

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Charakterisierung der Auswirkungen der *Cd79b* p.Y195H-Mutation im DLBCL-Mausmodell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Pauline Pfeiffer
aus Troisdorf

promoviert am 14. Juli 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G.R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. H.C. Reinhardt
2. Gutachter: Professor Dr. med. K. Hübel

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Universitätsprofessor Dr. med. Hans Christian Reinhardt
Dr. rer. nat. Gero Knittel

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. rer. nat. Gero Knittel und Frau Dr. med. Ruth Flümann durchgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 08.03.2026

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während der Promotionszeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Michael Hallek für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Ein aufrichtiger Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Hans Christian Reinhardt, für seine Unterstützung, seine wissenschaftliche Expertise und seine tagtägliche Begeisterung für das Projekt.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Gero Knittel für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Seine fachliche Expertise, seine kontinuierliche und geduldige Unterstützung sowie die zahlreichen konstruktiven Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Ruth Flümann für ihre wertvolle Unterstützung, die enge Zusammenarbeit und die hilfreichen Anregungen während der experimentellen Arbeiten.

Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung und den kollegialen Austausch, der die Promotionszeit für mich besonders wertvoll gemacht hat.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Geduld, ihre Motivation und ihre stetige Unterstützung bedanken. Ihre Unterstützung hat mich durch viele Phasen dieser Arbeit getragen und ist für mich von unschätzbarem Wert.

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	12
2. EINLEITUNG	14
2.1. B Zell-Entwicklung	14
2.2. Grundlagen der Tumorentstehung	18
2.3. Diffus großzellige B Zell-Lymphome - Definition	20
2.4. Einteilung in ABC-DLBCL und GCB-DLBCL	21
2.5. Genomanalysen der diffus großzelligen B Zell-Lymphome	21
2.6. Therapie der diffus großzelligen B Zell-Lymphome	22
2.7. NF κ B-Signaling in MCD/C5-DLBCL	24
2.8. <i>MYD88</i> -Mutationen in MCD/C5-DLBCL	24
2.9. <i>CD79B</i> -Mutationen in MCD/C5-DLBCL	25
2.10. <i>BCL2</i> -Aberrationen in MCD/C5-DLBCL	27
2.11. Mausmodell von MCD/C5-DLBCL	27
2.12. Fragestellung und Ziel der Arbeit	28
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1. Material	30
3.1.1. Laborprodukte	30
3.1.2. Puffer	31
3.1.3. Kits	32
3.1.4. Zellkultur	32
3.1.5. Primäre Antikörper	32
3.1.6. Sekundäre Antikörper	33

3.1.7.	Enzyme	34
3.2.	Methoden	34
3.2.1.	Tierversuche an Mausmodellen	34
3.2.2.	Serial Sacrifices	37
3.2.3.	MRT-Bildgebung	37
3.2.4.	Zelllinien	38
3.2.5.	Sanger-Sequenzierung	38
3.2.6.	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	39
3.2.7.	Immunhistochemie	40
3.2.8.	B Zell-Rezeptor-Internalisierung	40
3.2.9.	FACS (Fluorescence activated cell sorting)	41
3.2.10.	Gating-Strategie	42
3.2.11.	Datenanalyse	42
4.	ERGEBNISSE	43
4.1.	Validierung der Allel-Funktionalität	43
4.2.	Akute Auswirkungen der <i>Cd79b</i> -Mutation auf die B Zell-Rezeptor-Internalisierung	44
4.3.	Chronische Auswirkungen der <i>Cd79b</i> -Mutation	46
4.3.1.	Postmortale sowie bildmorphologische Reihenuntersuchungen der Organgewichte und -volumina	46
4.4.	Keimzentrums-Quantifizierung mithilfe von Immunhistochemie	51
4.5.	Effekte der <i>Cd79b</i> -Mutation auf die B Zell-Entwicklung	54
4.5.1.	Gating-Strategie	54
4.5.2.	Quantifizierung der B Zell-Entwicklungsstadien	57
4.6.	Serum-Immunglobulin-Spiegel	60
4.7.	Tumor-Charakterisierung	61
5.	DISKUSSION	63
5.1.	Einleitung und Überblick	63
5.2.	Diskussion der Hauptergebnisse	63
5.2.1.	Die <i>Cd79b</i> p.Y195H-Mutation beeinflusst die BCR-Internalisierung und -Signalgebung	63
5.2.2.	Veränderungen in der B Zell-Entwicklung und Organmorphologie	64
5.2.3.	Immunglobulinspiegel als funktioneller Surrogatparameter	64

5.2.4.	Tumorphänotyp der Tiere mit der <i>Cd79b</i> p.Y195H-Mutation	64
5.3.	Limitationen der Arbeit	65
5.4.	Aktueller molekularer Kontext der <i>CD79B</i> -Achse	65
5.5.	Klinische und wissenschaftliche Relevanz der Ergebnisse	65
5.6.	Ausblick und Perspektiven für Folgeprojekte	66
5.7.	Fazit	67
6.	LITERATURVERZEICHNIS	68
7.	ANHANG	73
7.1.	Abbildungsverzeichnis	73
7.2.	Tabellenverzeichnis	74

Abkürzungsverzeichnis

(ABC)-DLBCL	Activated b cell-like-DLBCL
AKT	Serine-threonine protein kinase AKT
B220	Pan B-cell marker in mice
BAC	Bacterial artificial chromosome
BC	<i>Rosa26^{BCL2};Cd19^{Cre}</i> mouse model
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-6	B-cell lymphoma 6
BCL-10	B-cell lymphoma 10
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BCR	B-cell antigen receptor
BDC	<i>Rosa26^{BCL2};Cd19^{Cre}</i> mouse model with an additional <i>Cd79b</i> allele knock-in
BER	Base excision repair
BLK	Tyrosine-protein kinase BLK
BLNK	B-cell linker protein
BSA	Bovine serum albumin
BTK	Bruton's Tyrosin Kinase
C	Wildtype mouse mode
°C	Degree Celsius
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CBM	CARD11-BCL10-MALT1
CCG	Cologne Center for Genomics
CD4	Cluster of differentiation 4
CD21	Cluster of differentiation 21
CD23	Cluster of differentiation 23
CD45	Cluster of differentiation 45
CD79	Cluster of differentiation 79
CD93	Cluster of differentiation 93
CD138	Cluster of differentiation 138
CD40L	CD40 ligand
cFLIP	Cellular FLICE-like inhibitory protein
cIAP 1/2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2
CMV	Cytomegalovirus

Cre	Cyclization recombination enzyme
CREBBP	CREB-binding protein
D	Diversity
DC	<i>Cd79b</i> ^{Y195H} ; <i>Cd19</i> ^{Cre} mouse model
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
1x10 ⁶	Million
EBF1	Early B-cell factor 1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FRT	Flippase recognition target
FS INT	Forward scatter integral
FYN	Tyrosine kinase FYN
g	Force of gravity
GC	Germinal center
(GCB)-DLBCL	Germinal center B cell-like-DLBCL
HE	Hematoxylin and eosin
HEPES	Hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid
H-Kette	Schwere Kette
HR	Homologous recombination
Ig	Immunoglobulins
I κ B	Inhibitor of NF κ B
IKK	Inhibitor of NF κ B kinase
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
J	Joining
JAK	Janus kinase
kb	Kilobase
KMT2D	Lysine Methyltransferase 2D

LAT2	Linker for activation of T cells family member 2
loxP	Locus of X-over P1
LYN	Tyrosine kinase LYN
M	Mole
MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MBC	<i>Myd88</i> ^{p.L252P} ; <i>Rosa26</i> ^{BCL2} ; <i>Cd19</i> ^{Cre} mouse model
MBDC	MBC mouse model with an additional <i>Cd79b</i> allele knock- in
MC	<i>Myd88</i> ^{p.L252P} ; <i>Cd19</i> ^{Cre} mouse model
MDC	MC mouse model with an additional <i>Cd79b</i> allele knock- in
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minutes
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMR	Mismatch repair
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MYD88	Myeloid differentiation factor 88
NEHJ	Nonhomologous end-joining
NER	Nucleotide excision repair
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B- cells
NLS	NF κ B's nuclear localization signal
NOS	Not otherwise specified
NOTCH 1/2	Neurogenic locus notch homolog protein 1/2
p50	Protein 50
p52	Protein 52
p100	Protein 100
pA	Polyadenylation signal
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PAX5	Paired box protein 5
pH	Potential of hydrogen

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC-β	Protein kinase C-beta
PNA	Peanut agglutinin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
<i>Rag1/2</i>	Recombination activating gene 1/2
RAS	Rat sarcoma
Rel	Transcription factor Rel
Rosa26	Reverse oriented splice acceptor, clone 26
RPMI	Roswell park memorial institute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFK	Tyrosine kinase SFK
SS INT	Side scatter integral
STAT	Signal transducer and activator of transcription proteins
SYK	Spleen tyrosine kinase
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TP53	Tumor protein 53
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
V	Variable
WT	Wildtype
μg	Microgramm
μl	Microliter
μm	Micrometer
%	Percentage

1. Zusammenfassung

Das diffus großzellige B Zell-Lymphom (DLBCL) ist eine biologisch und klinisch heterogene Erkrankung, deren Pathogenese maßgeblich durch genetische Veränderungen in zentralen Signalwegen der B Zelle bestimmt wird. Insbesondere der MCD/C5-Subtyp ist durch eine hohe Frequenz aktivierender *MYD88*-Mutationen sowie anti-apoptotischer *BCL2*-Aberrationen gekennzeichnet. Zusätzlich finden sich in diesem Subtyp häufig Mutationen in *CD79B*, einer zentralen Komponente des B Zell-Rezeptor (BCR), die mit einer chronisch aktiven BCR-Signalgebung assoziiert ist. Ziel dieser Arbeit war es, die funktionellen Auswirkungen der *CD79B*-Mutation auf die B Zell-Entwicklung, die BCR-Regulation und die Lymphomagenese in einem präklinischen Mausmodell zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde ein *Cd79b* p.Y195H-Knock-in-Mausmodell generiert und sowohl isoliert als auch in Kombination mit einem etablierten *Myd88/BCL2*-getriebenen DLBCL-Mausmodell analysiert. Akute Effekte der Mutation wurden mittels durchflusszytometrischer Analysen der BCR-Internalisierung untersucht, während chronische Effekte auf Organmorphologie, B Zell-Subpopulationen, Serum-Immunglobulinspiegel und Tumorentwicklung im Langzeitverlauf erfasst wurden.

Die Untersuchungen zeigten, dass die *Cd79b*-Mutation zu einer signifikant verminderten konstitutiven BCR-Internalisierung führt, während die ligandenvermittelte Internalisierung nach BCR-Quervernetzung weitgehend erhalten bleibt. Diese Befunde deuten auf eine selektive Beeinträchtigung der basalen BCR-Regulation hin. In der chronischen Analyse ergaben sich hingegen keine Hinweise auf eine beschleunigte Lymphomagenese oder eine erhöhte Tumorlast durch die zusätzliche *Cd79b*-Mutation im *Myd88/BCL2*-Hintergrund. Auch Milzgröße, Keimzentrumsstruktur sowie die histologischen und immunphänotypischen Eigenschaften der Tumoren wurden durch die Mutation nicht wesentlich beeinflusst.

Auf der Ebene der B Zell-Entwicklung zeigte sich jedoch eine veränderte Zusammensetzung einzelner B Zell-Subpopulationen mit teilweise reduzierten B Zell-Zahlen, was auf einen Einfluss der *Cd79b*-Mutation auf frühe Entwicklungs- und Toleranzprozesse hindeutet. Hinsichtlich der Serum-Immunglobulinspiegel zeigte sich ein Trend zu erhöhten IgM-Spiegeln in *Cd79b*-mutierten Tieren. Die analysierten Tumoren wiesen einen post-Keimzentrums-Plasmablasten -Phänotyp auf.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die *Cd79b*-Mutation zwar funktionelle Auswirkungen auf die BCR-Regulation hat, im untersuchten Mausmodell jedoch nicht ausreicht, um die *Myd88/BCL2*-getriebene Lymphomagenese weiter zu beschleunigen. Die Daten legen nahe, dass eine frühzeitige Verstärkung der BCR-Signalgebung im Rahmen der B Zell-Entwicklung durch Toleranzmechanismen kompensiert werden kann. Obwohl die *Cd79b*-Mutation bereits früh zu einer verstärkten BCR-Signalgebung führt, scheinen die

betroffenen B Zellen während ihrer Entwicklung durch natürliche Kontrollmechanismen entweder eliminiert oder funktionell abgeschwächt zu werden, sodass ein potenziell pro-onkogener Effekt der *Cd79b*-Mutation funktionell kompensiert werden kann und nicht zu einer beschleunigten Lymphomentstehung führt. Damit liefert die Arbeit wichtige Einblicke in die kontextabhängige Rolle von *Cd79b*-Mutationen und unterstreicht die Bedeutung des Entwicklungszeitpunkts genetischer Veränderungen für die Lymphomentstehung.

2. Einleitung

2.1. B Zell-Entwicklung

Unter den Diffus großzelligen B Zell Lymphomen können zwei Phänotypen unterschieden werden – das ABC-DLBCL (activated B cell-like DLBCL) und das GCB-DLBCL (germinal center B cell-like DLBCL).¹ Da die beiden Phänotypen unterschiedliche Entwicklungsstadien repräsentieren, wird im Folgenden näher auf die physiologische B Zell-Entwicklung eingegangen.

Die B Zell-Entwicklung findet in zwei Abschnitten statt. Der erste Abschnitt läuft im Knochenmark und der fetalen Leber ab und der zweite Abschnitt in der Peripherie durch Bindung von Fremd-Antigenen an die B Zelle.² Die Hauptentwicklungsstadien im ersten Abschnitt umfassen die hämatopoetische Stammzelle (HSC), den multipotenten Vorläufer (MPP), den gemeinsamen lymphoiden Vorläufer (CLP), die Pro-B Zelle, die Prä-B Zelle und die unreife B Zelle.² Diese unterschiedlichen Stadien können anhand der Expression von bestimmten Oberflächenproteinen und dem Immunglobulin-Gen-Umlagerungsstatus in verschiedene Gruppen eingeteilt werden.² Ausgehend von der multipotenten Vorläuferzelle erfolgt zunächst eine Trennung in myeloische und lymphoide Vorläuferzellen und anschließend eine Differenzierung in B und T Zelllinien.³ Kennzeichen des Prä-Pro-B Zell-Stadiums ist die Expression des Transkriptionsfaktors EBF1. EBF1 fördert über eine Bindung an den *Igh*-Lokus die D_H-J_H-Rekombination.

Durch die sogenannte V(D)J-Rekombination ist es möglich, dass jede B Zelle einen individuellen B Zell-Rezeptor exprimiert.^{4,5} Der B Zell-Rezeptor stellt einen membrangebundenen Antikörper dar, der aus zwei Immunglobulin-Schwerketten (IgH) und zwei Immunglobulin-Leichtketten (IgL) besteht.⁵ Diese Ketten enthalten wiederum N-terminale variable (V) als auch C-terminale konstante (C) Regionen.⁶ Die variable Region der Immunglobulin-Schwerketten wird durch V (Variable)-Gene, J (Joining)-Gene und D (Diversity)-Gene kodiert.⁷ Hingegen wird die variable Region der Immunglobulin-Leichtketten durch V-Gene und J-Gene kodiert, die D-Gene fehlen in diesen Ketten.⁷ Die konstante Region der Immunglobulin-Ketten wird durch CH-Exon-Cluster kodiert.⁷ Die hohe Variabilität an B Zell-Rezeptoren entsteht nun während der V(D)J-Rekombination durch Kombination der verschiedenen Segmente auf DNA-Ebene.⁸ Vermittelt wird diese Rekombination durch die Enzyme RAG1 und RAG2.⁹ Diese Enzyme induzieren Doppelstrangbrüche an spezifischen Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS).¹⁰ In der Immunglobulin-Schwerkette werden zunächst D- und ein J-Segment verknüpft und anschließend wird dieses neu entstandene DJ-Segment an ein V-Segment angefügt.¹¹ In der Immunglobulin-Leichtkette werden nur J- und V-Segment miteinander verbunden, da kein D-Segment vorhanden ist.¹¹ Die entstandenen

variablen und konstanten Regionen werden sowohl bei der Immunglobulin-Schwerkette als auch bei der -Leichtkette nach der Transkription durch Spleißen miteinander verbunden.¹¹ Außerdem ist EBF1 verantwortlich für die Expression von *CD79A*, *CD79B* und der Gene, die für den Pre-B Zell-Rezeptor kodieren. Es folgt das frühe Pro-B Zell-Stadium im Anschluss an die D_H-J_H-Rekombination. Die Expression von Nicht-B-Linien-Genen wird durch die PAX5-Expression gehemmt. PAX5 ist ein Transkriptionsziel von EBF1. Auch weitere B Zell-Gene werden unter die Kontrolle von PAX5 und weiteren Transkriptionsfaktoren gestellt. In dem frühen Pro-B Zell-Stadium erfolgt als weiterer wichtiger Entwicklungsschritt die Expression von CD19. PAX5 vermittelt ein Zusammenziehen des *Igh*-Lokus, um die V_H-Gensegmente und die D_H-J_H-Region stärker in eine räumliche Nähe zu bringen. Somit wird die V_H zu D_H-Rekombination gefördert. Als nächstes folgt das späte Pro-B Zell-Stadium. In diesem Stadium hat in den meisten Zellen die V_H zu D_H-J_H Immunglobulin-Gensegment-Rekombination begonnen. Den Abschluss dieser Rekombination stellt der Eintritt in das frühe Prä-B Zell-Stadium dar. In diesem Stadium wird die cKit-Expression, die der B Zelle den Empfang von Stammzellfaktor-Signalen, die als wachstumsfördernde Signale von Stromazellen im Knochenmark ausgehen, ermöglicht hat, eingestellt.³ Im Anschluss an die V_H-D_H-J_H-Rekombination exprimiert die B Zelle einen Prä-B Zell-Rezeptor und tritt in das Prä-B Zellen-Stadium ein. Es erfolgt eine Selektion von B Zellen mit einer produktiven neu angeordneten schweren Kette, die in das nächste Entwicklungsstadium eintreten. Zudem kommt es zu einem Verlust des Prä-B Zell-Rezeptors, was einhergeht mit dem Eintritt in das kleine Prä-B Zellen-Stadium. Die Expression der *RAG1/2*-Gene löst die Umlagerung der Leichtketten aus. Nach erfolgreicher Umlagerung wird der IgM-B Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert und die B Zelle wird nun als unreife B Zelle bezeichnet. Nun ist es entscheidend, autoreaktive B Zellen zu eliminieren. Im Knochenmark ist eine hohe Konzentration an Selbstantigenen vorhanden. Erkennt eine unreife B Zelle diese Selbstantigene, werden die B Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche quervernetzt und es kommt durch ein starkes intrazelluläres Signal zur Apoptose der Zelle. Alternativ kann diese B Zelle die Expression der Gene *RAG1/2* reaktivieren und die Rekombination der Immunglobulin-Gene wird wiederholt, um gegebenenfalls einen nicht mehr autoreaktiven B Zell-Rezeptor zu erhalten. Der dritte Mechanismus, der bei autoreaktiven B Zellen zum Einsatz kommt, wird als Anergie bezeichnet. Hierbei kommt es zu einer Herunterregulierung der B Zell-Rezeptor-Expression auf B Zellen, die Selbstantigene mit geringer Affinität erkennen. Im Anschluss an diese negative Selektion erfolgt der zweite Abschnitt der B Zell-Entwicklung im peripheren lymphatischen System, in diesem Zwischenstadium zwischen reifer und unreifer B Zelle werden die Zellen als transitorische B Zellen bezeichnet.^{3,12,13} Die B Zellen halten sich hierbei in sekundären lymphatischen Organen, insbesondere in der Milz, auf.^{12,14} Während der B Zell-Reifung in der Peripherie kommt es zu einer Veränderung des Verhältnisses von B Zell-

Rezeptoren der Klasse sIgM zu B Zell-Rezeptoren der Klasse sIgD: bei unreifen B Zellen überwiegt sIgM, bei reifen B Zellen hingegen sIgD. ³

Die unreifen B Zellen, die in die Peripherie auswandern, sind sehr kurzlebig, wobei alle 3 Tage etwa die Hälfte von ihnen zugrunde gehen. ³ Allerdings handelt es sich bei der Mehrheit der peripheren B Zellen um langlebige Zellen, von denen pro Tag nur 1-2 % absterben. ³ Das Zugrundegehen der unreifen B Zellen ist wahrscheinlich mit der Tatsache begründet, dass alle peripheren B Zellen um den Eintritt in B Zell-Follikel in der Milz konkurrieren. ³ Da die Zahl der Follikel begrenzt ist, können nicht alle gebildeten B Zellen aufgenommen werden. ³ Innerhalb des Follikels kommt es zu einer Sekretion des B Zell-aktivierenden Faktors (BAFF) durch dendritische Follikelzellen, was das Überleben der B Zellen sichert. ³

In den sekundären lymphatischen Organen reifen die B Zellen zu follikulären B-Lymphozyten oder zu Marginalzonen-B Zellen. ^{12,14} Den überwiegenden Teil machen die follikulären B Lymphozyten aus, die sich in Gedächtniszellen oder Plasmazellen differenzieren. ^{12,14} Zudem sind sie an T Zell-abhängigen Immunreaktionen und Keimzentrumsreaktionen beteiligt. ^{12,14} Marginalzonen-B Zellen sind eher für kurzfristige Immunreaktionen verantwortlich, indem sie sich zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren, die Antikörper produzieren. ^{12,14}

Vor ihrem ersten Antigenkontakt wird die B Zelle als „naiv“ bezeichnet. Kommt es nun zu einem Kontakt der B Zelle mit ihrem Antigen, wird diese aktiviert. ¹² Diese Aktivierung kann entweder T Zell-abhängig über CD4+-T Zellen oder -unabhängig geschehen. ¹²

Bei der T Zell-abhängigen Aktivierung präsentieren zunächst dendritische Zellen den T Zellen ein Protein-Antigen. ^{12,15} Durch diese Präsentation werden die T Zellen aktiviert und exprimieren an ihrer Oberfläche CD40L. ^{12,15} Die aktivierten T Zellen wandern in Richtung eines Follikels. ^{12,15} Gleichzeitig werden B Zellen aktiviert, die für das präsentierte Antigen spezifisch sind und wandern ebenfalls zu dem Follikel. ^{12,15} Anschließend präsentiert die B Zelle das gebundene Antigen der T Zelle über ein MHC-Klasse-II-Molekül. ^{12,15} Zusätzlich bindet das CD40L der T Zelle an den CD40-Rezeptor der B Zelle, was ebenfalls zu einer B Zell-Aktivierung führt. ^{12,15} Infolge dieser B Zell-Aktivierung und somit auch B Zell-Proliferation kommt es innerhalb des Lymphfollikels zu einer Bildung von B Zell-Foci innerhalb der T Zell-Zone. ^{12,15} Dort kommt es bereits zum Auftreten von antikörperproduzierenden Plasmazellen. ^{12,15} Ein Teil der aktivierten B Lymphozyten bildet innerhalb des Lymphfollikels Keimzentren aus und es kommt zu einer Keimzentrumsreaktion, die sich aus verschiedenen Prozessen zusammensetzt. ^{12,15} Zum einen findet ein Klassen-Switch statt, bei dem es durch chromosomale Umlagerungsprozesse zu einer Änderung der Immunglobulin-Isotypen kommt. ^{12,15} So kann eine B Zelle nun anstatt IgM beziehungsweise IgD auch IgA, IgE oder IgG produzieren, also Immunglobuline mit einer anderen Effektorfunktion. ^{12,15} Außerdem besitzen B Zellen, nachdem sie die Keimzentrums-Reaktion durchlaufen haben, eine höhere Affinität ihrer Rezeptoren gegen das jeweilige Antigen. Dies wird durch die sogenannte

„Affinitätsreifung“ erreicht, die sich aus zwei Vorgängen zusammensetzt. Es kommt zu zufälligen Mutationen in den Genen, die für die variablen Regionen des Antikörpers kodieren, dieser Vorgang wird auch als somatische Hypermutation bezeichnet. Zudem präsentieren follikuläre dendritische Zellen den mutierten B Zellen Antigene und bei nicht ausreichender Antigenbindung wird eine Apoptose der B Zelle induziert.^{12,15} Im Anschluss an diese Reaktionen verlassen die B Zellen die Keimzentren und entwickeln sich entweder zu B Gedächtniszellen oder antikörperproduzierenden Plasmazellen.^{12,15} B Gedächtniszellen zirkulieren in einer Art Ruhezustand zwischen Lymphknoten und Milz und können bei erneutem Antigenkontakt Antikörper mit einer hohen Affinität gegen das Antigen bilden.^{12,15} Plasmazellen halten sich in Lymphknoten, Milz sowie im Knochenmark auf und sezernieren Immunglobuline.^{12,15} Die langlebigen Plasmazellen im Knochenmark sind in der Lage, noch lange Zeit nach der Antigenexposition Antikörper zu bilden.^{12,15}

Strukturell lassen sich Keimzentren in eine helle und eine dunkle Zone unterteilen.¹⁶ In der dunklen Zelle proliferieren die aktivierten B Zellen, sie werden dann auch als Zentroblasten bezeichnet.¹⁶ Während der Proliferation kommt es zu der oben beschriebenen somatischen Hypermutation.¹⁶ Im Anschluss an die Proliferation werden die B Zellen als Zentrozyten bezeichnet und bilden zusammen mit T Helferzellen und follikulären dendritischen Zellen die helle Zone.¹⁶ In diesem Bereich findet der zweite Schritt der Affinitätsreifung statt. Es kommt durch die Interaktion von follikulären dendritischen Zellen und B Zellen zu einer Selektion der B Zellen in Abhängigkeit von ihrer Antigen-Affinität.¹⁶

Der andere Weg der B Zell-Aktivierung läuft T Zell-unabhängig ab. Dieser Mechanismus ist wichtig, da T Zellen lediglich Protein-Antigene erkennen können. Bindet ein B Zell-Rezeptor nun an ein Nicht-Protein-Antigen, wird eine Immunantwort ausgelöst, die keine Mitwirkung von T Zellen benötigt.¹² Hierbei kommt es zu einer Proliferation der B Zellen und Entwicklung zu Plasmazellen.¹⁷ Die produzierten Antikörper weisen allerdings eine niedrigere Affinität zu dem jeweiligen Antigen auf, da sie keine Keimzentrumsreaktion durchlaufen und somit keine Affinitätsreifung erfolgt.¹² Zudem können von den Zellen fast ausschließlich IgM-Antikörper produziert werden, da kein Klassen-Switch stattfindet.¹²

Entscheidend für beide Wege der B Zell-Aktivierung ist der B Zell-Rezeptor, durch den die Antigene erkannt werden. Die Vielfalt der B Zell-Rezeptoren entsteht einerseits durch die V(D)J-Rekombination während der B Zell-Entwicklung, die oben beschrieben wurde. Zusätzlich zu der V(D)J-Rekombination kommt es zu einer junktionalen Diversifizierung, durch die die Vielfalt an B Zell-Rezeptoren weiter erhöht wird.¹⁸ Die junktionale Diversifizierung bezeichnet ein zufälliges Einfügen oder Ausschneiden von Nukleotiden zwischen den neu kombinierten Gensegmenten.¹⁸ Die einzelnen B Zell-Rezeptoren sind in der Lage, eine Vielzahl von körpereigenen und körperfremden Antigenen zu erkennen.⁵ Allerdings entsteht

durch diese DNA-Umlagerungsprozesse ein hohes Risiko für onkogene Mutationen und Translokationen.⁵

GCB-DLBCL entspringen aus B Zellen der hellen Zone der Keimzentren.¹⁹ Auch Follikuläre Lymphome und Burkitt-Lymphome weisen dieses Stadium der B Zellreifung auf.²⁰⁻²² Genetische Veränderungen, die in GCB-DLBCLs gehäuft auftreten, sind *EZH2*-Mutationen, *BCL2*-Translokationen, *CREBBP*-Mutationen, *KMT2D*-Mutationen, *MEF2B*-Mutationen und Mutationen im JAK-STAT-Signalweg.^{23,24}

ABC-DLBCL haben ihren Ursprung in Plasmablasten, die die Keimzentrums-Reaktion bereits durchlaufen haben.^{5,20,21,25} Neuere Untersuchungen lieferten jedoch Hinweise darauf, dass ein Teil der ABC-DLBCL-Fälle ihren Ursprung in Prä-Gedächtniszellen hat.²⁶ Da der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung von ABC-DLBCL liegt, wird auf die in diesen Tumoren rekurrent mutierten Signalwege in den folgenden Kapiteln eingegangen.

2.2. Grundlagen der Tumorentstehung

Krebserkrankungen stellen weltweit eine der Hauptursachen für Krankheit und Sterblichkeit dar. Im Jahr 2020 gab es weltweit schätzungsweise 19,3 Millionen neue Krebsfälle und fast 10 Millionen mit Krebs verbundene Todesfälle.²⁷ Schätzungen zufolge wird die weltweite Krebslast im Jahr 2040 auf 28,4 Millionen Fälle steigen.²⁷

Die Tumorentstehung wird von exogenen und endogenen Faktoren beeinflusst. Die Karzinogenese lässt sich anhand des Mehrstufenmodells beschreiben, das ursprünglich auf Isaac Berenblum zurückgeht²⁸, in den folgenden Jahren jedoch stetig weiterentwickelt wurde. Hiernach wird die Karzinogenese in vier Phasen unterteilt: Initiation, Promotion, Konversion und Progression.²⁹ Im ersten Schritt, der Initiation, kommt es zum Auftreten irreversibler genetischer Schädigungen in einzelnen Zellen sowie zu der Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.²⁹ Protoonkogene kommen physiologischerweise im Genom von Zellen vor. Durch verschiedene Mutationen kann es allerdings zu einer Umwandlung eines Protoonkogens in ein Onkogen kommen („Gain-of-Function-Mutation“).³⁰ Diese Onkogene fungieren als Treiber einer unkontrollierten Zellproliferation.³⁰ Die wachstumshemmende Funktion von Tumorsuppressorgenen wird im Folgenden anhand des Transkriptionsfaktors p53 erläutert. Treten DNA-Veränderungen auf, fördert p53 DNA-Reparaturmechanismen oder aber die Apoptose der Zellen.³¹ Durch *TP53*-Mutationen kann es zu einem Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors kommen („Loss-of-Function-Mutation“).³¹ Dies resultiert wiederum in einer deregulierten Zellvermehrung und einem ungebremsten Tumorwachstum.³¹ Die entstandenen Zellen unterscheiden sich phänotypisch zunächst nicht von dem umliegenden Gewebe.²⁹ In der Promotions-Phase kommt es zu Änderungen der Zellmorphologie, sodass diese nun als präneoplastische Zellen erkennbar sind.²⁹ Zudem kommt es zu einer Stimulierung des Zellwachstums sowie zu einem Verlust der

Apoptosefähigkeit.²⁹ Unter Apoptose versteht man eine durch genetische Prozesse regulierte Form des Zelltods, durch welche geschädigte Zellen eliminiert werden.³² Im Anschluss kommt es zu der Konversion. Merkmale dieser Phase sind die Zellproliferation, die Akkumulation von Mutationen sowie die Angiogenese.²⁹ Der letzte Schritt der Karzinogenese ist die Progression. Als Progression wird die Transformation der zunächst benignen Tumoren in maligne Tumore bezeichnet.²⁹ Diese Phase ist durch eine zunehmende genetische Instabilität der Zellen gekennzeichnet.²⁹ Außerdem sind die Zellen zu einer Invasion in das umliegende Gewebe sowie gegebenenfalls, über die Blut- und Lymphgefäße, in andere Organe in der Lage.²⁹

Die Grundlage für die Entstehung eines malignen Tumors bildet ein Ungleichgewicht zwischen Schädigung und Reparatur des genetischen Materials.³³ Als Ursachen für die Karzinogenese wird die Einwirkung exogener und endogener Noxen angesehen.³³ Zu den endogenen Ursachen zählt beispielsweise die DNA-Schädigung durch hochreaktive Sauerstoffradikale, die physiologischerweise im Rahmen des Zellstoffwechsels anfallen.³⁴ Der DNA-Schaden tritt also ohne den Einfluss äußerer Faktoren auf. Zu den exogenen Faktoren zählen physikalische (z. B. ionisierende Strahlung), chemische (z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe im Zigarettenrauch, Chemotherapeutika) und biologische Noxen (z. B. RNA-Viren). Entscheidend für die Entstehung eines DNA-Schadens beziehungsweise für die Entstehung eines malignen Tumors ist letztendlich die Dysfunktionalität der DNA-Reparaturmechanismen.³³ Unterschieden werden verschiedene DNA-Reparaturmechanismen, deren gemeinsames Ziel die Erkennung und Eliminierung von DNA-Schädigungen ist.³³ Zu den relevantesten DNA-Reparaturmechanismen zählen die nicht-homologe-Enden-Verknüpfung (NHEJ), die homologe Rekombination (HR), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die Basenexzisionsreparatur (BER) sowie die Mismatch-Reparatur (MMR).³³

Im Hinblick auf DLBCL ist hervorzuheben, dass bei B Zellen physiologischerweise eine Mutation der DNA durch VDJ-Rekombination, somatische Hypermutation und Klassen-Switch stattfindet. Auf die einzelnen Mechanismen wurde bereits in dem Abschnitt über die B Zell-Entwicklung eingegangen. Diese physiologischen Vorgänge bergen jedoch das Risiko onkogener Mutationen. Jene entstehen insbesondere durch eine Off-Target-Aktivität der genannten Mechanismen.³⁵ Derzeit stellen Tumorresektionen, Chemo- und Radiotherapien sowie Immuntherapien die Standardbehandlungen von Krebserkrankungen dar. Unter Chemo- und Radiotherapien werden vielfältige Nebenwirkungen wie Infektanfälligkeit, Übelkeit, Erbrechen und Hautreaktionen beobachtet.³⁶ Dies steht im Zusammenhang mit der engen therapeutischen Breite dieser Therapien, das heißt, neben der gewünschten Toxizität auf die Tumorzellen kommt es auch zu einer Schädigung von gesundem Gewebe. Auch eine zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika stellt eine Herausforderung in der Therapie dar.³⁷ Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten spielen zielgerichtete Therapien (*Targeted therapy*), die in die gestörten Regulationsmechanismen

maligner Zellen eingreifen, eine entscheidende Rolle.³⁶ Für die Entwicklung dieser Therapien ist es essenziell, die gestörten Regulationsmechanismen zu identifizieren und zu charakterisieren.

2.3. Diffus großzellige B Zell-Lymphome - Definition

Grundsätzlich versteht man unter dem Begriff Tumor im onkologischen Kontext eine Neubildung von Gewebe. Unter Lymphomen versteht man Neubildungen von lymphatischem Gewebe. Der Ursprung dieser Tumore liegt folglich in den lymphatischen Organen oder in den lymphatischen B Zellen oder T Zellen. Innerhalb der Gruppe der Lymphome unterscheidet man weiter zwischen den Dignitäten „benigne“ und „maligne“. Maligne Lymphome lassen sich in die zwei großen Untergruppen der Hodgkin-Lymphome und der Non-Hodgkin-Lymphome unterteilen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem diffus großzelligen B Zell Lymphom (DLBCL), welches die häufigste Unterform der Non-Hodgkin-Lymphome ist.³⁸ DLBCL machen etwa 35 % der B Zell-Non-Hodgkin-Lymphome aus³⁹ und sind somit die häufigsten malignen Lymphome. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 70 und 80 Jahren, allerdings kann die Erkrankung auch bereits in jüngerem Alter auftreten.⁴⁰ Am häufigsten findet eine de novo Tumorentstehung statt. Es kann allerdings auch zu einer Transformation einer anderen lymphatischen Neoplasie in ein diffus großzelliges B Zell Lymphom kommen.⁴¹⁻⁴⁴

Die Klassifikation der Lymphome erfolgt anhand von histologischen Eigenschaften, Genexpressionsanalysen, Oberflächenmarkern und genetischen Veränderungen.^{39,45} Die einzelnen B Zell Lymphom-Subtypen spiegeln jeweils verschiedene Stadien der normalen B Zell-Entwicklung wider.⁴⁵ Allerdings bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass diese Entwicklungsstadien auch die Ursprungszellen für die verschiedenen Lymphome darstellen.⁴⁵ So kann es vorkommen, dass die auslösende genetische Veränderung in einem frühen Stadium der B Zell-Entwicklung auftritt und in einem späteren Entwicklungsstadium der maligne Phänotyp durch zusätzliche onkogene Aberrationen bestimmt wird.⁴⁶

DLBCL zählen zu den reifen B Zellneoplasien und zeichnen sich durch eine diffuse Infiltration des befallenen Gewebes aus.⁴⁷ Durch diese diffuse Infiltration durch Tumorzellen kommt es zu einer Parenchymdestruktion des Gewebes.⁴⁸ Die Manifestation von DLBCL kann nodal oder extranodal erfolgen.⁴⁹ Zu den häufigsten nodalen Manifestationsorten zählen Lymphknoten, Waldeyer-Rachenring, Mediastinum und Milz.⁴⁹ Extranodal kann das DLBCL beispielsweise im Magen, Darm, Nase und Nasennebenhöhlen, Hoden, Haut, Schilddrüse, im zentralen Nervensystem, Brust, Knochen oder in der Speicheldrüse auftreten.⁴⁹ Klinisch kann die Erkrankung durch Symptome einer lokalen Organ- beziehungsweise Gewebeeinfiltration an den jeweiligen Manifestationsorten in Erscheinung treten.⁴⁹ Ein Teil der Patientinnen und Patienten präsentiert zudem eine sogenannte B-Symptomatik, bestehend aus Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme.⁴⁹

In der Gruppe der großzelligen B Zell-Lymphome werden verschiedene Subentitäten zusammengefasst.⁵⁰ Grundlegend wird laut der WHO-Klassifikation (5. Edition, 2022) zwischen dem Diffusen großzelligen B Zell-Lymphom NOS und anderen großzelligen B Zell-Lymphomen unterschieden.⁵⁰ Das DLBCL NOS kann weiter in morphologische (zentroblastisch, immunoblastisch, anaplastisch, andere) sowie molekulare und genetische Subtypen (Keimzentrums-B Zell-Typ, Aktivierter B Zell-Typ, DLBCL NOS mit Rearrangements von *MYC* und *BCL6*) unterteilt werden.⁵¹ Unter dem Begriff der anderen großzelligen B Zell-Lymphome werden 17 weitere Subentitäten zusammengefasst.⁵⁰

Die malignen B Zellen nutzen häufig proliferationsfördernde Signalwege, die in den unterschiedlichen B Zell-Entwicklungsstadien auch physiologischerweise aktiv sind.^{25,52,53} Zu diesem Zweck werden die Signalwege durch verschiedene genetische Veränderungen neu vernetzt.⁴⁶

2.4. Einteilung in ABC-DLBCL und GCB-DLBCL

Wie bereits erwähnt, lassen sich DLBCL in ABC- und GCB-DLBCL einteilen. Diese Einteilung beruht auf den phänotypischen Ähnlichkeiten der Tumorzellen zu einem bestimmten B Zell-Entwicklungsstadium. Anhand von Genexpressionsanalysen konnten verschiedene Expressionsmuster identifiziert werden, die jeweils unterschiedliche Stadien der B Zell-Entwicklung widerspiegeln.²⁰ Der ABC-DLBCL-Subtyp exprimiert Gene, die für aktivierte B Zellen nach der Keimzentrums-Reaktion charakteristisch sind.²⁰ GCB-DLBCL hingegen zeigen Genexpressionsmuster, die denen von Keimzentrums-B Zellen ähnlich sind.²⁰

Die Einteilung des DLBCL in ABC- und GCB-Subtypen spiegelt vor allem die biologische Heterogenität der Erkrankung wider.⁵⁴ Während diese Subtypen unter bestimmten Therapieschemata prognostische Relevanz hatten, ist ihre Aussagekraft hinsichtlich der Prognose zunehmend therapieabhängig und unter modernen Behandlungsregimen weniger eindeutig.⁵⁵

2.5. Genomanalysen der diffus großzelligen B Zell-Lymphome

Zusätzlich zu der phänotypischen Einteilung von DLBCL wurden kürzlich zwei unabhängige Genomanalysen von humanen DLBCL durchgeführt.^{23,24} Dies war für das Verständnis der Erkrankung entscheidend, da die rein phänotypische Einteilung von DLBCL nicht die klinische Präsentation der Patientinnen und Patienten und das Ansprechen auf die Chemotherapie widerspiegelte.⁵ Hierbei zeigten sich verschiedene wiederkehrende, durch genetische Marker definierte DLBCL-Kategorien.^{23,56} In einer der Analysen konnten sechs genetische DLBCL-Subtypen definiert werden⁵⁶: Der MCD-Subtyp (basierend auf dem gemeinsamen Auftreten von *MYD88* p.L265P- und *CD79B*-Mutationen), BN2-Subtyp (basierend auf *BCL6*-Fusionen

und *NOTCH2*-Mutationen), N1-Subtyp (basierend auf *NOTCH1*-Mutationen), EZB-Subtyp (basierend auf *EZH2*-Mutationen und *BCL2*-Translokationen), ST2-Subtyp (basierend auf *SGK1*- und *TET2*-Mutationen) und der A53-Subtyp (basierend auf *TP53*-Mutationen und -Deletionen).⁵⁶ In der zweiten Analyse wurden fünf Cluster definiert, in die die DLBCL-Fälle eingeordnet wurden.²³ Diese Cluster wurden durch folgende genetische Merkmale definiert: *BCL6*-Strukturvarianten in Kombination mit *NOTCH2*-Aberrationen (C1-DLBCL), biallelische *TP53*-Inaktivierung (*TP53*-Mutationen und 17p-Kopienzahlverluste) in Kombination mit Haploinsuffizienz von 9p21.13/*CDKN2A* und 13q14.2/*RB1* (C2-DLBCL), *BCL2*-Mutationen mit konkordanten *BCL2*-Strukturvarianten in Kombination mit *EZH2*-, *CREBBP*- und *KMT2D*-Mutationen und zusätzlichen aktivierenden Veränderungen des PI3K-Signalweges (C3-DLBCL), Mutationen in Linker- und Core-Histon-Genen in Kombination mit Veränderungen in Immunevasionsmolekülen, NF- κ B und RAS/JAK/STAT-Signalmolekülen (C4-DLBCL) und 18q-Kopienzahlgewinne in Kombination mit *MYD88*- und *CD79B*-Mutationen (C5-DLBCL).²³ Diese umfassenden Untersuchungen bieten eine Grundlage für die Identifizierung von potenziell therapeutisch adressierbaren genetischen Veränderungen in humanen DLBCL. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der *CD79B*-Mutation auf die Entwicklung von DLBCL. Wie in den oben genannten Genomanalysen beschrieben, tritt diese Mutation häufig in Kombination mit *MYD88*-Mutationen auf.^{23,56} Zudem treten in MCD/C5-DLBCL gehäuft *BCL2*-Amplifikationen gleichzeitig mit *MYD88*-Mutationen auf.⁵⁷ Im Folgenden wird daher näher auf diese Mutationen eingegangen.

2.6. Therapie der diffus großzelligen B Zell-Lymphome

Zur Risikostratifizierung von Patientinnen und Patienten mit diffus großzelligem B Zell-Lymphom wird der Internationale Prognostische Index (IPI) herangezogen. Dieser berücksichtigt klinische Parameter wie Alter, Krankheitsstadium nach Ann-Arbor, Serum-Laktatdehydrogenase (LDH), Allgemeinzustand (ECOG-Performance-Status) sowie den Befall extranodaler Organe und erlaubt eine Einteilung in unterschiedliche Risikogruppen mit prognostischer Relevanz.⁵⁴

Die Erstlinientherapie des diffus großzelligen B Zell Lymphoms erfolgt kurativ mittels kombinierter Chemo-Immuntherapie. Für Patientinnen und Patienten mit niedrigem Risiko stellt das R-CHOP-Regime bestehend aus **R**ituximab, **C**yclophosphamid, **H**ydroxydaunorubicin, **O**ncovin (Vincristin) und **P**rednisolon weiterhin einen etablierten Therapiestandard dar.⁵⁴

Bei Patientinnen und Patienten mit erhöhtem Risiko richtet sich die Wahl der Erstlinientherapie zunehmend nach klinischen Risikofaktoren. Während R-CHOP auch in dieser Gruppe weiterhin eingesetzt wird, hat sich mit der Einführung neuer Therapieoptionen die Behandlungsstrategie weiterentwickelt. Insbesondere die Kombination von Polatuzumab-

Vedotin mit R-CHP (Pola-R-CHP) stellt eine wirksame Alternative zur R-CHOP-Therapie bei Patientinnen und Patienten mit einem IPI von ≥ 2 dar.⁵⁴ Polatuzumab-Vedotin ist ein CD79B-gerichtetes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat.

Im Rezidiv ist die Therapieauswahl wesentlich von Remissionsdauer, Komorbiditäten und Eignung für intensiviert Verfahren abhängig. Für geeignete Patientinnen und Patienten wird die CAR T-Zell-Therapie als etablierte Behandlungsoption berücksichtigt. Für Patientinnen und Patienten ohne CAR T-Zell-Eignung oder nach Versagen vorangegangener Therapielinien stehen weitere zielgerichtete Optionen zur Verfügung. Hierbei ist die kombinierte Gabe von CD3xCD20-bispezifischen Antikörper (z.B. Glofitamab) mit Chemotherapie zu nennen.

In einer randomisierten Phase-3-Studie („Phoenix“, ClinicalTrials.gov: NCT01855750) konnte ein Überlebensbenefit bei der zusätzlichen Gabe des BTK-Inhibitors Ibrutinib zu einer R-CHOP-Therapie bei jüngeren Patientinnen und Patienten (Alter ≤ 60 Jahre) mit Nicht-GCB-DLBCL gezeigt werden.⁵⁸ Um die molekulare Grundlage dieses Überlebensbenefits aufzudecken, wurden Tumorbiopsien von Patientinnen und Patienten aus dieser Studie analysiert.⁵⁸ Hierbei stellte sich heraus, dass insbesondere Patientinnen und Patienten mit den Tumorsubtypen MCD (basierend auf dem gemeinsamen Auftreten von *MYD88* p.L265P- und *CD79B*-Mutationen) und N1 (basierend auf *NOTCH1*-Mutationen), die durch eine chronisch aktive BCR-Signalübertragung charakterisiert sind, von der Kombinationsbehandlung mit Ibrutinib und R-CHOP profitieren.⁵⁸ Insbesondere das gute Ansprechen von MCD-Tumoren auf die zusätzliche Ibrutinib-Therapie ist für die vorliegende Arbeit von großem Interesse.

In der ZUMA-7-Studie wurde eine erhöhte Wirksamkeit der CAR T Zell-Therapie (Axicabtagen-Ciloleucel) zur Behandlung von DLBCL-Patientinnen und -Patienten mit rezidivierter beziehungsweise refraktärer Erkrankung im Vergleich zu Standard-Zweitlinientherapien nachgewiesen.⁵⁹ In der Folge wird die CAR T Zell-Therapie in der aktuellen S3-Leitlinie (Oktober 2022) für die Zweitlinientherapie bei Hochdosis-fähigen Patientinnen und Patienten mit einem frühen Krankheitsrezidiv empfohlen.⁵¹ Bei dieser Therapie werden T Lymphozyten der Patientinnen und Patienten über eine Leukapharese gewonnen und anschließend gentechnisch modifiziert, sodass sie im Anschluss chimäre Antigenrezeptoren gegen CD19 auf der Oberfläche exprimieren.⁶⁰ Über diese Rezeptoren sind die T Lymphozyten in der Lage, die Tumorzellen der Patientinnen und Patienten zu erkennen und zu zerstören. Vor der Reinfusion der T Zellen erfolgt eine Radio- oder Systemtherapie, um möglichst viele T Lymphozyten der Patientinnen und Patienten zu eliminieren.^{60,61} Nebenwirkungen der CAR T Zell-Therapie manifestieren sich an verschiedenen Organsystemen, insbesondere ist hier das Zytokin-Freisetzungssyndrom zu nennen.^{60,61} Die ZUMA-7-Studie konnte eine Risikoreduktion für ein Ereignis um 60 % durch die CAR T Zell Therapie verglichen mit Standardtherapien nachweisen.⁵⁹ Zudem zeigte die Studie eine deutliche Erhöhung der Komplettremissions-

Raten durch die CAR T Zell Therapie gegenüber den Standardtherapien (65 % versus 32 %).

59

Nichtsdestotrotz stellen therapierefraktäre Krankheitsverläufe sowie Rezidive weiterhin eine große klinische Herausforderung dar, da selbst durch Hochdosis- keine langfristige Krankheitskontrolle erreicht werden kann.^{4,62-64} Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Etablierung und Validierung therapeutischer Strategien zur Behandlung dieser Patientinnen und Patienten. Von diesen Therapieoptionen könnten ebenfalls alte und gebrechliche Patientinnen und Patienten profitieren, die für eine Hochdosis-Chemotherapie nicht in Frage kommen.⁶⁵

2.7. NF κ B-Signaling in MCD/C5-DLBCL

Mutationen, die in MCD/C5-DLBCL gehäuft vorkommen, betreffen meist intrazelluläre Signalkaskaden und führen häufig zu einer inadäquaten NF κ B-Aktivierung.⁴⁵ Es gibt zwei physiologische Wege der NF κ B-Aktivierung - den klassischen und den alternativen Weg.^{45,52,66,67} Bei dem klassischen Weg kommt es zu einer Aktivierung des IKK β -Proteins, welches anschließend I κ B α phosphoryliert und somit für die Ubiquitinierung und den Abbau im Proteasom markiert.⁴⁶ Bei I κ B α handelt es sich um ein inhibitorisches Protein, das NF κ B1/RelA und NF κ B1/c-Rel im Zytoplasma vom Zellkern absondert.⁶⁸ Durch den proteasomalen Abbau von I κ B α wird NF κ B freigesetzt und wandert in den Nukleus, wo es in der Folge verschiedene Zielgene aktiviert.⁶⁸⁻⁷⁰ Zu diesen Zielgenen zählen unter anderem *BCL2*, *BCL-XL*, *cFLIP*, *cIAP1* und *cIAP2*, welche die Apoptose der Zellen inhibieren.⁶⁸⁻⁷⁰ Neben diesen anti-apoptotischen Genen gibt es noch eine Vielzahl weiterer Gene, die durch NF κ B aktiviert werden. Hierzu zählen unter anderem proinflammatorische Gene, was auch die wichtige Rolle einer dysregulierten NF κ B-Aktivierung in der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen erklärt.⁷¹ Auf dem alternativen Weg wird p100 durch einen IKK-Komplex, der aus zwei IKK α -Untereinheiten besteht, phosphoryliert.⁶⁸ p100 ist ein Genprodukt, das durch *NF κ B2* kodiert wird.⁶⁸ Durch die Phosphorylierung von p100 wird es in den NF κ B-Bestandteil p52 gespalten.⁶⁸ Anschließend bildet p52 einen Komplex mit RelB und verlagert sich in das Kernkompartiment.⁶⁸

2.8. MYD88-Mutationen in MCD/C5-DLBCL

Etwa 29 % der humanen MCD/C5-DLBCL weisen eine *MYD88* p.L265P-Mutation auf.⁷² Das murine *Myd88* p.L252P befindet sich an der orthologen Position des humanen *MYD88* p.L265P.⁵⁷ Diese Mutation löst eine veränderte Signalübertragung über Toll-like Rezeptoren aus.⁷² Toll-like Rezeptoren sind ein Teil des Immunsystems⁷³ und gehören zur Gruppe der Pattern-Recognition Receptors⁷⁴. Diese Rezeptoren erkennen Pathogen-Associated

Molecular Patterns (PAMPs) und führen anschließend zu einer Aktivierung spezifischer Gene, um die Erreger zu eliminieren ⁷³. Diese Genaktivierung wird über eine Signalkaskade gesteuert. Zur Auslösung dieser Signalkaskade benötigen alle zehn Toll-like-Rezeptoren, bis auf TLR3, das Adapterprotein MYD88 ^{74,75}. Sobald ein Toll-like Rezeptor aktiviert wird, kommt es zu einer Rekrutierung von MYD88 in die Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne des Toll-like Rezeptors ⁷⁶. Diese Rekrutierung erfolgt über die Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne von MYD88 ⁷⁶. Anschließend findet die Bildung des sogenannten Myddosoms statt, indem MYD88 die Proteine IRAK-1, -2 und -4 rekrutiert ⁷⁷. Zudem erfolgt eine Phosphorylierung von IRAK-1 und -2 durch IRAK-4 ⁷⁸. Diese Phosphorylierung fördert die Rekrutierung von TRAF6 (Tumor-necrosis factor receptor-associated factor 6) ⁷⁸. Es schließt sich eine Ubiquitinierung und Aktivierung von TAK1 (auch bekannt als MAP3K7 [Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7]) an ⁷⁹, was im letzten Schritt den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert. ⁷⁵

Eine Dysregulation dieser TLR-Signalkaskade kann zur Entstehung verschiedener Erkrankungen beitragen. ⁷³ So kann eine verminderte Aktivität des Signalwegs zu Immundefekten führen ⁸⁰, während eine Überaktivität Autoimmunerkrankungen auslösen kann. ⁸¹ Besondere Bedeutung für diese Arbeit haben die onkogenen *MYD88*-Mutationen. ⁷² Die *Myd88* p.L252P-Mutation ist für eine Zerstörung der Tertiärstruktur der TIR-Domäne von MYD88 verantwortlich. ⁴⁵ Hierdurch scheint es zu einer gehäuften spontanen Formation des Myddosoms und in der Folge zu einer verstärkten NF κ B-Aktivierung zu kommen. ⁸²

2.9. CD79B-Mutationen in MCD/C5-DLBCL

Über 20 % der MCD/C5-DLBCL weisen Mutationen im ersten Tyrosinrest des CD79B-ITAMs auf. ⁸³ Unter einem ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) versteht man eine konservierte Region in dem zytoplasmatischen Anteil von Rezeptoren, die der Signaltransduktion nach intrazellulär dient. ⁸⁴ In GCB-DLBCL sind *CD79B*-Mutationen fast nie zu finden. ⁸³

Eine wichtige Grundlage für diese Arbeit lieferten die Untersuchungen von Anna Gazumyan und ihren Kollegen aus dem Jahr 2006. In deren Untersuchungen an Mausmodellen mit Mutationen in beiden CD79B-ITAM-Tyrosinen konnte eine erhöhte IgM-Oberflächenexpression und erhöhte Spiegel an zirkulierendem IgM festgestellt werden. ⁸⁵ Die erhöhte IgM-Oberflächenexpression ist auf einen verminderten B Zell-Rezeptor-Umsatz und eine verminderte Entfernung von der Plasmamembran zurückzuführen. ⁸⁵ Die Messung der B Zell-Rezeptor-Internalisierung zeigte eine verminderte Internalisierung der Rezeptoren auf mutierten B Zellen im Gegensatz zu Wildtyp-B Zellen. ⁸⁵ Zudem war auch die Rezeptor-Internalisierung infolge einer B Zell-Rezeptor-Quervernetzung in mutierten B Zellen vermindert. ⁸⁵ Diese Beobachtungen zeigten die entscheidende Rolle von CD79B-ITAM-

Tyrosinresten sowohl für die konstitutive als auch für die Liganden-induzierte B Zell-Rezeptor-Internalisierung.⁸⁵ In den bisherigen Untersuchungen wurden die CD79B-ITAM-Tyrosine durch Alaninreste ersetzt.⁸⁵ In humanen MCD/C5-DLBCL tritt allerdings in den meisten Fällen eine Tyrosin-zu-Histidin-Mutation im ersten CD79B-ITAM-Tyrosin auf, eine gemeinsame Mutation beider Tyrosinreste kommt hingegen kaum vor.⁸³ Grundlage für die vorliegende Arbeit war daher ein autochthones Mausmodell mit dieser Mutation. Die Rolle von *CD79B*-Mutationen wird zudem durch die Tatsache deutlich, dass auf der Oberfläche eines Großteils der DLBCL weiterhin B Zell-Rezeptoren exprimiert werden.^{45,86} Dies spricht dafür, dass proliferationsfördernde Wege unterhalb des BCR onkogene Signale vermitteln.^{45,86}

Untersuchungen konnten in Lymphomen genetische Veränderungen der verschiedenen Bestandteile der B Zell-Rezeptor-Signaltransduktion nachweisen, die zu einer konstitutiven und onkogenen Signalübertragung führen.⁵ Vorausgegangene Untersuchungen konnten eine chronisch aktive B Zell-Rezeptor-Signalübertragung in MCD/C5-DLBCLs nachweisen, was die Annahme bestätigte, dass der B Zell-Rezeptor eine entscheidende Rolle im Überleben von malignen B Zellen spielt.⁸³ In den folgenden Jahren wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um Gene im B Zell-Rezeptor-Signalweg zu identifizieren, die für die Proliferation und das Überleben von malignen B Zellen verantwortlich sind.⁸⁷ Hierbei zeigten sich unter anderem wiederkehrende Mutationen in den ITAMs von CD79B und CD79A.^{24,83} Die Mutationen führten vor allem zu einem Austausch des ersten ITAM-Tyrosins des CD79B-Proteins gegen eine andere Aminosäure, wodurch die Phosphorylierungsstelle am ITAM beseitigt wurde. Für das Verständnis dieser Mutationen in Bezug auf die Lymphomentstehung ist es wichtig, dass keine neue B Zell-Rezeptor-Signalübertragung durch die mutierten CD79B-Proteine ausgelöst werden kann, sondern sie vielmehr die laufende B Zell-Rezeptor-Signalübertragung verstärken.⁸³ Diese Signalverstärkung geschieht wahrscheinlich durch eine Verminderung der negativen Rückkopplungen des B Zell-Rezeptor-Signalweges.⁵ Hierfür sprechen die Beobachtungen, dass B Zellen mit der *CD79B*-Mutation eine verminderte Aktivität der LYN-Kinase aufweisen, welche ein negativer Regulator des B Zell-Rezeptor-Signalweges ist.⁵ Dieser LYN-Mangel führte bei Mäusen zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen.⁸⁸ Für die funktionelle Einordnung der rekurrenten *CD79B*-Mutationen wird im Folgenden genauer auf das B Zell-Rezeptor-Signaling eingegangen.

Onkogene Veränderungen des B Zell-Rezeptors haben eine besonders kritische Bedeutung, da verschiedene Signale, die vom B Zell-Rezeptor ausgehen, einen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von malignen B Zellen haben.⁵ Bei MCD/C5-DLBCL finden sich überwiegend IgM-B Zell-Rezeptoren, während bei GCB-DLBCL IgG-B Zell-Rezeptoren dominieren.⁸⁹ Die beiden B Zell-Rezeptor-Typen lösen unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aus. Über den IgG-B Zell-Rezeptor wird eine Differenzierung der B Zellen in Gedächtnis-B Zellen und Plasmazellen vermittelt.^{45,90-93} Dies geschieht über ERK-Kinasen

und intrazellulären Calcium-Fluss.^{45,90-93} Über IgM-B Zell-Rezeptoren wird hingegen weniger eine Differenzierung, sondern mehr die Proliferation der B Zellen vermittelt.^{45,90-93}

Die Signaltransduktion vom B Zell-Rezeptor aus nach intrazellulär, welche im Anschluss an eine Antigen-Bindung stattfindet, erfolgt über eine nicht-kovalente Bindung mit einem CD79B-CD79A-Heterodimer.⁵ Der zytoplasmatische Anteil von CD79B und CD79A enthält ITAMs, die die Signalübertragung vermitteln.⁵ Auch ohne eine Antigen-Bindung werden Signale durch den B Zell-Rezeptor nach intrazellulär vermittelt, um das Überleben der B Zellen zu sichern.⁵ Findet eine Antigen-Bindung an den B Zell-Rezeptor statt, kommt es zu einer Phosphorylierung der ITAMs von CD79B und CD79A durch Kinasen der Src-Familie (SFKs).⁵ Zu dieser Familie zählen auch die Kinasen LYN, FYN und BLK.⁵ Im Anschluss wird die SYK-Kinase durch die phosphorylierten ITAMs rekrutiert und aktiviert.⁵ Dieser aktivierte B Zell-Rezeptor-Komplex rekrutiert weitere Kinasen, zum Beispiel Bruton's Tyrosinkinase (BTK), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C β (PKC- β) sowie AKT und Adaptorproteine, wie BLNK und LAT2.^{5,94} PKC- β löst die Phosphorylierung von CARD11 aus, das im Anschluss einen Komplex mit MALT1 und BCL10 bildet (CBM-Komplex).⁹⁴ Dieser CBM-Komplex aktiviert den IKK-Komplex (Inhibitor of NF κ B kinase), welcher wiederum I κ B phosphoryliert.⁹⁵ Die Phosphorylierung von I κ B ermöglicht dessen proteasomalen Abbau und die Freisetzung von NF κ B.⁹⁵ Durch die folgende Freisetzung des NLS (NF κ B's nuclear localization signal) kommt es zu einer Translokation von NF κ B in den Zellkern und zu einer Aktivierung der Zielgene.⁹⁵

2.10. *BCL2*-Aberrationen in MCD/C5-DLBCL

Zudem konnte gezeigt werden, dass sich in B Zell-Malignomen eine erhöhte Menge an *BCL2*-mRNA und *BCL2*-Protein findet, was mit einem schlechteren klinischen Ansprechen korreliert.⁹⁶ *BCL2* ist ein anti-apoptotisches Protein, das eine wichtige Rolle bei der B Zell-Entwicklung einnimmt.^{97,98} In immunhistochemischen Untersuchungen wurde eine etwa vierfach erhöhte *BCL2*-Expression in MCD/C5-DLBCL im Vergleich zu GCB-DLBCL festgestellt.^{20,57} In MCD/C5-DLBCL finden sich häufiger fokale Kopienzahlgewinne^{25,99-103}, während in GCB-DLBCL häufig die Translokation t(14;18)(q32;q21) zwischen dem Immunglobulin-Schwerketten-Gen auf Chromosom 14 und dem *BCL2*-Gen auf Chromosom 18 auftritt.¹⁰¹

2.11. Mausmodell von MCD/C5-DLBCL

Aufgrund des häufigen gemeinsamen Auftretens von *MYD88*- und *BCL2*-Mutationen in DLBCL wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein Mausmodell generiert, das beide Mutationen trägt (MBC-Mausmodell).⁵⁷

Für dieses Mausmodell wurde ein *Myd88* p.L252P-Allel generiert, das die Mutation, nach Cre-vermittelter Rekombination, vom endogenen Locus exprimiert. ⁵⁷ Eine B Zell-spezifische Expression der Cre-Rekombinase wurde durch die Verwendung von *Cd19^{Cre}*-, *Aid^{Cre}*- und *Cd21^{Cre}*-Deleter-Mausstämmen erreicht. ⁵⁷ Hierbei ist zu erwähnen, dass die *Myd88* p.L252P-Mutation ortholog zu der humanen *MYD88* p.L265P-Mutation ist. ⁵⁷ Die Exons 2 bis 6 wurden von loxP-Stellen umgeben. ⁵⁷ Es wurde stromabwärts der distalen loxP-Stelle ein weiterer Satz der Exons 2 bis 6 eingefügt, in dem die *Myd88* p.L252P-Mutation enthalten war. ⁵⁷ Zusätzlich wurde ein Polyadenylierungssignal (pA) distal der Wildtyp-Exons hinzugefügt, um die Transkription der mutierten Exons 2 bis 6 zu verhindern. ⁵⁷

Außerdem wurde ein *BCL2*-Allel konstruiert, bei dem das Transgen (*BCL2* vom *Rosa26*-Lokus nach der Cre-vermittelten Exzision einer Stopp-Kassette überexprimiert wird. ⁵⁷

Durch die Kreuzung dieser beiden Allele entstehen *Myd88^c* p.L252P/WT;*Rosa26^{LSL}.BCL2.IRES.GFP/WT*;*Cd19^{Cre}/WT*-Tiere (MBC-Tiere). ⁵⁷

Vorausgegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass die von diesen genetisch modifizierten Tieren entwickelten Lymphome größtenteils den MCD/C5-DLBCL-Phänotyp aufweisen. ⁵⁷

2.12. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Effekte von *Cd79b* p.Y195H-Mutationen auf die B Zell-Entwicklung sowie die Tumorgenese von diffus großzelligen B Zell Lymphomen. Diese Mutation tritt in über 20 % der MCD/C5-DLBCL auf und stellt somit einen wichtigen potenziellen Angriffspunkt zielgerichteter Therapien dar.

Für die Durchführung der Experimente wurde ein Mausmodell generiert, das die *Cd79b* p.Y195H-Mutation trägt.

Um ein umfassendes Verständnis der Mutation zu erhalten, wurden sowohl akute als auch chronische Auswirkungen der Mutation untersucht.

Zudem sollen die Auswirkungen der *Cd79b* p.Y195H-Mutation in Kombination mit *Myd88* p.L252P-Mutationen und *BCL2*-Amplifikationen betrachtet werden, um ein eventuell vorhandenes Zusammenspiel zu erkennen.

In Abhängigkeit von den Ergebnissen dieser Arbeit könnte das generierte Mausmodell als präklinische Plattform für die Untersuchung der Erkrankung und die Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien dienen.

Zentrale Fragestellungen dieser Arbeit sind:

- Hat die *Cd79b* p.Y195H-Mutation einen Einfluss auf die konstitutive und Liganden-vermittelte B Zell-Rezeptor-Internalisierung und somit auf das B Zell-Rezeptor-Signaling?

- Führt die *Cd79b* p.Y195H-Expression zu der Entwicklung einer Splenomegalie? Gibt es zusätzliche Effekte der Mutation in Kombination mit *Myd88*- und *BCL2*-Mutationen?
- Inwiefern wirkt sich die *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die Größe und Menge der Keimzentren innerhalb der Milz aus?
- Gibt es Unterschiede in den Anteilen der verschiedenen B Zell-Entwicklungsstadien an der Gesamtheit der Splenozyten von *Cd79b*- mutierten Mäusen?
- Zeigen Tiere mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation veränderte Serumspiegel der Immunglobuline IgM, IgG und IgA?
- Zu welchem immunhistochemischen Tumor-Phänotyp führt die *Cd79b* p.Y195H-Mutation?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborprodukte

Tabelle 1 Verwendete Laborprodukte.

Produkt	Hersteller
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Axiovert 40 CFL Microscope	Zeiss
Axiovert 40C Microscope	Zeiss
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad
ChemiDoc XPS Molecular Imager	Bio-Rad
Countess II FL Automated Cell Counter	Life technologies
Gallios Flow Cytometer	Beckman Coulter Life Sciences
Heracell 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Biofuge Primo Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Methanol	Carl Roth
NP-40 Tergitol	Sigma Aldrich
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyde 4%	PanReac Applichem
PerfectBlue Horizontal Gel Electrophoresis System	Peqlab
Pipetman Classic Pipettes	Gilson
Potassium chloride (KCl)	Carl Roth
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth
Propidium iodide	Sigma Aldrich
Safe 2020 Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific
SDS pellets	Carl Roth
Sodium chloride (NaCl)	Carl Roth
Sodium deoxycholate	Sigma Aldrich
TEMED	Carl Roth
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Tris	Carl Roth

Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Tween 20	Sigma
B-mercaptoethanol	Sigma Aldrich
2YT medium	Carl Roth
1.5 ml centrifuge tube	Sarstedt
15 ml centrifuge tube	Greiner bio-one
2 ml centrifuge tube	Sarstedt
200 µl centrifuge tube	Sarstedt
50 ml centrifuge tube	Greiner bio-one

3.1.2. Puffer

Tabelle 2 Verwendete Puffer.

Loading Dye 6x	10 mM Tris-HCl pH 7,6 0,03 % Bromphenol blue 60 % Glycerol 60 mM EDTA
RIPA cell lysis buffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 1 % (v/v) Triton X-100 0,5 % (w/v) Sodium deoxycholate 0,1 % (w/v) SDS 150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM NaF
TAE 50x	10 M Tris base 87,5 % Acetic acid 250 mM EDTA pH 8,0 Adjust pH value to 8,5
Phosphate buffered saline (D-PBS)	8,1mM Natriumphosphat 138 mM NaCl 1,5 mM Kaliumphosphat 2,7 mM KCl
Primary antibody solution	1 % BSA 0,1 % Natriumazide in TBST
TBST	140 mM NaCl

	30 mM Tris HCl pH 7.5, 0.1 % (v/v) Tween-20
--	---

3.1.3. Kits

Tabelle 3 Verwendete Kits.

Name	Hersteller	Katalognummer
CD43(LY-48) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec	130-049-801
IgM Mouse Uncoated ELISA Kit	Invitrogen	88-50470-88
IgG (Total) Mouse Uncoated ELISA Kit	Invitrogen	88-50400-77
IgA Mouse Uncoated ELISA Kit	Invitrogen	88-50450-77

3.1.4. Zellkultur

Tabelle 4 Verwendetes Zellkultur-Medium.

B Zell-Medium	500 ml DMEM GlutaMax (Gibco 61965026) 50 ml FCS 6 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco 25030-081) 6 ml 100 mM Natriumpyruvat (Gibco 11360-070) 6 ml 1 M HEPES 6 ml nicht essenzielle Aminosäuren (100x) 6ml Penicillin/Streptomycin (100x)
---------------	---

3.1.5. Primäre Antikörper

Tabelle 5 Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Fluorophor	Ursprung/ Klon	Hersteller	Katalognummer
Biotin-SP Anti-IgM Fab	1:200		Mouse Polyclonal	Jackson Immuno Research	115-067-020

Biotin-SP Anti-IgM F(ab') ₂	1:200		Mouse Polyclonal	Jackson Immuno Research	115-066-020
FITC Anti- CD19	1:200		Mouse Monoclonal	BioLegend	115505
Alexa Fluor 700 Anti- CD19	1:200		Mouse Monoclonal	BioLegend	115528
Purified Rat Anti-Mouse CD138			Rat Monoclonal	BD Pharmingen	553712
Purified Rat Anti-Mouse CD45R (Clone RA3-6B2)	1:10		Rat Monoclonal	BD Pharmingen	550286
Peanut Agglutinin (PNA), Biotinylated				Vector Laboratories	B-1075-5
CD45		APC-Cy7	30-F11	BD Pharmigen	557659
B220		Pblue	RA3-6B2	BD Pharmigen	558108
CD93		PE-Cy7	AA4.1	BioLegend	136506
CD21		APC	7G6	BD Pharmigen	558658
CD23		PE	B3B4	eBioscience	12-0232-82
CD138		PE-Cy7	281-2	BioLegend	142514
MHC2		AF700	M5-1142	BioLegend	107622

3.1.6. Sekundäre Antikörper

Tabelle 6 Verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Hersteller	Katalognummer

Biotin Goat Anti-Rat Ig		Goat Polyclonal	BD Pharmingen	559286
Streptavidin HRP			BD Pharmingen	550946
Streptavidin, Alexa Fluor 647 Conjugate	1:200		Thermo Fisher	S32357

3.1.7. Enzyme

Tabelle 7 Verwendete Enzyme.

Name	Hersteller	Katalognummer
GoTaq DNA Polymerase and 5 x Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega	9PIM300

3.2. Methoden

3.2.1. Tierversuche an Mausmodellen

Die Versuche an Mäusen wurden gemäß den Vorschriften des lokalen staatlichen Tierschutzkomitees durchgeführt (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Deutschland [LANUV]). Alle Protokolle wurden durch das Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) genehmigt.

Die Mäuse wurden in einer speziellen pathogenfreien Einrichtung in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten.

In der folgenden Abbildung wird das Zuchtschema der in dieser Arbeit verwendeten transgenen *Cd79b^{p.Y195H/p.Y195H}*-Mäuse dargestellt. Es wurde das Cre/loxP-System verwendet. Dies ist ein Rekombinationssystem, durch das gezielte zellspezifische DNA-Veränderungen in den Organismen vorgenommen werden können. Das System wurde in den 1980er Jahren entwickelt. Der Konzern E.I. du Pont de Nemours and Company besitzt ein Patent hierfür. Cre ist eine Rekombinase, die spezifische Basensequenzen erkennt und die DNA an diesen Stellen spaltet. Diese spezifische Basensequenz wird auch als loxP beziehungsweise FRT bezeichnet. Für die Entfernung einer DNA-Sequenz aus einem Gen wird diese von loxP-Stellen umgeben. Die Cre-Rekombinase bindet an diese Stellen und der zwischen den loxP-Stellen liegende DNA-Abschnitt wird herausgeschnitten. In der F0-Generation steht auf der einen Seite eine Cre-Maus, die die Cre-Rekombinase unter dem CMV-Promotor exprimiert. Auf der anderen Seite steht die loxP-Maus, die das mutierte CD79B-Protein exprimiert.

Allerdings enthält das mutierte Allel wie unten beschrieben einen Transkriptionsblocker (human growth hormone polyadenylation signal - hGHpA) sowie die Wildtyp-Exons 3 bis 6, die von loxP-Stellen umgeben werden. Dies verhindert die unspezifische Transkription des mutierten CD79B-Proteins. Ziel ist es, eine spezifische Expression dieses mutierten CD79B-Proteins in den B Zellen der Mäuse zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde eine Cre-Maus mit einer loxP-Maus gekreuzt und man erhielt in der F1-Generation eine Cre/loxP-Maus. Diese Maus enthielt sowohl die Cre-DNA als auch die loxP-TB-loxP-*Cd79b*-DNA. In B Zellen wurde nun der CMV-Promotor aktiviert, was zu einer Cre-Expression führte. Anschließend schnitt die Cre-Rekombinase die Wildtyp-Exons 3 bis 6 sowie den Transkriptionsblocker an den loxP-Stellen heraus. In der F2-Generation erhielt man somit homozygote *Cd79b*^{p.Y195H/p.Y195H}-Mäuse.

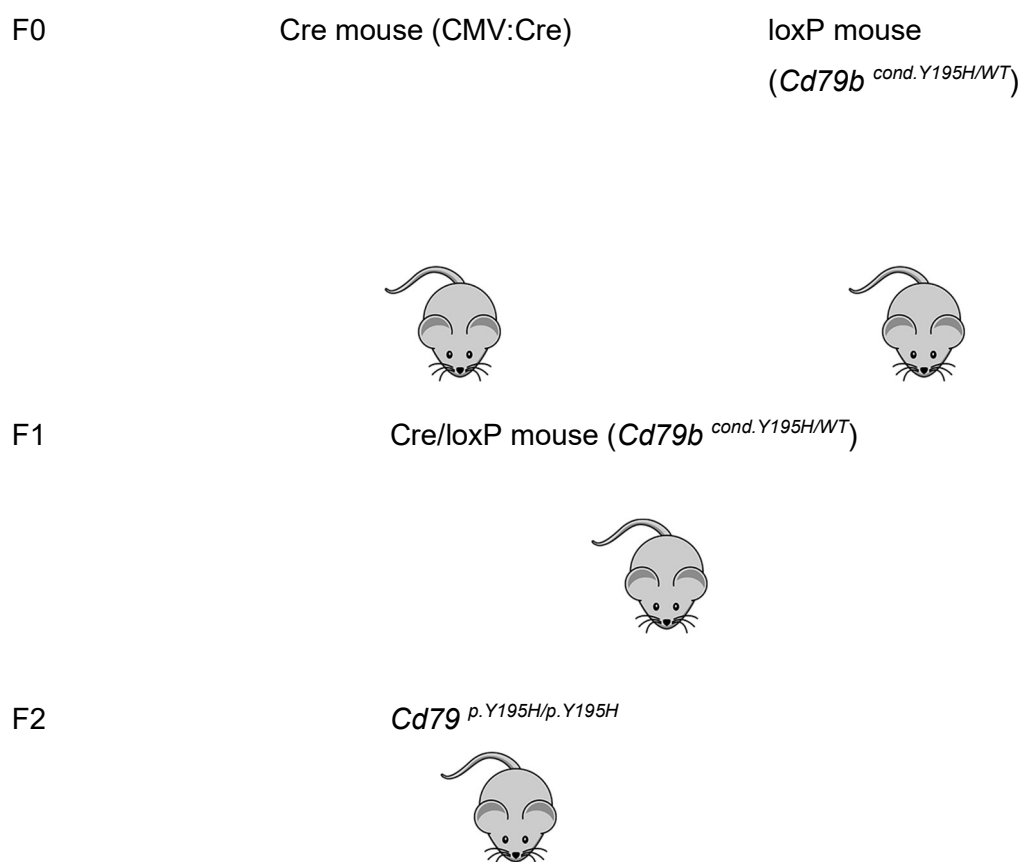


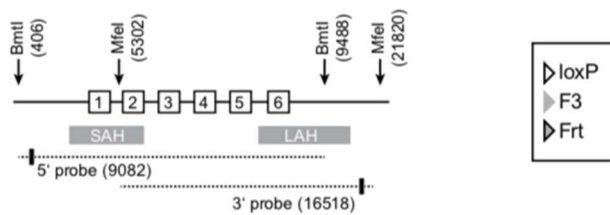
Abbildung 1 Zuchtschema der *Cd79b*^{p.Y195H/p.Y195H}-Maus.

In dieser Arbeit wurden transgene konditionale „Knock-In“-Mäuse verwendet. Generiert wurden diese durch die Firma Taconic unter Züchtung mit dem B6 Flp-deleter-Stamm. Die Allel-Konstruktion ist in der untenstehenden Abbildung dargestellt.

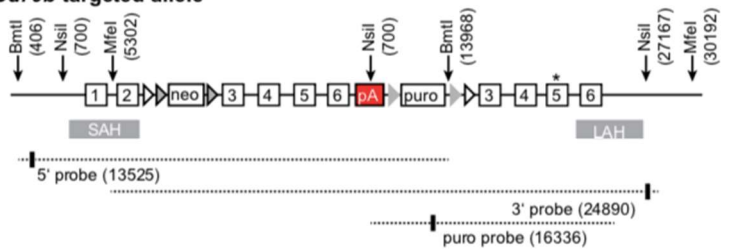
Es wurde eine Punktmutation im *Cd79b*-Gen erzeugt, wozu das Prinzip der homologen Rekombination genutzt wurde. Hierbei wird gezielt eine veränderte DNA-Sequenz in das Genom der Mäuse eingebracht.

Der Ziel-Vektor wurde mithilfe von standardisierten Techniken entwickelt. Die gezielte Genmodifikation basiert auf dem Protokoll NM_008339.2 des National Center for Biotechnology Information. Hierbei enthält das Exon 1 das Start-Codon für die Translation. Die Wildtyp-Exons 3-6, welche die komplette 3' untranslatierte Region enthalten, werden von loxP-Sites umgeben. Die Größe der von den loxP-Sites umgebenen Region beträgt 3,5 kb. Zusätzlich wurde ein Polyadenylierungssignal (hGHpA) zwischen der 3' untranslatierten Region und der distalen loxP-Site eingefügt, um die Downstream-Transkription des mutierten Exons 5 zu verhindern. Die Exons 3-6, einschließlich der Akzeptor-Spleißstelle von Exon 6, wurden dupliziert und downstream der distalen loxP-Site eingefügt. Die p.Y195H-Mutation wurde in das duplizierte Exon 5 eingefügt. Positive Selektionsmarker wurden in Intron 2 und downstream der hGHpA eingefügt und von FRT- (Neomycin-Resistenz-NeoR) und F3-Sites (Puromycin-Resistenz-PuroR) umgeben. Der Zielvektor wurde mithilfe eines BAC-Klons aus der C57BL/6JRPCI-23 BAC library hergestellt. Anschließend wurde der Zielvektor in die Taconic Biosciences C57BL/6N Tac embryonic stem (ES) Zelllinie transfiziert. Um die Ziel-Klone zu isolieren, wurde eine doppelt-positive (NeoR und PuroR) und -negative (Thymidinkinase-Tk) Selektion durchgeführt. Nach der *in vivo* Flp-vermittelten Entfernung der Selektionsmarker erhielt man das konditionale Allel. Dieses Allel exprimierte das Wildtyp-CD79B-Protein. Durch das hGHpA-Signal downstream des Exons 6 wurde die Transkription des mutierten Exons 5 verhindert. Anschließend erhielt man das konstitutive Allel durch *in vivo* Cre-vermittelte Entfernung der Exons 3 bis 6 und des hGHpA-Signals. Dieses Allel exprimierte das mutierte CD79B p.Y195H-Protein. Die verbleibenden Rekombinations-Stellen sind in unkonservierten Regionen des Genoms lokalisiert.

***Cd79b* wildtype allele**



***Cd79b* targeted allele**



***Cd79b* conditional knock-in allele (after Flp recombination)**



Abbildung 2 Allel-Design des *Cd79b* Knock-in Allels.

3.2.2. Serial Sacrifices

Um die chronischen Auswirkungen der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die Gewichte von Milz, Leber und Nieren der Mäuse zu untersuchen, wurden 30- und 50-Wochen alte Tiere getötet und die Organe anschließend untersucht.

Zusätzlich zu dem bereits von Flümman *et al.* durchgeführten Vergleich der Organgewichte von C- (Wildtyp), MC- (*Myd88*^{c-p.L252P/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}), BC- (*Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}) und MBC- (*Myd88*^{c-p.L252P/WT}; *Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}) Tieren wurde der zusätzliche Einfluss der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die einzelnen Genotypen untersucht.

3.2.3. MRT-Bildgebung

Zur Messung der Milzvolumina erfolgte eine MRT-Bildgebung der Mäuse im Alter von 10, 30 und 50 Wochen. Die Untersuchung erfolgte in einem 3-Tesla-MRT (Ingenia) der Firma Philips innerhalb einer Nagetier-Magnetspule (Durchmesser: 40 mm, Philips Research Europe). Im Vorfeld der Bildgebung wurden die Mäuse mit 2,5 % Isofluran narkotisiert. Zur Darstellung der Milzen wurden axiale T2-gewichtete Abdomen-Aufnahmen angefertigt (Turbo Spin Echo-Faktor: 10, Time of Repetition: 2674 ms, Time to Echo: 65 ms, Schichtdicke: 1 mm). Der Export der Bilder erfolgte im DICOM-Format. Die anschließende Quantifizierung wurde mithilfe der Horos-Software durchgeführt.

3.2.4. Zelllinien

Die murinen Zelllinien wurden sowohl aus Milzen der Tiere als auch aus primären Tumoren gewonnen und in DMEM GlutaMax mit den folgenden Zusätzen kultiviert: 10 % FCS, 2 mmol/L L-Glutamin, 1 mmol/L Natriumpyruvat, 10 mmol/L HEPES, nicht essenzielle Aminosäuren und 1 % Penicillin-Streptomycin.

Die aus den Lymphomen isolierten Zelllinien wurden unter einem Lichtmikroskop untersucht, um ihre Intaktheit sicherzustellen und ihr Wachstum zu beurteilen. Die Zellzahl wurde innerhalb einer Zählkammer (Countess II FL Automated Counter, ThermoFisher Scientific) automatisch bestimmt, indem 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt wurden. Je nach Zellzahl wurde das entsprechende Teilungsverhältnis berechnet, um eine Zelldichte von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/ml zu erhalten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf 5 cm-beziehungsweise 10 cm-Gewebekulturschalen (Falcon, ThermoFisher Scientific).

3.2.5. Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der Basenabfolge in einem bestimmten DNA-Abschnitt. Diese wurde durch die Sequenzierungs-Service-Gruppe des CCG-Instituts in Köln durchgeführt. Das PCR-Programm für die Sanger-Sequenzierung wurde entsprechend dem BigDye® Terminator Cycle Sequenzierungs-Protokolls ausgeführt.

Zu Beginn der Untersuchung muss eine Denaturierung stattfinden, um die als Doppelstrang vorliegende DNA in die jeweiligen Einzelstränge aufzutrennen. Hierfür erfolgt eine Erhitzung der DNA auf 96 °C. Zu dem Versuchsansatz wird der zu dem DNA-Strang passende Primer gegeben. Die mit dem Primer versehenen DNA-Einzelstränge werden auf vier Versuchsansätze aufgeteilt und eine DNA-Polymerase hinzugefügt. In den einzelnen Versuchsansätzen sind jeweils einzelne Nukleotide (dNTP, Desoxyribonucleotidtriphosphate) als Substrat für die DNA-Polymerase vorhanden. Die vier Ansätze werden anschließend mit unterschiedlichen Stopp-Nukleotiden (ddNTP, Didesoxyribonucleotidtriphosphate) versehen. Die DNA-Polymerase bindet nun an den Primer (Annealing) und vervollständigt den DNA-Einzelstrang über eine komplementäre Basenpaarung (Elongation). Sobald ein Stopp-Nukleotid eingefügt wird, bricht die Kettenverlängerung ab. Nach mehreren Zyklen sind daher in den einzelnen Ansätzen jeweils unterschiedlich lange DNA-Stränge vorhanden, die in einem Ansatz immer mit demselben Stopp-Nukleotid enden. Mithilfe der Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt. Durch Anlage einer elektrischen Spannung wandert die negativ geladene DNA zu der Anode, wobei kurze und leichte Fragmente schneller wandern als längere und schwere Fragmente. Auf dem Agarose-Gel können nun von unten nach oben die jeweiligen Stoppbasen abgelesen werden und man erhält so die Basenabfolge der Fragmente.

Tabelle 8 PCR-Programm für die Sanger-Sequenzierung.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklus
Digest (optional)	37	30 min	1
Initial denaturation	96	120 s	1
Denaturation	96	10 s	32
Annealing	55	5 s	32
Elongation	60	5 min	32

Tabelle 9 Verwendete Komponenten für die Sanger-Sequenzierungs-PCR.

Komponente	Menge
Restriction enzyme (optional)	0,5 µl
BigDye® Terminator v3.1	0,25 µl
5 x BigDye sequencing buffer	2,25 µl
Primer (10 µM)	0,25 µl
PCR template	2-10 ng per 100 bp
ad. PCR water	10 µl

3.2.6. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Mithilfe des ELISA wurden die Konzentrationen der Immunglobuline IgM, IgG und IgA im Serum von transgenen Mäusen mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation gemessen. Das Serum der Tiere wurde im Rahmen von Serial Sacrifices von Mäusen im Alter von 30 Wochen gewonnen. Das Prinzip des ELISA beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Zunächst wird ein spezifisches Antigen auf den Boden der Platten aufgetragen. Die Proben werden auf die Platten gegeben und sofern in diesen für das Antigen spezifische primäre Antikörper vorhanden sind, binden diese an das Antigen. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Nachweis-Antikörpers, der an den primären Antikörper bindet. Dieser Nachweis-Antikörper ist an ein Enzym gekoppelt, das durch Zugabe einer Substratlösung einen Farbstoff aktivieren kann, wodurch die Enzymaktivität photometrisch erfasst werden kann. Diese Enzymaktivität korreliert mit der Menge des gesuchten Antikörpers in der Probe.

Im ersten Schritt wurde die ELISA-Platte mit einem Fängerantikörper (100 µl), der in einem Beschichtungs-Puffer gelöst wurde, beschichtet, versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Flüssigkeit aus den Vertiefungen der Platte entfernt

und die Vertiefungen zweimal mit einem Waschpuffer (400 µl/Vertiefung) gewaschen. Die gewaschene Platte wurde auf einem Absorptionpapier trocken getupft. Das Blocken der Vertiefungen erfolgte durch eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Blockierungs-Puffer. An diesen Schritt schlossen sich zwei erneute Waschvorgänge wie oben beschrieben an. Um die Standardkurve zu generieren, wurde eine zweifache Reihenverdünnung der Standardfelder mit einem Assay-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde 100 µl Assay-Puffer in jede Blindvertiefung und 50 µl Assay-Puffer in jede Probenvertiefung gegeben. Die Serumproben wurden mit Assay-Puffer verdünnt (10.000-fach) und anschließend 50 µl der verdünnten Lösung in die entsprechenden Vertiefungen verteilt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler für zwei Stunden und anschließend vier Waschvorgänge. Nach Hinzugabe des Nachweis-Antikörpers wurden die Platten erneut für eine Stunde auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation schlossen sich vier Waschschrte an. Die Platten wurden mit 100 µl der Substratlösung in jeder Vertiefung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktionen zu beenden, wurden anschließend 100 µl der Stopp-Lösung hinzugefügt. Die Auslesung der Platten erfolgte bei 450 nm.

3.2.7. Immunhistochemie

Das Tumorgewebe der Mäuse wurde bei Raumtemperatur in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Standardfärbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin. Zusätzlich wurden die Gewebeschnitte mit Markern für B220 (BD, clone RA3-6B2) und CD138 (BD, Katalognummer: 553712) gefärbt. Die Keimzentrums-Quantifizierung erfolgte aus PNA-Färbungen unter Verwendung der Software ImageJ.

3.2.8. B Zell-Rezeptor-Internalisierung

Um die Internalisierung des B Zell-Rezeptors zu messen, wurden im ersten Schritt Splenozyten (1×10^6) aus Mäusen, die die *Cd79b* p.Y195H-Mutation trugen und Wildtyp-Mäusen, isoliert. Mithilfe eines Magnetseparationskits wurden die naiven B Zellen isoliert. Die Zellen wurden bei 4 °C in RPMI mit 0,5 % FCS gelagert. Anschließend wurden die Proben mit Biotin-SP anti-IgM Fab in einer Verdünnung von 1:200 für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschrte in Medium bei 4 °C. Um die konstitutive B Zell-Rezeptor-Internalisierung zu messen, wurden die Zellen bei 37°C für 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen in warmen (37 °C) 0,5 % Formaldehyd gelöst in PBS fixiert. Die fixierten Zellen wurden auf Eis gelagert. Nachdem alle Proben von den verschiedenen Inkubationszeiträumen fixiert waren, wurden alle Ansätze für 10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend dreimal für jeweils

eine Minute in PBS gewaschen. Um den Anteil der B Zellen herauszufiltern, die zum jeweiligen Fixierungszeitpunkt IgM auf ihrer Oberfläche trugen, wurden die Proben für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur mit Streptavidin 647 (1:200) und anti-CD19 (1:200) inkubiert. Nach einem erneuten Waschen mit PBS wurden die Splenozyten unter der Verwendung der Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

In einem zweiten Ansatz wurde die B Zell-Rezeptor-Internalisierung als Reaktion auf eine Rezeptor-Quervernetzung gemessen. Hierfür wurden die Zellen mit Biotin-SP Anti-IgM F(ab')₂ in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Der sonstige experimentelle Ablauf entspricht dem der Untersuchung der konstitutiven Internalisierung.

3.2.9. FACS (Fluorescence activated cell sorting)

Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS; Fluorescence activated cell sorting) wurden in dieser Arbeit bestimmte Oberflächenmarker auf den Splenozyten untersucht. Hierfür ist eine Färbung der B Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern notwendig. Diese Fluorochrome können durch das Durchflusszytometer detektiert werden. Die verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 5 und 6. dargestellt. Im Vorfeld der Messung wurden die Zellsuspensionen mit dem Antikörper gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml D-PBS für 5 Minuten bei 300 G gewaschen und in 300 µl D-PBS resuspendiert. Die Inkubationszeiten sowie das weitere Vorgehen zur Untersuchung der B Zell-Rezeptor-Internalisierung werden in einem separaten Abschnitt dargelegt.

Im Anschluss an den Färbeprozess erfolgte die Messung der Oberflächenmarker an einem Durchflusszytometer (Gallios Flow Cytometer, Beckman Coulter Life Sciences). Innerhalb dieses Durchflusszytometers passieren die Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl. Beim Auftreffen dieses Laserstrahls auf eine Zelle wird der Strahl gestreut und es werden die Fluorochrome auf der Zelloberfläche zum Leuchten angeregt. Das Streu- und Fluoreszenzlicht werden separat gemessen. Innerhalb des Streulichts unterteilt man verschiedene Streurichtungen: das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht (Forward Scatter) und das senkrecht zum Laserstrahl gestreute Licht (Side Scatter). Über den Forward Scatter erhält man Informationen über die Zellgröße, wohingegen der Side Scatter Auskunft über die Granularität der Zellen gibt. Die Intensität des Fluoreszenzlichts spiegelt die Menge des Zielantigens auf der Zelle wider. In dieser Arbeit wurde das Gallios-Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter verwendet. Das Gerät kann mit drei Lasern (405 nm violett, 488 nm blau, 638 nm rot) bis zu zehn Fluoreszenzfarben gleichzeitig detektieren. Es können 32 Proben in einem Autoloader durch einen automatisierten Erfassungsmodus gemessen werden. Die Messgeschwindigkeit beträgt bis zu 25.000 Ereignisse pro Sekunde.

Die Durchflusszytometrie wurde genutzt, um die Allel-Funktionalität zu validieren. Zu diesem Zweck wurde die Signalintensität für CD79B bei für die Mutation homozygoten Mäusen mit der von Wildtyp-Mäusen verglichen.

Zudem diente die FACS-Analyse der Bestimmung der B Zell-Rezeptor-Internalisierung. Es erfolgte zunächst ein Gating der B Zellen, indem die CD19-positiven Zellen herausgefiltert wurden. Im Anschluss wurde die Streptavidin-Signalintensität gemessen, da dieses Protein an Biotin bindet und somit die IgM-positiven Zellen markiert.

3.2.10. Gating-Strategie

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte im Anschluss an die Messung mithilfe der Kaluza-Analysesoftware.

Hierbei wurden die Anteile einzelner Populationen innerhalb der Zellsuspensionen gemessen. Zudem war es möglich, verschiedene Parameter zueinander in Beziehung zu setzen. Dargestellt wurden die Ergebnisse durch Dot-Plots. In diesen Dot-Plots werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen. Jeder Punkt innerhalb des Graphen entspricht einem gemessenen Event.

Die Betrachtung einzelner Zellen beziehungsweise Zellgruppen war durch die Auswahl der jeweiligen Regionen innerhalb des Dot-Plots möglich, was als „Gating“ bezeichnet wird.

Eine ausführliche Gating-Strategie wird im Ergebnisabschnitt dieser Arbeit dargestellt.

3.2.11. Datenanalyse

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism. Für den Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen wurde die Welch-ANOVA mit vorgeschaltetem Brown-Forsythe-Test verwendet, um Mittelwertunterschiede auch bei ungleichen Varianzen zuverlässig beurteilen zu können. Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Analyse der FACS-Daten erfolgte unter Verwendung der Kaluza Analysis-Software.

4. Ergebnisse

4.1. Validierung der Allel-Funktionalität

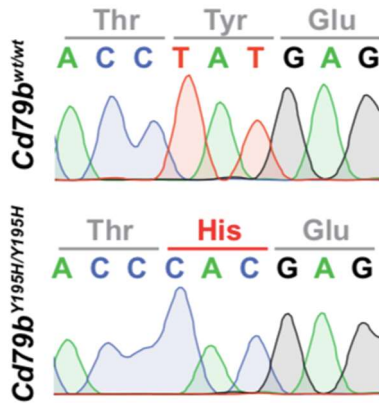


Abbildung 3 Sanger-Sequenzierung: mRNA-Sequenz von Wildtyp (oben) und *Cd79b*^{p.Y195H/p.Y195H}-Tieren (unten).

Um die Rolle der *Cd79b*-Mutation in der Entwicklung von diffus großzelligen B Zell-Lymphomen zu untersuchen, wurde wie oben beschrieben ein konditionales *Cd79b*-Allel konstruiert, das das mutierte CD79B-Protein nach einer Cre-vermittelten Rekombination exprimiert.

Das im Folgenden beschriebene Experiment diente dazu, die Expression der *Cd79b*-mutierten messenger RNA (mRNA) zu bestätigen. Zunächst wurde das *Cd79b*-Allel mit einem *CMV-Cre*-Allel zusammengekreuzt, wodurch Cre ubiquitär exprimiert wurde. Anschließend wurde das Keimbahn-rekombinierte Allel homozygotisiert. Mithilfe eines Magnetseparationskits wurden die B Zellen isoliert. Es folgte die cDNA-Synthese sowie die Durchführung einer Sanger-Sequenzierung.

Dargestellt wird ein Ausschnitt der Basensequenz des CD79B-ITAMs.

Im Gegensatz zur der mRNA-Basensequenz der Wildtyp-Tiere (T-A-T) zeigte sich bei den transgenen Tieren eine Veränderung der Basenabfolge (C-A-C). Hierdurch kodierte dieser DNA-Abschnitt für die Aminosäure Histidin anstatt für die Aminosäure Tyrosin.

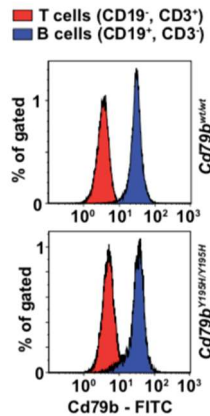


Abbildung 4 Durchflusszytometrie: CD79B-Oberflächenexpression in B Zellen von Wildtyp- (oben) und *Cd79b^{p.Y195H/p.Y195H}*-Tieren (unten).

In einem zweiten Schritt sollte sichergestellt werden, dass von der mutierten mRNA auch stabiles Protein translatiert wird. In der Durchflusszytometrie zeigten die homozygoten *Cd79b*-Tiere die gleiche Signalintensität für CD79B wie die Wildtyp-Tiere. Es befand sich also auf der Oberfläche der B Zellen von Tieren, die *Cd79b* nur von dem veränderten Allel exprimieren konnten, genauso viel CD79B-Protein wie auf der B Zell-Oberfläche von genetisch unveränderten Mäusen. Zudem wurde die Lymphozytenpopulation durch eine entsprechende Gating-Strategie in die CD19-negativen und CD3-positiven T Zellen sowie die CD19-positiven und CD3-negativen B Zellen aufgeteilt wurde. Bei der Betrachtung der Signalintensitäten innerhalb dieser Subpopulationen konnte bestätigt werden, dass der verwendete Antikörper spezifisch an das zu untersuchende Protein bindet.

Somit konnte sowohl bestätigt werden, dass die Mutation korrekt in das Genom integriert ist, als auch, dass das veränderte Allel funktional intakt ist und B Zell spezifisch exprimiert wird.

4.2. Akute Auswirkungen der *Cd79b*-Mutation auf die B Zell-Rezeptor-Internalisierung

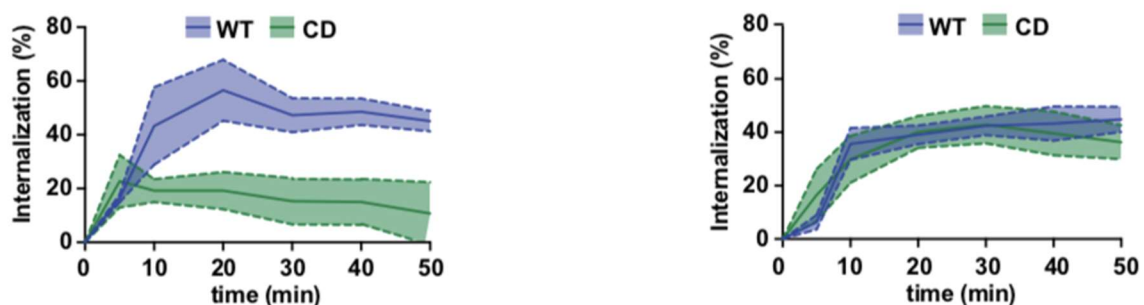


Abbildung 5 Konstitutive (links) und Liganden-vermittelte (rechts) B Zell-Rezeptor-Internalisierung von WT- und CD-Tieren. — = Mittelwert; - - = Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

Die Untersuchung der B Zell-Rezeptor-Internalisierung wurde in Anlehnung an die Daten von Gazumyan *et al.* (2006) durchgeführt. Sowohl CD79A als auch CD79B besitzen intrazellulär ein ITAM-Motiv. In den von Gazumyan *et al.* (2006) untersuchten B Zellen wurde in beide Tyrosinreste des CD79B-ITAMs eine Tyrosin-zu-Alanin-Mutation integriert. Die in humanen MCD/C5-DLBCL am häufigsten beobachtete Mutation ist allerdings eine Tyrosin-zu-Histidin-Mutation im ersten CD79B-ITAM-Tyrosin. Um klinisch relevante und möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu generieren, wurden daher in der vorliegenden Arbeit B Zellen mit einer Mutation im ersten Tyrosinrest des CD79B-ITAMs verwendet und nicht, wie in den Untersuchungen von Gazumyan *et al.*, B Zellen mit einer Mutation beider Tyrosinreste. Das Experiment diente dazu, einen möglichen Einfluss der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die BCR-Internalisierung darzustellen.

Um die konstitutive BCR-Internalisierung zu untersuchen, wurden die B Zell-Rezeptoren mit einem Fab' anti-IgM-Antikörper markiert. Dieser Antikörper bindet an den B Zell-Rezeptor und verhindert durch seine Struktur die Quervernetzung der Rezeptoren.

Für die Messung der BCR-Internalisierung als Reaktion auf eine Rezeptor-Quervernetzung wurden die Zellen mit einem F(ab')₂ anti-IgM-Antikörper konjugiert. Diese Antikörper enthalten zwei antigenbindende F(ab)-Anteile und können hierüber die B Zell-Rezeptoren miteinander vernetzen.

Die Fab-Antikörper sind Biotin-konjugiert, sodass eine sekundäre Anfärbung mit Streptavidin möglich ist.

Durch die anschließende Inkubation der Zellen bei 37 °C wurde die Internalisierung der oberflächengebundenen Antikörper induziert. Folglich standen die nach den jeweiligen Messzeitpunkten bereits internalisierten Antikörper nicht mehr für die sekundäre Färbung mit Streptavidin zur Verfügung.

Zudem wurde ein CD19-Antikörper verwendet, um die B Zell-Population aus der Gesamtheit der Splenozyten herauszufiltern. Der Anteil der B Zellen, auf denen sich zu den definierten Zeitpunkten IgM auf der Oberfläche befand, wurde mithilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen bestimmt. Anschließend wurde der Anteil der internalisierten B Zell-Rezeptoren zu dem jeweiligen Zeitpunkt berechnet.

B Zellen, die die *Cd79b* p.Y195H-Mutation trugen, zeigten eine deutlich verminderte konstitutive B Zell-Rezeptor-Internalisierung im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen (Abbildung 5). Nach einem Zeitraum von 20 Minuten waren durchschnittlich bereits 50 % der B Zell-Rezeptoren auf Wildtyp-B Zellen internalisiert, wohingegen lediglich 20 % der Rezeptoren auf B Zellen mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation internalisiert wurden (Abbildung 5).

Eine Quervernetzung der B Zell-Rezeptoren zeigte keine Unterschiede in Bezug auf die Rezeptor-Internalisierung im Vergleich von Wildtyp- und *Cd79b* p.Y195H-mutierten B Zellen

(Abbildung 5). Nach 20 Minuten waren sowohl in mutierten als auch in nicht-mutierten B Zellen etwa 40 % der B Zell-Rezeptoren internalisiert (Abbildung 5).

Zusammenfassend konnte eine Verminderung der konstitutiven BCR-Internalisierung durch die Tyrosin-zu-Histidin-Mutation im CD79B-ITAM festgestellt werden. Die Mutation hatte keinen Einfluss auf die Liganden-vermittelte BCR-Internalisierung.

Diese Ergebnisse sind zum Teil im Einklang mit den Beobachtungen von Gazumyan *et al.*. In diesen Untersuchungen zeigte sich ebenfalls eine Verminderung der konstitutiven BCR-Internalisierung durch die Mutation der Tyrosinreste des CD79B-ITAMs. Im Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen konnte von Gazumyan *et al.* durch die Quervernetzung der B Zell-Rezeptoren ebenfalls eine Reduktion der BCR-Internalisierung beobachtet werden.

Die *Cd79b* p.Y195H-Mutation reduziert selektiv die konstitutive BCR-Internalisierung, während die ligandeninduzierte BCR-Internalisierung erhalten bleibt.

4.3. Chronische Auswirkungen der *Cd79b*-Mutation

4.3.1. Postmortale sowie bildmorphologische Reihenuntersuchungen der Organgewichte und -volumina

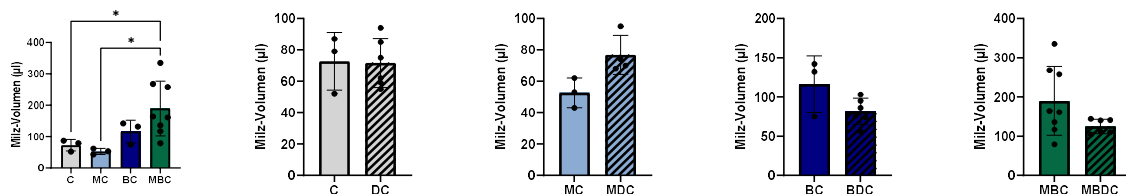


Abbildung 6 Milzvolumina von Tieren der Genotypen C (n=3), DC (n=6), MC (n=3), MDC (n=4), BC (n=3), BDC (n=6), MBC (n=8) und MBDC (n=6) im Alter von 10 Wochen. *, $P \leq 0,05$

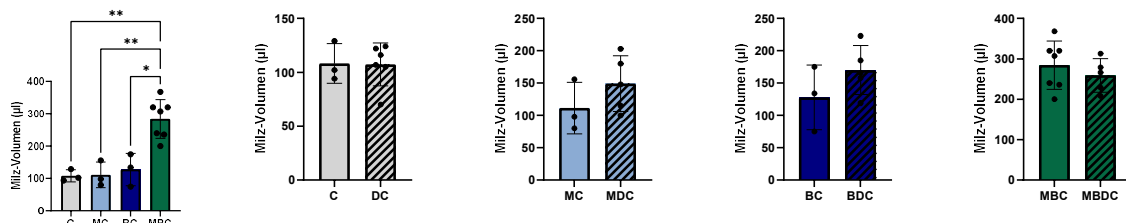


Abbildung 7 Milzvolumina von Tieren der Genotypen C (n=3), DC (n=6), MC (n=3), MDC (n=5), BC (n=3), BDC (n=5), MBC (n=7) und MBDC (n=5) im Alter von 30 Wochen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$

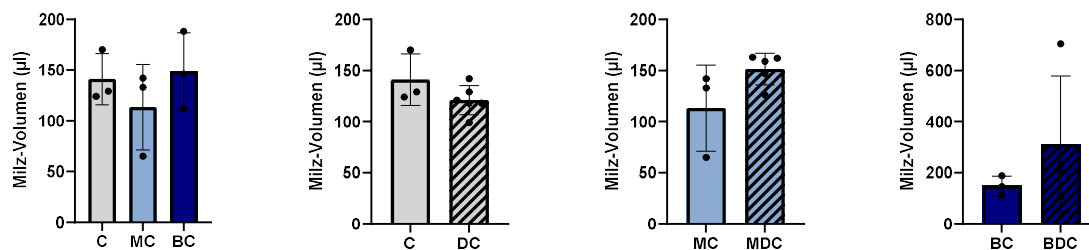


Abbildung 8 Milzvolumina von Tieren der Genotypen C (n=3), DC (n=6), MC (n=3), MDC (n=5), BC (n=3) und BDC (n=4) im Alter von 50 Wochen.

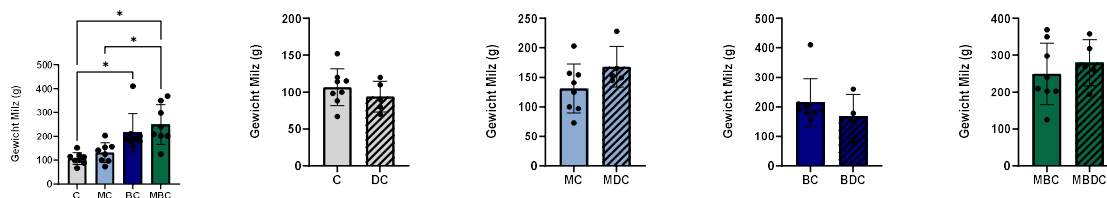


Abbildung 9 Gewicht der Milz von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=8), BDC (n=4), MBC (n=8) und MBDC (n=5) zum 30-Wochen-Zeitpunkt. *, $P \leq 0,05$

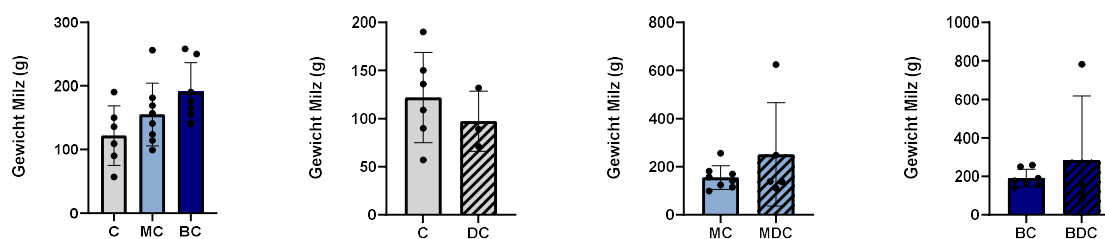


Abbildung 10 Gewichte der Milz von Tieren der Genotypen C (n=6), DC (n=3), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=7) und BDC (n=4) zum 50-Wochen-Zeitpunkt.

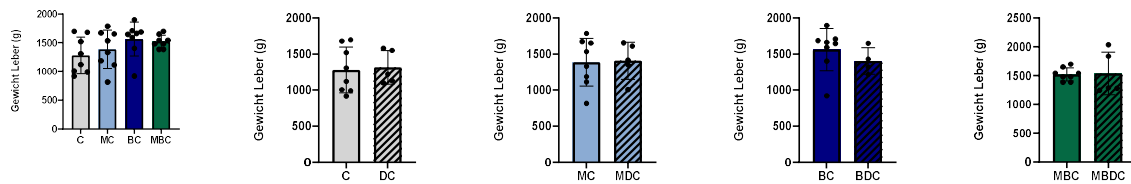


Abbildung 11 Gewicht der Leber von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=8), BDC (n=4), MBC (n=8) und MBDC (n=5) zum 30-Wochen-Zeitpunkt.

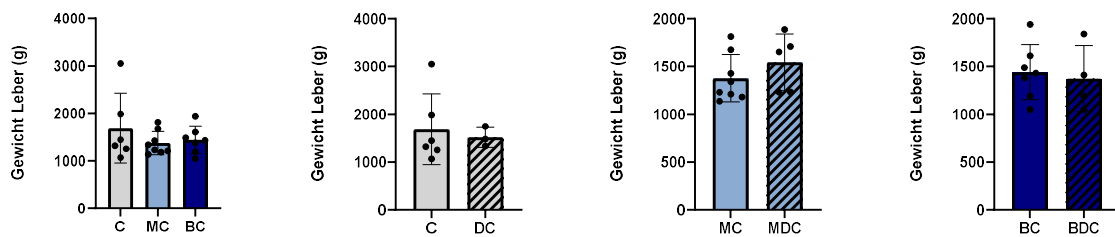


Abbildung 12 Gewichte der Leber von Tieren der Genotypen C (n=6), DC (n=3), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=7) und BDC (n=4) zum 50-Wochen-Zeitpunkt.

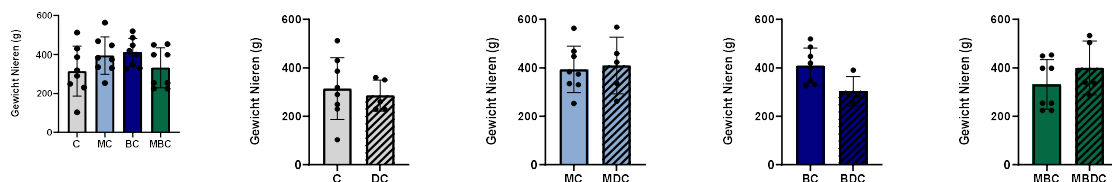


Abbildung 13 Gewicht der Nieren von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=8), BDC (n=4), MBC (n=8) und MBDC (n=5) zum 30-Wochen-Zeitpunkt.

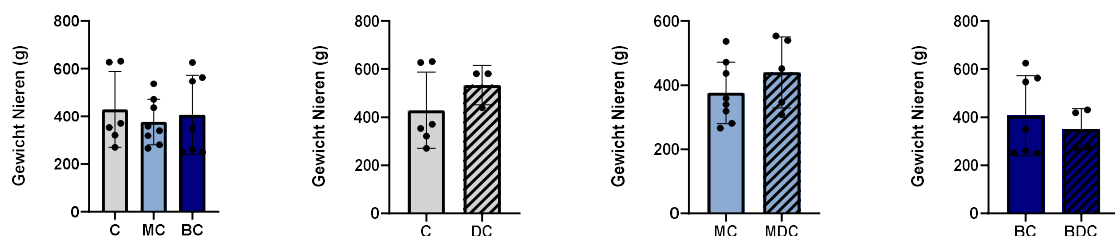


Abbildung 14 Gewichte der Nieren von Tieren der Genotypen C (n=6), DC (n=3), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=7) und BDC (n=4) zum 50-Wochen-Zeitpunkt.

Bei verschiedenen lymphoproliferativen Erkrankungen, so auch im DLBCL, tritt infolge einer Organinfiltration eine Splenomegalie auf.

Zur Darstellung der chronischen Auswirkungen der *Cd79b* p.Y195H-Mutation, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung einer Splenomegalie, wurden die im Rahmen von Serientötungen der Versuchstiere erhobenen Gewichte von Milz, Leber und Nieren der Tiere zwischen den verschiedenen Genotypen der Mäuse verglichen.

Für eine genauere Evaluation der Entwicklung einer Splenomegalie fanden zudem serielle MRT-Bildgebungen statt.

Dargestellt sind die Genotypen C (Wildtyp), MC (*Myd88*^{c-p.L252P/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}), BC (*Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}) und MBC (*Myd88*^{c-p.L252P/WT}; *Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}) zum 30-Wochen-Zeitpunkt (Abbildung 7) und die Genotypen C, MC und BC zum 50-Wochen-Zeitpunkt (Abbildung 8) jeweils im Vergleich mit der zusätzlichen *Cd79b* p.Y195H-Mutation. Nach 50 Wochen standen keine MBC-Tiere mehr für weitere Analysen zur Verfügung, da diese zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben waren. Dies ist konsistent mit den Untersuchungen von Flümman *et al.* (2021), wo MBC-Tiere bereits deutlich vor diesem Zeitpunkt eine hohe Mortalität aufwiesen.

Die bildmorphologische Beurteilung der Milzvolumina wurde zusätzlich bei 10 Wochen alten Tieren durchgeführt (Abbildung 6).

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Flümman *et al.* (2021) hinsichtlich des Phänotyps von Tieren des Genotyps C, MC, BC und MBC ließen sich in den vorliegenden Untersuchungen reproduzieren. MBC-Tiere zeigten in den bildmorphologischen Untersuchungen zum 10- und 30-Wochen Zeitpunkt signifikant höhere Milzvolumina als Wildtyp- (10 Wochen: $P=0,0271$; 30 Wochen: $P=0,0017$) und MC-Tiere (10 Wochen: $P=0,0163$; 30 Wochen: $P=0,0083$) (Abbildung 6, Abbildung 7). Im Alter von 30 Wochen waren die Milzvolumina von MBC-Tieren auch im Vergleich zu BC-Tieren signifikant erhöht ($P=0,0247$) (Abbildung 7). Diese Beobachtungen ließen sich auch im Rahmen der Serientötungen von Mäusen im Alter von 30 Wochen bestätigen. Hier zeigten sich die Milzgewichte von Tieren des Genotyps MBC ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtyp- ($P=0,0148$) und MC-Tieren ($P=0,0178$) (Abbildung 9). Zusätzlich ergab sich eine signifikante Erhöhung der Milzgewichte von Tieren des Genotyps BC verglichen mit Wildtyp-Tieren ($P=0,0199$) (Abbildung 9).

Im Rahmen der Serientötungen wurden zudem die Gewichte von Leber und Nieren erhoben. Sowohl bei 30- als auch bei 50-Wochen-alten Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Organgewichte von Leber und Nieren zwischen den einzelnen Genotypen (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Effekt der *Cd79b* p.Y195H-Mutation vor den einzelnen genetischen Hintergründen (C, MC, BC, MBC) untersucht. Hierbei zeigten sich sowohl im Hinblick auf die Milzvolumina als auch hinsichtlich der einzelnen Organgewichte

keine signifikanten Unterschiede vor den verschiedenen genetischen Hintergründen (Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14).

Insgesamt scheint die *Myd88*-Mutation in Kombination mit der *BCL2*-Amplifikation die Entwicklung einer Splenomegalie zu verstärken. Die *Cd79b*-Mutation scheint hierbei weder auf die Milzvolumina noch auf die Organgewichte einen zusätzlichen signifikanten Effekt zu haben.

4.4. Keimzentrums-Quantifizierung mithilfe von Immunhistochemie

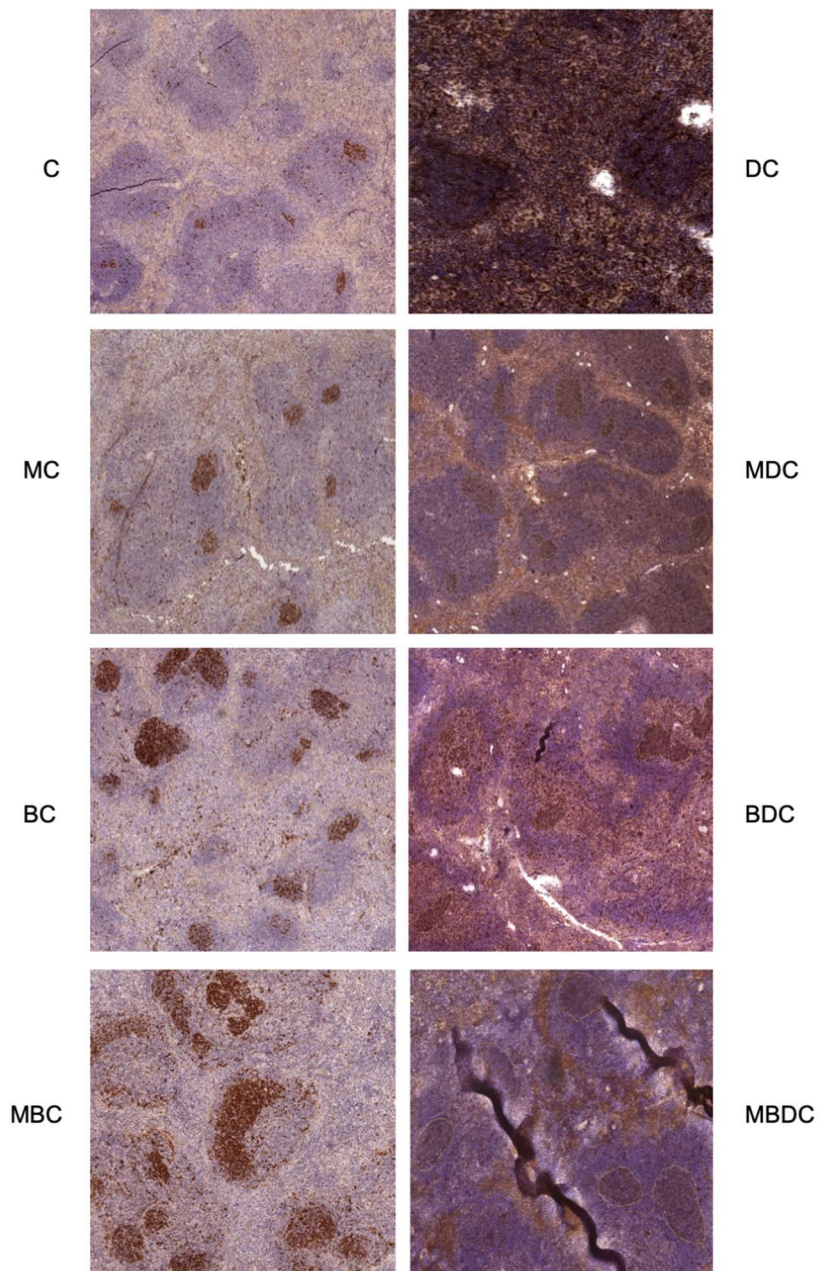


Abbildung 15 PNA-Färbungen der Keimzentren von Tieren der Genotypen C, DC, MC, MDC, BC, BDC, MBC und MBDC im Alter von 30 Wochen.

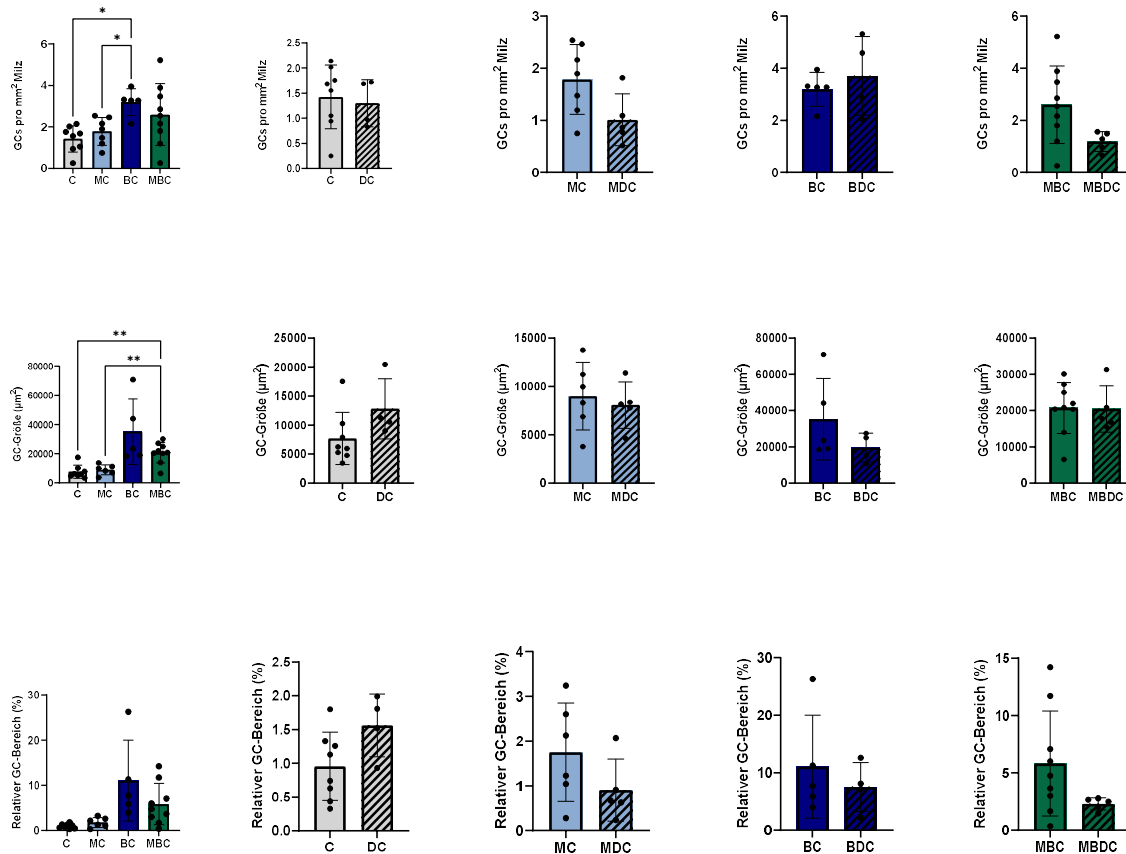


Abbildung 16 Quantifizierung der Keimzentren von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (GCs pro mm² Milz: n=8; GC-Größe und Relativer GC-Bereich: n=7), MDC (n=5), BC (n=5), BDC (n=4), MBC (GCs pro mm² Milz und Relativer GC-Bereich: n=9; GC-Größe: n=11) und MBDC (n=5) im Alter von 30 Wochen. *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01

Um die *in vivo* Auswirkungen der verschiedenen Mutationen zu beurteilen, wurden zusätzlich histologische Untersuchungen der Milzen durchgeführt. In diesem Rahmen wurden immunhistochemische PNA-Färbungen genutzt, um die Keimzentren innerhalb der Milz von Mäusen der verschiedenen Genotypen zu quantifizieren. Hierbei ging es vor allem darum, einen Einfluss der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die Größe und Menge der Keimzentren zu begutachten. Die Tiere wurden im Alter von 30 Wochen getötet und die Organe anschließend in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die verglichenen Genotypen wurden bereits beschrieben.

Die B Zellen innerhalb der Keimzentren exprimieren einen Liganden für Peanut-Agglutinin und können so identifiziert werden.

Zunächst wurden die Anzahl und Größe der Keimzentren sowie der Keimzentrum-Bereich pro Milzbereich der Genotypen C, MC, BC und MBC verglichen. Auch hier ließen sich die Ergebnisse von Flümann *et al.* (2021) weitestgehend nachbilden. BC-Tiere wiesen signifikant mehr Keimzentren auf als Wildtyp- (P = 0,0103) und MC-Tiere (P = 0,0297) (Abbildung 16). Bei der Betrachtung der Keimzentrum-Größe fiel eine signifikante Erhöhung in Mäusen des

Genotyps MBC verglichen mit Wildtyp-Mäusen ($P = 0,007$) und MC-Mäusen ($P = 0,0096$) auf (Abbildung 16).

Im Folgenden wurden auch hier Vergleiche der Genotypen C, MC, BC und MBC jeweils mit der zusätzlichen *Cd79b* p.Y195H-Mutation angestellt. Hierbei ließ sich jedoch kein signifikanter Effekt der zusätzlichen *Cd79b* p.Y195H-Mutation vor den einzelnen genetischen Hintergründen auf Anzahl, Größe oder Keimzentrums-Bereich pro Milzbereich feststellen (Abbildung 16).

Aus vorangegangenen Studien (Flümann *et al.*, 2021) ist bereits bekannt, dass sowohl *Myd88* als auch *BCL2* die Keimzentrumsbildung *in vivo* verstärken, die *Cd79b* p.Y195H-Mutation scheint hierbei jedoch keinen zusätzlichen Effekt zu haben.

4.5. Effekte der *Cd79b*-Mutation auf die B Zell-Entwicklung

4.5.1. Gating-Strategie

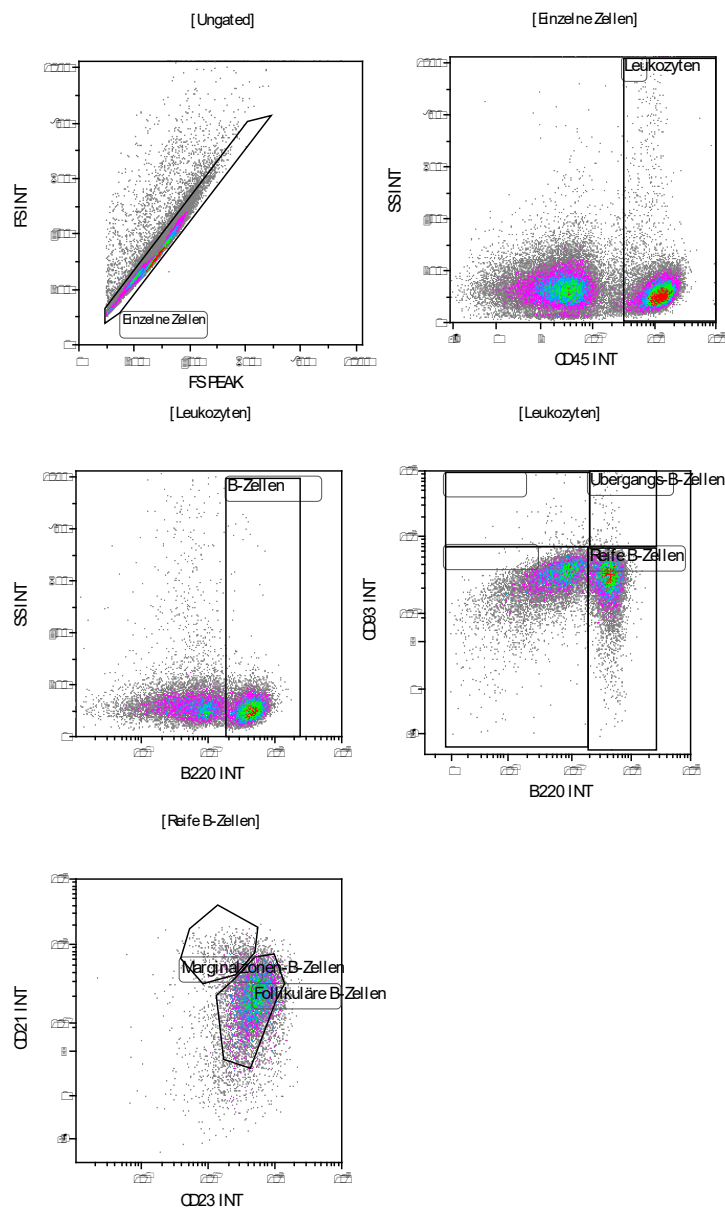


Abbildung 17 Durchflusszytometrie, Panel 1: Gating-Strategie zur Analyse der B Zell-Entwicklungsstadien.

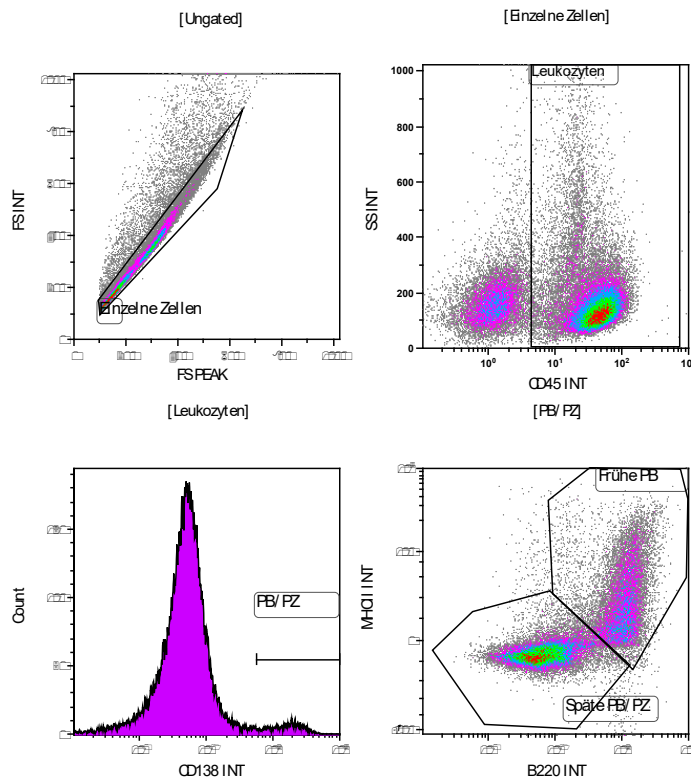


Abbildung 18 Durchflusszytometrie, Panel 2: Gating-Strategie zur Analyse der B Zell-Entwicklungsstadien. PB = Plasmablasten, PZ = Plasmazellen.

Die Auswirkungen der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die B Zell-Entwicklung wurden durch die Quantifizierung der einzelnen Entwicklungsstadien untersucht.

Um Aussagen über die Anteile der verschiedenen B Zell-Entwicklungsstadien an der Gesamtheit aller Splenozyten treffen zu können, war es nötig, eine Gating-Strategie zu wählen, durch die diese spezifischen Populationen herausgefiltert wurden.

Es wurden hierfür zwei FACS-Panels verwendet, um die jeweiligen Oberflächenmarker anzufärben. Die Zusammensetzung der Panels ist in der Tabelle 10 dargestellt. Panel 1 diente der Quantifizierung von Übergangs-B Zellen, Marginalzonen-B Zellen und folliculären B Zellen (Abbildung 17). Panel 2 wurde zur Analyse von frühen Plasmablasten und späten Plasmablasten beziehungsweise Plasmazellen verwendet (Abbildung 18).

In beiden Panels erfolgte zunächst ein Gating der einzelnen Zellen, um Zelltrümmer sowie Zellaggregate von der Analyse auszuschließen (Abbildung 17, Abbildung 18). Anschließend wurde die CD45-positive Leukozytenpopulation herausgefiltert (Abbildung 17, Abbildung 18). Zu dieser Population wurden die einzelnen Entwicklungsstadien bei der Analyse ins Verhältnis gesetzt.

In Panel 1 wurden die B220-positiven Zellen innerhalb der Leukozyten gated. Diese Gruppe repräsentiert die B Zellen (Abbildung 17). Zudem wurden innerhalb der Leukozyten die B220-

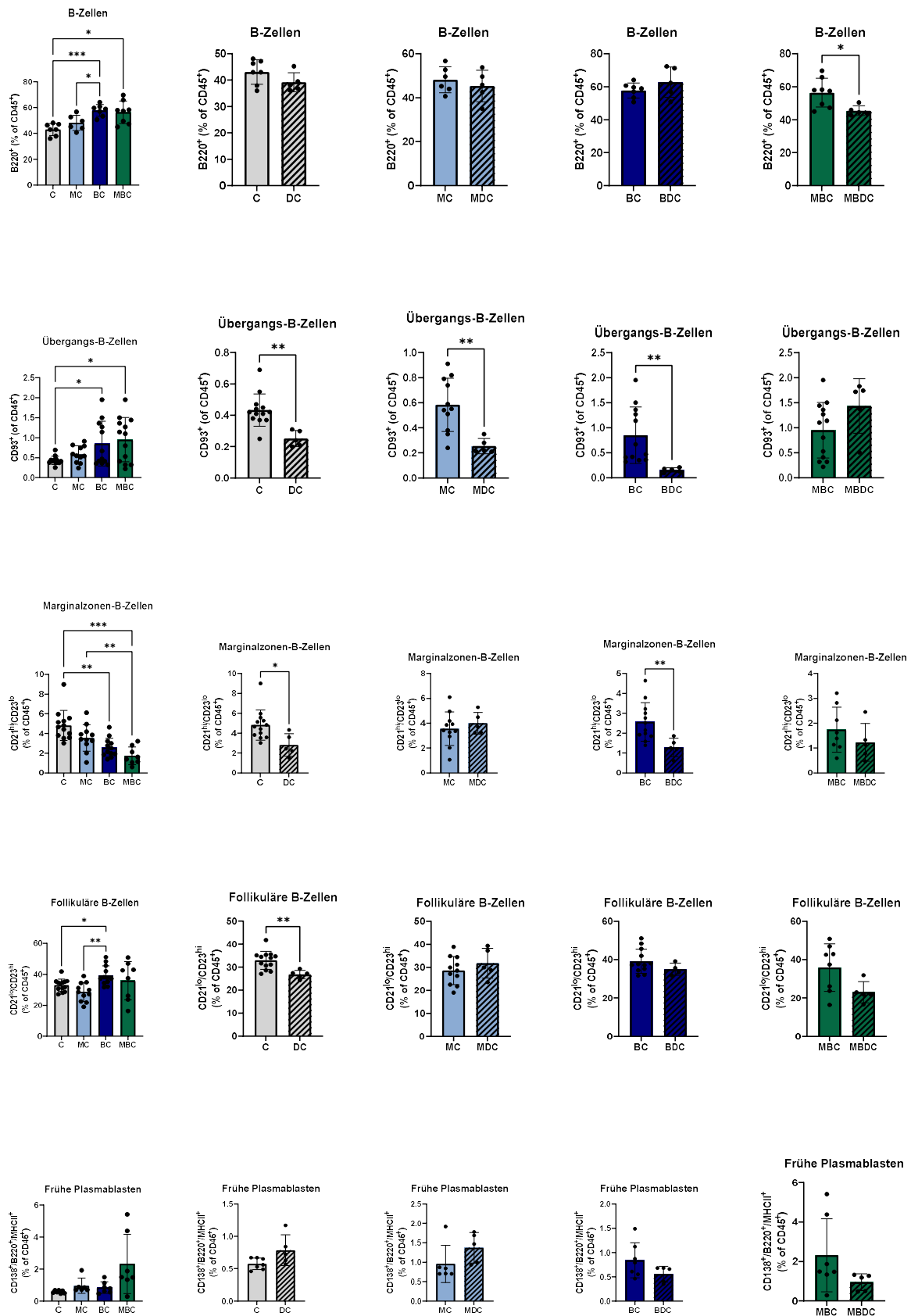
positiven und CD93-positiven Übergangs-B Zellen sowie die B220-positiven und CD93-negativen reifen B Zellen herausgefiltert (Abbildung 17). Innerhalb der reifen B Zellen konnte anschließend anhand der Expression von CD21 und CD23 zwischen Marginalzonen-B Zellen (CD21^{high}/CD23^{low}) und follikulären B Zellen (CD21^{low}/CD23^{high}) unterschieden werden (Abbildung 17).

In Panel 2 wurden die CD138-positiven Zellen innerhalb der Leukozyten gated (Abbildung 18). Innerhalb dieser CD138-positiven Zellen wurde zwischen B220- und MHC II-positiven frühen Plasmablasten und B220- und MHC II-negativen späten Plasmablasten beziehungsweise Plasmazellen differenziert (Abbildung 18).

Tabelle 10 FACS-Panels für die Immunphänotypisierung der Splenozyten.

Panel	Antikörper	Fluorochrom	Detektor
1	CD23	PE	FL 2
1	CD93	PE-Cy7	FL 5
1	CD21	APC	FL 6
1	CD45	APC-Cy7	FL 8
1	B220	Pac.Blue	FL 9
2	CD138	PE-Cy7	FL 5
2	MHC II	AF700	FL 7
2	CD45	APC-Cy7	FL 8
2	B220	Pac.Blue	FL 9

4.5.2. Quantifizierung der B Zell-Entwicklungsstadien



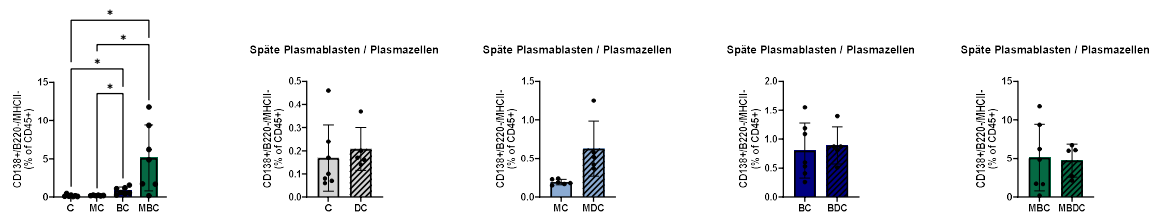


Abbildung 19 Durchflusszytometrie: Quantifizierung der einzelnen B-Zell-Entwicklungsstadien innerhalb der Splenozyten im Verhältnis zu der Gesamtheit der CD45-positiven Zellen der Genotypen C ($n > 5$), DC ($n = 5$), MC ($n > 5$), MDC ($n = 5$), BC ($n > 5$), BDC ($n > 3$), MBC ($n > 5$) und MBDC ($n = 5$) im Alter von 30 Wochen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde eine Immunphänotypisierung von Splenozyten durchgeführt. Ziel war es, einen genaueren Einblick zu bekommen, in welchem Ausmaß die einzelnen B-Zell-Entwicklungsstadien vorkommen. Insbesondere im Hinblick auf die Keimzentrams-Hyperplasie, die in BC- und MBC-Tieren beobachtet wurde, war die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung von Interesse.

Die Zellen stammten von 30-Wochen alten Mäusen der Genotypen C, DC, MC, DMC, BC, BDC, MBC und MBDC.

Um die einzelnen Subpopulationen herauszufiltern, erfolgte eine Färbung mit für das jeweilige Entwicklungsstadium typischen Markern, die Gating-Strategie wurde im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Wie bereits in den zuvor beschriebenen Untersuchungen erfolgte innerhalb der einzelnen Zellpopulationen zunächst ein Vergleich zwischen den Genotypen C, MC, BC und MBC. Anschließend wurden diese Genotypen jeweils mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation gegenübergestellt und mögliche Unterschiede analysiert.

Hinsichtlich der Menge an B-Zellen fiel eine signifikante Erhöhung dieser Subpopulation in BC-Tieren im Vergleich zu Wildtyp- ($P = 0,0009$) und MC-Tieren ($P = 0,0284$) auf (Abbildung 19). Auch eine Kombination der *BCL2*- und *Myd88*-Mutation scheint die Menge an B-Zellen zu erhöhen. Dies zeigt der signifikante Unterschied zwischen MBC- und Wildtyp-Mäusen ($P = 0,0155$) (Abbildung 19). Durch die zusätzliche *Cd79b* p.Y195H-Mutation scheint es bei MBC-Mäusen eher zu einer Verminderung des Anteils der B-Zellen zu kommen, was durch den signifikanten Unterschied zwischen MBC- und MBDC-Tieren indiziert wird ($P = 0,0284$) (Abbildung 19). Ansonsten fiel kein signifikanter Effekt der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf.

Bei Betrachtung der Anteile der Übergangs-B-Zellen zeigten sowohl BC- ($P = 0,0352$) als auch MBC-Mäuse ($P = 0,0123$) einen signifikant höheren Anteil als Wildtyp-Mäuse (Abbildung 19). Vor den genetischen Hintergründen C ($P = 0,0016$), MC ($P = 0,0019$) und BC ($P = 0,0036$) konnte durch die zusätzliche *Cd79b* p.Y195H-Mutation eine signifikante Verminderung der Übergangs-B-Zellen beobachtet werden (Abbildung 19).

Im Hinblick auf die Marginalzonen-B Zellen wiesen MBC-Tiere hingegen einen signifikant verminderten Anteil dieser Population auf im Vergleich zu Wildtyp- ($P = 0,0001$) und MC-Tieren ($P = 0,007$) (Abbildung 19). Auch die *BCL2*-Mutation allein scheint im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ($P = 0,0013$) für eine Verminderung des Anteils an Marginalzonen-B Zellen zu sorgen (Abbildung 19). Sowohl bei Wildtyp- ($P = 0,0281$) als auch bei BC-Mäusen ($P = 0,0066$) konnte eine signifikante Erniedrigung der Subpopulation durch eine zusätzliche *Cd79b* p.Y195H-Mutation beobachtet werden (Abbildung 19).

Der Anteil an follikulären B Zellen unterschied sich signifikant zwischen den Genotypen BC verglichen mit den Genotypen C ($P = 0,0343$) und MC ($P = 0,0041$), wobei erstere einen signifikant höheren Anteil aufwiesen (Abbildung 19). In der weiteren Analyse zeigte sich lediglich vor dem genetischen Hintergrund C ein Einfluss der *Cd79b* p.Y195H-Mutation. Hierbei zeigte sich der Anteil an follikulären B Zellen in DC-Tieren signifikant erniedrigt verglichen mit Wildtyp-Tieren ($P = 0,0041$) (Abbildung 19).

Bei dem Vergleich der Menge an frühen Plasmablasten zwischen den einzelnen Genotypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, allerdings schien der Anteil dieser Zellen in MBC-Tieren tendenziell höher zu sein als in C-, MC- und BC-Tieren (Abbildung 19).

Bei der Betrachtung der späten Plasmablasten beziehungsweise Plasmazellen fiel eine erhöhte Menge dieser Subpopulation in MBC-Tieren verglichen mit Wildtyp- ($P = 0,0442$) und MC-Tieren ($P = 0,0442$) auf (Abbildung 19). Ebenso zeigte sich in BC-Mäusen ein signifikant höherer Anteil dieser Zellen als in Wildtyp- ($P = 0,0361$) und MC-Mäusen ($P = 0,0361$) (Abbildung 19). Ein signifikanter Effekt der *Cd79b* p.Y195H-Mutation vor den verschiedenen Hintergründen ergab sich nicht.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die *Cd79b* p.Y195H-Mutation die Zusammensetzung der B Zell-Subsets verschiebt, ohne einen klaren Entwicklungsblock zu erzeugen.

4.6. Serum-Immunglobulin-Spiegel

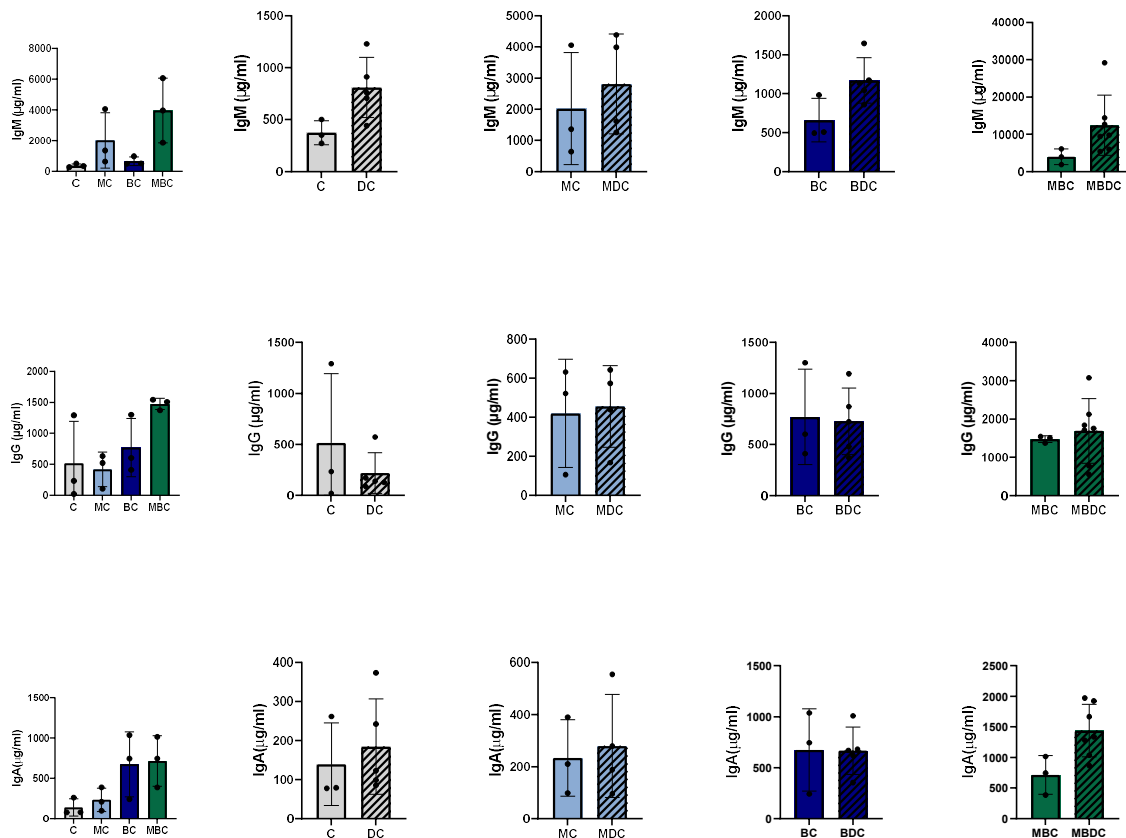


Abbildung 20 Serum-Immunglobulin-Spiegel: IgM-, IgG- und IgA-Serumspiegel von Tieren der Genotypen C (n = 3), DC (n = 5), MC (n = 3), MDC (n = 4), BC (n = 3), BDC (n = 5), MBC (n = 3) und MBDC (n = 7) im Alter von 30 Wochen.

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, zeigte sich der Anteil an späten Plasmablasten und Plasmazellen in MBC-Tieren deutlich erhöht. Zur Überprüfung, ob diese Tiere auch erhöhte Serum-Immunglobulin-Spiegel aufweisen, und zur Beurteilung des Anteils von IgM, IgG und IgA, wurden ELISAs durchgeführt. Auch hier wurde speziell ein möglicher Einfluss der *Cd79b* p.Y195H-Mutation untersucht.

Bei dem Vergleich der Serum-Immunglobulin-Spiegel von 30-Wochen-alten Tieren, zeigten sich im Hinblick auf die IgM-Spiegel in MBC-Tieren zwar tendenziell höhere Spiegel als in C-, MC- und BC-Tieren, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 20). Auch die zusätzliche *Cd79b* p.Y195H-Mutation scheint vor den verschiedenen Hintergründen zu höheren IgM-Serumspiegeln zu führen, allerdings ließen sich bei dem Vergleich der einzelnen Genotypen auch hier keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abbildung 20).

Die Messung der IgG-Spiegel in Tieren der verschiedenen Genotypen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 20). Es ließen sich hier lediglich tendenziell erhöhte IgG-Spiegel in Tieren des Genotyps MBC im Vergleich zu Tieren des Genotyps C, MC und BC beobachten (Abbildung 20).

In Bezug auf die IgA-Serumspiegel ließen sich weder bei dem Vergleich der Genotypen C, MC, BC und MBC noch bei dem Vergleich der einzelnen Genotypen jeweils mit der zusätzlichen *Cd79b* p.Y195H-Mutation signifikante Unterschiede feststellen (Abbildung 20).

4.7. Tumor-Charakterisierung

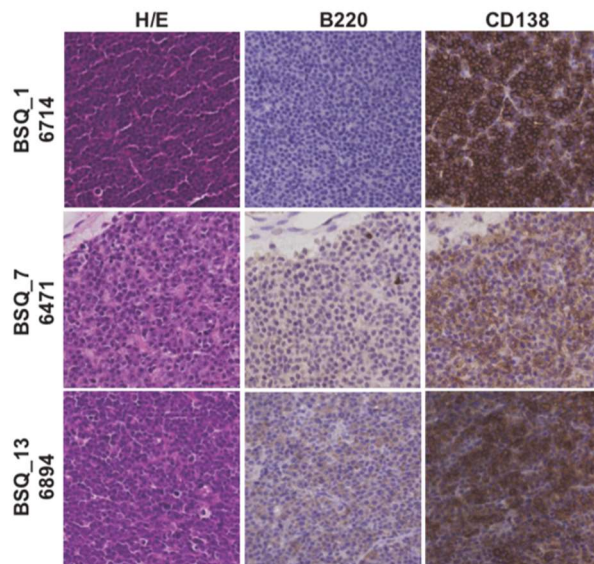


Abbildung 21 Immunhistochemie: H/E-, B220- und CD138-Färbung von MBDC-Tieren

Im Verlauf der Erkrankung entwickelt ein Teil der untersuchten Tiere klinisch manifeste Tumoren, die im Folgenden histologisch und immunphänotypisch näher charakterisiert werden.

Die aus MBDC-Tieren isolierten Tumoren wurden immunhistochemisch untersucht, um einen Einfluss der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf das Differenzierungsmuster der Tumorzellen zu evaluieren.

Durch immunhistochemische Färbungen erfolgte eine Beurteilung der Lymphome von Tieren des Genotyps MBDC (*Myd88*^{c-p.L252P/WT}; *Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/WT}; *Cd79b*^{p.Y195H/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}). Exemplarisch sind Ausschnitte von Tumorfärbungen von drei dieser Tiere dargestellt (Abbildung 21).

In den H/E-Färbungen waren deutliche Infiltrate von Tumorzellen zu erkennen (Abbildung 21). Die Lymphome zeigten keine Expression von B220 (Abbildung 21). Die Untersuchung der Tumoren auf CD138 fiel hingegen positiv aus (Abbildung 21). Diese Eigenschaften wurden von Flümman *et al.* (2021) auch bereits bei Lymphomen von Mäusen mit den Genotypen BC (*Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}) und MBC (*Myd88*^{c-p.L252P/WT}; *Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/WT}; *Cd19*^{Cre/WT}) beobachtet. Das CD138-Färbungsmuster variierte hinsichtlich seiner Intensität zwischen den einzelnen Lymphomen.

Die MBDC-Lymphome scheinen also, wie auch die MBC-Lymphome, ein post-Keimzentrums-Plasmablasten-Differenzierungsmuster zu repräsentieren. Somit ergibt sich kein Hinweis auf eine *Cd79b*-bedingte Verschiebung des Tumorphänotyps.

5. Diskussion

5.1. Einleitung und Überblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Rolle der *Cd79b* p.Y195H-Mutation im Kontext des diffus großzelligen B Zell-Lymphoms (DLBCL) unter experimentellen Bedingungen untersucht. Die *CD79B*-Mutation zählt zu den häufigsten genetischen Veränderungen im sogenannten MCD/C5-DLBCL-Subtyp, einer molekular definierten Untergruppe des DLBCL.^{23,24} Diese Mutation betrifft einen konservierten Tyrosinrest innerhalb des ITAM-Motivs von CD79B, der für die Signaltransduktion des B Zell-Rezeptors (BCR) essenziell ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die isolierten sowie kombinierten Effekte dieser Mutation auf die B Zell-Entwicklung, die BCR-Signalübertragung und die Lymphomentstehung mithilfe eines genetisch modifizierten Mausmodells zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf der Analyse sowohl akuter funktioneller Veränderungen (z. B. Rezeptorinternalisierung) als auch auf chronischen pathophysiologischen Veränderungen im Organismus (z. B. Immunglobulinproduktion, Keimzentrumsarchitektur und Tumorphänotyp).

5.2. Diskussion der Hauptergebnisse

5.2.1. Die *Cd79b* p.Y195H-Mutation beeinflusst die BCR-Internalisierung und -Signalgebung

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis einer verminderten B Zell-Rezeptor-Internalisierung infolge der *Cd79b* p.Y195H-Mutation. Damit bestätigt das Modell funktionell, dass die Mutation im ITAM-Motiv von CD79B – analog zu der Arbeit von Gazumyan *et al.* – eine Störung der negativen Rückkopplung des BCR-Signalwegs bewirkt. Hervorzuheben ist die selektive Beeinträchtigung der konstitutiven BCR-Internalisierung, wohingegen die Liganden-induzierte BCR-Internalisierung erhalten blieb. Diese Beobachtung unterscheidet sich von der Arbeit von Gazumyan *et al.*, bei der eine umfassende Störung der BCR-Internalisierung beschrieben wurde. Es ist allerdings zu beachten, dass in dem Modell von Gazumyan *et al.* eine Doppelmutation beider CD79B-ITAM-Tyrosine verwendet wurde, wohingegen in der vorliegenden Arbeit lediglich das erste CD79B-ITAM-Tyrosin verändert wurde. Hierdurch lässt sich potenziell erklären, dass der Mechanismus der Liganden-induzierten BCR-Internalisierung in dem hier verwendeten Modell funktionell intakt bleibt. Die einzelne Mutation scheint vorrangig die konstitutive Internalisierung zu beeinträchtigen.

Eine reduzierte Internalisierung kann zu einer prolongierten Oberflächenverweildauer des BCR führen, was wiederum chronisch aktive Signale begünstigen kann. Diese Konstellation

ist besonders relevant im Kontext des ABC-DLBCL, bei dem eine chronische Aktivierung des BCR-Signalwegs als pathogenetischer Treiber gilt.⁸³

Da BCR-abhängige Signalwege therapeutisch adressierbar sind, ist die funktionelle Einordnung der *Cd79b*-Mutation unmittelbar für die klinische Translation relevant.

5.2.2. Veränderungen in der B Zell-Entwicklung und Organmorphologie

Hinsichtlich der chronischen Effekte der Mutationen auf die Milzstruktur und die mögliche Entwicklung einer Splenomegalie ließen sich die Ergebnisse von Flümann *et al.* (2021) reproduzieren. Die Expression der *Myd88*-Mutation in Kombination mit der *BCL2*-Mutation führte zu Veränderungen der Milzstruktur mit nachgewiesener Splenomegalie. Histologisch zeigte sich eine Vermehrung und Vergrößerung von Keimzentren, was auf eine gesteigerte oder dysregulierte B Zell-Aktivierung und -Proliferation hindeutet. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein zusätzlicher Effekt der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die Organmorphologie festgestellt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich durch die *Cd79b* p.Y195H-Mutation das Verhältnis verschiedener B Zell-Entwicklungsstadien im Milzkompartiment verschob. Insbesondere fiel ein verminderter Anteil von Übergangs-B Zellen, Marginalzonen-B Zellen sowie follikulären B Zellen durch die zusätzliche *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf. Ein Entwicklungsblock – wie er bei stark transformierenden Mutationen auftreten kann – wurde hingegen nicht beobachtet.

5.2.3. Immunglobulinspiegel als funktioneller Surrogatparameter

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war die Analyse der Serum-Immunglobulin-Spiegel. Wenngleich sich hierbei keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen, scheint die *Cd79b* p.Y195H-Mutation vor den verschiedenen genetischen Hintergründen zu einer Erhöhung der IgM-Serumspiegel zu führen. Diese Befunde stützen die funktionelle Konsequenz der Mutation auf den BCR-Oberflächenumsatz, da eine verlängerte Oberflächenverweildauer auch eine quantitativ verstärkte Plasmazelldifferenzierung und IgM-Sekretion begünstigen kann. Hinsichtlich der anderen untersuchten Immunglobulin-Klassen (IgG und IgA) ließ sich keine derartige Erhöhung beobachten. Dies lässt eine unvollständige Klassenwechselreaktion (CSR) der B Zellen vermuten.

5.2.4. Tumorphänotyp der Tiere mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Tumore zeigten, dass Tiere mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation einen Tumorphänotyp entwickeln, der dem humanen ABC-DLBCL-Phänotyp ähnelt. Die positive Färbung für CD138 spricht für eine plasmablastische

Differenzierungslinie. Damit konnte das Modell erfolgreich einen der beschriebenen humanen DLBCL-Subtypen nachbilden.²³ Dies validiert die Relevanz der Mutation und unterstreicht die Eignung des Mausmodells als präklinische Plattform für weitere Untersuchungen.

5.3. Limitationen der Arbeit

Trotz der gewonnenen Erkenntnisse weist die vorliegende Arbeit mehrere Limitationen auf, die die Interpretation und Generalisierbarkeit der Ergebnisse einschränken.

Obwohl das generierte Mausmodell gezielte Rückschlüsse auf die Auswirkungen der *Cd79b* p.Y195H-Mutation erlaubt, bildet es nicht vollständig die humane Tumorerogenität ab.

Es wurden keine Analysen hinsichtlich der Signalkaskaden, die CD79B nachgeschaltet sind, durchgeführt.

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit keine therapeutischen Interventionen untersucht. Eine Beurteilung der Eignung des Modells in Bezug auf zielgerichtete Therapien ist daher nicht möglich.

Die genannten Limitationen grenzen die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit ein. Einige davon eröffnen gleichzeitig gezielte Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen, wie im folgenden Ausblick erläutert wird.

5.4. Aktueller molekularer Kontext der *CD79B*-Achse

Aktuelle Arbeiten zur genomischen Einteilung des DLBCL zeigen, dass bestimmte Tumorguppen durch wiederkehrende Aktivierungen zentraler Signalwege geprägt sind. Hierbei sind insbesondere die Achsen BCR, TLR und NF κ B zu nennen.¹⁰⁴

Veränderungen in *MYD88* und *CD79B* treten in klinisch relevanten genetischen Subtypen häufig gemeinsam auf und gelten als funktionell bedeutsam für die Aktivierung überlebensfördernder Signalwege.²⁴

Präklinische Daten aus autochthonen Mausmodellen zeigen, dass die *Cd79b*-Mutation in einem *Myd88*-getriebenen Kontext mit einem IgM-positiven Tumorphänotyp einhergehen kann und mit einer Ibrutinib-Sensitivität assoziiert ist.¹⁰⁵

Damit liefern die vorliegenden Ergebnisse eine plausible biologische Verbindung zwischen Veränderungen der BCR-Signalweiterleitung und potenziellen therapeutischen Angriffsmöglichkeiten in definierten genetischen Konstellationen.

5.5. Klinische und wissenschaftliche Relevanz der Ergebnisse

Im onkologischen Kontext unterstreichen die Daten die Rolle der *Cd79b* p.Y195H-Mutation als potenziell transformierenden Faktor, insbesondere in Kombination mit anderen Mutationen wie

Myd88 und *BCL2*. *Cd79b*-mutierte B Zellen scheinen nicht nur zu überleben, sondern auch durch chronische Signalaktivierung selektive Wachstumsvorteile zu erlangen.

Das Mausmodell bietet eine wertvolle präklinische Plattform, insbesondere zur Testung von BCR-Signalweg-Inhibitoren und zur Identifikation von Kooperationsmechanismen mit weiteren Mutationen (z. B. *BCL2*, *Myd88*). Diese Inhibitoren könnten in künftigen Studien auf ihre Wirksamkeit getestet werden.

In klinischer Hinsicht könnten *Cd79b* p.Y195H-Mutationen künftig als therapiestratifizierende Marker zur Anwendung kommen.

5.6. Ausblick und Perspektiven für Folgeprojekte

Aufbauend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen und deren begrenzende Faktoren ergeben sich mehrere Perspektiven für künftige Projekte.

-Funktionelle Analysen: Zur Untersuchung der Einflüsse der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf nachgeschaltete Signalwege wäre die Durchführung einer RNA-Sequenzierung sinnvoll. Hierbei ließe sich feststellen, welche Gene infolge der Mutation hoch- oder herunterreguliert sind. Durch die Phosphoproteomik ließen sich weitere Informationen darüber gewinnen, welche Proteine in Zellen mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation phosphoryliert sind. Somit könnten direkte Effekte auf die Signalweiterleitung untersucht werden.

-Therapeutische Interventionen: In-vivo-Testung zielgerichteter Inhibitoren wie Ibrutinib oder Venetoclax (gegebenenfalls in Kombination). Flümman *et al.* zeigten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2023, dass Lymphome mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation eine selektive Empfindlichkeit gegenüber Ibrutinib aufwiesen, im Vergleich zu Lymphomen ohne diese Mutation. Dies ist auf einen Einfluss der Mutation auf die interne BCR-Signalgebung zurückzuführen.

-Immunologische Mikroumgebung: Die Untersuchung der Tumormikroumgebung, also die Untersuchung aller Zellen und Strukturen, die mit dem Tumor interagieren, wäre für das weitere Krankheitsverständnis sinnvoll. Außerdem könnte man gegebenenfalls feststellen, ob sich die Wirkung von zielgerichteten Therapien durch Immunmodulation verbessern lässt.

-Immunisierungsexperimente: Durch die Durchführung von Immunisierungsexperimenten ließen sich mögliche Effekte der *Cd79b* p.Y195H-Mutation auf die humorale Immunantwort feststellen. In diesem Rahmen könnte man beispielsweise die Funktionalität des Klassenwechsels, die Antikörperantwort, die Affinitätsreifung im Keimzentrum sowie die Funktionalität der Plasmazell- und Gedächtniszellbildung analysieren.

-Autoreaktivität: Es wäre denkbar, dass die *Cd79b* p.Y195H-Mutation für eine vermehrte Entstehung von Autoantikörpern sorgt. Durch die chronisch aktive BCR-Signalgebung wird ein Zustand ständiger Antigenbindung simuliert. Zurückliegende Untersuchungen zeigten, dass durch eine gestörte BCR-Signaltransduktion autoreaktive B Zellen persistieren können, indem

sie der Anergie entkommen. ⁵ In weiterführenden Untersuchungen wäre es daher beispielsweise sinnvoll, das Vorhandensein von autoreaktiven Antikörpern im Serum von Tieren mit der *Cd79b* p.Y195H-Mutation zu überprüfen.

-Klinische Validierung: Prospektive Korrelation von *CD79B*-Mutationsstatus mit Therapieansprechen.

5.7. Fazit

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass die *Cd79b* p.Y195H-Mutation primär Einflüsse auf die BCR-Signalgebung mit entsprechenden funktionellen Konsequenzen hat.

Gleichzeitig zeigen die Daten, dass bestimmte zentrale Prozesse der B Zell-Biologie durch die *Cd79b* p.Y195H-Mutation weitgehend unbeeinflusst bleiben. Insbesondere die strukturelle Organisation lymphatischer Organe bleibt weitgehend intakt.

In dem verwendeten Mausmodell ist *Cd79b* früh in der B Zell-Linie aktiv (*Cd19Cre*). Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer beschleunigten Lymphomagenese durch die *Cd79b* p.Y195H-Mutation ist, dass die frühzeitige und konstitutive Verstärkung der BCR-Signalgebung in unreifen B Zellen bevorzugt Toleranzmechanismen wie Anergie oder klonale Deletion auslöst. ¹⁰⁶ An den B Zell-Checkpoints führen überstarke oder persistente BCR-Signale physiologischerweise nicht zur Expansion, sondern zur negativen Selektion autoreaktiver Klone. ^{107, 108} Dies könnte den Pool potentiell transformierbarer B Zellen reduzieren und damit einen pro-onkogenen Effekt der *Cd79b* p.Y195H-Mutation funktionell kompensieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Flümann R, Nieper P, Reinhardt HC, Knittel G. New murine models of aggressive lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 2020; **61**(4): 788-98.
2. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol* 2020; **1254**: 1-22.
3. Murphy K, Weaver C. Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten. *Janeway Immunologie* 2018: 377-440.
4. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010; **28**(27): 4184-90.
5. Young RM, Phelan JD, Wilson WH, Staudt LM. Pathogenic B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies: New insights to improve treatment. *Immunol Rev* 2019; **291**(1): 190-213.
6. Boyd SD, Joshi SA. High-Throughput DNA Sequencing Analysis of Antibody Repertoires. *Microbiol Spectr* 2014; **2**(5).
7. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 2012; **12**(7): 517-31.
8. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; **302**(5909): 575-81.
9. Fugmann SD. The origins of the Rag genes--from transposition to V(D)J recombination. *Semin Immunol* 2010; **22**(1): 10-6.
10. Chi X, Li Y, Qiu X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology* 2020; **160**(3): 233-47.
11. Murphy K, Weaver C. Die Entstehung von Antigenrezeptoren in Lymphocyten. *Janeway Immunologie* 2018: 221-71.
12. Abbas AK LA, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. *Philadelphia: Saunders Elsevier* 2007.
13. Siegenthaler W A-VB. Klinische Pathophysiologie : 239 Tabellen. 9., völlig neu bearb. Aufl.. ed. Stuttgart {[u.a.]}. *Thieme* 2006.
14. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; **74**(5): 261-71.
15. Schmidlin H, Diehl SA, Blom B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol* 2009; **30**(6): 277-85.
16. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**: 429-57.
17. Murphy K, Weaver C. Die humorale Immunantwort. *Janeway Immunologie* 2018: 517-80.
18. Livák F, Petrie HT. Somatic generation of antigen-receptor diversity: a reprise. *Trends Immunol* 2001; **22**(11): 608-12.
19. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**(3): 172-84.
20. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; **403**(6769): 503-11.
21. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(17): 9991-6.
22. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 2006; **354**(23): 2431-42.
23. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018; **24**(5): 679-90.
24. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2018; **378**(15): 1396-407.

25. Rui L, Schmitz R, Ceribelli M, Staudt LM. Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol* 2011; **12**(10): 933-40.
26. Steen CB, Luca BA, Esfahani MS, et al. The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2021; **39**(10): 1422-37.e10.
27. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**(3): 209-49.
28. Berenblum I. The Mechanism of Carcinogenesis. A Study of the Significance of Cocarcinogenic Action and Related Phenomena. *Cancer Research* 1941; **1**(10): 807-14.
29. Grafström RC, Norén UG, Zheng X, Elfving Å, Sundqvist K. Growth and Transformation of Human Oral Epithelium In Vitro. In: Müller-Hermelink HK, Neumann HG, Dekant W, editors. Risk and Progression Factors in Carcinogenesis; 1997 1997//; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 275-306.
30. Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(18).
31. Kanapathipillai M. Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers (Basel)* 2018; **10**(6).
32. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 2001; **322**(7301): 1536-8.
33. Shaheen M, Allen C, Nickoloff JA, Hromas R. Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* 2011; **117**(23): 6074-82.
34. Behl C, Ziegler C. Molekulare Mechanismen der Zellalterung und ihre Bedeutung für Alterserkrankungen des Menschen. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. pp. 23–108.; 2016.
35. Tabatabai A, Arora A, Höfmann S, et al. Mouse models of diffuse large B cell lymphoma. *Front Immunol* 2023; **14**: 1313371.
36. Alt-Epping B, Alt-Epping S, Quintel M, Nauck F. [Developments in modern oncology. Ramifications for anesthesia and intensive care medicine]. *Anaesthesist* 2009; **58**(8): 821-6.
37. Bier H. Chemotherapieresistenz – Mechanismen und Möglichkeiten der Überwindung. *Oto-Rhino-Laryngologia Nova* 2010; **1**(1): 9-15.
38. Nowakowski GS, Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2015; (35): e449-e57.
39. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127**(20): 2375-90.
40. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; **87**(2): 146-71.
41. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; **311**(23): 1471-5.
42. Nakamura N, Abe M. Richter syndrome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathol Int* 2003; **53**(4): 195-203.
43. Gonzalez CL, Medeiros LJ, Jaffe ES. Composite lymphoma. A clinicopathologic analysis of nine patients with Hodgkin's disease and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1991; **96**(1): 81-9.
44. Zarate-Osorno A, Medeiros LJ, Longo DL, Jaffe ES. Non-Hodgkin's lymphomas arising in patients successfully treated for Hodgkin's disease. A clinical, histologic, and immunophenotypic study of 14 cases. *Am J Surg Pathol* 1992; **16**(9): 885-95.
45. Shaffer AL, 3rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**: 565-610.
46. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Pallasch CP, Reinhardt HC. Rewired NFκB signaling as a potentially actionable feature of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *European Journal of Haematology* 2016; **97**(6): 499-510.
47. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999; **10**(12): 1419-32.

48. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011; **117**(19): 5019-32.
49. Shi Y, Han Y, Yang J, et al. Clinical features and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma based on nodal or extranodal primary sites of origin: Analysis of 1,085 WHO classified cases in a single institution in China. *Chin J Cancer Res* 2019; **31**(1): 152-61.
50. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; **36**(7): 1720-48.
51. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge für erwachsene Patient*innen mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom und verwandten Entitäten, Langversion 1.0, 2022, AWMF-Registernummer: 018/038OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/dlbcl/>; Zugriff am [24.10.2023].
52. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**(6): a000109.
53. Nagel D, Vincendeau M, Eitelhuber AC, Krappmann D. Mechanisms and consequences of constitutive NF-kB activation in B-cell lymphoid malignancies. *Oncogene* 2014; **33**(50): 5655-65.
54. Georg Lenz BC, Bertram Glaß, Ulrike Holtkamp, Felix Keil, Wolfram Klapper, Maïke Nickelsen, Urban Novak, Heinz Schmidberger, Clemens A. Schmitt, Clemens-Martin Wendtner. Onkopedia Leitlinie "Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom", Stand Dezember 2025. 2025. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom/@guideline/html/index.html> (accessed 03.02.2026).
55. Morschhauser F, Salles G, Sehn LH, et al. Five-Year Outcomes of the POLARIX Study Comparing Pola-R-CHP and R-CHOP in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2025; **43**(35): 3698-705.
56. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* 2020; **37**(4): 551-68.e14.
57. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood* 2016; **127**(22): 2732-41.
58. Wilson WH, Wright GW, Huang DW, et al. Effect of ibrutinib with R-CHOP chemotherapy in genetic subtypes of DLBCL. *Cancer Cell* 2021; **39**(12): 1643-53.e3.
59. Locke FL, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2021; **386**(7): 640-54.
60. Roberts ZJ, Better M, Bot A, Roberts MR, Ribas A. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. *Leuk Lymphoma* 2018; **59**(8): 1785-96.
61. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev* 2019; **34**: 45-55.
62. Horwitz SM, Negrin RS, Blume KG, et al. Rituximab as adjuvant to high-dose therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; **103**(3): 777-83.
63. Kewalramani T, Zelenetz AD, Nimer SD, et al. Rituximab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2004; **103**(10): 3684-8.
64. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; **26** Suppl 5: v116-25.
65. Flümman R, Rehkämper T, Nieper P, et al. An Autochthonous Mouse Model of Myd88- and BCL2-Driven Diffuse Large B-cell Lymphoma Reveals Actionable Molecular Vulnerabilities. *Blood Cancer Discov* 2021; **2**(1): 70-91.
66. Razani B, Reichardt AD, Cheng G. Non-canonical NF-kB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev* 2011; **244**(1): 44-54.

67. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; **25**(51): 6680-4.
68. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 693-733.
69. Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 2001; **20**(50): 7342-51.
70. Tracey L, Pérez-Rosado A, Artiga MJ, et al. Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol* 2005; **206**(2): 123-34.
71. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017; **2**: 17023-.
72. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; **470**(7332): 115-9.
73. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**(1): a011247.
74. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**(7): 499-511.
75. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009; **459**(7247): 717-21.
76. Loiarro M, Volpe E, Ruggiero V, et al. Mutational analysis identifies residues crucial for homodimerization of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and for its function in immune cells. *J Biol Chem* 2013; **288**(42): 30210-22.
77. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010; **465**(7300): 885-90.
78. Ye H, Arron JR, Lamothe B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 2002; **418**(6896): 443-7.
79. Xia ZP, Sun L, Chen X, et al. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 2009; **461**(7260): 114-9.
80. Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 447-91.
81. Green NM, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. *Semin Immunol* 2011; **23**(2): 106-12.
82. Avbelj M, Wolz OO, Fekonja O, et al. Activation of lymphoma-associated MyD88 mutations via allostery-induced TIR-domain oligomerization. *Blood* 2014; **124**(26): 3896-904.
83. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; **463**(7277): 88-92.
84. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev* 2005; **208**: 50-65.
85. Gazumyan A, Reichlin A, Nussenzweig MC. Ig beta tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *J Exp Med* 2006; **203**(7): 1785-94.
86. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**(4): 251-62.
87. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, et al. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 2006; **441**(7089): 106-10.
88. Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, et al. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 1995; **83**(2): 301-11.
89. Lenz G, Nagel I, Siebert R, et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 2007; **204**(3): 633-43.
90. Liu W, Meckel T, Tolar P, Sohn HW, Pierce SK. Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling. *Immunity* 2010; **32**(6): 778-89.
91. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009; **10**(12): 1292-9.

92. Martin SW, Goodnow CC. Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* 2002; **3**(2): 182-8.
93. Horikawa K, Martin SW, Pogue SL, et al. Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *J Exp Med* 2007; **204**(4): 759-69.
94. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**(4): 219-32.
95. Yang C, David L, Qiao Q, Damko E, Wu H. The CBM signalosome: potential therapeutic target for aggressive lymphoma? *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; **25**(2): 175-83.
96. Shen Y, Iqbal J, Huang JZ, Zhou G, Chan WC. BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. *Blood* 2004; **104**(9): 2936-9.
97. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; **57**(1): 79-88.
98. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993; **75**(2): 229-40.
99. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(36): 13520-5.
100. Dierlamm J, Murga Penas EM, Bentink S, et al. Gain of chromosome region 18q21 including the MALT1 gene is associated with the activated B-cell-like gene expression subtype and increased BCL2 gene dosage and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2008; **93**(5): 688-96.
101. Testoni M, Zucca E, Young KH, Bertoni F. Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2015; **26**(6): 1069-80.
102. Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, et al. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 2012; **44**(12): 1316-20.
103. Kretzmer H, Bernhart SH, Wang W, et al. DNA methylome analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. *Nat Genet* 2015; **47**(11): 1316-25.
104. Young RM, Shaffer AL, 3rd, Phelan JD, Staudt LM. B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol* 2015; **52**(2): 77-85.
105. Flümman R, Hansen J, Meinel J, et al. An inducible Cd79b mutation confers ibrutinib sensitivity in mouse models of Myd88-driven diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2024; **8**(5): 1063-74.
106. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 2010; **11**(8): 681-8.
107. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 2017; **17**(5): 281-94.
108. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 2007; **7**(8): 633-43.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zuchtschema der Cd79b ^{p.Y195H/p.Y195H} -Maus.....	35
Abbildung 2 Allel-Design des Cd79b Knock-in Allels.	37
Abbildung 3 Sanger-Sequenzierung: mRNA-Sequenz von Wildtyp (oben) und Cd79b ^{p.Y195H/p.Y195H} -Tieren (unten).	43
Abbildung 4 Durchflusszytometrie: CD79B-Oberflächenexpression in B Zellen von Wildtyp- (oben) und Cd79b ^{p.Y195H/p.Y195H} -Tieren (unten).	44
Abbildung 5 Konstitutive (links) und Liganden-vermittelte (rechts) B Zell-Rezeptor-Internalisierung von WT- und CD-Tieren. ___ = Mittelwert; - - = Fehlerindikatoren (Standardabweichung).	44
Abbildung 6 Milzvolumina von Tieren der Genotypen C (n=3), DC (n=6), MC (n=3), MDC (n=4), BC (n=3), BDC (n=6), MBC (n=8) und MBDC (n=6) im Alter von 10 Wochen. *, $P \leq 0,05$	46
Abbildung 7 Milzvolumina von Tieren der Genotypen C (n=3), DC (n=6), MC (n=3), MDC (n=5), BC (n=3), BDC (n=5), MBC (n=7) und MBDC (n=5) im Alter von 30 Wochen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$	46
Abbildung 8 Milzvolumina von Tieren der Genotypen C (n=3), DC (n=6), MC (n=3), MDC (n=5), BC (n=3) und BDC (n=4) im Alter von 50 Wochen.....	47
Abbildung 9 Gewicht der Milz von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=8), BDC (n=4), MBC (n=8) und MBDC (n=5) zum 30-Wochen-Zeitpunkt. *, $P \leq 0,05$	47
Abbildung 10 Gewichte der Milz von Tieren der Genotypen C (n=6), DC (n=3), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=7) und BDC (n=4) zum 50-Wochen-Zeitpunkt.	47
Abbildung 11 Gewicht der Leber von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=8), BDC (n=4), MBC (n=8) und MBDC (n=5) zum 30-Wochen-Zeitpunkt.....	48
Abbildung 12 Gewichte der Leber von Tieren der Genotypen C (n=6), DC (n=3), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=7) und BDC (n=4) zum 50-Wochen-Zeitpunkt.	48
Abbildung 13 Gewicht der Nieren von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=8), BDC (n=4), MBC (n=8) und MBDC (n=5) zum 30-Wochen-Zeitpunkt.	48
Abbildung 14 Gewichte der Nieren von Tieren der Genotypen C (n=6), DC (n=3), MC (n=8), MDC (n=5), BC (n=7) und BDC (n=4) zum 50-Wochen-Zeitpunkt.	48
Abbildung 15 PNA-Färbungen der Keimzentren von Tieren der Genotypen C, DC, MC, MDC, BC, BDC, MBC und MBDC im Alter von 30 Wochen.	51
Abbildung 16 Quantifizierung der Keimzentren von Tieren der Genotypen C (n=8), DC (n=5), MC (GCs pro mm ² Milz: n=8; GC-Größe und Relativer GC-Bereich: n=7), MDC (n=5), BC	

(n=5), BDC (n=4), MBC (GCs pro mm ² Milz und Relativer GC-Bereich: n=9; GC-Größe: n=11) und MBDC (n=5) im Alter von 30 Wochen. *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01.....	52
Abbildung 17 Durchflusszytometrie, Panel 1: Gating-Strategie zur Analyse der B Zell-Entwicklungsstadien.....	54
Abbildung 18 Durchflusszytometrie, Panel 2: Gating-Strategie zur Analyse der B Zell-Entwicklungsstadien. PB = Plasmablasten, PZ = Plasmazellen.....	55
Abbildung 19 Durchflusszytometrie: Quantifizierung der einzelnen B Zell-Entwicklungsstadien innerhalb der Splenozyten im Verhältnis zu der Gesamtheit der CD45-positiven Zellen der Genotypen C (n > 5), DC (n = 5), MC (n > 5), MDC (n = 5), BC (n > 5), BDC (n > 3), MBC (n > 5) und MBDC (n = 5) im Alter von 30 Wochen. *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01; ***, P ≤ 0,001.....	58
Abbildung 20 Serum-Immunglobulin-Spiegel: IgM-, IgG- und IgA-Serumspiegel von Tieren der Genotypen C (n = 3), DC (n = 5), MC (n = 3), MDC (n = 4), BC (n = 3), BDC (n = 5), MBC (n = 3) und MBDC (n = 7) im Alter von 30 Wochen.....	60
Abbildung 21 Immunhistochemie: H/E-, B220- und CD138-Färbung von MBDC-Tieren.....	61

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Laborprodukte.....	30
Tabelle 2 Verwendete Puffer.....	31
Tabelle 3 Verwendete Kits.....	32
Tabelle 4 Verwendetes Zellkultur-Medium.....	32
Tabelle 5 Verwendete primäre Antikörper.....	32
Tabelle 6 Verwendete sekundäre Antikörper.....	33
Tabelle 7 Verwendete Enzyme.....	34
Tabelle 8 PCR-Programm für die Sanger-Sequenzierung.....	39
Tabelle 9 Verwendete Komponenten für die Sanger-Sequenzierungs-PCR.....	39
Tabelle 10 FACS-Panels für die Immunphänotypisierung der Splenozyten.....	56