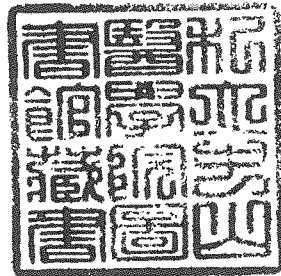


R
008.8
4432-2
88

私立中山醫學院醫學研究所
碩士論文

B-細胞慢性淋巴球性白血病
免疫球蛋白重鏈可變區基因之突變分析
Mutation Analysis in B-CLL Immunoglobulin
Heavy Chain Variable Region Genes



指導教授: 蔡淦仁 博士 (Kan-Jen Tsai, Ph.D.)

參考書恕不外借

研究生: 李碧雲 (Pi-Yun Lee)

中華民國: 八十八年六月

中山醫學院圖書館



C055204

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 私立中山醫學院 (學院) 醫學研究所
內 組 87 學年度第 二 學期取得 碩士 學位之論文。

論文名稱: B-細胞增殖性淋巴球性白血症免疫球蛋白

同意 不同意

重鏈可變區基因之突變分析

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號:)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名:

研究生簽名:
(親筆正楷)

李 鴻 雲

學號: R85129
(務必填寫)

日期: 民國 88 年 7 月 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄台北市 10636 和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 江守田、王淑貞。(本授權書諮詢電話: 02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請經濟部智慧財產局修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

慢性淋巴性白血病免疫球蛋白重鍊可變區基因的突變分析

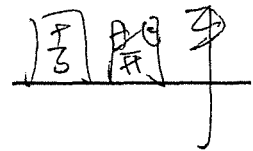
Mutation Analysis in B-CLL Immunoglobulin

Heavy Chain Variable Region Genes

口試委員

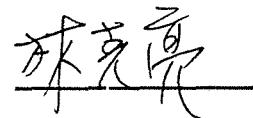
私立長庚大學微免研究所副教授

周開平 博士



私立中山醫學院醫事技術學系副教授

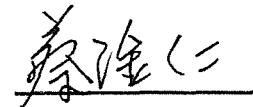
林克亮 博士



私立中山醫學院醫事技術學系副教授

蔡淦仁 博士

(本論文指導教授)



中華民國：八十八年六月

學生李碧雲論文題目為：B-細胞慢性淋巴球性白血病
免疫球蛋白重鏈可變區基因的突變分析，其論文已經
中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格
及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：蔡淦仁 博士

簽名：

蔡淦仁

中華民國八十八年七月

致謝

時間過的真快，一轉眼三年時光已消逝無蹤，研究生日子苦樂參半，尤其是隔離書本多年之後，要讓自己從職業婦女重回學生的軌道，除了自我調整之外，更重要的是蔡老師淦仁的提攜與協助。無論課業或實驗之原理、技術，不知花了老師多少個夜晚與無數的耐心。雖然，謝謝兩個字在這裡並沒有辦法表達我心中的感激，但我還是要跟您說：老師，謝謝您！

感謝林主任克亮與長庚大學周開平老師在論文上的指正和教導，使我的論文更臻完善，以及醫技系邱慧玲老師、李瑤玲老師、王麗娜老師、林世傑老師等，平日的溫心關懷。實驗室的愛珍、學梁、秉儒、雅文，謝謝你們的幫忙及生活上增添許多色彩。好友啟屏、阿妙、美娟、貞兒、春蘭姐，精神上的支撐與鼓勵以及省立豐原醫院檢驗科同事給予工作上的協助，在此一併致謝。

最重要的要感謝我的父母與家人，尤其是我的先生武忠及兒子景堂、景祥，在這段期間的支持和諒解，使我能心無旁騖的完成課業。最後謹以此論文獻給我的家人及所有關心我的朋友們。

李碧雲 謹致於

中山醫學院醫學研究所

中華民國八十八年六月

中文摘要

B 淋巴細胞在成熟過程當中，於發育後期，VDJ 基因重組所引導製造出的免疫球蛋白，將會表現於細胞膜上，成為細胞膜型式的免疫球蛋白基因(membrane immunoglobulin，簡稱 mIg)，這些細胞膜上的接受器(receptor)會因抗原的刺激，在免疫球蛋白可變區基因上面，會有體細胞突變(somatic mutation)或點突變(point mutation)的情形發生。依據文獻報告指出，在一些淋巴瘤的案例，如濾泡型淋巴瘤(follicular lymphoma)、黏膜相關淋巴組織 B 細胞淋巴瘤(mucosa associated lymphoid tissue lymphoma，簡稱 MALT lymphoma)等，可能有這種體細胞突變的情況發生。所以在本論文中，針對同樣屬於 B 細胞腫瘤的慢性淋巴球性白血病(B-Chronic Lymphocytic Leukemia，簡稱 B-CLL)，分析其免疫球蛋白重鏈可變區基因，觀察是否也有體細胞突變情形發生，並進一步與濾泡型淋巴瘤比較它們在免疫球蛋白重鏈可變區基因，兩者之間在基因序列的突變差異。首先引用 PCR(polymerase chain reaction)方法，針對十個經由實驗室報告及醫師臨床診斷為 B 細胞慢性淋巴球性白血病的案例，針對免疫球蛋白重鏈可變區基因 FR3-FR4 區域的放大，以分析慢性淋巴球性白血病的株性來源，確定其中六個案例為單株腫瘤細胞。為了進一步了解 B 細胞慢性淋巴球性白血病的免疫球蛋白可變區基因，是

否有體細胞突變現象，針對其中三個案例，以 PCR 方法，放大免疫球蛋白重鏈可變區 FR1-JH 區域，並進行基因選殖及定序。將得到的重鍊可變區基因序列與目前已確認的 germline 序列做比對，以取代性突變(replacement mutation，簡稱 R)和沉默性突變(silent mutation，簡稱 S)比值的分佈做結果分析。在案例一，CDR、FR 區域都是 0.3，顯示沒有突變情形發生。案例二、三的 CDR 區域是 4.0、FR 區域是 0.25，結果顯示 CDR 之 R/S 比值是 FR 的 16 倍，因此很可能有抗原刺激存在。D 基因部份，全部已比對出的五個案例，有 7 個氨基酸的改變，整體突變情形看來，並沒有一致性。JH 基因部份，所發現的突變固定在 codon 99、102、105 這幾個好發點上。所以，綜合以上結果顯示，B-CLL 可能來自於兩個不同 subset，雖然目前無法直接證明某部份的 B-CLL 與抗原刺激有關，但是未來也許可以利用本實驗所 clone 出來的免疫球蛋白基因，以 *In vitro* 的方式做進一步的分析與探討。

Abstract

VDJ gene rearrangement occurs during the final stage of B-cell development and membrane immunoglobulin appears on the mature B cells as a result. Subsequently, antigen stimulation results somatic hypermutation in those genes encoding variable region for antigen-binding. Previous findings have shown that somatic hypermutation in some lymphomas including those of follicular lymphoma and mucosa associated lymphoid tissue lymphoma (MALT) are frequently found. In this thesis study, B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) has been used to examine the changes in its heavy chain gene to determine if the somatic hypermutation occurs in this similar lymphocytic disorder. Firstly, the polymerase chain reaction (PCR) method was taken to amplify the FR3-FR4 region of the heavy chain gene of each of the cases to verify their monoclonarity. Among them, six were confirmed as the B-cell malignancy. In order to further determine the possible hypermutation of heavy chain genes within these cases, the full length of the heavy chain genes were PCR amplified in three of these cases. Subsequently, the DNA sequences of these PCR products were determined and used to compare with the published germline sequences. A R/S ratio was used to estimate the presence of hypermutation and significantly high R/S ratio were found in two of the cases in this study. Indicating possible antigen stimulation in these cases. However, no obvious mutation was found in the D gene segments in all cases. Interestingly, mutations were found only in certain nucleotides in J_H gene segment of the heavy chain gene. These data suggest that B-CLL might originate from at least two different

subsets. As well as some B-CLL might be derivative from antigen stimulation, however, direct evidence would be necessary to draw a more clear picture of the theory. Future study using the heavy chain gene clones prepared from this study would be able to further characterize the involvement of antigen-stimulation among these B-cell proliferative disorders.

縮寫表：

Ag	antigen
Ab	antibody
bp	base pair
B-CLL	B-chronic lymphocytic leukemia
B-NHL	B-non-hodgkin`s lymphoma
β -ME	β -mercaptoethanol
CDR	complementary determine région
CLL	chronic lymphocytic leukemia
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FISH	fluorescence in situ hybridization
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
OD	optical density

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
R	replacement
S	substitution
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TE	tris-EDTA buffer
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside

目錄

中文摘要	I
英文摘要	III
縮寫表	V
壹、緒論	1
貳、材料與藥品	
一.儀器	14
二.藥品	16
三.方法	20
參、結果	29
肆、討論	35
伍、附圖	43
陸、附表	61
柒、參考文獻	66
捌、附錄	71

壹、緒論(Introduction):

哺乳類動物所處的環境中，有各式各樣的微生物及致病原，所以，為了抵禦外來致病原，在演化過程中，發展出一套獨具特色的免疫系統。基本上免疫系統可分為：細胞性免疫(Cellular immunity)及體液性免疫(Humoral immunity)。其中感染部位與病原種類，可決定何種免疫系統被啟動，最主要的目的是要認出致病原並進一步將之消滅。其中參與細胞性免疫的細胞，包括：淋巴球(lymphocytes)、顆粒球(granulocytes)、巨噬細胞(macrophages)、血小板(platelets)等，它們都屬於白血球，共同源自於骨髓(bone marrow)。至於體液性免疫，是由可溶性分子(soluble molecules)所組成，包括：抗體(antibodies)、lymphokines、cytokines、monokines、chemokines、complement、acute phase reactants 等。

T細胞與免疫系統：

在細胞性免疫的細胞中，每一種類型的細胞，藉著中間媒介物質(mediators)活化，各有不同的反應與功能，但以淋巴球最具關鍵性。淋巴球是由 T cell、B cell 兩個 subset 所組成，它們都是來自共同的 pluripotent stem cell (Keller. *et al.* 1985 ; Fulop & Phillips. 1989 ; Phillips. 1989 ; Smith. *et al.* 1991)。在淋巴球發育過程中，於很早期

就形成 lymphoid stem cell，這些 lymphoid stem cell 再進一步的發育，形成所謂的 lymphoblast 之後，有些細胞會經由 thymus 教育形成 T 細胞，有些細胞則經由 bone marrow 形成 B 細胞。T 細胞是參與 Cellular immunity 的細胞，依其功能可區分為不同的亞群(subpopulation)：

- 一、 helper T cell (T_H cell) → 依產生細胞激素的種類與在發育過程中出現的先後，可再區分為 T_H-1 及 T_H-2 兩個 subset， T_H-1 cell 主要負責遲發型過敏反應 (Delayed hypersensitivity reaction)。 T_H-2 cell 會製造 interleukin-4(IL-4)、interleukin-5 (IL-5) 的 $CD4^+$ T cell，可幫助抗體產生。另外在人類，有屬於兩者中間型態的，稱之 T_H-0 cell (Elson LH. *et al.* 1995)。
- 二、 Cytotoxic/Suppressor T cell → 利用細胞膜上的 T 細胞抗原接受器(receptors)，認出並破壞已被病毒或其他胞內病原感染的宿主細胞。
- 三、 Intraepithelial lymphocytes → 會釋放 $IFN-\gamma$ 、IL-5 兩種細胞激素，主要的功能可能與免疫監視，如抗突變或病毒感染宿主細胞有關。

B 細胞與體液性免疫：

B 細胞則是參與 humoral immunity，在 B 細胞的細胞膜表面，有特定 receptors 辨識特定的抗原(Antigen；Ag)，經辨識為專一性的抗原之後，B 細胞開始增殖(proliferation)、分化(differentiation)，變成抗體形成細胞(antibody forming cell)，也就是我們一般所謂的漿細胞(plasma cell)。它會大量製造抗體並分泌至細胞外，由於這些抗體與原先細胞膜表面 receptors 有相同的結構，故所產生出的抗體能與活化 B 細胞的抗原結合。

T、B 細胞的發生與位置：

參與免疫細胞成熟過程的免疫系統的組織和器官結構，可分為兩個時期：最主要的(primary)淋巴器官主要是針對淋巴球的製造。周邊的(secondary)淋巴器官功能則是遇到各式各樣抗原之後，淋巴球的演化過程(lymphocyte repertoire)發生的地方。在人類或老鼠最主要的淋巴器官，T 細胞的發育是在胸腺(thymus)，B 細胞是在骨髓(bone marrow)。周邊的淋巴器官包括：淋巴結(lymph node)、脾臟(spleen)、派亞氏集合淋巴結(peyer's patches)、扁桃腺(tonsils)和其他淋巴叢集的地方 (Nossal.G.L.V. 1994)。在此藉著周遭環境抗原之刺激或病原菌感染，使 T、B 淋巴球活化，而開始與病原菌對抗。

B 細胞的起源與功能

B 淋巴細胞是發源自有多種作用的幹細胞(pluripotent stem cell)衍生而來(Smith. *et al.* 1991)；依照傳統分法，可分為兩個時期(Antonius Rolink & Fritz Melchers. 1991)：

一. 不依賴外來抗原時期(Antigen-independent)，它停止於當免疫球蛋白經由重整，表現於不成熟 B 淋巴球的細胞膜上為止。

二. 抗原依賴時期(Antigen-dependent)，於細胞膜表面，已有免疫球蛋白的 B 淋巴球，在末稍循環中經由 positive selection，然後移植到第二個淋巴器官，依賴自然界的抗原，這些細胞可再激發活化、增殖及可能發展成為記憶性細胞(memory cell)或漿細胞(plasma cell)分泌抗體(免疫球蛋白)。

所以，B 淋巴球經過這個獨一無二不同的過程，產生偵測抗原之基本能力及隨後產生抗體之反應。抗體之多樣性(diversity)，則已知是在 B 淋巴球發展期間，藉著兩個不同過程而產生 (Ursula Storb；1996)：

一、首先是在 bone marrow，pro/preB cell 階段，V、(D)、J 基因重組(recombination)，使分散的基因片段，依照次序組裝一個新的基因，完整的免疫球蛋白基因。在可變區藉

著 germline encoded V(D)J sequence 的隨機組合，以及在 V(D)J 連結的過程中再伴隨少量核苷酸的刪除和加入，所以造成抗體具多樣性的特性。

二、成熟的 B 淋巴球因為經歷 somatic hypermutation 的過程，使 V、D、J 基因重整(rearrangement)後的重組基因，在高突變發生的情況下，使抗體更具多樣性(antibody diversity)。

尤其是 somatic hypermutation (Berek, C. 1993 ; Storb,U. 1996) 更具特異性，B 細胞的 somatic hypermutation 發生於 germinal center，在抗原刺激下，和屬於免疫球蛋白分子上面，經過特異性高頻率突變重整的這一段抗原結合蛋白(Antigen-binding protein)產生反應。這個過程是隨機的，但在 germinal center 由於 selection 過程，讓選擇出來的抗體更具親和力(high affinity)，即選擇出來的這個 B 淋巴球經過點突變(point mutation)，使成為一個高親和力的抗體分子，針對抗原刺激分泌大量特異性抗體。

抗體的結構與演化

已知抗體(Antibody ; Ab)的分子結構，是由兩個完全相同的重鏈(heavy chain)和兩個完全相同的輕鏈(light chain)所組成。每一個重鏈和輕鏈都包括有可變區(variable region)和固定區(constant region)，

重鏈有四個基因片段，三個可變區和一個固定區所組成 (Tonegawa S. 1983)，位於染色體第十四對長臂第 32(14q32)的位置 (Capra J.D. & Toker P.W. 1989)。在人類這個基因，大致上有：90 個 variable gene(V_H)，依照基因的相似性分為七個 families(Cook G.P. & Tomlinson I.M. 1995)；30 個 functional diversity gene(D)和 6 個 joining gene(J) segment 所組成 (Schroeder & Dighiero ; 1994)。V (D) J 基因重組是很嚴謹的，首先 D gene 會跟 J gene 在重鏈位置產生連結，然後 V gene 再跟 DJ gene 重整，產生一個 rearrangement DNA(Fotini P. *et al.* 1997)。

但是，在我們的整組基因(genome)裡面，對於每一種特異的免疫反應，自然沒有足夠的空間，直接依據 one gene-one protein 的規則。所以當免疫系統必須面對各式各樣的抗原時，在 T、B 淋巴細胞的特異基因上，首先必需隨機重新組裝做更好的分配，這種重組(gene rearrangement)過程，發生在每一個 pre-T 和 pre-B 淋巴球(Nossal G.J.V. 1994)。由於一個細胞只有一種型式的基因，因此，每一個淋巴球只容許產生一個 receptor specificity。如此依序產生大量各擁有單一特異性淋巴球，淋巴球針對不同抗原，於細胞膜上產生不同屬於它自己的 receptor (T 細胞稱之 T cell receptor ; TCR、B 細胞稱之 membrane

immunoglobulin ; mIg), 共同組成一個廣闊具有潛在性的辨識防禦網。

B 細胞與體細胞突變 (Somatic mutation)

免疫系統的防衛機制主要包括 T、B 兩種細胞，而其中以 B 細胞具有更大的潛在性，因為在每一個特定的 B 淋巴球上，都帶有一個特殊細胞膜型式的免疫球蛋白，它假如能夠跟抗原結合，這個細胞株(clone)就會被選擇出來，這個過程我們稱為抗原的選擇(Antigen selection)。但是，隨著抗原濃度愈來愈低，這些免疫球蛋白基因，更進一步的，在分子結構上發生一些突變。因為當抗原濃度下降時，只有跟抗原結合比較好的這些 B 細胞株，會被選擇出來進一步活化，跟抗原結合比較不好的 B 細胞株，則會被慢慢淘汰，甚至死亡(Liu Y.J. *et al.* 1989 ; Mangeney. *et al.* 1991 ; Shokat K.M. & Goodnow C.C. 1995)。這是因為抗原濃度關係，B 細胞進行所謂的親和性成熟(Affinity maturation)(Jacob J. *et al.* 1986; Berek C. & Milstein C. 1987 ; Liu Y.J. *et al.* 1989)。親和性成熟這個機制，是由於免疫球蛋白可變區 V、D、J 基因中屬於 CDRs 的位置，進行 gene somatic mutation 所造成，一般認為這個區域是跟抗原直接接觸的位置(Shlomchik M.J. *et al.* 1987 ; Berek C. 1992 ; Robert M. *et al.* 1996)，它不需要整個重新改造 V、D、J 的重組，只要做一些稍微的調整，也就是經由 Point

mutation 或 Somatic mutation，造成一些新的氨基酸的細微改變，能與抗原結合最好的這個 B 細胞株，就會被選擇出來，進一步的增殖、分化。至於 somatic mutation 的機制，目前尚不清楚，但是根據報告顯示，它最主要是出現在一些好發點(hot spot)的位置，也就是主要位於 CDR1、CDR2、CDR3 的基因上面。在這些位置上的 somatic mutation，很可能是由於基因上面會造成 gene lesion，且於修補過程中誘導一些 mutation 上去。於 1995 年有學者提出兩種不一樣的模式 (Maizels N. 1995)：

一、Templated dependent：此種模式需要另外的 donor templated 提供一個 genetic information 來修補。

二、Templated independent：是一種隨機(random)的修補作用，很可能誘導一些 mutation 到基因上面，造成所謂的 somatic mutation。

生發中心(Germinal centers)

目前已知 somatic mutation 這個機制的發生，需要 germinal centers 這一個特殊結構 (Berek C. *et al.* 1991；Berek C. 1993；Liu Y.J. *et al.* 1997；Han S. *et al.* 1997)。它的一些個別的 microenvironmental zone (MacLennan, I.C.M. *et al.* 1991；Hardie, D.L. 1993)，是由四個主要

區域所組成 (Hardie, D.L. *et al.* 1993), 分別是 Dark zone、Basal light zone、Apical light zone、Follicular mantle zone。這些區域主要是由 Centroblast、Centrocyte、Follicular dendritic cell、Secondary B cell blast 及 CD4 T cell 所佔據。B 淋巴細胞在這個特殊的環境中, 接受抗原的刺激進一步的增殖, 也容許選擇這些增殖的淋巴球中, 經由突變而存活的 B 淋巴球, 在經過抗原持續刺激, 使細胞膜上的 receptor 經由 somatic mutation, 變得更有親和力的存活 B 淋巴球增殖 (MacLennan, I.C.M. *et al.* 1992; Berek C. 1993)。依據 1996 年的論文 (Kallberg K. *et al.* 1996), 更進一步證明 Germinal centers 與 somatic mutation 之間的密切關係。這個實驗是以體外培養系統模式之研究結果指出: somatic mutation 在 Germinal center 這個微環境中, 除了抗原的刺激之外, T_H2 細胞的參與佔極重要角色, T_H2 細胞是分泌 IL-3、IL-4、IL-5 的細胞及提供 CD 40 ligand, 最後再加上時間的誘發也是不可或缺的 (Kallberg E. *et al.* 1996)。

慢性淋巴球性白血病 (Chronic Lymphocytic Leukemia; CLL)

B 淋巴球成熟過程, 會暴露於有害突變之危機, 影響過渡時期之分子結果。這些自正常過程的突變, 有可能運作於不正常方式, 也就是說 B 細胞具有重整和突變能力, 是免疫球蛋白基因產生 specific

antibody-mediated immunity 的關鍵性所在。但是免疫球蛋白基因的重組和突變也可能導致錯誤之時，這種偶然的結果，牽涉細胞生長控制，除了高突變危險之外，B 細胞還有先天的能耐，就是經由不同階段高頻率的增殖或對於抗原所引起之反應。當一個改變的 B 細胞，經由抗原刺激下所產生的高度增殖或在正常情況下之分化，不管是那一種情況，這種偶然選擇下的累積形成突變，於不同時期，不同位置，造成往後的累積形成突變與隨後 B 細胞瘤之形成。

白血病是一種增殖無法控制的疾病，通常是指單株血液細胞過度擴展，CLL 屬於小球性成熟細胞型態，一般發病年齡層介於 60~70 歲之間，但有 10%病人在 50 歲之前被診斷出來 (Brittinger G. *et al.* 1997)，這種疾病病程發展極為緩慢，依據文獻上的報告，在西半球 95%CLL 是 B-cell lineage (B-CLL)，發展自 B1 subset，呈現的是一種惡性 B 細胞瘤，能表達 CD5、CD19、CD20 抗原，也能像正常 B 淋巴球一樣，在細胞膜上呈現細胞膜型式免疫球蛋白(membrane Ig) (Foon,K.A. *et al.* 1990)小淋巴球之拓展是其主要特徵($>5 \times 10^9/L$)。外形和正常的小淋巴球難以分辨，它們會侵犯骨髓(bone marrow)，且於周邊血液內大量循行，也會於某些器官內增殖，特別是淋巴結、脾臟、肝臟 (Cheson B.D. *et al.* 1988; International Workshop on CLL.



1989; Cirh R. *et al.* 1995) 根據細胞遺傳學分析 (Crossen P.E. 1997), 利用 FISH 和分子生物技術, 發現有 50% 患者染色體不正常, Trisomy 12 或者 13q14 易位(translocation) 是最常見的異常 (Juliusson G. *et al.* 1990; Hernandez J.M. *et al.* 1995), 其中 13q14 易位或刪除, 在 CLL 患者當中大致有 20% (Martin M. *et al.* 1998) 這種染色體不正常情形, 或許可以解釋這種疾病細胞株性之來由。1994 年之前的報告都顯示 B-CLL 這種腫瘤細胞株, 抗體變化情形沒有體細胞突變現象 (Moeker T.C. *et al.* 1988; Kuppers R. *et al.* 1991; Kipps T.J. 1993; Schroeder H.W. *et al.* 1994), 雖然有學者質疑(Cai. *et al.* 1993), 因為在他們分析 V_H251 gene 的結果中, 呈現的 R/S ratio 是 4.26, 一般認為高於 2.9 就被認為有意義, 但被質疑 R/S ratio 4.26 僅高於它的期望值 4.0 一些, 這個氨基酸的取代, 可能跟抗原刺激無關。另於 1997 年報告顯示 (Oscier D.G. *et al.* 1997), trisomy 12 細胞株在它免疫球蛋白可變區, 顯現非常少的突變 (0.34% ± 0.86%), 但是在 13q14 染色體不正常的患者, 顯現出來的突變比率卻是有意義的 (6.5% ± 1.67%), 偶爾出現的混合型, 表現的是 mix pattern。所有的突變具有株內相似性(intraclonal homogeneity), 3/10 的 pattern 具有 Ag-selection 暗示性, 這個結果暗示, B-CLL 的株性來源可能有兩個 subsets, 或許可以解釋之前文獻上不同觀點之爭議性。另外, 1995

年的報告指出 B-CLL 最常見到的基因，是 V_H1 佔 45%， V_H3 次之 (Rassenti L. & Kipps T.J. 1995；Surinder S. *et al.* 1998)，由這個結果得知，B-CLL 並不是由全部的 B 細胞經相等或然率產生，而推測是否有某些特定因素，影響或刺激這種癌瘤細胞的發展？

Lymphoma's

Lymphoma's 乃牽涉到淋巴結或淋巴結之外的淋巴組織，也有可能兩者均受侵犯之免疫系統細胞增生疾病。依照組織病理學上明顯的不同，可區分為：Non-Hodgkin's Lymphoma(NHL)與 Hodgkin's lymphoma，其中 NHL，為具不同程度單株增殖之不正常轉形淋巴球（如附錄一），存在周邊淋巴組織之 B 或 T 淋巴球增生疾病，可能以闊擴散性或囊狀性的型式增殖。這些 NHL 中，B-NHL 約佔 80% (Lim L.C. 1996)，對 B-CLL 和 B-cell lymphoma 的疾病原因，了解相當有限，雖然有一些危險因子被確立，這些因子很清楚被認為是病原媒介，卻沒有足夠的推理與假設，這些因子包括：大量職業和環境暴露因素 (Pearce. 1992)；或是病毒 (Mueller N.E. *et al.* 1992)、醫學的環境、藥物治療 (Bernstein. 1992) 以及周圍環境之影響而引發突變。即 B 細胞對環境中，誘導有機體突變之物質有監視作用，B 細胞這種特性，就像是最敏感的步哨，監控著曝露於四周環境中誘導有機體突變之物質。目前有一些証據顯示，B-cell lymphomas 的

發生與抗原刺激可能有關，例如：Follicular lymphoma 可能與 Retroviral 感染的病毒外套膜蛋白(virus envelope protein)有關 (David W.&Levy R. 1992)；MALT lymphoma 則可能與自體免疫有極密切的關係，例如：冷凝集素(cold agglutinins)、類風濕性關節炎因子(reheumatoid factors)和引起紅斑性狼瘡之抗核抗體(anti-DNA antibodies)等 (Qin Y. *et al.* 1995)；另外 salivary gland MALT 與曲狀桿菌(*Helicobacter pylori*) 的感染，兩者之間也有一定程度的關連(David W. *et al.* 1997)。

CLL 與 NHL 之間的關連性？

B-CLL 與 B-NHL 同樣都是 B 細胞腫瘤，它們之間具有一定程度的關連性存在 (Cartwright *et al.* 1987；Weisenburger *et al.* 1990)，而 B-CLL 是否也和某些 B-NHL 類似，具有抗原選擇現象發生？這是在本篇論文中想要探討的。

研究動機

本論文的研究動機便是利用免疫球蛋白重鍊基因的序列分析，找出 B-CLL 與 B-NHL 之間的關係，同時進一步探討 somatic hypermutation 在這兩種 tumor 的發生情形及關係。

貳、材料與方法

一、儀器：

高壓蒸氣滅菌鍋	Autoclave
全自動 DNA 定序分析儀	ABI PRISM Model 377 : Automatic DNA sequencing analyzer
水平式電泳槽	BRL Horizontal 58 : DNA Horizontal Electrophoresis Apparatus
電源供應器	COMPACT power supply
加熱攪拌器	Hot/Stir plate
高速離心機	High speed Centrifuge
微量型離心機	IWAKI (CFM-100) : microcentrifuge
酸鹼值測定儀	JENCO MICROCOMPUTER PH- VISION 6071 : PH meter
看片器	Light box
微量吸量管	Micropipette
上豪微波爐	Microwave
DNA 可程式溫控器	PTC-200 Peltier Thermal Cycler : DNA thermal cycler
拍立得相機與光照板	PHOTODYNE DNA analytical system

旋轉混合器

Shaker

紫外光-可見光光電比色計

UV/Vis scanning spectrophoresis
apparatus

試管混合器

Vortex mixer

二、藥品：

(一) 化學藥品

本實驗所使用之藥品均為試藥級或試藥級以上

Seakem : Agarose

Sigma : Ampicillin , Boric acid (H_3BO_3) , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
D-(+)-Glucose ($C_6H_{12}O_6$) , EDTA (Ethylenediamine -Tetraacetic
acid , $C_{12}H_{12}N_2O_8Na_4$) , NaOH (Nodium Hydroxide) , NaOAc
(Sodium acetate, $C_2H_3O_2Na$) , Potassium acetate ($KC_2H_3O_2$) ,
SDS(Lauryl sulfate, $C_{12}H_{25}O_4SNA$) , Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) , IPTG ,
X-gal , TBE buffer , Dimethylformamide

USB : Agar , LB broth (20g/1L) , Tris -Base , Tris Hcl

Merk : Absolute ethanol , Choloform , Phenol

(二) 特殊配製試劑

SOLUTION I :

Glucose buffer

25 mM Tris, pH 8.0

50 mM glucose

10 mM EDTA

Lysozyme solution

使用之前新鮮配製：每毫升 glucose buffer 溶入 8 毫克的 lysozyme.

SOLUTION II :

0.2M NaOH with 1% SDS (每一次使用前新鮮配製)

10% SDS 5 毫升

H₂O 44 毫升

10 M NaOH 1 毫升

SOLUTION III :

Potassium acetate solution

29.4 克 potassium acetate

11.5 毫升 glacial acetic acid

加 H₂O 至 100 毫升

TE buffer :

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

1 mM EDTA, pH 8.0

加 H₂O 至 1 L

10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) :

- * Electrophoresis-grade SDS 100 克溶入 900 毫升 H₂O.
加熱至 68°C 直到完全溶解.
- * 使用鹽酸將 pH 值調整至 7.2.
- * 再用 H₂O 將總體積加至 1 升.

(三) 酵素

EcoR I (BioLabs Lot : 28)

Taq DNA Polymerase (Bio-Thermal DNA Polymerase,
KST).

(四) 套組試劑

AdvanTAge™ PCR Cloning Kit CLONTECH, #K1901-1)

Genomic DNA Extraction Kit (Genomix)

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, #28104)

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN, #27106)

BIO 101 (GENECLEAN^R III KIT Cat # 1001-600)

(五) Primer

A. Primers used for DNA sequencing

M13 (-40) forward primer :

5`-GTTTTCCCAGTCACGAC-3`

M13 Reverse primer :

5`-AACACAGCTATGACCATG-3`

B. Primers used for PCR (附表一)

(六) 檢體來源

由中、南部醫學中心提供已經確認是 CLL，或者是懷疑是 CLL 之淋巴球增生的病患末稍血液。

三、方法

【實驗流程】

第一部份：B-CLL 免疫球蛋白基因可變區之突變分析

Peripheral whole blood with EDTA anticoagulant



DNA extraction



PCR analysis with nested primers



PCR products



Electrophoresis



Band pattern analysis

第二部份：B-CLL 免疫球蛋白重鍊基因之突變分析

Peripheral whole blood with EDTA anticoagulant



DNA extraction



PCR analysis with multiple primer pairs



PCR products



PCR products direct cloning



DNA sequencing



Sequences analysis

一、慢性淋巴性白血病末稍血液 DNA 之分離純化

依據 GenoMIX Kit，抽取 2.4 ml 末稍血液置放於含 EDTA 抗凝固劑試管中，混合均勻，轉移至 15 ml 橘色頭 polypropylene 試管。加入 4.8 ml Lysing Solution (Solution 1)，(試劑與檢體之比率是 2:1；可斟酌檢體量多寡調整)，上下混合均勻，68°C 水浴 5 分鐘，將細胞膜完全溶解。加入 7.2 ml Chloroform，蓋好蓋子，也是上下倒轉混合，直到完全混合均勻，2600 ×g 離心 15 分鐘 (或 2000 ×g 離心 25 分鐘)，將 DNA 分離出來。吸取含 DNA 的上層液體，加入 8 ml Precipitating Solution (Solution II)，緩慢混合，直到棉絮狀 DNA 沉澱形成，經由 1200×g 離心 5 分鐘，讓 DNA 完全沉澱。小心去除液體層，將已沉澱於管底 DNA，加入 4 ml Ionic Exchange Solution (Solution III) 再溶解，純化 DNA。用 95% ~ 96% Ethanol 再次沉澱，經 75% Ethanol 洗滌，烘乾，最後溶至無菌去離子水或 TE buffer 中，在 OD260/280 下比色，得知 DNA 之純度及濃度。

二、聚合酵素連鎖反應 (PCR) 放大 CDR3 區域

主要用於良性及惡性 B 淋巴球增生疾病之鑑別，因為 CLL 的診斷過程，依賴組織學和免疫細胞化學的方法，去偵測細胞表面上的抗原，以區分細胞的來源和株系。惡性 B 細胞的增生，通常可以利

用它是屬於 Light chain 的 kappa 或 lambda，很清楚的評定。但偶而，mix cell 分佈或缺乏可觀察的表面抗原，都會導致得不到診斷或沒有辦法確定、不明確之結果。所以，免疫球蛋白基因的重組，是唯一能夠偵查每一個 B 淋巴球之起源與發展，唯一的最好方法。正常 B 細胞的免疫球蛋白重鍊基因重組時，V、D、J 共同形成一個功能性單位，當 V-D-J 連結的時候，DNA basepairs 會任意的插入 V-D 和 D-J 接合之處，形成三個 CDR 區域，具有抗原特異性。因此，正常 B 細胞都有輕微不同程度的差異，在 V 和 J segments 之間，用 PCR 方法放大，於 agarose gel 上會呈現一個大數量 diffuse DNA。但是在 B-CLL 的患者，因為它是發源自同一株系，所以，在 agarose gel 上面呈現的是單一的 band，因此，我們可以很明確的鑑別診斷。

在這裡的 Primer 為進行 nested PCR 的 Primer II 以放大 FR3-FR4 區域（附表一）。進行第一次反應的成份包括：十分之一體積的 10X PCR buffer（其中包含 500 mM KCl，100 mM Tris-HCl pH9.0，15 mM MgCl₂，1.0% Triton X-100）、dNTP（200 μ M）、DNA template、Primers（FR3A primers: 40 pmole，LJH primers: 40 pmole）、2.5 U 的 Taq DNA polymerase；PCR 反應的條件為：Predenature 94°C 5 分鐘、Denature 94°C 15 秒、Annealing 58°C 30 秒、Extention 72°C 50 秒、Final

extention 72°C 7 分鐘，連續 30 cycle；進行第二次 PCR 反應的成份包括：十分之一體積的 10X PCR buffer（其中包括 500 mM KCl，100 mM Tris-HCl pH9.0，15 mM MgCl₂，1.0 % Triton X-100）、dNTP（200 μM）、第一次 PCR 所得產物（5 μl）、Primers（FR3A primers：80 pmole，VLJH Primers：80 pmole）、2.5 U 的 Taq DNA polymerase。PCR 反應的條件：Predenature 94°C 5 分鐘、Denature 94°C 15 秒、Annealing 58°C 30 秒、Extention 72°C 50 秒、Final extention 72°C 7 分鐘、40 cycle，皆以 Peltier Thermal Cycler model PTC-200 之儀器以熱起始(hot start)進行 PCR 反應。

三、聚合酵素連鎖反應（PCR）放大 VDJ 基因片段

為了分析完整的 VDJ 基因，因此選用 Primer I（附表一）做 FR1 至 FR4 的 DNA 放大，在每一反應中，包含十分之一體積的 10X PCR buffer（其中包括 500mM KCl，100mM Tris-Hcl pH9.0，15mM MgCl₂，1.0% Triton X-100）、DNA template（>200 ng）、Primers：（V_H primers：包括 V_H1、V_H2、V_H3、V_H4A、V_H4B、V_H5 及 V_H6 等七種 primer，各取 20 pmole，J_H primers：140 pmole）、2.5 U 的 Taq DNA polymerase，PCR 的條件為：Predenature 94°C 5 分鐘、Denature 94°C 1 分鐘、Annealing 60°C 1 分鐘、Extention 72°C 1 分鐘、Final

extention 72°C 7 分鐘、25 cycle，用 Peltier Thermal Cyclor model PTC-200 之儀器以熱起始(hot start)進行 PCR 反應。

以上 PCR 結果各取 10 μ l 跑 2% agarose gel，以 ethidium bromide 染色後，於 UV 燈下照相以分析結果。

四、PCR 產物之再純化

PCR 產物以 2.0% agarose gel 電泳確認之後，剩餘的 PCR 產物以 QIAquick-PCR Purification Kit 純化。首先將一倍體積的 PCR 產物加入五倍體積的 PE buffer，混合之後，倒入已接好 Collection tube 的 QIAquick spin column 裡面，離心 30-60 秒，去除離心下來的液體，此時 DNA 已附著在 QIAquick spin column，用 PE buffer 清洗，最後加入 Elute buffer 將 DNA 溶離出來，以 260/280 的吸光值測量算出 DNA 濃度。

五、Ligation

依據 AdvantageTM PCR Cloning Kit，將純化後的 PCR 產物於 24 小時內進行 ligation。在每一反應中包括：PCR 產物（普通約為 0.5-1.0 μ l）、pT-Adv Vector(50 ng)、10 分之一體積的 10X ligation buffer、

T4 DNA ligase (3 Weiss units/ μ l), 用去離子水調整至總體積為 10 μ l, 於 14°C 下進行反應至少 4 個小時以上。

Ligation 後之產物直接進行 Transformation, 若無法立即操作, 應置於 -20°C 保存。

六、Transformation

依據 Advantage™ PCR Cloning Kit, 將已接有 PCR 產物的 pT-Adv 質體, 以熱休克(heat shock)原理方式送入 TOP10F' E.coli。先取一管 (50 μ l) 冷凍 TOP10F' competent cells 於冰上解凍, 再加入 2 μ l β -ME (0.5 M) 置於 4°C、30 分鐘, 然後以 42°C、30 秒, 緊接著再 4°C、2 分鐘的條件得到 Transformant cell, 之後加入 250 μ l SOC 培養液置於 37°C 生長一小時 (使其恢復), 最後分別以 50 μ l 及 200 μ l 的量, 使其生長在 LB/Ampicillin 或 Kanamycin (1 μ l/ml) /IPTG (0.01 μ mole) /X-Gal (1 mg) 之培養盤上, 經過至少 18 小時、37°C 培養, 之後置放於 4°C、30 分鐘, 使其呈色完全。利用 Blue/White selection 的原理, 篩選具有表達質體的轉形細胞, 將這些細胞分別做次培養後, 抽取質體 DNA 以 *EcoR* I 切割, 以確認確實帶有我們所要分析的 DNA 片段。

七、質體 (Plasmid) 的分離純化

接種單一菌株於 5.0 ml 的 LB broth(1 μ l/ml 的 ampicillin)中，置放於 37°C、225 rpm 搖動的培養箱中隔夜培養。4°C、5000 rpm 以上離心 5 分鐘，加入 100 μ l Solution I(含 lysozyme)，混合之後置放室溫 5 分鐘(使細胞溶解)，之後轉入 Ependoff 小離心管再加入 200 μ l Solution II(stock \rightarrow 10X 稀釋)、上下混合均勻、置冰上 5 分鐘(將細胞壁的脂質溶解讓核酸跑出來)，再加入 150 μ l Solution III(將 denature 之 protein、cell 萃取出來及 single DNA 沉澱下來; Solution III 使用之前應先置放於冰上)，混合均勻。然後高速離心 10 分鐘，小心吸取上清液至新的 corex tube，加入 RNase A 15 μ l(去除 RNA)，上下混合，5 分鐘後再加入等量的 SS-phenol，上下混合均勻，高速離心 5 分鐘，取上清液，加入十分之一量的 sodium acetate(3 M、pH7.4 約 50 μ l)，再加入 95% ethanol 至滿，放置 -20°C 約 20 分鐘(讓 DNA 沉澱)。取出高速離心 10 分鐘後，快速倒掉上清液，留下底部的 DNA pellete，用 75% 的 ethanol 洗去鹽類，再高速離心一次去除殘餘的液體，將 DNA 烘乾，加入適量的 TE buffer。

* Solution I : Solution II : Solution III 之比率 = 1 : 2 : 1.5

質體的純化以 GENECLAN^R III KIT, Cat # 1001-600 來使用。

首先將溶於 TE buffer 之 DNA 加入三倍體積的 NaI (Sodium Iodide)與

10 μ l EZ-Glass milk，震盪混合(每 1-2 分鐘混合一次，使 DNA 充份結合上去)，室溫 5 分鐘，高速離心之後去除上清液，最後加入 20 μ l Elution solution，高速離心將 DNA 溶離出來，以 OD 260/280 下比色。確認純化之後 DNA 的濃度，準備做 DNA 序列。

八、去氧核糖核酸的定序 (DNA sequencing)

DNA 序列鑑定由本院貴重儀器中心負責，使用機型為 API 377。

九、DNA 序列分析

DNA 序列的分析主要是利用下列網路現有的基因分析系統：

Kabat DataBase、BLAST program、GenBank DataBase。

參、結果

一、聚合酵素連鎖反應 (PCR) 之結果

這部份總共收集 10 個經確立或懷疑為 B 細胞慢性淋巴球性白血病之案例，檢體處理方式是以加入乙二氨四乙酸(EDTA)當抗凝固劑之末稍血液。抽取 DNA 之後，在這裡進行兩個階段的 PCR 反應。

首先我用 primer II 以 nest PCR 方法，進行免疫球蛋白重鍊可變區基因 FR3 至 FR4 區域的放大，再根據 PCR 產物在膠上所呈現的型式，以鑑別這些案例是否為 B 細胞慢性淋巴球性白血病，或者只是良性細胞反應性增生。結果 10 個案例中有 6 個案例經 PCR 方法分析都是單株系腫瘤細胞，再加上臨床的診斷及實驗室的報告 (附表二)，確認屬於 B 細胞慢性淋巴球性白血病。如附圖一為其中 5 個案例 FR3 至 FR4 的 PCR 產物在膠上所呈現的結果。很明確的它們都是來自同一株系，屬於惡性的 B 細胞瘤。

為了瞭解 B 細胞慢性淋巴球性白血病是否與抗原選擇所造成的體細胞突變有關，所以將 6 個已經確認的案例，進一步用 PCR 方法放大免疫球蛋白可變區基因，為了得到比較完整的 VDJ 片段以供分析，我以 primer I 進行 FR1 至 FR4 區域的放大。6 個案例中

僅 3 個得到完整的 VDJ 片段，另外 3 個得到的是偽陰性之結果，結果詳見附圖二。

二、PCR 產物之選殖 (Cloning)

由於 PCR 產物可能包含不同型式體細胞突變的基因，因此，無法直接以 DNA 定序分析其基因。必須再利用基因選殖技術，將 PCR 產物與載體(vector)銜接(如附錄二)，送入相容性菌體內，以建立帶有 PCR 產物片段的菌株。再利用 Blue/White selection 原理，篩選具有表達質體(plasmid)的轉型細胞。因為在這個質體上具有 lacZ 基因，控制 β -galactosidase 的製造，若 PCR 產物有差入這個載體，則會破壞 lacZ 基因，破壞 β -galactosidase 的製造，使細菌無法利用半乳糖，則菌落呈無色。相反的若 PCR 產物沒有差入載體，就不會破壞完整的 lacZ 基因，讓 *E.coli* 能利用半乳糖，則菌落呈藍色。

在本研究中，分別將之前 6 個案例所得到的 PCR 產物，先經由 QIAquick PCR Purification Kit 純化之後，個別與 pT-Adv 載體銜接，再送入 TOP10F' *E.coli* competent cells，進行基因選殖及菌株的篩選。從個別案例所建立的菌株群中，隨意挑選 5 個至 10 個不同菌株，個別進行次培養。利用 miniprep 方法抽取質體 DNA，為了確認

我所篩選出來菌株，質體中確實包含原有的 PCR 產物，所以我用 *EcoRI* 缺割及 PCR 產物再次放大之方法，做雙重確認，結果如附圖三、四。

三、免疫球蛋白重鍊可變區基因之定序與突變分析

去氧核糖核酸(DNA)之定序，主要是依據 ABI PRISM™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit，以 PCR 的方式進行，每個檢體進行四組反應，以 M13 (-40) forward primer 自 5' 端開始讀起。DNA 定序之後的核苷酸序列及轉譯為氨基酸序列的分析，主要是利用目前網路現有的基因分析系統：BLAST program、Kabat Database、EMBL/GeneBank Database。首先是自基因庫中找出最相近似的 germlines，經由這些已知的 germlines 基因序列做比對，再進一步分析突變的位置。

在本實驗中，基因序列突變之分析與鑑定分兩部份進行： V_H segment 和 D、 J_H segment。 V_H segment 的比對是依據 Kabat 等學者所提出的定義為基準 (Kabat E.A. *et al.* 1991)。D 和 J_H segment 的分析，則是依據 Yamada 等學者所提出的準則 (Yamada M. *et al.* 1991)。

在 V_H segment 這一部份：共分析了三個案例，案例一隨機挑選 10

個菌株、案例二跟三都各隨機挑選 5 個菌株，個別進行質體純化及 DNA 定序工作。經由基因序列顯示，同一案例中的不同菌株得到的基因片段，不但長度相同，基因序列也相似。案例一的基因長度為 334 bp、案例二的基因長度是 325 bp、案例三則的基因長度則是 330 bp，它們都屬於完整的 VDJ 基因。經由基因庫比對的結果，與案例一最相近似的 germline 為 V_H3-11 ，兩者相似程度為 99%，與案例二相近似的 germline 為 $V_H1-DP10$ ，兩者相近似的程度是 95%，至於案例三則與案例一相同都屬於 V_H3-11 ，但是相似程度為 94%。將這些核苷酸序列翻譯成氨基酸序列之後，分析它們的突變情形，案例一總共包含了 8 個氨基酸密碼(codon)的替換，而這種突變的發生位置，有 4 個發生在 CDRs 區域，4 個發生在 FRs 區域，前者造成 1 個取代性突變(replacement mutation)，3 個沉默性突變(silent mutation)，R/S ratio(replacement/silent) 為 0.3；後者造成 1 個取代性突變，3 個沉默性突變，R/S ratio 為 0.3。在案例二包括了 10 個氨基酸的替換，其中 5 個發生於 CDRs 區域，5 個發生於 FRs 區域，前者造成 4 個取代性突變，1 個沉默性突變，R/S ratio 為 4.0；後者造成 1 個取代性突變，4 個沉默性突變，R/S ratio 為 0.25。於案例三則共有 7 個氨基酸的替換，5 個發生於 CDRs 區域，2 個發生於 FRs 區域，前者造成 4 個氨基酸的取代性突變，1 個沉默性突變，R/S ratio 為 4.0；後者都是屬於沉默性突變，R/S ratio 是 0。CDRs

與 FRs 個別的觀測值與預期值，請詳見附表三、四、五與圖五、六、七。

D、J_H segment 的分析：在 6 個 CLL 的案例中經由 PCR 方法放大 CDR3 的基因片段，比對目前已經知道的 germlines D gene Database，其中 5 個案例能找到相符合的基因序列。符合案例一、三的 germlines D gene Database 是 DM5-a/DM5-b，案件一僅有 1 個氨基酸的替代；案例三則有 2 個氨基酸的替代，造成 2 個氨基酸的取代性突變。與案例二、四、五相符合的 germlines D gene Database 則是 DXP'I，案例二有 2 個氨基酸的替代，造成 2 個氨基酸的取代性突變。案例四、五則各有 1 個氨基酸的替代。另外的案例六在目前的 Database 找不到符合的比對序列。(請詳見附圖八)

J_H 基因的分析，在案例一隨機挑選了 10 個菌株，案例二至六則隨機各挑選 5 個菌株做分析，除了案例二因 5 個菌株中有兩種不同的改變情形，列舉 2 個菌株核苷酸與氨基酸的基因序列情況，另外的五個案例，因為核苷酸經 PCR 方法放大的基因長度，發生改變的位置與種類都相同，所以都只列舉其中 1 個菌株當代表。這些案例中與現有基因庫的 Database 比對之結果，發現和 J_H5b 基因相符合之案例分別是一、四、五，在案例一有 1 個氨基酸的替代，案例四、五各有 4

個氨基酸的替代，發生的位置與改變的情形都是一樣的。與案例二相符合的基因是 J_H4b ，2-1 菌株有 2 個氨基酸的替代，造成 1 個氨基酸的取代性突變；於 2-2 的菌株總共有 3 個氨基酸的替代，造成 2 個氨基酸的取代性突變。案例三有 4 個氨基酸的替代，造成 3 個氨基酸的取代。另外的案例六則與 J_H4a 基因相符合， J_H4a 與 J_H4b 基因它們的氨基酸序列相似，只有 1 個核苷酸的差異，在案例六總共發生 5 個氨基酸的替代，造成 2 個氨基酸的取代性突變。(請詳見附圖九)

肆、討論

一、V_H基因的分析

一個具有特異性的免疫球蛋白的產生，在它們的免疫反應中，具有免疫球蛋白重組的 B 細胞株，可以透過抗原的刺激，產生免疫球蛋白可變區基因的體細胞突變(somatic mutation)，造成這些 B 細胞表面抗原接受器對抗原的親和性增加。這是免疫球蛋白基因由於抗原關係，造成親和性成熟(affinity maturation)的主要機制。這種體細胞發生突變的位置，一般認為主要位於 CDR1 與 CDR2 區域(Qin Y. *et al.* 1995；Wotherspoon A.C. *et al.* 1996)。體細胞突變的現象，可藉著重組可變區基因與最相近的 germline V 基因做比對而得知。在本論文中體細胞突變的分析，主要是以 CDRs、FRs 區域的 R/S 比值的分佈情形。依據報告指出，若任何一免疫球蛋白的 R/S 比值大於 2.9 的話，就可判定為發生過體細胞突變 (Zelenetz A.D. *et al.* 1992)

由前面的結果得知，B 細胞慢性淋巴球性白血病與淋巴瘤(以 follicular lymphoma 為例)，兩者在免疫球蛋白重鍊可變區位置，它們的核苷酸與氨基酸序列之比較，以案例一作分析，發現它們在體細胞突變之頻率上有很大的差異。B 細胞慢性淋巴球性白血病的 CDR、FR 區域 R/S 比值都是 0.3，但是在 follicular lymphoma，它的

CDR、FR 區域的 R/S 比值分別是 2.3、1.4。依據 1996 年的實驗證明 (Eva K. *et al.* 1996)：體細胞突變的發生，必需在 germinal centers 的環境中接受抗原刺激，與 T_H2 細胞分泌細胞激素的幫忙及提供 CD40 ligand，最後再加上時間的誘發。1997 年的文獻 (Yong-Jun Liu. *et al.* 1997) 更詳細的說明，CD40 ligand 對於 germinal centers 中的 B 細胞來說，扮演一個維持存活的關鍵性訊息：germinal centers B 細胞經過高頻率的體細胞突變之後，若產生一個低親和性的抗原接受器，因為抗原無法結合至 follicular dendritic cells，所以 germinal centers 中的 B 細胞很快的進行細胞凋亡 (apoptosis)；若 germinal centers 中的 B 細胞經過高頻率突變之後，具有高親和性的抗原接受器，則抗原會結合上 follicular dendritic cells，呈現給 T 細胞，活化 CD40 ligand 傳遞訊息，使進入漿細胞分泌大量特異性抗體，或成為記憶 B 細胞，待第二次免疫反應期間，產生大量高親和性抗體。因此，由案例一的分析結果，可以推論這種 B 細胞慢性淋巴球性白血病的株性來源，應該不是經由抗原刺激，根據一般的研究認為這種案例中，都具有 polyreactive autoantibody activity 表達。是這個腫瘤 B 細胞結合到 self-antigen，還是正常的 B 細胞會表達這樣的自體抗體，在持續的刺激之下，因此增加 B 細胞惡性轉換 (malignant transformation) 而加速腫瘤的形成？

進一步發現這兩種腫瘤之間，分析它們免疫球蛋白重鍊可變區基因有非常多相似之處，案例一所使用的 germlines V_H 基因是 V_H3-11 ，而 follicular lymphoma 則是 HUMISGHYAAD (屬於 $V_H III$ family)。文獻指出， $V_H III$ 為人體免疫球蛋白 germline V_H 基因群中，最常用於製造自體抗體的一族 (Pascual V. *et al.* 1992)，例如：類風濕性因子、抗 DNA 抗體等。因此，推測自體抗體之活化，在這個疾病的致病原理可能是一個重要因素。

在案例二 B 細胞慢性淋巴性白血病的 5 株 V_H 基因中，以 R/S 比值而言，雖然 CDRs 區域的比值 4.0 比 2.9 的標準，並不是很突顯，但以 FRs 區域 0.25 的比值做比較，CDRs 比 FRs 區域高出 16 倍之多。而 CDRs 區域正是抗原直接接觸的位置，所以，這種分佈現象為 B 細胞在 germinal centers 受到 positive selection 的結果。另外以株內分析(intra-clonal)結果顯示，同一案例的不同株 V_H 基因的突變位置及改變的核苷酸都相同，表示可能已長期接受某一抗原的刺激，使得許多 V_H 基因都已發生突變，所以出現較固定的突變型態。

在案例三的 5 株 V_H 基因中是屬於 V_H3-11 ，以 R/S 比值分析它們的突變情況，CDR 區域是 4.0，FR 區域是 0.25。雖然使用的 V_H

基因群和案例一相同，可是它的突變情形卻與案例二很類似，CDR 區域 R/S 比值與 FR 區域 R/S 比值高出 16 倍，只是株內分析結果稍有差異，在這個案例中，FR 區域的突變位置與核苷酸的改變都相同且比例都極低，因為 FR 區域是構成免疫球蛋白分子的重要支撐結構部份，而為了保留這些重要 conserved region 的方式之一。CDR 區域的突變型式中，可歸納出兩種突變型態：一種是突變位置與核苷酸的改變都相同，另一型態則是稍有變化，可能是抗原刺激仍然存在。

V_H 基因的分析，在這三個案例中，案例一、三所使用的 germline V_H 基因都是第三族，案例二則是屬於第一族。這兩族都是人體免疫球蛋白 V_H 基因群中，最常用於製造自體抗體的一族。這三個案例雖然同是 B 細胞慢性淋巴球性白血病，但是它們之間的突變型式與頻率並不相同。依據 1997 年的報告，B 細胞慢性淋巴球性白血病的株性來源，會因為染色體異常的差異，在它們的免疫球蛋白 V_H 基因上的體細胞突變也有很大的不同。Trisomy 12 異常的案例， V_H 基因表現的是未經抗原刺激，缺少體細胞突變的結果，而 13q14 易位的案例呈現的是完全相反的結果 (David G. *et al.* 1997)。因此，就這部份之分析，在這裡提出三點推論：

(一)、雖然在這個實驗中，並沒有偵測染色體是否有異常，但由結果推論這種疾病的株性來源，可分為兩個不同的 subset。

(二)、依案例二、三的突變情形顯示，不能排除抗原刺激存在的可能性。

(三)、是否腫瘤的形成與抗原的刺激有相關性？

所以未來在這個實驗中，也許應該將 chromosome 也列入偵測範圍，以進一步區分這兩種疾病的病源，是否來自不同的 subset。雖然在本論文中，我們無法直接證明在這些疾病是否有抗原刺激的情形，但是我們未來也許可利用本實驗所 clone 的免疫球蛋白重鍊基因，以 *in vitro* 的方式，製造類似免疫球蛋白的分子(Immunoglobulin-like protein)，也許可以利用這種 Ig-like protein 做病人血清的結合試驗，看看是否有 ligand-binding 的情況發生，並進一步分析所結合的 ligand 為何？並利用組織培養的方式，看看是否加入這些 ligand 或其他相關必需物質之後 (Eva K. *et al.* 1996)，是否也會造成體細胞突變等情形的發生。在過去一些研究中發現 *Helicobacter pylori* 與 MALT 有關 (David W. *et al.* 1997)，是否 *H.pylori* 的某些抗原可以刺激腫瘤的產生，所以也加強我們上述的推論。至於詳細機轉，特別是在 follicular lymphoma 以及 B 細胞慢性淋巴球性白血病，仍有待進一步實驗去

證明。

二、D、基因的突變分析

D 基因的分析在六個案例中，除了案例六找不到相符合 germline D 基因，案例一、三所使用的 D 基因是 DM5-a/DM5-b，案例二、四、五則是 DXP'1。DXP'1 基因在文獻上有指出，DXP 這一族在 B 細胞慢性淋巴球性白血病案例普遍被使用，約佔 50%。在本實驗中也是佔大多數，但真正的原因目前尚未得知。分析這部份的突變情形，發現在全部已比對出的 5 個案例，總共 26 個 codon 當中，就有 7 個產生氨基酸的替代，造成 7 個氨基酸的取代，比例上佔了 37%。

但是對 D 基因的突變情形，整體看來並沒有一致性的現象產生，可能原因是由於這段基因比較短，以突變而言，改變情形可能十分有限，因此無法確認出這些突變的意義。

三、J_H基因的突變分析

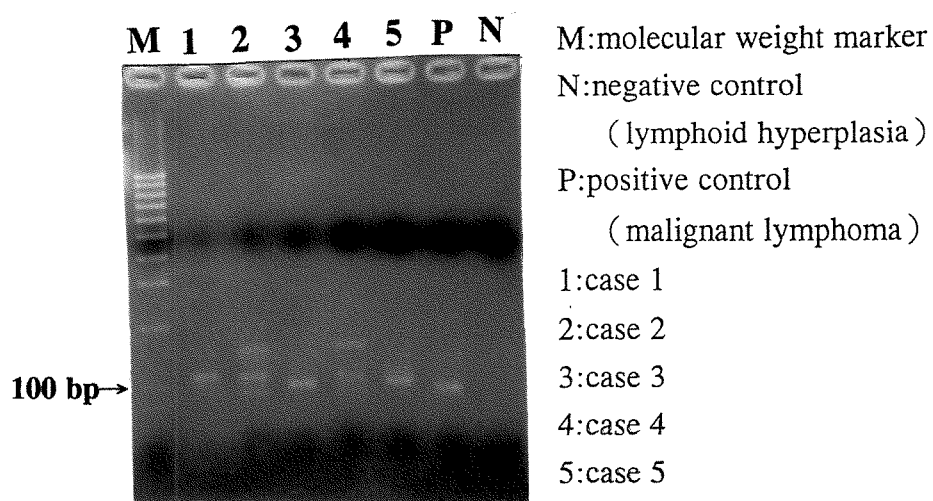
在 J_H 這部份的六個案例中，案例一、四、五所使用的 germline J_H 基因是 J_H5b。這三個案例總共有 9 個氨基酸的替代，但都屬於無意義的突變，並沒有造成氨基酸的替換。於案例二、三、六所使用的 germline J_H 基因是 J_H4a、J_H4b，發現從這些腫瘤細胞中的免疫球蛋白 J_H 片段，在 codon 99、102、105 是好發點(hot spot)突變位置。氨基酸的取代聚集在這些位置上，但在 J_H5b 是沒有發現的，這暗示著抗體親和性成熟的形成，在這些 codon 裡扮演著重要的角色。

於正常成人末梢血液的 B 淋巴球所使用的 germline J_H gene Database 中，J_H4 佔 52.5% (Yamada M. *et al* 1991)，與本實驗中的比例相似。因此，J_H4 基因在腫瘤細胞的使用比率，反應出免疫球蛋白 J_H 基因的正常演化功能，掩蓋了腫瘤細胞本身的特異性表達。

在 J_H 基因的區域所發現的突變，常發生在幾個好發點上，分別是 codon 99、102、105 上，當我們檢視該區域的氨基酸組成，如 99 位置：Y→F，又如 102 位置：Y→P、Q→R，這些改變很可能說明

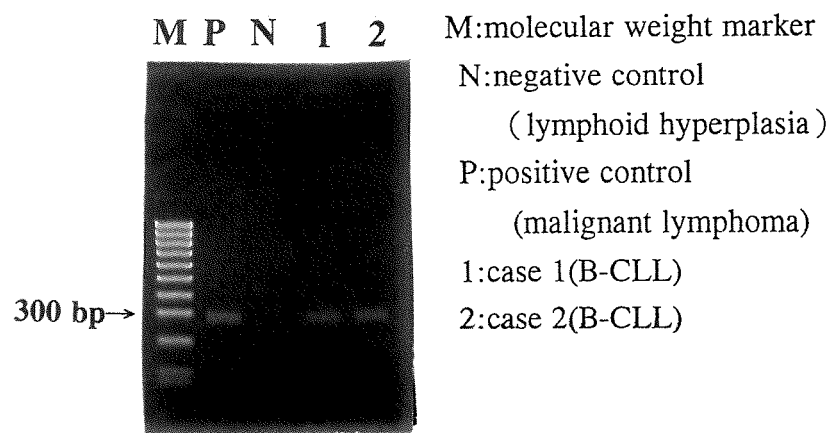
這個區域扮演對抗原結合所需結構上的支持性結構。因此，突變經常只能由一個大的氨基酸改變為另一個結構上也是屬於大分子的氨基酸，所以我們無法在這些位置上找到其他的氨基酸取代突變，也間接說明，也許一個特定結構的 CDR3，對於這些疾病的產生是相當重要的。維持一定的結構與特性可能與某種抗原之結合也有一定之關係，是否這點再次暗示，如我們前面所論述的某種抗原之存在，是造成這些疾病的直接或間接因素，這點仍有賴未來進一步去證明。

伍、附圖



圖一.以 PCR 的方法,放大免疫球蛋白重鍊基因 FR3-FR4 區域.

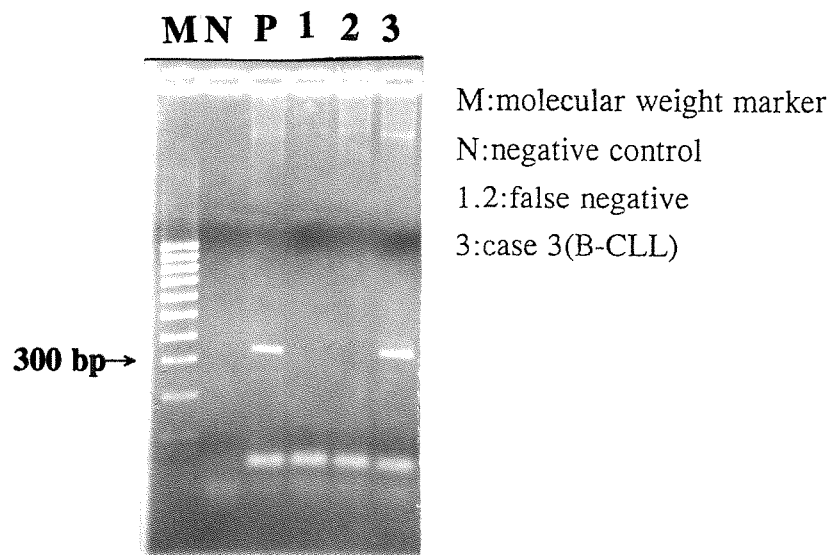
檢體:末梢全血.



圖二.以 PCR 的方法,放大免疫球蛋白重鍊基因 FR1-JH 區域.

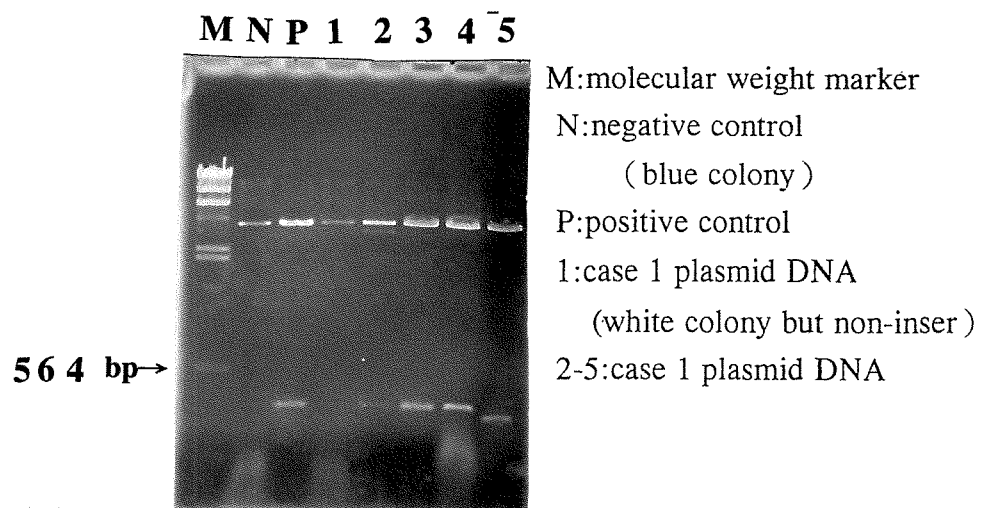
檢體:末稍全血.

(continue)

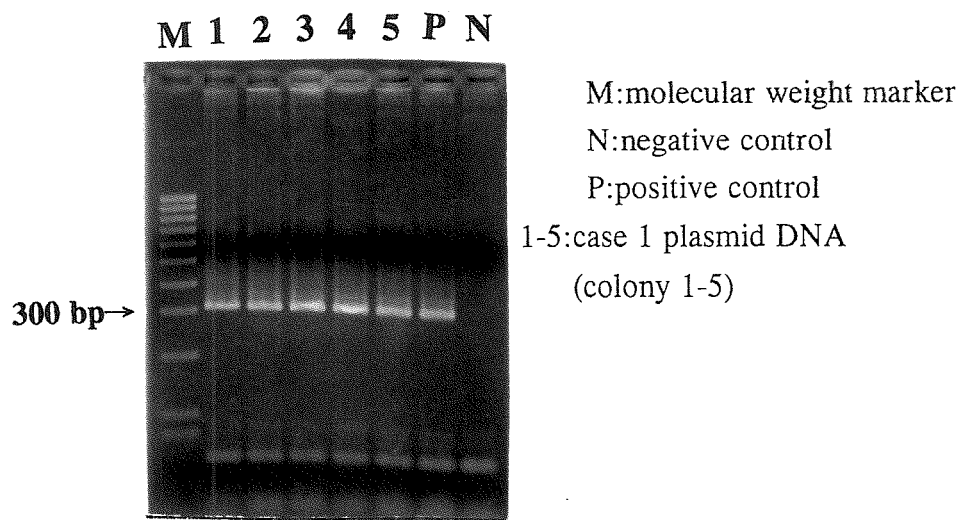


圖二.以 PCR 的方法,放大免疫球蛋白重鍊基因 FR1-JH 區域.

檢體:末梢全血.



圖三.以 *EcoRI* 切割質體 DNA(FR1-JH)之結果



圖四.以 PCR 方法再一次放大質體 DNA(FR1-JH)之結果.

Amino acid and nucleotide sequences of VH gene from different B-cell disorders

A. Nucleotides sequence

Case 1	←FR1→←	CDR1	→	FR2																						
	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A
HUMIGHYAAD	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAT	GCT	ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA
Clone 1	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	-A-	-T-	---	---	---	--A	---	---	---	---	---
Clone 2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-GC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 4	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	-GC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---
	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A
VH3-11	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	AGT	AGC	TAT	TGG	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA
Clone 1	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--C
Clone 2	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	-G-	---	--C
Clone 3	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	-G-	---	--C
Clone 4	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--C
Clone 5	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--C
Clone 6	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--C
Clone 7	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	-G-	---	--C
Clone 8	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--C
Clone 9	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--C
Clone10	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--C

(continued)

(continued)

	← CDR2 →														← FR3 →												
	V	I	S	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	A	I	S	R	D	N	S	K
HUMIGHYAAD	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT	GGA	AGT	AAT	AAA	TAC	TAC	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	GCC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	AAG
Clone 1	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---
Clone 2	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---
Clone 3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---
Clone 4	C--	---	---	-C-	-G-	---	---	--C	-GT	A-T	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---
Clone 5	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---
	N	I	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K
VH3-11	AAC	ATA	AAG	CAA	GAT	GGA	AGT	GAG	AAA	TAC	TAT	GTG	GAC	TCT	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG
Clone 1	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 2	---	---	---	---	-G-	---	--C	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 3	---	---	---	---	-G-	---	--C	---	---	A-T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 4	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 9	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone10	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(continued)

(continued)

	→												
	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E
HUMIGHYAAD	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG
Clone 1	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 4	--T	-T-	A--	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E
VH3-11	AAC	TCA	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG
Clone 1	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---
Clone 2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(continued)

B. Amino acid sequence

Case 1	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
HUMIGHYAAD	A S G F T F S S Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F A I S R D N S K				
Clone1	- - - - -	- - - - -	L - - - - -	- - - - -	- - - - -
Clone2	- - - - -	G - - - -	L - - - - -	- - - - -	- - - - -
Clone3	- - - - -	G - - - -	L - - - - -	- - - - -	- - - - -
Clone4	- - - - -	G - - - -	- - - - -	L - - S G - - - S N - G - - - - -	- - - - -
Clone5	- - - - -	- - - - -	A - - - - -	- - - - -	- - - - -
VH3-11	A S G F T F S S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R F T I S R D N A K				
Clone1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E - -
Clone2	- - - - -	- - - - -	- - - - -	N - - - - -	- - - - -
Clone3	- - - - -	- - - - -	- - - - -	N - - - - -	E - -
Clone4	- - - - -	- - - - -	- - - - -	N - - - - -	E - -
Clone5	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E - -
Clone6	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Clone7	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Clone8	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E - -
Clone9	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Clone10	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

(continued)

HUMIGHYAAD	N T L Y L Q M N S L R A E D
Clone1	- - - S - - - - - X
Clone2	- - - - - X
Clone3	- - - - - X
Clone4	- - - - - X
Clone5	- - - - - X
VH3-11	N S L Y L Q M N S L R A E D
Clone1	- - - - -
Clone2	- - - - -
Clone3	- - - - -
Clone4	- - - - -
Clone5	- - - - -
Clone6	- - - - -
Clone7	- - - - -
Clone8	- - - - -
Clone9	- - - - -
Clone10	- - - - -

圖五. 案例 1 慢性淋巴球性白血病免疫球蛋白重鍊基因可變區域, 依據 Kabat 等所提出的準則比對核苷酸與氨基酸序列的比對.
除了案例 1 個案 CDR 與 FR 的比較之外, 也和 follicular lymphoma 之間做比較.

(continued)

	A	D	E	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	
VH1-DP10	GCG	GAC	GAA	TCC	ACG	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	
Clone 1	--C	---	---	---	---	---	---	--A	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---
Clone 2	--C	---	---	---	---	---	---	--A	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---
Clone 3	--C	---	---	---	---	---	---	--A	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---
Clone 4	--C	---	---	---	---	---	---	--A	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---
Clone 5	--C	---	---	---	---	---	---	--A	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---

B. Amino acid sequence

	← CDR1 →	← CDR2 →
VH1-DP10	S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S	W V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q
Clone 1	- - - - - D - - N	- - - - - L - - - - - K - - - - -
Clone 2	- - - - - D - - N	- - - - - L - - - - - K - - - - -
Clone 3	- - - - - D - - N	- - - - - L - - - - - K - - - - -
Clone 4	- - - - - D - - N	- - - - - L - - - - - K - - - - -
Clone 5	- - - - - D - - N	- - - - - L - - - - - K - - - - -
VH1-10	G R V T I T A D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A	
Clone 1	- - - - - N - - - - -	
Clone 2	- - - - - N - - - - -	
Clone 3	- - - - - N - - - - -	
Clone 4	- - - - - N - - - - -	
Clone 5	- - - - - N - - - - -	

圖六. 案例 2 慢性淋巴球性白血病免疫球蛋白重鍊基因可變區域, 依據 Kabat 等所提出的準則比對核苷酸與氨基酸序列的比對.

Amino acid and nucleotide sequences of VH gene from different B-cell disorders

A. Nucleotides sequence

Case3	←FR1→←	CDR1	→←	FR2																								
	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A		
VH3-11	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	AGT	AGC	TAT	TGG	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA		
Clone 1	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	C	
Clone 2	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	C
Clone 3	---	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	C
Clone 4	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	C
Clone 5	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	C
	←	CDR2	→←	FR3																								
	N	I	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A		
VH3-11	AAC	ATA	AAG	CAA	GAT	GGA	AGT	GAG	AAA	TAC	TAT	GTG	GAC	TCT	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC		
Clone 1	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Clone 2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Clone 3	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Clone 4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Clone 5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

(continued)

	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E
VH3-11	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG
Clone 1	---	---	T-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 2	---	---	T-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 3	---	---	T-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 4	---	---	T-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clone 5	---	---	T-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

D gene segments and N region additions

Patient	FR3	N	D segment	N
			DM5-a/DM5-b G M T G T GGT ATA ACT GGA ACA G	
Case 1	GCGAGA	GAT TTC	--- --- --- GG-	CACAGCAGCGGGC
			V G	
Case 3	GCGAGA	CAT TTC	--- G-- --- GG-	
			DXP' I I T M V R G V I I ATT ACT ATG GTT CGG GGA GTT ATT ATA L L	
Case 2	CACAGG	GG	--- T-- --- --- C--	
Case 4			--- --- --- --- C--	
Case 5			--- --- --- --- C-	

圖八. Sequences of the CLL D gene segments compared with their most likely germline counterpart.

J_H gene segments

A. Nucleotides sequence

Patient	CDR3	FR4
JH5b	ACAAC TGGTT CGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	CAGT
Case 1	-----T-	----
Case 4	---A-----AT-----A	----
Case 5	---A-----AT-----A	----
JH4b	ACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	
Case 2-1	---T-----T-	
Case 2-2	---T-----G-----T-	
Case 3	---T---T-----G-----T-	
JH4a	ACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	
Case 6	--GG- C---CC-----T-----A-	

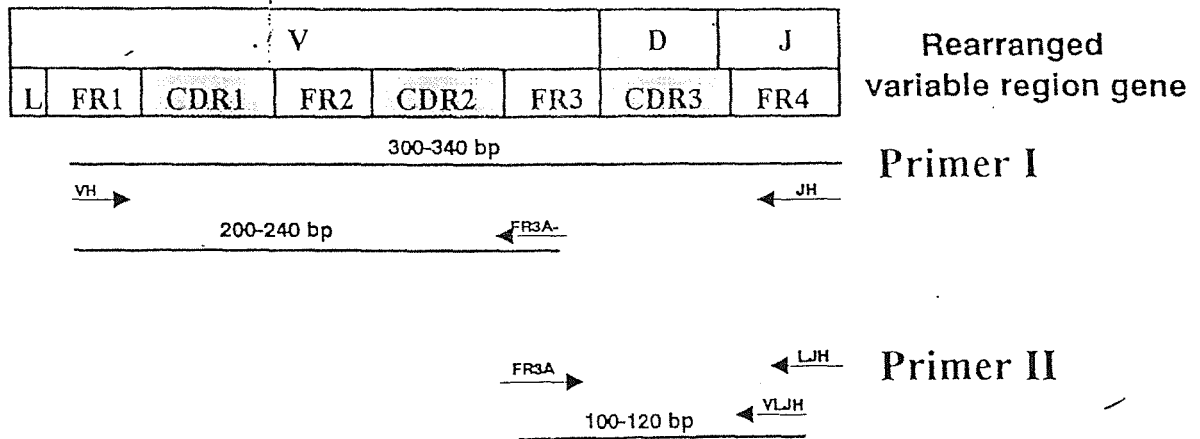
B. Amino acid sequence

Patient	CDR3	FR4
JH5b	W F D P W G Q G T L V T V S S	
Case 1	-----	CAGT
Case 4	-----	CAGT
Case 5	-----	CAGT
	99 102 105	
JH4b	Y F D Y W G Q G T L V T V S S	
Case 2-1	F-----	
Case 2-2	F-----R-----	
Case 3	F - - P - - R - - - - -	
JH4a	Y F D Y W G Q G T L V T V S S	
Case 6	W - - p - - - - -	

圖九. Sequences of the CLL JH gene segments compared with their most liked gerline counterpart.

A. Nucleotides sequence.

B. Amino acid sequence.



	Amplified region	Primer name	Primer sequence (5' to 3')
II	FR3-FR4	FR3A	5'-ACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT-3'
		LJH	5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'
		VLJH	5'-GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG-3'
I	FR1-FR4 FR1-FR3	VH1	5'-CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG-3'
		VH2	5'-TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA-3'
		VH3	5'-GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA-3'
		VH4A	5'-TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCCA-3'
		VH4B	5'-CGCTGTCTCTGGTTACTCCATCAG-3'
		VH5	5'-GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA-3'
		VH6	5'-CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG-3'
		JH	5'-AACTGCAGAGGAGACGGTGACC-3'
		FR3A-	5'-ACAGTAATACA(G/C)(G/A)GCCGTGT-3'

Table 1. Sequence of the Primers(5'-3') used to determine monoclonality of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement.

(轉載自劉學玫碩士論文)

附表一

表 2. Laboratory data and of B-CLL tumor cells

Case No	Circulating Lymphocytes ($\times 10^{-9}/L$)	CD5 (%)	CD19 (%)	CD20 (%)
1	16.6	75	93	93
2	30.1	95	93	81
3	9.0	95	86	85
4	21.4	65	83	85
5	15.2	83	90	89
6	29.4	74	89	91

Tumor cells obtained from peripheral blood.

表 3. Analysis of CLL-derived VH sequences

Case	VH family	GL Donor	D _H	J _H	% Homolgy	Identical sequence /Cloned sequenced
1	VH 3	VH3-11	DXP' 1	JH5b	99%	10/10
2	VH 1	DP10	DM5-a	JH4b	95%	5/5
3	VH 3	VH3-11	DXP' 1	JH4b	94%	5/5
4	---	---	DXP' 1	JH5b		5/5
5	---	---	DXP' 1	JH5b		5/5
6	---	---	---	JH4a		5/5

表 4. Distribution of mutations in CLL-derived sequences

Case No	# of nucleotide difference							
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDRs	FRs	Total
1	0	1	3	3	1	4	4	8
2	0	3	0	2	5	5	5	10
3	0	2	2	2	1	4	3	7

表 5. Distribution of mutations in dominant VH sequence

Case No	Region	Observed			Expected		
		R	S	(R/S)	R	S	(R/S)
1	FR	1	3	(0.3)	5	2	(3)
	CDR	1	3	(0.3)	2	1	(2)
2	FR	1	4	(0.25)	6	2	(3)
	CDR	4	1	(4.0)	2	1	(2)
3	FR	0	4	(0.25)	4	1	(4)
	CDR	4	1	(4.0)	1	1	(1)

- ※ R/S is the ratio of replacement (R) to silent (S) mutations observed in CDRs or FWRs , as compared with those expected by chance alone.
- ※ Calculation of number of expected R mutations in Ig V-gene CDRs or FRs:
 Number of expected R mutations =
 $n \times (\text{CDR Rf or FR Rf}) \times (\text{CDR}_{\text{rel}} \text{ or } \text{FR}_{\text{rel}})$

where: n = total number of observed mutations

Rf = replacement frequency inherent to CDR or FR sequences

CDR_{rel} or FR_{rel} = relative size of the CDRs or FRs

柒、參考文獻

- Rolink A and Melchers F. (1991) Molecular and Cellular origins of B Lymphocyte Diversity. *Cell*. 66:1081-1094.
- Chang B and Casali P. (1994) The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig V_H genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunology Today*. 15:367-373.
- Berek C and Milstein C.(1987) Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immun Rev*. 96:23-41.
- Berek C. (1992) The development of B cells and the B cell repertoire in the microenvironment of the germinal centre. *Immunol Rev*. 126:5-19..
- Berek C. (1993) Somatic mutation and memory. *Curr Opin Immunol*. 5:218-222.
- Buluwela L, Albertson D.G, Sherrinton P, Rabbitts P.H, Spurr N and Rabbitts T.H. (1988) The use of chromosomal translations to study human immunoglobulin gene organization: mapping DH segment within 35 kb of the Cu gene and identification of a new DH locus. *EMBO (Eur Mol Biol Organ)* . 7:2003-2020.
- Berek C, Berger A and Apel M. (1991) Maturation of the Immune Response in Germinal centers. *Cell*. 67:1121-1129.
- Cook G.P, Jomlisen I.M. (1995) The human immunoglobulin V_H repertoire. *Immuno Today*. 16:237-242.
- Rozman C and Montserrat E. (1995) Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England J of Medicine*. 333:1052-1056.
- Bahler D.W and Levy R(1992) Clonal evolution of a follicular lymphoma:Evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 89:6770-6774.
- Kallberg E, Jainandunsing S, Gray D and Leanderson T.(1996) Somatic Mutation of Immunobulin V genes in Vitro. *Science*. 271:1285-1289.

Foon K.A, Rai K.R, Gale R.P. (1990) Chronic lymphocytic leukemia: New insights into biology and therapy. *Ann Intern Med.* 113:525-539.

Papavasiliou F, Jankovic M, Gong S and Nussenzweig M.C. (1997) Control of immunoglobulin gene rearrangements in developing B cells. *Curr opin Immunol.* 9 :233-238.

Fulop G.M. and Phillips R.A. (1989) Use of *scid* mice to identify and quantitate lymphoid-restricted stem cells in long term bone marrow cultures. *Blood.* 74:1537-1544.

Brittinger G, Hellriegel K.P and Hiddemann W. (1997) Consensus meeting report: Chronic lymphocytic leukemia and hair-cell leukemia diagnosis and treatment. Results of a consensus meeting of the German CLL Cooperative Group. *Ann Hematol.* 74:1537-1544.

Nossal G.L.V. (1994) Negative selection of lymphocyte. *Cell.* 76:9229-9239.

Han S, Zheng, Takahashi Y and Kelsoe G. (1997) Distinctive Characteristics of germinal center B cells. *Semin Immunol.* 9:255-260.

Hardie D, Johnson G.D, Khan M and MacLennan I.C. (1993) Quantitative analysis of molecules that distinguish functional compartments within germinal centers. *Eur J Immunol.* 23:997-1004.

Hernandez J.M, Mecucci C, Criel A, Meeus P, Michaux L, Vanhoof A, Verhoef G, Louwagie A, Schieff JM, Boegaerts M, Vandenberghe H. (1995) Cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. *Leukemia.* 9:2140.

Hollowood K and Goodiadi J.R. (1998) Germinal centre cell kinetics. *J Pathol.* 185:229-233.

Ichihara.Y, Matsuoka H and Kurosawa Y. (1988) Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO.* 7:4144-4150.

Jacob J, Kelsee G, Rajewsky K and Weiss U. (1991) Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centers. *Nature.* 354:389-392.

- Capra J.D and Tucker P.W. (1989) Human immunoglobulin heavy chain genes. *The J of Biological Chemistry*. 264:12745-12748.
- Jukes T.H and King J.L. (1979) Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature*. 281:605-606.
- Juliusson G, Oscier D.G, Fitchett M, Ross F.M, Stockdill G, Mackie M.J, Parker A.C, Castoldi D.L, Cuneo A, Knutilla S, Elonen E and Gahrton G. (1990) Prognosis subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*. 323:720-724.
- Keller G. Paige C, Gilboa E and Wagner E.F. (1985) Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature*. 318:149-154.
- Kipps T.J(1993) Immunoglobulin gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*. 19:615.-625.
- Lim LC.(1996) Molecular genetics of B-cell lymphomas. *ANN Acad Med Singaporo*. 25: 37-41.
- Liu Y.J, Joshua D.E, willians G.T, Smith C.A, Gordon J and MacLennan I.C.M. (1989) Mechanisms of antigen-driven selection in germinal centers. *Nature*. (London) , 342:929-931.
- Liu Y.J, Bouteiller O and Fugier-Viver I. (1997) Mechanisms of selection and differetiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol*. 9:256-262.
- MacLennan I.C.M, Liu Y.J and Johnson G.D(1992) Maturation and dispersal of B cell clones during T cell-dependent antibody response. *Immunol Rev*. 126:143-161.
- Mangency M, Richard D, Tursz T and Wiels J(1991) An antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol*. 21:1131-1140.
- Corcoran M.M *et al.* (1998) Detailed Molecular Delineation of 13q14.3 Loss in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 91:1382-1390.

- Mckean D, Huppik, Bell M, Staudt L, gerhard W, and Weigert M (1984) Generation of antibody diversity in the immune response of *BALB/c* mice to influenza virus hemagglutination. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 81:3180-3184.
- Meeker T.C, Grimaldia J.C, O`Rourke R, Loeb J, Juliusson G, Einhorn (1988) Lack of detectable somatic hypermutation in the V region of the IgH chain gene of a human chronic B lymphocytic leukemia. *J Immunol.* 141:3994-3998.
- Matsuda.F, Shin E K, Hirabayashi Y, Nagaoka H, Yoshida M.C, Zong S.Q and Honjo T. (1990) Organization of variable region segments of the human immunoglobulin heavy chain: duplication of the D5 cluster within the locus and interchromosomal translation of variable region segments. *EMBO J.* 9:2501-2506.
- Maizels N. (1995) Somatic hypermatation: How many mechanisms diversify V region sequences? *Cell.* 83:9-12.
- Oscier D.G, Thompsett A, Zhu D, Sterenson F.K. (1997) Differential rates of somatic hypermutation in V_H gene among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood.* 89:4153-4160.
- Pascual V, *et al.* (1991) Human immunoglobulin heavy chain variable region genes: Organization, polymorphism, and expression. *Advances in Immunol.* 49:1-74.
- Phillips R.A. (1989) Development and regulation of the B-lymphocyte lineages: an interpretive overview. *Prog Immunol.* 7:305-315.
- Qin Y, Greiner A, *et al.* (1995) Somatic hypermutation in Low-Grade Mucosa-associated Lymphoid Tissue-Type B-cell Lymphoma. *Blood.* 86:3528-3534.
- MacCallum R.M, Andrew C.R. Martin and Thornton J.M. (1996) Antibody-antigen interaction: contact analysis and binding site topography. *J mol Biol.* 262:732-745.
- Schroeder H.W and Dighiero G. (1994) The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: Analysis of the antibody repertoire. *Immuno Today.* 15:288-294.
- Shokat K.M and Goodnow C.C (1995) Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal center immune. *Nature.* 375:334-338..

Shlomchik M.J, Aucoin A.H, Pisetsky D.S, Weigert M.G. (1987) Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 84:9150-9154.

Smith L.G, Weissman I.L and Heimfeld S. (1991) Clonal analysis of haematopoietic stem cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 88:2788-2792.

Sahota S.S, Garand R, Bataille R, Smith A.J and Stevenson F.K. (1998) V_H gene analysis of clonally related IgM and IgG from human lymphoplasmacytoid B-cell tumors with chronic lymphocytic leukemia features and serum monoclonal IgG. *Blood.* 91:238-243.

Tonegawa S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 302:575-581.

Storb,U.(1996) Molecular basis of somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Curr Opin Immunol.* 8:206-214.

Yamada M, Wasserman R, Reichard B.A, Shane S, Caton A.J, Rovera G. (1991) Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity and joining segments in adult segments in adult human peripheral blood B lymphocytes. *J Exp Med.* 173:395-407.

Zelenetz A.D, Chen T.T and Levy R(1992) Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigenic selection. *J Exp Med.* 176:1137-1148.

劉學玫 (1996) 濾泡型淋巴瘤及粘膜相關組織 B 細胞淋巴瘤免疫球蛋白重鍊可變區基因之突變分析.(長庚大學基礎醫學研究所碩士論文)

Table 80-6. Terminology Among Four Classifications Schemes

Working Formulation	Rappaport	Lukes-Collins	Kiel
<i>Low Grade</i>			
Malignant lymphoma Small lymphocytic consistent with CLL plasmacytoid	Lymphocytic, well differentiated Lymphocytic with plasmacytoid features	Small lymphocyte, B and T cell types Plasmacytoid lymphocyte	ML lymphocytic, CLL ML lymphoplasmacytic/lymphoplasmacytoid
Malignant lymphoma, follicular Predominantly small cleaved cell Diffuse areas Sclerosis	Nodular, poorly differentiated lymphocytic (PDL)	Small cleaved FCC	ML centroblastic-centrocytic (small), follicular = diffuse
Malignant lymphoma, follicular Mixed, small cleaved and large cell	Nodular, mixed (NML)	Small cleaved or large cleaved FCC	ML centroblastic-centrocytic (small); follicular = diffuse
<i>Intermediate Grade</i>			
Malignant lymphoma, follicular Predominantly large cell Diffuse areas Sclerosis	Nodular, histiocytic	Large cleaved or large noncleaved FCC	ML centroblastic-centrocytic (large), follicular = diffuse
Malignant lymphoma, diffuse Small cleaved cell	Diffuse, poorly differentiated	Diffuse, small cleaved cell FCC	ML centrocytic (small)
Malignant lymphoma, diffuse Mixed small and large cell Sclerosis Epithelioid cell component	Diffuse, mixed (DML)	Predominant cell type, including FCC subsets (small cleaved, large cleaved, large noncleaved) and some PTCL	ML centroblastic-centrocytic (small), diffuse ML lymphoplasmacytic/centrocytic, polymorphic
Malignant lymphoma, diffuse Large cell Cleaved cell Noncleaved cell Sclerosis	Diffuse histiocytic	Predominant cell type, large noncleaved FCC > large cleaved, some PTCL	ML centroblastic-centrocytic (large) diffuse ML centrocytic (large) ML centroblastic
<i>High Grade</i>			
Malignant lymphoma Large cell immunoblastic Plasmacytoid Clear cell Polymorphous Epithelioid cell component	Diffuse histiocytic	Immunoblastic sarcoma, B cell PTCL	ML immunoblastic T zone lymphoma Lymphoepithelioid cell lymphoma
Malignant lymphoma Lymphoblastic Convoluting cell Nonconvoluting cell	Lymphoblastic (previously referred to as diffuse PDL)	Convoluting lymphocytic lymphoma (predominantly thymic origin), rarely B cell	ML lymphoblastic, convoluting cell type ML lymphoblastic, unclassified
Malignant lymphoma Small noncleaved Burkitt's Follicular areas	Undifferentiated lymphoma, Burkitt's and non-Burkitt's	Small noncleaved FCC, Burkitt's and non-Burkitt's	ML lymphoblastic, Burkitt type and other B lymphoblastic
<i>Miscellaneous</i>			
Composite Mycosis fungoides Histiocytic Extramedullary plasmacytoma Unclassifiable Other	Composite Histiocytic Extramedullary plasmacytoma Unclassifiable Other	Composite Cutaneous T cell lymphoma Malignant histiocytosis Plasmacytoma	Mycosis fungoides ML plasmacytic

Abbreviations: ML, malignant lymphoma; NML, nodular mixed lymphoma; DML, diffuse mixed lymphoma; FCC, follicular center cell; PTCL, peripheral T cell lymphoma; > greater than or more common than; PDL, poorly differentiated lymphocytic.

