

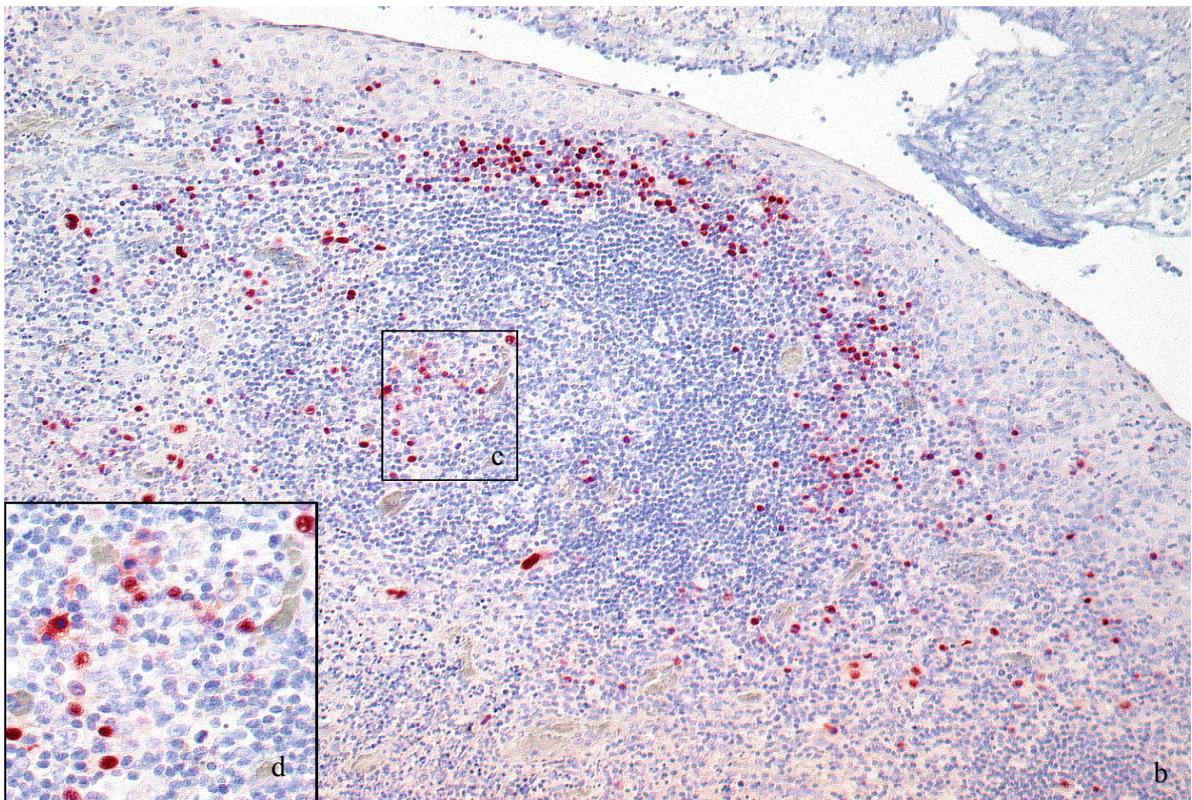
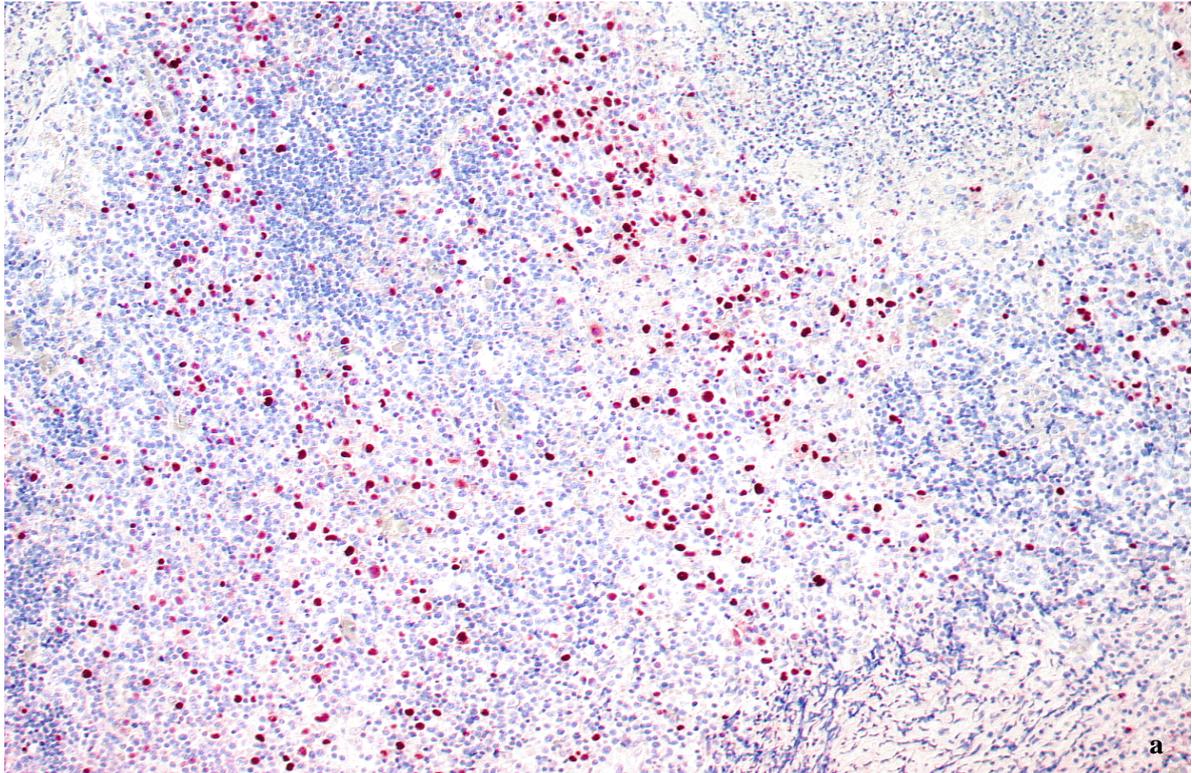
### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Detektion Epstein-Barr Virus infizierter Zellen**

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Zielzelle des EBV in der IM genauer zu charakterisieren. Besonderes Interesse galt dabei dem Differenzierungsstadium der EBV-infizierten B-Zellen in der IM. Diese Frage sollte über den Nachweis somatischer Mutationen in den umgelagerten IgH-Genen der EBV-positiven Zellen beantwortet werden. Es standen dafür Gefriergewebeproben von vier Fällen mit IM zur Verfügung; es waren drei Tonsillektomiepräparate und ein Lymphknoten. Die Diagnose IM war durch serologische, morphologische und immunhistologische Nachweise erbracht und gesichert worden.

Zur Identifikation EBV-infizierter Zellen wurde zum einen eine in situ-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis der kernständigen EBV-kodierten RNAs (EBER-1 und -2) und zum anderen eine Immunhistologie zum Nachweis der EBV-kodierten Proteine LMP-1 und EBNA-2 durchgeführt. Während der Nachweis der EBER-Expression nahezu alle EBV-positiven Zellen zur Darstellung bringt, exprimiert nur ein Teil der EBER-positiven Zellen auch LMP-1 und/oder EBNA-2. Um Zellen, die sowohl LMP-1 als auch EBNA-2 exprimierten, zu identifizieren wurden Doppelmarkierungen durchgeführt.

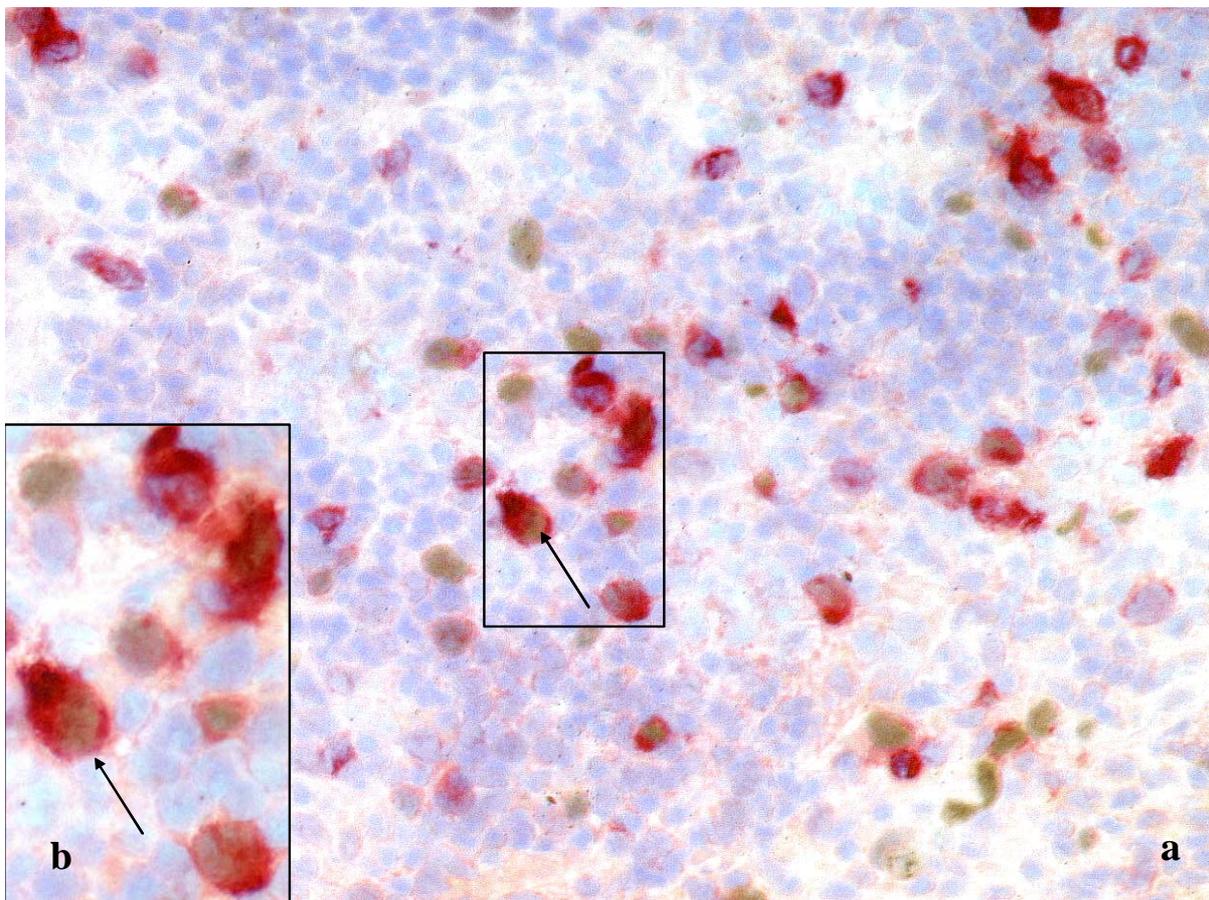
Durch die EBER in situ-Hybridisierung ließ sich eine EBV-Infektion an Paraffinschnitten aller vier Fälle mit IM nachweisen. Die zahlreichen EBER-positiven Zellen waren kleine bis mittelgroße Lymphozyten, die sich in den Interfollikularzonen aller Fälle ansiedelten. In drei Fällen waren sie auch im Keimzentrum in geringerer Anzahl zu finden. Eine Vorstellung über die Verteilung der EBER-positiven Zellen in der IM gibt die Abbildung 3.1.



**Abbildung 3.1. EBER in situ-Hybridisierung in einem Fall von Infektiöser Mononukleose (Tonsille).**

- a Überblick über die Verteilung der EBER-positiven Zellen im Interfollikularraum.
- b Keimzentrum mit EBER-positiven Zellen.
- d Vergrößerung des Ausschnittes c

Mit Hilfe der Immunhistologie waren in allen vier Fällen zahlreiche LMP-1-positive Zellen in der Interfollikularzone zu erkennen. In zwei Fällen befanden sich LMP-1-positive Zellen auch im Keimzentrum. EBNA-2-positive Zellen wurden in allen vier Fällen in der Interfollikularzone mit Hilfe der Immunhistologie identifiziert. Sehr vereinzelt zeigten sich EBNA-2-positive Zellen im Keimzentrum eines Falles. Doppelmarkierungsexperimente zeigten, dass etwa 5% der EBV-positiven Zellen beide Proteine exprimierten (siehe Abbildung 3.2.).



**Abbildung 3.2. Immunhistologische Darstellung von LMP-1-, EBNA-2- und doppelpositiven Zellen in der Infektiösen Mononukleose.**

a sowohl LMP-1- (rot), EBNA-2-positive (braun) als auch doppelmarkierte Zellen (Bsp. Pfeil) sind zu erkennen  
b Ausschnittsvergrößerung (40-fach) von a. Die eingeschränkte Morphologie erklärt sich durch die Verwendung von Gefriermaterial.

### 3.2. Isolierung, Amplifikation und Sequenzierung von Epstein-Barr Virus infizierten Einzelzellen

Von vier Fällen mit IM wurden insgesamt 843 Zellen isoliert: 400 waren LMP-1-positiv, 410 Zellen waren EBNA-2-positiv und 33 Zellen waren sowohl LMP-1- als auch EBNA-2-positiv.

Die IgH-Genumlagerungen von 175 Zellen ließen sich amplifizieren und sequenzieren. Von 175 amplifizierten und sequenzierten IgH-Genen stammten 110 aus LMP-1-positiven Zellen, 56 aus EBNA-2-positiven und 9 aus doppelmarkierten Zellen. Von den 175 Sequenzen der IgH-Gene waren 139 der dazugehörigen Zellen in der Interfollikularzone isoliert worden, 32 Zellen im Keimzentrum, zwei IgH-Sequenzen entstammten Zellen aus der Mantelzone.

Eine Übersicht über die isolierten, amplifizierten und sequenzierten EBV-positiven Zellen gibt die Tabelle 3.1.

**Tabelle 3.1. Anzahl der isolierten und sequenzierten EBV-positiven B-Zellen und deren Verteilung in der Lymphknoten- bzw. Tonsillenarchitektur**

Untersuchung		Lokalisation der isolierten, amplifizierten und sequenzierten Zellen				Puffer
nachgewiesenes Protein	Anzahl der isolierten Zellen	Anzahl der Sequenzen (gesamt)	Interfollikularzone	Keimzentrum	Mantelzone	
LMP-1	400	110	77	30	2	1
EBNA-2	410	56	53	2	0	1
DM	33	9	9	0	0	0
<b>Alle</b>	<b>843</b>	<b>175</b>	<b>139</b>	<b>32</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

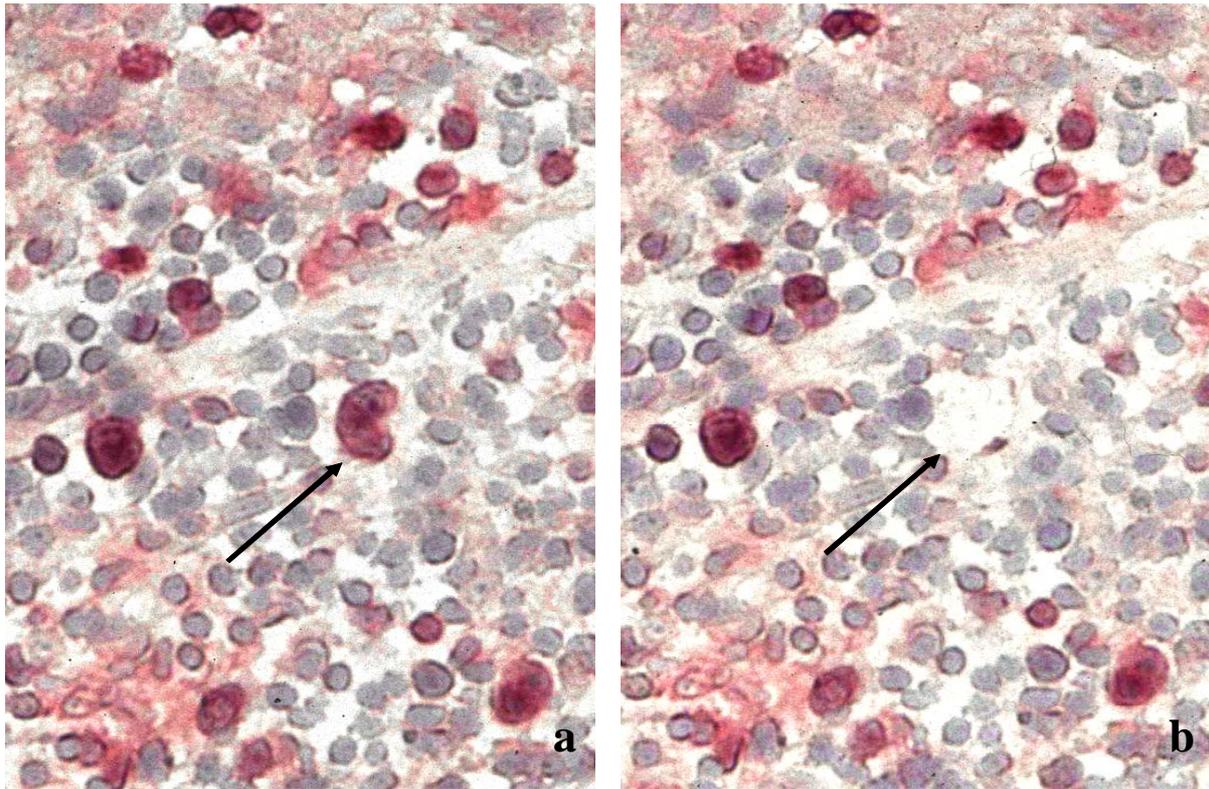
LMP-1 : *latent membran protein 1*

EBNA-2: *Epstein-Barr nuclear antigen 2*

DM: doppelmarkierte Zellen, diese Zellen exprimierten sowohl LMP-1 als auch EBNA-2

### 3.3. Kontrollen

Zur Dokumentation der isolierten Zellen wurden vor und nach der Isolierung jeder Zelle Fotos erstellt. Diese wurden von einem erfahrenen Morphologen beurteilt. Nur solche Zellen, deren Nachbarzellen bei der Isolierung unversehrt geblieben waren, wurden für die weitere Untersuchung mit der PCR herangezogen. Die Abbildung 3.3. zeigt eine EBNA-2-positive Zelle sowie das umgebende Gewebe vor und nach dem Isolierungsvorgang.



**Abbildung 3.3. Fotodokumentation einer Zelle vor und nach der Isolierung**

a: EBNA-2-positive Zelle vor der Isolierung. b: Gewebe nach der Isolierung der EBNA-2-positiven Zelle, die Unversehrtheit der angrenzenden Zellen nach dem „Pickvorgang“ ist gut zu erkennen. Die Übersichtung des Schnittes durch Puffer erklärt die relativ eingeschränkte Bildqualität.

Die Isolierung der Zellen wurde von pufferüberschichteten immungefärbten Gewebeschnitten vorgenommen. Die Zellen wurden nach der Isolierung einer hoch sensitiven „*nested-primer*“ PCR unterworfen, die in der Lage ist, eine einzelne Kopie (*single copy*) eines IgH-Gens zu amplifizieren. Diese hoch sensitive PCR ist für falsch positive Ergebnisse sehr empfindlich. Um sicher sein zu können, dass ein positives Ergebnis der PCR auch tatsächlich die Sequenz aus der dazugehörigen isolierten Zelle darstellte, wurden zahlreiche Negativkontrollen benötigt. Diese wurden aus dem Puffer, der den Schnitt während der Isolierung überschichtete, gewonnen. Nach jeder isolierten Zelle wurde eine Negativkontrolle aus dem Puffer entnommen. Knapp 900 Pufferproben wurden gewonnen und der sensitiven IgH-PCR unterzogen. Lediglich in zwei dieser Negativkontrollen zeigte sich ein IgH-spezifisches PCR-Produkt (0,2%), wahrscheinlich verursacht durch in Puffer freigesetzte DNA. Diese geringe Kontaminationsrate belegt die Zuverlässigkeit der hier durchgeführten Untersuchungen.

### 3.4. VH Familienbenutzung in Epstein-Barr Virus infizierten B-Zellen

Durch den Vergleich der ermittelten Sequenz der IgH-Gene der isolierten Zellen mit den Keimbahnsequenzen (gesammelt in den Datenbanken VBASE [*catalogue of human V gene segments and alleles*]) (siehe Kap.2.7.) konnte das umgelagerte VH-Familien-Segment bestimmt werden. Die Häufigkeit der umgelagerten VH-Familien-Segmente ist in Tabelle 3.2. zusammengefaßt.

**Tabelle 3.2. Häufigkeit der umgelagerten VH-Familien in EBV-positiven B-Zellen**

nachgewiesenes Protein	Anzahl der Sequenzen (gesamt)	Häufigkeit der umgelagerten VH-Familie											
		VH1		VH2		VH3		VH4		VH5		VH6	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>LMP-1</b>	110	1	1	2	2	76	69	25	22	5	5	1	1
<b>EBNA-2</b>	56	1	2	2	4	42	75	8	14	3	5	0	0
<b>DM</b>	9	1	11	0	0	4	45	3	33	1	11	0	0
<b>Alle</b>	<b>175</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>122</b>	<b>70</b>	<b>36</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

LMP-1 : *latent membran protein 1*

EBNA-2: *Epstein-Barr nuclear antigen 2*

DM: doppelmarkierte Zellen, diese Zellen exprimierten sowohl LMP-1 als auch EBNA-2

### 3.5. Somatische Mutationen in Epstein-Barr Virus infizierten B-Zellen

Zur Identifizierung somatischer Mutationen in den umgelagerten IgH-Genen der isolierten EBV-positiven Zellen wurde das VH-Keimbahnsegment mit der besten Übereinstimmung mit der umgelagerten VH-Sequenz der isolierten Zelle verglichen.

Von den 175 Zellen trugen 77 Zellen (44%) null bis drei Mutationen. Null bis drei Abweichungen der Sequenzen von der Keimbahnkonfiguration mit der besten Übereinstimmung wurden aufgrund von Polymorphismen in den verschiedenen VH-Familien nicht als somatische Mutationen beurteilt. Diese Zellen wurden daher als naive B-Zellen gewertet.

92 der 175 Zellen (53%) trugen in ihren VH-Genumlagerungen vier oder mehr Mutationen. Unter diesen mutierten Zellen ließen sich zwei Gruppen ausmachen.

- Die IgH-Umlagerungen der ersten Gruppe (etwa zwei Drittel der mutierten Zellen; 59 von 92 mutierten Zellen) trugen vier bis zehn Mutationen.

- Die IgH-Umlagerungen der zweiten Gruppe (etwa ein Drittel der mutierten Zellen; 33 von 92 Zellen) waren mit mehr als zehn Mutationen stark mutiert.

Die Mutationsanzahl konnte in den verbleibenden sechs Fällen nicht exakt bestimmt werden, da diese Zellen Deletionen oder Insertionen in ihren Sequenzen trugen.

Die Aufschlüsselung der Mutationsmuster in den LMP-1- und EBNA-2-positiven Zellen zeigte folgende Ergebnisse:

- Von den 110 LMP-1-positiven Zellen waren 48 (43,6%) unmutiert. 57 von 110 LMP-1-positiven Zellen (51%) trugen mehr als vier Mutationen in ihren IgH-Genen.
- Unter den EBNA-2-positiven Zellen waren 25 von 56 (44,6%) unmutiert. Die Mehrzahl, 30 von 56 (53,6%) der EBNA-2-positiven Zellen hatte mehr als vier Mutationen in ihren IgH-Genen.

Die durchschnittliche Gesamtmutationsrate aller 175 sequenzierten Zellen betrug 4,0%. Die Mutationsraten der einzelnen Zellpopulationen betrug bei den LMP-1-positiven Zellen 4,1%, bei den EBNA-2-positiven Zellen 3,9% und bei den doppelmarkierten Zellen 4,1%. Zwischen den drei Zellpopulationen bestanden deshalb keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Mutationsraten (die einzelnen Mutationsraten können der Tabelle 3.3. entnommen werden).

Die Gesamtmutationsrate in den vier Fällen variierte zwischen 0,8-6,3%, die Mutationsrate der LMP-1-positiven Zellen von 0,8-6,4% und die der EBNA-2-positiven Zellen von 0,2-6,0%.

**Tabelle 3.3. Anzahl der Mutationen und Mittelwerte der Mutationsraten in EBV-positiven Zellen**

nachgewiesenes Protein	Anzahl der Sequenzen (gesamt)	Anzahl der Mutationen				Mutationsrate (%) <sup>2</sup>
		0-3	4-10	>10	nicht analysierbar <sup>1</sup>	
LMP-1	110	48	36	21	5	4,1
EBNA-2	56	25	19	11	1	3,9
DM	9	4	4	1	0	4,1
Alle	175	77	59	33	6	4,0

LMP-1 : *latent membran protein 1*

EBNA-2: *Epstein-Barr nuclear antigen 2*

DM: doppelmarkierte Zellen, diese Zellen exprimierten sowohl LMP-1 als auch EBNA-2

<sup>1</sup> nicht analysierbare Mutationszahl aufgrund von Deletionen/Insertionen in fünf Fällen und Leserasterverschiebung in einem Fall

<sup>2</sup> Mittelwerte der Mutationsraten der betreffenden Subpopulation

### 3.6. Kodierungskapazität und Antigenselektion in Epstein-Barr Virus infizierten B-Zellen

Zur Prüfung der Kodierungsfähigkeit mussten die IgH-Genumlagerungen auf Stopkodons, Deletionen oder Insertionen und auf Leserasterverschiebungen untersucht werden. IgH-Genumlagerungen mit intakter Kodierungsfähigkeit wurden auf Anzeichen einer Antigenselektion überprüft (siehe Kap 2.7.). Eine Übersicht über die Anzahl EBV-infizierter Zellen mit intakter Kodierungsfähigkeit bzw. die Ursachen für den Verlust der intakten Kodierungsfähigkeit sowie die Anzahl antigenselektierter Zellen gibt die Tabelle 3.4.

**Tabelle 3.4. Kodierungsfähigkeit und Antigenselektion EBV-positiver Zellen**

nachgewiesenes Protein	Anzahl der Sequenzen (gesamt)	Antigenselektion in den funktional umgelagerten Zellen			Ursachen und deren Häufigkeit für nicht funktionale Umlagerungen		
		unmutiert <sup>1</sup>	Ja	Nein	Stopkodon <sup>2</sup>	Leserasterverschiebung <sup>3</sup>	Stopkodon durch Leserasterverschiebung <sup>4</sup>
<b>LMP-1</b>	110	35	22	26	12	10	5
<b>EBNA-2</b>	56	23	18	11	1	2	1
<b>DM</b>	9	3	2	3	0	0	1
<b>Alle</b>	<b>175</b>	<b>61</b>	<b>42</b>	<b>40</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>7</b>

LMP-1: *latent membran protein 1*

EBNA-2: *Epstein-Barr nuclear antigen 2*

DM: doppelmarkierte Zellen, diese Zellen exprimierten sowohl LMP-1 als auch EBNA-2

<sup>1</sup> keine somatischen Mutationen

<sup>2</sup> Stopkodons, die den Abbruch der Proteinsynthese zur Folge haben

<sup>3</sup> Leserasterverschiebungen, die das Basen-Triplet verschieben

<sup>4</sup> Leserasterverschiebungen, die ein Stopkodon bewirken

In der Mehrzahl der Fälle (82%) lag intakte Kodierungsfähigkeit vor (143 von allen 175 Zellen), während 18% (32 von allen 175 Zellen) einen Verlust der Kodierungsfähigkeit aufwiesen. Beim Vergleich der beiden Zellpopulationen, LMP-1- versus EBNA-2-positiver Zellen, stellte sich heraus, dass der Verlust der Kodierungsfähigkeit (durch Stopkodons oder Leserasterverschiebungen) häufiger unter den LMP-1- als unter den EBNA-2-positiven Zellen auftrat. Dies war bei 25% (27 von 110 LMP-1-positiven Zellen) der LMP-1-positiven Zellen der Fall. Unter den EBNA-2-positiven Zellen hingegen waren nur 7% (4 von 56 EBNA-2-positiven Zellen) durch Stopkodons oder Leserasterverschiebungen funktionslos geworden (siehe Tabelle 3.4.).

Bei 143 Zellen lag intakte Kodierungsfähigkeit vor. Unter diesen Zellen fanden sich 61 Zellen, die weniger als vier Mutationen trugen. Die Antigenselektion dieser Zellen konnte aufgrund der geringen Mutationsanzahl nicht analysiert werden. Diese unmutierten Zellen wurden als naive B-Lymphozyten klassifiziert.

Unter den verbleibenden 82 funktionalen und mutierten Zellen ließen sich hinsichtlich der Antigenselektion zwei Gruppen ausmachen:

Etwa die Hälfte, 42 der verbleibenden 82 Zellen war antigenselektiert. Von den 42 Zellen waren 22 LMP-1-, 18 EBNA-2-positiv und zwei Zellen exprimierten sowohl LMP-1 als auch EBNA-2. Das entspricht einer Antigenselektion von 20% unter den LMP-1-positiven Zellen und 32% unter den EBNA-2-positiven Zellen. Diese Zellen wurden aufgrund der somatischen Mutationen und den Anzeichen einer Antigenselektion als post-Keimzentrumszellen klassifiziert.

Die zweite Hälfte, 40 der 82 mutierten und funktionalen Zellen stellte eine interessante besondere Zellpopulation dar: 40 Zellen mit intakter Kodierungsfähigkeit zeigten somatische Mutationen aber keine Anzeichen einer Antigenselektion. Davon waren 26 LMP-1-positiv-, elf EBNA-2-positiv Zellen, sowie drei doppelmarkierte Zellen. (Dies entsprach einem Prozentsatz von 24% aller LMP-1-positiven Zellen, 20% aller EBNA-2-positiven Zellen und 30% aller doppelmarkierten Zellen). Aufgrund der intakten Kodierungskapazität und den vorhandenen somatischen Mutationen wurden diese Zellen den post-Keimzentrumszellen zugeordnet, allerdings fehlten die zu erwartenden Anzeichen einer Antigenselektion.

**Tabelle 3.5. Mutationsraten und Anzahl der Mutationen in den IgH-Genen der nicht antigenselektierten EBV-infizierten Postkeimzentrumszellen**

nachgewiesenes Protein	Anzahl	Anzahl der Mutationen		Mutationsrate % <sup>1</sup>
		4 bis 10	>10	
<b>LMP-1</b>	26	18	8	6,85
<b>EBNA-2</b>	11	7	4	6,8
<b>DM</b>	3	2	1	7,23
<b>Alle</b>	<b>40</b>	<b>27</b>	<b>13</b>	<b>6,86</b>

LMP-1 : *latent membran protein 1*

EBNA-2: *Epstein-Barr nuclear antigen 2*

DM: doppelmarkierte Zellen, diese Zellen exprimierten sowohl LMP-1 als auch EBNA-2

<sup>1</sup> gemittelte Mutationsraten der betreffenden Subpopulation

### **3.7. Klonalität der Einzelzellen**

Um die Frage zu klären, ob die EBV-infizierten Zellen aktiv an einer Keimzentrumsreaktion teilnehmen, wurden die isolierten und sequenzierten EBV-infizierten Zellen sämtlich auf Klonalität untersucht.

In allen vier Fällen fanden sich klonale Zellen, die sich in insgesamt 14 verschiedene Klone aufteilten. Ihre Größe variierte zwischen zwei und 16 beteiligten Zellen: es fanden sich sechs Klone mit zwei, vier Klone mit drei und je ein Klon mit vier, fünf, sieben und 16 beteiligten Zellen.

Diese 14 Klone ließen sich anhand der intraklonalen Diversität in zwei Gruppen einteilen: in der ersten Gruppe konnte keine intraklonale Diversität bei identischen klonalen Zellen festgestellt werden, in der zweiten Gruppe ließ sich intraklonale Diversität mit Differenzen der IgH-Umlagerungen durch Austausch einzelner Basen nachweisen.

In der ersten Gruppe waren die klonalen Zellen identisch, d.h. sie zeigten keine intraklonale Diversität. Zu dieser Gruppe gehörten elf Klone. Ihre Größe reichte von zwei bis fünf beteiligten Zellen, die bis auf zwei Keimzentrumzellen, alle im Interfollikularraum lokalisiert waren. Die Anzahl der beteiligten Zellen, die Lokalisation, Mutationsfrequenz und die Antigenselektion bzw. Funktionalität der IgH-Gene der beteiligten Zellen können der Tabelle 3.6. entnommen werden.

**Tabelle 3.6. Lokalisation, Funktionalität und Antigenselektion der klonalen EBV-positiven Zellen ohne intraklonale Diversität**

Klon	Zahl der klonalen Zellen	Lokalisation	Zahl der Mutationen in den IgH-Genen der klonalen Zellen	Funktionalität	Antigenselektion
1	5	IF	7	funktional	Nein
2	3	IF	5	funktional	Ja
3	4	IF	5	Stopkodon	nd <sup>1</sup>
4	2	IF	20	funktional	Ja
5	3	IF	3	Stopkodon	nd
6	2	IF	9	funktional	Ja
7	2	IF	7	funktional	Nein
8	2	GC	2	funktional	nd
9	2	IF	36	funktional	Nein
10	2	IF	7	funktional	Nein
11	3	IF	4	funktional	Ja

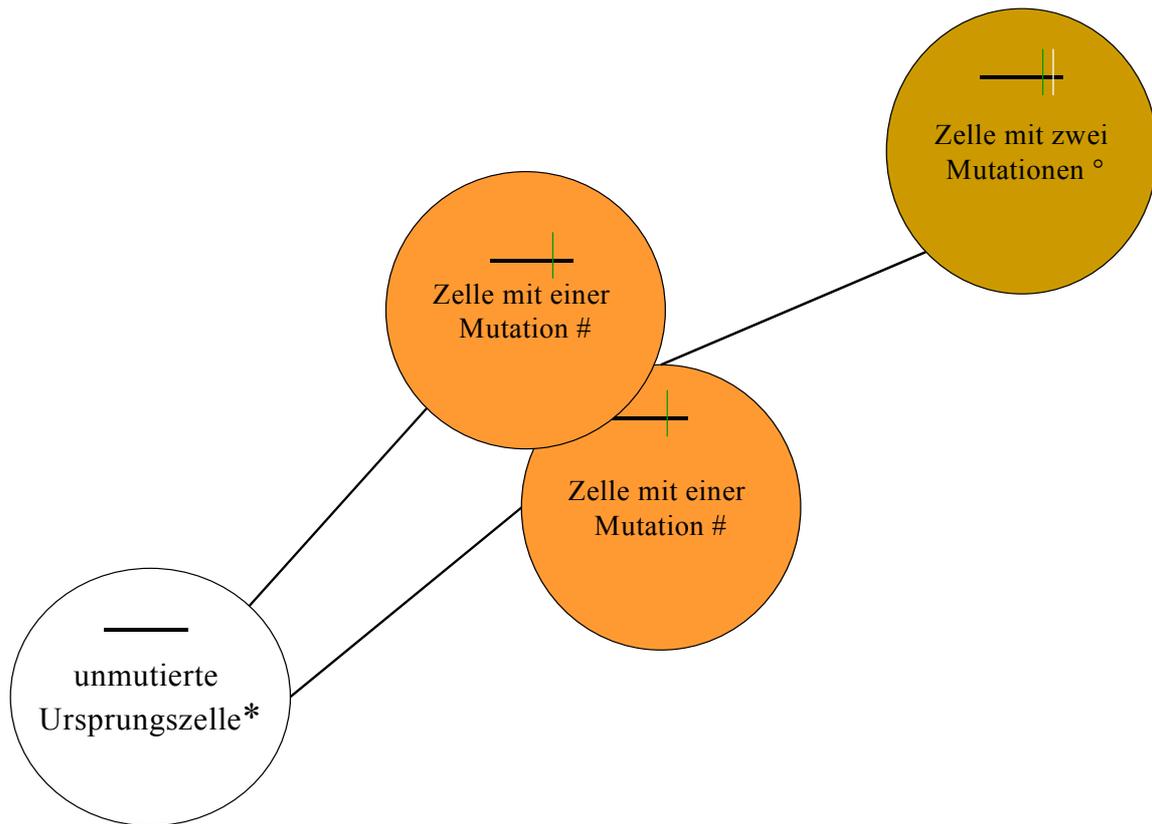
IF: Interfollikularzone

Keimzentrum: GC= *germinal center*

<sup>1</sup> nd klassifiziert Zellen mit nicht definierbarer Antigenselektion aufgrund zu geringer Mutationszahl oder Stopkodons.

Die zweite Gruppe bestand aus drei Klonen, deren IgH-Umlagerungen sich durch den Austausch einzelner Basen unterschied, so dass die beteiligten Zellen intraklonale Diversität zeigten.

Der erste der drei Klone bestand aus drei Zellen. Alle drei Zellen waren aus dem Interfollikularraum isoliert worden. Zwei dieser drei Zellen waren identisch mit einer gemeinsamen Mutation in ihren IgH-Sequenzen. Die dritte Zelle dieses Klons trug zwei Mutationen, zum einen die gleiche Mutation wie die ersten beiden Zellen dieses Klons sowie eine weitere. Die Sequenzen der Zellen dieses Klons erwiesen sich als funktional, aber aufgrund der geringen Mutationsanzahl wurden sie hinsichtlich der Antigenselektion als nicht definierbar klassifiziert. Abbildung 3.4. verdeutlicht den "verwandtschaftlichen" Zusammenhang der drei Zellen mit intraklonaler Diversität.



#### Abbildung 3.4. Stammbaum der drei klonalen Zellen mit intraklonaler Diversität

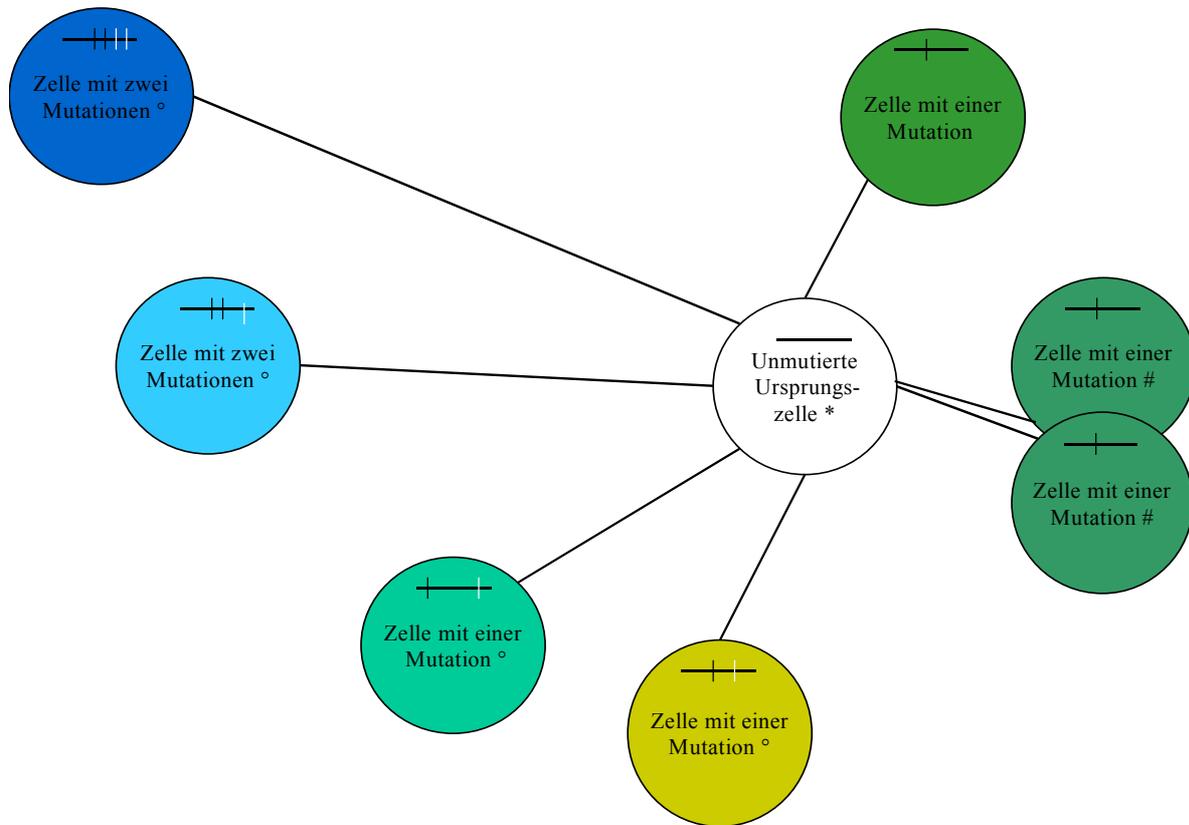
Die mit \* markierte, naive, unmutierte Ursprungszelle konnte nicht identifiziert werden. Der schwarze Querbalken symbolisiert das umgelagerte Immunglobulinschwerkettengen.

Die mit # markierten Zellen sind identisch. Sie tragen jeweils die gleiche Mutation in ihrem umgelagerten Immunglobulinschwerkettengen (symbolisiert durch einen grünen senkrechten Strich durch den schwarzen Querbalken)

Die mit ° markierte Zelle trägt zwei Mutationen. Zum einen die gleiche Mutation wie ihre Vorläuferzellen (grün markierter senkrechter Strich), zum anderen eine weitere Mutation (symbolisiert durch den weißen senkrechten Strich durch den schwarzen Querbalken).

Der zweite Klon mit intraklonaler Diversität setzte sich aus sieben Zellen zusammen. Sechs Zellen waren aus dem Keimzentrum und eine Zelle war aus der Mantelzone isoliert worden. Zwei der sieben Zellen waren identisch mit einer gleichen Mutation. Eine weitere Zelle war ebenfalls einfach mutiert, die Mutation war allerdings eine andere als die der beiden identischen Zellen. Zwei Zellen trugen jeweils zwei unterschiedliche Mutationen. Jede dieser beiden Zellen hatte je eine Mutation in der CDR2-Region und je eine Mutation in der NDN-Region. Eine weitere zu diesem Klon gehörende Zelle wies drei Mutationen auf, zwei in der FW3- und eine in der NDN-Region. Die am stärksten mutierte Zelle dieses Klons trug vier Mutationen, eine Mutation jeweils in der CDR2- und FW3- und zwei in der NDN-Region. Die sieben Sequenzen dieses Klons waren alle funktional und aufgrund der geringen Mutationsanzahl hinsichtlich der Antigenselektion nicht analysierbar. Die zu diesem Klon gehörige unmutierte naive B-Zelle konnte nicht identifiziert werden. Die

"verwandtschaftlichen" Zusammenhänge der Zellen des zweiten Klons können der Abbildung 3.5. entnommen werden.



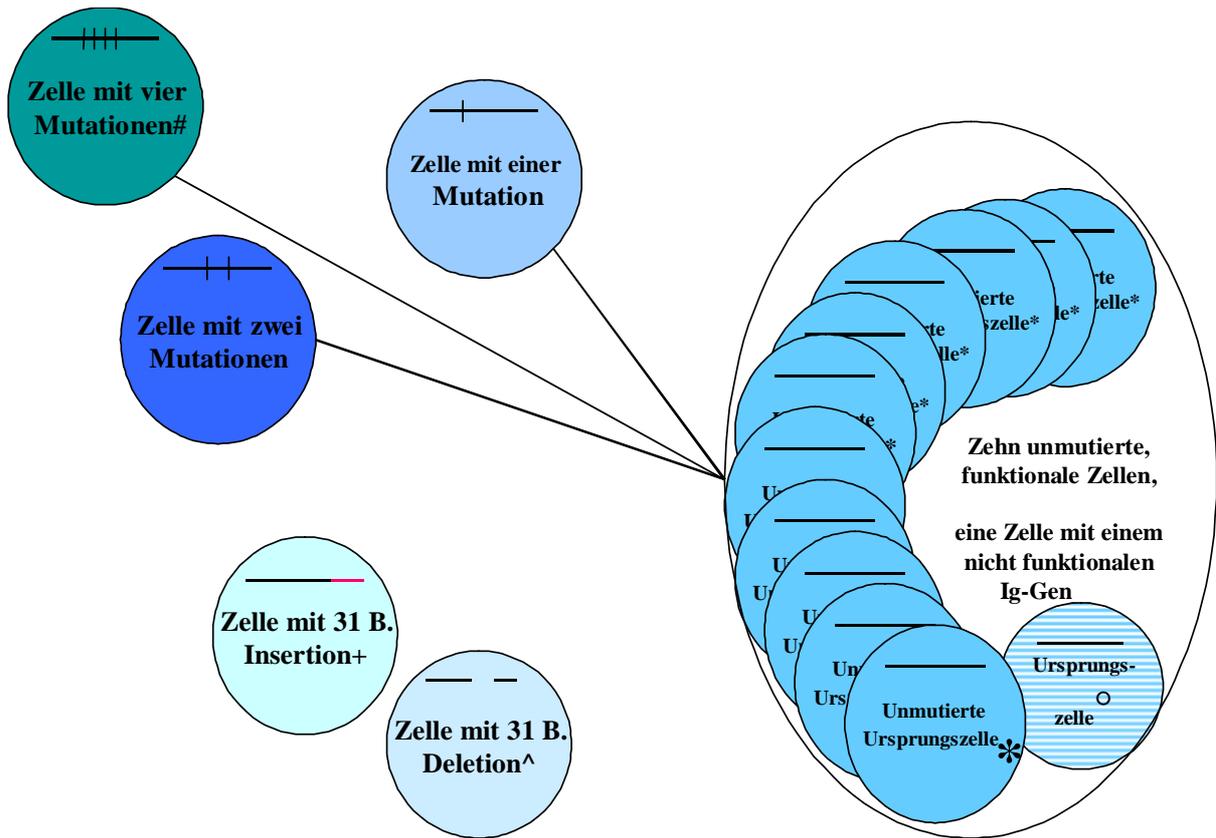
**Abbildung 3.5. Stammbaum der sieben klonalen Zellen mit intraklonaler Diversität**

Die mit \* markierte, naive, unmutierte Ursprungszelle konnte nicht identifiziert werden. Der schwarze Querbalken symbolisiert das umgelagerte Immunglobulinschwerkettengen.

Die mit # markierten Zellen waren identisch. Sie trugen jeweils die gleiche Mutation in ihrem umgelagerten Immunglobulinschwerkettengen (symbolisiert durch einen grünen senkrechten Strich durch den schwarzen Querbalken).

Bei den mit ° markierten Zellen handelte es sich um Zellen, die zusätzlich zu den angegebenen Mutationen, Mutationen in der NDN-Region trugen. Die Mutationen in den CDR2 und FW3 Bereichen sind durch schwarze senkrechte Striche durch den Querbalken symbolisiert, die Mutationen, die im NDN-Bereich lagen sind durch weiße Striche durch den schwarzen Querbalken symbolisiert.

Der dritte Klon aus Zellen mit intraklonaler Diversität bestand aus 16 Zellen. 14 dieser Zellen wurden aus dem Keimzentrum und jeweils eine aus der Mantelzone und dem Interfollikularraum isoliert. Elf Zellen dieses Klons trugen keine Mutationen. In jeweils einer Zelle dieses Klons ließen sich eine, zwei bzw. vier unterschiedliche Mutationen nachweisen. Vier der Zellen dieses Klons wiesen ein funktionsloses IgH-Gen auf: zwei Zellen wiesen eine Deletion und eine Insertion von 31 Basen auf, in den zwei anderen Zellen fanden sich Stopkodons. Antigenselektion konnte nicht analysiert werden, da die Mutationsanzahl zu gering war. Die Abbildung 3.6. zeigt den Stammbaum der Zellen des dritten Klons mit intraklonaler Diversität.



### Abbildung 3.6. Stammbaum der 16 klonalen Zellen mit intraklonaler Diversität

Die mit \* markierte Zelle stellte die Ursprungszelle dar. Es lagen zehn Kopien dieser Zelle vor. Der schwarze Querbalken symbolisiert das umgelagerte Immunglobulinschwerkettengen.

Die mit ° markierte Zelle stellte ebenfalls eine Kopie der unmutierten Ursprungszelle dar, sie wies jedoch ein Stopkodon auf, weshalb das IgH-Gen der Zelle für keinen funktionstüchtigen Antikörper kodierte.

Die mit # markierte Zelle trug vier Mutationen in ihren IgH-Umlagerungen (symbolisiert durch vier senkrechte Striche durch den schwarzen Querbalken). Diese Sequenz kodierte für einen nicht funktionalen Antikörper, da sie ein Stopkodon in ihren IgH-Genen trug.

+ Diese Zelle wies eine defekte Kodierungskapazität auf, da eine Insertion von 31 Basenpaaren zur Leserasterverschiebung führte (die Deletion ist durch eine Lücke in dem das IgH-Gen symbolisierenden schwarzen Querbalken dargestellt).

^ Diese Zelle wies eine defekte Kodierungskapazität auf, da eine Deletion von 31 Basenpaaren zur Leserasterverschiebung führte (die Insertion ist durch einen zusätzlichen roten Querbalken symbolisiert).