intrakutan statt? Sind die Tumorzellen unmutierte, *pregerminal center* B-Zellen oder handelt es sich um mutierte, also um mit einem Antigen in Kontakt gestandene oder noch stehende, *postgerminal center* oder *germinal center* B-Zellen? Und im Fall des letzteren, kann es sich bei dem Antigen, in Anlehnung an die antigengetriebenen Maltome des Magens, um eine Substanz handeln, die eine chronische Stimulation von Immunzellen der Haut hervorrufen und somit die Entstehung von Lymphomen begünstigen kann?

Molekularbiologische Analysen auf Einzelzellniveau bieten die Möglichkeit, Tumorzellen genetisch exakt zu charakterisieren. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Methode der Mikromanipulation und der Einzelzell-PCR an der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité Berlin zu etablieren, um an ausgewählten kutanen B-Zell-Lymphomen die Immunglobulingensequenzen ermitteln und Mutationsanalysen vornehmen zu können. Durch die Analyse der variablen Regionen der Immunglobulingene auf Einzelzellebene sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

a) Nachweis klonaler B-Zellen in Hautbiopsien von Patienten mit kutanem B-Zell-Lymphom mittels Einzelzellanalyse.
b) Sind die Immunglobulingene mutiert oder handelt es sich um unmutierte Keimbahnsequenzen?
c) Sind in verschiedenen Zellen des gleichen Tumors trotz klonaler Verwandtschaft Sequenzunterschiede zu finden (intraklonale Diversität)?
d) Sind die Sequenzen von Tumorzellen im zeitlichen Verlauf konstant oder „reifen“ die Tumorzellen noch antigenabhängig, feststellbar durch andauernde Mutationen (*ongoing mutation*)?
e) Welche Keimbahngene wurden von den Tumorzellen rearrangiert, sind diese eventuell typisch für Autoantikörper?
f) Wie unterscheiden sich Mutationsfrequenz und -verteilung der Immunglobulingene der primär kutanen von denen anderer (nodaler) B-Zell-Lymphome?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN PATIENTEN

In der vorliegenden Arbeit werden die Lymphomzellen von zwei Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité Berlin mit kutanem B-Zell-Lymphom untersucht.

3.1.1 Patient UK - kutanes Keimzentrumszell-Lymphom am behaarten Kopf

Der 54 Jahre alte Patient UK stellte sich in gutem Allgemeinzustand 1992 wegen einer seit vier Monaten bestehenden Hautveränderung am Capillitium in Form eines ca. 5 cm im Durchmesser betragenden, unscharf begrenzten, derben, nichtverschieblichen subkutanen Knotens vor, der teilweise exulzeriert und hämorrhagisch krustig belegt war und ein Umgebungserythem aufwies. Die entnommene Biopsie zeigte histologisch ein diffus konfluierendes lymphozytäres Infiltrat im Korium, das bis in das subkutane Fettgewebe reichte. Es bestand aus großkernigen Zellen mit blassem, randbetontem Kernchromatin und parazentralem großen Nukleolus. Die Mitoserate war hoch; mit Hilfe des Proliferationsmarkers MIB1 (Ki-67) wurde sie mit ca. 80% angegeben. Durch Anfärbung mit dem CD20-Antikörper konnten diese Zellen als B-Lymphozyten identifiziert werden. Vor allem entlang der Gefäße waren kleine kompakte Lymphozyten ohne Kernpolymorphie herdförmig betont. Sie stellten sich als T-Zellen dar und wurden als tumorinfiltrierende reaktive T-Zellen gewertet. Auch sogenannte Sternenhimmelzellen, mit Zelldetritus beladene Makrophagen, waren auszumachen, wohingegen Follikelstrukturen und Mantelzellen nicht zu erkennen waren. Die routinemäßig durchgeführte molekularbiologische Diagnostik zeigte in der Thermogradientengelelektrophorese der PCR-Produkte polyklonale Amplifikate sowohl für den TCRγ-Rezeptor als auch für die IgH-Kette (PD A. Lukowsky, mündliche Mitteilung). Eine Übersicht der Befunde findet sich in Tabelle 2 auf Seite 22.
Eine umfassende Durchuntersuchung (Palpation, Sonographie von Abdomen und Lymphknotenstationen, CT, Knochenmarkpunktion und Blutparameter) schloß eine extrakutane Beteiligung bzw. Herkunft aus. Trotz fehlender Monoklonalitätsnachweise (keine nachweisbare Leichtkettenexpression und somit keine -restriktion, keine Monoklonalität der PCR-IgH-Produkte; siehe Diskussion) wurde die Diagnose eines kutanen Keimzentrumszell-Lymphoms (zentroblastisch-zentrozytisch) vom diffusen Typ gestellt. Der Tumor wurde laut Histographie im Gesunden exzidiert und der Defekt mit Spalthaut gedeckt.

Abbildung 4 oben: Patient UK; *in loco*-Rezidiv des Keimzentrumszell-Lymphoms am Capillitium 2 Jahre nach der Exzision und Spalthautdeckung des Primärtumors

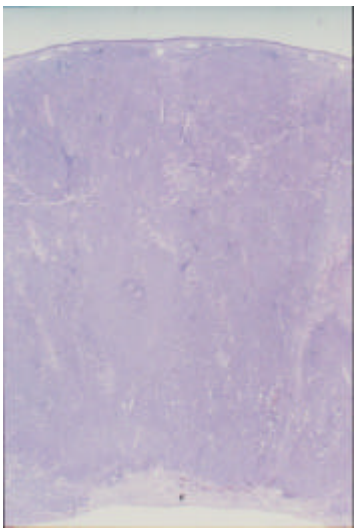

Abbildung 5 links: histologisches Präparat in HE-Färbung des Tumorrezidivs; 15fach vergrößert. sichtbar das diffuse, bis in die Subcutis reichende Infiltrat

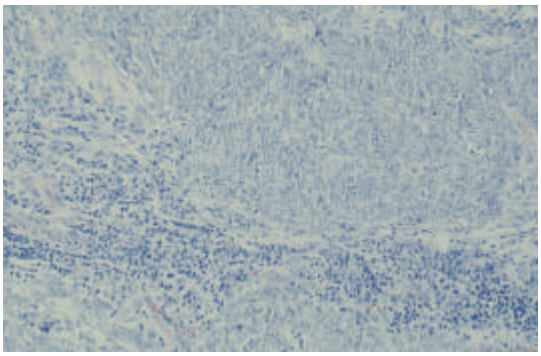

Abbildung 6 Giemsa-Färbung zur Darstellung der Zytomorphologie; 300fach vergrößert; deutlich werden die kleinen reaktiven T-Zellen entlang der Blutgefäße

Zwei Jahre später, im August 1994, traten erneute Hauterscheinungen an den Transplantaträndern auf (Abbildung 4), die wiederum chirurgisch entfernt wurden (Biopsie 11/94). Histologisch (Abbildung 5 und Abbildung 6) wurde ein Lokalrezidiv des vordiagnostizierten B-Zell-Lymphoms bestätigt. Wegen der diskontinuierlichen Ausbreitung des Tumors waren mehrere basale und laterale Schnittränder in der Histographie nur fraglich frei von neoplastischen Zellen. Daraufhin wurde systemisch mit Intron A (IFNα-2b, 3x9 Mio. IE sc./Woche) behandelt, was allerdings zu den unerwünschten Nebenwirkungen einer sensomotorischen Polyneuropathie und daher zum Absetzen der Therapie führte. Es folgte eine lokale Bestrahlung mit schnellen Elektronen mit einer Summendosis von 36 Gy. Der Tumor wuchs in der Folgezeit nicht oder nur sehr langsam. Erst ab Frühjahr 1996 nahm der Tumor langsam wieder an Masse zu (Biopsie 07/96) und es wurde eine erneute Exzision geplant. Überraschend konnte aber bei Wiedervorstellung im Herbst 1996 eine fast vollständige Regression des ca. 6 cm großen Knotens ohne jegliche Lymphomtherapie (Bemerkung: Herr UK erhielt in dieser Zeit Omeprazol wegen Magenbeschwerden) festgestellt werden. Bei sehr gutem Allgemeinbefinden waren bis auf ein leichtes Erythem keine weiteren Hauterscheinungen im früheren Tumorareal zu notieren.

3.1.2 Patientin IL - Großzelliges kutanes B-Zell-Lymphom der unteren Extremität

Die damals 49jährige Frau IL bemerkte Anfang 1994 erstmalig eine rötliche Hauterscheinung am medialen Knöchel des rechten Sprunggelenkes, die sich im Laufe der folgenden Monate zentrifugal ausbreitete. Ende des Jahres stellte sich die Patientin in der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité vor, wo sie eine ca. 15x20 cm große, asymmetrische, scharf begrenzte Infiltration der Haut mit atrophischem Zentrum und rötlich-lividem knotigem Randwall präsentierte. In der histologischen Untersuchung (Biopsie 12/94) stellte sich ein, durch einen schmalen Bindegewebsstreifen von der Epidermis abgesetztes, pleomorphes Zellinfiltrat dar, das neben wenigen kleinen lymphoiden Zellen überwiegend sehr große hellkernige Zellen beinhaltete, die in der Regel einen zentral/parazentral gelegenen Nucleolus und einen exzentrischen Zytoplasmasaum vorwiesen. Mit diesen Kriterien ähnelten sie Immunoblasten, ohne diesen tatsächlich zu entsprechen. Mehrfach waren auch hier Sternenhimmelzellen sowie ausgedehnte Tumorzellnekrosen, die für einen sich rasch ausbreitenden Tumor sprechen, sichtbar. Die Lagerung der Tumorzellen war überwiegend kohäsiv und die Mitoserate mit >90% außerordentlich hoch. Immunhistochemisch wurden die Tumorzellen als B-Lymphozyten charakterisiert. Aber auch ein nicht unbedeutender Anteil an T-Lymphozyten und Makrophagen war auszumachen. Follikelstrukturen waren nicht

vorhanden. Die molekularbiologische Untersuchung zeigte Monoklonalität der Produkte der IgH-PCR. Eine Übersicht der Befunde zeigt die folgende Tabelle.

	UK	IL		UK	IL
CD20	+ (80-90%)	+ (>90%)	***IgM/IgG***	- / -	+ / -
CD5	-	-	κ/λ	- / -	- / -
CD10	-	-	***bcl-2***	-	+
CD30 (Ki-1)	-	-			
CD-35	+	-	***IgH-PCR****	polyklonal	monoklonal
MIB1 (Ki-67)	+++ (80%)	+++ (>90%)	***TCRγ-PCR****	polyklonal	polyklonal

Tabelle 2 Immunhistochemische und molekularbiologische Befunde der beiden Patienten UK und IL; *...mit aus der Hautbiopsie extrahierter Gesamt-DNA

Es wurde primär die Diagnose eines großzelligen B-Zell-Lymphoms (Keimzentrumszell-Lymphom vom immunoblastischen Typ) gestellt, was nach der neuen EORTC-Klassifikation mit dieser Lokalisation als eigene Entität gewertet und als „großzelliges kutanes B-Zell-Lymphom der unteren Extremität“ bezeichnet wird.

Diese aggressivere Form der B-Zell-Lymphome machte die Durchführung von systemischer Chemotherapie notwendig. Frau IL erhielt sechs Zyklen nach dem CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon), was bis auf leichte Polyneuropathiesymptome und eine *Alopecia totalis symptomatica* gut toleriert wurde. Unter der Behandlung nahm das Tumorvolumen ab. Perimalleolär waren postinflammatorische Hyperpigmentierungen zu sehen. Insgesamt kam es zur Teilremission. Im Sommer 1995, zwei Monate nach Verabreichung des letzten CHOP-Zyklus, thrombosierte die *Vena poplitea* des rechten Beines, was eine dauerhafte Antikoagulationstherapie notwendig machte. Das gesamte rechte Bein war geschwollen und die Patienten gab starke Schmerzen an. In der rechten *Regio inguinalis* war jetzt eine ca. 2x5 cm große Resistenz tastbar. Eine zu diesem Zeitpunkt erneut veranlaßte Thorax-CT-Untersuchung zeigte keine lymphomverdächtigen Strukturen. Die Schwellung und Schmerzen im Bein verliefen progredient, was zu einer erneuten stationären Aufnahme führte. Innerhalb weniger Tage verschlechterte sich der Zustand der Patientin dramatisch. Es entwickelte sich ein zunehmendes Erythem, später größere Tumoren am rechten Fuß (Abbildung 9), die nachfolgend exulzerierten. Die inguinalen Knoten nahmen weiter an Größe

zu und die Patientin klagte jetzt zunehmend über retrosternale Schmerzen und Luftnot. Eine durchgeführte Biopsie der rechten Wadenmuskulatur (Biopsie 09/95) zeigte spezifische Infiltrate des vordiagnostizierten Tumors. Auch pulmonale Infiltrate waren jetzt nachweisbar. Es wurde versucht, die Tumorprogression mit erneuter Chemotherapie aufzuhalten. Wegen zunehmender Verschlechterung des Allgemeinzustandes unter der Chemotherapie mußte diese beendet werden. Frau IL verstarb im Juni 1996, zweieinhalb Jahre nach Diagnosestellung.

Abbildung 7 Patientin IL; Lokalbefund September 1995; Biopsienarbe sichtbar

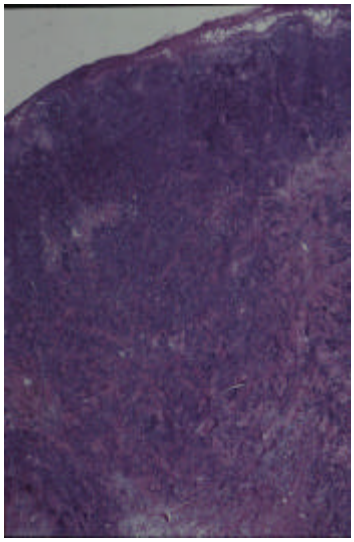

Abbildung 8 histologischer Befund; HE-Färbung; 30fach vergrößert

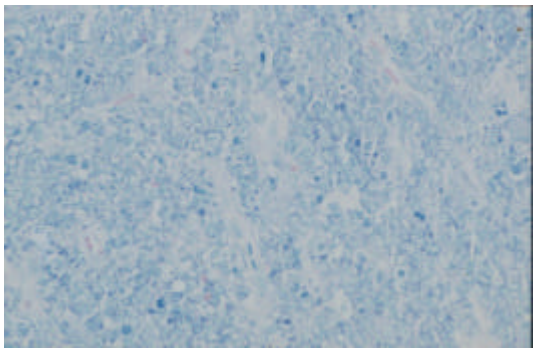

Abbildung 9 links: Giemsa-färbung des großzelligen B-Zell-Lymphoms der unteren Extremität; 300fach vergrößert

3.2 VERWENDETE GERÄTE, REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

3.2.1 Für die Färbung

Kryostat FRIGOCUT 2800	Leica, Bensheim, FRG
Primärantikörper:	
Maus-Anti-Human-B Cell, CD20, L26	Dako Diagnostika, Hamburg, FRG
Kaninchen Anti-Human-T Cell, CD3	Dako Diagnostika, Hamburg, FRG
Sekundärantikörper:	
Ziege-Anti-Maus IgG + IgM	Dianova, Hamburg, FRG
Ziege-Anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg, FRG
Tris Buffered Saline (TBS), ad 1l, pH 7,5:	
Tris-Base 0,9 g	Merck, Darmstadt, FRG
Tris-HCl 6,85 g	Merck, Darmstadt, FRG
NaCl 8,78 g	Merck, Darmstadt, FRG
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	BioGenex, Mainz, FRG
Neufuchsin	Sigma, Deisenhofen, FRG
Naphtol AS-BI Phosphate	Sigma, Deisenhofen, FRG

3.2.2 Für die Mikromanipulation

Umkehrmikroskop DIAPHOT 300	Nikon, Düsseldorf, FRG
Micropipette Puller PB-7	Narishige, Tokyo, Japan
Pipette Grinder EG-40	Narishige, Tokyo, Japan
Micropipette GD-1	Narishige, Tokyo, Japan

3.2.3 Für den Proteinase-Verdau und die PCR

Personal Cycler	Biometra, Göttingen, FRG
Multi Ultra PCR Tubes (für 1. Runde PCR)	Sorenson, Salt Lake City, USA
Mineral Oil	Sigma, Deisenhofen, FRG
RNA, 5S-ribosomal	Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG
Expand High Fidelity PCR System (für PCR 1. Runde)	Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG
AmpliTaq®DNA Polymerase, with GeneAmp®	Roche Molecular Systems, Branchburg, USA

(für PCR 2. Runde und alle anderen PCRs)	für Perkin Elmer
JumpStart™ dNTP	BioVentures, Murfreesboro; USA
Oligonukleotid-Primer	Biotez, Berlin, FRG
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, FRG
Agarose-Gel 2%:	
Agarose (UltraPure™) 2 g	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, FRG
1x TBE 100 ml	
Ethidiumbromid (UltraPure™) 10 µl	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, FRG
TBE 5x (1l):	
Tris-Base 54 g	Sigma, Deisenhofen, FRG
Borsäure 27,5 g	Merck, Darmstadt, FRG
EDTA 0,5 M, pH 8,0 40 ml	Merck, Darmstadt, FRG
1kb DNA-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, FRG

3.2.4 Für die Sequenzierung

373 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt, FRG
Sequence Analysis & Sequence Navigator Software	Applied Biosystems, Weiterstadt, FRG
DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, FRG
Formamid	Merck, Darmstadt, FRG
Sequenziergel:	
Harnstoff	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, FRG
Acrylamid	Pharmacia Diagnostics, Freiburg, FRG
APS	Sigma, Deisenhofen, FRG
TEMED	Amresco, Solon, USA

3.2.5 Für die DNA-Extraktion und Klonierung

Protease	Qiagen, Hilden, FRG
Extraktionspuffer:	
KCl 50 mM	Merck, Darmstadt, FRG
Tris / HCl pH 8,3 10 mM	Sigma, Deisenhofen, FRG
Nonidet® P40 0,45 %	Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG
	Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG

Tween® 20 0,45%	
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, FRG
TA-Cloning® Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
INF aF'one Shot® competetent cells	Invitrogen, Leek, Niederlande
Ampicillin-X-Gal-Agar-Platten (1,5%):	
Bacto-Agar 3g	Difco Laboratories, Detroit, USA
LB Broth Base [20g / l] 200 ml	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, FRG
Ampicillin [50 mg / ml] 200 µl	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, FRG
X-Gal [20 mg / ml] 400 µl (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid)	Carl Roth, Karlsruhe, FRG
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, FRG
Restriktionsendonuklease *EcoRI* [10 U / µl]	Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG
SuRE / Cut Buffer H	Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG

3.3 DIE METHODEN

3.3.1 Schnitt und Anfärbung der kryokonservierten Bioptate

Die für die Mikromanipulation verwendeten Biopsien wurden durch Frau Wittkowski, Abteilung für Immunpathologie des Instituts für Pathologie der Charité, geschnitten und gefärbt. 10 µm dicke Gewebeschnitte wurden 10 min mit Aceton fixiert und anschließend mit dem Primärantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Färbung der B-Zellen wurde der *Maus-Anti-Human-B Cell, CD20, L26* und für die T-Zell-Färbung der *Kaninchen-Anti-Human-T Cell, CD3* Antikörper der Firma DAKO verwendet. Die gebundenen Antikörper reagierten dann 30 min mit den biotinylierten Sekundärantikörpern *Ziege-Anti-Maus* bzw. *Ziege-Anti-Kaninchen* der Firma DIANOVA. Nach jeder Inkubation erfolgte ein gründlicher Waschschritt mit *Tris Buffered Saline* (TBS). Alkalische Phosphatase, im Komplex mit Streptavidin, wurde über dieses an Biotin gebunden (30 min) und stand für die anschließende Farbreaktion (15 min) des Chromogens (Neufuchsin / Naphtol-AS-Biphosphat) in CD3 / CD20-positiven Zellen zur Verfügung, was diese rot färbte. Die Präparate wurden dann bis zur Einzelzellmanipulation in Tris-HCl (0,5 M; pH 7,6) bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2 Die Mikromanipulation der Einzelzellen

Die Methode der Mikromanipulation, definiert als das Operieren mit Hilfe von mechanischen Vorrichtungen unter mikroskopischer Sicht, [61] von PETERFI [62] auch als Mikrurgie (Wortkombination aus *micro* und *surgery*) bezeichnet, wurde bereits Ende des vorigen Jahrhunderts von Mikrobiologen für die Untersuchung von Blastomeren tierischer Embryos angewendet. Einen großen Entwicklungsschub erhielt die Technik aufgrund ihres Potentials für die Reproduktionsmedizin, die *in vitro*-Fertilisation. Wir wendeten sie an, um aus histologischen Schnitten Einzelzellen zu isolieren. Hierbei wurden unter mikroskopischer Sicht bei 600facher Vergrößerung mittels zwei hydraulisch steuerbarer Glaskapillaren CD20- bzw. CD3-positive Einzelzellen mobilisiert, durch Unterdruck angesaugt und in ein PCR-Reaktionsgefäß für die 1. Runde der PCR überführt (Abbildung 10 - Abbildung 13). Jede gepickte Zelle wurde in ihrem Gewebeverband fotographisch dokumentiert. In dem Reaktionsgefäß waren 20 µl 1x PCR Puffer ohne MgCl und 1 ng / µl 5SrRNA vorgelegt. Die Zugabe der 5SrRNA soll das Binden der DNA an die Gefäßwand verhindern. Die Zellen waren hierin bei -20°C lagerbar. Die verwendeten

Glaskapillaren wurden zuvor mit einem *Micropipette Puller* unter hohen Temperaturen spitz ausgezogen und die Spitze dann mit einem *Pipette Grinder* angeschliffen.

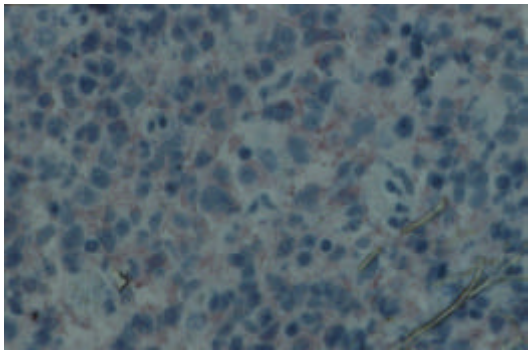

Abbildung 10

Histologischer Schnitt (10 µm); CD20 gefärbt; Vergrößerung 450fach; zu pickende Zelle umrandet; am Bsp. der Patientin IL

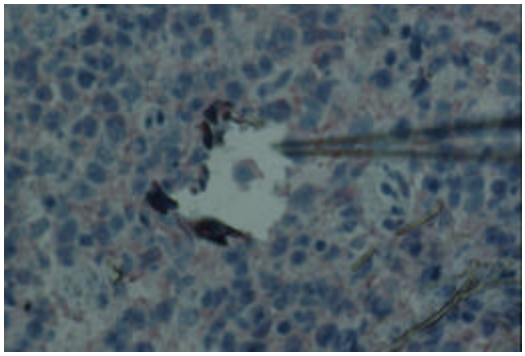

Abbildung 11

Die zu pickende Zelle ist freigelegt

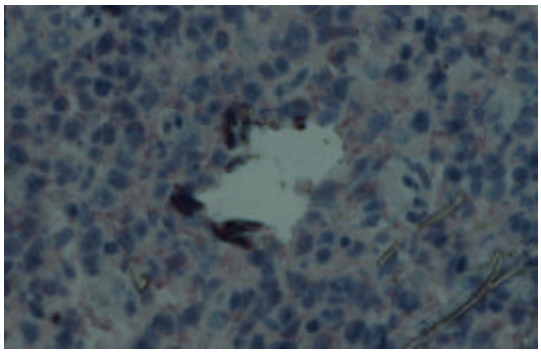

Abbildung 12

Die Zelle wurde aufgenommen

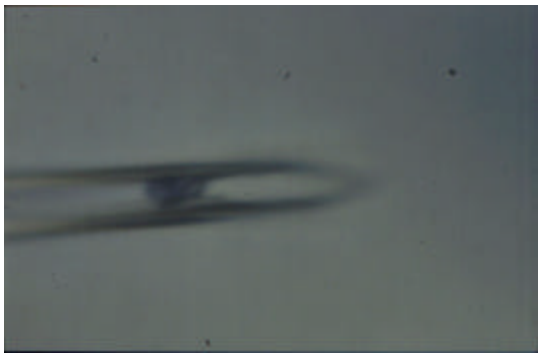

Abbildung 13

Die Zelle in der Glaskapillare

3.3.3 Die Einzelzell-PCR

Die in 20 µl PCR-Puffer gelagerten Einzelzellen wurden zuerst einem Verdau mit 0,5 µl Proteinase K [0,25 mg / ml] unterzogen. Hierzu wurde das mit einem Tropfen Mineralöl

überschichtete Gemisch 55 min bei 50°C inkubiert, was mit einer zehnminütigen Erwärmung auf 95°C zur Inaktivierung des Enzyms beendet wurde.

Zur Amplifikation des rearrangierten Immunglobulingens der Tumorzelle wurde eine zweistufige, *seminested* PCR gewählt. In der ersten Runde wurde ein Gemisch bestehend aus sechs V_H-familienspezifischen 5'-Primern und drei die sechs humanen J_H-Segmente bindenden 3'-Primer ($J_H$ext) verwendet. In der zweiten Runde wurde das Produkt der ersten Runde in sechs familienspezifische Ansätze mit je einem der sechs 5'-Primer gemeinsam mit einem Gemisch bestehend aus vier mehr intern gelegenen J_H-Primer (J_H-int) aufgesplittet. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Ihre Bindungsstellen an den Immunglobulingenen zeigt Abbildung 14.

VH 1,7	CCT CAG TGA AGG TYT CCT GCA AGG C
VH 2	GTC CTG CGC TGG TGA AAC CCA CAC A
VH 3	GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG
VH 4	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C
VH 5	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A
VH 6	ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G
JH 1,4,5int	GAC GGT GAC CAG GGT KCC CTG GCC
JH 2int	GAC AGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC
JH 3int	GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC
JH 6int	GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTK GCC
JH 1,2,4,5ext	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT
JH 3ext	TAC CTG AAG AGA CGG TGA CCA TTG T
JH 6ext	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT

Tabelle 3 Oligonukleotidprimer für die Einzelzell-PCR zur Amplifikation der Immunglobulingene, nach KÜPPERS *et al.* [63]; angegeben in 5'-3'-Richtung; Primer `VH1,7` bindet an V_H1- und V_H7-Familienmitgliedern; Y: C+T, R: A+G, K: G+T

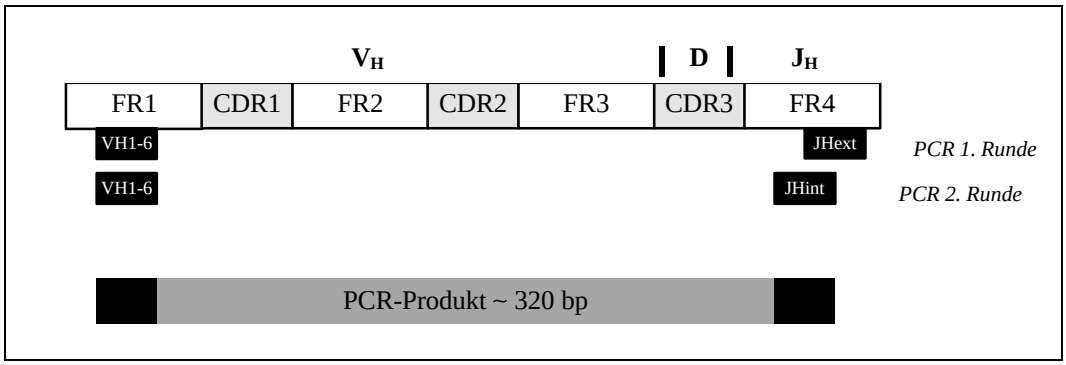

Abbildung 14 Primeransatz am Immunglobulingen für die *seminested* PCR

Die PCR-Reaktion der ersten Runde wurde mit der DNA einer Zelle, je 7 nM Primer der 9 Primer im Gemisch, 200 µM dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$, 5 µl 10xPCR-Puffer und 3,5 U eines Taq/Pwo-DNA-Polymerasegemisches geringerer Fehlerrate in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Die Polymerase wurde nach dem ersten Denaturierungsschritt hinzupipettiert. Wir benutzten extradünne Reaktionsgefäße, um die Wärmeübertragung während der PCR zu optimieren. Die Amplifikation bestand aus einem primären Zyklus mit einem Denaturierungsschritt von 95°C für 2 min, einem Primer *annealing* von 65°C für 2 min und einem Extensionsschritt von 72°C für 1 min gefolgt von 35 Zyklen 95°C 1 min, 59°C 30 sec und 72°C 1 min und abschließender Extension von 5 min bei 72°C. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen, die am gleichen Tag wie die B-Zellen aus den CD3-gefärbten Schnitten des jeweiligen Patienten isoliert wurden. Alle mikromanipulierten Zellen wurden kodiert, der Ansatz der PCR-Reaktionen erfolgte verschlüsselt.

Für die zweite Runde wurde 1 µl des PCR-Ansatzes aus der ersten Runde mit je 50 nM Primer, 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP und 1,25 U Taq Polymerase versetzt. Das PCR-Programm gestaltete sich wie folgt: Primärer Zyklus 95°C 2 min, 68°C 5 min (Polymerase pipettiert), 72°C 1 min, gefolgt von 45 Zyklen 95 °C 1 min, 61°C 30 sec, 72°C 1 min und abschließende Extension 72°C 5 min. Für die PCR mit den Primern aus den V_H-Familien 3 und 4 wurde die *annealing*-Temperatur für die 45 Zyklen auf 65°C erhöht. Als Negativkontrolle für die 2. Runde verwendeten wir „Wasserkontrollen“, die alle für die PCR verwendeten Reagenzien, aber kein Produkt der 1. Runde, also kein *template* enthielten. Die amplifizierten V-Regionen wurden auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid visualisiert. Die Produkte wurden unter Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kit* entsprechend den Vorschriften des Herstellers gereinigt und anschließend direkt sequenziert.

3.3.4 Die Direktsequenzierung

Da das PCR-Produkt Kopien eines einzigen DNA-Molekülabschnittes einer Zelle darstellte, also monoklonal war, konnte es ohne den Umweg der Klonierung direkt sequenziert werden. Die Sequenzierung wurde nichtradioaktiv nach SANGER [64] unter Verwendung fluoreszenzmarkierter dideoxygenierter NTP mit dem *373 DNA Sequencer* (Applied Biosystems) durchgeführt.

Für die Sequenzreaktion wurden 1-10 µl PCR-Produkt (in Abhängigkeit der DNA-Konzentration, ca. 50 ng DNA), 5 µl *Ready Mix* (enthält AmpliTaq DNA Polymerase FS,

dNTPs, dITP, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und Puffer) aus dem *Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer) und 1,5 µl eines der beiden Primer [2,5 µM] aus der PCR 2. Runde in einem Volumen von 20 µl, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, zur Reaktion gebracht. Einem primären Denaturierungsschritt von 96°C für 2 min folgten 25 Zyklen bestehend aus 96°C 30 sec, 50°C 15 sec und 60°C 4 min. Anschließend wurde das Mineralöl entfernt und das Produkt in ein Reaktionsgefäß mit 2,0 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6 und 50 µl 95%igem Äthanol überführt, gemischt und anschließend 10 min auf Eis gelagert. Mit einer Eppendorf-Mikrozentrifuge (5415 C) wurde die Lösung 30 min mit 14000 U / min zentrifugiert und die obere Äthanollösung entfernt. Das Präzipitat wurde noch einmal mit 250 µl 70%igem Alkohol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Herstellung des Sequenziergels (4,75%ig) wurden 30,0 g Harnstoff in 7,1 ml 40%igem Acrylamid, 6ml 10x TBE und 25,375 Aqua bidest. gelöst, das Gemisch daraufhin durch einen Filter (0,2 µm) gegeben und für ca. 10 min entgast. Nach Zugabe von 180 µl 10%igem APS und 24 µl TEMED wurde das Gel gegossen. Die luftgetrockneten Proben wurden in 4 µl Ladepuffer (Formamid / 50mM EDTA / Dextranblau=5 / 1 / 1) aufgenommen und auf das Sequenzgel aufgetragen.

Jedes PCR-Produkt der 2. Runde wurde prinzipiell sowohl in 5'-3' (*sense*) als auch in 3'-5' Richtung (*antisense*) sequenziert. So ließen sich fehlende oder unklare Informationen durch den Gegenstrang ergänzen bzw. verifizieren. Bei Nichtübereinstimmung wurde erneut sequenziert, was alles in allem die mögliche Fehlerrate der Sequenzreaktion auf eine vernachlässigbare Größe minimierte. Die erhaltene Sequenz wurde *online* gegen das *V BASE Sequence Directory* (I.M. Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) mit Hilfe der DNAPLOT Software von H.-H. Althaus, Universität Köln, verglichen, um die nächstverwandten Immunglobulin-Keimbahngene zu ermitteln.

3.3.5 Die DNA-Extraktion, PCR, Klonierung

Aus Hautbiopsien der Tumorpatienten wurde die DNA extrahiert, um durch eine PCR der Gesamt-DNA den Tumorklon nachzuweisen. Auch für die Amplifizierung der Keimbahngene (s. Abschnitt 3.3.6) wurde Gesamt-DNA der Patienten benötigt. Etwa 20x10 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebetteten Biopsien wurden mit 1 ml Xylol entparaffinisiert, das Xylol mit 1 ml 96% Äthanol ausgewaschen und anschließend eine Stunde lang im Vakuum getrocknet. Dann wurden die Proben für ca. 10 Stunden mit 20 µl Protease [2g / l] und 200 µl Extraktionspuffer bei 55°C inkubiert. Abschließend wurde die Protease durch 15minütige Erwärmung auf

95°C inaktiviert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (14000 U / min, 5 min) aus dem Überstand entfernt. Fünf Mikroliter der DNA-Lösung wurden mit je 200 nM eines der 6 V_H-Primer und den 4 gepoolten $J_H$ext-Primer, 5 µl 10x PCR-Puffer, 2,5 µM $MgCl_2$, 200 µM dNTP und 1,25 U Taq Polymerase zur Reaktion. Das PCR-Programm bestand aus 2 min primärer Denaturierung bei 95°C gefolgt von 35 Zyklen 95°C 30 sec, 61°C 30 sec, 72°C 1 min. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarose-Gel mittels Ethidiumbromid analysiert, die Banden erwarteter Größe ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) entsprechend den Vorschriften des Herstellers gereinigt.

Für die Klonierung verwendeten wir den *TA-Cloning*® *Kit* der Fa. Invitrogen®. Ungefähr 10 ng (1 µl) PCR-Produkt wurden in den pCR®2.1-Vektor ligiert und 2 µl der Ligationsreaktion in *INF*α*F'One Shot*® -kompetente Zellen transformiert. Das Produkt wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen auf Ampicillin-X-Gal-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien aus weißen Kolonien wurden angeimpft und in LB-Medium (+ Ampicillin 1:1000) wiederum über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Um die Plasmide zu isolieren, wurde der *QIAGEN Plasmid Mini Kit* nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Zur Kontrolle erfolgte ein Probeverdau von 8,5 µl Plasmid-DNA mit 0,5 U *EcoRI* und Puffer H für 2 h bei 37°C und anschließende Visualisierung auf einem 2%igen Agarosegel. In der darauffolgenden Sequenz-Reaktion wurden 4 µl Plasmid-DNA eingesetzt. Im Gegensatz zur Direktsequenzierung kamen hierbei am Vektor bindende Primer zur Anwendung (Tabelle 4).

M13Rev	TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC
T7Prom	AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG

Tabelle 4 Oligonukleotidprimer zur Sequenzierung von in pCR™II klonierten PCR-Produkten

3.3.6 Die Keimbahngen-Analyse

Obwohl die meisten humanen V_H-Keimbahngene bekannt sind, ist es für Mutationsanalysen aufgrund eines möglichen allelen Polymorphismus erforderlich, die Sequenz der rearrangierten und mutierten Immunglobuline gegen das putative Keimbahngen der jeweilig untersuchten Person zu vergleichen. Hierfür mußten Primer konstruiert werden, die das in der Tumorzelle rearrangierte V_H-Keimbahngen in Keimbahnkonfiguration amplifizieren.

V5-51Lead	CCC CTG ATT CAA ATT TTG TGT CTC C
V5-51RSS	CTC GGG GCT GGT TTC TCT CAC TGT G
V3-7Lead	CTA GGA AGA TTG AGT GTG TGT GGA T
V3-7RSS	CTC ACA CTG ACT TCC CCT CAC TGT G

Tabelle 5 Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung des Keimbahngens V5-51 des Patienten UK und des Keimbahngens V3-7 der Patientin IL; Lead...*leader*, 5'-Primer; RSS...Rekombinationssignalsequenz, 3'-Primer

Die PCR-Reaktion gestaltete sich mit 1 µl Gesamt-DNA aus der Hautbiopsie, je 200 nM Primer, 10x PCR-Puffer, 2,5 µM $MgCl_2$, 200 µM dNTP und 1,25 U Taq Polymerase wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben wurde.

4 ERGEBNISSE

4.1 ETABLIERUNG DER METHODE

Um die Methode der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR zu etablieren, verwendeten wir zwei verschiedene Untersuchungsmaterialien: die Hybridomzellinie CB03 und ein kutanes T-Zell-Lymphom, das reichlich mit reaktiven B-Zellen durchmischt war.

4.1.1 Die Hybridomzellinie CB03

Die Hybridomzellen wurden von PD Dr. S. Jahn, Dermatologische Universitätsklinik der Charité, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein IgM-produzierendes Human-Maus-Heterohybridom, das durch eine Fusion von lienalen B-Lymphozyten eines Patienten mit idiopathischer Thrombozytopenie mit Maus-Myelom-Zellen entstanden ist. [65] Die Sequenzen der rearrangierten humanen V_HDJ_H Gene des Hybridoms waren bekannt. Die Hybridomzellen wurden mittels Zytospins auf einen Objektträger gebracht und wie oben beschrieben mikromanipuliert und sequenziert.

Wir untersuchten insgesamt 18 CB03-Zellen, wobei die PCR 1. Runde an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurde. Von den 18 untersuchten Zellen fanden wir in 4 Zellen die erwartete Sequenz, was einer Effizienz von ca. 20% entspricht.

	Anzahl untersuchter Zellen	***Anzahl der Zellen mit erwarteter Sequenz***	***Anzahl der Falschprodukte***
	10	4	9
	8	0	6
Σ	18	4	15 (= 5 Sequenzen)

Tabelle 6 Daten der CB03-Hybridomzell-Analyse; Erläuterungen im Text

Dafür wurden aber 15 Falschprodukte mit Sequenzen, die sich von der erwarteten unterschieden, amplifiziert. Von den 15 Amplifikaten waren allerdings einige identisch, sodaß sich dahinter nur 5 Sequenzen verbargen. Eine Sequenz davon war bekannt und in der Datenbank aller in unserem Labor sequenzierten V_HDJ_H-Gene vorhanden. Die anderen

4 Sequenzen waren unbekannt. Als Negativkontrolle verwendeten wir Reaktionsgemische, die alle PCR-Chemikalien, aber keine Zelle enthielten. Die Verunreinigungen, aber nicht die erwartete Sequenz, waren auch in diesen Negativkontrollen anzutreffen.

4.1.2 Reaktive B-Lymphozyten aus einem kutanen T-Zell-Lymphom

Im Anschluß an die Versuche mit den Zytospin-Präparaten untersuchten wir B-Lymphozyten aus Bioptaten von der Patientin MW stammend, die an einem kutanen T-Zell-Lymphom erkrankt war. (Nähere klinische Angaben sind von untergeordneter Bedeutung.) Die immunhistochemische Färbung der Biopsie zeigte eine beträchtliche Population von CD20-positiven Zellen. Mit der Untersuchung dieser Zellen wurde zum einen die Mikromanipulation von Zellen in ihrem kutanen Gewebeverband und zum anderen die PCR-Amplifikation von verschiedenen und unbekannten Sequenzen erprobt.

Eine Statistik der durchgeführten Analyse gibt die folgende Tabelle wieder:

Experiment (PCR 1. Runde)	*Anzahl der PCR-Reaktionen*	*Anzahl gefundener Amplifikate erwarteter Länge*	*davon sequenziert*	*davon bekannte Verunreinigungen*
I	9	0	0	0
II	10	11*	7	0
III	10	17*	9	3
IV	10	6	3	1
V	6	8	3	0
Σ	45	42	22	4

Tabelle 7 Ergebnis der Einzelzelzellanalysen von polyklonalen B-Zellen aus der Biopsie der Patientin MW mit kutanem T-Zell-Lymphom. *...Wegen der erwarteten geringen Effizienz sind bewußt mehr als nur eine zu untersuchende Zelle in einige der PCR-Gefäße während der Mikromanipulation überführt worden, wodurch mehrere Amplifikate möglich sind.

Bei 45 durchgeführten PCR-Reaktionen waren insgesamt 42 Produkte erwarteter Länge im Agarosegel nachweisbar. Eine Aussage zur Effizienz kann nicht gemacht werden, da sich, wie in der Legende zur Tabelle beschrieben, in einigen PCR-Reaktionen der 1. Runde mehr als eine Zelle befand. (Durch Protokollierung und bildliche Darstellung der durchgeführten Mikromanipulation kann aber genau Auskunft darüber gegeben werden, wie viele Zellen

tatsächlich in welchem Röhrchen zur Reaktion kamen.) Von den 42 visualisierten PCR-Produkten wurden 22 direkt sequenziert. Alle 22 Sequenzen waren untereinander verschieden, wobei 4 davon bereits Bestandteil unserer laboreigenen Sequenzdatenbank waren und somit als Verunreinigung zu werten sind. Bei 3 der übrigbleibenden 18 unbekannten PCR-Produkte zeigte die Direktsequenzierung Überlagerungen verschiedener Sequenzinformationen, was eine Klonierung notwendig machte (*MW15H3*, *MW24H3*, *MW28H3* in Abbildung 15). Auch diese Überlagerungen sind vermutlich die Folge der Amplifizierung der Immunglobulingene mehrerer Zellen in einem Reaktionsgefäß, wobei eine biallelische VDJ-Rekombination formell nicht ausgeschlossen werden kann. Einschließlich der Klonierungen sind aus den CD20-positiven Zellen der Patientin MW insgesamt 21 unterschiedliche Sequenzen erhalten worden. Die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen sind in der Abbildung 15 nach V_H-Familien geordnet dargestellt. Beachtenswert ist der Fakt, daß in 14 der 21 Sequenzen das verwendete V_H-Gen in Keimbahnkonfiguration vorliegt, d.h. die Sequenz auf Nukleotidebene nicht eine einzige Mutation aufweist.

Als Negativkontrolle kamen CD3-positive Zellen zum Einsatz, die am gleichen Tag wie die B-Zellen aus dem Gewebeschnitt der Patientin MW isoliert wurden. Insgesamt 9 T-Zellen wurden mit den 45 B-Zellen analysiert. Die PCR von 1 der 9 T-Zellen zeigte ein Produkt im Agarosegel, dessen Sequenzierung eine aus unserem Labor stammende Verunreinigung.

```
                                  ---CD1---            -------CD2------
                            ----H1----                    ---H2---
                                  --CDR1-                --------CDR2-------
                         2         3             4          5            6          7         8            9
                         01234567890 1ab2345 67890123456789 012abc3456789012345 678901234567890 12abc345678901234

MW34H1 (DP-14)0          .....SGYTFT S..YGIS WVRQAPGQGLEWMG WISA..YNGNTNYAQKLQG RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR ASDEWELTPGAFDIW
MW52H1 (DP-25)9          .....SGYIFT D..YYMH WVRQAPGQRLEWMG WINA..GNGNTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR DLDDYRYGMDVW
MW55H1 (DP-14)2          .....SGYTFT S..YGIS WVRQAPGQGLEWMG WISA..YNGNTNYAQKLQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR DRAGRTGWFDPW

MW15H3P3 (DP-46)0        .....SGFTFS S..YAMH WVRQAPGKGLEWVA VISY..DGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DP*IL**YQLRRCF*YL
MW15H3P4 (COS-3)0        .....SGFTFS S..YGMH WVRQAPGKGLEWVA FIRY..DGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DKEEEGLFDYW
MW17H3 (VH3-8)0          .....SGFTFS D..YYMS WIRQAPGKGLEWVS YISS..SSSYTNYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GGYYGDENWFDPW
MW19H3 (DP-48)9          .....SGFTFG N..YDMH WVRQATGKGLQWVS GIG...TAGDTFYAGSVQG RFTISRENANNSLFLQMNSLRAGDTAVYYCAR ASPPHGSGSYHNSYYYYMDVW
MW22H3 (DP-58)0          .....SGFTFS S..YEMN WVRQAPGKGLEWVS YISS..SGSTIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ASHYGSGTDCW
MW24H3P1 (DP-46)0        .....SGFTFS S..YAMH WVRQAPDKGLEWVA VISY..DGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSLETSGIAARRVYYYYYMDVW
MW24H3P2 (DP-47)0        .....SGFTFS S..YAMS WVRQAPGKGLEWVS AISG..SGGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK EGMEGYDYVWGSYHKPRYYYYYMDVW
MW28H3P1 (DP-54)0        .....SGFTFS S..YWMS WVRQAPGKGLEWVA NIKQ..DGSEKYYVDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DTGMSYGPSEGGYW
MW28H3P2 (DP-46)1        .....SGFTFS S..YAMH WVRQAPGKGLEWVA VISY..DGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GKGDYAKYW
MW30H3 (V3-64)0          .....SGFTFS S..YAMH WVRQAPGKGLEYVS AISS..NGGSTYYANSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR DI?YTADPDYYYGMDVW
MW47H3 (DP47)0           .....SGFTFS S..YAMS WVRQAPGKGLEWVS AISG..SGGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK ASTYYDILTGFYYYYYMDVW

MW19H4 (DP-71RB)6        .....SGGSIS S..YYWS WIRQPPGKGLEWIG YIY...HSGSTNHNSSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR RQQQLGKLY*YGMDVW
MW21H4 (V4-34)0          .....YGGSFS G..YYWS WIRQPPGKGLEWIG EIN...HSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR LVCSSTSCYYSYYYGMDVW
MW30H4 (DP-78)15         .....SGGSIS SGNSYWS WIRQPPGRGLE*IG HIY...SSGNTYNNPSLKS RVTISLDTSKNQFSLRPSSVTAADTAVYYCAR D*AASRIL*EYQLLPMSVYLDLPPCLL
MW34H4 (4.30)1           .....SGGSIS SSSYYWG WIRQPPGKGLEWIG SIY...YSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR EQTGTTMDYYYGMDVW

MW28H5 (VH32S)0          .SCKGSGYSFT S..YWIS WVRQMPGKGLEWMG RIDP..SDSYTNYSPSFQG HVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR RSAGPDDYYDSSGWIWFDPW
MW37H5 (DP-73)0          .SCKGSGYSFT S..YWIG WVRQMPGKGLEWMG IIYP..GDSDTRYSPSFQG QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAS GGYDYW
MW49H5 (DP-73)0          .SCKGSGYSFT S..YWIG WVRQMPGKGLEWMG IIYP..GDSDTRYSPSFQG QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCGV VIKWGGMDVW
```

Abbildung 15 Abgeleitete Aminosäuresequenzen der V_H-Gene des B-Zell-reichen T-Zell-Lymphoms der Patientin MW im *single-letter code*. Aminosäureaustausche im Vergleich zu den Keimbahn-V_H-Genen (in Klammern) sind fett und kursiv dargestellt. Die hochgestellten Ziffern geben die Anzahl der Mutationen auf Nukleotidsequenzebene wieder. Nur fettgedruckte Sequenzen sind funktionell. Sequenzen ohne „W“ (Tryptophan) als letzte Aminosäure sind nicht im Leseraster. *...Stop codon; CDR...*complementarity determining regions* [58]; H1,2...*loops* [59]; CD1,2...*contact definition* [60]

4.2 SEQUENZANALYSE VON TUMORZELLEN AUS KUTANEN B-ZELL-LYMPHOMEN

Insgesamt wurden 106 Lymphomzellen, stammend von 2 Patienten mit primär kutanem B-Zell-Lymphom, untersucht. Nach der Isolierung der Zellen aus anti-CD20-gefärbten histologischen Präparaten wurden diese in eine *seminested* PCR überführt, um mit Hilfe spezifischer Primer die *single copy*-DNA ihrer rearrangierten Immunglobulingene der schweren Kette zu amplifizieren. In der 1. Runde der PCR wurden alle in Frage kommenden Primer gepoolt eingesetzt und anschließend das entstandene PCR-Produkt jeder Zelle für 6 V_H-familienspezifische PCR-Reaktionen der 2. Runde als Matritze verwendet. Die Produkte der 2. Runde wurden auf einem Agarosegel visualisiert. Abbildung 16 zeigt das am Beispiel von vier Zellen der Patientin IL. Die Zellen mit der Nr. 51 und 52 zeigen jeweils ein Produkt in Bahn 3, was die Amplifizierung eines Immunglobulingens der V_H3-Familie anzeigt.

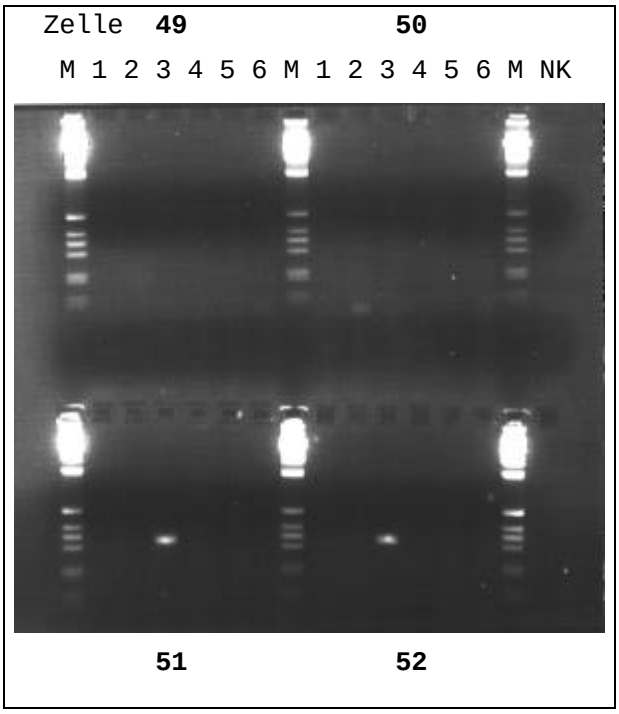

Abbildung 16 2% Agarose-Gel. Aufgetragen sind 5 µl der PCR-Produkte 2. Runde von 4 Zellen der Patientin IL, wovon die beiden unteren ein Amplifikat erwarteter Länge (ca. 320 bp) der V_H3-Familie zeigen. M...Marker; NK...Negativkontrolle

Die PCR-Produkte mit einem Amplifikat erwarteter Länge wurden nach einer Reinigung in beide Richtungen direkt sequenziert. Abbildung 17 zeigt ein Elektropherogramm des verwendeten automatischen Sequenzierers der Fa. *Applied Biosystems*.

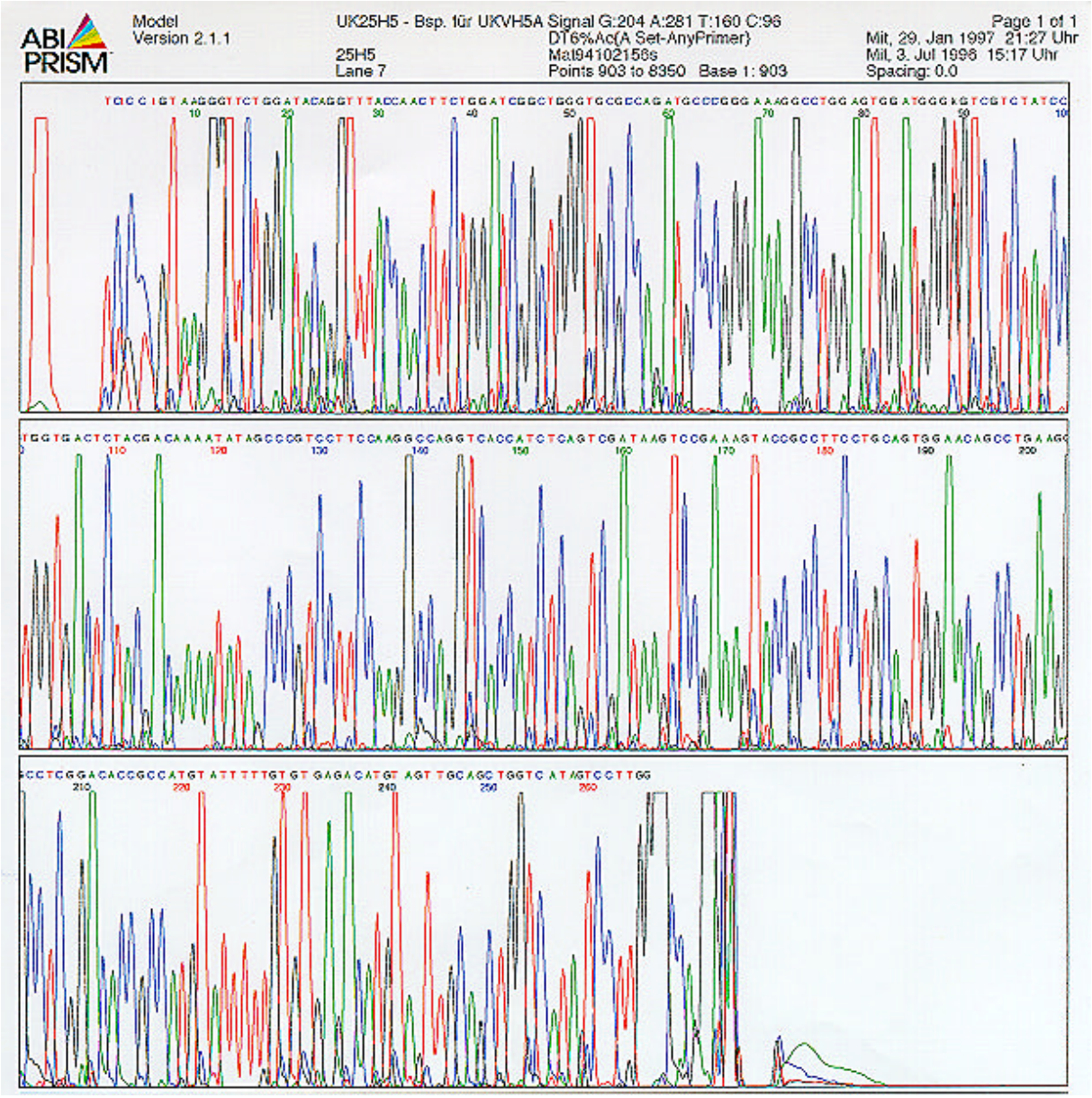

Abbildung 17 Elektropherogramm der Direktsequenzierung des *sense*-Stranges des IgH-PCR-Produktes einer Tumorzelle (Verschlüsselungs-Nr. 25) des Patienten UK. Die über den Kurven angegebene Nukleotidsequenz in Großbuchstaben wurde automatisch durch die Software zugeordnet. Kleinbuchstaben entstanden bei der manuellen Nachbearbeitung.

4.2.1 4.2.1 Lymphomzell-Analyse des Patienten UK

Herr UK leidet seit ca. fünf Jahren an einem primär kutanen Keimzentrumszell-Lymphom am behaarten Kopf. Wir untersuchten zwei Biopsien, die in einem zeitlichen Abstand von zwei Jahren entnommen wurden: Biopsie 11/94 und 07/96. Beide Biopsien entstammen *in loco*-Rezidiven des exzidierten Primärtumors. Kryokonserviertes Gewebe des Primärtumors aus dem Jahre 1992 war nicht vorhanden. Aus der Biopsie 11/94 untersuchten wir 34 und aus der Biopsie 07/96 27 CD20-gefärbte Zellen. Eine Zusammenfassung der durchgeführten Analyse gibt die folgende Tabelle wieder:

Experiment (PCR 1. Runde)	***Biopsie***	***Anzahl der untersuchten B-Zellen***	***Anzahl gefundener Amplifikate erwarteter Länge***		***identische V_HDJ_H-Rekombination***
			gesamt	***sequenziert***	
I [a]	11/94	8	17*	17	3 UKVH5a
II [b]	11/94	9	4	2	1 UKVH5a
III [b]	11/94	9	5	5	5 UKVH5a
IV [c]	11/94	8	6	6	2 UKVH5a
V [d]	07/96	9	3	3	3 UKVH5b
VI [d]	07/96	9	0	0	-
VII [d]	07/96	9	2	2	1 UKVH5b
	Σ	61	37	35	11 UKVH5a ≠ 4 UKVH5b

Tabelle 8 Übersicht der Einzelzellanalyse des Patienten UK (kutanes Keimzentrumszell-Lymphom); unterschiedliche Buchstaben in eckiger Klammer der 1. Spalte repräsentieren unterschiedliche Mikromanipulationstage. *...Mehr Amplifikate als untersuchte Zellen aufgrund von Verunreinigungen; siehe Text.

Die Differenz aus den Zahlen der vorletzten und letzten Spalte gibt die Anzahl der „Nicht-Tumorzellen“ wieder. Da es sich bei deren Sequenzen (abgesehen von einer Ausnahme) um uns bekannte und in unserer Laborsequenzdatenbank gespeicherte Sequenzen handelt, sind die „Nicht-Tumorzellen“ als Plasmid-Verunreinigungen und nicht als reaktive B-Zellen des kutanen Lymphoms zu werten. Trotz dieser sehr hohen Anzahl von Verunreinigungen (Häufung in Experiment I, siehe Diskussion), fanden wir in verschiedenen Zellen identische Sequenzen bei zeitlich unabhängig durchgeführten Mikromanipulationen und PCR-

Ansätzen. Gleiche Sequenzen wurden zu einer Konsensus-Sequenz mit den Initialien des Patienten und der amplifizierten V_H-Familie zusammengefaßt (Tabelle 8, letzte Spalte). Alle aus einer Biopsie stammenden B-Lymphozyten waren in ihren V_HDJ_H-Sequenzen identisch, sie zeigten also keine intraklonale Diversität, obwohl aus einem histologischen Präparat von räumlich entfernten Stellen Einzelzellen mobilisiert und analysiert wurden. Die Sequenzen der Tumorzellen aus den beiden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Biopsien waren allerdings unterschiedlich, wobei ihre Verwandtschaft, also das Entstehen beider Subklone aus der gleichen naiven B-Zelle, sicher ist: Die rekombinierten V_HDJ_H-Gene und die N-Sequenzen sind identisch. Die Abbildung 21 auf Seite 49 zeigt die Nukleotidsequenzen der V_H-Regionen der Lymphomzellen. Sie sind im Vergleich zu den Keimbahngenen dargestellt, die während der Ontogenese des B-Lymphozyten rekombiniert wurden.

Zusätzlich zu den Einzelzellexperimenten wurde Gesamt-DNA von in Paraffin eingebetteten Hautbiopsien des Patienten UK untersucht. Zur Verfügung stand ein Präparat vom Dezember 1995, zeitlich also zwischen den Biopsien der Einzelzellexperimente gelegen. Mit den gleichen Primerkombinationen wie beschrieben konnte das dominante Immunglobulingen der Tumorzellen in einer zweistufigen PCR amplifiziert werden. Das Produkt wurde kloniert und 5 Klone sequenziert. Die Sequenz ist in Abbildung 21 als *UKVH5c* bezeichnet. Sie ist bis auf die Position 94 (AGA *vs.* AGG) der Sequenz *UKVH5b* (07/96) identisch.

Eine durchgeführte PCR mit der Gesamt-DNA aus der 07/96-Biopsie ergab klonierbare Produkte bereits nach der 1. Runde der PCR (mit dem externen 3'J_H-Primer), wodurch die erweiterte Sequenzinformation bis zur Position 106 angegeben werden kann.

4.2.1.1 Keimbahngen-Analyse für Patient UK

Die Sequenz des in den Lymphomzellen rearrangierten und mutierten V_H-Gens wurde *online* gegen alle bekannten, in Datenbanken verfügbaren, humanen V_H-Keimbahngene verglichen. Das Keimbahngen mit der höchsten Homologie zum Tumor-V_H-Gen war *DP-73*. [66] *DP-73* entspricht dem von MATSUDA *et al.* veröffentlichten Gen *V5-51*, [67] für das zusätzlich die *leader*-Sequenz und die Rekombinationssignalsequenz angegeben ist. Die Kenntnis der 3' flankierenden Sequenz ist für die Amplifikation von V_H-Genen in

Keimbahnkonfiguration unerläßlich. In Abbildung 21 ist die Sequenz des für den Patienten UK spezifischen Keimbahngens *V5-51UK* zu finden. Die Bezeichnung erfolgte in Anlehnung an den Nomenklaturvorschlag von SHIN *et al.*, [68] wobei die erste Ziffer die V_H-Familie dokumentiert und die zweite Zahl die Position des Gens im IgH-Locus auf dem Chromosom 14 anzeigt.

Um zu beweisen, daß das amplifizierte patientenspezifische Keimbahngen das tatsächlich von der Tumorzelle rearrangierte Gen ist, haben wir sowohl die Keimbahnsequenz wie auch die Tumorsequenz mit einem am *leader* bindenden Primer amplifiziert. Im Keimbahngen des Patienten UK (*V5-51UK*) liegt an Position -1 ein alleler Polymorphismus vor (TCC→GCC), der im Tumorgen *UKVH5c* wiederkehrt, was die Verwendung dieses Gens bei der Ontogenese der Tumorzelle sehr wahrscheinlich macht. In der folgenden Abbildung sind die PCR-Produkte der Keimbahngene (Bahnen 1 und 3) gemeinsam mit den Tumorgenen (Bahnen 2 und 4) dargestellt. Als DNA-Matritze wurde in allen vier Reaktionen die gleiche Gesamt-DNA aus einer Hautbiopsie (12/95) eingesetzt.

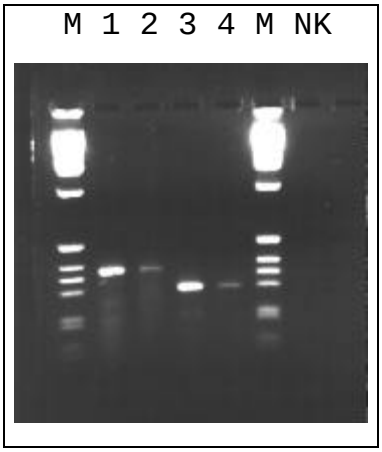

Abbildung 18

Keimbahngen° und Tumorgen* des Patienten UK zum Vergleich auf 2%igem Agarose-Gel aufgetragen.

Verwendete Primer:

Bahn 1°:	V5-51Lead - V5-51RSS
Bahn 2*:	V5-51Lead - JH int
Bahn 3°:	VH5 - V5-51RSS
Bahn 4*:	VH5 - JH int

Es wurden sichtbar weniger Tumorgenprodukte als Keimbahngenprodukte amplifiziert, da das V_H-Gen in Keimbahnkonfiguration, d.h. nicht rearrangiert, zweifach in jeder Körperzelle (hier alle hautständigen Zellen) und wahrscheinlich noch einfach in den Lymphomzellen vorliegt, wohingegen das Tumorgen als *single copy*-Gen nur in den Lymphomzellen zu finden ist. Die Tumorgenprodukte sind erwartungsgemäß etwas größer als ihre Keimbahngenäquivalente (Bahn 2>1 und 4>3), da sie neben dem V_H-Gen auch noch das D- und einen Teil des J_H-Gens beinhalten.

Durch den genetischen Code wird bestimmt, ob eine Mutation auf Nukleotidebene zu einem Aminosäureaustausch führt (***r**eplacement*) oder nicht (***s**ilent*). Eine Häufung von Austauschmutationen in den antigenbindenden bzw. eine Konservierung der Strukturen in den nicht-antigenbindenden Bereichen deutet auf eine antigenabhängige Reifung und positive Selektion des B-Lymphozyten hin. Als Maßstab gilt die R / S-Ratio der in den V_H-Genen gefundenen Mutationen. Diese muß aber mit der intrinsischen R / S-Ratio des rekombinierten Keimbahngens verglichen werden, da die Wahrscheinlichkeit, durch eine Mutation eine Kodierungsänderung zu bewirken, für jede Tripletkombination unterschiedlich ist. In Abbildung 19 ist die intrinsische R / S-Ratio für *V5-51UK* angegeben.

```
21                                      30                                          40
6/3 7/1 7/1 6/3 6/3 5/3 6/1 8/1 8/1 6/3 8/1 6/1 7/0 7/2 6/3 7/0 6/3 6/3 7/1 9/0 6/3 6/3 7/1
TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA

                        50                                          60
6/3 5/4 7/1 7/0 9/0 6/3 7/2 7/2 6/1 6/3 6/3 8/1 6/3 8/1 6/3 6/2 6/1 8/1 6/3 6/3 8/1 7/1 6/3
GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC

                70                                          80
7/1 6/3 6/3 7/2 4/3 6/3 8/1 7/1 6/3 7/2 8/1 6/3 6/3 6/1 5/4 7/1 7/0 8/1 8/1 5/4 7/1 6/3 5/3
CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG

                90
8/1 6/3 6/3 9/0 6/1 6/1 7/1 6/3 6/2
GAC ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA
```

		Antigenbindung				*Antigenbindung*			
FR1 (21-30)	no-CD1 (21-29)	CDR1 (31-35)	CD1 (30-35)	FR2 (36-49)	no-CD2 (36-46)	CDR2 (50-65)	CD2 (47-58)	FR3 (66-94)	no-C3 (59-92)
65 / 20 **=3,3**	59 / 17 **=3,5**	34 / 7 **=4,9**	40 / 10 **=4**	94 / 25 **=3,8**	72 / 22 **=3,3**	113 / 34 **=3,3**	88 / 24 **=3,7**	208 / 63 **=3,3**	243 / 71 **=3,4**

n. KABAT:	***n. MACCALLUM:***
CDR1,2,s: 147 / 41 = **3,6**	CD1,2: 128 / 34 = **3,8**
FR1,2,3: 367 / 108 = **3,4**	no-CD1,2,3 374 / 110 = **3,4**

Abbildung 19 oben: Keimbahngen *V5-51UK* mit für jede Position notierter intrinsischer R / S-Ratio. unten: Zusammenfassung der R / S-Ratio über das gesamte Gen, unterteilt in die Bereiche definiert durch KABAT (CDR *vs.* FR) und MACCALLUM (***c**ontact **d**efinition*). Zahlen in Klammern geben die Positionen dieser Bereiche an.

(Die Sequenzangabe erfolgt erst ab Position 21, da die aus der Einzelzellanalyse gewonnene Sequenzinformation des Tumorgens erst ab dieser Position vorliegt. Abbildung 21 zeigt die vollständige Sequenz.)

4.2.1.2 Mutationsanalyse der Immunglobulingene der Lymphomzellen des Patienten UK

Hierfür wurden die Tumorsequenzen mit den putativen Keimbahngensequenzen verglichen (Abbildung 21). Für die V_H-Gene ergibt sich, daß von den 236 Nukleotiden der *UKVH5*-Gene 22 Nukleotide (bei *UKVH5c* 21) gegenüber dem Keimbahngen mutiert sind, was einer Mutationsrate von 9,3% entspricht. Die genaue Verteilung der Mutationen über das gesamte Gen und ihre Auswirkung auf die Aminosäuresequenz zeigt die folgende Tabelle:

			Antigenbindung				*Antigenbindung*				*Ag-Bindung*	
UKVH5	FR1 (21-30)	no-CD1 (21-29)	CDR1 (31-35)	CD1 (30-35)	FR2 (36-49)	no-CD2 (36-46)	CDR2 (50-65)	CD2 (47-58)	FR3 (66-94)	no-CD3 (59-92)	CDR1,2 CD1,2	FR1,2,3 no-CD1,2,3
a	1/0	1/0	2/0	2/0	0/0	0/0	6/2	6/1	8/3	7/4	8/2=4 8/1=8	9/3=3 8/4=2
c	1/2	1/1	2/0	2/1	2/0	0/0	3/2	5/0	6/3	5/5	5/2=2,5 7/1=7	9/5=1,8 6/6=1
b	1/2	1/1	2/0	2/1	2/0	0/0	3/2	5/0	6/4	5/5	5/2=2,5 7/1=7	9/6=1,5 6/6=1

Tabelle 9 R/S-Ratio der V_H-Gene der Lymphomzellen des Patienten UK, wiederum zusammengefaßt nach KABAT und MACCULLAM

Bei dem von den Tumorzellen rekombinierten D-Keimbahngen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um *DN1* [69] und bei dem J_H-Keimbahngen um J_H5b. [70] Die Mutationen sind in Abbildung 21 ersichtlich. Eine statistische Mutationsanalyse wird nicht unternommen, da eine sichere Auswertung dieser Region nicht möglich ist.

4.2.2 Lymphomzell-Analyse der Patientin IL

Frau IL bemerkte Anfang 1994 eine Rötung am rechten Fuß, die sich progredient ausbreitete und Ende 1994 als großzelliges kutanes B-Zell-Lymphom der unteren Extremität diagnostiziert wurde. Im Sommer 1996 verstarb sie an den Folgen einer systemischen Metastasierung ihres Tumors. Wir untersuchten auch bei dieser Patientin zwei Biopsien, die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen worden waren: Biopsie 12/94 und 09/95. Die Biopsie 12/94 entstammt der Primärläsion am rechten Fuß und die Biopsie 09/95 wurde aus der Wadenmuskulatur des rechten Beines, die vollständig mit Lymphomzellen infiltriert war, entnommen. Insgesamt untersuchten wir 45 CD20-gefärbte Zellen, wobei 19 PCR-Produkte der erwarteten Länge amplifiziert wurden. Tabelle 10 zeigt die Statistik dieser Untersuchungen im Detail:

Experiment (PCR 1. Runde)	Biopsie	Anzahl der untersuchten B-Zellen	Anzahl gefundener Amplifikate erwarteter Länge gesamt	sequenziert	identische V_HDJ_H-Rekombination
I	12/94	9	3	3	3 ILVH3
II	12/94	9	4	4	4 ILVH3
III	12/94	9	3	2	1 ILVH3
IV	09/95	9	5	2	2 ILVH3a
V	09/95	9	4	4	4 ILVH3a
	Σ	45	19	15	14 8 ILVH3 = 6 ILVH3a

Tabelle 10 Übersicht der Einzelzellanalyse der Patientin IL (großzelliges kutanes B-Zell-Lymphom der unteren Extremität)

15 Produkte konnten direkt sequenziert werden, 14 davon waren identisch. Nur ein Produkt des Experiments III war eine aus unserem Labor stammende Verunreinigung. Die Effizienz dieser Einzelzellanalysen lag bei 31% (14 von 45), eventuell sogar noch etwas höher, sollte es sich bei den 4 nicht sequenzierten Produkten (bei der Reinigung verloren), die bei der PCR auch mit dem VH3-familienspezifischen Primer amplifiziert wurden, um tumorspezifische Produkte handeln. Da die Sequenzen sowohl biopsiebezogen untereinander wie auch beide Biopsien zueinander gleich waren, liegt in dem Fall weder intraklonale Diversität noch *ongoing mutation* vor. Die Nukleotide der Konsensus-Sequenz zeigt Abbildung 21, die davon abgeleitete Aminosäuresequenz die Abbildung 22.

4.2.2.1 Keimbahngen-Analyse für Patientin IL

Die *online*-Suche nach dem V_H-Keimbahngen mit der größten Homologie zum rearrangierten Gen ermittelte das V_H-Gen an Position 7 des IgH-Locus auf Chromosom 14 als das mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der Rekombination verwendete Gen: *V3-7*, [67] bzw. *DP-54*. [66] Die veröffentlichte *leader*- und Rekombinationssignalsequenz von *V3-7* für das Designen der Primer zugrundelegend, konnte dieses Gen der Patientin IL amplifiziert und sequenziert (*V3-7IL*) und für die Mutationsanalyse genutzt werden.

Die Amplifikation mit einem am *leader* bindenden Primer gelang zwar für das Keimbahngen der Patientin, nicht aber für das Tumorgen. (Die Sequenz von *V3-7IL* ist aus diesem Grund

in Abbildung 21 erst ab Position 25 angegeben.) Ein Beweis dafür, daß *V3-7IL* das tatsächlich von den Tumorzellen rearrangierte V_H-Keimbahngen ist, liegt deshalb nicht vor.

Um eine korrekte Mutationsanalyse durchführen zu können, ist auch für *V3-7IL* die intrinsische R/S-Ratio ermittelt worden:

```
25                  30                                      40
6/3 6/3 8/1 6/3 8/1 8/1 8/1 6/1 7/0 9/0 8/1 5/2 6/3 6/3 7/1 6/3 6/3 6/3 7/1 6/3 5/4 7/1 7/0
TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG

        50                                          60
6/3 6/3 8/1 7/2 7/1 7/1 8/1 6/3 8/1 7/1 7/1 6/1 6/1 6/3 8/1 6/3 6/3 7/1 6/3 4/4 8/1 6/3 7/2
GTG GCC AAC ATA AAG CAA GAT GGA AGT GAG AAA TAC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC

70                                          80
6/3 6/2 8/1 8/1 6/3 7/1 8/1 4/3 5/4 6/1 5/4 7/1 9/0 8/1 8/1 5/4 6/2 6/3 7/1 8/1 6/3 6/3 6/3
TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG

90
6/1 6/1 7/1 6/3 6/2
TAT TAC TGT GCG AGA
```

		Antigenbindung				*Antigenbindung*			
FR1 (25-30)	no-CD1 (25-29)	CDR1 (31-35)	CD1 (30-35)	FR2 (36-49)	no-CD2 (36-46)	CDR2 (50-65)	CD2 (47-58)	FR3 (66-94)	no-CD3 (59-92)
41/12 **=3,4**	33/11 **=3**	38/3 **=12,7**	46/4 **=11,5**	88/31 **=2,8**	69/25 **=2,8**	115/28 **=4,1**	89/19 **=4,7**	207/65 **=3,2**	240/75 **=3,2**

n. KABAT:	***n. MACCALLUM:***
CDR1,2,s: 153/31 =**4,9**	CD1,2: 135/23 = **5,9**
FR1,2,3: 336/108 = **3,1**	no-CD1,2,3 342/111 = **3,1**

Abbildung 20 oben: Keimbahngen *V3-7IL* mit für jede Position notierter intrinsischer R/S-Ratio; unten: Zusammenfassung der R/S-Ratio über das gesamte Gen

4.2.2.2 Mutationsanalyse der Immunglobulingene der Lymphomzellen der Patientin IL

Von den 224 Nukleotiden der *ILVH3*-Sequenz (=*ILVH3a*) sind 38 gegenüber dem Keimbahngen (*V3-7IL*) mutiert. Das ergibt die sehr hohe Mutationsfrequenz von 17%.

			Antigenbindung				*Antigenbindung*				*Ag-Bindung*	
	FR1 (25-30)	no-CD1 (25-29)	CDR1 (31-35)	CD1 (30-35)	FR2 (36-49)	no -CD2 (36-46)	CDR2 (50-65)	CD2 (47-58)	FR3 (66-94)	no-CD3 (59-92)	CDR1,2 CD1,2	FR1,2,3 no-CD1,2,3
ILVH3	2/2	2/2	2/0	2/0	3/2	2/2	8/2	9/2	9/8	7/8	10/2=5 11/2=5,5	14/12=1,2 11/12=0,9

Tabelle 11 R/S-Ratios des V_H-Gens der Lymphomzellen der Patientin IL

Das in *ILVH3* rekombinierte D-Gen ist vermutlich ein kleiner Abschnitt eines *DIR*-Gens [69] und bei dem J-Gen handelt es sich um J_H3a. [71]

Eine Zusammenfassung der R/S-Ratio Analyse für beide Patienten stellt die Tabelle 12 auf Seite 51 dar.

Abbildung 21

```
                 Intron><Exon      -1  +1                                  10
V5-51UK        CCC ACA GGA GTC TGT GCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG
V5-51          --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
UKVH5c         --- --- --- --- --- -G- --- --- --a --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --g --- --- --- --- ---

                                                 _____________CD1_____________                                        ______CD2__
                                 ________________H1_____________
                                                 ___________CDR1___________
               20                                        30  31   a   b                                  40
V5-51UK        ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC ... ... TAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG
V5-51(DP-73)   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ... ... --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
UKVH5a (11/94)  -- --- --- --- --- --- --- --- --G --- --- -A- ... ... -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
UKVH5c (12/95)  -- --a --- --- --- --- --- --- --G --- --a -A- ... ... -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -AC --- ---
UKVH5b (07/96)  -- --a --- --- --- --- --- --- --G --- --a -A- ... ... -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -AC --- ---

V3-7IL         CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC ... ... TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCC
DP-54 (V3-7)   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ... ... --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
ILVH3 (12/94)                   -- --- -At --- G-t --- --- -A- ... ... -T- --- --- --- --- --- --- --- A-- --- -C- --- --a --- --a --- --- T--
ILVH3a (09/95)                  -- --- -At --- G-t --- --- -A- ... ... -T- --- --- --- --- --- --- --- A-- --- -C- --- --a --- --a --- --- T--

               ______________CD2_____________________________
                       ______________H2______________
               ____________________________CDR2____________________________________
               50      52   a   b   c                             60                                  70
V5-51UK        ATC ATC TAT CCT ... ... GGT GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC
V5-51          --- --- --- --- ... ... --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
UKVH5a         G-- G-- --- --- ... ... --- --- --- ACG --a -A- --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- GAA --t --- --- -T-
UKVH5c         G-- --- --- ---         --- --- --- -CG --- --- --t --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- -CA --t --- --- ---
UKVH5b         G-- --- --- ---         --- --- --- -CG --- --- --t --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- -CA --t --- --- ---

V3-7IL         AAC 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
DP-54          --- --- --- --- ... ... --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
ILVH3          --t --c --T AC- ... ... --- --- -C- --C -C- GT- --- --- --- --- --- --- --- --c --- --- G-- -T- --- --t --t -T- --C --- --c t-a ---
ILVH3a         --t --c --T AC- ... ... --- --- -C- --C -C- GT- --- --- --- --- --- --- --- --c --- --- G-- -T- --- --t --t -T- --C --- --c t-a ---
```

```
                                                                                  _____CD3__
                                                                                          __
                                                                                          __
                80      82   a   b   c                                  90
V5-51UK         CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CA
V5-51           --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --
UKVH5a          --- --- --- -A- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --- --
UKVH5c          --- --- --- -A- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --- --
UKVH5b          --- --- --- -A- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --g --

V3-7IL          CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GA
DP-54           --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --
ILVH3           --- --- --- --- -A- --- --- -Tt --- --- --- --- C-t --- --- --- --- T-T TT
ILVH3a          --- --- --- --- -A- --- --- -Tt --- --- --- --- C-t --- --- --- --- T-T TT



                ___________________CD3_________________________________
                ___________________H3__________________________________
                ___________________CDR3_________________________________
                  96              100  a                              103
DN1             T ATA GCA GCA GCT GGT                             CCC TGG GGC CAG GGA            JH5b
UKVH5a          - G-- -Tt --- --- --- CAT AGT                     --t ---
UKVH5c          - --- -Tt --- --- --- CAC AGT                     --t ---
UKVH5b          - --- -Tt --- --- --- CAC AGT                     --t --- --g --- ---

DIR1,2,5          CCC AGG A                     T GAT GCT TTT GAT GTC TGG                        JH3a
ILVH3           G --- --- -GG GGC CTA GGC CCT CC- -GG C-- --- T-- --- ---
ILVH3a          G --- --- -GG GGC CTA GGC CCT CC- -GG C-- --- T-- --- ---
```

Abbildung 21 Nukleotidsequenzen der V_H-Regionen der Tumorzellen von den Patienten UK und IL. Die erste Spalte enthält die Bezeichnung der Sequenzen in chronologischer Reihenfolge der entsprechenden Biopsien, aus denen sie stammen. Sie sind gegen das putative Keimbahngen des jeweiligen Patienten (1. Zeile) als Homologievergleich angeordnet: ein Bindestrich kennzeichnet Homologie, abweichende Nukleotide sind ausgeschrieben. Kleinbuchstaben repräsentieren stumme Mutationen. Auch die bereits veröffentlichten Keimbahngene (kursiv, 2. Zeile) werden mit denen des Patienten verglichen, um einen möglichen allelen Polymorphismus darzustellen.

Referenzen zu den angegebenen Keimbahngenen: *DP-73* und *DP-54*, [66] *V5-51* und *V3-7*, [67] *DN1* und *DIR*, [69] J_H*5b* [70] , J_H*3a* [71]

EMBL-Datenbank *accession numbers* der von uns sequenzierten Gene: *V5-51UK*...Y12817; *UKVH5a*...Y11556; *UKVH5b*...Y11557; *UKVH5c*...Y11558; *V3-7IL*...Y12818; *ILVH3*...Y10020

```
                                 ---CD1---            -------CD2------                                          ----------CD3--------
                             ----H1----                     ---H2---                                             ---------H3--------
                                   --CDR1-                --------CDR2-------                                     --------CDR3-------
                       2         3            4          5           6          7         8           9          0
                       01234567890 1ab2345 67890123456789 012abc3456789012345 67890123456789012abc345678901234 567890abcdefghijk123456

UKVH5a (V5-51UK)       .SCKGSGYRFT N..FWIG WVRQMPGKGLEWMG VVYP..GDSTTKYSPSFQG QVTISVDKSESTAFLQWNSLKASDTAMYFCVR HVVAAGHSP          W...
UKVH5c (V5-51UK)       .SCKGSGYRFT N..FWIG WVRQMPGKGLEYMG VIYP..GDSATRYSPSFQG QVTISVDKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYFCVR HIVAAGHSP          W...
UKVH5b (V5-51UK)       .SCKGSGYRFT N..FWIG WVRQMPGKGLEYMG VIYP..GDSATRYSPSFQG QVTISVDKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYFCVR HIVAAGHSP          WGQG

ILVH3 (V3-7IL)         .....SDFAFS N..FWMS WVRQTPAKGLEWVS NINT..DGTDTVYVDSVKG RFTVFRDNVNNSLYLQMNNLRVEDTALYYCAC LPRRGLGPPGPFYV     W...
ILVH3a (V3-7IL)        .....SDFAFS N..FWMS WVRQTPAKGLEWVS NINT..DGTDTVYVDSVKG RFTVFRDNVNNSLYLQMNNLRVEDTALYYCAC LPRRGLGPPGPFYV     W...
```

Abbildung 22 Abgeleitete Aminosäuresequenzen der V_H-Regionen der Tumorzellen von den Patienten UK und IL. Aminosäureaustausche im Vergleich zu den Keimbahn-V_H-Genen (in Klammern) sind fett und kursiv dargestellt.

	Mutationsfrequenz Mutationen / analysierte Basen	***Region*** (relative Größe)	***Mutationen*** ***beobachtet*** R	S	R/S	***erwartet*** R n • rel. Gr. • Rf	S n • rel. Gr. • Sf	***intrinsische R/S***	***p*** [n! / k!(n-k)!] • q^k • $(1-q)^{n-k}$
UKVH5a	22 / 236 (9,3%)	**CDR** (66 / 234=0,282)	8	2	**4**	22 • 0,282 • 0,782 4,8	22 • 0,282 • 0,218 1,4	147 / 41 **3,6**	0,055
		FR (168 / 234=0,718)	9	3	**3**	22 • 0,718 • 0,773 12,2	22 • 0,718 • 0,227 3,6	367 / 108 **3,4**	
UKVH5b	22 / 236 (9,3%)	**CDR** (66 / 234=0,282)	5	2	**2,5**	22 • 0,282 • 0,782 4,8	22 • 0,282 • 0,218 1,4	147 / 41 **3,6**	0,2
		FR (168 / 234=0,718)	9	5	**1,8**	22 • 0,718 • 0,773 12,2	22 • 0,718 • 0,227 3,6	367 / 108 **3,4**	
ILVH3	38 / 224 (17%)	**CDR** (66 / 222=0,297)	10	2	**5**	38 • 0,297 • 0,832 9,4	38 • 0,297 • 0,168 1,9	153 / 31 **4,9**	0,14
		FR (156 / 222=0,703)	14	12	**1,2**	38 • 0,703 • 0,757 20,2	38 • 0,703 • 0,243 6,5	336 / 108 **3,1**	

Tabelle 12 Zusammenfassung der statistischen Mutationsanalyse aller analysierten Tumorsequenzen. Für Erläuterungen siehe Diskussion.

n: Gesamtanzahl der Mutationen
rel. Gr.: relative Größe
Rf o. Sf: statistischer Anteil der R- oder S-Mutationen an allen möglichen Mutationen in den CDRs bzw. FRs
k: Anzahl beobachteter R-Mutationen in den CDRs
q: Wahrscheinlichkeit, daß eine Mutation als R-Mutation in den CDRs auftritt; q=rel.Größe • Rf
p: Wahrscheinlichkeit, daß die vorliegenden R-Mutationen in den CDRs zufällig so verteilt sind. Berechnung nach dem binominalen Wahrscheinlichkeitsmodell SHLOMCHIKS [72]

5 DISKUSSION

5.1 MUTATIONSANALYSE

5.1.1 Mutationsfrequenz

Mutationsanalysen der Immunglobulingene von B-Lymphozyten können Auskunft darüber geben, in welchem Stadium ihrer Entwicklung sich die B-Zellen zum Zeitpunkt ihrer Untersuchung befinden. Unreife und naive B-Zellen werden nur gering mutierte Gene der für die Antigenbindung entscheidenden variablen Region aufweisen (Mutationsfrequenz von IgM^+IgD^+-B-Zellen 0,3% [73]), wohingegen die mit einem Antigen in Kontakt stehenden oder gestandenen B-Zellen mehrere Mutationen beinhalten (Mutationsfrequenz von klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen 4% [74]). Die Mutationen finden während der sogenannten Keimzentrumsreaktion in den sekundären lymphatischen Organen statt, durch die affinitätsgereifte selektionierte B-Zellklone mit typischer Mutationsverteilung entstehen: Aus antigenstimulierten naiven B-Zellen des Primärfollikels bzw. der Mantelzone von Sekundärfollikeln entstehen B-Zell-Blasten mit hoher Proliferationsrate (Generationszeit liegt zwischen 3 h [75] und 6 h [54]), aus denen die Zentroblasten, die die dunkle Zone der Keimzentren bilden, hervorgehen. Aus den sIg^- Zentroblasten, während deren Proliferation die Hypermutationsmaschinerie angestellt ist, entwickeln sich direkt die sIg^+ Zentrozyten, wodurch die Anzahl der Zentroblasten trotz aktiver Zellteilung konstant bleibt. Die Zentrozyten sind selbst nicht mehr zur Zellteilung befähigt. Sie werden antigenabhängig in der hellen Zone des Keimzentrums selektioniert. [75] Die Mutationsrate pro Basenpaar und Zellzyklus wird mit 10^{-3} angegeben. [76] KÜPPERS *et al.* gehen von bis zu einer Mutation pro Zellzyklus für das V_H-Gen aus. [77] Für eine Gedächtnis-B-Zelle mit einem V_H-Gen bestehend aus 300 bp wären somit bei 10^{-3} Mutationen / bp / Zyklus 40 Zellzyklen notwendig, um auf die oben genannte Mutationsfrequenz von 4% (=12 Mutationen) zu kommen. Bei einer Generationszeit von 10 h [76] würde der Hypermutationsprozeß 17 Tage dauern. Die Keimzentrumsreaktion ist histologisch bis zu 3 Wochen nach Antigenkontakt sichtbar. [54]

Diese Fakten zugrundelegend, wurden bereits mehrere Arbeiten veröffentlicht, die mit Hilfe der Mutationsanalysen von entarteten B-Lymphozyten die B-Zell-Lymphome in *pre-germinal*, *germinal* und *post-germinal center cell*-Lymphome unterteilen und so die Zuordnung zu den physiologischen Äquivalentzellen, bei denen ebenfalls Mutationsanalysen durchgeführt

wurden (z.B. für naive IgM^+IgD^+ PBLs, [73] für Mantelzellen und Keimzentrumszellen [77] und für Marginalzonenzellen der Milz [57]), ermöglichen. So sind die B-CLL und das Mantelzell-Lymphom als *pre-germinal center cell*- [78]; das Keimzentrumszell-Lymphom, [78-80] das Hodgkin-Lymphom [81] und wahrscheinlich auch das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom [82] als *germinal center cell*- und das monozytoide B-Zell-Lymphom, [83] das Maltom, [46,47] das multiple Myelom [84] und das Burkitt-Lymphom [85] als *post-germinal center cell*-Lymphom beschrieben worden.

In unseren Mutationsanalysen beschränken wir uns auf die V_H-Gene, da deren Sequenzen fast ausnahmslos bekannt sind. [86] Die Gefahr, allelen Polymorphismus als angebliche Mutationen zu interpretieren, haben wir durch die Sequenzierung der patienteneigenen Keimbahngene ausgeschlossen. Die Analyse der CDR3-Region gestaltet sich naturgemäß komplizierter, da einerseits die verwendeten D- und J-Gene z.T. sehr stark modifiziert werden und andererseits die matritzenunabhängigen N-Sequenzen eingefügt werden. Die in den Tumor-B-Zellen rearrangierten V_H-Gene *V5-51* (*DP-73*) und *V3-7* (*DP-54*) geben keinen Hinweis auf die Spezifität des Antikörpers. Im Gegensatz dazu wurden in den nodalen Keimzentrumszell-Lymphomen und auch in den Maltomen überproportional häufig V_H-Gene typisch für Autoantikörper gefunden. [47,79] Die Beschreibung eines Falles, wo Maltom-B-Zellen auch das *DP-54*-Gen wie die Lymphomzellen der Patientin IL rekombiniert aufwiesen, [47] ist sicherlich Zufall.

Das von uns untersuchte Lymphom-V_H-Gen des Patienten UK weist 22 Mutationen im Vergleich zum Keimbahngen auf (Mutationsfrequenz=9%), das Lymphom-V_H-Gen der Patientin IL beherbergt 38 Mutationen (Mutationsfrequenz=17%). Es handelt sich also bei den Tumorzellen beider untersuchter primär kutanen B-Zell-Lymphome um reife B-Zellen (Keimzentrumszellen bzw. deren Abkömmlinge). Die Mutationsfrequenz liegt aber bei beiden deutlich oberhalb der für B-Gedächtniszellen angegebenen 4%. [74] Da bisher für das Immunsystem des Menschen keine, wie bei den Schafen mögliche, [87] antigen- und keimzentrumsunabhängige Hypermutation beschrieben wurde, ist davon auszugehen, daß unsere untersuchten Lymphomzellen überdurchschnittlich lange an der Keimzentrumsreaktion beteiligt waren oder noch sind. Vergleichbar hohe Mutationsfrequenzen von 8%, [88] 11%, [78] oder 13% [80] werden sowohl in Arbeiten über noduläre Keimzentrumszell-Lymphome, wie auch für die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (7,5% [89] und 11% [82]) angegeben. Da die hohe Mutationsfrequenz „unphysiologisch“ ist, muß vor oder während der Keimzentrumsreaktion ein Ereignis stattgefunden haben, das die B-Zelle

verlängert der Hypermutation ausgesetzt hat. Ob dieses Ereignis außerdem auch ausgereicht hat, ein unkontrolliertes Wachstum des B-Zell-Klons zu einem Lymphom zu bewirken, oder ob ein zweites transformierendes Ereignis dazu notwendig war, ist aus der Mutationsfrequenz allein nicht ersichtlich. Waren die B-Lymphozyten bereits vor der Keimzentrumsreaktion entartet, aber noch zur Hypermutation befähigt, oder entstand das Lymphom erst nach Abschluß des Hypermutationsprozesses? Antworten auf diese Fragen liefern zeitlich gestaffelte Sequenzanalysen im Verlauf der Tumorprogression oder die Untersuchung möglichst vieler verschiedener Tumorzellen.

5.1.2 Andauernde Mutationen (*ongoing mutation)* und intraklonale Diversität

Keimzentrumszellen nahe dem Ende der Keimzentrumsreaktion (*germinal center*-B-Zellen) und *post-germinal center*-B-Zellen beherbergen eine ähnliche Anzahl an Mutationen. Eine Einordnung in das oben skizzierte System (*germinal/post-germinal center*) ist daher durch die alleinige Betrachtung der Mutationszahlen nicht möglich, wenn nicht eindeutige histologische und immunhistochemische Kriterien die Zuordnung der entarterten B-Zellen zu ihren physiologischen Zelläquivalenten ermöglichen, Beispiel Plasmozytom. Molekularbiologisch kann die Differenzierung nur dann erfolgen, wenn entweder DNA von Biopsien unterschiedlicher Entnahmezeitpunkte oder mehrere Mikroausschnitte bzw. Einzelzellen aus einer Biopsie analysiert werden. Ersteres kann die dynamische Entwicklung eines Tumorklons aufzeigen, letzteres gibt den aktuellen Entwicklungsstand an. Sollten Mutationen im Verlauf hinzugekommen sein (*ongoing mutation*) oder werden in einer Biopsie unterschiedliche Subklone gefunden (intraklonale Diversität), so war die Hypermutationsmaschinerie in den Lymphomzellen noch aktiv, es handelt sich dann definitionsgemäß um Keimzentrumszellen. Andauernde Mutationen bzw. intraklonale Diversität sind sowohl für die physiologischen Keimzentrumszellen [77] wie auch für die Keimzentrumszell-Lymphome [78-80] nachgewiesen worden. Bei den B-Zell-Tumoren, die aufgrund einer hohen Anzahl gefundener Mutationen mit typischer Verteilung als *post-germinal center cell*-Lymphome gewertet wurden und bei deren Analyse nicht die o.g. Kriterien zur Anwendung kamen, [46] kann es sich molekularbiologisch ebensogut auch um *germinal center cell*-Lymphome handeln, bei denen durch Mutationen veränderte Subklone oder eine gar noch andauernde Hypermutation aus versuchstechnischen Gründen nicht erkennbar waren. Eine mögliche Ausnahme stellen Gedächtnis-B-Zellen dar, die erneut an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen und wegen

andauernder Mutationen als *germinal center*-Zelle bezeichnet werden, was bei den Maltomen der Fall sein könnte.

Bei den von uns untersuchten primär kutanen Lymphomen haben wir mehrere Einzelzellen aus verschiedenen Regionen einer Biopsie analysiert. Identische V_HDJ_H-Rekombinationen und N-Sequenzen in mehreren B-Zellen wiesen diese als zum Tumorklon gehörig aus. Der genaue Sequenzvergleich der Lymphomzellen einer jeden Biopsie beider Patienten ergab Identität, d.h. keiner der beiden Tumorklone war intraklonal divers. Der Vergleich der Tumorzellen im zeitlichen Verlauf allerdings zeigte Sequenzunterschiede für das primär kutane Keimzentrumszell-Lymphom (Patient UK), aber nicht für das großzellige kutane B-Zell-Lymphom der unteren Extremität (Patientin IL). Im Detail betrachtet, stellt *UKVH5b* (07/96) aber nicht eine weitermutierte Version von *UKVH5a* (11/94) dar, sondern beide sind aus einer gemeinsamen Ursprungszelle hervorgegangen. Das wird einerseits dadurch ersichtlich, daß beide Sequenzen gleich viele (22), davon aber 7 unterschiedliche, Mutationen aufweisen, und andererseits fällt auf, daß *UKVH5b* an 7 Nukleinsäurepositionen Keimbahnkonfiguration aufweist, an denen in *UKVH5a* bereits Mutationen stattgefunden hatten. Rückmutationen zur Keimbahnsequenz an 7 von 22 mutierten Positionen bei jeweils drei Mutationsmöglichkeiten (bei vier Basen) ist statistisch höchst unwahrscheinlich. Diese Tatsache impliziert natürlich, daß *UKVH5b*- oder *UKVH5b*-Vorläuferzellen bereits zum Zeitpunkt der Analyse der *UKVH5a*-Zellen vorhanden gewesen sein müssen, die wahrscheinlich nicht Bestandteil der 11/94 entnommenen Biopsie waren, aus der insgesamt 34 Einzelzellen verschiedener Bereiche isoliert und untersucht wurden. Zwar nicht in der einzelnen Biopsie, doch alle Daten zusammen betrachtet, handelt es sich bei dem Tumor des Patienten UK um ein intraklonal diverses B-Zell-Lymphom, bei dem zu verschiedenen Zeitpunkten verschiedene dominante Subklone auftraten. Ähnliches ist für ein nodales Keimzentrumszell-Lymphom gezeigt worden, bei dem zwei Jahre lang ein Subklon mit 23 Mutationen und geringer Heterogenität vorherrschend war und wo im dritten Jahr aus einem Rezidiv Tumor-Ig-DNA mit nur 15 der 23 Mutationen gefunden wurde. [79]

Diese Beobachtung beantwortet gleichzeitig die Frage nach der zeitlichen Abfolge von transformierendem Ereignis und dem Hypermutationsprozeß: Die B-Lymphozyten des Keimzentrumszell-Lymphoms des Patienten UK müssen *nach* ihrer Entartung (weiter-) mutiert sein. Anders lassen sich 2 unterschiedlich mutierte, aber verwandte Tumorklone nicht erklären. Die Sequenz der gemeinsamen Ursprungszelle könnte postuliert werden, indem die in

UKVH5a und *b* gleichen Mutationen als zur Ursprungszelle gehörend angesehen werden. Individuelle Mutationen wären dann erst nach der Aufzweigung des genealogischen Baumes entstanden. Demnach hätte die postulierte Ursprungszelle 15 Mutationen im V_H-Gen angesammelt. Davon entfielen 5 R- und 1 S-Mutation auf die CDRs und 6 R- und 3 S-Mutationen auf die FRs.

Zusätzlich zu den Sequenzen aus den Einzelzellexperimenten ist noch eine Tumorsequenz (*UKVH5c*) bekannt, die aus der Gesamt-DNA einer 12/95 entnommenen Biopsie gewonnen wurde. Diese liegt zeitlich ziemlich genau zwischen den beiden Biopsien für die Einzelzellanalyse. *UKVH5c* ist bis auf eine Base identisch mit *UKVH5b* (07/96). Nur an Position 94, dritte Base, liegt noch Keimbahnkonfiguration vor. In den acht Monaten zwischen 12/95 und 07/96 fand also *ongoing mutation* an nur einer Position statt. Das verdeutlicht die Schwierigkeit, andauernde Mutationen nachzuweisen.

Für den aggressiven Tumor der Patientin IL konnte weder intraklonale Diversität noch eine Entwicklung des Tumorklons im zeitlichen Verlauf gezeigt werden. Eine Untersuchung der Immunglobulingene von Maltomen konnte andauernde Mutation nur in den *low-grade*, nicht aber in den *high-grade* Tumoren demonstrieren. [47] Es ist verführerisch, Parallelen zu unseren beiden Fällen zu ziehen, von denen auch der *high-grade* Tumor der Patientin IL keine andauernde Mutation aufwies. Es muß aber beachtet werden, daß die *high-grade* Formen der Maltome aus den *low-grade* Formen durch blastische Transformation hervorgehen können, [49] wie es auch bei den nodulären Keimzentrumszell-Lymphomen der Fall ist, [88] aber die von uns untersuchte Entität „großzelliges Lymphom der unteren Extremität“ primär durch seine Lokalisation definiert ist und *low-grade* Vorläufer nicht beschrieben werden. [35] Die Erklärung allerdings, warum *high-grade* Maltome nicht weiter mutieren, kann auch für den Tumor der Patientin IL zutreffen: Ein zusätzliches transformierendes Ereignis hat der B-Zelle die Fähigkeit genommen, auf eine Aktivierung durch die Mikroumgebung eines Keimzentrums mit Hypermutation zu reagieren. Bei den *high-grade* Maltomen des Magens ist auch keine Wachstumsstimulierung durch *H. pylori* spezifische T_H-Zellen mehr möglich. [44] Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Zerstörung der Mikroumgebung durch das aggressive Wachstum des Tumors selbst. In den Biopsien der Patientin IL konnten keine follikulären dendritischen Zellen als notwendiger Bestandteil eines Keimzentrums durch den anti-CD35-Antikörper nachgewiesen werden. Lichtmikroskopisch sichtbare Keimzentren waren im Fall von UK auch nicht vorhanden, follikuläre dendritische Zellen als Reste eines reaktiven Follikels

wurden aber angefärbt. Einen Hinweis könnte die außerordentlich hohe Mutationsfrequenz von 17% liefern. Denkbar wäre die Transformation in zwei Etappen: das primäre Ereignis zwingt den durch eine Immunisierung aktivierten Klon, länger als üblich an der Keimzentrumsreaktion teilzunehmen und somit unverhältnismäßig viele Zellzyklen über sich ergehen zu lassen. Das wiederum erhöht das Risiko, durch Mutation z.B. eines Regulatorgens, zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen zu transformieren, die die Mikroumgebung eines Keimzentrums für ihr Wachstum nicht mehr benötigen.

5.1.3 Mutationsmuster

Die Betrachtung des Mutationsmusters versucht die Frage zu klären, ob die beobachteten Mutationen selektioniert worden sind. Als Ursache für den Selektionsdruck gelten Antigene, die mit den Oberflächenimmunglobulinen der stimulierten B-Zellen wechselwirken müssen, um diese vor der Apoptose zu bewahren. [90] Hierfür ist einerseits ein funktionstüchtiges Antikörperprotein notwendig, das transkribiert, translatiert und an die Zelloberfläche gebracht werden muß und andererseits muß das Immunglobulin das Antigen, das bezogen auf die stimulierten B-Zellen mengenmäßig in der Unterzahl ist, fest binden können. Ergebnis selektionierter Mutationen wären demnach Immunglobulingene, die frei von Stop-Kodonen sind und deren strukturverantwortliche Aminosäuren konserviert (negativer Selektionsdruck) und deren für die Antigenbindung verantwortlichen Aminosäuresequenzen optimiert (durch positive oder negative Selektion) wurden. Veränderungen der Aminosäurenkodierungen erfolgen durch sogenannte Austauschmutationen (***r**eplacement*) auf Nukleinsäureniveau, eine Konservierung der Aminosäurensequenz wird durch „stumme“ (***s**ilent*) Mutationen möglich.

Um das Mutationsmuster der von uns untersuchten V_H-Sequenzen zu beurteilen, ist es notwendig, auf die verschiedenen veröffentlichten Auswertungsmethoden zur Quantifizierung einer Affinitätsreifung einzugehen. Grundlage aller Überlegungen ist die Einteilung des Antikörpermoleküls in einen für die Antigenbindung verantwortlichen Bereich, bisher die CDRs, und in die für die Struktur des Moleküls bedeutsamen FRs. Demnach müßten Austauschmutationen in den CDRs akkumulieren, um die Affinität zum Antigen zu erhöhen und stumme Mutationen gehäuft in den FRs zu finden sein. Die Annahme voraussetzend, daß nicht selektionierte Mutationen zufällig, also gleichmäßig über CDRs und FRs verteilt sind, errechneten JUKES & KING das Verhältnis von Austausch- zu stummen Mutationen. [91] Von den durch den genetischen Code vorgegebenen 526 Mutationsmöglichkeiten der 61 aminosäure-kodierenden Triplets (Stop-Kodone ausgenommen) würden 392 (=74,5%) zu Austausch-

mutationen und 134 (=25,5%) zu stummen Mutationen führen. Das Verhältnis beider zueinander, die sogenannte erwartete R/S-Ratio, beträgt 2,9. Liegt nun die für einen mutierten Genabschnitt beobachtete R/S-Ratio über 2,9%, kann man von einer positiven Selektion der stattgefundenen Austauschmutationen ausgehen. R/S-Ratios <2,9 weisen hingegen auf einen angestrebten Erhalt der Proteinstruktur hin.

Aus diesen Daten entwickelten SHLOMCHIK *et al.* eine Formel zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit (*q*), mit der eine in einem V_H-Gen auftretende Mutation als R-Mutation in den CDRs erwartet werden kann: $\boldsymbol{q=Rf \times CDR_{rel}}$ (*Rf*=Frequenz der Austauschmutationen, =0,745; CDR_{rel}=relative CDR-Größe zum gesamten V_H). [72] Die erwartete Anzahl der R-Mutationen in den CDRs $[R_{erw}]_{CDR}$ bei insgesamt *n* Mutationen in einem V_H-Gen ist dann das Produkt aus *q* und *n*: $\boldsymbol{[R_{erw}]_{CDR}=q \times n}$, mit der die tatsächlich beobachtete Anzahl der R-Mutationen verglichen werden kann. Mehr R-Mutationen in den CDRs als erwartet sprechen für stattgefundene Selektion. Zusätzlich wurde eine Formel erarbeitet (*binominal probability model*), die angibt, wie wahrscheinlich eine beobachtete Verteilung von R-Mutationen ist, sollte sie zufällig und ohne selektiven Druck so entstanden sein: $\boldsymbol{p=[n!/k!(n-k)!]q^k(1-q)^{n-k}}$ (*p*=Wahrscheinlichkeit; *n*=alle beobachteten Mutationen; *k*=Anzahl der beobachteten R-Mutationen in CDRs; *q*=siehe obige Formel). Geringe errechnete Wahrscheinlichkeiten sprechen für eine selektionierte Mutationsverteilung.

Die Verwendung der von Jukes & King [91] berechneten Werte für die erwartete R/S-Ratio (siehe oben) stellte sich als zu grobe Vereinfachung heraus, da Mutationen zwar zufällig verteilt sind, ihre tatsächliche Auswirkung auf die Aminosäurensequenz (R- *vs.* S-Mutation) aber tripletabhängig ist (vgl. z.B. R/S_{ATG}=9/0 und R/S_{CGA}=4/4). CHANG & CASALI bemerkten, daß in den CDRs (vor allem CDR1) der V_H-Keimbahngene vorrangig solche Triplets vorkommen, deren Mutationen überdurchschnittlich zu R-Mutationen führen, wodurch die erwartete R/S-Ratio beträchtlich größer als 2,9 sein kann. [92] Ein anschauliches Beispiel bietet das Keimbahngen *V3-7IL* mit einer intrinsischen R/S-Ratio von 12,7 in der CDR1. Aus diesem Grund müssen die für die mutierten Antikörper ermittelten R/S-Ratios mit den intrinsichen R/S-Ratios der putativen Keimbahngene verglichen werden. Auch in die oben angegebenen SHLOMCHIKschen Formeln müssen die für das putative Keimbahngen jeweiligen intrinsischen Werte für die Frequenz der Austauschmutationen (*Rf*) anstelle der durchschnittlichen 0,745 eingesetzt werden.

Die zusammenfassenden Daten zur Mutationsanalyse der von uns untersuchten V_H-Sequenzen zeigt die Tabelle 12 auf Seite 51. Aufgrund dieser Daten ist eine Schlußfolgerung für einen selektionierten Mutationsprozeß nur sehr bedingt möglich. Vergleicht man die tatsächlichen mit den intrinsischen R/S-Ratios für die CDRs, zeigt sich in keinem der von uns untersuchten V_H-Gene ein statistisch signifikanter Unterschied. Einzig für *UKVH5a* könnte man eine überdurchschnittliche Anhäufung von Austauschmutationen in den CDRs ausmachen: Die Wahrscheinlichkeit, mit der bei zufälliger Verteilung von insgesamt 22 Mutationen 8 als R-Mutationen in den CDRs zu finden sein würde, beträgt nur 0.055, d.h. eine derartige Verteilung fände in 5 von 100 Fällen statt. Betrachtet man hingegen die FRs, fällt das Bestreben auf, die Proteinstruktur zu konservieren. Die beobachteten R/S-Ratios liegen, vor allem für *ILVH3*, deutlich unter den theoretisch erwarteten. Es ist aber zu bedenken, daß die errechneten intrinsischen R/S-Ratios laut Shlomchik *et al.* für die FRs zu hoch angesetzt sind, da ca. die Hälfte (48%) der theoretisch möglichen R-Mutationen strukturell nicht toleriert werden könnte und zum Ausschluß dieses Klons von der weiteren antigenabhängigen Affinitätsreifung führen würde. [72] Die intrinsische R/S-Ratio für die FRs wäre demnach nur die Hälfte des von uns berechneten Wertes, wodurch der Eindruck von einer negativen Selektion von R-Mutationen in den FRs unserer Lymphomgene relativiert wird. Für eine zumindest während des Untersuchungszeitpunktes antigenunabhängige Reifung der Tumorzellen würde auch die Tatsache sprechen, daß die Zellfärbung bei UK negativ für die schwere Kette und bei beiden Patienten negativ für die leichte Kette des Oberflächenimmunglobulins ausfiel.

Trotzdem ist ein wirksames Antigen während der Hypermutation der Tumorzellen (oder deren Vorläufer) nicht auszuschließen. Die hohe R/S-Ratio von 5/1 in den CDRs der hypothetischen Ursprungszelle der beiden Klone des Patienten UK läßt die Vermutung zu, daß zumindest einige der Austauschmutationen positiv selektioniert wurden. Es ist außerdem möglich, daß nur sehr wenige der vielen beobachteten Mutationen affinitätssteigernd sind und dadurch positiv selektioniert wurden. Die übrigen Mutationen können entweder, funktionell nicht störend, stochastisch über das gesamte Gen verteilt worden sein und so die R/S-Analyse „verschleiern“, oder sie sind erst hinzugekommen, als die Antigenabhängigkeit der Reifung durch ein transformierendes Ereignis bereits aufgehoben war. Niemand weiß bisher, welches Signal die Keimzentrumsreaktion beendet. Wird die Keimzentrumsreaktion vorzeitig beendet, wenn bereits nach wenigen Hypermutationsrunden optimal bindende Immunglobuline generiert wurden, oder findet sie erst gar nicht statt, wenn Antikörper bereits in Keimbahnkonfiguration hoch affin sind?

Ein - wenn bei den wenigen untersuchten Fällen auch nur geringes - Indiz für einen funktionellen Rückkopplungsprozeß während der Antikörperreifung ist die Tatsache, daß beide Tumorsequenzen in sogenannten offenen Leserahmen und ohne Stop-Kodone vorliegen, also theoretisch exprimiert werden könnten. Sie unterscheiden sich in diesem Punkt von den Hodgkin-Lymphomen, deren Immunglobulingene z.T. durch Mutationen unfunktionell geworden sind. [81] Um diese Aussage zu verifizieren, sind Untersuchungen an mehreren kutanen B-Zell-Lymphomen erforderlich.

Es ist zu fragen, ob die Mutationsanalyse zum Nachweis einer antigenabhängigen Affinitätsreifung im Einzelfall immer so angewendet werden kann, wie sie oben beschrieben wurde. Wieviele und welche der Aminosäuren der CDRs sind denn tatsächlich an der Antigenbindung beteiligt, also welche Mutationen haben einen Einfluß auf die Affinität zum Antigen? Können nicht auch veränderte FRs Auswirkungen auf die Affinität zum Antigen haben? Kristallographisch wurde zwar gezeigt, daß die CDRs ungefähr den an der Oberfläche des Antikörpermoleküls liegenden Schleifen entsprechen, die für die Antigenbindung verantwortlich sind, aber nicht mit ihnen identisch sind. [59] Bereits eine geringe Verschiebung der Bereiche für die R/S-Ratio-Analyse kann den errechneten Quotienten dramatisch verändern, da es sich in den meisten Fällen um statistisch kleine Zahlen handelt. So z.B. vermindert nur eine einzige zusätzliche S-Mutation im antigenbindenden Bereich eine deutlich „selektionierte“ R/S-Ratio von 8/1 auf einen „nicht selektionierten“ Wert von 4, wie das bei dem *UKVH5a*-Gen der Fall ist, wenn der antigenbindende Bereich unterschiedlich definiert ist (siehe Tabelle 9 auf Seite 44). So kann nach der *contact definition* MACCULLAMS, nicht aber nach KABATS CDR/FR-Einteilung die Position 47 an der Antigenbindung beteiligt sein, die bei *UKVH5b* und *c* gleich zweimal mutiert ist. Von den Residuen 26 bis 35 der, durch die verschiedenen Definitionen umschriebenen, antigenbindenden Region 1 (CDR1, H1, CD1) sind die Aminosäuren der Positionen 26, 27, 28, 29, 31a und 34 und von den Residuen 47 bis 65 der antigenbindenden Region 2 (CDR2, H2, CD2) sind die Positionen 48, 49, 52b, 52c und 59-65 nach den Bindungsstudien MACCALLUMS nicht an der Antigenbindung beteiligt, [60] wovon die Aminosäuren an Position 26, 27, 29 und 34 den von CHOTHIA *et al.* für die kanonischen *backbone*-Strukturen der Schleife H1 verantwortlich gemachten Aminosäuren entsprechen. [59] Austauschmutationen an diesen Stellen würden aber in den herkömmlichen Mutationsanalysen fälschlicherweise voll zu Buche schlagen. (Eine vollständige Übersicht über den Anteil der einzelnen Residuen an der Bindung zu unterschiedlichen, nach ihrer Größe

sortierten, Antigenen [klein=Hapten, medium=Peptide/Karbohydrate, groß=Proteine] findet sich auf der Internet-Seite *http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/MeanContacts.html*.) Ein weiterer Grund, die Mutationsanalysen kritisch zu hinterfragen, ist die Beobachtung, daß selbst Antikörper in Keimbahnkonfiguration Antigene fest binden können [93] oder daß ein einziger Aminosäureaustausch die Affinität wesentlich beeinflussen kann. [94,95] Alle weiteren während der Hypermutation angesammelten Mutationen würden strukturell zwar geduldet werden, hätten aber mit der Affinitätsreifung nichts zu tun. Desweiteren wird in der Arbeit von TILGNER *et al.* eine überdurchschnittliche Anhäufung von Mutationen in der FR3 festgestellt. [96] In der Tat zeigten HILLSON *et al.*, daß an der Bindung zum Staphylokokken-Protein A Residuen der FRs beteiligt sind [97] und FOOTE & WINTER demonstrierten, wie FR-Residuen die Konformation der CDRs und dadurch die Affinität zum Antigen beeinflussen. [98] Ein letzter Punkt, der bei der kritischen Betrachtung der Mutationsanalysen erwähnt werden muß, ist die Tatsache, daß Mutationen nicht zufällig über das variable Fragment des Antikörpers verteilt sind, sondern sich in sogenannten *hot spots* konzentrieren (Übersicht in BETZ *et al.*, 1993 [99]). Hierbei fallen Sequenzmotive auf, die bevorzugt mutiert werden (TAA und RGYW [100] oder genauer CAGCT und AAGTT [99]), wobei im Ergebnis der Mutationen Transitionen (A↔G und T↔C) den Transversionen überwiegen. Natürlich können auch *hot spot*-Mutationen durch ein Antigen selektioniert werden. In verschiedenen Antikörpern, die als Antwort auf unterschiedlichste Antigenreize generiert wurden, immer wieder auftauchende gleiche Mutationspräferenzen weisen aber auf einen intrinsischen Prozeß hin, der antigenunabhängig ist, wie das anhand von Häufungen stummer Mutationen leicht verdeutlicht werden kann. Interessanterweise findet sich in beiden Tumorgenen, *UKVH5a,b,c* und *ILVH3*, die klassische Mutation an der *hot spot*-Position 31, zweite Base wieder, wie sie in vielen anderen mutierten V_H-Genen gefunden wird: AGC→AAC (Ser→Asn). [99] Sie kann mit hoher Wahrscheinlichkeit nur selten mit einer antigenspezifischen Affinitätsreifung in Zusammenhang gebracht werden, wird aber, da in CDR1 liegend, häufig für R/S-Analysen mit herangezogen. [79,82] Auch an anderen Positionen der beiden Tumorgene finden sich die häufiger mutierten Triplets, die die Aminosäure Serin kodieren (AGC und AGT), in klassisch mutierter Form wieder: Position 82a in *UKVH5a,b,c* und die Positionen 55 und 82b in *ILVH3*.

5.2 EINORDNUNG DER DATEN IN DIE GEGENWÄRTIGE KLASSIFIKATION PRIMÄR KUTANER LYMPHOME

Die in der Tabelle 1 auf Seite 5 wiedergegebene Einteilung der primär kutanen Lymphome spiegelt den aktuellen Kenntnisstand über die Tumorzellen und deren klinisches Verhalten wider. [10] Einige nicht unwesentliche Detailfragen werden allerdings in der Literatur noch sehr kontrovers diskutiert und können derzeitig nicht abschließend beantwortet werden.

5.2.1 Keimzentrumszell-Lymphom *vs.* Marginalzonenzell-Lymphom

So herrscht noch keine Einigkeit darüber, ob die überwiegende Mehrheit der primär kutanen Lymphome von Keimzentrumszellen oder von Marginalzonenzellen ausgeht. Als Beispiel seien der Artikel SLATERS [17] und die darauf folgende Reaktion WILLEMZES [101] angeführt. Die in den Maltomen vorherrschende Zellpopulation wird als *centrocyte-like cells* bezeichnet, da sie den Zentrozyten der Keimzentren ähnelt. [102] Eine Eigenschaft der Maltomzellen ist die follikuläre Kolonisation, d.h. das Einwandern der Tumorzellen in reaktive Follikel, was wiederum den Anschein erweckt, es handele sich um neoplastische Follikel nodulärer Keimzentrumszell-Lymphome. Die Immunphänotypisierung der primär KKZL ($CD10^-$, bcl-2^-), in Distinktion zu den nodulären Keimzentrumszell-Lymphomen ($CD10^+$, bcl-2^+), wird von manchen Autoren als Hinweis auf eine Verwandtschaft zu den Marginalzonenzellen (auch $CD10^-$ und bcl-2^-), und somit zu den Maltomen, gewertet. [17] Auch der Fakt, daß B-Zellen in gesunder Haut nicht vorkommen und erst durch einen Stimulus, ähnlich dem MALT-Gewebe des Magens, akquiriert werden müssen, zieht Parallelen zu den Maltomen und führte zu dem Begriff des SALT (*skin associated lymphoid tissue*). [17,34] In einer neueren Arbeit werden 15 kutane Lymphome vom MALT-Typ, sieben davon als primär kutan, beschrieben und ihre Prävalenz mit bis zu 25% angegeben. [103] Der Autor interpretiert in diesem Zusammenhang übrigens die 83 von SANTUCCI beschriebenen Fälle primär kutaner Lymphome [12] als mögliche Maltome, die von SANTUCCI selbst als Mantelzell-Lymphome diskutiert werden. Auch die Arbeitsgruppe um KERL beschrieb kürzlich primär kutane Marginalzonen-B-Zell-Lymphome. [104] Es ist interessant, daß bei den Maltomen des Magens die *high-grade* Formen die häufigeren sind und daß die von ISAACSON beschriebenen *low-grade* Maltome die Minderheit repräsentieren. Die *low-grade* Formen weisen genügend Charakteristika auf, die ihre Klassifikation als eigene Entität ermöglichten (siehe Kapitel 1.1.4). Die Blasten der *high-grade* Formen allerdings ähneln noch mehr den Keimzentrumszellen als es die *centrocyte-like* Zellen tun. Einzig das Wissen um die klonale Verwandtschaft der großen Zellen zu den *centrocyte-like* Zellen eines „gemischten“

Maltoms ließ die Aussage zu, daß es sich bei den großen Blasten nicht um Keimzentrumszellen, sondern um morphologisch veränderte Marginalzonenzellen handelt. [47,49]

Damit wäre allerdings denkbar, daß die vorrangig großzelligen, diffus wachsenden primär kutanen Keimzentrumszell-Lymphome aus Marginalzonenzellen bestehen, die wiederum aus kleinzelligen, mehr charakteristischen Formen (z.B. Vorhandensein reaktiver Follikel) hervorgegangen sind. Dieser Übergang von kleinzelligen in großzellige Tumorformen ist ein eindeutiges Merkmal der KKZL, [10] und zwar, ähnlich den Maltomen des Magens, ohne eine begleitende Veränderung der Malignität des Tumors zu bewirken. Die gering prävalenten Marginalzonen-Lymphome, die primär in der Haut gefunden werden, [103] stellten dann die Vorstufe der häufig gefundenen „Keimzentrumszell-Lymphome“ dar.

Die von uns untersuchten Lymphome beherbergen weder neoplastische, noch reaktive Follikel, ihre Zellen ähneln Keimzentrumszellen und sie sind negativ für sIg, CD5 und CD10. Sie entsprechen damit den Keimzentrumszell-Lymphomen der EORTC-Klassifikation. Es ist ein unglücklicher Umstand, daß sich die bereits vorliegenden Mutationsanalysen der nodalen Keimzentrumszell-Lymphome [78-80,88,105,106] nicht wesentlich von denen der Marginalzonenzell-Lymphome [46,47,83] unterscheiden: Für beide konnten Hypermutationen nach antigenselektioniertem Muster wie auch *ongoing mutation* gezeigt werden. Aus dem Grunde bieten die vorliegenden Sequenzdaten über die primär kutanen Lymphome derzeit keine Entscheidungshilfe in der Streitfrage Keimzentrumszell-Lymphome *vs.* Marginalzonenzell-Lymphome.

5.2.2 *High-grade vs. low-grade* Tumorzellen

Auch die Beschreibung der Zellgröße der Tumorzellen ist verwirrend. Das primär KKZL der EORTC-Klassifikation kann durch kleine Zellen (*low-grade* in frühen Läsionen) oder große Zellen (*high-grade* Blasten in späten Läsionen) dominiert werden, ohne daß von einer blastischen Transformation - eine höhere Aggressivität implizierend - gesprochen wird. Aufgrund der langen Überlebensraten der Patienten überwiegen insgesamt die großen Zellen, d.h. die *high-grade* Formen. [11,12,107] Die KKZL der EORTC-Klassifikation sollen den zentroblastisch / zentrozytischen Lymphomen der Kiel-Klassifikation entsprechen, [10] sie wurden auch bisher so bezeichnet. Diese gehören aber zu den *low-grade*, also überwiegend kleinzelligen Tumoren, [8] da die Zentrozyten in der Überzahl sind. [108] Dadurch kommt es zu der überraschenden Feststellung ISAACSONs, daß die zentroblastisch / zentrozytischen

Lymphome in der Haut extrem selten sind. [13] Die häufigen B-Zell-Tumoren der Haut bezeichnet er als *high-grade* B-Zell-Lymphome, wobei er Ähnlichkeiten zu den zentroblastisch / zentrozytischen Tumoren einräumt. [13]

Bei den von uns untersuchten Lymphomen handelt es sich in beiden Fällen histologisch um großzellige Formen (>50% Blasten). Einziger Unterschied ist das Vorhandensein von Immunoblasten-ähnlichen Zellen im Fall des großzelligen B-Zell-Lymphoms der unteren Extremität. Immunoblasten können theoretisch aber auch in KKZL gefunden werden, [10] und sie sind andererseits keine Notwendigkeit für die Diagnosestellung der großzelligen Lymphome der unteren Extremität. [35] Eine Subunterteilung der großzelligen Lymphome in zentroblastische oder immunoblastische Formen ist vom klinischen Gesichtspunkt für die primär kutanen großzelligen Lymphome nicht notwendig. [35] Sie ist auch in der REAL-Klassifikation verlassen und die umfassende Bezeichnung *diffuses großzelliges Lymphom* eingeführt worden, da erstens auch bei den nodalen Lymphomen keine klinischen Unterschiede der einzelnen Subtypen bestehen und zweitens eine einheitliche Typisierung der Tumoren durch verschiedene Pathologen der *International Lymphoma Study Group* nicht möglich war. [9] In einer neueren Arbeit über diffuse großzellige nodale B-Zell-Lymphome konnte desweiteren keine Korrelation zwischen Subtyp und Mutationsmuster gezeigt werden, was auch gegen eine Subklassifizierung spricht. [82]

5.2.3 Rolle des *bcl-2* Proteins

Als Unterschied zwischen den beiden von uns untersuchten kutanen Lymphomen verbleiben die Lokalisation, der klinische Verlauf und die unterschiedliche Expression des *bcl-2* Proteins. Der Nachweis des *bcl-2* Proteins ist ein Charakteristikum der kutanen großzelligen Lymphome der unteren Extremität. [35] Der Tumor der Patientin IL ist *bcl-2*$^{+}$. Nun wird hier allerdings ein Merkmal bemüht, dessen Abwesenheit einerseits dazu dient, die primär KKZL von den nodalen zu differenzieren und dessen Vorhandensein andererseits die kutanen großzelligen B-Zell-Lymphome der unteren Extremität von den KKZL abzugrenzen helfen soll. Von manchen Autoren wird die Positivität für das *bcl-2* Protein als Hinweis auf einen systemischen Prozeß gewertet, was die ungünstigere Prognose der großzelligen Lymphome der unteren Extremität erklären könnte. [14,109] Auf einen systemischen Tumor weist die *bcl-2* Expression aber nur dann hin, wenn sie aufgrund einer t(14;18)-Translokation erfolgt, was bei den großzelligen B-Zell-Tumoren der unteren Extremität nicht der Fall sein soll. [36]

Das *bcl-2* Protein, ein 26 kDa Protein, schützt die Zellen vor dem programmierten Zelltod, der Apoptose. [54] Das kodierende (Protoonko-) Gen befindet sich auf dem Chromosom 18. Es wird exprimiert in fast allen kleinen Lymphozyten und extrafollikulären B-Zell-Blasten, aber nicht in Keimzentrumszellen. Erst die Stimulierung des B-Zell-Rezeptors der Keimzentrumszellen durch Antigene bewirkt die erneute Expression und bewahrt sie so vor der Apoptose. [54] Es ist gut nachvollziehbar, daß Keimzentrumszellen mit einer t(18;14) Translokation und der daraus folgenden erhöhten Expression des *bcl-2* Proteins (*bcl* steht für *B-cell lymphoma*) Ausgangszellen für ein unkontrolliertes Wachstums sein können, wie es für die nodalen Keimzentrumszell-Lymphome typisch ist. [9] Die Expression von Oberflächenimmunglobulinen der Tumorzellen und deren Wechselwirkung mit Antigenen wären dann theoretisch für das Tumorwachstum nicht erforderlich, ist aber tatsächlich der Fall. [9,79] Die Beobachtung, daß primär KKZL negativ für das *bcl-2* Protein sind, macht einen anderen Pathomechanismus für die Entstehung der KKZL wahrscheinlich. Viele der primär KKZL, vor allem die späten Formen, sind allerdings auch negativ für das Oberflächenimmunglobulin, [10,12,110] wodurch eine Erklärung der Tumorprogression dieser Lymphome als Folge von B-Zell-Rezeptor-Antigen-Wechselwirkungen zumindest für länger bestehende Läsionen schwerfällt.

Die Expression des *bcl-2* Proteins ist in Keimzentrumszell-Lymphomen nicht zwingend an eine t(18;14) Translokation gebunden. [111] Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate von Lymphozytenpopulationen und der nicht t(18;14) abhängigen Expression des *bcl-2* Proteins hergestellt: Kleine ruhende B-Zellen und auch die CCL-Zellen der Marginalzone der Maltome wie auch die Keimzentrumszellen der neoplastischen Follikel der Keimzentrumszell-Lymphome, die allesamt eine geringe Proliferationsrate aufweisen, exprimieren das *bcl-2* Protein, wohingegen sowohl die stark proliferierenden Maltomzellen, die die reaktiven Follikel der *low-grade* Lymphome kolonisieren, wie auch die physiologischen Keimzentrumszellen das *bcl-2* Protein nicht exprimieren. [48] Die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen des Patienten UK (80% der Zellen sind *Ki-67* positiv), die typisch für späte Läsionen ist, [12] könnte demnach eine Erklärung für das Fehlen des *bcl-2* Proteins sein. Die Ursache der *bcl-2* Expression der Tumorzellen der Patientin IL trotz ihrer hohen Proliferationsrate wäre bei Richtigkeit o.g. These dann nur aufgrund einer t(18;14) vorstellbar.

5.3 ZUR METHODE

Ziel wissenschaftlicher Untersuchungen ist es, immer tiefer in die Details unbekannter Zusammenhänge einzudringen und dabei das Auflösungsvermögen der Untersuchungsmethode zu erhöhen. Hierin reihen sich auf dem uns interessierenden Gebiet die ersten Mikromanipulationsversuche des vorigen Jahrhunderts, [112,113] die geniale Idee MULLIS, DNA-Moleküle durch sich wiederholende Polymerisationszyklen zu vervielfältigen (PCR), [114] die erste Amplifikation von DNA aus Einzelzellen durch LI *et al.* im Jahre 1988, [115] die Mikromanipulation von Zellpopulationen aus histologischen Präparaten für nachfolgende PCRs, [116] die Mikrodissektion von histologischen Präparaten nach der Methode von Pan *et al.* [117] oder mittels eines Lasers oder selektiver UV-Bestrahlung [118] und schließlich die erstmalig 1993 beschriebene Mikromanipulation von Einzelzellen aus ihrem Gewebeverband und der nachfolgenden Einzelzell-PCR [77] ein.

5.3.1 Einzelzell- *vs.* Populationsanalysen

Die Anwendung der Polymerasekettenreaktion in der Lymphomdiagnostik dient der Darstellung monoklonaler Lymphozytenpopulationen. [119] Sie hat in der Routinediagnostik im wesentlichen die aufwendigere Southern-Hybridisierung abgelöst. [120] Vervielfacht und analysiert werden diejenigen DNA-Abschnitte, die physiologisch variabel sind: die rearrangierten Gene für die Antigenrezeptoren. Monoklonalität wird durch ein, mittels unterschiedlicher Methoden visualisiertes, monoklonales PCR-Produkt nachgewiesen. Für die Routinediagnostik wird hierfür aus Zellpopulationen (Blutzellen, Biopsiegewebe) extrahierte DNA verwendet. Problematisch wird die Interpretation der PCR-Produkte, wenn der Anteil der tumorspezifischen DNA an der Gesamt-DNA sehr gering ist und vor allem dann, wenn besonders viel der Gesamt-DNA von reaktiven Lymphozyten stammt, da diese auch PCR-fähige Hybridisierungsstellen für die verwendeten Oligonukleotide bietet. Die klonalen Zellen müssen mindestens 1%-5% der untersuchten Zellpopulation ausmachen, um eine monoklonale Population nachweisen zu können, was der Sensitivität der Southern-Hybridisierung entspricht. [120] Deshalb gab es die verschiedensten Ansätze, die zu untersuchende Zellpopulation einzugrenzen. [116-118] Ein weiterer Nachteil der Populationsanalysen ist die Gefahr der Bildung von PCR-Hybriden, die synthetisiert werden, wenn ähnliche Moleküle, hier verschiedene V_H-Gene, als Matritze die Population bilden. Nur zum Teil anpolymerisierte Moleküle können an ähnlichen Molekülen hybridisieren und weiter nach deren Matritze zu Ende verlängert werden, was die Interpretationen von Mutationen erschwert. Auch der Fakt, daß nicht rein monoklonale PCR-Produkte zwecks Sequenzierung kloniert werden müssen,

erschwert die Mutationsanalysen: Fehlerhafte PCR-Produkte (Taq-Fehler) können bei der Ligation eingebaut werden. Intraklonale Diversität anhand von unterschiedlichen Sequenzen verschiedener angeimpfter Bakterienklone festzustellen ist nicht möglich. Es müssen mindestens die Produkte zweier unabhängiger PCR-Reaktionen kloniert und die zu analysierende Sequenz in Klonierungen beider gefunden werden, um eine verlässliche Aussage treffen zu können.

Neben der Möglichkeit der Direktsequenzierung haben Analysen auf Einzelzellniveau den Vorteil, Molekularbiologie und Zytologie eindeutig zu korrelieren. Es wird so möglich, Zellen verschiedener Morphologien (Immunoblasten, Zellen mit plasmozytischer Differenzierung, *etc.*) dem Tumor zuzuordnen oder als reaktiv zu charakterisieren. Sie stellen damit eine wesentliche Ergänzung zu der derzeitig praktizierten Methode der immunophenotypischen Leichtkettenrestriktion mit ihrer auf die einzelne Zelle bezogenen 50 %igen Wahrscheinlichkeit (κ *vs.* λ) dar. Sie bieten außerdem die Möglichkeit, die Lage der Tumorzellen im Gewebeverband zu dokumentieren. Das wäre bei den primär kutanen Keimzentrumszell-Lymphomen mit histologisch sichtbaren Follikeln von Interesse, was wiederum einen Beitrag zu der Diskussion Keimzentrumszellen *vs.* Marginalzonenzellen der primär kutanen B-Zell-Lymphome leisten kann. Leider waren in keinem der von uns untersuchten Präparate Follikel zu sehen, weshalb hierzu keine Aussagen gemacht werden können. Die Tumorzellpopulationen, obwohl vorrangig großzellig, beherbergten in beiden Fällen auch kleine Zellen. Die tumorspezifische V_H-Sequenz wurde in $CD20^+$ Zellen unterschiedlicher Größe gefunden (Daten nicht dargestellt).

Die molekularbiologische Untersuchung von Einzelzellen kann weiterhin erstmalig verschiedene genetische Besonderheiten, wie z.B. eine t(18;14) und eine gleichzeitige virale DNA, in ein und derselben Zelle aufzeigen, da eine Kombination von verschiedenen Oligonukleotiden in der PCR möglich ist. Für die Untersuchung antigenselektionierter Hypermutationen in B-Lymphozyten und anschließenden Antigenbindungsstudien ist von Bedeutung, daß die Sequenz der schweren und der leichten Kette des Immunglobulins in ein und derselben Zelle ermittelt werden kann. Derartige Analysen sind derzeitig in Arbeit.

5.3.2 Sensitivität und Spezifität der PCR-Diagnostik

Die Sensitivität der PCR-Diagnostik bei B-Zell-Lymphomen liegt zwischen 70 % und 90 %, je nachdem, ob FRI, II oder III als Bindungsstelle des 5'-Primers, bzw. eine Kombination der

genannten Primer verwendet wurde. [120,121] Die angegebenen Sensitivitäten beziehen sich auf solche Fälle, die zuvor durch Southern-Hybridiserung bereits als monoklonal diagnostiziert wurden. Bei der Routinediagnostik kutaner B-Zell-Lymphome an der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité Berlin werden bei ca. 50% der Patienten, deren klinisches, histologisches und immunhistochemisches Gesamtbild eine Neoplasie vermuten läßt, Monoklonalität nachgewiesen (persönliche Mitteilung PD Dr. A. Lukowsky, Leiter des Routinelabors). Es ist zu betonen, daß sich dieser doch deutlich geringere Wert auf klinisch verdächtige und nicht auf durch Southern-Hybridisierung zuvor bestätigte Neoplasien bezieht, wodurch die Ausgangsgröße höher ist. Ein weiterer Grund für die geringere Sensitivität ist die Tatsache, daß es sich bei den primär kutanen B-Zell-Lymphomen um Entartungen stark mutierter B-Zellen handelt, wie unsere Sequenzanalysen aufzeigen konnten. Die in der Praxis gebräuchlichen Oligonukleotide wurden aber anhand von Sequenzübersichten der Keimbahngene entwickelt, wonach die *framework regions* im Gegensatz zu den hypervariablen Bereichen konservierte Strukturen darstellen. Sie werden allerdings (fast) ebenso mutiert wie die CDRs (siehe Kapitel 5.1.3). Ob mit oder ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz spielt für die Primerbindung keine Rolle. Es ist also nicht verwunderlich, daß die Sensitivität der PCR zum Nachweis klonaler B-Zell-Populationen vom Lymphomtyp abhängig ist: Die nahezu unmutierten B-Zellen der B-CLL werden 100 %ig, die Keimzentrumszell-Lymphome nur zu 70% nachgewiesen. [121]

In der Routinediagnostik der Gesamt-DNA des Patienten UK konnte keine Monoklonalität für die schwere Kette des Immunglobulins nachgewiesen werden. Der bei dieser *seminested* PCR verwendete 5'-Primer soll an FR3 binden (*FR3a:* 5'-ACACGGCYSTGTATTACTGT), die beiden 3'-Primer am J_H-Segment (*LJH_{ext}:* 5'-TGAGGAGACGGTGACC und *$VLJH_{int}$:* 5'-GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG). Nachdem die Amplifikation und Sequenzierung der variablen Region der Tumorzellen mit den Oligonukleotiden der Einzelzell-PCR (siehe Material und Methoden) gelang, wurde offensichtlich, warum die Routine-PCR negativ war: Die Tumor-DNA war in den dem 3'-Ende der Oligonukleotide komplementären Bereichen mutiert. Dem Primer *FR3a* waren die viert- und fünftletzte Position (Aminosäureposition 91) und dem *$VLJH_{int}$* die letzte Position am 3'-Ende (Position 101) nicht mehr komplementär. Gerade die Hybridisierung des 3'-Endes der Primer an den Matritzen ist für eine erfolgreiche PCR essentiell. [122]

5.3.3 (Un-)Zuverlässigkeit der Daten

Die Sensitivität der Polymerasekettenreaktion ist außerordentlich hoch. Sie hängt primär von der Anzahl der Zielmoleküle und der Komplexität der Nicht-Target-Moleküle ab. [122] Wie in mehrfachen Veröffentlichungen gezeigt wurde, können sogenannte *single-copy genes* aus einer haploiden Zelle amplifiziert werden. [77,115] Die Spezifität wird durch die Oligonukleotide und die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Salzkonzentration) beeinflußt. Das Arbeiten auf Einzelzellniveau birgt einige Besonderheiten gegenüber dem Arbeiten mit Zellpopulationen.

Größter Nachteil der Methode ist die fehlende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, ein wesentliches Erfordernis wissenschaftlichen Experimentierens. Die getroffene Aussage zu einer bestimmten Zelle kann somit nicht bewiesen, nur durch die Art des Versuchsaufbaus glaubhaft gemacht werden. Größtes Problem stellen hierbei Kontaminationen dar. Bereits eine geringe Anzahl von (monoklonalen) Fremdmolekülen verhindert die Amplifikation des einen gewünschten. Fremdmoleküle können von kontaminierenden Zellen stammen oder DNA von PCR-Produkten vorangegangener Reaktionen oder Plasmid-DNA früherer Klonierungen sein. Um die Gefahr der Kontamination zu reduzieren, wurden die Mikromanipulation und die PCR 1. Runde jeweils in einem und die PCR 2. Runde in einem anderen Raum durchgeführt. Der Mikromanipulationsraum durfte nicht von Mitarbeitern, die zuvor an anderen PCR- und vor allem Klonierungsarbeitsplätzen tätig waren, betreten werden. Die Mikromanipulation erfolgte in sterilen Kitteln und Einmalhandschuhen, die Glaskapillaren wurden nach jeder Manipulation einer Zelle gewechselt. Um die Gefahr der Kontaminationen während der Mikromanipulation beurteilen zu können, wurden am gleichen Tag von der selben Biopsie CD3-positive T-Zellen als Negativkontrolle gewonnen. Das Ansetzen der PCR-Chemikalien wurde für beide PCR-Runden durch Leerproben (alle Reagenzien ohne DNA) kontrolliert. Wie die Übersicht über die Einzelzellanalyse des Patienten UK (Tabelle 8 auf Seite 40) allerdings verdeutlicht, bestanden anfänglich große Kontaminationsprobleme. Mit Hilfe einer akribisch geführten Sequenzdatenbank aller bisher in unserem Labor amplifizierten und sequenzierten Immunglobulingene konnten wir den Großteil als „laboreigene“ Plasmide identifizieren. Es gelang uns, die Häufigkeit der Kontaminationen deutlich zu reduzieren, nachdem wir uns entschlossen, auch die Chemikalien für die 2. Runde PCR im Mikromanipulationslabor zu pipettieren. Nur das PCR-Produkt der 1. Runde und die Polymerase wurden in dem Raum hinzugegeben, in dem die PCR 2. Runde erfolgte. Im Mikromanipulationsraum wurde, mit Ausnahme des Zellkerns, nie DNA pipettiert!

Mit Hilfe der Voruntersuchungen an den CB03-Hybridomzellen und den B-Zell-Infiltraten des T-Zell-Tumors der Patientin MW konnten wir zeigen, daß wir in der Lage sind, sowohl monoklonale als auch polyklonale B-Zell-Populationen zu untersuchen. Die Familienspezifität der Primer wurde anhand der MW-Sequenzen nachgewiesen. Einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit der Sequenzierung geben die MW-Daten: 14 der 21 sequenzierten V_H-Gene liegen in Keimbahnkonfiguration vor, was eine geringe Fehlerrate der Polymerase andeutet. Praktisch ist die Gefahr, durch Einbau falscher Nukleotide der Polymerase fehlerhafte Sequenzen zu analysieren, in unseren Versuchen zu vernachlässigen. Anders als es bei den Klonierungen der Fall ist, kann ein PCR-Fehler, selbst wenn er im ersten Zyklus der PCR auftreten sollte, bei einer Direktsequenzierung nicht zu einer falschen Sequenz, sondern höchstens zu einer Überlagerung im Elektropherogramm führen. Die PCR-Fehlerrate (am häufigsten wird G gegenüber einem T eingebaut [116]) wird von den verschiedenen Labors und Herstellern unterschiedlich angegeben. Neuere PCR-Protokolle mit geringeren dNTP- und $MgCl_2$-Konzentrationen haben die Fehlerrate deutlich gesenkt. Sie liegt bei ca. 5×10^{-6} pro Zyklus. [122] In verschiedenen Veröffentlichungen beschriebene Werte um $1{,}5 \times 10^{-3}$ resultieren aus der Summe der PCR- und Klonierungsfehler. [57,73] Um die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Nukleotideinbaus weiter zu minimieren, haben wir für die PCR 1. Runde ein Taq/Pwo-DNA-Polymerasegemisch geringerer Fehlerrate verwendet. Die Tatsache, daß wir keine intraklonale Diversitäten fanden, bietet die Möglichkeit, eine Aussage zu der Sequenziergenauigkeit zu machen. Von den 14 untersuchten Tumorsequenzen der Patientin IL beispielsweise waren alle untereinander identisch. Alles in allem können unsere Mutationsanalysen als auf sicheren Füßen stehend betrachtet werden, da das patientenspezifische Keimbahngen und die fehlerfreie Sequenz der Immunglobulingene der Tumorzellen für die Analysen zur Verfügung standen.

Ein Problem, das den Arbeits- und finanziellen Aufwand betrifft, ist die geringe Effizienz. Sie lag in unseren Händen bei ca. 30% (UK 24,6 % und IL 31%) und ist damit ähnlich der von KÜPPERS *et al.* für B-Zellen mit mutierten V_H-Genen angegebenen. [77] Die Ursachen dafür sind vielseitig: Zwar werden die Einzelzellen aus 10 µm dicken Kryopräparaten isoliert, die Möglichkeit, daß der interessierende Bereich des rearrangierten Chromosoms 14 durch die Schnittführung verlorenging, ist aber nicht auszuschließen. Auch eine lagerungsbedingte Degradierung des DNA-Moleküls ist möglich. Weiterhin ist nicht zu überprüfen, ob die in die Glaskapillare aspirierte Zelle tatsächlich in das PCR-Gefäß überführt oder ob das eine zu amplifizierende Molekül während der Pipettierung der Polymerase nicht versehentlich wieder

entfernt wurde. Hohe Temperaturen können außerdem zu DNA-Doppelstrangbrüchen des gewünschten Moleküls führen, was eine Amplifizierung unmöglich macht. Auch die oben erläuterte Variante, daß Primerbindungen durch Mutationen der entsprechenden Bereiche erschwert wurden, ist in Betracht zu ziehen. Die geringste Verunreinigung durch sequenzähnliche Moleküle, d.h. andere Immunglobulingene, überdeckt die eigentliche PCR. Die geringe Effizienz, der Zeit- und vor allem der Kostenaufwand machen die Mikromanipulation und Einzelzell-PCR für die Routineuntersuchungen derzeit ungeeignet. Sie stellt aber definitiv eine innovative Methode dar, die völlig neue Fragestellungen in der molekulargenetischen Forschung aufwerfen und beantworten kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden die Immunglobulinsequenzen von primär kutanen B-Zell-Lymphomen untersucht und die Methoden der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR erstmalig in der dermatologischen Forschung angewendet. Mutationsanalysen der Immunglobulingene von B-Lymphozyten können Auskunft darüber geben, in welchem Stadium ihrer Entwicklung sich die B-Zellen zum Zeitpunkt ihrer Untersuchung befinden, wodurch Rückschlüsse auf die Herkunft der Lymphomzellen möglich sind.

Wir untersuchten insgesamt 106 B-Lymphozyten von zwei Patienten mit primär kutanem B-Zell-Lymphom, die in beiden Fällen aus mindestens zwei verschiedenen Biopsien gewonnen wurden. Die Sequenzanalyse konnte sowohl für das primär kutane Keimzentrumszell-Lymphom als auch für das großzellige B-Zell-Lymphom der unteren Extremität die Tumorzellen als reife, mutierte *germinal center*-B-Zellen oder deren Abkömmlinge identifizieren, was die histologische Beurteilung dieser Zellen als von Keimzentrumszellen abstammend unterstützt. Zumindest für das Keimzentrumszell-Lymphom des Patienten UK konnte nachgewiesen werden, daß die Zellen nach ihrer Transformation zu Tumorzellen noch zur Hypermutation befähigt waren. Eindeutige Indizien für eine antigenabhängige Verteilung der Mutationen gibt es - die derzeitigen Analyseverfahren (R/S-Ratio) nutzend - nicht, was aber die Rolle eines Antigens bei der Entstehung oder gar Progression des Tumorklons nicht ausschließt, wie in der Diskussion ausführlich erläutert wird. Anhand der vorliegenden Sequenzen konstruierte *single chains* (über einen *linker* gekoppelte variable Fragmente der H- und L-Kette) oder besser vollständige antigenbindende Fragmente (H- und L-variables Fragment plus den C1-Domänen) werden in Bindungsstudien die Frage der Spezifität und Affinität der Tumorantikörper beantworten helfen.

Molekularbiologische Unterschiede zwischen beiden untersuchten Tumorentitäten bestehen zum einen in der deutlich höheren Mutationsfrequenz sowie dem Fehlen von intraklonaler Diversität bzw. andauernder Mutation des V_H-Gens der Patientin IL mit dem großzelligen B-Zell-Lymphom der unteren Extremität. Es ist selbstverständlich notwendig, mehrere Fälle zu untersuchen, um einen molekularbiologischen Unterschied zwischen den Keimzentrumszell-Lymphomen und den großzelligen Lymphomen der unteren Extremität zu konstatieren und somit einen Beitrag für die Klassifikation primär kutaner B-Zell-Lymphome zu leisten.

Die Mikromanipulation und die molekularbiologische Untersuchung auf Einzelzellniveau stellen kombiniert eine elegante und potente Methode dar, Tumorzellen exakt zu lokalisieren und genetisch zu charakterisieren. Ihre Anwendung läßt sich auf verschiedene Bereiche durch die Verwendung geeigneter Oligonukleotide übertragen. Sie ermöglicht die Beantwortung völlig neuer Fragestellungen, wie die exakte Verteilung der Zytokinexpression im Gewebeverband und deren Zuordnung zu einzelnen Zellen, um nur ein Beispiel zu nennen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Stingl G, Hauser C, Wolff K: The epidermis: an immunologic microinvironment, in Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds): Dermatology in general medicine, McGraw-Hill, 1993, S. 172

2. Clark WH, Mihm MC, Jr., Reed RJ, Ainswarth AM: The lymphocytic infiltrates of the skin. Hum Pathol 5:25, 1974

3. Burg G, Rodt H, Grosse Wilde H, Netzel B, Fateh Moghadam A, Braun Falco O: Enzymecytochemical and immunocytological studies as a basis for the revaluation of the histology of cutaneous B-cell and T-cell lymphomas. Hamatol Bluttransfus 20:179, 1977

4. Kerl H, Burg G: Immunozytome und immunoblastische Lymphome der Haut. Hautarzt 30:666, 1979

5. Willemze R, de Graaff Reitsma CB, van Vloten WA, Meijer CJ: The cell population of cutaneous B-cell lymphomas. Br J Dermatol 108:395, 1983

6. Schmoeckel C, Burg G, Braun Falco O: Quantitative analysis of lymphoid cells in cutaneous low-grade malignant B-cell lymphomas. Arch Dermatol Res 266:239, 1979

7. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. Cancer 49:2112, 1982

8. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelenyi G, Sundstrom C, Lennert K, van Unnik JA, Mioduszewska O, et al: Updated Kiel classification for lymphomas. Lancet 1:292, 1988

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

10. Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Peréz JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, van Vloten WA, Meijer CJ: EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. eingereicht 1997

11. Pimpinelli N, Santucci M, Bosi A, Moretti S, Vallecchi C, Messori A, Giannotti B: Primary cutaneous follicular centre-cell lymphoma--a lymphoproliferative disease with favourable prognosis. Clin Exp Dermatol 14:12, 1989

12. Santucci M, Pimpinelli N, Arganini L: Primary cutaneous B-cell lymphoma: a unique type of low-grade lymphoma. Clinicopathologic and immunologic study of 83 cases. Cancer 67:2311, 1991

13. Isaacson PG, Norton AJ: Cutaneous Lymphoma, in Isaacson PG, Norton AJ (eds): Extranodal Lymphomas, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994, S. 131

14. Kerl H, Volkenandt M, Cerroni L: Maligne Lymphome der Haut. Hautarzt 45:421, 1994

15. Burg G, Kerl H, Przybilla B, Braun Falco O: Some statistical data, diagnosis, and staging of cutaneous B-cell lymphomas. J Dermatol Surg Oncol 10:256, 1984

16. Musshoff K: Klinische Stadieneinteilung der Nicht-Hodgkin-Lymphome. Strahlentherapie 153:218, 1977

17. Slater DN: MALT and SALT: the clue to cutaneous B-cell lymphoproliferative disease. Br J Dermatol 131:557, 1994

18. Wood GS, Ngan BY, Tung R, Hoffman TE, Abel EA, Hoppe RT, Warnke RA, Cleary ML, Sklar J: Clonal rearrangements of immunoglobulin genes and progression to B cell lymphoma in cutaneous lymphoid hyperplasia. Am J Pathol 135:13, 1989

19. Shelley WB, Wood MG, Wilson JF, Goodman R: Premalignant lymphoid hyperplasia preceding and coexisting with malignant lymphoma in the skin. Arch Dermatol 117:500, 1981

20. Rijlaarsdam JU, Meijer CJ, Willemze R: Differentiation between lymphadenosis benigna cutis and primary cutaneous follicular center cell lymphomas. A comparative clinicopathologic study of 57 patients. Cancer 65:2301, 1990

21. Kerl H, Ackerman AB: Inflammatory diseases that simulate lymphomas: cutaneous pseudolymphomas, in Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds): Dermatology in general medicine, McGraw-Hill, 1993, S. 1315

22. Sterry W, Staib G: Moderne molekularbiologische Diagnostik kutaner maligner Lymphome. Hautarzt 46:4, 1995

23. Kaudewitz P: Pseudolymphome der Haut, in Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (eds): Dermatologie und Venerologie, Springer, 1995, S. 1390

24. Pimpinelli N, Santucci M, Giannotti B: Cutaneous lymphoma: a clinically relevant classification. Int J Dermatol 32:695, 1993

25. Lennert K, Stein H, Kaiserling E: Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. Br J Cancer 31 SUPPL 2:29, 1975

26. Mason DY, Gatter KC, Parker EM, Micklem KJ: The revised European-American classification of human lymphoid neoplasms (booklet to transparencies). 1996

27. Pileri SA, Leoncini L, Falini B: Revised European-American Lymphoma Classification. Curr Opin Oncol 7:401, 1995

28. Rijlaarsdam JU, van der Putte SC, Berti E, Kerl H, Rieger E, Toonstra J, Geerts ML, Meijer CJ, Willemze R: Cutaneous immunocytomas: a clinicopathologic study of 26 cases. Histopathology 23:117, 1993

29. Garbe C, Stein H, Gollnick H, Taud W, Orfanos CE: Kutanes B-Zell-Lymphom bei chronischer Borrelia-Burgdorferi-Infektion. Bericht über zwei Fälle und Literaturübersicht. Hautarzt 39:717, 1988

30. Garbe C, Stein H, Dienemann D, Orfanos CE: Borrelia burgdorferi-associated cutaneous B cell lymphoma: clinical and immunohistologic characterization of four cases. J Am Acad Dermatol 24:584, 1991

31. Falzon M, Isaacson PG: Histological classification of the non-Hodgkin's lymphoma. Blood Rev 4:111, 1990

32. Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, Nadler LM, De Vita VT, Lister TA, Armitage JO: Lymphoma classification--the gap between biology and clinical management is closing. Blood 88:4085, 1996

33. Chan JK, Banks PM, Cleary ML, Delsol G, De Wolf Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, et al: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms proposed by the International Lymphoma Study Group. A summary version. Am J Clin Pathol 103:543, 1995

34. Giannotti B, Santucci M: Skin-associated lymphoid tissue (SALT)-related B-cell lymphoma (primary cutaneous B-cell lymphoma). A concept and a clinicopathologic entity. Arch Dermatol 129:353, 1993

35. Vermeer MH, Geelen FA, van Haselen CW, van Voorst Vader PC, Geerts ML, van Vloten WA, Willemze R: Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. Arch Dermatol 132:1304, 1996

36. Geelen FA, Beljaards RC, van der Putte SC, Willemze R: Differences in the expression of bcl-2 protein and adhesion molecules between prognostically different groups of primary cutaneous large B-cell lymphomas. Ann Oncol in press:1997

37. Bertero M, Novelli M, Fierro MT, Bernengo MG: Mantle zone lymphoma: an immunohistologic study of skin lesions. J Am Acad Dermatol 30:23, 1994

38. Isaacson P, Wright DH, Judd MA, Mepham BL: Primary gastrointestinal lymphomas: a classification of 66 cases. Cancer 43:1805, 1979

39. Isaacson P, Wright DH: Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. Cancer 52:1410, 1983

40. Isaacson P, Wright DH: Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. Cancer 53:2515, 1984

41. Isaacson PG, Norton AJ: Extranodal Lymphomas. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994

42. Wotherspoon AC, Ortiz Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG: Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 338:1175, 1991

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

44. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J: The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to Helicobacter pylori. Lancet 342:571, 1993

45. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Dogan A, Spencer J: Immunoglobulin specificity of low grade B cell gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type. Am J Pathol 142:285, 1993

46. Qin Y, Greiner A, Trunk MJ, Schmausser B, Ott MM, Muller Hermelink HK: Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. Blood 86:3528, 1995

47. Du M, Diss TC, Xu C, Peng H, Isaacson PG, Pan L: Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. Leukemia 10:1190, 1996

48. Isaacson PG, Wotherspoon AC, Diss TC, Pan LX: Bcl-2 expression in lymphomas. Lancet 337:175, 1991

49. Chan JK, Ng CS, Isaacson PG: Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach. Am J Pathol 136:1153, 1990

50. Schroeder HW, Jr., Wang JY: Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. Proc Natl Acad Sci U S A 87:6146, 1990

51. Rolink A, Andersson J, Ghia P, Grawunder U, Haasner D, Karasuyama H, ten Boekel E, Winkler TH, Melchers F: B-cell development in mouse and man. The Immunologist 3/4:125, 1995

52. Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. Nature 302:575, 1983

53. 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 311:752, 1984

54. Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC: Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. Immunol Today 13:17, 1992

55. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Briere F, Banchereau J, Liu YJ: Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. Science 268:720, 1995

56. Liu YJ, Oldfield S, MacLennan IC: Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. Eur J Immunol 18:355, 1988

57. Dunn Walters DK, Isaacson PG, Spencer J: Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. J Exp Med 182:559, 1995

58. Kabat EA, Wu TT: Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. Ann N Y Acad Sci 190:382, 1971

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

60. MacCallum RM, Martin ACR, Thornton JM: Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. J Mol Biol 262:732, 1996

61. Timson J, McDermott H: Instrumentation and preparation for micromanipulation, in Fishel S (ed): Micromanipulation techniques, London, Baillière Tindall, 1994, S. 13

62. Peterfi T: Das mikrurgische Verfahren. Naturwissenschaften 11:81, 1923

63. Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K: Micromanipulation and PCR analysis of single cells from tissue sections, in Weir DM, Blackwell C, Herzenberg LA (eds): Handbook of Experimental Immunology, Oxford, Blackwell Scientific (in press), 1997,

64. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74:5463, 1977

65. Jahn S, Niemann B, Winkler T, Kalden JR, von Baehr R: Expansion of a B-lymphocyte clone producing IgM auto-antibodies encoded by a somatically mutated VHI gene in the spleen of an autoimmune patient. Rheumatol Int 13:187, 1994

66. Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G: The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. J Mol Biol 227:776, 1992

67. Matsuda F, Shin EK, Nagaoka H, Matsumura R, Haino M, Fukita Y, Taka ishi S, Imai T, Riley JH, Anand R, et al: Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. Nat Genet 3:88, 1993

68. Shin EK, Matsuda F, Nagaoka H, Fukita Y, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Honjo T: Physical map of the 3' region of the human immunoglobulin heavy chain locus: clustering of autoantibody-related variable segments in one haplotype. EMBO J 10:3641, 1991

69. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y: Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. EMBO J 7:4141, 1988

70. Schroeder HW, Jr., Hillson JL, Perlmutter RM: Early restriction of the human antibody repertoire. Science 238:791, 1987

71. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P: Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. Cell 27:583, 1981

72. 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 U S A 84:9150, 1987

73. Klein U, Kuppers R, Rajewsky K: Human IgM+IgD+ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. Eur J Immunol 23:3272, 1993

74. Klein U, Kuppers R, Rajewsky K: Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in human. Blood 89:1288, 1997

75. Hentges F: B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. Clin Exp Immunol 97 Suppl 1:3, 1994

76. Berek C, Berger A, Apel M: Maturation of the immune response in germinal centers. Cell 67:1121, 1991

77. Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K: Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. EMBO J 12:4955, 1993

78. Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H: Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. Blood 84:403, 1994

79. Bahler DW, Levy R: Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. Proc Natl Acad Sci U S A 89:6770, 1992

80. 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 86:505, 1994

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

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

83. Kuppers R, Hajadi M, Plank L, Rajewsky K, Hansmann ML: Molecular Ig gene analysis reveals that monocytoid B cell lymphoma is a malignancy of mature B cells carrying somatically mutated V region genes and suggests that rearrangement of the kappa-deleting element (resulting in deletion of the Ig kappa enhancers) abolishes somatic hypermutation in the human. Eur J Immunol 26:1794, 1996

84. Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K: Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. Blood 80:2326, 1992

85. Klein U, Klein G, Ehlin Henriksson B, Rajewsky K, Kuppers R: Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. Mol Med 1:495, 1995

86. Cook GP, Tomlinson IM: The human immunoglobulin VH repertoire. Immunol Today 16:237, 1995

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

88. Bahler DW, Zelenetz AD, Chen TT, Levy R: Antigen selection in human lymphomagenesis. Cancer Res 52:5547s, 1992

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

90. MacLennan IC, Gray D: Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. Immunol Rev 91:61, 1986

91. Jukes TH, King JL: Evolutionary nucleotide replacements in DNA. Nature 281:605, 1979

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

93. Pascual V, 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 Suppl 32:50, 1992

94. Rudikoff S, Giusti AM, Cook WD, Scharff MD: Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 79:1979, 1982

95. 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 J 5:1561, 1986

96. Tilgner J, Golembowski S, Kersten B, Sterry W, Jahn S: VH genes expressed in peripheral blood IgE-producing B cells from patients with atopic dermatitis. Clin Exp Immunol 107:528, 1997

97. Hillson 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 178:331, 1993

98. Foote J, Winter G: Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol 224:487, 1992

99. Betz AG, Neuberger MS, Milstein C: Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. Immunol Today 14:405, 1993

100. Rogozin IB, Kolchanov NA: Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. Biochim Biophys Acta 1171:11, 1992

101. Willemze R, Rijlaarsdam JU, Meijer CJ: Are most primary cutaneous B-cell lymphomas 'marginal cell lymphomas'? Br J Dermatol 133:950, 1995

102. Isaacson PG: Recent developments in our understanding of gastric lymphomas. Am J Surg Pathol 20 Suppl 1:S1, 1996

103. Bailey EM, Ferry JA, Harris NL, Mihm MC, Jr., Jacobson JO, Duncan LM: Marginal zone lymphoma (low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type) of skin and subcutaneous tissue: a study of 15 patients. Am J Surg Pathol 20:1011, 1996

104. Cerroni L, Signoretti S, Kutting B, Annessi G, Metze D, Giannetti A, Kerl H: Marginal zone B-cell lymphoma of the skin. J Cutan Pathol 23:47, 1996 (abstr.)

105. Bahler DW, Campbell MJ, Hart S, Miller RA, Levy S, Levy R: Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. Blood 78:1561, 1991

106. Zelenetz AD, Campbell MJ, Bahler DW, Takahashi S, Oren R, Esserman L, Umetsu DT, Kwak LW, Maloney DG, Brown S, et al: Follicular lymphoma: a model of lymphoid tumor progression in man. Ann Oncol 2 Suppl 2:115, 1991

107. Willemze R, Meijer CJ, Sentis HJ, Scheffer E, van Vloten WA, Toonstra J, van der Putte SC: Primary cutaneous large cell lymphomas of follicular center cell origin. A clinical follow-up study of nineteen patients. J Am Acad Dermatol 16:518, 1987

108. Lennert K: Non-Hodgkin-Lymphome: Prinzipien und Anwendung der Kiel-Klassifikation. Verh Dtsch Ges Pathol 76:1, 1992

109. Cerroni L, Volkenandt M, Rieger E, Soyer HP, Kerl H: bcl-2 protein expression and correlation with the interchromosomal 14;18 translocation in cutaneous lymphomas and pseudolymphomas. J Invest Dermatol 102:231, 1994

110. Nagatani T, Miyazawa M, Matsuzaki T, Hayakawa H, Iemoto G, Kim ST, Baba N, Aihara M, Miyamoto H, Nakajima H, et al: Cutaneous B-cell lymphoma--a clinical, pathological and immunohistochemical study. Clin Exp Dermatol 18:530, 1993

111. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. Am J Pathol 137:225, 1990

112. Schmidt HD: On the minute structure of the hepatic lobules, particularly with reference to the relationship between the capillary blood vessels, the hepatic cells and the canals which carry the secretion of the latter. Am J Med Sci 37:13, 1859

113. Chabry L: Contribution l'embryologie normal et teratologique des ascidies simples. J Anat Physiol 23:167, 1887

114. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1:263, 1986

115. Li HH, Gyllensten UB, Cui XF, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N: Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature 335:414, 1988

116. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U: Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. Nature 354:389, 1991

117. Pan LX, Diss TC, Peng HZ, Isaacson PG: Clonality analysis of defined B-cell populations in archival tissue sections using microdissection and the polymerase chain reaction. Histopathology 24:323, 1994

118. Shibata D, Hawes D, Li ZH, Hernandez AM, Spruck CH, Nichols PW: Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. Am J Pathol 141:539, 1992

119. Staib G, Sterry W: Use of polymerase chain reaction in the detection of clones in lymphoproliferative diseases of the skin. Recent Results Cancer Res 139:239, 1995

120. Lehman CM, Sarago C, Nasim S, Comerford J, Karcher DS, Garrett CT: Comparison of PCR with southern hybridization for the routine detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. Am J Clin Pathol 103:171, 1995

121. Diss TC, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan L: Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. J Pathol 169:291, 1993

122. Arnheim N, Erlich H: Polymerase chain reaction strategy. Annu Rev Biochem 61:131, 1992

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CCL	*centrocyte-like*
CD	*a) contact definition* *b) cluster of differentiation*
CDR	*complementarity determining region*
cIg	cytosolisches Ig
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
DCLWG	*Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group*
DIR	irreguläre D-Gene
EORTC	*European Organization for Research and Treatment of Cancer*
FR	*framework region*
h	Stunden
Ig	Immunglobulin
IgH	schwere Kette des Ig
IL	Interleukin
KBZL	kutanes B-Zell-Lymphom
KKZL	kutanes Keimzentrumszell-Lymphom
MALT	*mucosa-associated lymphoid tissue*
MZBZL	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
PAS	*Periodic Acid Schiff reaction* (Periodsäure-Leukofuchsin-Reaktion)
PBL	periphere Blutlymphozyten
PCR	*polymerase chain reaction*
REAL	*Revised European-American Lymphoma (Classification)*
RSS	Rekombinationssignalsequenz
sIg	*surface* (Oberflächen-) Ig
TdT	terminale Desoxynucleotidyl-Transferase

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, im Mai 1997

S. Golembowski

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. W. Sterry danke ich für die Möglichkeit, an der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité wissenschaftlich arbeiten und meine Promotion vorbereiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, PD Dr. S. Jahn, der überdurchschnittliche labortechnische Rahmenbedingungen organisierte und der jederzeit bereit zu wissenschaftlichen Diskussionen war, die mir viele wertvolle Anregungen für meine theoretische und praktische Arbeit vermittelten.

Dieser Dank schließt alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe des Herrn PD Dr. S. Jahn ein. Insbesondere bei Frau Dr. S. Gellrich möchte ich mich für ihren erfrischenden, ansteckenden Arbeitseifer bedanken, der Energiereserven meinerseits mobilisieren half.

Allen Mitarbeitern der Labore der 5. Ebene der Hautklinik danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

Für die histologische Beratung bedanke ich mich bei Frau Dr. H. Audring.

Frau K. Wittkowski gebührt Dank für das Schneiden und die Anfärbung der Kryopräparate.

Der Arbeitsgruppe von Prof. K. Rajewsky des Instituts für Genetik der Universität zu Köln, hier vor allem Herrn Dr. R. Küppers, danke ich für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung bei der Etablierung der Methode und der Überlassung der Oligonukleotidsequenzen für die Einzelzell-PCR.

Abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie. Meiner Frau, Beate Golembowski, danke ich für die organisationstechnische Hilfe und für die Durchsicht des Manuskripts und meiner Tochter Sophie dafür, daß sie gesund zur Welt kam. Beiden danke ich für die vielen Stunden geduldigen Wartens.

Die Arbeit wurde mit einer „Studentische-Hilfskraft-Stelle“ der Forschungskommission der Charité und später durch die DFG im Rahmen der klinischen Forschergruppe „Lymphome der Haut“ (Nr. Ste366/7-1) unterstützt.

LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Name	Sven Golembowski
geboren	16. September 1967 in Bernburg
Wohnanschrift	Arkonastraße 52, 13189 Berlin
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1974 - 1982	Polytechnische Oberschule in Bernburg
1982 - 1986	Landesschule Schulpforta mit Spezialausbildung im Fach Musik
1986	Abitur an der Landesschule Schulpforta, Prädikat "Ausgezeichnet"

Armeedienst

1986 - 1990	in Berlin

Studium der Humanmedizin

Seit 1990	an der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin
1993	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1993/94	Studienjahr am University College London, Großbritannien
1996	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1996	United States Medical Licensing Examination Step I

Praktisches Jahr

1996/97	Dermatologische Universitätsklinik der Charité, Berlin
	Universitätsklinik für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Rudolf Virchow

Stipendien

1993/94	Förderung durch den DAAD für einen einjährigen Studienaufenthalt in Großbritannien
Seit 1995	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Veröffentlichungen

Tilgner, J., Golembowski, S., Sterry, W. & Jahn, S. (1995). Mutated and unmutated VH genes encoding IgE detected in peripheral blood B cells in patients with atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol., 105: 458 (Abstr.)

Tilgner, J., Golembowski, S., Kersten, B., Sterry, W. & Jahn, S. (1997). VH genes expressed in peripheral blood IgE producing B cells from patients with atopic dermatitis. Clin. Exp. Immunol., 107 (3): 528-535

Golembowski, S., Gellrich, S., Audring, H., Jahn, S. & Sterry, W. (1997). Characterization of the VH-gene rearrangement in a cutaneous B-cell lymphoma by micromanipulation and single cell PCR. Arch. Dermatol. Res., 289 (Suppl.): A63 (Abstr.)

Jahn, S., Gellrich, S., Borkowski, A., Golembowski, S., Rutz, S., Gromnica-Ihle, E. & Sterry, W. (1997). Antigen-driven clonal expansion of B cells infiltrating salivary glands and lymph nodes in patients with Sjoegren's syndrome. J. Invest. Dermatol., 108 (4): 599 (Abstr.)