

**Untersuchungen zu den Mechanismen in der Entwicklung
maligner B-Zell-Lymphome vom mukosaassoziierten
lymphatischen Gewebe (MALT) - Typ**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Constanze Helga Knörr

aus Ansbach
Würzburg, 2000

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	B-Zell-Reifung und -Aktivierung bei der humoralen Immunantwort	3
2.1.1	Entwicklungsstufen der B-Zell-Reifung im Knochenmark	4
2.1.1.1	Grundaufbau eines humanen Immunglobulinmoleküls	5
2.1.1.2	Der Mechanismus des VDJ-Rearrangements der variablen Region der schweren Immunglobulinketten beim Menschen	5
2.1.1.3	Aufbau der variablen Region der schweren Immunglobulinketten	8
2.1.2	Die humorale Immunantwort	9
2.1.2.1	B- und T-Zell-Aktivierung nach Antigenkontakt	9
2.1.2.2	Affinitätsreifung der B-Zellen im Keimzentrum	11
2.2	Maligne Non-Hodgkin-Lymphome und deren Einteilung nach der R.E.A.L.-Klassifikation	15
2.2.1	Das extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphom des MALT-Typs	15
2.2.1.1	Das niedrig-maligne MALT-Typ Lymphom	17
2.2.1.2	Das sekundär hoch-maligne MALT-Typ Lymphom	18
2.2.1.3	Das primär hoch-maligne extranodale B-Zell-Lymphom	18
2.3	Aufgabenstellung	20
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	22
3.1	Analyse der variablen Region der Schwereketten-Gene (V_H-Gene) des Antigenrezeptors von niedrig-malignen MALT-B-Zell-Lymphomen	22
3.1.1	Identifizierung des Tumor-B-Zell-Klons	22
3.1.2	Amplifikation und Identifizierung des tumorspezifischen V_H-Gens	28
3.1.2.1	Analyse der V_H -Region bei mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphomen	29
3.1.2.2	Analyse der verwendeten V_H -Gene im polyklonalen Entzündungsinfiltrat von MALT-Typ Lymphomen	33

3.1.3	Korrelation der Tumorklonalität mit dem Nachweis der Translokation t(11;18)(q21;q21) in niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen	36
3.1.4	Mutationsanalysen bei mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphomen	37
3.1.5	Intraklonale Variationen bei mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphomen	44
3.1.6	Diskussion der Ergebnisse	50
3.1.6.1	Bestimmung der Klonalität der untersuchten niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome und Wahl der tumorspezifischen Primer	50
3.1.6.2	Analyse des tumorspezifischen V _H -Gen-Repertoires in mono- und biklonalen niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen	54
3.1.6.3	Analyse des V _H -Gen-Repertoires des polyklonalen Entzündungsinfiltrats bei MALT-Typ Lymphomen	57
3.1.6.4	Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Tumorzellen von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen anhand von Mutationsanalysen der tumorspezifischen V _H -Region	59
3.2	Charakterisierung des Mikromilieus bei malignen MALT-Typ Lymphomen <i>in vivo</i>	63
3.2.1	Bestimmung der Menge an tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TITL) <i>in vivo</i>	63
3.2.2	Bestimmung des Aktivierungszustandes der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten <i>in vivo</i>	64
3.2.3	Untersuchungen zur Expression von kooperierenden Molekülen zwischen Tumor-B-Zellen und tumorinfiltrierenden T-Zellen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	66
3.2.3.1	Nachweis der Expression von CD40-Ligand im Tumorgewebe <i>in vivo</i>	66
3.2.3.1.1	Nachweis der mRNA-Expression von CD40-Ligand	66
3.2.3.1.2	Nachweis der Proteinexpression von CD40-Ligand	67
3.2.3.2	Nachweis der mRNA-Expression von CD40-Ligand in tumorinfiltrierenden T-Zellen <i>in vitro</i>	68
3.2.3.3	Nachweis der Expression von Fas-Ligand im Tumorgewebe <i>in vivo</i>	70
3.2.3.3.1	Nachweis der mRNA-Expression von Fas-Ligand	70
3.2.3.3.2	Nachweis der Proteinexpression von Fas-Ligand	71
3.2.3.4	Nachweis der mRNA-Expression von Fas-Ligand in tumorinfiltrierenden T-Zellen <i>in vitro</i>	72

3.2.4	Konstruktion der Zelllinie Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/huFas-L	73
3.2.4.1	Stabile Transfektion der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk ⁻ /huCD40-L/huCD32 mit humanem Fas-Ligand	73
3.2.4.2	Nachweis der stabilen Transfektion der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk ⁻ /huCD40-L/huCD32 mit humanem Fas-Ligand	79
3.2.5	Untersuchungen zur Expression von Cytokinen im Tumorgewebe <i>in vivo</i>	82
3.2.5.1	Nachweis der mRNA-Expression von T _H 1- und T _H 2/T _H 3-Typ Cytokinen <i>in vivo</i>	82
3.2.5.2	Nachweis der Proteinexpression von T _H 1- und T _H 2/T _H 3-Typ Cytokinen	85
3.2.6	Diskussion der Ergebnisse	86
3.2.6.1	Aktivierte und immunkompetente tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TITL) in MALT-Typ Lymphomen <i>in vivo</i>	86
3.2.6.2	Expression von CD40-Ligand und Fas-Ligand auf TITLs in MALT-Typ Lymphomen <i>in vivo</i>	86
3.2.6.3	Konstruktion der Zelllinie Ltk ⁻ /huCD40-L/huCD32/huFas-L zur Simulation von T/B-Zell-Interaktionen	88
3.2.6.4	Expression von T _H 2- und T _H 3-Typ Cytokinen in MALT-Typ Lymphomen <i>in vivo</i>	90
4	SCHLUßFOLGERUNG UND AUSBLICK	92
5	MATERIAL UND METHODEN	98
5.1	Material	98
5.1.1	Enzyme, Chemikalien und Geräte	98
5.1.1.1	Enzyme	98
5.1.1.2	Chemikalien	98
5.1.1.3	Antikörper	98
5.1.1.4	Arbeitsgeräte und Hilfsmittel	98
5.1.1.5	Allgemeine Puffer und Lösungen	99
5.1.1.6	Nährmedien für Bakterien	100
5.1.1.7	Nährmedien für eukaryontische Zellen	100
5.1.2	Plasmide und Oligonukleotide	101
5.1.2.1	Plasmide	101
5.1.2.2	Oligonukleotide	101

5.1.3	Bakterienstämme, Primärzellen und Zelllinie	101
5.1.3.1	Bakterienstämme	101
5.1.3.2	Primärzellen	101
5.1.3.3	Zelllinien	103
5.1.3.4	Antikörper für FACS-Analysen	103
5.1.3.5	Antikörper für immunhistochemische Färbungen	103
5.1.3.6	Antikörper für Western-Blot-Analysen	103
5.1.3.7	Antikörper zur Zelldepletion	103
5.1.4	Größenstandard	104
5.2	Methoden	105
5.2.1	Molekularbiologische Methoden	105
5.2.1.1	Kultivierung von prokaryontischen Zellen	105
5.2.1.1.1	Fest- und Flüssigkultur von Bakterienstämmen	105
5.2.1.1.2	Dauerkulturen von Bakterien	105
5.2.1.2	DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe	105
5.2.1.3	DNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen	106
5.2.1.4	Phenol-, Chloroform-Isoamylalkohol (CIA), Chloroformextraktion	106
5.2.1.5	DNA-Fällung	107
5.2.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	107
5.2.1.7	RNA-Isolation aus gefrorenem Gewebe	107
5.2.1.8	RNA-Gel	108
5.2.1.9	Konzentrationsbestimmung der RNA	108
5.2.1.10	Synthese von cDNA	108
5.2.1.11	Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) - Ansatz mit cDNA als Template	109
5.2.1.12	Prinzip der Optimierung einer PCR	109
5.2.1.13	GAPDH - PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese	109
5.2.1.14	Quantifizierung der cDNA-Menge anhand einer GAPDH-PCR	110
5.2.1.15	CDR3-PCR	110
5.2.1.16	V _H -Familien-PCR	111
5.2.1.17	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel	112
5.2.1.17.1	Aufreinigung über GenElute™ Minus EtBr	112
5.2.1.17.2	Aufreinigung mittels Gelase	112
5.2.1.18	„Bluntenden“ von PCR-Fragmenten	112
5.2.1.19	Ligation von DNA-Fragmenten	113

5.2.1.19.1 Bluntend-Ligation	113
5.2.1.19.2 Sticky-end-Ligation	113
5.2.1.20 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i>	114
5.2.1.21 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	114
5.2.1.22 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	115
5.2.1.23 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	117
5.2.1.24 Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese	118
5.2.1.25 Cyclesequencing von DNA und Auswertung über ABI 373	118
5.2.2 Proteinchemische Methoden	119
5.2.2.1 Gesamtproteinaufschluß	119
5.2.2.2 Gesamtproteinaufschluß zum Nachweis von Proteinen im ELISA	119
5.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	119
5.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgel	119
5.2.2.5 Western-Blot	120
5.2.2.6 Western-Blot-Hybridisierung mit monoklonalen Antikörpern und ECL-Detektion	121
5.2.3 Zellbiologische Methoden	121
5.2.3.1 Einfrieren von eukaryontischen Zellen und Zelllinien	121
5.2.3.2 Auftauen von eukaryontischen Zellen und Zelllinien	121
5.2.3.3 Zellzahlbestimmung nach Neubauer	122
5.2.3.4 Gewinnung von Primärzellen aus Frischgewebe	122
5.2.3.5 Lymphozytenisolierung aus Vollblut oder Buffycoat mittels Ficollgradient	122
5.2.3.6 Kultivierung von Suspensionszellen	122
5.2.3.7 Kultivierung von adherenten murinen Fibroblasten	122
5.2.3.8 Zelldepletion mit magnetischen Beads	123
5.2.3.9 Stimulation von PBLs mit Ionomycin und TPA	123
5.2.3.10 Proliferationstest mit H^3 -Thymidin in vitro	123
5.2.3.11 FACS-Färbung	124
5.2.3.11.1 Direkte FACS-Färbung von Zelloberflächenmolekülen	124
5.2.3.11.2 Indirekte und direkte FACS-Färbung von Zelloberflächenmolekülen in einem Reaktionsansatz	124
5.2.3.12 Kultivierung von B-Lymphozyten im „CD40-System“	125
5.2.3.12.1 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk^- /huCD32 Zellen und anti-CD40-Antikörpern	125
5.2.3.12.2 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk^- /huCD32/huFas-L Zellen	125
5.2.3.12.3 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk^- /huCD40-L/huCD32 Zellen	125

5.2.3.12.4 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk ⁻ /huCD40-L/huCD32/ huFas-L Zellen	125
5.2.3.12.5 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk ⁻ /muFas-L Zellen	125

5.2.3.13	Austesten der G418-Konzentration zur Selektion auf stabil transfizierte murine Ltk ⁻ -Zellen	126
5.2.3.14	Transfektion der murinen L-Zelllinie	126
5.2.3.15	Apoptoseassay <i>in vitro</i>	127
5.2.4	Immunhistochemische Methoden	127
5.2.4.1	ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay zum Nachweis von Fas-Ligand Protein	128
5.2.4.2	APAAP-Färbung (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)	129
5.2.5	Sequenz- und Mutationsanalysen der variablen Region der schweren Immunglobulinketten	130
5.2.5.1	Sequenzauswertungen	130
5.2.5.2	Analyse der somatischen Mutationen	130
6	LITERATURVERZEICHNIS	132
7	ANHANG	142
7.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zu 3.1.4 und 3.1.5	142
7.2	Verwendete Oligonukleotide	171
7.3	Lebenslauf	173
7.4	Veröffentlichungen	175

Abkürzungsverzeichnis

3'	downstream
5'	upstream
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
α	Alpha
α	anti (bei Antikörperspezifität)
A	Adenin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B-CLL	Chronische Lymphatische B-Zell-Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CD40-L	CD40-Ligand
cDNA	komplementäre DNA
C _H	konstante Region der schweren Ketten von Immunglobulinen
C _L	konstante Region der leichten Ketten von Immunglobulinen
cm ²	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cw	clockwise; Orientierung eines Fragments bezüglich des LacZ-Leserahmens des Vektors in gleicher Richtung kloniert
ccw	counterclockwise; Orientierung eines Fragments bezüglich des

LacZ-Leserahmens des Vektors in entgegengesetzter Richtung
kloniert

d	2´Desoxy-
ddNTP	2´,3´-Didesoxynukleosid-5´triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleosid-5´phosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
d(T) ₁₅	Oligonukleotid aus 15 Thymidinresten
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cellsorter
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	fötales Kälberserum
FISH	fluorescence in situ hybridisation
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOR	steht für FORWARD im Zusammenhang mit der Orientierung eines Primers bei der PCR
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) oder Gramm
G	Guanin
G418	Neomycin
GALT	darmassoziierte lymphatische Gewebe
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gRNA	Gesamt-RNA
h	Stunde
hu	human

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
k	Kilo ($\times 10^3$)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria-Broth
LMP	low melting point
m	Milli ($\times 10^{-3}$)
MALT	muscosaasoziiertes lymphatisches Gewebe
mcs	multiple cloning site
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
M-MTV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mu	murin
MW	Molekulargewicht
μ	Mikro ($\times 10^{-6}$)
n	Nano ($\times 10^{-9}$)
NaOAc	Natriumacetat
Neo	Neomycin
nt	Nukleotid
Od _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
p	Piko ($\times 10^{-12}$)

p Plasmid

PBL	peripherer Blutlymphozyt
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffprotonenkonzentration
Ponceau-S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-8sulfo-phenylazo)phenylazo]- 2,7-naphthalene disulfonic acid
QR	Quantum Red™
REV	steht für REVERSE im Zusammenhang mit der Orientierung eines Primers bei der PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR (reverse transcribed PCR)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
t	Zeit (time)
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T _M	Schmelztemperatur
TITL	tumorinfiltrierende T-Lymphozyten
TPA	12-O-Tetradekanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRI	Tricolor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

U	Einheit der enzymatischen Aktivität (unit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V _H	variable Region der schweren Ketten von Immunglobulinen
V _L	variable Region der leichten Ketten von Immunglobulinen
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent; weight per volume)
XCSF	Xylen Cyanol FF
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Genetischer Code

TTT	F Phe	TCT	S Ser	TAT	Y Tyr	TGT	C Cys
TTC	F Phe	TCC	S Ser	TAC	Y Tyr	TGC	C Cys
TTA	L Leu	TCA	S Ser	TAA	* Ter	TGA	C Cys
TTG	L Leu	TCG	S Ser	TAG	* Ter	TGG	W Trp
CTT	L Leu	CCT	P Pro	CAT	H His	CGT	R Arg
CTC	L Leu	CCC	P Pro	CAC	H His	CGC	R Arg
CTA	L Leu	CCA	P Pro	CAA	Q Gln	CGA	R Arg
CTG	L Leu	CCG	P Pro	CAG	Q Gln	CGG	R Arg
ATT	I Ile	ACT	T Thr	AAT	N Asn	AGT	S Ser
ATC	I Ile	ACC	T Thr	AAC	N Asn	AGC	S Ser
ATA	I Ile	ACA	T Thr	AAA	K Lys	AGA	R Arg
ATG	M Met	ACG	T Thr	AAG	K Lys	AGG	R Arg
GTT	V Val	GCT	A Ala	GAT	D Asp	GGT	G Gly
GTC	V Val	GCC	A Ala	GAC	D Asp	GGC	G Gly
GTA	V Val	GCA	A Ala	GAA	E Glu	GGA	G Gly
GTG	V Val	GCG	A Ala	GAG	E Glu	GGG	G Gly

Aminosäuren-Einbuchstaben-Code

Alanin	A	Arginin	R	Asparagin	N
Asparaginsäure	D	Cystein	C	Glutamin	Q
Glutaminsäure	E	Glycin	G	Histidin	H
Isoleucin	I	Leucin	L	Lysin	K
Methionin	M	Phenylalanin	F	Prolin	P
Serin	S	Threonin	T	Tyrosin	Y
Tryptophan	W	Valin	V		

1 ZUSAMMENFASSUNG

B-Zell-Lymphome des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) entwickeln sich außerhalb des primären lymphatischen Gewebes und entstehen hauptsächlich im Magen aufgrund einer *H. pylori*-assoziierten chronischen Entzündung. Vorangegangene immunhistochemische und funktionelle Untersuchungen zeigten, daß die Tumorzellen phänotypisch Gedächtnis-B-Zellen entsprechen und Antigenrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe von molekulargenetischen Antigenrezeptoranalysen die Tumorzellpopulationen identifiziert und charakterisiert werden. Dabei wurde deutlich, daß sowohl mono- als auch biklonale B-Zell-Lymphome existieren. Im Vergleich zu neueren veröffentlichten Daten von MALT-Typ Lymphomen aus der Speicheldrüse, konnte jedoch bei den hier untersuchten gastralen Tumoren keine V_H -Genrestriktion nachgewiesen werden. Die tumorspezifischen V_H -Mutationsanalysen zeigten, daß es sich bei den Tumor-B-Zellen auch genotypisch um Gedächtnis-B-Zellen handelt, die jedoch offensichtlich unterschiedlich lange dem Mechanismus der Keimzentrumsmaturation ausgesetzt worden waren. Zudem konnte bei mono- und biklonale Lymphomen, im Gegensatz zu Fällen mit polyklonalem Entzündungsinfiltrat die Translokation $t(11;18)(q21;q21)$ nachgewiesen werden.

Ausgehend von der Tatsache, daß die Tumorprogression dieser B-Zell-Lymphome anfangs noch abhängig von dem lokal vorhandenen Mikromilieu zu sein scheint, wurden die tumorinfiltrierenden T-Zellen (TITL) genauer charakterisiert. Es wurden überwiegend $CD4^+$ TITLs nachgewiesen, die sowohl aktiviert ($CD69^+$) als auch immunkompetent ($CD28^+$) waren und die für T/B-Zell-Kooperationen essentiellen Moleküle wie CD40-Ligand und Fas-Ligand exprimierten. Zudem konnten im Tumorgewebe vor allem $T_H2/3$ -Typ Cytokine (IL10, IL13, $TGF\beta_1$) nachgewiesen werden, die ebenfalls das Tumorwachstum *in vitro* positiv beeinflussen können.

Um in Zukunft spezifischere Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Tumor-B-Zellen und TITLs durchführen zu können, wurde abschließend ein Zellkultursystem entwickelt, mit dessen Hilfe es möglich sein wird das Tumormikromilieu *in vitro* spezifisch zu simulieren, um so das Verhalten der Tumor-B-Zellen auch *ex vivo* beobachten und analysieren zu können. Die Daten dieser Arbeit geben einen vertieften und verbesserten Einblick in die tumorspezifischen Mechanismen und ermöglichen den Entwurf eines neuen detaillierteren Modells zur Tumorentstehung und -progression von niedrig-maligne MALT-Typ Lymphomen.

SUMMARY

B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) arise in sites primarily devoid of lymphoid tissue, preferentially in the stomach preceded by a chronic inflammation associated with *H. pylori* infection. Previous studies suggested that the tumor cells are the malignant counterpart of memory B-cells and express functional antigen receptors on their cell surfaces with autoantigenic reactivity.

In the present work the molecular structure of the tumor antigen receptor was described more detailed in several cases of gastric MALT-type lymphomas and compared with recently published data from normal B-cells and different tumor entities. These findings clearly showed the existence of mono- as well as bclonal B-cell lymphomas. However, in contrast to recent molecular data derived from salivary gland MALT-type lymphomas, no V_H -gene restriction was found. The tumorspecific V_H -gene analyses confirmed the memory B-cell phenotype of the tumor cells at the DNA level. Furthermore, it is likely that the tumor B-cells passed several rounds of maturation cycles in the germinal centres because of their mutation pattern in the hypervariable region of the antigen receptor. By comparing clonality of the tumors it became obvious that those lymphomas showing the t(11;18)(q21;q21) translocation were directed towards (mono-)clonality. Therefore this translocation appears to represent a major progression event in tumor establishment.

Because at least low-grade MALT-type B-cell lymphoma growth is depended on the local microenvironment, the tumorinfiltrating T-lymphocytes (TITL) were investigated in detail. In the tumor tissue $CD4^+$ TITLs were found predominantly which were activated ($CD69^+$) as well as immunocompetent ($CD28^+$) and express CD40-Ligand and Fas-Ligand, two molecules which play a keyrole in T/B-cell interactions in germinal centre reaction. In addition, $T_H2/3$ cytokines (IL10, IL13, $TGF\beta_1$) were detected in the tumor tissue. These cytokines were shown to stimulate the tumor growth *in vitro*.

Therefore it will be mandatory to engage CD40-Ligand and FAS-Ligand simultaneously for further detailed investigations of early steps of tumor development. An *in vitro* system will offer the possibility to investigate and analyse the behaviour of tumor B-cells *ex vivo* and compare t(11;18) positive and negative cases and thus lead to a biological based model of tumor-development and -progression of low-grade MALT-type lymphomas.

2 EINLEITUNG

Das menschliche Immunsystem stellt ein essentielles, körpereigenes Abwehrsystem dar, das den Menschen aktiv vor Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Parasiten und anderen Fremdanthigenen schützt. Bei diesem Abwehrmechanismus handelt es sich nicht um ein geschlossenes Organsystem, sondern um das Zusammenwirken von unterschiedlichen Organen und Zelltypen.

Die drei Haupteigenschaften des Immunsystems bestehen darin, daß erstens Antigene als fremd erkannt und bekämpft werden können, jedoch gegenüber allen körpereigenen Strukturen Toleranz besteht. Die zweite wesentliche Eigenschaft der Immunreaktion ist ihre Spezifität, d.h. daß nur gegen das Fremdanthigen eine spezifische Körperabwehr stattfindet. Die dritte Eigenschaft ist die Fähigkeit, ein immunologisches „Gedächtnis“ aufzubauen, das bei erneutem Kontakt mit dem jeweiligen Antigen zu einer schnelleren und stärkeren Immunreaktion führt.

Die am Immunsystem beteiligten Zellen stammen alle von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab, aus denen dann die lymphatische und die anderen hämatopoetischen Hauptlinien des Systems hervorgehen. Ausgehend von den lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich je nach Umgebung entweder B- oder T-Zellen. Im Gegensatz dazu bilden sich Monozyten/Makrophagen, antigen-präsentierende dendritische Zellen, Mastzellen und Granulozyten aus den myeloischen Vorläuferzellen.

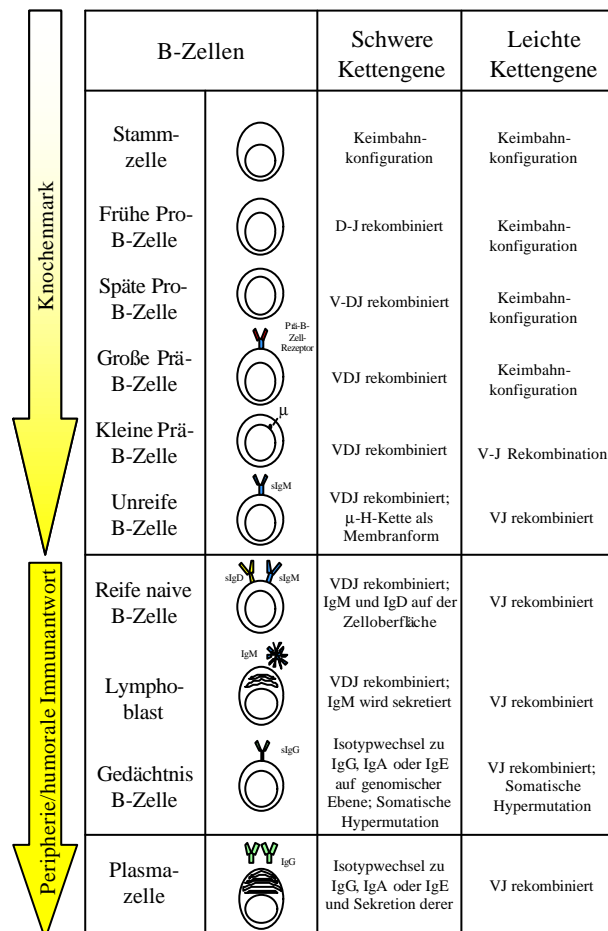
Die primär immunologisch wichtigen Zellen einer Immunreaktion sind dabei die B- und T-Zellen, die es dem Immunsystem ermöglichen, mit Hilfe zweier Abwehrmechanismen auf das Antigen zu reagieren. Dabei handelt es sich zum einen um die humorale Immunantwort der B-Zellen und zum anderen um die zelluläre Immunantwort der T-Zellen.

Die zellvermittelte T-Zell-Antwort richtet sich bei den cytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen direkt gegen infizierte Zellen und tötet diese ab, wohingegen $CD4^+$ T-Zellen zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen besitzen. Sie können aufgrund dieser Eigenschaft in inflammatorische T_H1 -Zellen und Helfer- T_H2 -Zellen aufgeteilt werden (Janeway, 1997). Inflammatorische T-Zellen aktivieren Makrophagen und tragen dazu bei, daß diese intrazelluläre Antigene effektiver zerstören können. Im Vergleich hierzu regen Helfer- T_H2 -Zellen B-Lymphozyten, die Effektorzellen der humoralen Immunantwort, zur Differenzierung und Sekretion von Antikörpern/Immunglobulinen an. Antikörper dienen zum einen dazu, extrazelluläre Pathogene zu neutralisieren und ihnen das Eindringen in die Wirtszelle zu verwehren oder zum anderen, sie zu opsonisieren.

2.1 B-Zell-Reifung und -Aktivierung bei der humoralen Immunantwort

2.1.1 Entwicklungsstufen der B-Zell-Reifung im Knochenmark

Die erste Differenzierungsphase einer B-Zelle von der pluripotenten Stammzelle bis hin zur unreifen B-Zelle findet im Knochenmark statt. Die Definition der einzelnen Stadien, die bei dieser Reifung durchlaufen werden, erfolgt nach dem Entwicklungsstand der schweren und leichten Immunglobulinketten auf genomischer Ebene. Die Einteilung erfolgt somit nach der fortschreitenden genomischen Rekombination, bei der die Gene beider Kettentypen erst in der richtigen Zusammensetzung entstehen (Abbildung 1). Nach diesem Schema entwickelt sich aus der Stammzelle die frühe Pro-B-Zelle, daraus die späte Pro-B-Zelle, gefolgt von der großen Prä-B-Zelle und der kleinen Prä-B-Zelle. Am Ende der B-Zell-Differenzierung im Knochenmark steht die unreife B-Zelle, die einen Antigenrezeptor vom Typ IgM auf ihrer Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 1)



(Janeway, 1997).

Abbildung 1: B-Zell-Entwicklung im Knochenmark und der Peripherie

2.1.1.1 Grundaufbau eines humanen Immunglobulinmoleküls

Jedes Immunglobulinmolekül besteht aus vier Polypeptidketten, die sich in je zwei identische schwere (heavy/H) und leichte (light/L) Ketten aufteilen (Abbildung 2) (Porter, 1991). Die H- und L-Ketten werden über kovalente Disulfidbrücken zusammengehalten und bilden die Y-Grundstruktur eines jeden Antikörpers aus. Sowohl die leichten, als auch die schweren Ketten bestehen aus einer variablen und einer konstanten Region, wobei die konstante Region den Kettentyp bestimmt. Von den L-Ketten gibt es nur zwei verschiedene Arten (λ - und κ -Kette), wohingegen es von den H-Ketten fünf Hauptarten gibt (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE), die gleichzeitig auch den Isotyp des Immunglobulinmoleküls definieren.

Wichtig für die Antigenerkennung sind dabei die variablen Regionen der schweren und der leichten Ketten, da diese gemeinsam die Antigenbindungsstelle ausbilden.

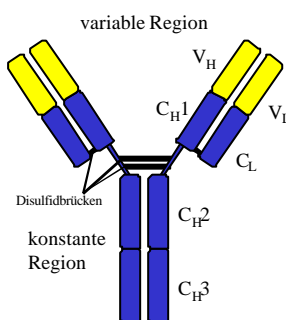


Abbildung 2: Antikörpermolekül vom Typ IgG.

Jedes Antikörpermolekül setzt sich aus zwei schweren (innen liegenden Ketten) und zwei leichten (außen liegende Ketten) Ketten zusammen. Dabei sind die schweren Ketten über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden und jede leichte Kette ist über je eine Disulfidbrücke mit einer schweren Kette verknüpft. Aufgrund von Sequenzvergleichen kann man beide Kettenarten in verschiedene Abschnitte unterteilen. Jeweils am N-Terminus (hellgrau) befinden sich die sogenannten variablen Regionen (V_H, V_L), die gemeinsam die Antigenbindungsstelle bilden. Die dunkelgrau gezeichneten Bereiche bezeichnet man als konstante Regionen (C_H1, C_H2, C_H3 / C_L).

2.1.1.2 Der Mechanismus des VDJ-Rearrangements der variablen Region der schweren Immunglobulinketten beim Menschen

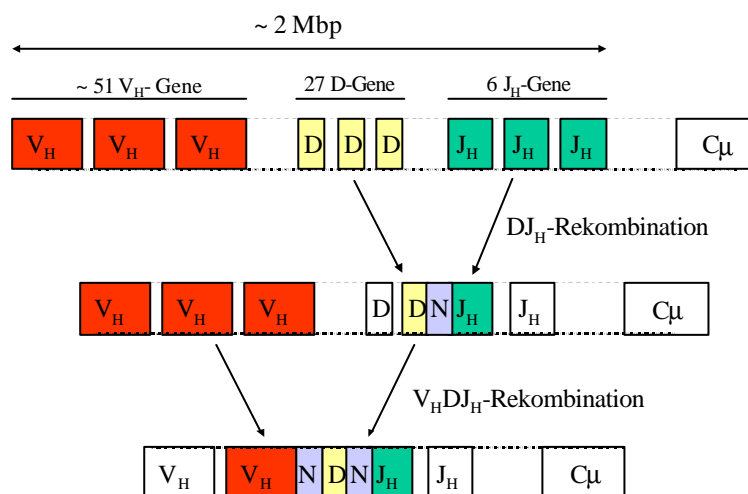
Sowohl die variable Region der schweren, als auch die der leichten Ketten eines Immunglobulinmoleküls wird durch Rekombination auf genomischer Ebene erzeugt. Das Grundprinzip besteht darin, daß unterschiedliche Gensegmente des Typs V_H, D und J_H (am Beispiel der variablen Region der schweren Kette), die gemeinsam auf Chromosom 14 lokalisiert sind, durch genomische Rekombination zu einer sogenannten variablen Region verbunden werden. Alle drei Segmenttypen liegen als Cluster, in der Reihenfolge V_H, D und J_H im Bereich 14q23. Dieser Abschnitt umfaßt ungefähr 2Mb. Der Mensch besitzt neben 51 funktionellen V_H-Gensegmenten, die sich in sieben verschiedene V_H-Familien (V_H1 - V_H7) aufgrund ihrer Homologien unterteilen lassen, 27 D- und 6 J_H-Segmente. Jedes Segment eines Typs kann nun mit jedem beliebigen Segment der beiden anderen Segmenttypen rekombiniert werden. Dies hat zur Folge, daß viele, in ihrer variablen Region

unterschiedliche, Immunglobulinmoleküle (10^{23}) generiert werden und somit die Voraussetzung geschaffen ist, daß unterschiedlichste Antigene von B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor erkannt werden.

Bei den schweren Ketten nennt man den Vorgang VDJ-Rearrangement, bei den leichten Ketten nur VJ-Rekombination, da keine D-Segmente vorhanden sind. Beiden Vorgängen liegt jedoch der selbe Rekombinationsmechanismus zugrunde.

Dabei wird im ersten Schritt mit Hilfe des Enzymes VDJ-Rekombinase, das einen Komplex aus Schneide- und Reparaturenzymen darstellt, ein D-Fragment an ein J_H -Fragment rekombiniert und es entsteht ein DJ_H -Fragment (Abbildung 3) (Tonegawa, 1983; Waldmann, 1987; Tonegawa, 1993). Die D- und J_H -Fragmente die zu Beginn zwischen den beiden rekombinierten Segmenten lagen, sind nun unwiederbringlich entfernt worden. Im darauffolgenden Schritt wird das DJ_H -Fragment mit einem V_H -Fragment verknüpft und die B-Zelle enthält nun eine fertige variable Region der schweren Kette. Bei beiden Rekombinationsvorgängen werden aufgrund des Rekombinationsmechanismus noch willkürlich sogenannte N-Nukleotide zwischen D/J_H und D/V_H durch die TdT (terminale Desoxynucleotidyltransferase) eingefügt, was die Diversität der Antigenbindungsstelle zusätzlich erhöht. Dieser Bereich NDN (Abbildung 3, Abbildung 4) stellt den sogenannten „Fingerabdruck“ einer jeden B-Zelle dar, und nur B-Zellen, die sich aus dieser einen Zelle entwickeln werden (klonale Expansion), tragen dieselbe, als CDR3 bezeichnete Sequenz. Dieser kurze Sequenzbereich wird in der Regel herangezogen, um Klonalitätsanalysen von B-Zellen durchzuführen.

Abbildung 3: Der Mechanismus des VDJ-Rearrangements der schweren Kette eines Immunglobulinmoleküls. Im



ersten Schritt, bezeichnet als DJ_H -Rearrangement wird ein D-Segment an ein J_H -Segment rekombiniert. Den zweiten Schritt bezeichnet man als V_HDJ_H -Rearrangement, da nun an das neuentstandene DJ_H -Fragment ein V_H -Segment rekombiniert wird. Bei beiden Rekombinationsvorgängen werden durch das Enzym TdT noch zusätzliche Nukleotide (N) eingefügt.

2.1.1.3 Aufbau der variablen Region der schweren Immunglobulinketten

Das bei der Rekombination entstandene V_HDJ_H -Exon unterteilt sich auf DNA-Sequenzebene in vier Framework-Regionen FRI/(1) – FRIV/(4) und drei CDR- (complementary determining region) Regionen CDRI/(1) – CDRIII/(3) (Abbildung 4) (Padlan, 1994). Dabei codieren die FR-Regionen für das Gerüst der variablen Region der schweren Kette und die CDR-Regionen für die Antigenbindungsstelle. Dies wird auch deutlich, wenn sich in der fortschreitenden B-Zell-Entwicklung somatische Mutationen und Hypermutationen in der variablen Region auftreten. Diese Mutationen und die damit verbundenen Aminosäureaustausche akkumulieren sich in den CDR-Regionen, was eine Veränderung in der Antigenbindungsspezifität des jeweiligen Immunglobulinmoleküls zur Folge hat. Die Gerüstregionen hingegen werden meist nur unwesentlich mutiert. Anhand von Mutationsanalysen der variablen Region der schweren Kette, kann man den Differenzierungsstand einer B-Zelle bestimmen. Liegt die variable Region, v.a. das V_H -Segment noch in Keimbahnkonfiguration vor, so hat noch keine Affinitätsreifung der B-Zelle im Keimzentrum aufgrund von Antigenkontakt stattgefunden. Findet man jedoch gehäuft Mutationen in den CDRs, so deutet dies auf Antigenkontakt der B-Zelle hin, wobei es sich um eine Keimzentrums-B-Zelle oder eine Post-Keimzentrums-B-Zelle handeln kann. Mit Hilfe von statistischen Auswerteverfahren kann man die beiden Zelltypen unterscheiden. Bei ersteren ist der somatische Mutationsprozeß noch im Gang (sog. „ongoing mutations“), während er bei letzteren schon abgeschaltet ist.



Abbildung 4: Aufbau der variablen Region einer schweren Immunglobulinkette auf genomischer Ebene nach erfolgreichem V_HDJ_H -Rearrangement. Der gesamte abgebildete Bereich wird als variable Region bezeichnet, die sich aus den Segmenten V_H , D, J_H und den neu hinzugefügten Nukleotiden (N) zusammensetzt. Aufgrund von Sequenzanalysen unterteilt man die variable Region auch in vier Gerüstregionen / FR (framework regions) und drei hypervariable Regionen / CDR (complementary determining regions). L: Leader-Region.

2.1.2 Die humorale Immunantwort

Die reifen naiven B-Zellen verlassen das Knochenmark, um über die Blutbahn und die Lymphgefäße durch den Körper und die sekundären lymphatischen Organe zu zirkulieren (siehe Abbildung 1). Die im Körper vorhandenen Fremdantigene werden ebenfalls durch das Blutgefäßsystem zu den lymphatischen Organen, wie Lymphknoten, Milz, MALT, GALT, Peyersche Plaques und Blinddarm transportiert. In den lymphatischen Organen treffen nun reife naive B-Zellen und naive T-Zellen, die aus dem Thymus kommen, auf das jeweilige Fremdantigen.

2.1.2.1 B- und T-Zell-Aktivierung nach Antigenkontakt

Den naiven $CD4^+$ T-Zellen werden auf der Oberfläche von APCs (Antigen präsentierenden Zellen) Peptide des Antigens im Komplex mit MHC Klasse II-Molekülen präsentiert. Erkennt nun eine naive $CD4^+$ T-Zelle über ihren T-Zell-Rezeptorkomplex das Fremdpeptid, so ist dies noch nicht ausreichend um die T-Zelle zu stimulieren. Als costimulierende Moleküle exprimiert die antigenpräsentierende Zelle B7-Moleküle (CD80 und CD86), die Liganden für CD28 sowie CD40, den Rezeptor für CD40-Ligand (Abbildung 5). Sowohl CD28 als auch CD40-Ligand werden auf der naiven T-Zelle präsentiert. Nur wenn die naive $CD4^+$ T-Zelle über den T-Zell-Rezeptorkomplex, CD28 und CD40-Ligand Signale erhält, wird die Zelle aktiviert. Durch die Aktivierung findet dann eine autokrine Stimulation über IL2 und dessen Rezeptor statt, was eine klonale Expansion dieser einen antigenspezifischen $CD4^+$ T-Zelle zur Folge hat. Die durch Zellteilung entstandenen Zellnachkommen sind in der Lage, sowohl zu T_H1 - als auch zu T_H2 -Zellen zu differenzieren. Die Faktoren und Mechanismen, die an der Ausbildung des jeweiligen Phänotyps beteiligt sind, sind noch nicht vollständig bekannt. Man nimmt an, daß neben den costimulierenden Signalen und dem Peptid:MHCII-Komplex, auch die von den infektiösen Agens ausgeschütteten Cytokine bei der Entscheidung, ob eine T_H1 - oder T_H2 -Zelle entstehen soll, eine wichtige Rolle spielen (Lindhout, 1997).

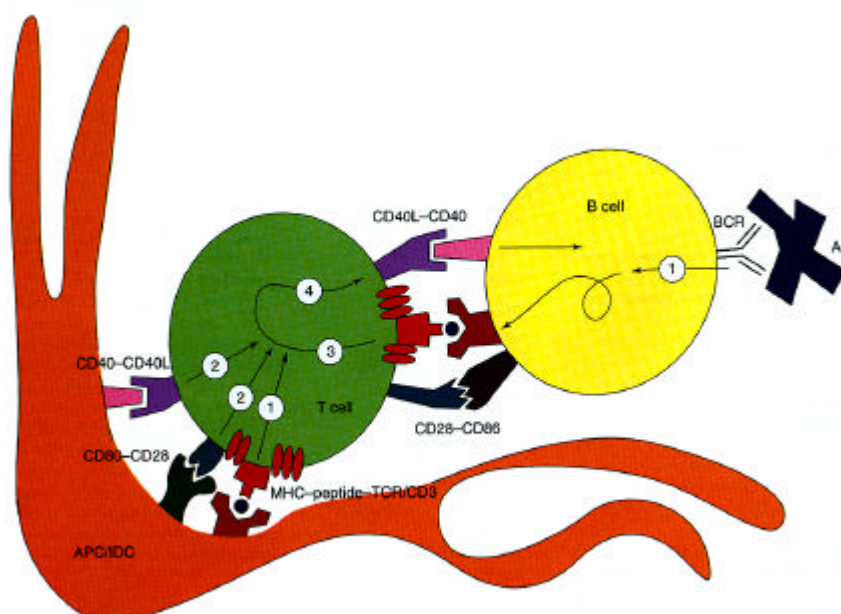
Parallel zum Priming der naiven T-Zellen, erkennen auch spezifische reife naive B-Zellen in den primären Lymphfollikeln - das sind hauptsächlich aus B-Zellen bestehende Bereiche des sekundären lymphatischen Organs - das Fremdantigen über Bindung an ihren Oberflächenantigenrezeptor. Die Zelle erhält damit das Signal, den Antigenrezeptor zu internalisieren und das Antigen zu prozessieren. Peptide des Fremdantigens werden daraufhin im Komplex mit MHCII-Molekülen auf der Zelloberfläche wieder präsentiert. Die antigenpräsentierende B-Zelle wandert nun in die T-Zell-Zone

des Organs ein und trifft dort auf die für dasselbe Antigen spezifische aktivierte T_H2 -Zelle (Abbildung 5). Die T-Zelle erkennt über ihren antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor im Komplex mit CD3 den Peptid:MHCII-Komplex der B-Zelle. Parallel dazu erfolgt eine Bindung über CD28 (T_H2 -Zelle) und B7 (B-Zelle), was zur Folge hat, daß B- und T-Zelle zusätzlich über CD40 (B-Zelle)/CD40-Ligand (T_H2 -Zelle) interagieren und die B-Zelle somit aktiviert wird. Als lösliche Aktivatoren werden die Cytokine IL4, IL5, IL6, IL10 und IL13 von der T_H2 -Zelle sezerniert.

Diese T/B-Zell-Interaktion führt zum einen dazu, daß die aktivierten B-Zellen proliferieren und ein Teil von ihnen direkt zu Plasmazellen differenziert, die antigenspezifische Antikörper vor allem des Typs IgM bilden. Und zum anderen wandern aktivierte T_H2 - und B-Zellen gemeinsam in primäre Lymphfollikel ein, um sekundäre Lymphfollikel mit Keimzentren auszubilden, in denen sowohl die Affinitätsreifung und der Isotypwechsel der B-Zellen, als auch die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen stattfindet.

Trifft die antigenpräsentierende B-Zelle nicht auf die antigenspezifische T_H2 -Zelle und wird nicht über B7 und CD40 stimuliert, so findet keine Aktivierung der B-Zelle statt, sondern der B-Lymphozyt verläßt das lymphatische Organ über die efferenten Lymphgefäße und kehrt in den Blutkreislauf zurück oder geht aufgrund Fas/(CD95)-vermittelter Apoptose zugrunde.

Dieser Kontakt zwischen antigenspezifischer B- und T_H2 - Zelle stellt den ersten von drei Kontrollpunkten dar, an denen überwacht wird, daß nur B-Zellen die für körperfremde Antigene spezifisch sind, aktiviert werden, klonal expandieren und zu Gedächtnis-B-Zellen oder zu



Plasmazellen differenzieren können (MacLennan, 1994; Lindhout, 1997).

Abbildung 5: Erster antigenspezifischer Kontrollpunkt (außerhalb des Keimzentrums). 1) Die antigenspezifischen B-Zellen werden durch Kreuzvernetzung von nativem Antigen mit dem Antigenrezeptor aktiviert. Die T-Zellen werden durch prozessiertes Antigen, welches ihnen im Komplex mit MHCII von den APCs präsentiert wird, aktiviert. 2) Es erfolgt eine Costimulation der T-Zellen über CD40/CD40-Ligand und CD80/CD28 Wechselwirkungen. 3) Für die Initiierung einer Keimzentrumsreaktion sind die Wechselwirkungen zwischen der antigenspezifischen B- und T-Zelle essentiell. 4) CD40/CD40-Ligand Wechselwirkungen stellen das zweite Aktivierungssignal für die B-Zellen dar. Zu dieser Aktivierung kommt es aber nur, wenn die T-Zelle das von der B-Zelle präsentierte Antigen erkennt und zusätzlich CD40-Ligand exprimiert. Dieser Vorgang und zusätzliche costimulierende Signale (CD28/CD86) leiten die Keimzentrumsreaktion ein, das heißt sowohl B- als auch T-Zellen wandern in das Keimzentrum ein. Ag: Antigen; APC: Antigen-präsentierende Zelle; BCR: B-Zell-Rezeptorkomplex; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex; TCR: T-Zell-Rezeptor. Abbildung entnommen aus Lindhout (1997).

2.1.2.2 Affinitätsreifung der B-Zellen im Keimzentrum

Die in den primären Lymphfollikel eingewanderten aktivierten B-Zellen beginnen sich schnell zu teilen und verändern stark ihre Morphologie. Man bezeichnet sie nun als Centroblasten, welche die dunkle Zone des Keimzentrums ausbilden (Abbildung 6). In diesem Stadium findet nach dem darwinistischen Prinzip auch die sogenannte Affinitätsreifung der B-Zellen statt (MacLennan, 1994; Wagner, 1996). Durch die enorme Teilungsrate und vor allem durch die intrinsische Eigenschaft, somatische Mutationen in den variablen Regionen der schweren und leichten Immunglobulinkette zu akkumulieren, entstehen aus dem T-Zell-aktivierten antigenspezifischen B-Zell-Klon Centroblasten, die somatische Hypermutationen in ihren CDRs (complementary determining regions) vor allem der schweren Kette aufweisen und aufgrund dessen einen B-Zell-Rezeptor mit veränderter Antigenbindungsstelle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese Zellen bezeichnet man nun als Centrozyten. Sie sind kleiner und bilden zusammen mit den Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) die helle Zone des Keimzentrums.

Das Prinzip der Affinitätsreifung besteht darin, daß die B-Zellen für den am besten passenden Antigenrezeptor selektioniert werden. Alle anderen Centrozyten werden durch Apoptose eliminiert. Diese Selektion findet mit Hilfe der in der hellen Zone des Keimzentrums vorhandenen FDCs statt (Abbildung 7). Die FDCs bilden Immunkomplexe aus zirkulierendem Antigen, Komplement (C3b) und löslichen Antikörpern, die sie über ihren Komplement-Rezeptor CR2 an der Zelloberfläche der B-Zelle präsentieren. Die durch somatische Hypermutationen in ihrem Antigenrezeptor veränderten B-Zellen, kompetieren untereinander um das vorhandene Antigen an den FDCs. Zeigt ein B-Zell-Rezeptor eine geringere oder gleiche Affinität gegenüber dem Antigen, so geht der Centrocyt aufgrund von Fas/Fas-Ligand Wechselwirkungen in Apoptose über. Liegt bei dem Rezeptor eine höhere Affinität gegenüber dem Antigen vor als die des im Komplex vorhandenen Antikörpers, so

entgeht die Keimzentrumszelle dem programmierten Zelltod. An dieser Kontrollstelle werden autoreaktive B-Zellen, die den ersten Kontrollpunkt unbeschadet durchlaufen haben, eliminiert. Der molekulare Mechanismus, wie Apoptose und somit die Endonukleaseaktivität im Zellkern geblockt wird, ist noch unklar. Man nimmt an, daß durch das Andocken des hochaffinen Antigenrezeptors an das Antigen im Immunkomplex, die Apoptoseinduktion verzögert wird und auf der B-Zelle LFA-1/CD11a (lymphocyte-function-associated molecule) und VLA-4/CD49 (very late antigen 4) hochreguliert werden (Abbildung 7). LFA1 interagiert mit ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) und VLA-4 mit VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) auf der FDC-Oberfläche, dies intensiviert den Kontakt beider Zellen und hat eine erneute Verzögerung der Apoptoseinduktion zur Folge.

Diese Affinitätsselektion der Centrozyten aufgrund ihres mutierten Immunglobulinrezeptors stellt den zweiten Kontrollpunkt für B-Zellen auf ihrem Weg zur reifen Plasmazelle oder Gedächtnis-B-Zelle dar. Nur B-Zellen mit für das Fremdanigen hochaffinen Rezeptoren sind in der Lage ihre terminalen Differenzierungsschritte fortzusetzen.

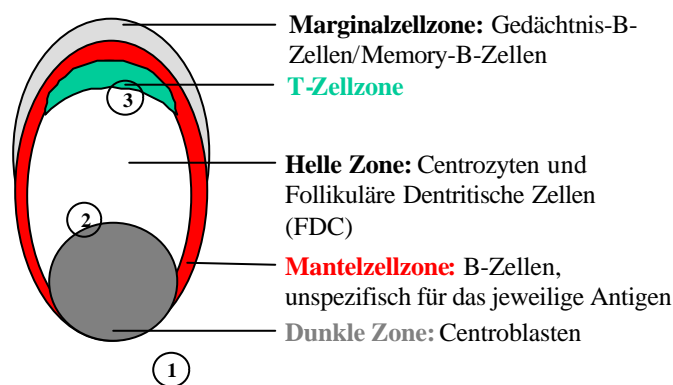


Abbildung 6: Aufbau eines Keimzentrums. Die im Text und in den Abbildungen beschriebenen Kontrollpunkte sind außerhalb oder in unterschiedlichen Zonen des Keimzentrums lokalisiert. Kontrollpunkt 1 liegt noch außerhalb des Keimzentrums. Kontrollpunkt 2 hingegen befindet sich am Übergang von der dunklen zur hellen Zone und Kontrollpunkt 3 in der oberen hellen Zone am Rande der T-Zell-Zone.

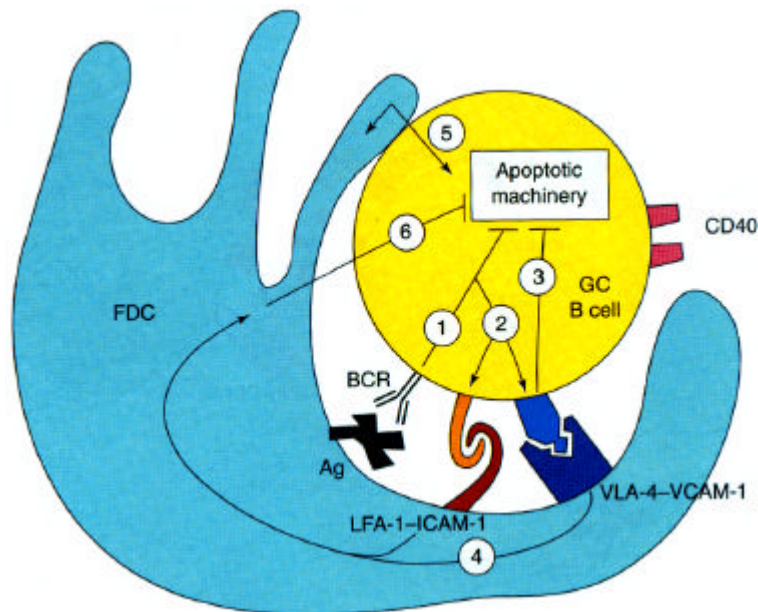
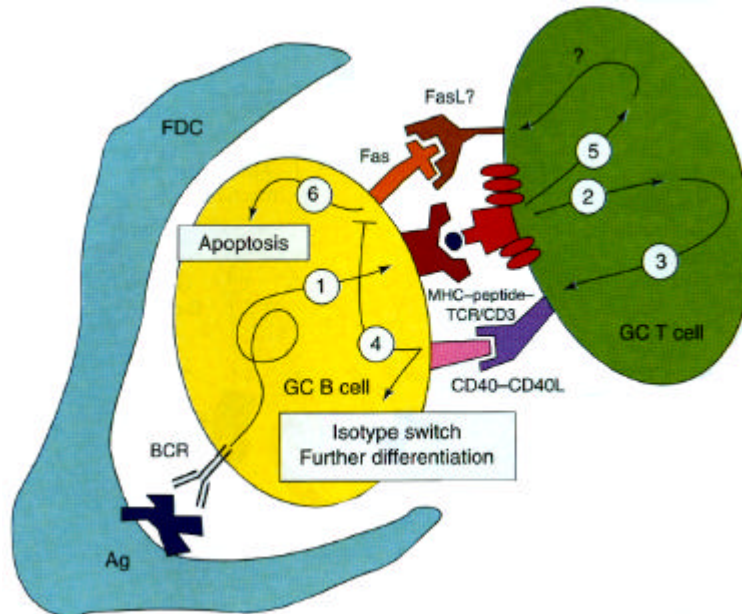


Abbildung 7: Zweiter antigenspezifischer Kontrollpunkt (im Keimzentrum). 1) Die hochaffine Keimzentrums-B-Zellen werden aufgrund eines Kompletionsprozesses selektiert. 2) Die Vernetzung des Antigenrezeptors mit Antigen unterbindet für kurze Zeit den apoptotischen Prozeß und aktiviert kurzfristig die Expression von LFA-1 und VLA-4. 3) Es kommt zu einer erneuten Verzögerung der Apoptose, da die B-Zellen und FDCs über LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1 interagieren. 4) Möglicherweise werden die FDCs aktiviert. 5) Der enge Kontakt zwischen Keimzentrums-B-Zellen und FDCs führt zur Ausbildung von „gap junctions“. 6) Die Apoptose der selektierten B-Zellen wird verhindert. FDC: Follikuläre dendritische Zellen; ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule; LFA-1: leukocyte function-associated molecule 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; VLA-4: very late antigen 4. Abbildung entnommen aus Lindhout (1997).

Gleichzeitig wandern die B-Zellen in den apikalen Bereich der hellen Zone des Keimzentrums, wo sich die antigenspezifischen T_H2 -Zellen befinden. Hier erfolgt nun die dritte und letzte Spezifitätskontrolle ihres B-Zell-Rezeptors. Denn nur B-Zellen, die das richtige Antigen präsentieren und wieder auf eine antigenspezifische T_H2 -Zelle treffen, erhalten Signale zur klonalen Expansion, zum Isotypwechsel und zur Differenzierung in Gedächtnis- oder Plasma-B-Zellen. An dieser Stelle besteht also nochmals die Möglichkeit autoreaktive B-Zellen aus dem System zu entfernen.

Trifft nun eine B-Zelle, die das Fremdanigen im Komplex mit MHCII präsentiert, auf die passende antigenspezifische T_H2 -Zelle, so erkennt diese das Antigenpeptid über ihren T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR-Komplex) (Abbildung 8). Dieser Kontakt führt zu einer schnellen CD40-Ligand-Expression auf der T-Zelle und zur Interaktion mit den CD40-Molekülen auf der B-Zelle. Die Interaktion von CD40 mit CD40-Ligand hat zur Folge, daß Fas/(CD95) auf der Zelloberfläche des Centrozyten herunterreguliert wird, die Zelle apoptoseresistent wird und der nachfolgende Isotypwechsel sowie die Enddifferenzierung zur Plasma- oder Gedächtnis-B-Zelle induziert wird (Lindhout, 1997).

Die andere Möglichkeit wäre, daß die T_H2 -Zelle das Antigen nicht über ihren TCR-Komplex erkennen, wenn es sich um ein Autoantigen handelt. Das bedeutet, daß die T-Zelle kein Signal erhält CD40-Ligand hochzuregulieren und somit auch keine CD40/CD40-Ligand Interaktion mit der B-Zelle zustande kommt. Aufgrund dessen wird auf der B-Zelle auch Fas/CD95 nicht herunterreguliert und die Zelle erhält, über den Kontakt mit Fas-Ligand auf der T_H2 -Zelle, das Signal in Apoptose zu



gehen.

Abbildung 8: Dritter antigenspezifischer Kontrollpunkt (im Keimzentrum). 1) Die selektierten Keimzentrums-B-Zellen nehmen das Antigen auf und präsentieren es den antigenspezifischen Keimzentrums-T-Zellen. 2) Nur wenn die T-Zellen das Antigen im Komplex mit MHCII erkennen, kommt es zu einer schnellen Expression von CD40-Ligand 3). 4) Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen B- und T-Zellen über CD40/CD40-Ligand kommt es bei den Keimzentrums-B-Zellen zu einer Herunterregulierung von Fas. Zusätzlich erfolgt die Initiation des Isotypwechsels und die Ausdifferenzierung der Keimzentrums-B-Zelle zur Plasma- oder Gedächtnis-B-Zelle. Präsentiert die Keimzentrums-B-Zelle jedoch kein Antigen im Komplex mit MHCII und die T-Zelle kann somit nicht mit ihrem TCR mit der B-Zelle in Kontakt treten, dann erfolgt auch keine CD40-Ligand Expression auf der T-Zelle. 5) Der Regulationsmechanismus der Fas-Ligand-Expression ist noch unklar, aber vermutlich spielt dabei die TCR-Stimulation eine Rolle. 6) Antigenunspezifische B-Zellen werden über Fas/Fas-Ligand Wechselwirkungen getötet. Auf diesem Wege werden auch autoreaktive und Bystander-B-Zellen eliminiert. TCR: T-Zell-Rezeptorkomplex. Abbildung entnommen aus Lindhout (1997).

2.2 Maligne Non-Hodgkin-Lymphome und deren Einteilung nach der R.E.A.L.-Klassifikation (Revised European American Lymphoma Classification)

Maligne Lymphome stellen primäre Neoplasien der Zellen des lymphatischen Gewebes dar und werden in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Dabei handelt es sich bei beiden um sehr heterogene Gruppen, was eine weitere Unterteilung erforderte. Für die Hodgkin-Lymphome wurde 1966 die bis heute noch weitgehend gültige Rye-Klassifikation erarbeitet (Lukes, 1966), wohingegen für die NHLs unterschiedliche Klassifikationen entstanden. Im Jahre 1994 wurde die sogenannte R.E.A.L.-Klassifikation entwickelt, die eine Synthese und Weiterentwicklung der bestehenden Kiel-Klassifikation (Lennert, 1992) und der Working-Formulation (1982; Harris, 1994) erbrachte.

Bei der R.E.A.L.-Klassifikation werden die malignen Lymphome anhand ihrer biologischen Eigenschaften im Vergleich zu dem putativen normalen Gegenstück eingeteilt, das heißt man versucht die entarteten Zellen, soweit es möglich ist, nach ihrem vorliegenden Differenzierungszustand zu klassifizieren. Ein Beispiel hierfür ist das Marginalzonenlymphom der B-Zell-Reihe, bei dem es sich um entartete B-Zellen handelt, die von ihrer Differenzierungsstufe phänotypisch, immunologisch und molekular den Marginalzonen-B-Zellen entsprechen.

2.2.1 Das extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphom des MALT-Typs

Obwohl extranodale Lymphome etwa 40% der lymphoiden Neoplasien ausmachen, wurden sie in der jüngeren Vergangenheit stark vernachlässigt. Die meisten dieser Lymphome entwickeln sich aus B-Zellen und treten hauptsächlich im Magen auf, einem Organ das normalerweise kein lymphatisches Gewebe aufweist. Trotz allem entsteht dort aufgrund des B-Zell-Lymphoms ein mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT) (Isaacson, 1983). Dieses aufgrund der Erkrankung ausgebildete MALT bezeichnet man als sogenanntes sekundäres MALT. Bis heute ist die Krankheitsursache noch weitgehend unklar. Man konnte bis vor kurzem weder spezifische chromosomale Aberrationen, noch durch Rearrangement aktivierte Onkogene oder Epstein-Barr Virus-Infektionen nachweisen, von jenen Mechanismen man annimmt, daß sie den ersten Entwicklungsschritt hin zum nodalen Lymphom darstellen. Neueste Ergebnisse zeigten jedoch, daß eine reziproke Translokation $t(11;18)(q21;q21)$ in einem Großteil der niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen vorliegt (Ott,

1997) und diese genetische Veränderung anscheinend ursächlich an der Lymphomentstehung beteiligt ist.

Das sekundäre MALT wird in Folge einer chronischen Entzündung ausgebildet, was im Falle des Magens meist durch eine Besiedelung mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) und einer damit verbundenen lymphfollikulären Gastritis geschieht. Aber nicht nur die chronische Entzündung und die damit verbundene Einwanderung von B-Zellen in die Magenschleimhaut spielt bei der Ausbildung des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes eine Rolle, sondern vielmehr scheint der Prozeß auch abhängig von lokaler Antigenstimulation und den damit verbundenen Immunreaktionen zu sein. Hinweise dazu erhielt man durch Studien an gastralen MALT-Typ Lymphomen die zeigten, daß niedrig-maligne Tumoren eradiziert werden konnten, indem man *H. pylori* durch Antibiotikabehandlung eliminierte (Wotherspoon, 1993; Bayerdorffer, 1995; Fischbach, 1997).

Neben einer *H. pylori* abhängigen Gastritis können aber auch noch andere chronisch entzündliche Erkrankungen mit einem MALT-Typ Lymphom in anderen Organen assoziiert sein. Dabei handelt es sich dann meist um Autoimmunerkrankungen, wie der Hashimoto Thyroiditis oder die Sjögren Erkrankung. Die im Antigenrezeptor von MALT-Typ Lymphomen verwendeten V_H-Gene entsprachen oft jenen, die auch in Autoantikörpern nachzuweisen waren. Sie enthielten somatische Hypermutationen, wie sie bei der Affinitätsreifung der B-Zellen im Keimzentrum während einer Immunantwort zu erkennen sind (siehe 2.1.2.2) (Qin, 1995). Diese Theorie wird auch dadurch untermauert, daß man sogenannte „ongoing mutations“ innerhalb eines niedrig-malignen Tumorklons nachweisen konnte (Qin, 1997), was ebenfalls darauf hindeutet, daß sich der Klon während der Lymphomentstehung aus einem antigengetriebenen Affinitätsreifungsprozeß entwickelt haben muß. (Du, 1996). Entsprechend dieser *in vivo* Ergebnisse reagieren die malignen Lymphomzellen *in vitro* auf Antigenstimulation und ihr Antigenrezeptor erkennt in einigen Fällen spezifisch eine Reihe von unterschiedlichen (Auto-)Antigenen. Dabei handelt es sich aber nur um Antigene derjenigen Gewebe, aus denen sich auch extranodale Lymphome entwickeln (z.B. Schilddrüse, Speicheldrüse, Lungen- und Magenepithel) (Hussell, 1993; Greiner, 1994). All diese Beobachtungen deuten daraufhin, daß die autoreaktiven Lymphom-B-Zellen eine Strategie entwickelt haben müssen, während der Affinitätsreifung im Keimzentrum nicht eliminiert zu werden, wie es normalerweise mit autoreaktiven B-Zellen geschieht (siehe 2.1.2.1; 2.1.2.2).

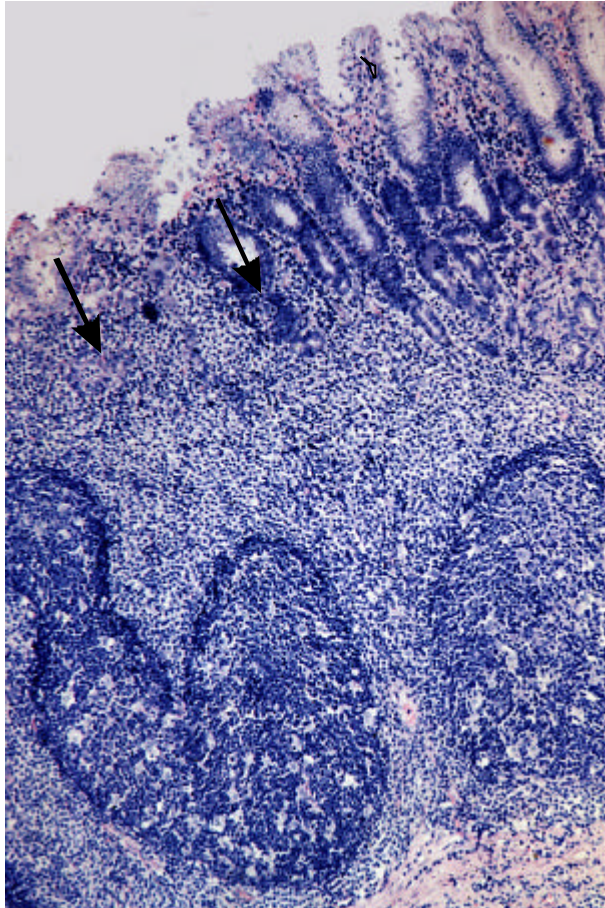
Bei Marginalzonen-B-Zellen handelt es sich um direkte Nachkommen der Keimzentrums-B-Zellen (Centrozyten; 2.1.2.2; Abbildung 6), die nicht durch den Körper zirkulieren und sogenannte Gedächtnis-B-Zellen/Memory-B-Zellen (Abbildung 6) (van den Oord, 1986; Liu, 1988; van

Krieken, 1989; MacLennan, 1992) darstellen. Im Normalfall entsteht ein kontrollierter Pool an nicht autoreaktiven Gedächtnis-B-Zellen, aufgrund einer T-Zell- und antigenabhängigen Expansion der B-Zellen (Schroder, 1996) und deren gerichtete Deletion über Fas/Fas-Ligand Interaktionen (Rathmell, 1995). Diese Affinitätsreifung zur Gedächtnis-B-Zelle, die in der Lage ist, hochaffine und hochspezifische Antikörper auszubilden, wird von unterschiedlichen Gruppen von T-Helferzellen (T_H) über Oberflächenmoleküle und lösliche Cytokine kontrolliert. Folglich könnten T-Zellen nicht nur bei der normalen B-Zell-Affinitätsreifung eine wichtige Kontrollfunktion übernehmen, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von B-Zell-Lymphomen des MALT-Typs spielen.

2.2.1.1 Das niedrig-maligne MALT-Typ Lymphom (Greiner, 1996)

Das niedrig-maligne Marginalzonen-B-Zell-Lymphom des MALT-Typs zeigt ein Wachstumsverhalten, wie das des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes der Peyerschen Plaques, des Appendix und der Tonsillen. Die Tumorzellen bilden einen breiten, der Marginalzone entsprechenden Saum um die morphologisch zunächst normal erscheinenden reaktiven Lymphfollikel mit Keimzentren. Cytologisch sind die Tumorzellen größer als die normalen Marginalzonen-B-Zellen. Sie besitzen unregelmäßig gestaltete, oft längliche und eingezogene Zellkerne, mit hellem Kernchromatin und relativ breitem, hellem und wenig basophilen Cytoplasma. Sie sind den Centrozyten des Keimzentrums von der Morphologie her sehr ähnlich, besitzen aber meist ein breiteres Cytoplasma und sind oftmals mit größeren immunoblastisch oder plasmoblastisch differenzierten Zellformen assoziiert. Aufgrund der Infiltration der Magenschleimhaut durch Lymphom-B-Zellen, im Falle eines Magen-Lymphoms, entstehen sogenannten lymphoepitheliale Läsionen, die für die Diagnose der Erkrankung in diesem Stadium von großer Bedeutung sind. Da sich das niedrig-maligne MALT-Typ Lymphom nur sehr lokal begrenzt ausbreitet, sind diese Gewebeerstörungen ein sicherer Hinweis für malignes Wachstum des Tumors.

Abbildung 9: Histologischer Schnitt aus einem niedrig-malignen gastralen MALT-Typ Lymphom. Deutlich zu erkennen sind die Lymphfollikel mit den Keimzentren, die von einer breiten neoplastischen Marginalzone umgeben sind. Die Pfeile weisen auf sogenannte lymphoepitheliale Läsionen hin, die aufgrund der Infiltration der Magenschleimhaut mit Lymphom-B-Zellen entstehen. Es handelt sich hierbei um eine Giemsa-Färbung. Vergrößerung: x250.



2.2.1.2 Das sekundär hoch-maligne MALT-Typ Lymphom (Greiner, 1996)

Als sekundär hoch-malignes MALT-Typ Lymphom bezeichnet man die Kombination aus einem niedrig-malignem Lymphom und einer hoch-malignen Komponente. Dabei kann es sich um fokale Blastenvermehrung in einem überwiegend niedrig-malignen MALT-Typ Lymphom handeln (Typ B nach (de Jong, 1997)) oder aber um einen Blastenrasen mit einem geringen Anteil des niedrig-malignen MALT-Typ Lymphoms (Typ C nach (de Jong, 1997)).

2.2.1.3 Das primär hoch-maligne extranodale B-Zell-Lymphom (Greiner, 1996)

Bisher ist es noch nicht gelungen, sich auf eine genaue Definition für primär hoch-maligne Lymphome des MALT-Typs zu einigen. Anhand cytologischer Merkmale ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob sich die Lymphome aus Marginalzonen-B-Zellen oder aus folliculären Keimzentrums-B-Zellen entwickelt haben. Jedoch entspricht ein Teil der Zelleigenschaften denen der niedrig-malignen Lymphome und deutet daraufhin, daß die Tumorzellen von Keimzentrums-B-Zellen abstammen. Bei diesen gemeinsamen Merkmalen handelt es sich vor allem um die folliculäre Kolonisation durch die Tumorzellen und das Fehlen von rearrangiertem *bcl-2*, wohingegen in vielen folliculären Lymphomen eine *bcl-2*-Expression nachgewiesen werden konnte.

Die neoplastischen Zellen sind groß und haben Ähnlichkeit mit Centroblasten, Immunoblasten und Plasmoblasten. Ihre Differenzierung hin zur Plasmazelle entspricht der des niedrig-malignen MALT-Typ Lymphoms, jedoch findet man im Gegensatz dazu in den hoch-malignen Tumoren weit weniger reaktive Follikel. Die meisten hoch-malignen MALT-Typ Lymphome sind lange Zeit auf den Magen oder die regionalen Lymphknoten begrenzt. Zur Metastasierung und Befall des Knochenmarks kommt es erst im späten Verlauf der Krankheit.

2.3 Aufgabenstellung

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der Entstehung und Progression von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen aufzuklären. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen helfen, neue Möglichkeiten in der Behandlung betroffener Patienten zu erarbeiten, aber auch Methoden zur Erkennung und Prävention der Krankheit zu entwickeln. Aufgrund dessen sollte das Augenmerk bei den Untersuchungen sowohl auf die Tumor-B-Zellen als auch auf die tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TITL) gerichtet werden, vor allem hinsichtlich der lokalen Immunreaktionen, die vor Ort bei der Tumorentstehung ablaufen.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte die Klonalität und der Reifungszustand der Tumor-B-Zellen von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Es sollte geklärt werden, ob sich das anhand morphologischer und immunologischer Merkmale bestimmte Stadium einer Gedächtnis-B-Zelle/Memory-B-Zelle, auch auf DNA-Ebene manifestiert. Dies würde bedeuten, daß die Tumor-B-Zellen während der Lymphomentstehung eine antigenabhängige Affinitätsreifung innerhalb eines Keimzentrum durchlaufen haben und dies auf genomischer Ebene in der variablen Region (V_H) der schweren Immunglobulinkette zu erkennen ist. Neben der Bestimmung des Reifungszustandes sollte man auch neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung der B-Zell-Population im Tumor erhalten. Für diese Fragestellungen sollte die V_H -Region des Antigenrezeptors der untersuchten Tumoren amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollten die tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TITL) ebenfalls von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen näher untersucht und charakterisiert werden. Interessant war hier vor allem die Frage, um welche Art von T-Zellen es sich dabei handelt, in welchem Stadium (ruhend oder aktiviert) sie sich befinden und welche Rolle sie bei der Tumorprogression spielen. Nachdem man per FACS-Analysen die Art und den Aktivierungszustand der T-Zellen bestimmt hat, sollte geklärt werden, ob die vorhandenen T-Zellen prinzipiell über die entsprechenden Oberflächenmoleküle verfügen, um Einfluß auf die Lymphomentwicklung, durch Interaktion mit den Tumor-B-Zellen, nehmen zu können. Hierfür sollten auf mRNA- und Proteinebene die Expression von CD40-Ligand und Fas-Ligand *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Zusätzlich sollte für spätere *in vitro* Studien eine Zelllinie konstruiert werden, mit deren Hilfe Tumor-B-Zellen über CD40, Fas und einen dritten variierbaren Oberflächenrezeptor parallel stimuliert werden können. Somit wäre man in der Lage, unter Zellkulturbedingungen T/B-Zell-Interaktionen des Keimzentrums zu simulieren und die Reaktion der Tumor-B-Zellen zu erforschen.

Als Ausgangszelllinie stand der Arbeitsgruppe Ltk⁻, eine murine Fibroblastenzelllinie stabil transformiert mit humanem CD40-Ligand und CD32/Fc γ -Rezeptor II zur Verfügung (Banchereau, 1991; Galibert, 1996). Diese Zelllinie sollte zusätzlich mit dem humanen Fas-Liganden stabil transfiziert werden und das Molekül auf der Zelloberfläche exprimieren. Parallel zu den Untersuchungen zur CD40-Ligand- und Fas-Ligand-Expression sollte auch das *in vivo* Spektrum an im Tumor exprimierten Cytokinen bestimmt werden. Hieraus sollte man Rückschlüsse auf den vorliegenden T-Zell-Typ und die damit verbundene Immunantwort ziehen können.

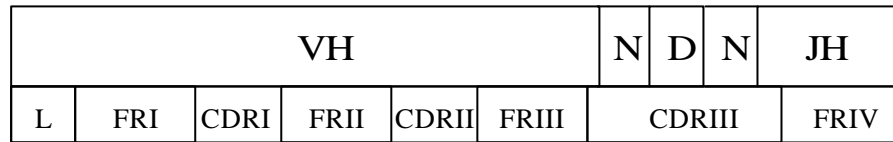
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Analyse der variablen Region der Schwerketten-Gene (V_H -Gene) des Antigenrezeptors von niedrig-malignen MALT-B-Zell-Lymphomen

Bei den zu untersuchenden Tumorzellen handelte es sich um B-Lymphozyten, die einen Antigenrezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Die Beschaffenheit dieses Rezeptors, vor allem aber die der Antigenbindungsstelle, kann Aufschluß über die Klonalität der untersuchten B-Zellen, deren Entwicklungsstadium und deren Kontakt mit Antigen geben. Da hauptsächlich die variable Region der schweren Immunglobulinketten die Antigenbindungsspezifität des Rezeptors ausmacht, wurden in diesem Teil der Arbeit die Sequenzinformationen der V_H -Gene der Tumorzellen herangezogen, um die oben genannten Eigenschaften der Klonalität, des Reifungsstands und des Antigenkontakts zu untersuchen.

3.1.1 Identifizierung des Tumor-B-Zell-Klons

Aufgrund der von Qin veröffentlichten Daten (1995) ging man davon aus, daß sich bei niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen der Tumor aus einem einzigen B-Zell-Klon entwickelt, das heißt eine entartete B-Zelle expandiert zu einer monoklonalen Tumorphopulation. Deshalb sollte zu Beginn der Untersuchungen mit Hilfe einer spezifischen RT-PCR der Tumorklon identifiziert werden. Hierzu wurde aus Gefriermaterial von 14 niedrig-malignen MALT-Typ Tumoren die Gesamt-RNA isoliert und mit Oligo-dT- und Random-Hexamer-Primer mittels einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit für die CDR3-Region spezifischen Oligonukleotiden (V_H -cons-FOR x J_H -cons-REV, (McCarthy, 1990) (siehe Abbildung 10) wurde eine RT-PCR für diesen cDNA-Abschnitt durchgeführt, der für jeden B-Zell-Klon charakteristisch ist und seinen „Fingerabdruck“ darstellt (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4). Die PCR wurde nach dem unter 5.2.1.15 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Aufgetragen auf ein 3%iges Agarosegel sollte das amplifizierte cDNA-Stück entweder bei einer monoklonalen B-Zell-Population eine distinkte Bande mit einer Größe von 100 bis 150 bp, oder bei oligo- oder polyklonalen Populationen einen sogenannten „Schmier“ ergeben (siehe Abbildung 11). Das Erscheinungsbild von oligoklonalen Populationen im Gel entsteht aufgrund der verschiedenen amplifizierten CDR3-Regionen, die sich nicht nur in ihren Sequenzen, sondern auch in ihren Längen unterscheiden.



VHcons-FOR →

← JHcons-REV

Abbildung 10: Lage der verwendeten Oligonukleotide bei der Amplifikation der tumorspezifischen CDR3-Region. Die beiden Konsensus-Primer wurden so gewählt, daß sie nur die CDR3-Region (CDRIII) amplifizierten. V_H -cons-FOR hybridisiert in einem hochkonservativen Bereich aller bekannten V_H -Gene am 3'-Ende der Framework-Region 3 (FRIII). J_H -cons-REV bindet am 5'-Ende der Framework-Region 4 (FRIV) und somit in einem konservativen Abschnitt der J_H -Gene.

Zehn von fünfzehn untersuchten Fällen (Fall #1, #3, #4, #13, #16, #17, #18, #19, #22, #24) zeigten bei dieser PCR eine Bande, zwei Fälle (#11, #14) wiesen zwei distinkte Banden auf und bei drei Fällen (#20, #21, #23) konnte im Gel keine klonale Bande nachgewiesen werden.

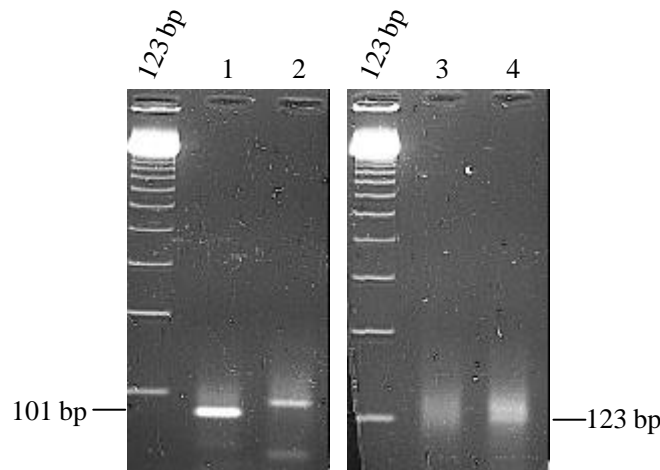


Abbildung 11: PCR-Produkte von amplifizierten CDR3-Regionen bei mono- und polyklonalen Tumoren mit dem Primerpaar V_H -cons-FOR x J_H -cons-REV. Auf beiden 3%igen Agarosegelen wurde eine 123 bp-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Bei den Spuren 1 und 2 handelt es sich um die beiden monoklonalen Fälle #18 und #19, bei den Spuren 3 und 4 um die beiden oligoklonalen Fälle #20 und #21. Die monoklonalen Fälle zeigten eine klare Bande bei 101 bp und 112 bp, wohingegen bei den oligoklonalen Fällen nur Schmier zwischen ~110 bp bis ~180 bp zu erkennen war. Grund dafür war die Amplifikation unterschiedlichster CDR3-Regionen, die sich in ihren Längen und vor allem ihren Sequenzen stark unterschieden.

Um sicher zu gehen, daß es sich bei den mono- und biklonalen Banden tatsächlich jeweils um eine Population mit einer spezifischen CDR3-Sequenz handelte, wurden die Banden aus einem LMP-Gel mit Hilfe von Gelase aufgereinigt und blutend in den Vektor pCR-Skript kloniert, in *E. coli* amplifiziert und über eine Blau-Weiß-Selektion die Plasmide, die CDR3-Sequenzen enthielten, identifiziert und reisoliert. Alle Plasmide wurden daraufhin von beiden Seiten mit M13-Uni und T3 sequenziert und ihre Sequenzen untereinander verglichen. Bei neun von zehn Fällen, die nach der CDR3-PCR eine Bande im Gel zeigten (ausgenommen Fall #4), konnte auch eine dominierende

CDR3-Sequenz identifiziert werden (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu stand Fall #4, der ebenfalls in der PCR eine distinkte Bande zeigte, bei welchem jedoch anhand der Sequenzergebnisse deutlich wurde, daß es sich hierbei um einen polyklonalen Fall handeln mußte, da keine CDR3-Sequenz doppelt oder mehrfach vorhanden war. Dieses Ergebnis zeigte, daß diagnostische Klonalitätsbestimmungen, basierend auf der Basenpaarlänge der jeweiligen CDR3-Region, immer über ein hochauflösendes Polyacrylamidgel analysiert werden sollten. Außerachtlassen sollte man auch nicht die Tatsache, daß der eindeutige Klonalitätsnachweis nur aufgrund von Sequenzanalysen der CDR3-Region möglich ist.

Neben den monoklonalen Fällen wurden Fall #11 und #14 als biklonale Fälle identifiziert. Bei beiden konnten mit Hilfe der Sequenzanalysen zwei voneinander unabhängige CDR3-Sequenzen ermittelt werden (Tabelle 1).

CDR3-REGION

```

495
GTATTACTGTGCGA...GAC.....AAAGTGGTGGCGGCACGGTGATGT.TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
483
GTATTACTGTGCGA...GAC.....AAAGTGGTGGCGGCACGGTGATGT.TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
485
GTATTACTGTGCGA...GAC.....AAAGTGGTGGCGGCACGGTGATGT.TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
486
GTATTACTGTGCGA...GAC.....AAAGTGGTGGCGGCACGGTGATGT.TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
487
GTATTACTGTGCGA...GAC.....AAAGTGGTGGCGGCACGGTGATGT.TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
482
GTATTACTGTGCGA...GAC.....AAAGTGGTGGCGGCACGGTGATGT.TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
481
AGAGGAGACGGTGACCAGGGTT.....CCCTGGCCCCAGGGGTGCAACCAGGACGCGTAGTTAGTCGGATCTCTCGCACAGT
478
GTATTACTGTGCGA...GAGCCAGT.TACTTTGTGCTTTTTGGAGTGCGCTACGGTATGGACGTCTGGAGCCAGGGGACCAC
479
GTATTACTGTGCGA...GAGAGAGATATTGTAGTAGTGTAGCTGCTATGCCGGGT.TCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCT
480
GTATTACTGTGCGA...GAG.....ATCCGACTAACTACGCGTCCTGGT.TCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCT
477
GTATTACTGTGCGA...GAA.....GT..GAATTAC.ATGGGCGATACT.TCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCT
494
GTATTACTGTGCGA...GAT.....TCGCGAGAGGAAGTATT.....C.CTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCT
491
GTATTACTGTGCGA...GAG.....GT..GA.TTAC.NTC.....TACT.TTGCCTTCTGGGGCCAGGGAACCCT
493
GTATTACTGTGCGA...GAGA.....TCGTGATGCCGGCAGCTC.....GC.TTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCT

```

Abbildung 12: CDR3-Sequenzen des monoklonalen Falls #19. Die ersten sechs Sequenzen stellen die CDR3-Region des Tumorklons dar. Die restlichen CDR3-Sequenzen waren durchweg unterschiedlich und stammten von anderen unabhängigen B-Zell-Populationen, die als Bystander-B-Zellen bezeichnet wurden und auf dem Gelbild (Abbildung 11 / Spur 2) als Hintergrundschmier zu erkennen waren.

Bei den Fällen #20, #21 und #23 war schon anhand der CDR3-PCR klar, daß es sich um polyklonale B-Zell-Population, wie bei Fall #4 handeln würde, dennoch wurden von Fall #20 und

#21 die Amplifikate der CDR3-PCR kloniert und sequenziert. Diese Ergebnisse zeigten deutlich die Heterogenität der CDR3-Sequenzen aufgrund der unterschiedlichsten B-Zell-Klone (Abbildung 13).

CDR3-REGION

1347
 GTATTACTGTGCGAGAGTCCC.....GTCGCCTGGCTGGTATCCCG...GCCCGGTATCCATGGACGTCTG
 1400
 GTATTACTGTGCTAGAGAGGACTACTATGATAGTAGTCTTATTACTACGGGGACTACTACTACTACATGGACGTCTG
 1401
 GTATTACTGTACCACAGT.....TAATCGTGATT...CGGGGANGA..ACGACTACGGCATGGNCNTCTG
 1403
 GTATTACTGTGCGAGAGA.....GAGGGGTATAGCAGTGGCTGGTGAATTTGA.....CTACTG
 1405
 GTATTACTGTGCGAGACGC.....ANCCGCAGCAGNT.....GGTCCTTTGANTANTG
 1407
 GTATTACTGTGCGGAGGGGGT.....GTAGTGGGAGCT.....AGTTGGTTCGACCCCTG
 1408
 GTATTACTGTGCGAGAGN.....CCGGAATACGGTACTA...CGGCGNTGGGGCTCTTGATATCTG
 1409
 GTATTACTGTGCGACA.....ACCAATGANTN....ANG....NNTGTTCAAGGCCTG
 1411
 GTATTACTGTACTAGACATTTTGAG.....ACAGAGTATTACGACATTTGACTGATTATGCATACTTTGACCACTG
 1412
 GTATTACTGTGCGAGAGGGTCC.....CTACCGAGTNTAGTGGGAGN.....TACTTCCTTGACTTCTG
 1413
 GTATTACTGTGTGAGAGAGA.....GTCCTTATGATGGTA.....GTTTGACGGACATGGACGTCTG
 1414
 GTATTACTGTGCGAGAGTNACTGAG...CCATATAGTGANAGNTATGGCNCNCCCACTACTACTACAGTATGGNC.TCTG
 1415
 GTATTACTGTGCGAGA.....AGTAGCAGTGGCTA....TAA.CAACTGGTTCGACCCCTG
 1416
 GTATTACTGTGCGAGAGGC.....GGAAGNTACAGCTCCTT.....GGACGTCTG
 1417
 GTATTACTGTGAAAAGAGTCGGGC...AGCAGCTGGGCCAGACGGGATGACTTCG...ACTACTCCGGTCTGGACGTCTG
 1418
 GTATTACTGTGNGAGA.....GGGAACAG....TG....GGAGNNTATACANNGACTACTG
 1419
 GTATTACTGTGCGAGAGACCGTGAA...GGATATTGTCGTAGTATAAGCAGCCA....AAA.CAACTGGTTCGATCCCTG
 1420
 GTATTACTGTGCGAGGGAT...T.....CAGATTGTTCTAGTACCAGCTGCTATATAAGATACGGGGACTACTG
 1422
 GTATTACTGTGCGAGATTATTTTGG...AG.....GGTAGCTGGAAGT...ACATCAACTGGTTCGACCCCTG
 1424
 GTATTACTGTGCGAGAA..GTTATG...ATCAC....GTTTGGGGAGCGACTT....A....TACTACTTTGACTACCG
 1425
 GTATTACTGTGCCAGAGAGGAGTCC..TTGCCTTACTATAATTCCGAGAACATT.....CCGGGTGGCTCGACCCCTG
 1426
 GTATTACTGTGCGAGA...GTTGGG...GACG.....AGTACGGTACTA....C....GAACTCTTGACTACTG
 1427
 GTATTACTGTGC.....G.....ATTGAATAT....AATTATGAA.AGTAGTGGGGTTTTGACTACTG
 1428
 GTATTACTGTGTGAGAGAGA.....GTCCTTATGATGGTA.....GTTTGACGGACATGGACGTCTG
 1429
 GTATTACTGTGCGAAGGTCCCTCGT...ACTAC...GGTTCGGGGANTTCCCA....CT...TACTACTTTGACTCCTG
 1431
 GTATTACTGTGCGAGAGACTGTGGT...GGTACTGCCCC.....TGGCCTT...ACTACTACGGTATGGACGTCTG
 1433
 GTATTACTGTGCGAGAGATACGG.....CGGGTTCGGGGAAATTATAACCTCTTCTACTACCAGTACGGTATGGACGTCTG
 1434
 GTATTACTGTGCGAAAGA.....TCGCAATTCTTGGAA.....TAGTTTTGATACTTCTGATGTCTG
 A11
 GTATTACTGTGCGAG.....CACG...AAC.....TGGAAC.....TACTACTTTGACTACTG
 A14
 GTATTACTGTGCGAAAGCGAGCCGG.....AGGGTGGGGCTTCTCTGG....GGTACAAGTGGTTCGACCCCTG

Abbildung 13: CDR3-Sequenzen des polyklonalen Falls #4. Alle identifizierten CDR3-Sequenzen sind unterschiedlich. Es konnte keine dominante Tumor-CDR3-Sequenz nachgewiesen werden

Tabelle 1: Bestimmung der Klonalität und der tumorspezifischen CDR3-Region der untersuchten Fälle

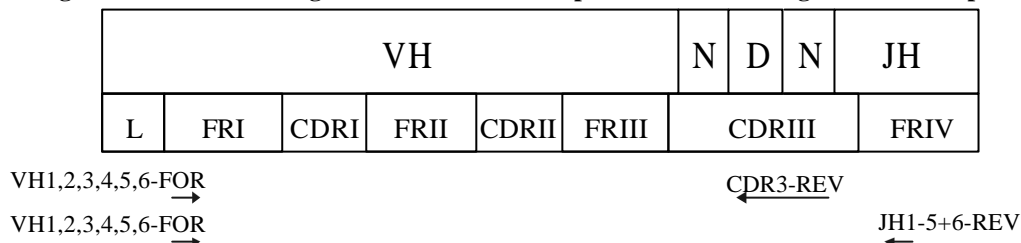
Fall	Klonalität	*N/N _{total} sequenziert	CDR3- Nr.	CDR3-Region 5'@3'	CDR3-Länge in bp
#1	monoklonal	9/10	1	GGCGGTCTAACTACCTCGTT	20
#3	monoklonal	10/26	377	ACGGAAGTACCAGCTGCTATACCCTAT	27
#4	polyklonal	0/27			
#11	biklonal	19/32	889	GTCTCGCATTACGATCTTTTGCCTGGT	27
		3/9	911	TCATCAACTGGTGGCGGGGCC	21
#13	monoklonal	10/10	13	GTTTCAACGCGG	12
#14	biklonal	5/28	391	GAATCGGGTGGCTACGGCTACCCA	24
		6/28	550	GACAATCGATATGGTTCGGGGACTTATTACCCCCCT	36
#16	monoklonal	13/36	1496	TTAGTCGTGATTCGGGGAGGAACGAC	26
#17	monoklonal	7/37	662	AGCAGTCGGGGGGAGCTACTAGGGGGACTTTGC	33
#18	monoklonal	9/11	40	GATCGTGATGCCGGCAGCTCG	21
#19	monoklonal	6/15	482	CAAAGTGGTGGCGGCACGGTGATG	24
#20	polyklonal	0/37			
#21	polyklonal	0/40			
#22	monoklonal	18/40	1228	GGCCAGGGTTGCTTC	15
#23	polyklonal	nicht klonierbar			
#24	monoklonal	5/17	431	GAGGGAGGGGGCCCTGCAGTGGCAGGC	27

* N entspricht der Anzahl an untersuchten Klonen mit der gleichen Sequenz. N_{total} ist die Anzahl aller Klone, die für den jeweiligen Fall untersucht wurden.

3.1.2 Amplifikation und Identifizierung des tumorspezifischen VH-Gens

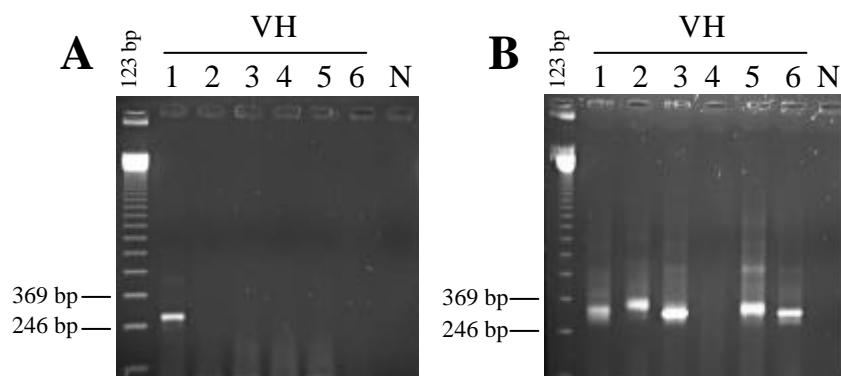
Ausgehend von den identifizierten tumorspezifischen CDR3-Sequenzen wurde für jeden Fall, ein zur jeweiligen CDR3-Region komplementärer und somit klonspezifischer Reverse-Primer ausgewählt und synthetisiert. Dieses Oligonukleotid wurde in einer RT-PCR mit je einem der sechs unterschiedlichen V_H-Familienprimern V_H1-FOR bis V_H6-FOR (Küppers, 1993) kombiniert. Bei den oligoklonalen Fällen wurde als Reverse-Primer ein Gemisch aus zwei Konsensusprimern für die J_H-Region der schweren Immunglobulinketten verwendet ((Abbildung 14); J_H(1-5)-REV und J_H6-REV; (Küppers, 1993)). Alle Reaktionsansätze wurden nach Protokoll 5.2.1.16 durchgeführt.

Abbildung 14: Lage der verwendeten Oligonukleotide bei der Amplifikation der V_H-Region mit tumorspezifischen



Primern oder J_H-spezifischen Primern. Die Konsensus-Primer für die verschiedenen V_H-Familien sind jeweils in einem hochkonservativen Bereich am 5'-Ende der Framework-Region 1 (FRI) lokalisiert. Der tumorspezifische Primer entspricht jeweils der unter 3.1.1 ermittelten CDR3-Sequenz. Für polyklonale Fälle wurde ein Oligonukleotidgemisch spezifisch für das 5'-Ende der verschiedenen J_H-Regionen verwendet.

Da die ausgewählten CDR3-REV-Primer spezifisch für den jeweiligen Tumor-B-Zell-Klon waren, sollte in den mono- und biklonalen Fällen auch jeweils nur einer der sechs V_H-Familienprimer in Kombination mit dem CDR3-REV-Primer eine Bande von ~ 270bp ergeben. Dies war in allen untersuchten Tumorproben der Fall (siehe Abbildung 15). In vereinzelt Fällen waren neben der spezifischen V_H-Familienbande auch unspezifische Banden, wie durch Sequenzierung bestätigt



wurde, zu sehen.

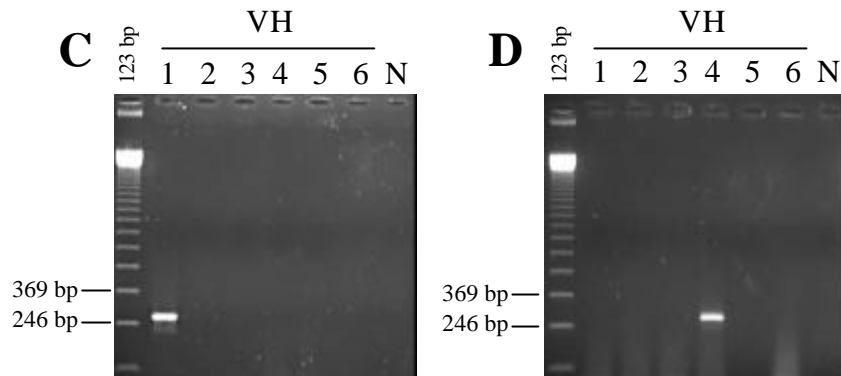


Abbildung 15: Beispiele für V_H -Familien-PCRs bei mono- und biklonale Tumoren sowie bei polyklonalen Fällen. Bei allen Gelen wurde eine 123 bp-Leiter als Größenstandard benutzt. Die Spuren 1 bis 6 stellen die sechs verschiedenen V_H -Familien dar. N entspricht der Negativkontrolle. A) Monoklonaler Fall #18: Mit dem tumorspezifischen Primer 18CDR3-40-REV erhielt man eine V_{H1} -spezifische Bande. B) Polyklonaler Fall #21: Es konnten V_H -Segmente der Familien V_{H1} , 2, 3, 5 und 6 in Kombination mit J_{H1-5+6} -REV amplifiziert werden. C + D) Biklonaler Fall #14: C) zeigt eine Bande bei V_{H1} mit dem Tumorprimer 14CDR3-550-REV. D) zeigt eine V_{H4} -Familienbande mit 14CDR3-391-REV.

Die PCR-Fragmente wurden aus dem 2%igen Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt, in den Vektor pCR-Skript ligiert und in *E. coli* transformiert. Aus den positiven Bakterienkolonien wurde mit Minipräparation die Plasmid-DNA isoliert, NotI/PstI restriktionsverdaut und auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die Insert-enhaltenden Plasmide wurden mit M13-Uni und T3 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von VBASE (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>) im Internet ausgewertet. Dabei handelte es sich um einen Sequenzvergleich mit allen bekannten V_H -, D- und J_H -Keimbahngenen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Das verwendete J_H -Keimbahngenen wurde anhand der Sequenzen aus 3.1.1 ermittelt.

3.1.2.1 Analyse der V_H -Region bei mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphomen

Gene der V_{H1} -Familie wurden in insgesamt fünf verschiedenen Tumoren verwendet (Tabelle 2). Nachgewiesen wurde in Fall #18 DP-75, #22 DP-15, #24 DP-10, #11 DP-2 und in #14 DP-14. Alle erhaltenen Tumor- V_H -Gene zeigten eine Identität von 94 – 98% mit dem entsprechenden Keimbahn- V_H -Gen.

Ebenso häufig wie V_{H1} -Gene fand man in niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen Gene der Familie V_{H4} . Aus ihr wurde bei Fall #1 das Gen DP-63, bei den Fällen #3 und #13 das Gen DP-71, bei Fall #11 DP-2 und bei Fall #14 DP-78 detektiert. Mit Ausnahme von Fall #11 mit 88 %, zeigten die vier vorherigen Fälle eine 94 – 98%ige Identität mit dem jeweiligen Keimbahngenen.

In den Fällen #16 und #17 wurden V_H -Segmente aus der V_H3 -Familie identifiziert. Dabei handelte es sich im Fall #17 um DP-50 und im Fall #16 um 3-49RBm, die beide eine Identität von 96 % zur Keimbahn aufwiesen. Fall #16 stellte jedoch bei der Amplifikation des V_H -Genabschnitts eine Ausnahme dar. Der nach Tabelle 1 entworfene 16CDR3-1496-REV-Primer ergab mit keinem der verwendeten V_H -Familienprimer ein PCR-Produkt und wurde deshalb durch den Primermix $J_H(1-5)+6$ -REV ersetzt. Die so erhaltenen V_H -Sequenzen aus der V_H3 -Familie bestanden zu 50 % aus ein und derselben Sequenz, obwohl kein klonspezifischer Reverse-Primer verwendet wurde. Die restlichen 25 von 50 Sequenzen unterschieden sich alle voneinander und keine Sequenz trat mehrfach auf. Aufgrund dessen ging man davon aus, daß es sich hierbei um die V_H -Sequenz des Tumorklons handeln mußte.

Als einziger Fall verwendete Tumor #19 ein V_H -Segment, das zu 95% identisch mit DP-73 aus der V_H5 -Familie war. Gene aus den Familien V_H2 , V_H6 und V_H7 wurden in keinem der untersuchten Tumoren gefunden.

Tabelle 2: Identifizierung der V_H-, D- und J_H-Gensegmente bei mono- und biklonalen B-Zell-Lymphomen des MALT-Typs

Fall	Klonalität	Primerpaare	N/N _{total} sequenziert	%Identität mit Keimbahngen	V _H - Familie	V _H - Keimbahngen	D- Segment	J _H - Segment	LR
#1	monoklonal	VH4-FOR x 1CDR3-1-REV	6/6	94	VH4	DP-63	D1-20	4	IN
#3	monoklonal	VH4-FOR x 3CDR3-377-REV	17/17	98	VH4	DP-71	D2-2	6	IN
#13	monoklonal	VH4-FOR x 13CDR3-13-REV	28/36	97	VH4	DP-71	???	6	IN
#16	monoklonal	VH3-FOR x JH(1-5)+6-REV	25/50	96	VH3	3-49RBm	D2-2	6	OUT
#17	monoklonal	VH3-FOR x 17CDR3-662-REV	14/15	96	VH3	DP-50	D1-26	4	IN
#18	monoklonal	VH1-FOR x 18CDR3-40-REV	15/15	94	VH1	DP-75	D3-16	4	IN
#19	monoklonal	VH5-FOR x 19CDR3-482-REV	24/25	95	VH5	DP-73	(D3-16)*	4	IN
#22	monoklonal	VH1-FOR x 22CDR3-1228-REV	9/16	98	VH1	DP-15	???	4	IN
#24	monoklonal	VH1-FOR x 24CDR3-431-REV	18/21	96	VH1	DP-10	D6-19	6	IN
#11	biklonal	VH1-FOR x 11CDR3-889-REV	19/32	96	VH1	DP-2	D3-9	5	IN
		VH4-FOR x 11CDR3-911-REV	3/9	88	VH4	DP-65	D1	6	IN
#14	biklonal	VH1-FOR x 14CDR3-550-REV	13/16	95	VH1	DP-14	D3-10	6	IN
		VH4-FOR x 14CDR3-391-REV	9/12	97	VH4	DP-78	D5-12	4	IN

N/N_{total} sequenziert: Anzahl der untersuchten Sequenzen, die dem jeweiligen V_H-Gen entsprachen, im Vergleich zur Gesamtanzahl der untersuchten Sequenzen; LR: Leseraster; ??? : D-Segment konnte nicht identifiziert werden; * D-Segment liegt in revers-komplementärer Orientierung vor; Identifikation der D-Segmente erfolgte nach Corbett [, 1997 #1715];

Das D-Segment der variablen Region konnte in 11 von 13 Fällen mit Hilfe von VBASE (Corbett, 1997) und den Kriterien nach Klein (1994) bestimmt werden (Tabelle 2). Zur Identifizierung eines D-Segments mußten mindestens sieben aufeinanderfolgende Nukleotide mit dem Keimbahn-D-Segment übereinstimmen oder aber acht Nukleotide in Folge vorliegen, die nur durch eine Basensubstitution unterbrochen wurden.

Zehn der untersuchten Tumoren benutzten das D-Segment in 5'→3' Orientierung, wohingegen Fall #19 das D3-16 Segment in revers-komplementärer Richtung rearrangiert hatte. In den beiden Fällen #13 und #22 ergab der Sequenzvergleich ein negatives Ergebnis. Ein Grund dafür könnten somatische Hypermutationen sein, welche die CDR3-Region der betroffenen Fälle so stark verändert hatten, daß das ursprüngliche D-Segment nicht mehr erkannt werden konnte. Daß es sich um neue D-Segmente handelte, die nicht in der Genbank enthalten sind, ist unwahrscheinlich, da alle D-Sequenzen sequenziert und veröffentlicht worden sind (Ravetch, 1981; Siebenlist, 1981; Rabbitts, 1983; Buluwela, 1988; Buluwela, 1988; Ichihara, 1988; Mattila, 1995; Corbett, 1997). Zweimal wurde in je zwei Lymphomen das gleiche D-Segment identifiziert. Dabei handelte es sich zum einen um die Fälle #18 und #19, die beide das Segment D3-16 rearrangiert hatten, jedoch #19 in revers-komplementärer Orientierung wie oben beschrieben wurde. Und zum anderen um die Tumoren #3 und #16 die beide D2-2 verwendeten, wobei im Fall #16 aufgrund von Leserastermutationen schon im V_H-Segment keine komplette funktionelle schwere Immunglobulinkette entstehen konnte.

Je sechs von dreizehn untersuchten V_H-Regionen enthielten ein J_H4- oder J_H6-Gensegment, ein Fall verfügte über ein J_H5-Segment (siehe Tabelle 2).

Alle analysierten V_H-Regionen, mit Ausnahme der von Fall #16, waren im Leseraster rearrangiert und enthielten kein STOP-Codon, d.h. die durch das VDJ-Rearrangement entstandenen variablen Regionen der schweren Immunglobulinkette waren alle funktionell und stellten somit die exprimierten Sequenzen des Tumorklons dar. Im Gegensatz dazu enthielten alle sequenzierten Klone von Fall #16 Leserastermutationen, die entweder zu einem „out-of-frame“ Leseraster führten oder in einem STOP-Codon endeten.

3.1.2.2 Analyse der verwendeten V_H-Gene im polyklonalen Entzündungsinfiltrat von MALT-Typ Lymphomen

Mit Hilfe der unter 3.1.2 beschriebenen Methode wurden bei den polyklonalen Fällen #4, #20, #21 und #23 die verwendeten V_H-Familien und deren V_H-Gene untersucht. Im Fall #4 erhielt man nur Gene der V_H3-Familie. Acht verschiedene V_H3-Gene von 22 bekannten, konnten mit

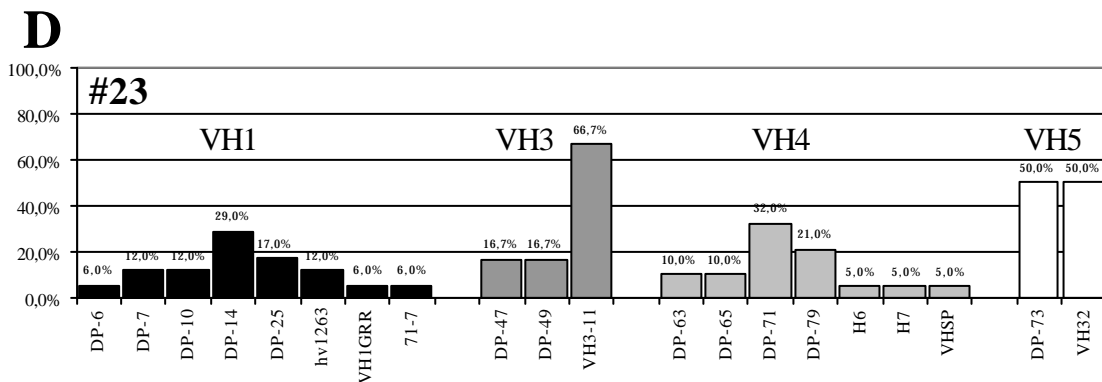
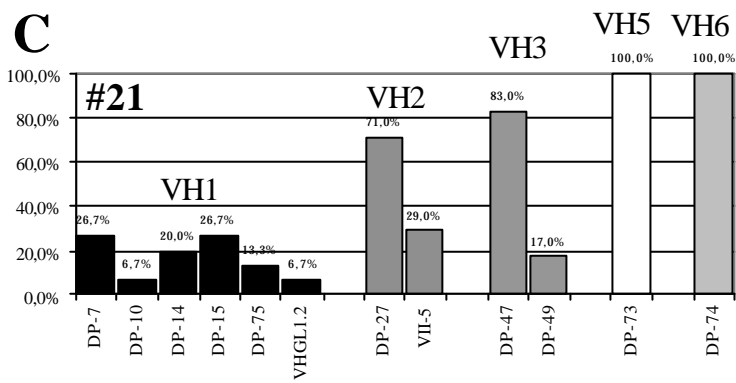
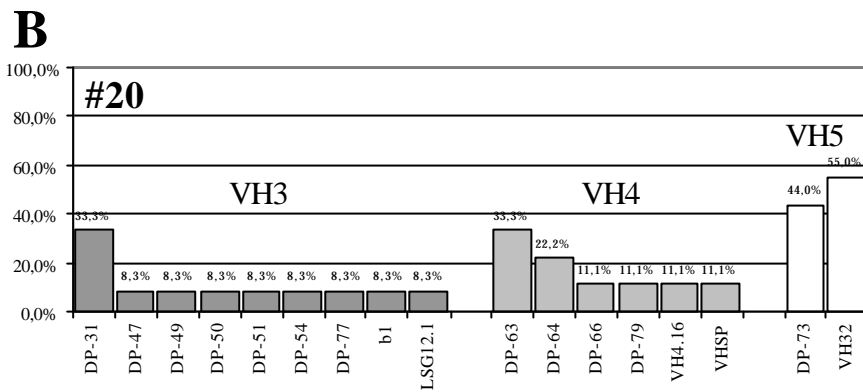
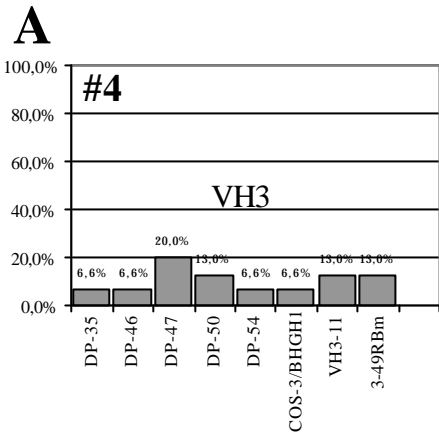
unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16A). 20 % der untersuchten Klone enthielten das V_H -Gensegment DP-47. Mit je 13 % wurden DP-50, VH3-11 und 3-49RBm nachgewiesen. Und jeweils 6,6 % der V_{H3} -Familienklone enthielten DP-35, DP-46, DP-54 und COS-3.

Fall #20 exprimierte neben V_H -Genen der V_{H3} -Familie auch V_{H4} und V_{H5} . Dabei handelt es sich um kleinere V_H -Familien, die sich im Gegensatz zu V_{H3} nur aus 11 (V_{H4}) und 2 (V_{H5}) funktionellen, unterschiedlichen Gensegmenten zusammensetzen (siehe Abbildung 16B). Bei der V_{H3} -Familie wurde mit 33,3 % DP-33 am häufigsten nachgewiesen. Alle weiteren identifizierten V_H -Gene der Familie (DP-47, DP-49, DP-50, DP-51, DP-54, DP-77, b1, LSG12.1) waren mit 8,3 % gleich stark vertreten. DP-63 und DP-64 stellten bei der V_{H4} -Familie mit je 25 % die beiden am häufigsten rearrangierten Gensegmente dar. DP-66, DP-79, VH4.16 und VHSP konnten zu gleichen Anteilen (12,5 %) nachgewiesen werden. Mit 55 % war VH23 bei der V_{H5} -Familie neben DP-73 (44 %) am stärksten vertreten.

Fünf unterschiedliche V_H -Familien (V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H5} , V_{H6}) konnten im Fall #21 detektiert werden. Im Falle der V_{H1} -Familie konnten 6 von 11 bekannten funktionellen Gensegmenten im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um DP-15 (30,8 %), DP-7 und DP-14 (23,1 %) und DP-10, DP-75, VHGL1.2 (7,7 %). Zwei der drei bekannten V_{H2} -Gene, DP-27 und VII-5, wurden ebenfalls gefunden, wobei DP-27 in 71 % der untersuchten Klone vorlag. Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Fällen, wurden aus der V_{H3} -Familie nur die beiden Gensegmente DP-47 (83 %) und DP-49 detektiert. Die Familien V_{H5} und V_{H6} (ein funktionelles V_H -Gensegment) waren jeweils durch DP-73 und DP-74 vertreten.

Wie in Abbildung 16D deutlich wird, setzte sich die Population an rearrangierten V_H -Segmenten des Falls #23 aus Gensegmenten der Familien V_{H1} , V_{H3} , V_{H4} und V_{H5} zusammen. Dabei wurden DP-14, DP-25, DP-7, DP-10, hv1263, DP-6, VH1GRR und 71-1 aus der V_{H1} -Familie, DP-47, DP-49 und VH3-11 (je 33,3 %) aus der V_{H3} -Familie sowie DP-71, DP-79, DP-63, DP-65, H6, H7, VHSP, VH4-MC9a und VH4.16 aus der V_H -Familie verwendet. Bei Familie V_{H5} konnten beide funktionellen V_H -Gene (DP-73, VH32Sanz) zu gleichen Teilen nachgewiesen werden.

Abbildung 16: Verwendete V_H -Segmente und ihr prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten V_H -Familie im Entzündungsinfiltrat von MALT-Typ Lymphomen. A: Fall #4; B: Fall #20; C: Fall: #21; D: Fall #23. Aufgrund der verwendeten PCR- und Auswertungsmethoden können die Prozentangaben zur Häufigkeit der einzelnen V_H -Gensegmente nur jeweils innerhalb der entsprechenden V_H -Familie verglichen werden, jedoch nicht zwischen unterschiedlichen V_H -Familien und Fällen.



3.1.3 Korrelation der Tumorklonalität mit dem Nachweis der Translokation t(11;18)(q21;q21) in niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen

In neueren cytogetischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnte eine für niedrig-maligne MALT-Typ Lymphome spezifische Translokation t(11;18)(q21;q21) nachgewiesen werden (Ott, 1997; Dierlamm, 1999). Die von Ott und Kalla (unveröffentlichte Daten) an dem hier verwendeten Patientenmaterial durchgeführten translokationsspezifischen Analysen (siehe Tabelle 3), weisen deutlich auf eine Korrelation von Tumorklonalität und der tumorspezifischen Translokation hin. In 10 von 11 untersuchten Fällen bei denen ein oder zwei B-Zell-Klone den Tumor ausbildeten (mono- oder biklonal), konnte die Translokation t(11;18)(q21;q21) mit Hilfe von FISH- und RT-PCR-Analysen in der Neoplasie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren alle Fälle mit polyklonalem Entzündungsinfiltrat negativ für die spezifische Translokation.

Tabelle 3: Korrelation von Tumorklonalität mit der Translokation t(11;18)(q21;q21)

Fall	Lokalisation	Klonalität	t(11;18)(q21;q21)*	Ig-Typ
#1	Magen	monoklonal	nein	M, κ
#3	Magen	monoklonal	ja	M, κ
#13	Schilddrüse	monoklonal	ja	M, λ
#16	Magen	monoklonal	ja	?, λ
#17	Magen	monoklonal	ja	M, κ
#18	Lunge	monoklonal	ja	A, λ
#19	Lunge	monoklonal	ja	M, λ
#22	Magen	monoklonal	ja	M, κ
#24	Speicheldrüse	monoklonal	ja	M, κ

Fall	Lokalisation	Klonalität	t(11;18)(q21;q21)*	Ig-Typ
#11	Magen	biklonal	ja	M, κ
#14	Magen	biklonal	ja	M, λ
#4	Magen	polyklonal	nein	M, κ
#20	Schilddrüse	polyklonal	(nein)	M, κ
#21	Magen	polyklonal	(nein)	M, κ
#23	Magen	polyklonal	nein	M, κ

* Nachweis der Translokation wurde von Ott [, 1997 #1290] und Kalla (unveröffentlichte Daten) mit Hilfe von FISH- und RT-PCR-Analysen durchgeführt.

3.1.4 Mutationsanalysen bei mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphomen

Aufgrund von Analysen der somatischen Mutationen im V_H -Genabschnitt des jeweiligen Antikörpermoleküls erhält man Einblick in das Reifungsstadium (Prä-Keimzentrumszellen, Keimzentrumszellen oder Post-Keimzentrumszellen) der untersuchten B-Zelle. Anhand der Verteilung und Beschaffenheit der einzelnen Mutationen kann man auf positiv oder negativ erfolgte Selektion der Zelle, aufgrund von Antigenkontakt schließen (Berek, 1991; Rajewsky, 1996; Klein, 1998).

Bei zwölf von dreizehn in Abschnitt 3.1.2.1 (Tabelle 2) analysierten V_H -Regionen wurden Mutationsanalysen durchgeführt. Die jeweiligen CDR3-Regionen wurden nicht auf Mutationen hin untersucht, da oft Schwierigkeiten bestanden das jeweilige D-Segment eindeutig einem Keimbahn-D-Segment zuzuordnen. Der Fall #16 wurde nicht analysiert, da alle untersuchten V_H -Klone Leserastermutationen und STOP-Codons enthielten und somit keine funktionelle schwere Immunglobulinkette daraus entstehen konnte.

Alle untersuchten V_H -Regionen enthielten somatische Punktmutationen im Vergleich zu den entsprechenden Keimbahn- V_H -Sequenzen. Die Wahrscheinlichkeit, daß Mutationen auf Keimbahnpolymorphismen zurückzuführen waren, ist sehr gering, da fast alle V_H -Gene und ihre Varianten identifiziert und in der verwendeten Genbank zu diesem Zeitpunkt schon enthalten waren (Cook, 1995). Ebenso ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß Fehler der Taq-Polymerase die

Ergebnisse stark verfälschten, da in einigen Fällen eine fortlaufende Mutationsrate von rund 5,5 % vorlag, die weitaus größer war als die empirisch ermittelte Fehlerrate der verwendeten Taq-Polymerase von 0,17 %.

Die Mutationsanalysen der V_H-Gene ergaben Mutationsraten zwischen 2,3 % und 26,1 %. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz der untersuchten B-Zell-Klone lag bei 9,9 % (siehe Abbildung 17).

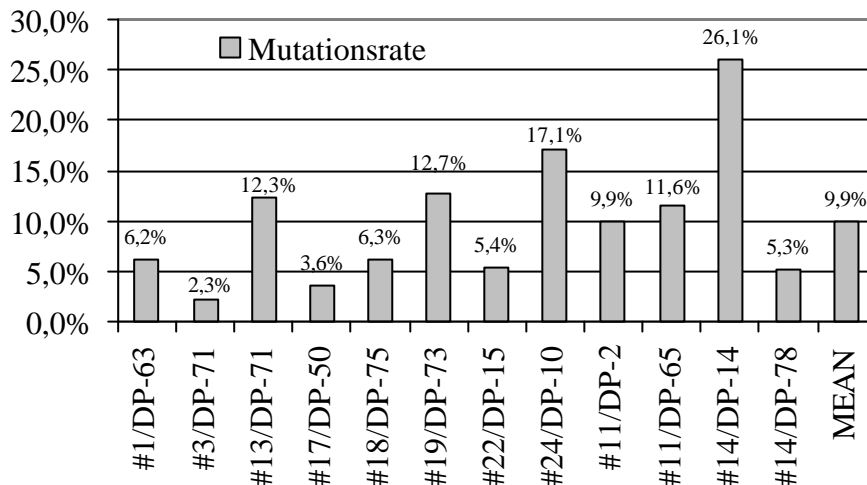


Abbildung 17: Mutationsraten der untersuchten V_H-Gene in niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen

In Tabelle 4 sind alle Ergebnisse zusammengefasst, wobei R den Austauschmutationen (replacement mutation), die zu veränderten abgeleiteten Aminosäuresequenzen führen und S den stillen Mutationen (silent mutation), die sich nicht auf die Zusammensetzung des Proteins auswirken, entspricht. Die beobachteten R- und S-Mutationen wurden anhand der Nukleotidsequenzen bestimmt, wobei eine S-Mutation, die im gleichen Codon wie eine R-Mutation vorkam, nicht gezählt wurde. Ebenso wurden zwei R-Mutationen, die im selben Codon lokalisiert waren auch nur als eine R-Mutation gewertet, da nur eine Aminosäure verändert wurde (Klein, 1998). Mutationen welche die untersuchten Klone eines Falls gemeinsam hatten, wurden nur einmal gewertet. Die jeweiligen Nukleotidsequenzen und abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind unter 7.1 aufgeführt. Die in Tabelle 4 zur Berechnung der erwarteten Mutationsrate und der Wahrscheinlichkeit p verwendeten Formeln sind unter 5.2.5 näher erläutert.

Sieben der zwölf untersuchten V_H -Gene (#1, #3, #22, #24, #11/DP-65, #14/DP-14, #14/DP-78) zeigten weder in den CDR- noch in den FR-Regionen für positive Selektion aufgrund von Antigenkontakt charakteristische R/S-Verhältnisse im Vergleich zu den berechneten Werten (siehe Abbildung 18 und Tabelle 4). Bei vier der sieben Fälle (#1, #24, #11/DP-65, #14/DP-14) war eine verminderte Anzahl an R-Mutationen in den FRs sowie ein geringeres R/S-Verhältnis im Vergleich zu den theoretischen Werten, statistisch signifikant. Dies ist typisch für exprimierte Antikörpermoleküle, bei denen aufgrund negativen Selektionsdrucks in diesen Regionen die Funktion und Struktur des Antikörpers aufrechterhalten werden soll (Berek, 1991).

Die beiden V_H -Gene #11/DP-2 und #17/DP-50 zeigten in den CDRs ein unverändertes Mutationsbild im Vergleich zu den vorherigen Fällen. Im Gegensatz dazu fand man in den FRs mehr Austauschmutationen als erwartet wurden. Jedoch war dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant, somit ist davon auszugehen, daß die Mutationen zufällig und nicht aufgrund eines vorhandenen Selektionsdrucks entstanden sind.

Ein anderes Bild zeigte sich in den Fällen #18 und #19, bei denen die Anzahl an erwarteten R-Mutationen, sowohl in den CDRs als auch in den FRs, größer war als die theoretischen Werte. Die Wahrscheinlichkeit p , daß die Anhäufungen an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen rein zufällig entstanden sind, ist im Falle der CDR-Regionen sehr klein ($p < 0,1$). Man kann davon ausgehen, daß die Austauschmutationen aufgrund eines positiven Antigenselektionsdrucks entstanden sind. Die gezielte Einführung von Mutationen in den FRs ist unwahrscheinlich, wenn man in Tabelle 4 den Wert p betrachtet.

Nur bei einem Fall (#13) fand man das statistisch signifikante, klassische Mutationsbild aufgrund von Antigenkontakt, bei dem mehr R-Mutationen in den CDRs und weniger R-Mutationen in den FRs gefunden wurden, als berechnet worden waren. Hier ist deutlich der auf die CDR-Regionen wirkende positive Selektionsdruck, welche die Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen erhöhen soll, zu erkennen. Parallel dazu wird auch die negative Selektion der FR-Regionen, die in ihren Strukturen erhalten bleiben sollen, um die Funktion des Antikörpers aufrecht zu erhalten, deutlich.

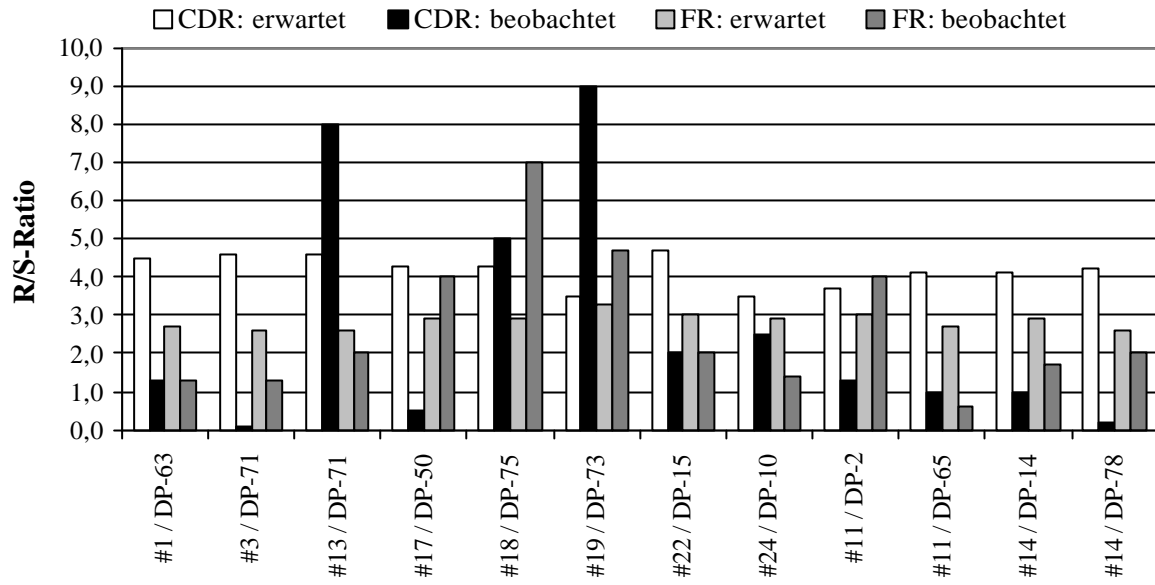


Abbildung 18: Erwartete und beobachtete R/S-Verhältnisse der CDR- und FR-Regionen von mono- und biklonalen B-Zell-Lymphomen des MALT-Typs.

Tabelle 4: Ergebnisse der Mutationsanalysen bei mono- und biklonalen B-Zell-Lymphomen des MALT-Typs.

Fall	V _H -Keimbahnen	Region	Erwartete	Erwartete	Beobachtete	Beobachtete	Erwartete	Beobachtete	p	%M-Gesamt
			R	S	R	S	R/S	R/S		
#1	DP-63	CDRs	3	1	4	3	4,5	1,3	0,184	6,2
		FRs	9	3	5	4	2,7	1,3	0,026	
#3	DP-71	CDRs	1	0	0	0	4,6	0	0,260	2,3
		FRs	3	1	3	2	2,6	1,5	0,321	
#13	DP-71	CDRs	6	1	8	1	4,6	8,0	0,096	12,3
		FRs	12	5	10	5	2,6	2,0	0,102	
#17	DP-50	CDRs	2	0	1	2	4,3	0,5	0,264	3,6
		FRs	4	1	4	1	2,9	4,0	0,273	
#18	DP-75	CDRs	3	1	5	0	4,3	∞	0,094	6,3
		FRs	6	2	7	0	2,9	∞	0,211	
#19	DP-73	CDRs	6	2	9	1	3,5	9,0	0,064	12,7
		FRs	15	5	14	3	3,3	4,7	0,144	

Fall	V _H -Keimbahngen	Region	Erwartete		Beobachtete		Erwartete		Beobachtete		p	%M-Gesamt
			R	S	R	S	R/S	R/S				
#22	DP-15	CDRs	3	1	2	1	4,7	2,0	0,238	5,4		
		FRs	6	2	6	3	3,0	2,0	0,222			
#24	DP-10	CDRs	7	2	5	2	3,5	2,5	0,120	17,1		
		FRs	16	6	14	10	2,9	1,4	0,100			
#11	DP-2	CDRs	4	1	4	3	3,7	1,3	0,223	9,9		
		FRs	9	3	8	2	3,0	4,0	0,171			
#11	DP-65	CDRs	6	1	3	3	4,1	1,0	0,079	11,6		
		FRs	12	5	7	11	2,7	0,6	0,019			
#14	DP-14	CDRs	11	3	8	8	4,1	1,0	0,073	26,1		
		FRs	25	9	20	12	2,9	1,7	0,038			
#14	DP-78	CDRs	3	1	1	5	4,2	0,2	0,129	5,3		
		FRs	10	3	4	2	2,6	2,0	0,118			

R: Replacement-/Austauschmutation; S: Silent/stille Mutation; p: Wahrscheinlichkeit, daß der Überschuß an R-Mutationen in den jeweiligen Regionen zufällig entstanden ist; %M-gesamt: Mutationsfrequenz berechnet in % im jeweiligen V_H-Gensegment;

3.1.5 Intraklonale Variationen bei mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphomen

Nicht nur die Anzahl und die Art (R oder S) der Mutationen gibt Aufschluß über den Reifungszustand einer B-Zelle, sondern auch das Verteilungsmuster der Mutationen innerhalb der untersuchten Plasmidklone eines Tumors. Findet man sogenannte „ongoing mutations“ (siehe 2.1.1.3), so ist dies ein Hinweis, daß der somatische Hypermutationsmechanismus bei den jeweiligen B-Zellen noch nicht beendet ist und es sich somit um Keimzentrums-B-Zellen handeln müßte. Weisen hingegen alle tumorspezifischen V_H -Klone die gleiche Veränderung auf, so ist davon auszugehen, daß es sich bei den Tumorzellen um Post-Keimzentrums-B-Zellen (Gedächtnis-B-Zellen) handelt, bei denen der Mechanismus der somatischen Hypermutation schon abgeschlossen wurde (Küppers, 1993).

In elf der zwölf untersuchten Tumorklone fand man verschieden starke intraklonale Variationen. Im Fall #11/VH4 waren keine unterschiedlichen Mutationsmuster in den einzelnen Tumorsequenzen vorhanden. Alle untersuchten Sequenzen enthielten nur sogenannte „common mutations“, das heißt Mutationen, die allen Plasmidklonen gemeinsam waren.

Ein völlig anderes Bild ergab die Analyse von Fall # 13 (Abbildung 19). Hier wurde deutlich, daß sich aus dem ursprünglichen Tumorklon (Abbildung 19, Absatz 1), der nur drei common mutations aufwies, weitere in ihrer CDR3-Region immer noch identische Unterkclone, aufgrund von „ongoing mutations“, entwickelt hatten. Insgesamt wurden 22 noncommon mutations gefunden, die sich aus 17 R- und 5 S-Mutationen zusammensetzten. Anhand des Mutationsmusters war deutlich zu erkennen, daß sich aus dem Haupttumorklon (Abbildung 19, Absatz 1) ein Nachfolgeklon mit einer zusätzlichen R-Mutation (AA78: F \rightarrow L: Position der Aminosäuren bezogen auf den gesamten V_H -Genabschnitt; Großbuchstaben entsprechen R-Mutationen, Kleinbuchstaben S-Mutationen) entwickelt hatte (Abbildung 19, Absatz 2). Innerhalb dieses Klons fand man noch zusätzliche Mutationsvarianten, die meist mehrmals vorhanden waren (AA25: S \rightarrow C (1685, 1652, 1653: Klonnummer); AA42: G \rightarrow R (1659, 1686, 1655); AA58: N \rightarrow K (1677, 1685, 1661)). Zwei von siebzehn noncommon R-Mutationen waren in CDR1 lokalisiert und vier von siebzehn in CDR2.

Bei Fall #19 war ebenfalls ein Ursprungsklon (Abbildung 20, Absatz 1) mit sechs R- und vier S-Mutationen zu erkennen, die sich in allen untersuchten V_H -Sequenzen wiederfanden. Zusätzlich traten Variationen des Ausgangsklons in Erscheinung (siehe Abbildung 20, Absatz 2), wobei es sich ausschließlich um R-Mutationen handelte, von denen in vier Fällen die common mutations verändert

worden waren (1018: N \rightarrow K, p \rightarrow L (1001) oder A (1018), 993: y \rightarrow F). In drei der vier Fälle wurden S- in R-Mutationen umgewandelt. Wie bei Fall #13, ist auch im Fall #19 aus dem Ursprungsklon ein Nachfolgeklon entstanden, der eine zusätzliche R-Mutation (AA82b: S \rightarrow T) enthielt (siehe Abbildung 20, Absatz 3). Dieser modifizierte Klon trat noch zusätzlich in fünf verschiedenen Mutationsvarianten auf (Abbildung 20, Absatz 3), wobei auch einmal, die für den Klon typische Aminosäure AA82b: T durch N (995) oder A (1015) ersetzt wurde. Insgesamt fand man im vorliegenden Fall siebzehn noncommon R-Mutationen aber keine S-Mutation.

Die Abbildung 21 (Absatz 1) zeigt den Ausgangsklon von Fall #24, der drei R-Mutationen und vier S-Mutationen enthielt. Die nachfolgenden V_H-Sequenzen wurden durch 15 R- und 7 S-Mutationen variiert. Dabei zeigten sich auch wieder Folgeklone mit jeweils unterschiedlichen noncommon mutations (Abbildung 21, Absatz 2) und Klone, die zusätzlich eine S-Mutation an AA89: V \rightarrow v enthielten (Abbildung 21, Absatz 3). Drei der fünfzehn noncommon R-Mutationen fand man in der CDR1-Region und zwei in der CDR2-Region. Eine der R-Mutationen in der CDR1-Region veränderte die allen Klonen gemeinsame Aminosäure 31 (1581: AA31: N \rightarrow D).

Bei Fall #14 / VH1 wurde kein Klon gefunden, der ausschließlich common mutations enthielt und somit den Ausgangsklon, wie in den vorherigen Fällen, darstellte. Anhand der Mutationsmuster der untersuchten V_H-Sequenzen konnte man jedoch die Ausgangssequenz erschließen. Der ursprüngliche Klon mußte vier gemeinsame R-Mutationen (AA52a: A \rightarrow G; AA56: N \rightarrow Y; AA65: G \rightarrow D; AA81: E \rightarrow D) enthalten haben. Dann spaltete sich der Ursprungsklon in zwei Klonvarianten auf (Abbildung 22, Absatz 1 und 2), die ihrerseits wieder durch gemeinsame Mutationen charakterisiert wurden. Die erste Variante (Absatz 1) enthielt fünf common R- und (AA28: T \rightarrow S; AA58: N \rightarrow K; AA63: L \rightarrow F; AA68: T \rightarrow N; AA76: S \rightarrow N; AA77: T \rightarrow A) drei S-Mutationen (AA52; AA72; AA82a). Zusätzlich fand man acht Einzelaustauschmutationen und sieben S-Mutationen. Die zweite Klonvariante (Absatz 2) verfügte über nur eine gemeinsame R-Mutation (AA63: L \rightarrow V) und drei S-Mutationen (AA27; AA33; AA49). Hinzu kamen neun R- und neun S-Mutationen. Insgesamt waren acht R-Mutationen in der CDR2-Region lokalisiert und zwanzig in den FR-Regionen.

Auf die intraklonalen Variationen der Fälle #3, #17, #18, #22, #11/VH1, #11/VH4 und #14VH4 wurde an dieser Stelle nicht eingegangen, da es sich jeweils nur um geringe Sequenzabweichungen vom jeweiligen Hauptklon handelte und die gefundenen Mutationen nur in je einem Plasmidklon in Erscheinung traten. Es konnte in diesen Fällen nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei manchen Sequenzveränderungen um Fehler der Taq-Polymerase handelte. Die Sequenzen sind im Anhang unter 7.1 aufgeführt.

Fall #13

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	
DP-71	SGGSIS		SYYS	WIRQPPGKGLEWIG		YIYYSGSTNYNPSLKS
	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR					
1646	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1648	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1651	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1654	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1658	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1663	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1679	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1681	-----	--S-N	-----	-----	-----	s -----
--						
1650	-----	--S-N	-----	-----	-----	s --a-----
--						
1659	-----	--S-N	-----R-----	-----	-----H-----	s -----
--						
1680	-----	--S-N	-----	-----	-----R-----	s -----
--						
1677	-----	--S-N	-----	-----K-----	-----	s -----
--						
1685	C-----	--S-N	-----	-----K-----	-----	s -----A-----
--						
1661	-----	--S-N	-----	-----K-----	-----L-----	s -----
--						
1674	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1678	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1647	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1656	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1662	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1686	-----	--S-N	-----R-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1655	-----	--S-N	-----R-----	-----G-----	-----L-----	s -----
--						
1652	C-----	--S-N	-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1653	C-----	--S-N	-----	-----	-----L-----	s -----
--						
1683	-----	--S-N	-----	-----S-----	-----L-----	s -----
--						
1660	-----	--S-N	-----	-----n-----	-----L-----	s -----
--						
1668	-----	--S-N	R-----	-----	-v-----L-----	s -----
--						
1682	-----	--S-N	-----	-----	-----	N-----
--						
1684	-----	DHS--	--r-----	-----S-----	-----v--Q-H--N-----	-----
--						

Abbildung 19: Intraklonale Variationen in der Aminosäuresequenz von Fall #13. Großbuchstaben stehen für R-Mutationen; Kleinbuchstaben stehen für S-Mutationen; Fettgedruckte Aminosäuren stellen sogenannte „common mutations“ dar, die in allen untersuchten Sequenzen gefunden wurden.

Fall #19

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
DP-73	SCKGSGYSFT		SYWIG	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPGDSDRYSPSFQG
	QVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCAR				
1000	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
1009	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
1013	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
1014	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
1016	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
1024	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
1001	-----	N----	-----g	-VNL--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
1027	-----	N----	-----Tg	-VNp--V-----H-	-----N--y-----
---	y---				
993	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--F-----
---	y---				
1012	-S-----	K----	-----g	-VNA--YV-----H-	-----TN--y-----
---	y---				
1008	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-----
---	y---				
994	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-----
---	y---				
1017	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-----
---	y---				
1019	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-----
---	y---				
1021	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-----
---	y---				
1005	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	--A-----N--y---T-----
---	y---				
992	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-----
A---	y---				
997	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-N-----
---	y---				
995	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---N-N-----
---	y---				
1015	-----	N----	-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---A-----
---	y---				
999	-----C---	N----	-----V-----g	-VNp--V-----H-	-----N--y---T-----
---	y---				

Abbildung 20: Intraklonale Variationen in der Aminosäuresequenz von Fall #19. Großbuchstaben stehen für R-Mutationen; Kleinbuchstaben stehen für S-Mutationen; Fettgedruckte Aminosäuren stellen sogenannte „common mutations“ dar, die in allen untersuchten Sequenzen gefunden wurden.

Fall #24

DP-10	FR1 SCKASGGTFS	CDR1	FR2 SYAIS	CDR2 WVRQAPGQGLEWMG	FR3 GIIPIFGTANYAQKFQG
RVTTITADESTSTAYMELSSLRSED			TAVYYCAR		
1589	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----t--D--l-----

1394	-----	N-V--	-----H-----	-----a---k---	--t-----t--D--l--D--

1591	----P-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----t--D--l-----

1590	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-S-----t--D--l-----

1580	-----	N----	-----L-----	-----a-----	--t-----t--D--l-----
--y-----					
1584	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--tV-----t--D--l-----
-I-----					
1587	-----	N----	-----H-----	-----a-----	-It-----t--D--l-----

1576	----Lg-----	N----	--G--H-H-----	-----aK-----	--t-----t--D--l-----

1505	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----st--D--l-----

1506	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----st--D--l-----
-v-----					
1586	-----	N----	-----H-----g	-----a-----	--t-----t--D--l-----
-v-----					
1588	-----	N----	-----H-----g	-----a-----	--t-----t--D--l-----
-v-----					
1578	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----s--t--D--l-----
-v-----					
1577	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----t--D--l-----
-v-----					
1581	-----	D----	-----H-----	-----a-----	--t-----t--D--l-----
-v-----					
1583	-----	N----	-----H-----	-----a---N--	--t-----t--Dl--l-----
-v-----					
1393	----C-----	N-V--	-----H-----	-----	--t-----t--Dl--l-----
-v-----					
1585	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----t--D-I-l-----
-v-----					

Abbildung 21: Intraklonale Variationen in der Aminosäuresequenz von Fall #24. Großbuchstaben stehen für R-Mutationen; Kleinbuchstaben stehen für S-Mutationen; Fettgedruckte Aminosäuren stellen sogenannte „common mutations“ dar, die in allen untersuchten Sequenzen gefunden wurden.

Fall #14 / VH1

DP-14	FR1 SGYTFT	CDR1	FR2 SYGIS	CDR2 WVRQAPGQGLEWMG	FR3 WISAYNGNTNYAQKLQG
RVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR					
1201	--NS--	-----	-CDRP-----	--sG---Y-K---F-D	--N---d---NA---D-r-----
t---					
1198	---S--	s----	-----	--sGy-gY-K---F-D	--N---d---NA---D-r-----
avLLcE-					
1190	---S--	-----	-----	--sGy-gY-K---F-D	--N---d---NA---D-r-----
t---					
1193	s-y---	--g--	-----g	--GG---Y-----V--	-----D-----

```

1200  --y---  s-g-s  -----L-----g  ---G-ngY--S---V-D  ----tI----s----D-----
---
1194  --y---  s-g-s  -----g  ---G-n-Y--S---V-D  ----tI----s----D-----
---
1195  --y---  s-g-s  -----g  ---G-n-Y--S--kV-D  ----tI----s----D-K--K---tG-F-
--K

```

Abbildung 22: Intraklonale Variationen in der Aminosäuresequenz von Fall #14/VH1. Großbuchstaben stehen für R-Mutationen; Kleinbuchstaben stehen für S-Mutationen; Fettgedruckte Aminosäuren stellen sogenannte „common mutations“ dar, die in allen untersuchten Sequenzen gefunden wurden.

3.1.6 Diskussion der Ergebnisse

Ausgehend von der These, daß sich solide maligne Tumoren aus einer entarteten Zelle entwickeln und somit monoklonalen Ursprungs sind (Fialkow, 1976), wurde dies auch für Tumoren des lymphatischen Systems vorausgesetzt. Im Falle der niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome wurde anfangs, mit Hilfe von Southern-Blot-Analysen der variablen Region der schweren und leichten Immunglobulinketten, die Klonalität des jeweiligen Tumors bestimmt (Spencer, 1989). Aufgrund von oftmals begrenzten Mengen an Biopsiematerial, welches für Untersuchungen zur Verfügung stand, entwickelten verschiedene Arbeitsgruppen vergleichbare PCR-Strategien, um zwischen mono- und polyklonalen B-Zell-Populationen unterscheiden zu können (Brisco, 1990; McCarthy, 1990; Trainor, 1990; Diss, 1993; Küppers, 1993). Die Grundidee dieser Nachweismethoden beruht auf der Tatsache, daß jede B-Zelle anhand der Länge ihrer individuellen CDR3-Region innerhalb des V_H -Gens der schweren Immunglobulinketten identifiziert werden kann. Monoklonale Zellpopulationen ergeben mit dieser Methode eine distinkte Bande im Agarosegel, wohingegen bei polyklonalen Zellpopulationen ein breites Spektrum an unterschiedlich langen CDR3-Regionen nachgewiesen wird, welches im Gel als „Schmier“ sichtbar ist. Mit Hilfe der klonspezifischen CDR3-Region ist man anschließend in der Lage die gesamte V_H -Region des Tumors zu analysieren.

Im Vergleich zu früheren Untersuchung der tumorspezifischen V_H -Region von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen, die jeweils nur drei bis vier unterschiedliche Tumoren miteinander verglichen hatte (Qin, 1995; Du, 1996; Bahler, 1997; Qin, 1997), wurde hier erstmals eine umfangreichere Studie mit fünfzehn verschiedenen Patienten durchgeführt. Zudem handelte es sich bei zehn der untersuchten Fälle um gastrale MALT-Typ Lymphome.

3.1.6.1 Bestimmung der Klonalität der untersuchten niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome und Wahl der tumorspezifischen Primer

Von den fünfzehn niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen, bei denen mit Hilfe der PCR-Methode nach McCarthy (1990) die Klonalität bestimmt wurde, waren neun Fälle entsprechend der klassischen Tumordefinition monoklonal. Im Gegensatz dazu konnte man in zwei Lymphomen jeweils zwei distinkte, voneinander unabhängige Tumorklone anhand ihrer CDR3-Sequenz bestimmen. In beiden Fällen ist es unwahrscheinlich, daß es sich jeweils bei einer der identifizierten CDR3-Regionen um die des zweiten, nicht funktionellen und somit nicht exprimierten Allels handelte, da als Template-DNA in der PCR nicht genomische DNA sondern cDNA vom Tumor eingesetzt wurde.

Die Möglichkeit, daß Gesamt-RNA aufgrund

der gewählten Aufreinigungsmethode mit genomischer DNA verunreinigt war, konnte nicht ausgeschlossen werden. Hätte es sich jedoch tatsächlich um das zweite Allel gehandelt, so hätte man anschließend bei den dazugehörigen Tumor- V_H -Regionen nicht funktionell rearrangierte V_HNDNJ_H -Sequenzen erhalten müssen. Ausgehend von diesen Klonalitätsbestimmungen wurde für jedes Lymphom ein zur CDR3-Region komplementäres Oligonukleotid entworfen (Qin, 1995), mit dessen Hilfe es möglich war, in den nachfolgenden V_H -Gen-Analysen sich ausschließlich auf die Tumorsequenzen zu fokussieren.

In den vier untersuchten Fällen #4, #20, #21, #23 konnte eindeutig weder in der CDR3- noch in der V_H -Familien-PCR ein Tumorklon nachgewiesen werden. Vielmehr scheint es so, daß in diesen Fällen nicht der Tumor, sondern nur das den Tumor umgebende Entzündungsinfiltrat analysiert wurde. Dies würde auch das Vorhandensein von polyklonalen B-Zell-Populationen rechtfertigen. Ein Grund dafür könnte ein zu geringer Tumoranteil im Gegensatz zu den nicht-neoplastischen Zellen im verwendeten Gewebe sein. Dies würde bedeuten, daß der eigentliche Tumorklon von den polyklonalen B-Zell-Populationen des Entzündungsinfiltrats überlagert wurde. Da jedoch alle verwendeten Blöcke vorab mikroskopisch auf ausreichend vorhandenes Tumorgewebe hin untersucht wurden, ist dies grundsätzlich auszuschließen. Eine weitere Erklärung wäre eine mangelnde Sensitivität der angewandten CDR3-PCR. Obwohl es mit dieser Methode möglich sein sollte monoklonale B-Zell-Populationen nachzuweisen, auch wenn diese nur 2 - 5 % des untersuchten Zellgemisches ausmachen (McCarthy, 1990; Trainor, 1990), so besteht doch die Möglichkeit, daß unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen dies nicht realisiert werden konnte. Zudem könnte der eigentliche Tumoranteil in der untersuchten Probe, trotz mikroskopischer Voruntersuchung, unter 5% gelegen haben, da es rein morphologisch nicht möglich ist Tumor-B-Zellen und nicht-neoplastische B-Zellen, die eventuell am Aufbau der bekannten Tumorstruktur beteiligt sein könnten, zu unterscheiden. Eine dritte Möglichkeit wäre die fehlende Komplementarität des verwendeten V_H -Konsensusprimers, der für die CDR3-PCR eingesetzt wurde. Eventuell hybridisierte dieses Oligonukleotid, trotz seiner hohen Homologie (85 %) zu 95 % aller V_H -Gene, in den vier untersuchten Fällen nicht an die entsprechende Sequenz in der FR3-Region des Tumor- V_H -Gens. Diese mangelnde Komplementarität der verwendeten Primer könnte auch auf Mutationen in den entsprechenden Oligonukleotidbindungsstellen zurückzuführen sein. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß durch den somatischen Hypermutationsmechanismus, der sowohl in dieser als auch in früheren Arbeiten für MALT-Typ Lymphome beschrieben wurde (Qin, 1995; Du, 1996; Qin, 1997; Hallas, 1998), die Bindungsstellen der Primer verändert wurden. Eine weiter

Erklärung wäre der Verlust einer der beiden Primer

bindungsstellen aufgrund von Deletionen im Zusammenhang mit dem Mechanismus des VDJ-Rearrangements oder aber aufgrund von chromosomale Translokation, wie t(14;18) oder t(8;14), welche das Schwerekettenen betreffen würden. Dieser translokationsbedingte Sequenzverlust konnte aufgrund von cytogenetischen Untersuchungen am Nativgewebe ausgeschlossen werden (Ott, 1997). Da in den vier Fällen kein Tumorklon zu erkennen war, wurde das V_H-Gen-Repertoire des tumorassoziierten Entzündungsinfiltrats analysiert. Die V_H-Gen-PCRs wurden nicht mit einem tumorspezifischen Revers-Primer durchgeführt, sondern mit einem Primergemisch, welches komplementär zu einem hochkonservierten Abschnitt in der 5'-Region der sechs J_H-Gene war.

3.1.6.2 Analyse des tumorspezifischen V_H-Gen-Repertoires in mono- und biklonalen niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen

Bei acht von neuen monoklonalen sowie bei den beiden biklonalen Lymphomen erhielt man mit dem jeweiligen tumorspezifischen CDR3-Primer und mit je einem der V_H-Familienprimer (VH1 - VH6; Küppers, 1993) ein eindeutiges V_H-Gen. In einem der monoklonalen Fälle (#16) konnte mit dem Tumorprimer keine V_H-Gen-Sequenz identifiziert werden. Aufgrund dessen wurde er durch ein Oligonukleotidgemisch, welches komplementär zum 5'-Ende aller bekannten J_H-Gensegmente war (Küppers, 1993), ersetzt. Mit dieser Strategie konnte man auch hier ein dominantes V_H-Gen mit jeweils der gleichen CDR3-Region isolieren. Zwölf von dreizehn untersuchten V_H-Regionen waren funktionell rearrangiert. Fall #16 hingegen enthielt Leserastermutationen, die STOP-Codons zur Folge hatten und somit keine funktionelle schwere Immunglobulinkette hiervon exprimiert werden konnte.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der V_H-Regionanalyse nochmals zusammengefaßt. Deutlich zu erkennen ist, daß 38 % aller untersuchten mono- und biklonalen Lymphome ein V_H-Gen der Familie V_H1 oder V_H4 exprimiert wurde, wohingegen nur 15 % ein V_H3-Familiengen exprimierten. Obwohl es sich bei V_H3 um die Familie mit den meisten funktionellen V_H-Genen handelt, fand man in den niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen eine andere prozentuale Verteilung der exprimierten V_H-Familien als für CD5⁻/IgM⁺ B-Zellen beschrieben wurde, welche das normale Gegenstück zu den Tumorzellen darstellen (Brezinschek, 1997) (Abbildung 23). CD5⁻/IgM⁺ B-Zellen exprimieren hauptsächlich V_H3-Gene (53,9 %) und zu einem weitaus geringeren Anteil V_H4- (25 %) und V_H1-Gene (13 %) (Abbildung 23). Diese Expressionsunterschiede könnten eventuell auch auf die weitaus geringere Anzahl an untersuchten B-Zell-Klonen zurückzuführen sein. Jedoch zeigte sich auch in den

Arbeiten von Qin (1995) und Bahler (1997; 1998) eine deutliche Präferenz für die Verwendung eines V_{H1} -Gens.

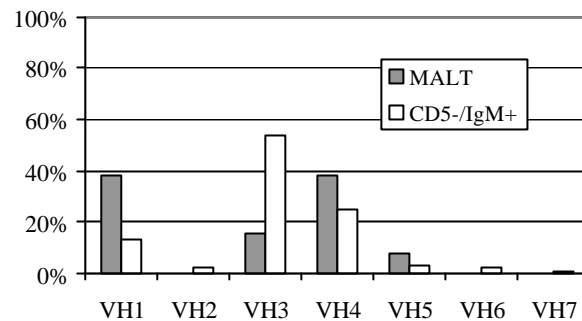


Abbildung 23: Häufigkeit der Verwendung der einzelnen V_{H} -Familien in MALT-Typ Lymphom-B-Zellen im Vergleich zu normalen Gedächtnis-B-Zellen des Menschen (CD5/IgM⁺).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der V_{H} -Regionanalysen

Fall	Klonalität	Primerpaare	V_{H} -Fam	V_{H} -Gen	D	J_H
#1	monoklonal	VH4-FOR x 1CDR3-1-REV	VH4	DP-63	D1-20	4
#3	monoklonal	VH4-FOR x 3CDR3-377-REV	VH4	DP-71	D2-2	6
#13	monoklonal	VH4-FOR x 13CDR3-13-REV	VH4	DP-71	???	6
#16	monoklonal	VH3-FOR x JH(1-5)+6-REV	VH3	3-49RBm	D2-2	6
#17	monoklonal	VH3-FOR x 17CDR3-662-REV	VH3	DP-50	D1-26	4
#18	monoklonal	VH1-FOR x 18CDR3-40-REV	VH1	DP-75	D3-16	4
#19	monoklonal	VH5-FOR x 19CDR3-482-REV	VH5	DP-73	(D3-16)*	4
#22	monoklonal	VH1-FOR x 22CDR3-1228-REV	VH1	DP-15	???	4
#24	monoklonal	VH1-FOR x 24CDR3-431-REV	VH1	DP-10	D6-19	6
#11	biklonal	VH1-FOR x 11CDR3-889-REV	VH1	DP-2	D3-9	5
		VH4-FOR x 11CDR3-911-REV	VH4	DP-65	D1	6
#14	biklonal	VH1-FOR x 14CDR3-550-REV	VH1	DP-14	D3-10	6
		VH4-FOR x 14CDR3-391-REV	VH4	DP-78	D5-12	4

???: D-Segment konnte nicht identifiziert werden; * D-Segment liegt in revers-komplementärer Orientierung vor; Identifizierung der D-Segmente erfolgte nach Corbett (1997);

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Bahler (1997; 1998), der in niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen der Speicheldrüsen, die mit dem Sjogrens Syndrom assoziiert waren, bevorzugt DP-10/51p1 und DP-88/7M27, zwei Gene der V_{H1} -Familie, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden, nachweisen konnte, zeigte sich bei den hier untersuchten hauptsächlich gastralen

niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen keine Präferenz für ein bestimmtes V_H -Gen innerhalb der einzelnen Familien. Im Fall #24, einem niedrig-malignen MALT-Typ Lymphom der Speicheldrüse wurde ebenfalls wie oben beschrieben DP-10 als Tumor- V_H -Gen identifiziert.

In den Fällen, in denen es möglich war die D-Region zu identifizieren, zeigte sich deutlich, daß die Auswahl des D-Gensegments in den untersuchten niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen offensichtlich rein zufällig erfolgte und keine Restriktion vorlag. Wie im Ergebnisteil schon erläutert wurde, konnten zwei D-Segmente nicht erkannt werden. Dies kann zum einen an einer starken Verkürzung des D-Segments und der Addition von N-Nukleotiden (TdT) während des Rekombinationsvorganges liegen, oder zum anderen an einem hohen Anteil an somatischen Mutationen innerhalb der CDR3-Region. Beide Mechanismen sind erfahrungsgemäß für die Diversifikation der Antikörpermoleküle verantwortlich.

Vergleicht man den J_H -Gebrauch der niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome mit dem von normalen $CD5^-/IgM^+$ Gedächtnis-B-Zellen, so sind deutliche Unterschiede zu erkennen (siehe Abbildung 24). Im Gegensatz zu den Gedächtnis-B-Zellen, die am häufigsten J_H4 (55 %) gefolgt von J_H6 (24 %) und J_H5 (10 %) exprimieren (Brezinschek, 1997), sind in den untersuchten Tumoren die beiden Familien J_H4 und J_H6 gleich stark vertreten. J_H1 , J_H2 und J_H3 wurden nicht verwendet. Bei den Untersuchungen von Du (1996) an niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen wurden ebenfalls nur J_H -Segmente der Familien 4, 5 und 6 identifiziert. Auch bei den Fällen von Qin (1995) wurde in drei von vier untersuchten niedrig-malignen Lymphomen ein J_H4 -Gen verwendet. Jedoch wurde hier auch die Verwendung von J_H3 beobachtet.

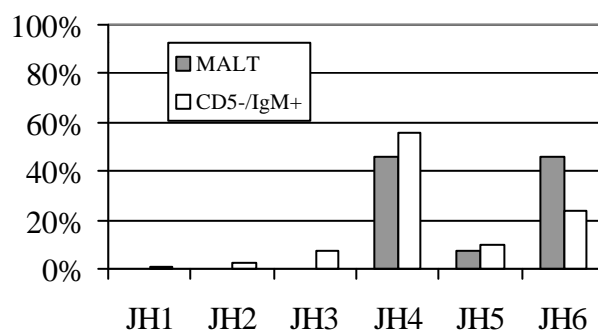


Abbildung 24: Häufigkeit der Verwendung der einzelnen J_H -Familien in MALT-Typ Lymphom-B-Zellen im Vergleich zu normalen Gedächtnis-B-Zellen des Menschen ($CD5^-/IgM^+$).

3.1.6.3 Analyse des V_H-Gen-Repertoires des polyklonalen Entzündungsinfiltrats bei MALT-Typ Lymphomen

Die hier durchgeführten Untersuchungen zum V_H-Gen-Repertoire des Entzündungsinfiltrats neoplastischer Magenerkrankungen sind in dieser Form völlig neu. Jüngste Daten über das B-Zell-Repertoire in Milzresektaten bei Magenkarzinompatienten deuten auf eine V_H-Restriktion mit einer Präferenz für V_{H3}-Gene hin, die jedoch zumeist in Keimbahnkonfiguration vorliegen (Hensel, 1999). Im Gegensatz hierzu ergab sich im entzündlichen Gewebe der Magenschleimhaut bei MALT-Typ Patienten ein ganz anders Bild. Mit Hilfe ganz unterschiedlicher PCR-Ansätze konnte in keinem der vier untersuchten Fälle (#4, #20, #21, #23) ein monoklonales Infiltrat, als Hinweis auf ein Lymphom nachgewiesen werden. Dabei wurde für die Amplifikation der CDR3-Region nicht nur die hier verwendeten Oligonukleotide nach McCarthy (1990) getestet, sondern auch die von Trainor beschriebenen Primer (1991) (persönliche Mitteilung Dr. Starostik), die ebenfalls ein negatives Ergebnis erbrachten. Auch der Versuch das monoklonale Infiltrat mit Hilfe von V_H-familienspezifischen PCRs (Küppers, 1993) nachzuweisen, blieb ohne Erfolg, obwohl die verwendeten Oligonukleotide in konservierten Regionen der FR1- und J_H-Region lokalisiert waren. Betrachtet man die V_H-Expression in den polyklonalen Entzündungsinfiltraten, so läßt sich schon an der Anzahl der nachgewiesenen V_H-Familien ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Patienten erkennen. Auffällig dabei ist die Tatsache, daß sowohl in Fall #21 wie #23 die Familie V_{H3}, obwohl sie mit Abstand die größte V_H-Familie darstellt (siehe Tabelle 6), nur jeweils durch zwei (#21) und drei (#23) unterschiedliche V_H-Gene vertreten war. Im Vergleich dazu wurde in den Fällen #20 und #4 jeweils ein breites Spektrum an unterschiedlichen V_{H3}-Segmenten verwendet. Sowohl bei Fall #21 als auch bei Fall #23 fand man die beiden V_{H3}-Gene DP-47 und DP-49, die auch in normalen Gedächtnis-B-Zellen den größten Anteil des verwendeten V_H-Repertoires ausmachen (siehe Tabelle 7). Interessanterweise zeigte sich in beiden Fällen innerhalb der V_{H3}-Familie mit 83 % (#21) und 66,7 % (#23) eine deutliche Dominanz von DP-47 (#21) und V_{H3}-11 (#23). Obwohl ein breites Spektrum an V_H-Familie nachgewiesen werden konnte, scheint innerhalb des Entzündungsinfiltrats eine gewisse V_{H3}-Genrestriktion vorzuliegen. Ein komplett anderes Bild zeigte sich bei Fall #4. Im Gegensatz zu den Fällen #20, #21 und #23, bei denen V_H-Gene aus drei bis fünf unterschiedlichen V_H-Familien nachgewiesen wurden, fand man im Entzündungsinfiltrat von Fall #4 nur V_{H3}-Gene. Hier scheint trotz

Polyklonalität, aus bisher noch unbekanntem Gründen, eine V_H -Familienrestriktion vorzuliegen. Vergleicht man die einzelnen V_H -Gene und ihre Expression innerhalb der V_{H3} -Familie, so war keine Dominanz eines einzelnen V_H -Gens, sondern ein breites Spektrum an unterschiedlichen V_{H3} -Familienmitgliedern, wie es im Vergleich mit normalen $CD5^-/IgM^+$ Gedächtnis-B-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten (Brezinschek, 1997) bereits beschrieben wurde, zu erkennen (siehe Tabelle 7). Es zeigte sich jedoch auch, daß V_H -Gene, die im normalen Repertoire weniger als 3,9 % ausmachten, in diesem Fall stärker oder gleich stark vertreten waren. Aufgrund der absoluten Überrepräsentanz bestimmter V_H -Gene (wie DP-54 oder DP-47) aus der V_{H3} -Familie, die sowohl bei hoch-malignen MALT-Typ Lymphomen (Hallas, 1998) als auch bei anderen Lymphomtypen (insbesondere B-CLL) beschrieben wurden (Jain, 1994; Tamaru, 1995; Chapman, 1996), wäre es interessant die Bindungsspezifität der Antikörper zu untersuchen, da es sich bekanntermaßen oftmals um autoreaktive Antikörper handelt (Greiner, 1998).

Tabelle 6: Anzahl der verwendeten funktionellen V_H -Gensegmente im Entzündungsinfiltrat von MALT-Typ Lymphomen

	V_{H1}	V_{H2}	V_{H3}	V_{H4}	V_{H5}	V_{H6}
Anzahl an bekannten funktionellen V_H -Genen	11	3	22	11	2	1
Fall #4	—	—	8	—	—	—
Fall #20	—	—	9	6	2	—
Fall #21	6	2	2	—	1	1
Fall #23	8	—	3	9	2	—

Tabelle 7: Die am häufigsten verwendeten V_H-Gene in normalen CD5⁺/IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen

V_H-Gen-Segment (V_H-Familie)	normale CD5⁺/IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen
DP-47 (V _H 3)	12,1 %
DP-71 (V _H 4)	7,8 %
DP-49 (V _H 3)	5,8 %
DP-54 (V _H 3)	5,8 %
DP-79 (V _H 4)	5,8 %
DP-46 (V _H 3)	4,9 %
DP-14 (V _H 1)	4,9 %
DP-58 (V _H 3)	4,4 %
DP-63 (V _H 4)	3,9 %

nach (Brezinschek, 1997)

3.1.6.4 Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Tumorzellen von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen anhand von Mutationsanalysen der tumorspezifischen V_H-Region

Anhand von Analysen der rearrangierten variablen Region der schweren Immunglobulinketten der Tumor-B-Zellen erhält man Einblicke und Hinweise auf den Ursprung der untersuchten Neoplasien. Man ist somit in der Lage, anhand der Art der vorhandenen oder nicht vorhandenen V_H-Mutationen, jenes B-Zell-Stadium zu bestimmen, innerhalb dessen die Transformation von der normalen zur neoplastischen B-Zelle stattgefunden haben müßte (siehe Abbildung 25) (Klein, 1998). So ist zum Beispiel die Anhäufung von somatischen Mutationen in den V_H-Genen ein Hinweis darauf, daß die jeweilige Zelle dem Hypermutationsmechanismus des Keimzentrums ausgesetzt war, somit also in das Keimzentrum eingetreten sein mußte oder es schon passiert hatte (Berek, 1991; Rajewsky, 1996). Das Vorhandensein von intraklonalen Variationen bietet zusätzlich die Möglichkeit zwischen Keimzentrums-B-Zellen, die aufgrund des noch immer aktiven Mutationsmechanismus sogenannte „ongoing mutations“ aufweisen und Postkeimzentrums-B-Zellen (Gedächtnis-B-Zelle oder Plasmazelle) zu unterscheiden (Küppers, 1993). Findet man hingegen keine Mutationen im Vergleich zur Keimbahnsequenz, so muß es sich um Neoplasien von Prä-Keimzentrumszellen (z. B. naive B-

Zellen) handeln, wie es bei einer Untergruppe von B-CLLs der Fall ist (Klein, 1998; Damle, 1999; Hamblin, 1999; Naylor, 1999).

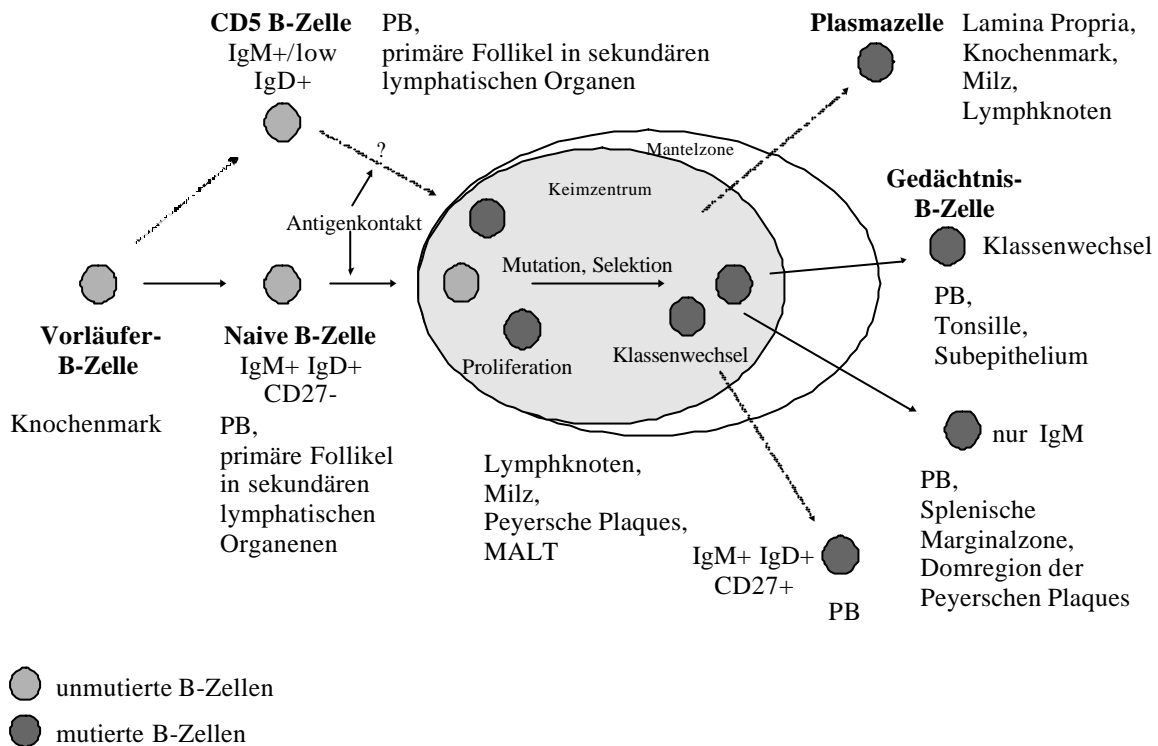


Abbildung 25: Definition der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von B-Zellen und deren Lokalisation im menschlichen Körper anhand von Mutationsanalysen der V_H -Gen-Sequenzen. Die gestrichelten Differenzierungswege sind rein hypothetischer Natur. Abbildung in Anlehnung an Klein et al (1998). PB: peripheres Blut.

In der vorliegenden Arbeit wurden an acht mono- und zwei biklonalen niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen Mutationsanalysen in den V_H -Regionen der Tumor-B-Zellen durchgeführt, um Hinweise auf die möglichen normalen Vorläuferzellen dieses Lymphomtyps zu erhalten. Zusätzlich erwartete man neue Erkenntnisse darüber, welchen Einfluß eventuell vorhandenes Antigen auf die Krankheitsentstehung und deren weiteren Verlauf haben könnte. In allen untersuchten Fällen wurden funktionelle und gleichzeitig hypermutierte V_H -Gene identifiziert, deren durchschnittliche Mutationsfrequenz mit 9,9 % (Abbildung 17) weitaus höher war, als die von Klein (1998) anhand der bis dahin veröffentlichten Daten (Qin, 1995; Du, 1996; Bahler, 1997) berechnete Durchschnittsfrequenz von 4,3 %. Berücksichtigt man bei den Berechnungen nun auch die hier vorliegenden neuen Daten, so erhält man eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von 7,1 %.

Obwohl in allen untersuchten Fällen die Tumor-B-Zellen phänotypisch Marginalzonen-B-Zellen/Gedächtnis-B-Zellen entsprachen, zeigte sich schon anhand der Schwankungsbreite der einzelnen Mutationsfrequenzen, daß es sich bei den B-Zell-Lymphomen des MALT-Typs

genotypisch um eine weitaus heterogenere Gruppe handeln mußte, als zu Beginn der Untersuchungen erwartet wurde (Qin, 1995; Du, 1996). Deutlich zu erkennen ist, daß sich die mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphome in zwei große Gruppen unterteilen lassen. Auf der einen Seite stehen die Lymphom-B-Zellen mit einheitlichen Mutationsmustern (#1, #3, #17, #18, #22, #11V_H1, #11V_H4, #14V_H4) innerhalb aller untersuchten Tumorsequenzen und auf der anderen Seite die Fälle (#13, #19, #24, #14V_H1), deren Tumorsequenzen sogenannte „ongoing mutations“, im Vergleich mit der abgeleiteten Aminosäuresequenzen, aufwiesen. Der Nachweis von „ongoing mutations“ deutet auf einen Antigen- und Keimzentrumsmilieu-assoziierten Entwicklungsprozeß der niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome hin. Dieser Prozeß kann direkt in den reaktiven Follikeln des Entzündungsinfiltrats ablaufen, wofür der rein morphologische Befund der sogenannten follikulären Kolonisierung (Keimzentrumsdestruktion) sprechen würde. Ob dieser Prozeß nur in den Keimzentren und im Verlaufe der Tumorprogression abläuft, ist bislang noch unklar.

Neben der Bestimmung des Differenzierungszustandes der Tumor-B-Zellen wurde auch die Frage nach eventuell beteiligter positiver Antigenselektion an der Entstehung der Tumoren bearbeitet. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte nur in einem Fall (#13) der Einfluß von positiver Antigenselektion anhand des Mutationsmusters der variablen Region der V_H-Kette nachgewiesen werden. Alle anderen Fälle zeigten entweder eine rein zufällige Verteilung der Mutationen oder aber die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

Die hier beschriebenen Mutationsmuster sind vergleichbar mit den bislang publizierten Daten von einzelnen ausgewählten Fällen von MALT-Typ Lymphomen aus ganz unterschiedlichen Regionen (Qin, 1995; Du, 1996; Bahler, 1997; Qin, 1997; Bahler, 1998; Hallas, 1998; Tierens, 1998). Dennoch wurden die Mutationsmuster von den Autoren unterschiedlich interpretiert. So konnte Qin (1995) an vier gastralen niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen aufgrund von statistischen Berechnungen nach Jukes (1979) eine positive Antigenselektion nachweisen, wohingegen Bahler (1997; Bahler, 1998) bei MALT-Typ Lymphomen der Speicheldrüse, mit den gleichen statistischen Methoden diese Ergebnisse nicht bestätigen konnte. Aufgrund neuerer Erkenntnisse bei der Mutationsanalyse von Chang und Casali (Chang, 1994), die die Veranlagung bestimmter Codons für Replacement-Mutationen berücksichtigten, wurden die hier erhaltenen Daten nach diesem neueren statistischen Verfahren ausgewertet. Mit der gleichen Bewertungsmethode konnten auch Hallas (1998) und Tierens (1998) bei unterschiedlichen MALT-Lymphomen keine eindeutige Antigenselektion nachweisen. Da jedoch in allen bisher veröffentlichten Fällen nahezu vergleichbare Mutationsmustern beschrieben wurden, scheint es sich bei der Beantwortung der Frage nach

positiver Antigenselektion, vor allem um ein Problem der statistischen Auswertung und der nachfolgenden Interpretation der Ergebnisse zu handeln.

3.2 Charakterisierung des Mikromilieus bei malignen MALT-Typ Lymphomen *in vivo*

3.2.1 Bestimmung der Menge an tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TITL) *in vivo*

Aus dem operativ entfernten Organ wurden die makroskopisch sichtbaren Tumoren präparativ entfernt und es wurde nach der unter 5.2.3.4 beschriebenen Methode eine Tumorzellsuspension hergestellt. Mit den erhaltenen Zellen wurden anschließend Dreifach-FACS-Färbungen und -Analysen durchgeführt. Mit Hilfe von direkt gekoppelten fluoreszierenden Antikörpern gegen die B- und T-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküle CD19 und CD3, wurde zuerst der Prozentsatz an Tumor-B-Zellen und tumorinfiltrierenden T-Zellen (TITL) in der vorhandenen Zellsuspension bestimmt, um so Aufschluß über die Zusammensetzung des Tumors zu erhalten. Parallel dazu wurde durch Dreifachfärbung mit CD3-, CD4- und CD8-Antikörpern (siehe 5.2.3.11.1) innerhalb der TITLs subtypisiert, um die T_H -Population ($CD3^+CD4^+$) zu identifizieren. Untersucht wurden zehn niedrig-maligne (Fall #1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 15) und vier (Fall #6, 7, 8, 9) hoch-maligne MALT-Typ Lymphome sowie ein Fall mit follikulärer *H. pylori*-assoziiertes Gastritis (Fall #12) als Kontrolle. Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, lag der Anteil an Tumor-B-Zellen bei den niedrig-malignen B-Zell-Lymphomen zwischen 49 % und 89 %, mit einem Durchschnittswert von 74 %. Mit durchschnittlich 26 % konnte ebenfalls eine große Anzahl an $CD3^+$ -positiven TITLs nachgewiesen werden. Bei den hoch-malignen B-Zell-Lymphomen fand man im Durchschnitt 68 % (46 % bis 91 %) an Tumor-B-Zellen und 32 % (9 % bis 54 %) an TITLs. Das Kontrollgewebe setzte sich aus 38 % B-Zellen und 62 % T-Lymphozyten zusammen. Innerhalb der T-Zell-Populationen der niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome fand sich ein hohes durchschnittliches CD4/CD8-Verhältnis von 3,3, verglichen mit einem Verhältnis von 2,0 bei normalen PBLs. Im Gegensatz dazu war das Verhältnis von $CD4^+$ und $CD8^+$ TITLs bei hoch-malignen Lymphomen im Mittel ausgeglichen (CD4/CD8: 1,2) und vergleichbar mit dem der Gastritis (1,3).

Tabelle 8: Bestimmung der Menge an TITLs und deren Charakterisierung bei niedrig- und hoch-malignen MALT-Typ Lymphomen

Fall	%CD19	%CD3	%CD4	%CD8
#1	68	32	26	6
#2	75	25	20	5
#3	87	13	10	3
#4	74	26	18	8
#5	72	28	18	10
#10	89	11	10	1
#11	49	51	42	9
#13	84	16	13	3
#14	63	37	25	12
#15	80	20	18	2
#12	38	62	22	16
#6	62	38	18	20
#7	91	9	4	5
#8	46	54	38	16
#9	74	26	9	18

3.2.2 Bestimmung des Aktivierungszustandes der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten *in vivo*

In Abschnitt 2.2.1 der Einleitung wurde bereits erläutert, daß sich der Tumor und das dazugehörige sekundäre MALT aufgrund von Antigenstimulation und der damit verbundenen Immunreaktion entwickeln und propagiert werden. Dies würde für die tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten bedeuten, daß sie aktiv an der Tumorentwicklung beteiligt sind. Aufgrund dessen sollte die Frage nach dem Aktivierungszustand der TITLs beantwortet werden. Hierzu wurde mit Dreifarben-FACS-Färbungen und -Analysen die Expression der beiden Oberflächenmoleküle CD69 und CD28 auf den TITLs (CD3⁺) untersucht. Dabei handelt es sich bei CD69 um einen Marker, der etwa 0,5 - 2 h nach der Aktivierung der T-Zelle auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Janeway, 1997). Bei CD28 hingegen ist bekannt, daß es sich um den Oberflächenrezeptor auf T-Zellen für die unter 2.1.2.1

beschriebenen B7-Liganden handelt. Die Expression von CD28 ist somit eine essentielle Voraussetzung für eine erfolgreiche B-Zell-Aktivierung.

Wie in Abbildung 26A und B deutlich zu erkennen ist, exprimierten sowohl die TITLs der niedrig- ($n = 10$) als auch der hoch-malignen ($n = 4$) Lymphome, im Vergleich zu den PBL-T-Zellen derselben Patienten, signifikant mehr CD69. Ebenso wurde in allen untersuchten Lymphomen eine weitaus höhere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD28 gemessen als bei den Kontroll-T-Zellen. Obwohl eine höhere Expressionsrate für beide untersuchten Marker jeweils in den niedrig-malignen verglichen mit den hoch-malignen Lymphomen festgestellt werden konnte, war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, daß die TITLs von niedrig- und hoch-malignen MALT-Typ Lymphomen sich in einem aktivierten Zustand ($CD69^+$) befanden und zudem immunkompetent ($CD28^+$) waren.

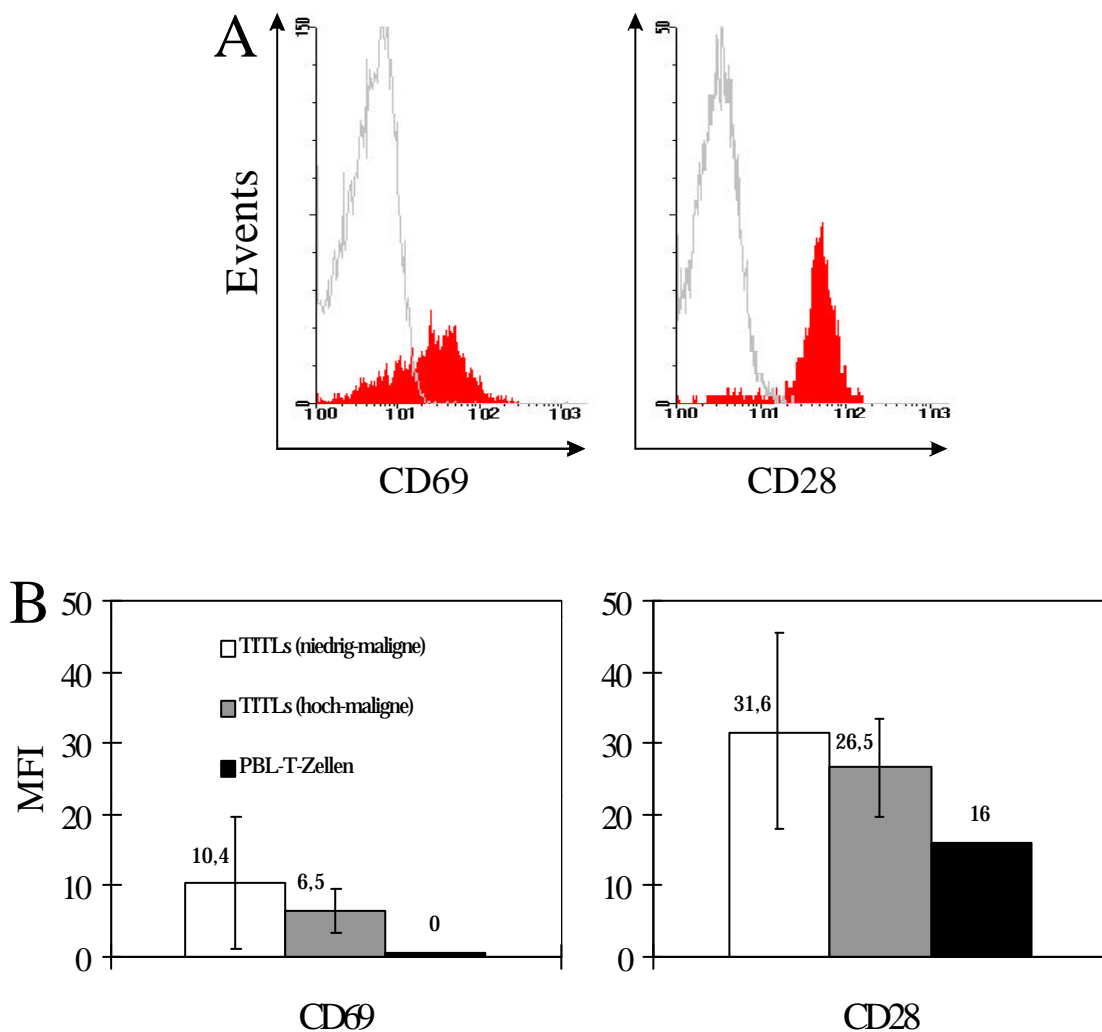


Abbildung 26: Expressionsnachweis von CD69 und CD28 auf TITLs von niedrig- und hoch-malignen MALT-Typ Lymphomen. A: Charakteristische FACS-Histogramme für die Expression von CD69 und CD28 von TITLs am Beispiel des niedrig-malignen MALT-Typ Lymphoms Fall #5. B: Darstellung der durchschnittlichen CD69- und

CD28-Expression anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) aller untersuchten Fälle. Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung.

3.2.3 Untersuchungen zur Expression von kooperierenden Molekülen zwischen Tumor-B-Zellen und tumorinfiltrierenden T-Zellen *in vivo* und *in vitro*

Nachdem gezeigt wurde, daß die untersuchten TITLs von niedrig- und hoch-malignen MALT-Typ Lymphomen sowohl aktiviert als auch immunkompetent waren, sollte geklärt werden, ob die Zellen ebenfalls über die für die T/B-Zell-Interaktionen essentiellen Oberflächenmoleküle CD40-Ligand und Fas-Ligand verfügen. Wie in den Abschnitten 2.1.2.1 und 2.1.2.2 bereits beschrieben wurde, übernimmt das Molekül CD40-Ligand eine Schlüsselfunktion bei der T- und B-Zell-Aktivierung zum Beginn der humoralen Immunantwort (Kontrollpunkt 1), aber auch bei der abschließenden Kontrollselektion der antigenspezifischen B-Zellen im Keimzentrum (Kontrollpunkt 3). Neben dem CD40-Liganden spielt an dieser Stelle auch das Fas-Ligand-Molekül eine wichtige Rolle. Es ist dafür verantwortlich, daß all die B-Zellen durch Fas/Fas-Ligand Interaktionen in Apoptose übergehen, die das Antigen nicht oder nicht mehr erkennen oder aber autoreaktiv sind.

3.2.3.1 Nachweis der Expression von CD40-Ligand im Tumorgewebe *in vivo*

3.2.3.1.1 Nachweis der mRNA-Expression von CD40-Ligand

Von allen untersuchten Tumoren (Tabelle 8) wurde aus Gefriermaterial Gesamt-RNA isoliert, diese mittels reverser Transkription (Oligo-dT- und Random-Hexamer-Primer) in cDNA umgeschrieben und damit eine semiquantitative RT-PCR mit CD40-Ligand-spezifischen Oligonukleotiden (huCD40-L-FOR1.1 x huCD40-L-REV) durchgeführt. Alle verwendeten cDNAs wurden zu Beginn anhand des GAPDH-Amplifikats auf gleiche Ausgangskonzentration eingestellt (siehe 5.2.1.14). Die beiden CD40-Ligand-Primer waren so ausgewählt worden, daß sie nur cDNA-Sequenzen, nicht aber genomische Sequenzen erkennen und amplifizieren konnten. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 1,5 mM MgCl₂ und folgenden Zyklen durchgeführt: 94°C, 1 min; (94°C, 15 s / 60°C, 15 s / 72°C, 30 s) x 40; 72°C, 2 min; 4°C, ∞; Tube Control. Acht von zehn niedrig-malignen Lymphomen waren deutlich positiv für CD40-Ligand mRNA (siehe Abbildung 27), wohingegen in zwei Fällen (Fall #1, #3) keine mRNA nachgewiesen werden konnte. Ebenso waren drei der hoch-malignen Tumoren für CD40-Ligand mRNA negativ. Bei Fall #8 konnte eine

schwache Bande im Agarosegel identifiziert werden. Die Kontrollgastritis (Fall #12) war ebenfalls positiv.

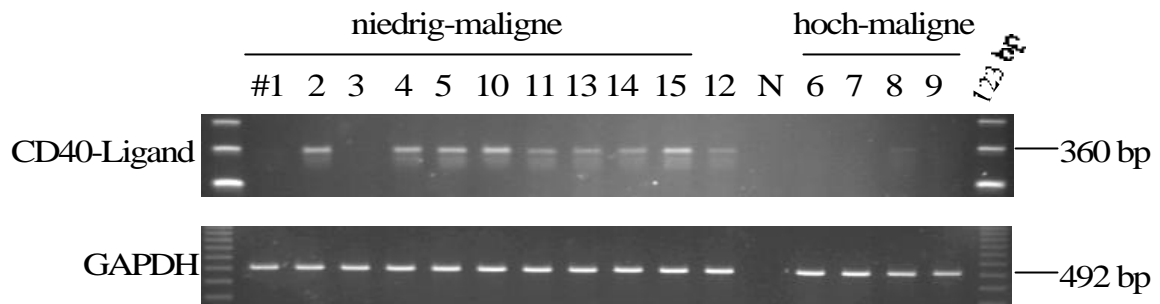
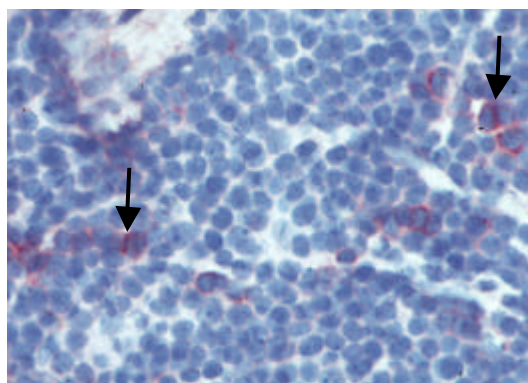


Abbildung 27: RT-PCR-Nachweis von CD40-Ligand mRNA im Tumorgewebe. Die Proben wurden auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die GAPDH-PCR diente als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR. N: Negativkontrolle.

3.2.3.1.2 Nachweis der Proteinexpression von CD40-Ligand

Der Nachweis der Proteinexpression wurde bei allen Fällen mit immunhistochemischer Färbungen von Gefrierschnitten erbracht. Im Gegensatz zur Methode des Western-Blots, weist man hier das gesuchte Protein mit Hilfe eines Antikörpers in seiner physiologischen Form auf der Zelloberfläche nach und erhält gleichzeitig Hinweise über das Expressionsmuster innerhalb des untersuchten Gewebes. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen entsprachen denen der mRNA-Expression des CD40-Liganden. In Abbildung 28, am Beispiel des niedrig-malignen MALT-Typ Lymphoms Fall #10, ist eine deutliche Markierung des auf der Zelloberfläche exprimierten CD40-Ligand-Proteins zu sehen. In den vier hoch-malignen Lymphomen konnte keine



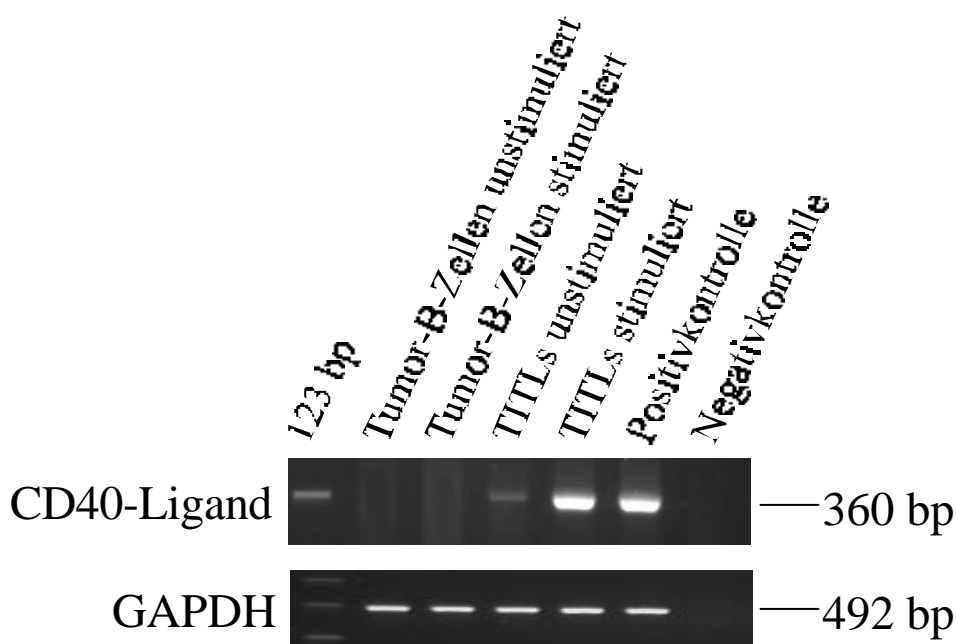
Proteinexpression nachgewiesen werden.

Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis der Proteinexpression von CD40-Ligand im Tumorgewebe. Die Pfeile markieren CD40-Ligand-positive Zellen. Es handelt sich hierbei um ein APAAP-Färbung des Falls #10 im Gefrierschnitt. Die Vergrößerung ist 250-fach.

3.2.3.2 Nachweis der mRNA-Expression von CD40-Ligand in tumorinfiltrierenden T-Zellen *in vitro*

Da in den vorangegangenen Untersuchungen die CD40-Ligand mRNA-Expression im Gesamttumor untersucht worden war, sollte nun mit Hilfe von *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden, daß die detektierte CD40-Ligand mRNA von den TITLs stammte und nicht von den Tumor-B-Zellen, wie es im Falle von Grammer (1995) beschrieben wurde. Hierzu wurden die durch Zelldepletion aufgereinigten Tumor-B-Zellen und TITLs, wie unter 5.2.3.9 beschrieben für 6 h mit Ionomycin und TPA stimuliert. Anschließend wurde Gesamt-RNA in cDNA mit Oligo-dT- und Random-Hexamer-Primer umgeschrieben und die bereits beschriebene CD40-Ligand-spezifische semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Als Kontrollen wurden sowohl die Tumor-B-Zellen als auch die TITLs für 6 h ohne Stimulanzien kultiviert. In Abbildung 29 ist deutlich zu erkennen, daß die TITLs sowohl im unstimulierten wie im stimulierten Zustand CD40-Ligand mRNA exprimierten. Im Gegensatz dazu waren die Tumor-B-Zellen, auch nach starker *in vitro*-Stimulation, nicht in der Lage CD40-Ligand mRNA zu synthetisieren. Dies ist ein eindeutiger Hinweis, daß die im Tumor nachgewiesene CD40-Ligand mRNA und Proteinexpression von den TITLs stammte und nicht von den Tumor-B-Zellen.

Abbildung 29: RT-PCR-Nachweis der CD40-Ligand mRNA-Expression in TITLs (Fall #13). Die Banden wurden in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die GAPDH-PCR diente als Mengenstandard für die semi-quantitative RT-



PCR. Als Positivkontrolle wurde cDNA von stimulierten PBLs verwendet.

Als zusätzlicher Nachweis, daß die untersuchten Tumor-B-Zellen kein CD40-Ligand-Protein exprimierten, wurde Gesamtprotein isoliert, über ein SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes CD40-Ligand-Protein hybridisiert und mit dem ECL-System entwickelt. Der Western-Blot in Abbildung 30 zeigt deutlich, daß nur im Falle der Positivkontrollen (Spur 1, 2, 7, 8) eine spezifische Bande für CD40-Ligand von 39 kDa zu erkennen war. Normale Gedächtnis-B-Zellen aus einer Tonsille sowie aufgereinigte Tumor-B-Zellen zeigten weder vor noch nach Stimulation mit Ionomycin und TPA CD40-Ligand-Expression.

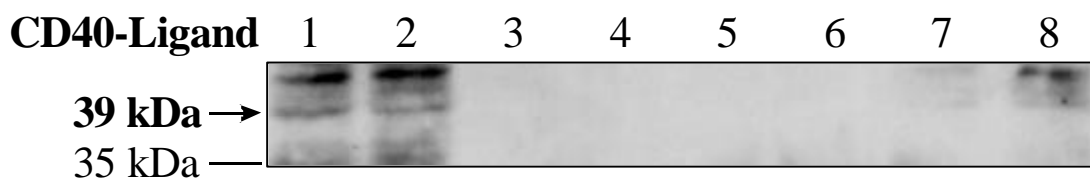


Abbildung 30: Western-Blot-Analyse zur Proteinexpression von CD40-Ligand in Tumor-B-Zellen Spur 1 + 2: Positivkontrolle, humane T-Zelllinie C8166 unstimuliert und stimuliert mit Ionomycin/TPA. Spur 3 + 4: normale Memory-B-Zellen unstimuliert und stimuliert. Spur 5 + 6: Tumor-B-Zellen unstimuliert und stimuliert (#13). Spur 7 + 8: humane T-Zelllinie Jurkat unstimuliert und stimuliert. In jeder Spur wurden jeweils 30 µl eines Gesamtproteinaufschlusses aus je 1×10^6 Zellen in 100 µl Laemmli Puffer aufgetragen. Die Proben wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel analysiert.

3.2.3.3 Nachweis der Expression von Fas-Ligand im Tumorgewebe *in vivo*

3.2.3.3.1 Nachweis der mRNA-Expression von Fas-Ligand

Der Nachweis von Fas-Ligand mRNA erfolgte nach der gleichen semiquantitativen RT-PCR-Methode wie bei CD40-Ligand. Die verwendeten Fas-Ligand-spezifischen Oligonukleotide (huFas-L-E1-FOR x huFas-L-E4-REV) waren ebenfalls so ausgewählt worden, daß nur cDNA-Sequenzen damit amplifiziert werden konnten. Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl mit 1,5 mM MgCl₂ und folgenden Zyklen durchgeführt: 94°C, 1 min; (94°C, 15 s / 62°C, 15 s / 72°C, 30 s) x 40; 72°C, 2 min; 4°C, ∞; Tube Control. Wie in der Abbildung 31 deutlich zu erkennen ist, waren acht von zehn niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen positiv für Fas-Ligand mRNA, unterschieden sich jedoch sichtbar in der Stärke ihrer Expression. Im Falle der hoch-malignen Lymphome exprimierten 75 % der untersuchten Tumoren Fas-Ligand mRNA. Bei der Kontrollgastritis konnte keine Fas-Ligand cDNA in der RT-PCR nachgewiesen werden.

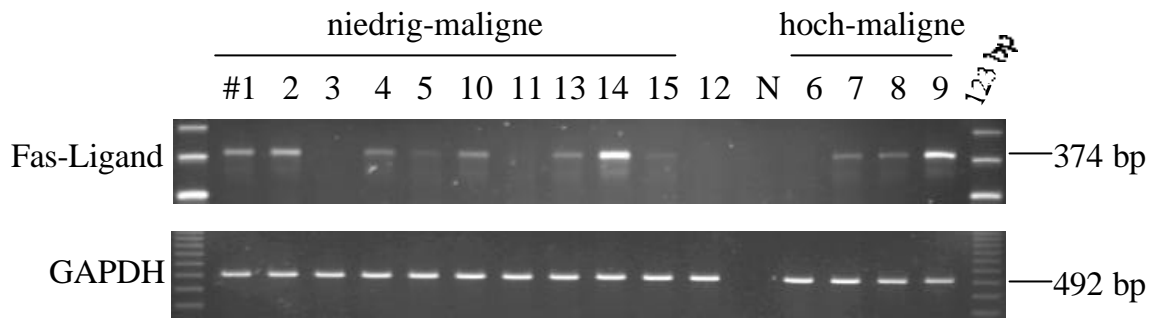
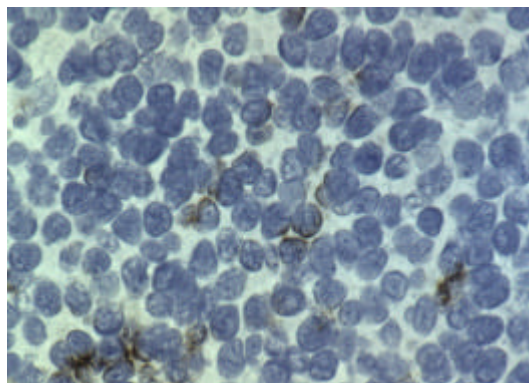


Abbildung 31: RT-PCR-Nachweis von Fas-Ligand mRNA im Tumorgewebe. Die Proben wurden auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die GAPDH-PCR diente als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR. N: Negativkontrolle

3.2.3.3.2 Nachweis der Proteinexpression von Fas-Ligand

Parallel zu dem Nachweis von exprimierter Fas-Ligand mRNA mit Hilfe von RT-PCR-Analysen, wurde die Proteinexpression bei allen Fällen immunhistochemisch bestimmt. Hier korrelierte ebenfalls die Expression von Fas-Ligand mRNA mit der Proteinexpression. Am Beispiel des Falles #10 sind deutlich braungefärbte Fas-Ligand-spezifische Signale auf den Zelloberflächen zu erkennen



(Abbildung 32).

Abbildung 32: Immunhistochemischer Nachweis der Proteinexpression von Fas-Ligand im Tumorgewebe. Die Pfeile markieren Fas-Ligand-positive Zellen. Es handelt sich hierbei um ein PAP-Färbung des Falls #10 im Gefrierschnitt. Die Vergrößerung ist 400-fach.



3.2.3.4 Nachweis der mRNA-Expression von Fas-Ligand in tumorinfiltrierenden T-Zellen *in vitro*

Da auch im Falle des Fas-Ligands die mRNA-Expression im Gesamttumorgewebe bestimmt wurde, sollte auch hier wie bei den Untersuchungen zur Expression des CD40-Ligands, *in vitro* nachgewiesen werden, daß die Fas-Ligand mRNA von TITLs, nicht aber von Tumor-B-Zellen, synthetisiert worden waren. Hierzu wurden die durch Zelldepletion aufgereinigten Tumor-B-Zellen und TITLs, wie unter 5.2.3.9 beschrieben für 6 h mit Ionomycin und TPA stimuliert. Anschließend wurde Gesamt-RNA in cDNA mit Oligo-dT- und Random-Hexamer-Primer umgeschrieben und die Fas-Ligand-spezifische semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Als Kontrollen wurden sowohl die Tumor-B-Zellen als auch die TITLs für 6 h ohne Stimulanzien kultiviert. Verglichen mit der Expression des CD40-Liganden, ist auch hier deutlich zu sehen, daß die Tumor-B-Zellen auch nach *in vitro*-Stimulation nicht in der Lage waren Fas-Ligand mRNA zu exprimieren. Im Gegensatz dazu exprimierten die stimulierten TITLs mRNA, aber in geringeren Mengen als im Falle des CD40-Ligands. Jedoch geht auch aus diesen Versuchen eindeutig hervor, daß die TITLs, nicht aber die Tumor-B-Zellen Fas-Ligand mRNA synthetisieren konnten.

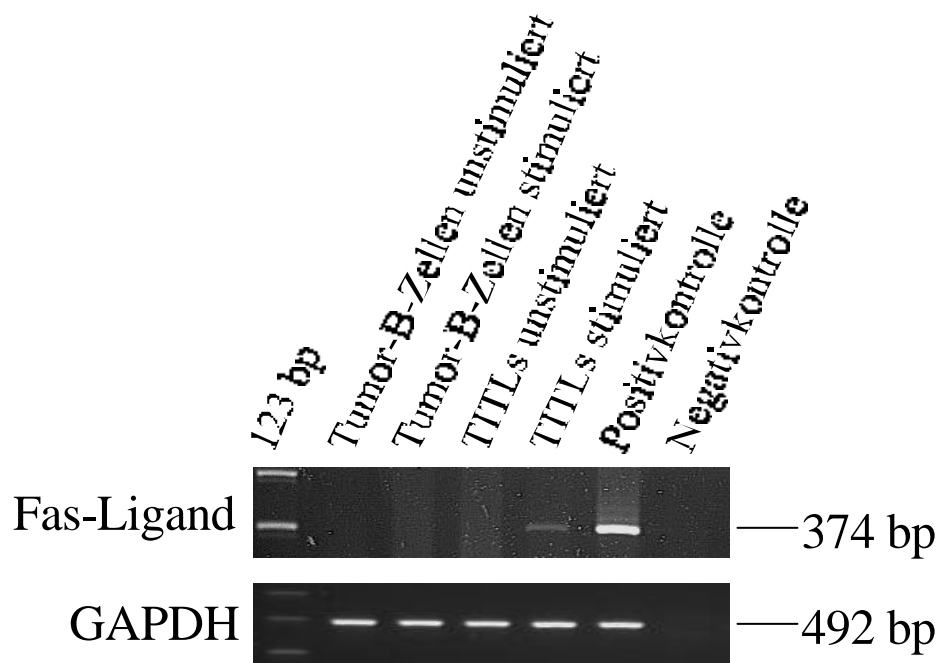


Abbildung 33: RT-PCR-Nachweis der Fas-Ligand mRNA-Expression in TITLs (Fall #13). Die Banden wurden in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die GAPDH-PCR diente als Mengenstandard für die semi-quantitative RT-PCR. Als Positivkontrolle wurde cDNA von stimulierten PBLs verwendet.

Als zusätzlicher Nachweis, daß die untersuchten Tumor-B-Zellen kein Fas-Ligand-Protein exprimierten, wurde Gesamtprotein isoliert, über ein SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. Die Membran wurde anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes Fas-Ligand-Protein hybridisiert und mit dem ECL-System entwickelt. Der Western-Blot in Abbildung 34 zeigt deutlich, daß nur im Falle der stimulierten Positivkontrolle (Spur 2) eine spezifische Bande für Fas-Ligand von 40 kDa zu erkennen war. Normale Gedächtnis-B-Zellen aus einer Tonsille sowie aufgereinigte Tumor-B-Zellen zeigten weder vor noch nach Stimulation mit Ionomycin und TPA Fas-Ligand-Expression. Ebenso waren die unstimulierten und stimulierten Jurkat-Zellen negativ für das gesuchte Protein.

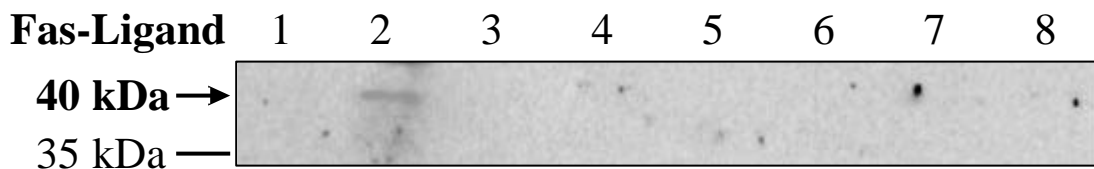


Abbildung 34: Western-Blot-Analyse zur Proteinexpression von Fas-Ligand in Tumor-B-Zellen Spur 1 + 2: Positivkontrolle, humane T-Zelllinie C8166 unstimuliert und stimuliert mit Ionomycin/TPA. Spur 3 + 4: normale Gedächtnis-B-Zellen unstimuliert und stimuliert. Spur 5 + 6: Tumor-B-Zellen unstimuliert und stimuliert (#13). Spur 7 + 8: humane T-Zelllinie Jurkat unstimuliert und stimuliert. In jeder Spur wurden jeweils 30 µl eines Gesamtproteinaufschlusses aus je 1×10^6 Zellen in 100 µl Laemmli Puffer aufgetragen. Die Proben wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel analysiert.

3.2.4 Konstruktion der Zelllinie Ltk^- /huCD40-L/huCD32/huFas-L

3.2.4.1 Stabile Transfektion der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk^- /huCD40-L/huCD32 mit humanem Fas-Ligand

Da mit dem uns zur Verfügung stehenden Probenmaterial nur begrenzt Untersuchungen *in vivo* zu den Interaktionen zwischen B- und T-Zellen in den Keimzentren des Tumors möglich waren, sollte ein Zellkultursystem entwickelt werden, mit dem man in der Lage sein wird, *in vitro* die Reaktionen von Tumor-B-Zellen auf T-Zell-spezifische Stimuli zu untersuchen. Als Ausgangssystem diente das sogenannte „CD40-System“ (Galibert, 1996), bei dem die zu untersuchenden B-Zellen mit der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk^- , die stabil mit humanem CD40-Ligand und humanem CD32/ $Fc\gamma$ -Rezeptor II transfiziert ist, kokultiviert werden. Somit ist es möglich B-Zellen über CD40 und einen zweiten frei gewählten Oberflächenrezeptor,

mittels monoklonaler Antikörper, simultan zu stimulieren. Dieses Zellkultursystem sollte durch die stabile Transfektion mit dem humanen Fas-Ligand modifiziert werden. Mit der neuerhaltenen Zelllinie wäre man dann in der Lage, den unter Abbildung 8 erläuterten 3. Kontrollpunkt, den eine B-Zelle auf ihrem Selektionsweg im Keimzentrum durchlaufen muß, *in vitro* in vereinfachter Form zu simulieren. Somit ist die Möglichkeit gegeben, das Verhalten von Tumor-B-Zellen, die phänotypisch einer Gedächtnis-B-Zelle entsprechen, an diesem wichtigen Punkt der B-Zell-Reifung genauer zu studieren und nach Fehlreaktionen in der Keimzentrumsselektion der Zellen zu suchen, die möglicherweise an der Entstehung und Progression des MALT-Typ Lymphoms beteiligt sind.

Aus dem Blut eines gesunden Spenders wurden mit Hilfe eines Ficollgradienten die peripheren Blutlymphozyten (PBL) isoliert, diese mit Ionomycin (400 ng/ml) und PMA (10 ng/ml) für 6h *in vitro* stimuliert und daraus die Gesamt-RNA präpariert. Die erhaltene RNA wurde mittels einer reversen Transkription mit Oligo-dT- und Random-Hexamer-Primer in cDNA umgeschrieben. Mit den Fas-Ligand-spezifischen Oligonukleotiden huFas-L-kompl.-FOR und huFas-L-kompl.-REV wurde die codierende Sequenz des humanen Fas-Ligands (GenBank Accession No. U11821) in einer PCR amplifiziert. Bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 mM und einem Probenvolumen von 25 μ l wurden 40 PCR-Zyklen durchlaufen (94°C, 1 min; (94°C, 15 s / 62°C, 15 s / 72°C, 1 min) x 40; 72°C, 2min; 4°C, ∞ ; Tube Control). Anstelle des Standard-PCR-Puffers der verwendeten Taq-Polymerase wurde 5x Puffer B (300 mM Tris/HCl, 75 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10,0 mM $MgCl_2$, Lösung eingestellt auf pH 9,0) von Invitrogen (Deutschland) verwendet. Das PCR-Produkt wurde auf einem 2,0%igen Agarosegel analysiert (Abbildung 35) und aus dem Gel ausgeschnitten. Das Amplifikat wurde mit Hilfe von GenElute™ Minus EtBr (5.2.1.17.1) aus dem Gelstück eluiert und mit einer Ammoniumacetatfällung angereichert.

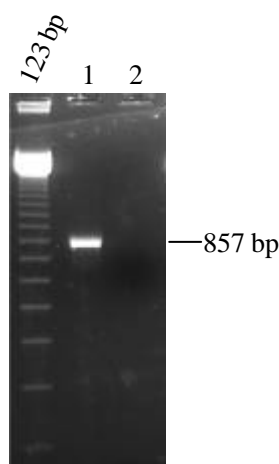


Abbildung 35: RT-PCR von humanem Fas-Ligand. Auf dem 2%igen Agarosegel wurde eine 123 bp-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Spur 1: Amplifizierte Fas-Ligand cDNA aus stimulierten PBLs. Spur 2: Negativkontrolle ohne cDNA.

Die amplifizierte und aufgereinigte Fas-Ligand cDNA wurde zuerst bluntend über die Schnittstelle SrfI in den Vektor pCR-Script kloniert, in *E. coli* amplifiziert und mittels Blau-Weiß-Selektion die Plasmide mit Insert reisoliert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle mit EcoRI/NotI geschnitten (siehe Abbildung 36).

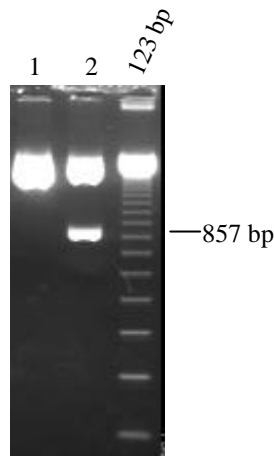


Abbildung 36: Restriktionsverdau von pCR-Script/huFas-L mit EcoRI/NotI. Auf dem 2%igen Agarosegel wurde eine 123 bp-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Spur 1: Vektor pCR-Script ohne Insert verdaut mit EcoRI/NotI. Spur 2: pCR-Script/huFas-L verdaut mit EcoRI/NotI.

Anschließend wurden alle im Restriktionsverdau positiven Plasmide mit M13-UNI, T3, huFAS-L-E1-FOR und huFAS-L-E4-REV komplett, auf beiden DNA-Strängen sequenziert und die erhaltenen cDNA-Sequenzen mit der des veröffentlichten Fas-Liganden (GenBank Accession No. D38122) verglichen. Alle untersuchten Fas-Ligand-Sequenzen enthielten an der gleichen Stelle einen Einzelbasenpaaraustausch (nt759), bei dem das ursprünglich vorhandene Thymidin durch ein Cytosin ersetzt worden war. Dies könnte aufgrund eines Lesefehlers der Taq-Polymerase während der Synthesephase der PCR entstanden sein. Da die Mutation aber in allen klonierten Fas-Ligand-Sequenzen auftrat, erschien diese Erklärung unrealistisch. Wahrscheinlicher ist es, daß es sich hierbei um einen genetischen Polymorphismus im Fas-Ligand des Spenders handelte. Aufgrund der Tatsache, daß es sich jedoch bei dieser Mutation um einen Austausch in der dritten Base eines Codons handelte und somit die Aminosäuresequenz nicht verändert werden würde, arbeitete man mit der vorhandenen cDNA-Sequenz weiter.

Zur gerichteten Umklonierung der Fas-Ligand cDNA in den Expressionsvektor pCI-NEO wurden die beiden Schnittstellen EcoRI und NotI ausgewählt. Um die cDNA-Sequenz in CW-Orientierung zum CMV IE-Enhancer/Promotor in den Vektor pCI-NEO (siehe Abbildung 38) klonieren zu können, mußte ein Plasmid pCR-Script/Fas-L ausgewählt werden, bei dem die Fas-Ligand-cDNA in CCW-Orientierung zum LacZ-Leserahmen vorlag (siehe Abbildung 37).

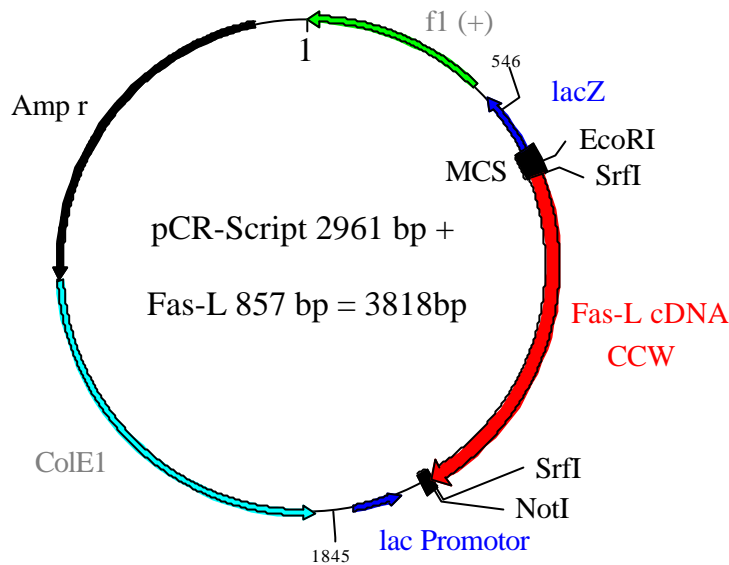


Abbildung 37: Vektorkarte von pCR-Script/huFas-L. Die cDNA vom huFas-L wurde blutend über SrfI in die MCS kloniert und lag in CCW-Orientierung bezüglich des lacZ-Gens vor. Über einen EcoRI/NotI-Restriktionsverdau wurde das Insert wieder aus dem Vektor ausgeschnitten und zur gerichteten Umklonierung in den Vektor pCR-Script verwendet. MCS: Multiple cloning site;

Das ausgewählte Plasmid wurde nochmals in *E. coli* amplifiziert und eine Maxipräparation der Plasmid-DNA durchgeführt. 100 ng der aufgereinigten Plasmid-DNA wurden mit EcoRI/NotI in einem Volumen von 100 µl ÜN bei 37°C restriktionsverdaut. Der Verdau wurde über ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt und das 857 bp lange Fas-Ligand-Fragment mittels GenElute™ Minus EtBr aus dem Gelstück eluiert. Anschließend wurde es in den mit EcoRI/NotI vorverdauten Vektor pCI-NEO ligiert und in *E. coli* amplifiziert. Da bei diesem Vektor keine Blau-Weiß-Selektion zur Verfügung stand, mußten alle Bakterienkolonien auf erfolgreiche Ligation untersucht werden. Die Ausbeute an positiven Klonen lag jedoch wegen der gewählten Klonierungsstrategie bei über 90 %. Alle positiven Plasmide wurden anschließend mit T3-pCI-NEO, T7-pCI-NEO, huFAS-L-E1-FOR und huFAS-L-E4-REV komplett auf beiden DNA-Strängen sequenziert. Ein Plasmid wurde im großen Maßstab isoliert, um es für die nachfolgende Transfektion zu verwenden.

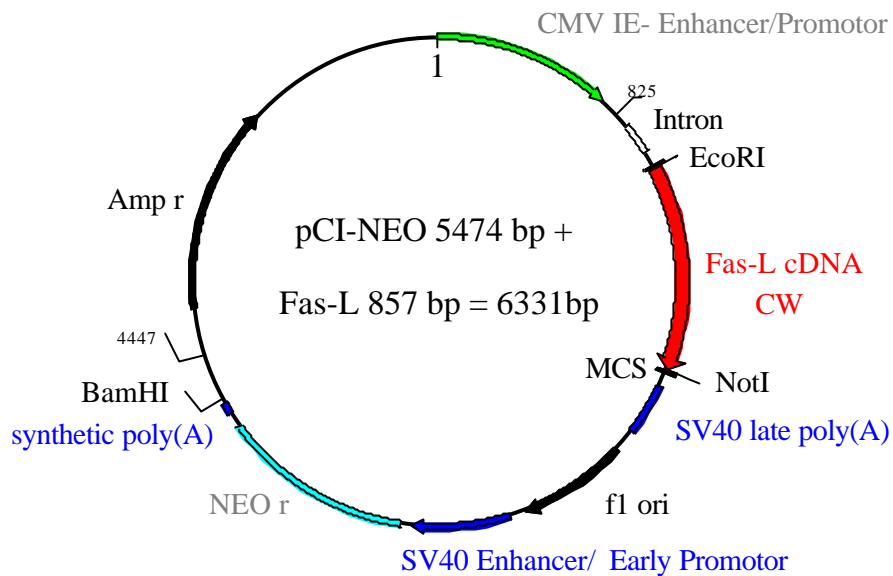


Abbildung 38: Vektorkarte von pCI-NEO/huFas-L. Die cDNA von huFas-L wurde über die Schnittstellen EcoRI und NotI gerichtet in den Vektor pCI-NEO kloniert. Mit der angewendeten Klonierungsstrategie konnte das Fragment in CW-Orientierung bezüglich des CMV IE-Promotors/Enhancers erfolgreich plaziert werden. MCS: Multiple cloning site. Die Ampicillinresistenz (Amp^r) wurde zur Selektion des Plasmids in *E. coli* verwendet, wohingegen die Neomycin (G418)-Resistenz (Davies, 1980; Southern, 1982) zur Selektion im eukaryontischen System diente. Die konstitutive mRNA-Expression des Gens erfolgt aufgrund eines CMV immediate early Enhancer/Promotors (Schmidt, 1990) und wird von einem chimären Intron (Gross, 1987; Buchman, 1988; Evans, 1989; Huang, 1990) sowie einem SV40 late poly(A)-Signal (Bernstein, 1989; Jackson, 1990) bei den nachfolgenden Schritten hin zur Translation positiv unterstützt.

Für eine erfolgreiche stabile Transfektion muß das in die Wirtszelle eingeschleuste Plasmid in das Genom des Wirts rekombinieren. Um diesen Vorgang zu erleichtern, muß bei der Transfektion das Plasmid in linearisierter Form vorliegen. Aufgrund dessen wurde der Expressionsvektor pCI-NEO/huFas-L mit BamHI (siehe Abbildung 38) restriktionsverdaut.

Die Transfektion und anschließende Vereinzelung der stabilen Transfektanten mittels „limiting dilution“ wurde wie unter 5.2.3.14 beschrieben, durchgeführt. Folgenden Transfektionen wurden mit der Zelllinie Ltk/huCD40-L/huCD32 angesetzt:

Tabelle 9: Transfektionsansätze zur stabilen Transfektion von Ltk-/huCD40-L/huCD32 mit pCI-NEO/Fas-L

Ansatz	Zellen	Transfektionslösung
1	Ltk-/huCD40-L/huCD32 oder Ltk-/huCD32	pCI-NEO/Fas-L (5 µg) + RPMI + SuperFect®
2	siehe oben	pCI-NEO/Fas-L (5 µg) + RPMI + SuperFect®
3	siehe oben	pCI-NEO/Fas-L (5 µg) + RPMI + SuperFect®
4	siehe oben	pCI-NEO/Fas-L (5 µg) + RPMI
5	siehe oben	RPMI + SuperFect®
6	siehe oben	RPMI
7	siehe oben	keine Transfektion aber G418-Selektion
8	siehe oben	keine Transfektion aber G418-Selektion
9	siehe oben	keine Transfektion und keine G418-Selektion
10	siehe oben	pCI-NEO (5 µg) + RPMI + SuperFect®

Die Zelllinie Ltk-/huCD32 (Banchereau, 1991) wurde ebenfalls mit dem humanen Fas-Ligand transfiziert, um sie bei zukünftigen Versuchen als Kontrollzelllinie mitführen zu können.

Nach drei bis vier Tagen zeigten sich bei den Ansätzen 1, 2, 3 und 10 (Positivkontrolle für erfolgreiche Transfektion) die ersten Transfektanten, die neben untransfizierten toten Zellen kleine Zellinseln ausbildeten. Die Zellen der Ansätze 4 bis 8 waren zu 90 % tot. Die Kulturschale von Ansatz 9 war konfluent mit Zellen bewachsen. Nach weiteren acht Tagen wurden die Transfektanten in 250 ml und dann in 500 ml Kulturflaschen umgesetzt. Sechzehn bis achtzehn Tage nach der Transfektion wurde mit der Vereinzelung (limiting dilution) der transfizierten Zellen begonnen. Nach weiteren 14 Tagen waren unter dem Lichtmikroskop Klone, die sich aus einer einzelnen Zelle entwickelt hatten, deutlich zu erkennen. Von der Zelllinie Ltk-/huCD40-L/huCD32 wurden 62 Klone einzeln mit einer 200 µl Eppendorfpipette in 5 ml Kulturflaschen umgesetzt und vermehrt. Von Ltk-/huCD32 erhielt man 51 Klone.

3.2.4.2 Nachweis der stabilen Transfektion der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk⁻/huCD40-L/huCD32 mit humanem Fas-Ligand

Um eine erfolgreiche Integration der Fas-Ligand cDNA in das Genom der transfizierten Zellen nachzuweisen, wurde von jedem Zellklon aus 1×10^7 Zellen Gesamt-RNA isoliert und diese mit reverser Transkriptase und einem Oligo-dT-/Random-Primergemisch in cDNA umgeschrieben. Mit einer anschließenden RT-PCR wurde die Fas-Ligand cDNA, wie unter 3.2.4.1 beschrieben, amplifiziert und in einem 2%igen Agarosegel identifiziert. Die erhaltenen Banden wurden aus dem Gel aufgereinigt und ihre Identität nochmals durch direkte Sequenzierung überprüft. Für weitere Untersuchungen wurden nur noch die Klone weiterkultiviert, deren huFas-Ligand-Bande deutlich im Gel zu erkennen war (siehe Abbildung 39). Mit diesen positiven Klonen wurden anschließend RT-PCR-Analysen spezifisch für huCD32 (huCD32-cDNA-FOR x huCD32-cDNA-REV; 1,5 mM MgCl₂; 94°C, 1 min; (94°C, 15 s / 65°C, 15 s / 72°C, 40 s) x 35; 72°C, 2 min; 4°C, ∞; Tube Control) und huCD40-Ligand (huCD40-L1.1-FOR x huCD40-L-REV; 1,5 mM MgCl₂; 94°C, 1 min; (94°C, 15 s / 60°C, 15 s / 72°C, 30 s) x 35; 72°C, 2 min; 4°C, ∞; Tube Control) durchgeführt, um sicher zu gehen, daß beide mRNAs auch nach Integration des Plasmids noch exprimiert wurden. Für den Nachweis von huFas-Ligand auf Proteinebene wurden nur noch die Zellklone verwendet, die sowohl für huFas-Ligand als auch für huCD32 und huCD40-Ligand in der RT-PCR positiv waren. Von der Zelllinie Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/huFas-L wurden zwölf Klone und von Ltk⁻/huCD32/Fas-L fünf Klone auf Proteinexpression im ELISA untersucht.

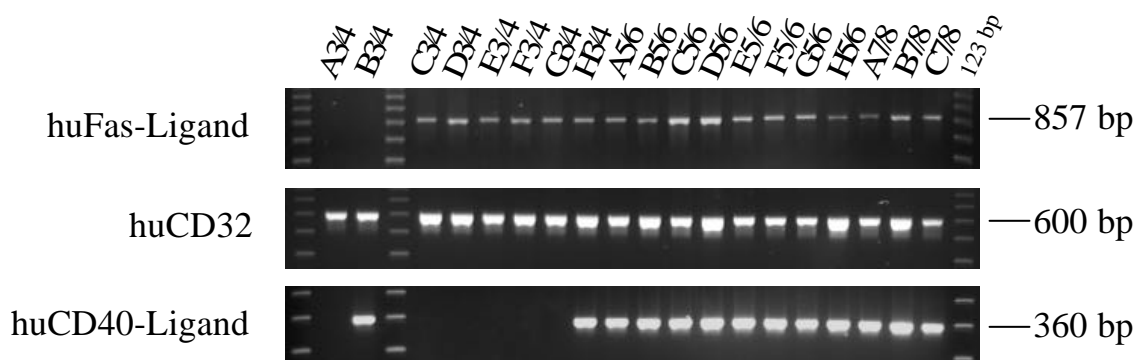


Abbildung 39: RT-PCRs zum Nachweis der Expression von huFas-L, huCD32- und huCD40-L-mRNA. Beschriftung siehe Tabelle 10. Proben wurden jeweils auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen. Eine 123 bp-Leiter diente als Größenstandard.

Mit diesem kommerziell erhältlichen ELISA der Firma Coulter-Immunotech Diagnostics (Krefeld, Hamburg) wurde die Fas-Ligand-Proteinexpression in den ausgewählten Zellklonen bestimmt. Aus 1×10^7 Zellen pro Zellklon wurde Gesamtprotein isoliert und direkt im ELISA eingesetzt. Die Proteinkonzentration wurde jeweils unabhängig voneinander in zwei Wells bestimmt und der Mittelwert daraus berechnet.

Tabelle 10 und Abbildung 40 zeigen die Ergebnisse des Fas-Ligand-ELISAs. In den Wells A1/2 bis H1/2 wurde als Standard aufgereinigtes rekombinantes Fas-Ligand-Protein eingesetzt. Von den zwölf untersuchten Klonen (H3/4, A5/6 bis H5/6, A7/8 bis C7/8) der transfizierten Zelllinie $Ltk^{-}/huCD40-L/huCD32/huFas-L$ exprimierten sechs das hu-Fas-Ligand-Protein (H3/4, E5/6 bis H5/6, B7/8 bis C7/8). In zwei (D3/4, F3/4) der fünf untersuchten Klone von $Ltk^{-}/huCD32/huFas-L$ konnte das Protein ebenfalls nachgewiesen werden. Als Negativkontrollen wurden die beiden untransfizierten Zelllinien $Ltk^{-}/huCD40-L/huCD32$ (B3/4) und $Ltk^{-}/huCD32$ (A3/4) verwendet sowie die nur mit pCI-NEO transfizierte Zelllinie $Ltk^{-}/huCD40-L/huCD32/NEO$. Zur Kontrolle, daß der verwendete ELISA spezifisch nur den humanen Fas-Liganden erkannte, wurde die mit murinem Fas-Ligand transfizierte Zelllinie L47/muFas-L mitgeführt (erhalten von A. Schimpl / Immunbiologie, Uni Würzburg). In den Wells E7/8 (Abbildung 40) konnte kein Protein nachgewiesen werden. Stimulierte PBLs und deren Zellkulturüberstand wurden als Positivkontrolle verwendet und zeigten eine deutliche Gelbfärbung (A9/10, C9/10). Ebenfalls als Fas-Ligand-positive Zelllinie wurden mit Ionomycin/TPA stimulierte Jurkat-Zellen untersucht, die jedoch im ELISA negativ waren. Dies bedeutet nicht unbedingt, daß die Zellen kein Protein exprimierten, sondern wahrscheinlicher ist es, daß die Menge an Fas-Ligand-Protein unterhalb der Nachweisgrenze des Assays lag.

Tabelle 10: Proteinbestimmung von huFas-Ligand in den transfizierten Zellklonen mittels ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A		NK	L-CD32	0,0 ng/ml	2/18-1/3	0,0 ng/ml	3/14-1/3	0,0 ng/ml	PBL stimul.	1,660 ng/ml
B	STD	0,000 ng/ml	L-CD32 CD40-L	0,0 ng/ml	2/19-1/3	0,0 ng/ml	3/18-1/3	0,468 ng/ml	Überst. PBL	0,0 ng/ml
C	STD	0,256 ng/ml	4-1/3	0,0 ng/ml	2/26-1/3	0,0 ng/ml	3/19-1/3	1,131 ng/ml	Überst. PBL sti.	0,157 ng/ml
D	STD	0,313 ng/ml	24-1/3	0,741 ng/ml	2/27-1/3	0,0 ng/ml	L-NEO	0,0 ng/ml		
E	STD	0,625 ng/ml	32-1/3	0,0 ng/ml	2/28-1/3	0,559 ng/ml	L-mu Fas-L	0,0 ng/ml		
F	STD	1,25 ng/ml	50-1/3	0,322 ng/ml	2/34-1/3	0,712 ng/ml	Jurkat	0,0 ng/ml		
G	STD	2,5 ng/ml	51-1/3	0,0 ng/ml	3/3-1/3	0,251 ng/ml	Jurkat stimul.	0,0 ng/ml		
H	STD	5,0 ng/ml	2/1-1/3	0,792 ng/ml	3/4-1/3	1,477 ng/ml	PBL	1,311 ng/ml		

STD: Fas-Ligand-Proteinstandard; L-CD32: Ltk/huCD32; L-CD32/CD40-L: Ltk/huCD40-L/huCD32; L-NEO: Ltk/huCD32 nur mit pCI-NEO ohne Fas-Ligand transfiziert; L-muFas-L: Ltk/muriner Fas-Ligand; EBV-L.: EBV-Zelllinie; stimul./sti.: stimuliert; Überst.: Kulturmedium von PBLs; Die Proben wurden jeweils als Doppelbestimmungen von links oben nach rechts unten aufgetragen; C3/4 bis G3/4: Klone von Ltk/huCD32/huFas-L; H3/4 bis C7/8: Klone von Ltk/huCD40-L/huCD32/huFas-L. Linke Seite der Doppelkästchen enthält die Bezeichnung des jeweiligen Klons.

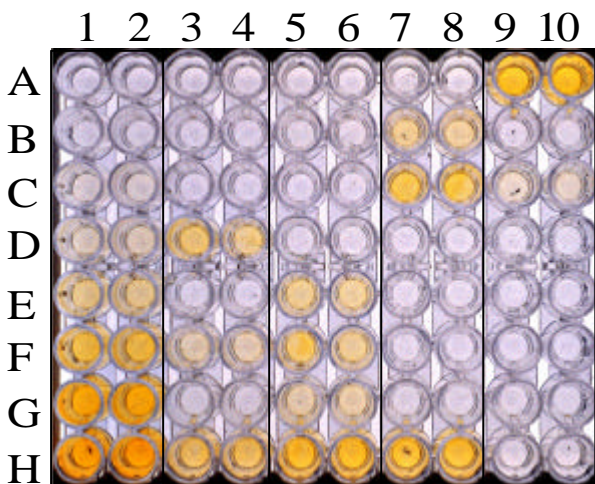


Abbildung 40: Nachweis des humanen Fas-Ligand-Proteins in den transfizierten Zellklonen mittels ELISA. Identität der Proben siehe Tabelle 10. Fas-Ligand-positive Proben zeigten eine Gelbfärbung.

3.2.5 Untersuchungen zur Expression von Cytokinen im Tumorgewebe *in vivo*

Da gezeigt worden war, daß die vorhandenen aktivierten und immunkompetenten TITLs sowohl CD40-Ligand als auch Fas-Ligand auf Proteinebene exprimierten, somit also die essentiellen Moleküle für einen erfolgreichen T/B-Zell-Kontakt vorhanden waren, sollten weitere Untersuchungen Aufschluß über die Art und Weise der T-Zell-Antwort im Tumor geben. Findet man *in vivo* auch eine T_H1 -gewichtete Immunantwort, wie sie Hauer (1997) nach Stimulation der TITLs mit *H. pylori in vitro* fand? Oder liegt eine T_H2 -Typ Antwort vor? Um diese Fragestellung zu erörtern, wurde das tumorspezifische *in vivo*-Cytokinspektrum analysiert. Anhand der Ergebnisse sollte man Rückschlüsse auf den Typ der vorhandenen TITLs und die durch sie induzierte Immunantwort erhalten.

3.2.5.1 Nachweis der mRNA-Expression von T_H1 - und T_H2/T_H3 -Typ Cytokinen *in vivo*

Aus jeweils der gleichen Anzahl an Kryoschnitten vom Tumorgewebe wurde Gesamt-RNA isoliert, mit Oligo-dT- und Random-Hexamer-Primer revers transkribiert und anschließend für alle untersuchten Cytokine eine spezifische semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Für jedes verwendete Cytokinprimerpaar wurden die PCR-Bedingungen optimiert. Zur Optimierung der Reaktion wurde cDNA von stimulierten PBLs (Ionomycin/TPA-Stimulation) als Ausgangsmaterial verwendet. Es wurde jeweils die optimale Annealingtemperatur sowie die richtige $MgCl_2$ -Konzentration ermittelt. Die sensitivste Kombination aus beiden Parametern wurde anhand der Intensität der erhaltenen Amplifikatbande und der Reinheit des entsprechenden Gelhintergrunds bestimmt. Die Tumor-cDNAs wurde mittels einer GAPDH-spezifischen PCR auf gleiche cDNA-Ausgangskonzentrationen eingestellt und für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Alle Cytokin-PCRs wurden mit folgenden Zyklen durchgeführt: $94^\circ C$, 1 min; ($94^\circ C$, 30 s / $XX^\circ C$, 30 s / $72^\circ C$, 30 s) x 44; $72^\circ C$, 2 min; $4^\circ C$, ∞ . Die entsprechenden Annealingtemperaturen und $MgCl_2$ -Konzentrationen sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: PCR-Bedingungen der semiquantitativen Cytokin-PCRs.

mRNA	Forward-Primer	Reverse-Primer	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]
IFN γ	IFN γ -FOR	IFN γ -REV	60	1,5
IFN γ -RE	IFN γ -RE-FOR	IFN γ -RE-REV	65	1,5
IL2	IL2-FOR	IL2-REV	60	1,5
IL10	IL10-FOR	IL10-REV	60	1,5
IL13	IL13-FOR	IL13-REV	60	1,5
TGF β ₁	TGF β ₁ -FOR	TGF β ₁ -REV	60	1,5

Wie in Abbildung 41 deutlich zu sehen ist, konnte in allen untersuchten niedrig- und hoch-malignen MALT-Typ Lymphomen sowie in der Kontrollgastritis die mRNA des T_H3-Typ Cytokins TGF β ₁ nachgewiesen werden. Ebenso konnte in 60 % der niedrig-malignen und 25 % der hoch-malignen Tumoren IL10 mRNA (T_H2-Typ) detektiert werden. IL13 mRNA (T_H2-Typ) wurde hingegen nur in niedrig-malignen, nicht aber in hoch-malignen Lymphomen gefunden.

Im Gegensatz zu den T_H2/3-Typ Cytokin-mRNAs waren die des T_H1-Typs nur vereinzelt und mit schwachen Signalen zu erkennen. IL2 mRNA konnte nur in vier Fällen (#1, 2, 10, 13) von niedrig-malignen Lymphomen nachgewiesen werden. Obwohl man in allen untersuchten Fällen eine spezifische Bande für IFN γ -Rezeptor mRNA (IFN γ -RE) erhielt, konnten nur jeweils in einem Fall von niedrig- und hoch-malignen MALT-Typ Lymphomen (#1, #7), geringe Mengen an IFN γ mRNA nachgewiesen werden.

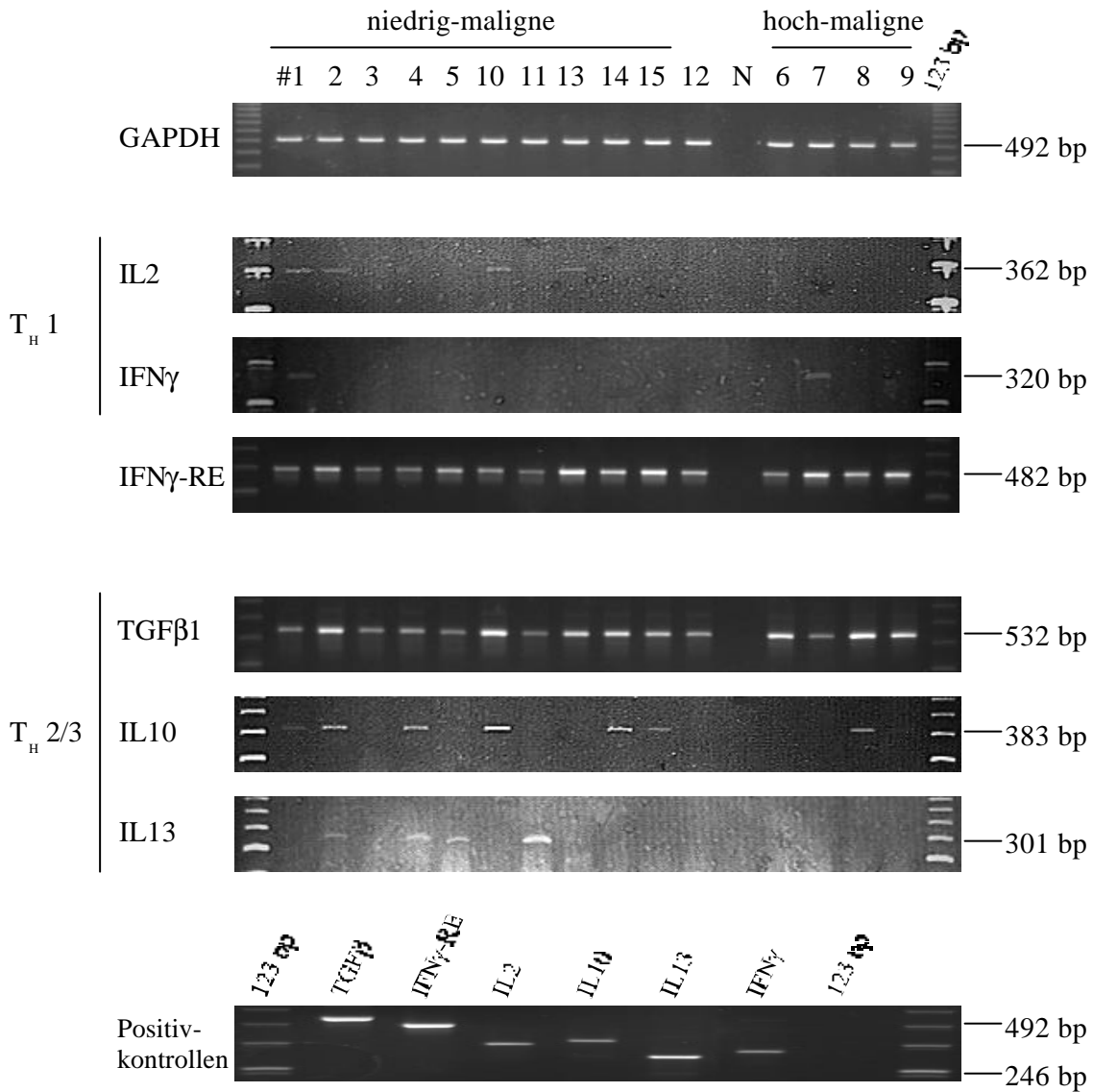


Abbildung 41: RT-PCR-Nachweis von T_H1- und T_H2/3-Typ Cytokin mRNAs im Tumorgewebe. Die Proben wurden auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Als Größenstandard wurde eine 123 bp-Leiter aufgetragen. Die GAPDH-PCR diente als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR. N: Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde cDNA von stimulierten PBLs verwendet. Die unterschiedlichen Bandenintensitäten der Positivkontrollen sind nicht auf mangelnde Sensitivität der einzelnen RT-PCRs zurückzuführen, sondern sind abhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Probenmaterials.

3.2.5.2 Nachweis der Proteinexpression von T_H1 - und T_H2/T_H3 -Typ Cytokinen

Auch bei den Cytokinen wurde parallel zur mRNA-Expression die Proteinexpression *in vivo* anhand von immunhistochemischen Färbungen bestimmt. Die Ergebnisse entsprachen denen der RT-PCR-Analysen. Bei den immunhistochemischen Analysen konnte $TGF\beta_1$ -Protein (Abbildung 42B) im Cytoplasma der Tumorzellen und in den Endothelzellen von Gefäßen nachgewiesen werden. IL10- und IL13-positive Zellen (Abbildung 42C und D) lagen verteilt im Tumorgewebe vor. Abbildung 42A zeigt den für IL2 mRNA positiven Fall #1. Hier konnte auf wenigen vereinzelt Zellen innerhalb des Tumors IL2-Protein detektiert werden.

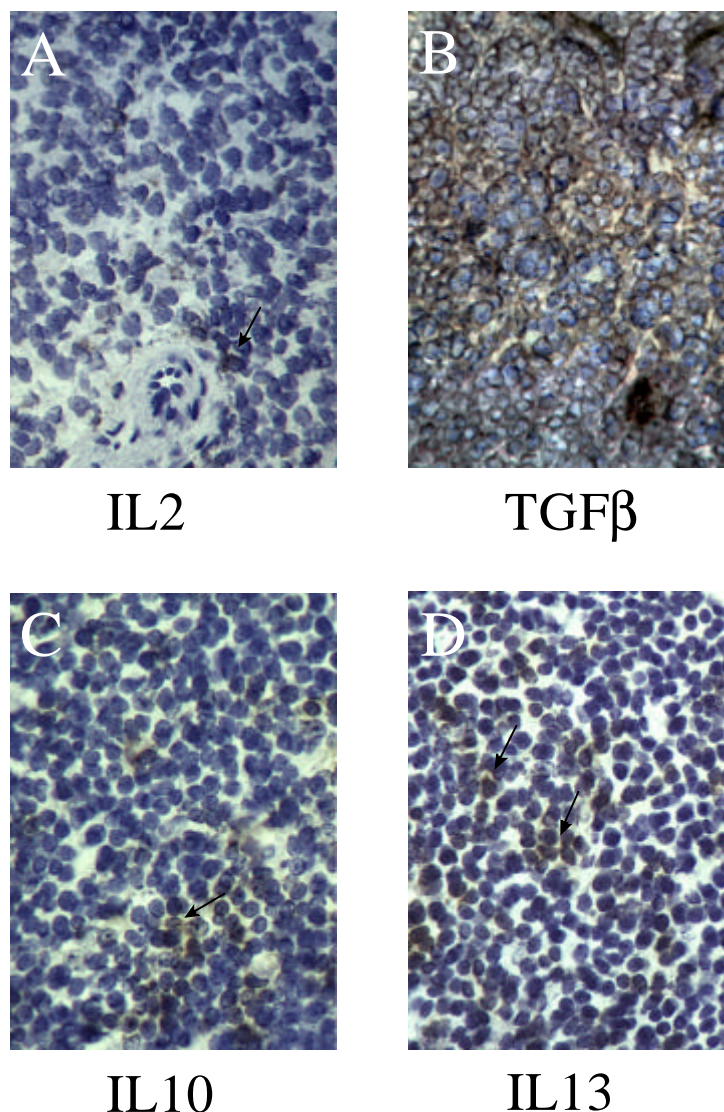


Abbildung 42: Immunhistochemischer Nachweis der Proteinexpression von T_H1 - und T_H2/T_H3 -Cytokinen im Tumorgewebe. A: Nur einige wenige Zellen sind IL2-positiv (Pfeil). Diese Zellen wurden im perivaskulären Bereich und im Tumor gefunden. Es handelt sich hier um eine PAP-Färbung im Gefrierschnitt des Falles #1. Die Vergrößerung ist 400-fach. B: Die Tumorzellen zeigen eine starke cytoplasmatische Färbung für $TGF\beta_1$ (Pfeil). Gefärbt wurden Gefrierschnitte des Falles #10 nach PAP. Die Vergrößerung war 200-fach. C und D: IL10 (Fall #10; PAP-Färbung im Gefrierschnitt mit einer 250-fachen Vergrößerung) und IL13 (Fall #11; PAP-Färbung im Gefrierschnitt mit einer 200-fachen Vergrößerung) wurden über das Tumorgewebe verteilt, nachgewiesen (Braunfärbung; Pfeil)

3.2.6 Diskussion der Ergebnisse

3.2.6.1 Aktivierte und immunkompetente tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TITL) in MALT-Typ Lymphomen *in vivo*

Ein einzigartiges Phänomen, welches nur bei gastralen MALT-Typ Lymphomen in Erscheinung tritt, ist die Fähigkeit der Rückbildung dieser Tumoren, wenn mit Hilfe einer Antibiotikabehandlung die chronische Entzündung, meist ausgelöst durch *H. pylori*, unterbunden wird (Wotherspoon, 1993; Bayerdorffer, 1995; Fischbach, 1997). Hierbei läßt sich schon die komplexe Beziehung zwischen Tumor und Wirt welche *in vivo* besteht, erahnen. Jedoch ist allein die Tatsache, daß man tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TITL) nachweisen kann, noch nicht ausreichend, um die symbiotischen Wechselwirkungen zwischen Tumor-B-Zellen und TITLs näher beschreiben und den Mechanismus verstehen zu können. Dies ist auch dann nicht möglich, wenn ein weitaus höherer Anteil an CD4⁺ Helfer-T-Zellen (T_H) in den Tumoren vorhanden war, als man im Normalfall erwartet hätte. Ein weitaus gewichtigeres Argument für das Zusammenspiel von Lymphom-B-Zellen und TITLs stellen *in vitro* Untersuchungen dar, bei denen gezeigt werden konnte, daß aktivierte T-Zellen das Tumorwachstum förderten (Hussell, 1996). Um so bedeutender ist es, daß *in vivo* aktivierte TITLs nachgewiesen werden konnten, die parallel zu dem Aktivierungsmarker (CD69⁺) auch Immunkompetenzmarker (CD28⁺) in einem weitaus höherem Maße als periphere T-Zellen exprimierten. Sowohl die erhöhte Anzahl an T_H-Zellen als auch die Tatsache, daß es sich bei den vorliegenden TITLs um aktivierte und immunkompetente T-Zellen handelte, unterstützt die Theorie der Symbiose zwischen Tumor und Wirt auf der Ebene von T/B-Zell-Interaktion. Wobei sich hier allerdings die Frage stellt, welche Rolle die TITLs bei der Tumorprogression spielen und weshalb die eigentliche Kontrollfunktion der vorhandenen T_H-Zellen im Keimzentrum bei den Tumor-B-Zellen versagt.

3.2.6.2 Expression von CD40-Ligand und Fas-Ligand auf TITLs in MALT-Typ Lymphomen *in vivo*

Neben ihrer Fähigkeit zur Hilfestellung beim Priming von tumorspezifischen CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphozyten, gibt es Hinweise basierend auf Mausmodellen und Zelllinien, daß CD4⁺ T-Zellen zusätzlich eine wichtige Effektorrolle bei der Regulation der Tumorummunität spielen können (Demanet, 1994; Ashany, 1995; Racila, 1995; Schattner, 1996). Deshalb ist die Tatsache, daß CD40-Ligand fast in allen niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen gefunden wurde, in

verschiedener Hinsicht von großer Bedeutung. Erstens handelt es sich zum einen bei CD40-Ligand um den stärksten Proliferationsstimulus für MALT-Typ Lymphom-B-Zellen *in vitro* (Greiner, 1997; Greiner, 1998) und zum anderen wäre CD40-Ligand in der Lage das Tumorwachstum auch *in vivo* zu fördern. Zweitens stellte man in vorangegangenen Untersuchungen fest, daß CD40-Ligand *in vitro* medikamentös induzierte Apoptose bei Lymphomzelllinien hemmen konnte (Friesen, 1996; Voorzanger-Rousselot, 1998). Dies legt die Vermutung nahe, daß auch *in vivo* durch CD40-Ligand-Stimulation eine Resistenz der Lymphom-B-Zellen gegenüber proapoptotischen und antiproliferativen Effekten, aufgrund von cytotoxischen Medikamenten, bewirkt werden kann. Drittens ist bekannt, daß CD40-Ligand von T-Zellen exprimiert wird, die Kontakt mit spezifischem Antigen hatten und somit aktiviert sind (Banchereau, 1994). Der Nachweis von CD40-Ligand im Tumorgewebe spricht somit für die Idee von einem antigenvermittelten Tumorwachstum, basierend auf aktivierten T-Zellen. Unterstützt wird diese Vorstellung vor allem auch durch die Tatsache, daß die TITLs CD40-Ligand exprimierten, nicht aber die Lymphom-B-Zellen, wie es kürzlich für Tumor-B-Zellen einiger Nonhodgkin Lymphome (z. B. B-CLL) beschrieben wurde (Brugnoni, 1995; Trentin, 1997). Mit der Expression von CD40-Ligand im Tumor besteht somit die Möglichkeit eines nicht autonomen Tumorwachstums, welches durch aktivierte CD40-Ligand-positive T-Zellen gefördert wird. Dies würde auch die Tatsache erklären, daß es zu einer Regression der niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome nach Antibiotikabehandlung kommt.

Neben CD40-Ligand konnte aber auch Fas-Ligand im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Fas-Ligand, das zweite Molekül welches eine wichtige Rolle bei T/B-Zell Wechselwirkungen spielt, findet man im Normalfall nur auf stark aktivierten, nicht aber auf ruhenden T-Zellen. Es dient vor allem dazu, für den Körper schädliche autoreaktive B-Zellen mittels Apoptose zu eliminieren.

In Anbetracht der Tatsache, daß viele MALT-Typ Lymphome Antigenrezeptoren exprimieren, welche spezifisch für Autoantigene sind (Hussell, 1993; Greiner, 1994; Greiner, 1994; Qin, 1995; Qin, 1997), war es sehr erstaunlich, daß in den meisten Fällen Fas-Ligand im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Expression von Fas-Ligand auf den Tumor-B-Zellen selbst, wie es im Falle einiger Karzinome beschrieben wurde (Strand, 1996). Eine andere Möglichkeit wäre die Existenz eines bisher noch unbekanntes Mechanismus, der es den Tumorzellen erlaubt der Selektionskontrolle, durch die im Tumor vorhandenen T-Zellen, zu enttrinnen und sie resistent gegen Fas/Fas-Ligand induzierte Apoptose werden läßt. Die hier vorliegenden Ergebnisse, welche zeigen, daß weder Fas-Ligand mRNA noch Protein *in vivo* noch *in vitro* in Tumor-B-Zellen nachgewiesen werden konnte, spricht für die zweite Variante. Ferner

besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß die Fas-vermittelte Apoptose beeinträchtigt ist oder aber das Fas-Molekül in mutierter Form vorliegt, wie es schon bei einigen B-Zell-Lymphomen gezeigt wurde (Gronbaek, 1998) und es aufgrunddessen zu einer funktionellen Fas-Resistenz kommt (Greiner, 1998; Plumas, 1998).

3.2.6.3 Konstruktion der Zelllinie Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/huFas-L zur Simulation von T/B-Zell-Interaktionen

Zur *in vitro* Simulation des Keimzentrums-mikromilieus wurde, ausgehend von dem „CD40-System“ von Banchereau (1991; Galibert, 1996), ein modifiziertes Zellkultursystem entwickelt, anhand dessen die Reaktionen von B-Zellen auf T_H-Zell-spezifische Signale *in vitro* untersucht werden können. Hierfür sollte die murine Fibroblastenlinie Ltk⁻, zusätzlich zu dem schon vorhandenen humanen CD40-Liganden und humanen CD32 (F_Cγ-Rezeptor II), den humanen Fas-Liganden auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

Bei allen erfolgreich transfizierten Klonen der Zelllinien Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/Fas-L und Ltk⁻/huCD32/huFas-L wurde mit RT-PCR-Analysen die Expression der humanen Fas-Ligand mRNA überprüft. Dreiviertel aller untersuchten Zellklone exprimierten die spezifische mRNA. Da jeweils aus der gleichen Anzahl an Zellen gRNA isoliert wurde, konnte man die Expressionsstärke anhand der Bandenintensität der PCR grob abschätzen. Hier zeigte sich ein stark unterschiedliches Expressionsspektrum. Grund dafür liegt in der Natur des verwendeten Expressionsvektors, der sich ungerichtet in das Genom des Wirts integrieren kann. Das bedeutet, daß das Plasmid nicht an definierten Stellen und über ausgewählte Sequenzen mit der Wirts-DNA rekombiniert, sondern daß die Rekombination an beliebigen Stellen und beliebig oft stattfinden kann. Aufgrund dessen entstanden Klone, die mit unterschiedlicher Häufigkeit die genetische Information für das humane Fas-Ligand-Molekül enthielten und somit auch verschieden stark exprimierten. Bei vereinzelten Klonen konnte trotz der Neomycinresistenz keine Fas-Ligand mRNA nachgewiesen werden. Hier könnte anstelle des gesamten Plasmids nur das Gen für die Neomycinphosphotransferase ins Wirtsgenom stabil integriert worden sein, oder aber durch den Vorgang der Rekombination waren Fehler innerhalb der Vektorsequenz aufgetreten, die eine erfolgreiche Expression des Fremdgens verhinderten.

Neben der Detektion von Fas-Ligand mRNA wurde auch die Expression von humaner CD40-Ligand und CD32 mRNA kontrolliert. In 90 % der untersuchten Klone konnten beide mRNAs erfolgreich nachgewiesen werden. Bei den restlichen 10 % konnte jeweils eine der beiden mRNAs

nicht detektiert werden. Es ist anzunehmen, daß der Vektor pCI-Neo/huFas-L an einer, für die mRNA-Synthese wichtigen Stelle im Wirtsgenom, integriert wurde und aufgrund dessen die Expression stark eingeschränkt oder sogar behindert war.

Abschließend wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (Coulter-Immunotech Diagnostics, Deutschland) für humanen löslichen Fas-Ligand (sFas-Ligand) die Proteinexpression der transfizierten Zellklone bestimmt. Aufgrund der Tatsache, daß die beiden im ELISA verwendeten monoklonalen Antikörper zwei unterschiedliche Epitope in der extrazellulären Domäne (Tanaka, 1996) des sFas-Ligands erkennen, konnte mit diesem System auch der membranständige Fas-Ligand detektiert werden, wenn dieser in nativer Form im ELISA eingesetzt wurde. 40 % der Klone von Ltk⁻/huCD32/huFas-L und 58 % der Klone von Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/huFas-L zeigten im ELISA eine deutliche positive Reaktion (Gelbfärbung) entsprechend dem mitgeführten Mengenstandard an sFas-Ligand. Als Negativkontrollen wurden die beiden Ausgangszelllinien Ltk⁻/huCD40-L/huCD32 und Ltk⁻/huCD32 sowie die mit murinem Fas-Ligand transfizierte Zelllinie Ltk⁻/muFas-L und reines Medium mitgeführt. In diesen Proben konnte kein huFas-Ligand-Protein nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, daß der ELISA spezifisch nur huFas-Liganden detektierte und die monoklonalen Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingingen. Neben dem kommerziellen Mengenstandard diente ein Gesamtproteinaufschluß von stimulierten PBLs und deren Zellkulturüberstand als Positivkontrolle. Die PBLs zeigten ebenso ein stark positives Signal (Nachweis von membranständigem huFas-L), wohingegen der Überstand eine schwache, aber trotzdem sichtbare Positivreaktion (Nachweis von löslichem huFas-L) ergab. Die für huFas-Ligand positiven Klone zeigten in ihrer Expressionsstärke deutliche Unterschiede. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die unterschiedliche Häufigkeit der erfolgten Plasmidintegration zurückzuführen. Im Falle der huFas-Ligand-negativen Klone könnte es sich zum einen um ein Mengenproblem gehandelt haben, das heißt die vorliegenden Proteinmengen lagen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs oder zum anderen wurde aus unbekanntem Gründen nur ein fehlerhaftes oder überhaupt kein Protein synthetisiert.

Der funktionelle Nachweis des membranständigen Fas-Ligand-Proteins *in vivo* mittels FACS-Analysen war aufgrund der Expression von huCD32/Fc γ -Rezeptor II nicht möglich. Bei diesem Oberflächenmolekül handelt es sich um einen Rezeptor, der Antikörper des Typs IgG über ihren Fc-Teil bindet (Ravetch, 1991). Da es sich bei dem monoklonalen FACS-Antikörper NOK-1 (Kayagaki, 1995) um ein murines IgG₁-Molekül handelte, welches aufgrund seiner Homologie zu den humanen IgGs ebenfalls von Fc γ -Rezeptor II erkannt und gebunden werden konnte, erhielt man

falsch-positive Färbungen, die die eigentliche Fas-Ligand-Detektion überlagerten. Mehrfache Versuche, die freien Bindungsstelle der $F_c\gamma$ -Rezeptor II-Moleküle vorab mit humanem IgG₁, κ (Lew, 1984; Steward, 1985) abzublocken, zeigten keinen Erfolg. Problematisch dabei war es, daß große Mengen an IgG₁, κ eingesetzt werden mußten, um alle freien $F_c\gamma$ -Rezeptor II erfolgreich zu besetzen, daß die noch auf der Zelloberfläche vorhandenen anderen Moleküle ebenfalls nicht mehr identifiziert werden konnten.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde davon abgesehen weitere Nachweise für die funktionelle Proteinexpression auf der Zelloberfläche zu entwickeln und durchzuführen.

3.2.6.4 Expression von T_H2- und T_H3-Typ Cytokinen in MALT-Typ Lymphomen *in vivo*

Im Gegensatz zu einer neueren Arbeit, welche beschreibt, daß *in vitro* TITLs von MALT-Typ Lymphomen nach *H. pylori*-Stimulation IFN γ (T_H1) sezernierten (Hauer, 1997), wurden bei den hier durchgeführten Untersuchungen *in vivo* hauptsächlich T_H2- (IL10, IL13) und T_H3- Typ (TGF β ₁) und nur zu einem geringen Anteil T_H1-Typ (IL2) Cytokine nachgewiesen. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf eine TGF β ₁-Expression der Tumor-B-Zellen *in vivo* zurückführen, welche eine Verschiebung der T-Zell-Antwort von T_H1 in Richtung T_H2 zur Folge haben kann, wie es anhand eines Mausmodells bereits beschrieben wurde (King, 1998). Es könnte natürlich auch sein, daß *in vitro* auf eine bestimmte T_H1-Population aufgrund von Kulturbedingungen hin selektiert wurde und diese Population über einen anderweitigen Mechanismus kontrolliert wird (z. B. MHC restringiert). Wobei man natürlich nicht ausschließen kann, daß einige wenige dieser Zellen nicht doch im Tumormikromilieu funktionell von großer Bedeutung sein könnten. Jedoch wäre die Existenz von T_H1-Typ Cytokinen ein Argument gegen die Förderung des Tumorwachstums durch TITLs und würde vielmehr die Theorie unterstützen, daß der Wirt eine anti-Tumorimmunität entwickeln könnte (Schattner, 1996). Im Gegensatz dazu konnte für T_H2- (IL10, IL13) und T_H3-Typ (TGF β ₁) Cytokine klar gezeigt werden, daß es sich hierbei um Lymphokine handelt, welche einen starken proliferations- und differenzierungsfördernden Einfluß auf B-Zellen haben (Banchereau, 1994; Defrance, 1994; Garcia, 1996).

Aufgrund der Tatsache, daß aktivierte TITLs in MALT-Typ Lymphomen *in vivo* T_H2-Typ Cytokine sezernieren, wäre es durchaus möglich, daß diesen T-Zellen eine weitaus wichtigere Funktion als nur die Umwandlung von *H. pylori*-spezifischen Signalen in Wachstumssignale für Lymphom-B-Zellen

zukommt. So wurde erst kürzlich von Blanckenstein et al (Cayeux, 1997) beschrieben, daß es zu einer Verschiebung von einer „produktiven“ zellulären Immunantwort (T_H1 -Typ) gegen den Tumor, hin zu einer „nicht produktiven“ humoralen Antwort des Immunsystems (T_H2 -Typ) kommt, wenn $CD4^+$ T-Zellen Tumorantigen von B-Zellen präsentiert wird. Daher ist es natürlich möglich, daß eine T_H1 -gewichtete Immunreaktion, die sich während einer mit *H. pylori* assoziierten chronischen Entzündung etabliert hat (siehe D'Elis, 1997; Grafton, 1997), eine anti-Tumorimmunität fördert, wohingegen ein T_H2 -gewichtetes Cytokinspektrum *in vivo* primär die Entwicklung von lymphoproliferativen Erkrankungen und abnormalen B-Zell-Klonen propagiert. Wenn sich dies tatsächlich als ein grundsätzliches Phänomen von MALT-Typ Lymphomen darstellt, sollten Behandlungsstrategien entworfen werden, die es ermöglichen, die T_H2 -vermittelte T-Zell-Toleranz gegenüber dem Tumor aufzuheben und/oder im Gegensatz dazu die Entwicklung einer körpereigenen Immuntherapie zu unterstützen, die vor allem auch bei den MALT-Typ Lymphomen erfolgreich wirken kann, bei denen trotz erfolgter *H. pylori* Eradikation das Tumorwachstum fortschreitet.

4 SCHLUßFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen an niedrig-malignen MALT-Typ B-Zell-Lymphomen machten deutlich, daß es sich bei den untersuchten Neoplasien um eine molekular heterogene Gruppe von B-Zell-Tumoren handelt. Dies wurde insbesondere im Rahmen der Klonalitätsuntersuchungen deutlich, bei denen neben monoklonalen auch biklonale Tumoren nachgewiesen wurden. Demgegenüber standen Fälle mit gastraler lymphfollikulärer Hyperplasie und tumorartiger Organausbreitung ohne nachweisbare Klonalität. Auch diese neusten Untersuchungen lassen die Frage offen, ob die Klonalität, bestimmt anhand des B-Zell-Rearrangements, unbedingt mit der Malignität des Tumors korreliert (Collins, 1997).

Anhand der V_H -Familien- und V_H -Gen-Analysen des Immunglobulinrezeptors wurde deutlich, daß sich die untersuchten Fälle auf molekularer Ebene in drei Gruppen einteilen lassen. Die erste Gruppe wird von den lymphfollikulären Hyperplasien gebildet, bei denen ein distinkter Tumor-B-Zell-Klon mit den zur Verfügung stehenden Techniken nicht identifiziert werden konnte. Der überwiegende Teil des untersuchten Gewebes wurde von nicht-neoplastischen B-Zell-Populationen ausgebildet, von denen 80 % somatische Mutationen im verwendeten V_H -Gen verglichen mit der Keimbahnsequenz, aufwiesen. Die mono- und biklonalen MALT-Typ Lymphome bildeten zusammen die Gruppen 2 und 3, wobei die Einteilung nicht anhand der Klonalität der Lymphome, sondern aufgrund vorhandener Mutationsmuster innerhalb des tumorspezifischen V_H -Gens erfolgt. Der entscheidende Unterschied sind die sogenannten „ongoing mutations“, welche in einem Teil der untersuchten MALT-Typ Lymphome nachgewiesen wurden und darauf hindeuteten, daß der Mechanismus der somatischen Hypermutationen bei den Tumor-B-Zellen der einen Gruppe noch aktiv war, vergleichbar den Befunden von Berek (1991) und Rajewsky (1996), die dieses Phänomen für normale Keimzentrums-B-Lymphozyten zuerst beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten Tumor- V_H -Sequenzen der dritten Gruppe jeweils ein klonspezifisches einheitliches Mutationsmuster, welches charakteristisch für Gedächtnis-B-Zellen der Marginalzone ist (Berek, 1991; Rajewsky, 1996), bei denen der Prozeß der Affinitätsreifung offensichtlich schon abgeschlossen wurde.

Interessant dabei ist die Frage, welche Mechanismen bei der Ausbildung von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen von Bedeutung sind und es dem Tumor ermöglichen phänotypisch einheitliche Tumorzellen zu generieren, die sich jedoch genotypisch nicht unerheblich voneinander unterscheiden. In diesem Zusammenhang ist auch die Rolle der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten

(TITL) und deren Einfluß auf die Tumorprogression von großer Bedeutung. Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse der B-Zell-Rezeptoranalysen und der Charakterisierung der TITLs, wurde folgendes Modell für die Tumorentwicklung bei gastralen MALT-Typ Lymphome entworfen.

Aufgrund der *H. pylori* bedingten Antigenstimulation bildet sich im Verlauf der Erkrankung eine Organentzündung mit allen Charakteristika eines mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT), ähnlich den Peyerschen Plaques im Ileum aus (Isaacson, 1983; Hussell, 1993; Eidt, 1994; Greiner, 1994; Greiner, 1996). Dabei wandern die aktivierten B-Zellen in die Sekundärfollikel ein und erhalten aufgrund von T/B-Zell-Wechselwirkungen über CD40/CD40-Ligand und andere Moleküle, positive Proliferationssignale und beginnen zu expandieren. Einen indirekten Hinweis auf solch einen antigenvermittelten Wirkungsmechanismus bei niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen erhielt man aufgrund von klinischen Studien, bei denen sich nach Antibiotikabehandlung und der Eradikation von *H. pylori* das gastrale niedrig-maligne MALT-Typ Lymphom und das reaktive Entzündungsinfiltrat zurückbildeten (Wotherspoon, 1993; Bayerdorffer, 1995; Fischbach, 1997). Der Grund dafür ist möglicherweise das Fehlen des bakteriellen Antigenstimulus zur Aktivierung der T-Zellen, die dadurch ihrerseits nicht mehr in der Lage sind die Tumorzellen zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen. Das Wachstum des Tumors wird somit nicht mehr exogen durch T-Zellen und Antigen gefördert und folglich bildet sich die Neoplasie zurück.

Frühere Untersuchungen zeigten, daß Tumor-B-Zellen von niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen Autoantigenrezeptoren exprimierten (Hussell, 1993; Greiner, 1994). Daraus ergibt sich die Frage nach den notwendigen Voraussetzungen die gegeben sein müssen, um es auto- oder polyreaktiven Tumor-B-Zellen zu ermöglichen in dem Mikromilieu eines Keimzentrums ungehindert zu expandieren und zu Gedächtnis-B-Zellen heranreifen zu können (siehe 2.1.2.1, 2.1.2.2). Eine mögliche Rolle könnte dabei eine gestörte T/B-Zell-Kooperation spielen, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß es sich bei den TITL sowohl um aktivierte (CD69⁺), als auch um immunkompetente (CD28⁺) T-Zellen handelte, die zudem die beiden für T/B-Zell-Wechselwirkungen wichtigsten Proteine, CD40-Ligand und Fas-Ligand exprimierten. Des weiteren konnten verschiedene Cytokine innerhalb der Tumoren nachgewiesen werden, die ebenfalls eine Schlüsselfunktion im „Dialog“ zwischen T- und B-Zellen übernehmen. Dabei handelte es sich fast ausschließlich um Cytokine, die im Normalfall an einer T_H2-gerichteten Immunantwort beteiligt sind (IL10, IL13, TGFβ₁) und zusätzlich einen proliferations- und differenzierungsfördernden Einfluß auf normale B-Zellen ausüben (Banchereau, 1994; Defrance, 1994; Garcia, 1996). Somit ist es naheliegend, daß diese Effekte auch maßgeblich an der Entwicklung der Tumor-B-Zellen beteiligt

sein können, da die Tumorzellen *in vitro* vor allem auf CD40-Stimulation in Kombination mit T_H2-Cytokinen (Greiner, 1997) besonders stark proliferieren. Jedoch unterscheiden sich auch in diesem Punkt die normalen Gedächtnis-B-Zellen nicht von den Tumor-B-Zellen.

Demgegenüber geben neuere Ergebnisse von Gronbaek (1998) und Seeberger (unveröffentlichte Daten) Hinweise auf die möglichen Fehlerquellen innerhalb des Kontrollmechanismus. Beide Autoren fanden heraus, daß in etwa 60 % bis 100 % aller niedrig-malignen MALT-Typ Lymphome die Tumor-B-Zellen Mutationen im Fas/CD95 Molekül aufwiesen und somit möglicherweise der Fas-Rezeptor nur noch eingeschränkt funktionsfähig war. Dabei ist der Rezeptor zwar noch in der Lage den Liganden (Fas-Ligand/CD95-L) zu binden, jedoch erfolgt keine Weiterleitung des Apoptosesignals in das Zellinnere (Greiner, 1998). Diese Fehlfunktion des Fas-Rezeptors ermöglicht es den Tumor-B-Zellen sich dem negativen T-Zell-vermittelten Selektionsmechanismus des Keimzentrums zu entziehen und verschafft ihnen dadurch einen Überlebensvorteil gegenüber normalen B-Zellen. Dies bedeutet, daß die eigentlich janusköpfige T-Zell-Hilfe der TITLs beschränkt wird auf die positiven, proliferations- und differenzierungsfördernden Signale und der negative, regulatorische Einfluß der T-Zellen von den Tumor-B-Zellen aufgrund des defekten Apoptoserezeptors unterbunden wird.

Das in dieser Arbeit entwickelte Zellkultursystem zur Simulation des Keimzentrumsmikromilieus wird die Möglichkeit bieten *in vitro* T/B-Zell-Interaktionen zu studieren und näher zu untersuchen. Das Prinzip dieses Cokultursystems Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/Fas-L basiert auf der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk⁻, die neben humanem CD32 und CD40-Ligand auch humanen Fas-Ligand exprimiert. Aufgrund dieser Tatsache besteht die Möglichkeit humane B-Zellen, die mit der Fibroblastenlinie kokultiviert werden, parallel über CD40-Ligand und Fas-Ligand zu stimulieren. Zusätzlich kann mit Hilfe von CD32 und monoklonale Antikörper noch ein drittes, frei wählbares Signal auf die B-Zelle übertragen werden (siehe Abbildung 43). Mit diesem System ist man in Zukunft in der Lage, keimzentrumsspezifische Signalkombinationen und -wege auf vereinfachte und leicht handhabbare Weise *in vitro* zu untersuchen und zu verstehen.

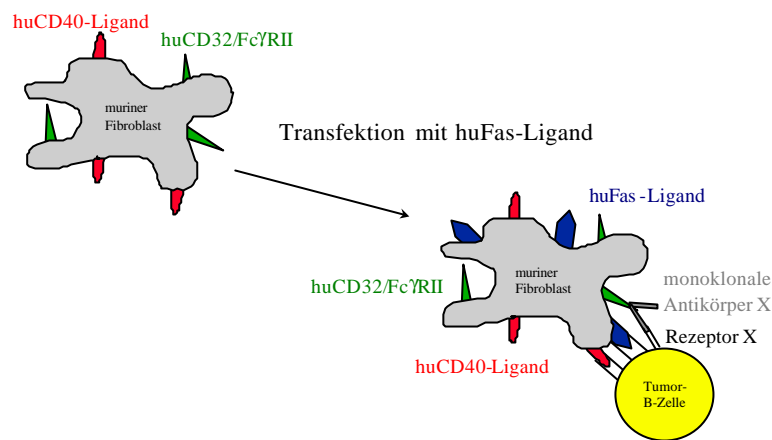


Abbildung 43: Zellkultursystem zur Simulation eines keimzentrumsartigen Mikromilieus.

Da jedoch in der vorliegenden Arbeit die Fas-Ligand-Expression der Zelllinie nur quantitativ im Gesamtproteinaufschluß bestimmt wurde, müssen nachfolgende Tests noch die Funktionalität des vorhandenen Liganden beweisen. Hierfür wurde schon vorab ein Apoptoseassay etabliert, der bei dieser Fragestellung genutzt werden könnte. Das Prinzip dieses Assays besteht darin, daß Fas-positive Testzellen mit den transfizierten murinen Fibroblasten kokultiviert werden. Aufgrund der Interaktionen zwischen Fas-Ligand auf der Oberfläche der Fibroblasten und Fas auf den Testzellen, kommt es zu einer Apoptoseinduktion. Parallel dazu sollte jedoch mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper die CD40-Ligand-Molekül in ihrer Funktion gehemmt werden, damit ausgeschlossen werden kann, daß die zu testenden Zellen nicht über CD40-Ligand beeinflusst werden und das Testergebnis verfälschen. Die Testzellen werden anschließend wieder aus dem Kultursystem entnommen und mit einem Farbstoff angefärbt, der es erlaubt mit Hilfe von FACS-Analysen zwischen lebenden, toten und apoptotischen Zellen zu unterscheiden (Philpott, 1995)(5.2.3.15). Erhält man bei diesem Versuchsansatz ein positives Ergebnis, das heißt es konnte Apoptose mit dem artifiziell exprimierten humanen Fas-Ligand induziert werden, dann kann das Kultursystem für die eigentlichen Untersuchungen verwendet werden.

Eine gestörte T/B-Zell-Interaktion steht somit möglicherweise am Anfang der MALT-Typ Lymphomentstehung und würde die Autoreaktivität des Antigenrezeptors der Tumoren aber noch nicht deren klonale Heterogenität erklären. Vielmehr stellt sich zudem die Frage, welche zusätzlichen Mechanismen, neben den beschriebenen Fas-Mutationen, für die Ausbildung von mono- und

biklonalen MALT-Typ Lymphomen gegenüber polyklonalen lymphfollikulären Hyperplasien verantwortlich sind. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei möglicherweise die von Ott (1997) in niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen beschriebene und von Dierlamm (1999) auf molekularer Ebene näher charakterisierte spezifische reziproke Translokation $t(11;18)(q21;q21)$, die ebenfalls in einem Großteil der hier untersuchten Fälle mittels RT-PCR-Untersuchungen von Kalla (unveröffentlichte Daten) nachgewiesen werden konnte. Von dieser Translokation sind zwei Gene betroffen, wobei es sich auf Chromosom 11 um das apoptoseinhibitorische HIAP1 (**h**uman **i**nhibitor of **a**poptosis **p**rotein **1**) handelt (LaCasse, 1998; Deveraux, 1999) und auf Chromosom 18 um das funktionell noch nicht näher charakterisierte MLT-Gen (**M**ALT **l**ymphoma associated **t**ranslocation). Betrachtet man die Ergebnisse unter 3.1.3/Tabelle 3 so ist deutlich zu sehen, daß ausnahmslos mono- und biklonale Lymphome die Translokation aufweisen, nicht aber die lymphfollikulären Hyperplasien. Offensichtlich scheint die Translokation für einzelne Tumorzellen neben den Fas-Mutationen, einen zusätzlichen Selektionsvorteil gegenüber den restlichen Lymphom-B-Zellen darzustellen. Dieser Vorteil ermöglicht es ihnen sich in einem derart großem Umfang zu vermehren, daß der Tumor ausschließlich von einem und/oder zwei B-Zell-Klonen gebildet wird. Welchen konkreten Einfluß, das durch die Translokation entstandene Fusionsprotein HIAP1-MLT auf die Tumor-B-Zellen hat und welche Wirkungsmechanismen damit verbunden sind, ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch völlig unklar. Da es sich jedoch bei einem der beiden Translokationsgene um HIAP1 handelt, dessen Genprodukt antiapoptischen Eigenschaften besitzt, könnte man sich durchaus vorstellen, daß diese auch für die Tumorklonexpansion von Vorteil sind. In nachfolgenden Untersuchungen sollte aufgrund dessen das Augenmerk auf die grundlegenden Funktionsweisen und Eigenschaften der beiden Einzel- (HIAP1, MLT) und Fusionsproteine (HIAP1-MLT, MLT-HIAP1) gelegt werden. Diese Ergebnisse werden zu einem besseren Verständnis der Rolle der Translokation $t(11;18)(q21;q21)$ innerhalb der Tumorentstehung beitragen und eröffnen eventuell auch neue Ansatzpunkte, Strategien für zukünftige therapeutische Maßnahmen zu entwickeln.

Betrachtet man die für die Translokation $t(11;18)(q21;q21)$ positiven MALT-Typ Lymphome so zeigt sich, daß sich diese Gruppe in Tumorklone mit und ohne „ongoing mutations“ unterteilt. Einerseits wäre es denkbar, daß es sich bei den Tumoren mit „ongoing mutations“ um Fälle handelt, die nicht aus Marginalzonen-B-Zellen (Gedächtnis-B-Zellen) entstanden sind, sondern aus Keimzentrums-B-Zellen, welche sich noch im Prozeß der Affinitätsreifung befanden. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, daß die Zellen phänotypisch eindeutig Gedächtnis-B-Zellen entsprechen und nach neueren Untersuchungen das malignen Gegenstück zu den IgM^+IgD^- mutierten Gedächtnis-B-

Zellen darstellen (Klein, 1997; Klein, 1998). Wahrscheinlicher ist es, daß die Tumor-B-Zellen erneut aus dem Tumor in das Keimzentrum eingewandert sind und somit weitere somatische Hypermutationen in den entsprechenden V_H-Genen generiert werden konnten. Dies würde bedeuten, daß die Tumorklone mit einheitlichem Mutationsmustern weitaus kürzere Zeit dem Mechanismus der somatischen Mutation ausgesetzt waren als die Fälle mit „ongoing mutations“. Im Hinblick auf die Tatsache, daß bei B-CLL-Fällen vor nicht allzu langer Zeit erkannt wurde, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten mit dem Mutationsmuster des Tumor-V_H-Gens korreliert (Damle, 1999; Hamblin, 1999; Naylor, 1999), macht deutlich, daß die molekulargenetische Bestimmung des Entwicklungsstandes der Tumor-B-Zellen durchaus auch wichtige Informationen für die Wahl der Therapie haben kann. Dieses Beispiel zeigt auch, daß Tumorklone, die aus einer naiven B-Zelle entstanden waren, schlechter mit Chemotherapie behandelt werden konnten und die betroffenen Personen eine weitaus geringere Lebenserwartung hatten, als die Patienten deren Tumoren aus Postkeimzentrums-B-Zellen hervorgingen. Daher könnte in Zukunft auch bei den niedrig-malignen MALT-Typ Lymphomen die Information therapiebeeinflussend sein, ob die Klonalität, das Vorhandensein von intraklonalen Variationen und der Translokation t(11;18) in Korrelation zum Krankheitsverlauf des Lymphompatienten und seinen Therapieerfolg nach Eradikationsbehandlung stehen. Vielleicht ist es auch bei den hier untersuchten Lymphomen möglich, basierend auf den molekularen Unterschieden der einzelnen Tumoren, unterschiedliche Behandlungsstrategien zu entwickeln, die es ermöglichen die Krankheit weitaus differenzierter und abhängig vom molekularen Status zu behandeln.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Enzyme, Chemikalien und Geräte

5.1.1.1 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biozym (Oldendorf), Boehringer (Mannheim), GIBCO BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Mannheim) und Stratagene (Amsterdam) bezogen.

5.1.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth GmbH (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) geliefert.

Die Medienbestandteile für molekularbiologische Methoden wurden von GIBCO BRL (Eggenstein) bezogen. Die Firma Linaris (Bettingen am Main) lieferte RPMI, Seramin, Gentamycin und Ficoll.

5.1.1.3 Antikörper

Die Antikörper für ELISA-, FACS- und Western-Blot-Analysen wurden von folgenden Firmen bezogen: Becton Dickinson (Heidelberg), Dako (Hamburg), Pharmingen (San Diego, USA).

Magnetische Beads gekoppelt mit Antikörpern zur Zelldepletion wurden von der Firma Dynal (Oslo) bezogen.

5.1.1.4 Arbeitsgeräte und Hilfsmittel

Elektrophoreseapparatur GNA100 und GNA200, Powersupply EPS 200 und GPS200/400
Blotapparatur Novablot: Amersham-Pharmacia-Biotech (Freiburg); Minigel-Twin: Biometra (Göttingen); PCR-Maschine Touch Down: Hybaid (Heidelberg); Gene Amp 2400: Perkin Elmer (Langen); Zentrifugen: Eppendorf (Hamburg); Heraeus (Hanau); Beckman (München); Mikroskope: Zeiss (Jena); Spektrometer: Kontron; FACScan[®] (Argonlaser, 488nm) mit der dazugehörigen Software LYSIS II: Becton Dickinson (Heidelberg); Videoauswerteeinheit: MWG (Ebersberg); UV-Schirm UVT 20M/W: Herolab;

Protran/Nitrocellulose-Transfermembran: Schleicher und Schuell (Dassel); BiomaxMR: Kodak (New York); 3MM Chromatographiepapier: Whatman (Madstone, England); GenElute™ Minus EtBr: Supelco (Bellefonte, USA); Spritzen und Kanülen: Becton Dickinson (Heidelberg und Terumo, Leuven, Belgien); Insulinspritzen: Omnicon® 80, Braun, (Melsungen);

5.1.1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

Low TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA
10 x TBE	3 mM Tris; 20 mM EDTA; 0,5 M Borsäure
10 x MOPS	400 mM MOPS; 1 mM Na-Acetat; 100 mM EDTA
Auftragspuffer (nativ)	50 % Sucrose; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol FF
Auftragspuffer (denaturierend) für RNA-Gele	10 µl 10 x MOPS; 10 µl Formaldehyd; 50 µl Formamid; 10 µl nativer Auftragspuffer; 1 µl Ethidiumbromid
PBS	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O; 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O
FACS-Puffer	1 x PBS mit 0,01 % NaN ₃ (w/v); Lösung durch 0,1 µm Nitrozellulosemembran filtriert
FACS-Färbepuffer	FACS-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA
Citratpuffer	7,15 g/l Citronensäure, 177,99 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
EDTA-Puffer	0,2 g/l EDTA; 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O; 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O; pH7,1 - 7,3
Ethidiumbromid	40 mg/ml in H ₂ O; 40 µl ad 2 l 0,5 x TBE
Trypanblau	5 g/l Trypanblau, 9 g/l NaCl gelöst in H ₂ O
X-Gal	1 mg X-Gal in 50 µl Dimethylformamid

Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O
Gentamycin	10 mg/ml in H ₂ O
G418/Neomycin	50 mg/ml in H ₂ O
Ionomycin	0,5 mg/ml
TPA	1 mg/ml
Superfect® (Qiagen, Hilden)	3 mg/ml
RNAse A-Lösung	20 mg/ml, thermostabile RNAsen 30 min kochen
Ponceau-Stocklösung	0,5 g Ponceau-S, 1 ml Essigsäure, ad 100 ml H ₂ O; wird vor Gebrauch 1:10 mit H ₂ O verdünnt
Bradford-Reagenz (Bio-Rad)	100 mg Coomassie brilliant blue G-250; 30 mg SDS; 50 ml 96 % EtOH; ad 200 ml H ₂ O; wird vor Gebrauch 1:5 mit H ₂ O verdünnt
BSA	1 µg/µl in H ₂ O

5.1.1.6 Nährmedien für Bakterien

Millers' LB-Boullion Basis	10 g/l SelectPepton (GIBCO BRL, Eggenstein); 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1,2% Agar (w/v)
LB _{amp} -Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
SOB-Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl ad 1l H ₂ O; autoklavieren; Zugabe von je 10 ml sterilem 1 M MgCl ₂ und 1 M MgSO ₄
SOC-Medium	2 ml sterile 20 % (w/v) Glucose ad 100 ml SOB-Medium

5.1.1.7 Nährmedien für eukaryontische Zellen

Grundmedium	RPMI mit 10 % Seramin und 60 µg/ml Gentamycin
G418-Selektionsmedium	Grundmedium mit 300 µg/ml oder 400 µg/ml G418

5.1.2 Plasmide und Oligonukleotide

5.1.2.1 Plasmide

Für die Klonierungen wurde der Vektor pCR-Script von Stratagene (Amsterdam) verwendet. Für die Transfektion der eukaryontischen Zelllinie Ltk⁻/huCD40-L/huCD32 wurde der Vektor pCI-NEO von Promega (Mannheim) eingesetzt. Beide Plasmide tragen eine Ampicillinresistenz. Der Vektor pCI-NEO trägt zusätzlich noch eine Neomycinresistenz als Selektionsmarker in eukaryontischen Zellen.

5.1.2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden in Auftragssynthese von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt und bezogen.

Universalprimer:

M13-REV

M13-UNI

T3

T7

T3-pCI-NEO

T7-pCI-NEO

5.1.3 Bakterienstämme, Primärzellen und Zelllinie

5.1.3.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende Stämme der Spezies *Escherichia coli* verwendet: DH5 α (Woodcock, 1989); XL1-Blue MRF['] (Stratagene, Amsterdam).

5.1.3.2 Primärzellen

normale Lymphozyten

PBL

Buffycostat

Tonsille

Primäres Lymphommaterial:

Tabelle 12: Verwendetes Probenmaterial.

Fall	Fall-Nr.	Lokalisation	Diagnose	Stadium	t(11;18)(q21;q21)	Ig-Typ
#1	H705/93	Magen	niedrig-maligne	EI2	nein	M, κ
#2	20867/93	Magen	niedrig-maligne	EIII1	n.d.	M, λ
#3	H6538/96	Magen	niedrig-maligne	EI2	ja	M, κ
#4	H6006/95	Magen	niedrig-maligne	EI2	nein	M, κ
#5	20401/91	Magen	niedrig-maligne	EI1	nein	M, κ
#10	4236/95	Magen	niedrig-maligne	EI2	nein	M, κ
#11	H4886/95	Magen	niedrig-maligne	EIII1	ja	M, κ
#13	H1851/95	Schilddrüse	niedrig-maligne	n.d.	ja	M, λ
#14	H4364/94	Magen	niedrig-maligne	EIII1	ja	M, λ
#15	H5690/95	Magen	niedrig-maligne	EI2	nein	M, κ
#16	H1800/95	Magen	niedrig-maligne	EI1	ja	?, λ
#17	24211/91	Magen	niedrig-maligne	EI1	ja	M, κ
#18	H4145/91	Lunge	niedrig-maligne	n.d.	ja	A, λ
#19	H3302/88	Lunge	niedrig-maligne	n.d.	ja	M, λ
#20	3682/94	Schilddrüse	niedrig-maligne	n.d.	(nein)	M, κ
#21	22903/96	Magen	niedrig-maligne	EI2	(nein)	M, κ
#22	H1608/95	Magen	niedrig-maligne	EI2	ja	M, κ
#23	H3976/92	Magen	niedrig-maligne	EIII1	nein	M, κ
#24	H1689/94	Speicheldrüse	niedrig-maligne	n.d.	ja	M, κ
#12	1020/95	Magen	Gastritis	--	n.d.	--
#6	H6031/94	Magen	hoch-maligne	EIII1	n.d.	M, κ
#7	H4365/94	Magen	hoch-maligne	EIII1	n.d.	M, κ
#8	H5030/94	Magen	hoch-maligne	EI2	n.d.	M, κ
#9	H4997/94	Magen	hoch-maligne	EI2	n.d.	M, κ

Stadium nach Musshoff (1977)

5.1.3.3 Zelllinien

Ltk⁻/huCD32; Ltk⁻/huCD40-L/huCD32; Ltk⁻/muFas-L

Jurkat

C8166

5.1.3.4 Antikörper für FACS-Analysen

anti-CD19_{HD 37, Sigma}; anti- κ _{KP-53, Sigma}, anti- λ _{HP6054, Sigma}; anti-CD3_{UCHT-1, Sigma}; anti-CD14_{Leu-M3, Becton Dickinson}; anti-CD40_{mAb89²⁴}; anti-CD4_{R-8886, Sigma}; anti-CD8_{R-806, DAKO}; anti-CD38_{MHCD3804, MEDAC}; anti-IgD_{I-2768, Sigma}; anti-IgM_{P-9295, Sigma}; anti-CD25_{R-811, DAKO}; anti-CD69_{BD 347823, Becton Dickinson};

Alle Antikörper waren direkt konjugiert mit FITC, PE oder Tricolor/QR.

5.1.3.5 Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Für Immunperoxidasefärbungen wurden folgende Antikörper von DAKO (Deutschland) verwendet: anti-Kaninchen, -Ratte und -Maus.

Für die APAAP-Färbung des humanen CD40-Liganden wurde der Maus-anti-human Antikörper TRAP von RA Krozcek (Berlin) verwendet.

Weitere immunhistochemische Färbungen wurden mit folgenden Antikörpern durchgeführt: Kaninchen-anti-human Fas-Ligand (SC-834-G, Santa Cruz, USA), Ratte-anti-human IL-2 (MQ1-17H12, Pharmingen, Deutschland), Maus-anti-human IL-10 (Mab 2,17; R&D Systems, Deutschland), Ratte-anti-human IL-13 (JES10-5A2, Pharmingen, Deutschland) und TGF β ₁ (BMS4435, Boehringer Mannheim, Deutschland).

5.1.3.6 Antikörper für Western-Blot-Analysen

Für Western-Blot-Analysen wurden folgende Antikörper verwendet: Maus-anti-huCD40-Ligand (TRAP; RA Krozcek, Berlin), Maus-anti-huFas-Ligand (Klon G247-4; Pharmingen, Deutschland).

5.1.3.7 Antikörper zur Zelledepletion

Entweder wurden Zellen mit magnetischen Beads von Dynal (Deutschland), die schon mit den entsprechenden Antikörpern gekoppelt waren, depletiert. Oder aber unkonjugierte Beads konnten mit beliebigen Antikörpern gekoppelt werden. Hierbei wurden die beiden Antikörper CD38⁺ (clone ACT 13.5, Serotec, Deutschland) und IgD⁺ (clone HJ9, Sigma, Deutschland) verwendet.

5.1.4 Größenstandard

Als Größenstandards für DNA-Agarosegele wurden eine 123 bp Leiter (GIBCO BRL, Eggenstein) und Lambda DNA, hydrolysiert mit dem Restriktionsenzym ClaI, verwendet. Die verwendete Lambda DNA (NEB, Schwalbach) hat ein Molekulargewicht von $31,5 \times 10^6$ Da und umfaßt 48502 bp. Nach der Hydrolyse mit ClaI ergaben sich Banden mit folgender Größe: 11385/10496 bp; 6262 bp; 4398/4198 bp; 3673 bp; 2614 bp; 1915 bp; 1804 bp; 1704 bp; 1112 bp; 937 bp; 657 bp; 537 bp; 352 bp.

Rainbowmarker von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) wurde als Größenstandard für SDS-Proteingele verwendet. Die farbigen Banden entsprechen folgenden Proteingrößen: blau: 250 kD, rot: 160 kD, grün: 105 kD, gelb: 75 kD, violett: 50 kD, blau: 35 kD, orange: 30 kD, grün: 25 kD, blau: 15 kD, rot: 10 kD.

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1 Kultivierung von prokaryontischen Zellen

5.2.1.1.1 Fest-und Flüssigkultur von Bakterienstämmen

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde aus dem gefrorenen Bakterienglycerolstock etwas Zellmaterial entnommen und mit einem Dreiösenausstrich auf eine LB-Platte überimpft. Die Platte wurde ÜN bei 37°C bebrütet.

Für eine 250 ml ÜN-Suspensionskultur von Bakterien wurde mit einer ausgeglühten Impföse eine einzelne Kolonie in LB-Medium überführt. Für eine 3ml ÜN-Kultur einer Minipräparation von Plasmid-DNA wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher überimpft.

5.2.1.1.2 Dauerkulturen von Bakterien

Für Langzeitlagerung von Bakterienklonen wurden 800 µl ÜN-Kultur mit 200 µl 50 % Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert.

5.2.1.2 DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe

Am Kryostaten wurden 30 bis 40 Schnitte mit 10 µm Dicke vom Gefrierblock abgeraspelt und in einem auf -20°C gekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Gewebeschnitte wurden in 50 ml 1 x PBS aufgenommen, gewaschen und bei 1720 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 20 ml 1 x PBS wiederholt. Das Pellet wurde in 4,5 ml 1 x TNE (10 x TNE: 10 mM Tris, pH 7,5; 10 mM NaCl; 1 mM EDTA), 250 µl 10 % SDS und 2,5 mg Proteinase K (10 mg/ml) resuspendiert, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und ÜN bei 37°C inkubiert. Nach dem Proteinase K-Verdau wurde der Ansatz 3 x mit Phenol, 1 x mit Phenol/Chloroform und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Daraufhin erfolgte die Fällung der genomischen DNA mit Na-Acetat/Isopropanol 1 h bei -80°C. Nach der Fällung wurde 30 min bei 3430 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und 20 min bei RT getrocknet. Resuspendiert wurde die genomische DNA in sterilem H₂O.

5.2.1.3 DNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen

RSB-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,4
	10 mM NaCl
	3 mM MgCl ₂
TENS	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
	40 mM EDTA, pH 8,0
	200 mM NaCl
	1 % SDS
	50 µg/ml Proteinase K

1 x 10⁵ bis 1 x 10⁸ Zellen wurden in 1ml eiskaltem PBS resuspendiert und 10 s bei 15800 x g pelletiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in 400 µl RSB-Puffer mit 0,5 % Triton x 100 vermischt und 4 min auf Eis gestellt. Nach der Zelllyse wurden die Zellkerne 10 s bei 15800 x g abzentrifugiert und mit 100 µl RSB-Puffer gewaschen. Zum Kernpellet wurden daraufhin 400 µl RSB-Puffer, versetzt mit 25 µg/ml RNase, gegeben und die Lösung 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden der Lösung 400µl TENS mit 40 µg Proteinase K zugegeben und ÜN bei 37°C inkubiert. Nach dem Proteinase K-Verdau wurden 220 µl 5 M NaCl hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 30 s gevortext und dann 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die genomische DNA wurde mit 2 Volumen 96 % EtOH bei 15800 x g 20 min gefällt, mit 70 % EtOH gewaschen und in 10 - 20 µl Low TE aufgenommen. Aus 1 x 10⁶ eukaryontischen Zellen gewinnt man ca. 5 µg genomische DNA.

5.2.1.4 Phenol-, Chloroform-Isoamylalkohol (CIA), Chloroformextraktion

Zur Aufreinigung einer DNA-haltigen Lösung wurde diese mit dem gleichen Volumen Phenol, Chloroform oder doppelten Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (CIA) (24:1) versetzt und 30 s gevortext. Durch 5 min Zentrifugation (15000 x g) bei RT wurde die Emulsion wieder in ihre Phasen getrennt. Die obere, aquatische Phase enthält die zu isolierende DNA. Diese wurde in ein neues Cap überführt.

5.2.1.5 DNA-Fällung

DNA wurde je nach Bedarf an Qualität oder Quantität nach drei unterschiedlichen Methoden gefällt. Sollte die DNA möglichst rein sein und einen geringen Anteil an einwertigen Salzen enthalten, so wurde mit doppeltem Volumen 96 % Ethanol bei -20°C , 30 min gefällt. Wurde mehr Wert auf Quantität als auf Qualität bei der DNA-Fällung gelegt, so erfolgte eine Isopropanolfällung (1/10 Volumen 5M Na-Acetat + 1 Volumen Isopropanol; 30 min, -20°C). Bei beiden Fällungen wurde anschließend 30 min bei $15\ 800 \times g$, RT, zentrifugiert. Eine dritte Methode der Fällung stellte die Ammoniumacetatfällung dar. Hier wurde die DNA-haltige Lösung mit 1 Volumen NH_4 -Acetat (4°C) + 2 Volumen 96 % Ethanol (RT) versetzt und sofort 30 min bei max. Geschwindigkeit in einer Eppifuge zentrifugiert.

Das DNA-Pellet wurde je nach Bedarf in sterilem H_2O oder Low TE gelöst.

5.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Extinktion der DNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ mg/ml} = \text{mg DNA/ml}$$

5.2.1.7 RNA-Isolation aus gefrorenem Gewebe (Chomczynski, 1987)

Gefriermaterial wurde im Kryostaten in $10 \mu\text{m}$ dicken Schnitten geraspelt. Pro RNA-Isolierung wurden rund 30 bis 40 Schnitte verwendet. Diese wurden in $1000 \mu\text{l}$ TRIZOL[®] (GIBCO BRL, Eggenstein) aufgenommen und auf Eis gestellt. Zur Homogenisierung des Gewebes wurde mit unterschiedlich starken Kanülen und 1 ml Spritzen geschert. Das Gewebe mußte nach Beendigung so homogen sein, daß es problemlos durch eine Insulinkanüle aufgezogen werden konnte.

Daraufhin wurden pro Ansatz $10 \mu\text{g}$ einer Glykogenlösung (20 mg/ml) hinzugegeben und der Ansatz 2 - 3 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Chloroform und 30 s vortexen. Daraufhin wurde bei 4°C und $10000 \times g$ 15 min zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde in ein neues Cap überführt und mit $500 \mu\text{l}$ Isopropanol versetzt. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte 10 min bei RT und einer anschließender Zentrifugation wie im vorherigen Schritt. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und im Heizblock bei 65°C 10 min getrocknet. Die RNA wurde mit $30 \mu\text{l}$ DEPC-Wasser versetzt, 10 min bei 65°C inkubiert und 30 s gevortext. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C .

5.2.1.8 RNA-Gel

Für ein 50 ml RNA-Gel wurden 0,75 g Agarose in 36,3 ml DEPC-H₂O aufgekocht und der Volumenverlust nach dem Aufkochen mit DEPC-H₂O ausgeglichen. Der flüssigen Agarose wurden daraufhin noch 8,7 ml Formaldehyd und 5 ml 10 x MOPS RNAse-frei zugemischt.

Von der zu analysierenden Gesamt-RNA wurden 2 µl mit jeweils 8 µl Denaturierungspuffer vermischt, 15 min auf 65°C inkubiert, danach kurz auf Eis gestellt und dann auf das Gel aufgetragen. Der Laufpuffer bestand aus 1 x MOPS.

5.2.1.9 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentration wurde über die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ mg/ml} = \text{mg RNA/ml.}$$

5.2.1.10 Synthese von cDNA

Die RNA wurde aufgetaut und 10 min bei 65°C inkubiert und gevortext. Für eine cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz pipettiert:

5 µl gRNA (1 µg)
2 µl Oligo-dT₁₅ (1 µg/µl)
1 µl Random-Primer (50 nM)

Der Ansatz wurde 10 min bei 65°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Folgende Chemikalien wurden pro Ansatz hinzupipettiert:

5.5 µl H₂O
5 µl 5 x First-Strand-Puffer
2.5 µl 100 mM DTT
2.5 µl 10 mM (jedes 10 mM) dNTPs
0.8 µl RNasin[®] (40000 U/ml) (PROMEGA, Mannheim)
1.0 µl mMLV-RT (200 U/ml)

Es folgte eine 70-minütige Inkubation bei 37°C.

Danach wurde der Reaktionsansatz für 4 min auf 98°C erhitzt, zur Inaktivierung der reversen Transkriptase und anschließend auf Eis gestellt.

5.2.1.11 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) - Ansatz mit cDNA als Template

1 - 2 µl cDNA
2,5 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂
1,0 - 3,0 µl 25 mM MgCl₂
0,5 µl 10 mM dNTPs (jedes dNTP 2,5 mM)
0,5 µl 20pmol FORWARD-Primer
0,5 µl 20pmol REVERSE-Primer
0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
ad 25 µl H₂O

5.2.1.12 Prinzip der Optimierung einer PCR

Bei der Verwendung von neuen Primerpaaren wurden standardmäßig zu Beginn die Reaktionsbedingungen der PCR optimiert. Die cDNA von stimulierten PBLs (siehe 5.2.3.9) wurde als Template für die Amplifikation eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde, wie unter 5.2.1.11 beschrieben pipettiert und die MgCl₂-Endkonzentration von 0,5 mM bis 3,5 mM in 0,5-er Schritten ausgetestet. Zudem wurde mit einer Annealingtemperatur, die 5°C unter der nach folgender Formel berechneten Primerschmelztemperatur lag, begonnen:

$$T_M = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Ergab die gewählte Annealingtemperatur kein zufriedenstellendes Ergebnis, so wurde sie teilweise bis zur errechneten Schmelztemperatur der jeweiligen Primer erhöht.

5.2.1.13 GAPDH - PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese

Die Qualität der zu verwendenden cDNA wurde über eine GAPDH-spezifische PCR kontrolliert.

Folgender Ansatz wurde standardmäßig verwendet:

1 µl cDNA
2,5 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂
2,0 µl 25 mM MgCl₂
0,5 µl 10 mM dNTPs (each dNTP 2,5 mM)
0,5 µl 20pmol GAPDH-FOR
0,5 µl 20pmol GAPDH-REV

0,1 µl Taq-Polymerase (5U/µl)

17,9 µl H₂O

Die PCR erfolgte in der PCR-Maschine Touch Down von Hybaid (Heidelberg) unter der Funktion Tube Control:

94°C, 1 min

(94°C, 15 s / 65°C, 15 s / 72°C, 1 min) x 25

72°C, 2 min

4°C, ∞

5.2.1.14 Quantifizierung der cDNA-Menge anhand einer GAPDH-PCR

Um für nachfolgende semiquantitative PCRs die cDNA-Mengen aufeinander einzustellen, wurden bei der GAPDH-PCR nach 20, 22 und 24 Zyklen jeweils 7 µl des PCR-Ansatzes entnommen und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Bandenintensitäten wurden visuell miteinander verglichen und durch Titration der eingesetzten cDNA-Menge aufeinander abgestimmt. Die erhaltenen GAPDH-Banden sollten nach erfolgtem Mengenabgleich alle die gleiche Intensität aufweisen.

5.2.1.15 CDR3-PCR

Zur Amplifikation der CDR3-Region der schweren Immunglobulinkette wurde an cDNA oder genomischer DNA folgende PCR durchgeführt:

1 µl cDNA

2,5 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂

1,5 µl 25 mM MgCl₂

0,5 µl 10 mM dNTPs (each dNTP 2,5 mM)

0,5 µl 20pmol V_H-cons-FOR

0,5 µl 20pmol J_H-cons-REV

0,1 µl Taq-Polymerase (5U/µl)

17,9 µl H₂O

Die PCR erfolgte in der PCR-Maschine Touch Down von Hybaid (Heidelberg) unter der Funktion Tube Control:

94°C, 1 min

(94°C, 15 s / 62°C, 15 s / 72°C, 20 s) x 40

72°C, 4 min

4°C, ∞

5.2.1.16 V_H-Familien-PCR

Zur Amplifikation der jeweiligen fallspezifischen V_H-Familie der schweren Immunglobulinkette wurde der tumorspezifische Primer mit jedem der sechs V_H-Familienprimer kombiniert und eine RT-PCR durchgeführt:

1 µl cDNA

2,5 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂

1,5 µl 25 mM MgCl₂

0,5 µl 10 mM dNTPs (each dNTP 2,5 mM)

0,5 µl 20pmol V_H1(/2/3/4/5/6)-FOR

0,5 µl 20pmol Tumorprimer-REV

0,1 µl Taq-Polymerase (5U/µl)

17,9 µl H₂O

Konnte kein tumorspezifischer Primer ermittelt werden, so wurde statt dessen ein Gemisch aus Konsensusprimern für die J_H-Region verwendet. Die Primer J_H(1-5)+6-REV und J_H6 lagen in einem Mischungsverhältnis von 5:1 vor.

Die PCR erfolgte in der PCR-Maschine Touch Down von Hybaid (Heidelberg) unter der Funktion Tube Control:

94°C, 1 min

(94°C, 15 s / 61°C, 15 s / 72°C, 30 s) x 40

72°C, 4 min

4°C, ∞

Die angegebene Annealingtemperatur von 61°C wurde bei den Primern V_H1/2/5/6-FOR verwendet. Bei V_H3- und V_H4-FOR wurde die Temperatur auf 65°C erhöht. Lag die errechnete Schmelztemperatur des tumorspezifischen Primers unterhalb der angegebenen Temperaturen, so wurde die Annealingtemperatur dem Reverseprimer angepasst.

5.2.1.17 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel

5.2.1.17.1 Aufreinigung über GenElute[®] Minus EtBr (Supelco; Bellefonte, USA)

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und auf eine Säule, die vorab mit 100 µl LowTE equilibriert worden war, geladen und dann 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde durch Ammoniumacetatfällung aus dem Eluat gewonnen. Das mit 70 % EtOH gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 12 µl H₂O aufgenommen.

5.2.1.17.2 Aufreinigung mittels Gelase (Biozym, Oldendorf)

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Gelase (β-Agarase) erfolgte aus einem 2-3,5 % LMP-Gel. Hierfür wurde die DNA aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Pro 10 mg Gel wurden 30 µl 1 x Gelasepuffer zugegeben und 1h bei RT inkubiert. Der Puffer wurde danach vorsichtig abpipettiert und das Gelstück bei 70°C 5 min im Thermoblock geschmolzen. Die flüssige LMP-Agarose wurde auf 45°C abgekühlt und 1 U Gelase/600 mg 1 % LMP-Gel zupipettiert. Die Lösung wurde für 16 h in der PCR-Maschine konstant auf 45°C gehalten. Anschließend wurde eine Ammoniumacetatfällung mit dem aufgereinigten Fragment durchgeführt. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 12 µl H₂O aufgenommen.

5.2.1.18 „Bluntenden“ von PCR-Fragmenten

Da die verwendete Taq-Polymerase Poly-A-Überhänge an den Enden von PCR-Fragmenten produziert, mußten alle Fragmente, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, vor der Ligation „gebluntended“ werden. Dies erfolgte nach folgendem Ansatz:

10 µl PCR-Fragment in H₂O gelöst
1 µl 10 mM dNTP-Mix (jedes 2,5 mM)
1,3 µl 10 x Pfu DNA-Polymerase-Puffer
1 µl Pfu DNA-Polymerase (0,5 U)

Die bluntend-Reaktion wurde 30 min bei 72°C in der PCR-Maschine mit beheiztem Deckel inkubiert. Das behandelte PCR-Fragment wurde bei 4°C gelagert.

5.2.1.19 Ligation von DNA-Fragmenten

5.2.1.19.1 Bluntend-Ligation

Die bluntend-Ligation eines PCR-Produkts erfolgte mit dem Klonierungskit PCR-Script™ Amp Cloning Kit von Stratagene (Amsterdam) nach folgendem Ansatz:

1 µl pPCR-Script Amp SK(+) Klonierungsvektor (10 ng/µl)
1 µl 10 x PCR-Script-Reaktionspuffer
0,5 µl 10 mM rATP
4 µl bluntend-PCR-Fragment (mind. 40 x Überschuß zum Vektor)

1 µl SrfI Restriktionsendonuklease (5 U/µl)
1 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl)
1,5 µl H₂O

Die Ligation wurde für 1 h bei RT inkubiert und danach für 10 min auf 65°C erhitzt, um die eingesetzten Enzyme zu inaktivieren.

5.2.1.19.2 Sticky-end-Ligation

Für eine „sticky-end“-Ligation wurden der verwendete Vektor und das zu klonierende Fragment mit denselben Restriktionsenzymen verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Die nach der Aufreinigung erhaltenen DNA-Konzentrationen wurden visuell mit Hilfe eines Agarosegels bestimmt. Prinzipiell lag das zu klonierende Fragment mindestens im 10 x Überschuß zum Vektor im Ligationsansatz vor.

1 µl Vektor (500 ng/µl) verdaut mit Restriktionsenzym X
2 µl 10 x Ligasepuffer
10 µl Fragment (5 µg) verdaut mit Restriktionsenzym X
1 µl T4-Ligase
6 µl H₂O

Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 16°C im H₂O-Bad inkubiert. Zur Inaktivierung der T4-Ligase wurde die Ligation 10 min auf 65°C erhitzt.

5.2.1.20 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*s

Die zu transformierenden *E. coli*s wurden auf Eis aufgetaut und 40 µl in ein vorgekühltes 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Zu den kompetenten Bakterien wurden 0,7 µl β-ME pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde daraufhin 10 min auf Eis inkubiert und nach je 2 min nochmals vorsichtig gemischt. Danach wurden die 10 µl Ligationsansatz zupipettiert und es erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Der Transformationsansatz wurde dann für 45 s in ein 42°C Wasserbad und danach nochmals auf Eis gestellt. Nach 2 min wurden 450 µl 42°C warmes SOC-Medium hinzugegeben und die Bakteriensuspension 1 h bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde beim Ausplattieren auf zwei LB-Amp-Platten, die mit X-Gal versetzt waren, ausplattiert. IPTG zur Induktion des β-Galactosidase-Promotors wurde nicht hinzugegeben, da erfahrungsgemäß ohne Induktion mit IPTG eine bessere Blau-Weiß-Selektion möglich war.

5.2.1.21 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

GET 50 mM Glucose
 10 mM EDTA, pH 8,0
 25 mM Tris, pH 8,0

Lysispuffer 0,2 M NaOH
 1 % SDS

3 M K-Acetat 3 M Kalium/ 5 M Acetat, pH 4,8

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 1,5 ml aus einer 3 ml ÜN-Kultur entnommen und bei 5000 x g 5 min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl GET aufgenommen und mit dem Vortexer resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 µl Lysispuffer, die erhaltene Lösung wurde 5 x invertiert und für 5 min auf Eis gestellt. Nach Beendigung der Inkubation wurden 150 µl 3 M K-Acetat hinzugegeben, die Lösung vorsichtig gemischt und nochmals 5 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte eine 5 min Zentrifugation bei 15800 x g und der erhaltene Überstand wurde in ein neues Cap überführt. Durch Zugabe von 700 µl 96 % EtOH und 5 min Zentrifugation bei 15800 x g wurde die Plasmid-DNA bei RT gefällt. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 300 µl 70 % EtOH gewaschen und 5 min bei 65°C im Thermoblock getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in je 40 µl LowTE mit 20 µg/ml RNase gelöst.

1 mM EDTA

Aus einer Bakterienkolonie wurde eine 5 ml LB_{amp}-Tagkultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Mit der Tagkultur wurde dann eine 100 ml ÜN-Kultur angeimpft und ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde am nächsten Morgen bei 5000 x g pelletiert und das Pellet in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Zu der Lösung wurden dann 10 ml Puffer 2 bei RT vorsichtig hinzugegeben, einige Male behutsam invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 10 ml eiskalter Puffer 3 zupipettiert, die Lösung vorsichtig gemischt und sofort auf die mitgelieferte, unten verschlossene Filterspritze gegeben. Die Lösung inkubierte 10 min bei RT und wurde dann durch die Spritze filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde mit 2,5 ml EndoFree-Puffer versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Während der Inkubationszeit wurde die DNA-Aufreinigungssäule mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Danach wurde die gekühlte DNA-Lösung über die Säule gegeben. Das Prinzip der Säule bestand darin, daß die DNA am Säulenmaterial gebunden wurde und die restlichen Bestandteile der Lösung ungehindert die Säule passierten. Die Säule wurde daraufhin 2 x mit Puffer QC gewaschen und dann die DNA mit 15 ml Puffer QN wieder eluiert. Gefällt wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol bei RT und einer anschließenden Zentrifugation von 30 min, bei 15000 x g und 4°C. Das erhaltene Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert und 10 min luftgetrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die Plasmid-DNA in unterschiedlichen Volumina Low TE aufgenommen und resuspendiert.

5.2.1.23 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für einen Restriktionsverdau von Plasmid-DNA aus einer Minipräparation wurden 3 µl eines 40 µl Ansatzes verwendet. Folgender Standardansatz pro Restriktionsverdau wurde pipettiert:

3 µl Plasmid-DNA
1 µl 10 x Puffer der verwendeten Restriktionsendonuklease
1 Unit Restriktionsenzym
x µl H₂O ad 10 µl

Der Restriktionsverdau erfolgte 1,5 h bei 37°C im Inkubator.

5.2.1.24 Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese

DNA-Fragmente > 80 bp wurden über ein Agarosegel aufgetrennt. Standardmäßig erfolgte die Auftrennung über ein 2%iges Agarosegel. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE mit 0,8 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 2h bei 130 V. Die Dokumentation des Gellaufs erfolgte über eine Videoauswerteeinheit der Firma MWG (Ebersberg).

5.2.1.25 Cyclesequencing von DNA und Auswertung über ABI 373

Für die Sequenzierreaktion wurde der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer (Weiterstadt) verwendet:

2 µl Plasmid-DNA aus Minipräparation
5 µl Sequenzier-Master-Mix
1 µl 3,2 pmol Primer
12 µl H₂O ad 20 µl

Der Reaktionsansatz durchlief folgende PCR-Zyklen in der PCR-Maschine Touch Down von Hybaid (Heidelberg) unter simulated Tube Control:

(96°C, 10 s / 50°C, 15 s / 60°C, 4 min) x 25
∞ 4°C

Der Sequenzieransatz wurde danach über eine Sephadex G50 Säule in einer gelben Eppendorfspritze aufgereinigt und aus dem Eluat die amplifizierte DNA mit 2,0 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,6 und 50 µl 96 % EtOH 10 min auf Eis gefällt. Die DNA wurde bei 15800 x g 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % EtOH gewaschen und bei 65°C im Thermoblock gut getrocknet.

Die DNA wurde zum Auftragen auf das Sequenziergel in 3 µl Auftragspuffer (denaturierend) für Sequenziergele (Formamid und 50 mM EDTA, pH 8,0 im Verhältnis 5:1) gelöst und 2 min bei 90°C inkubiert. Bis zum Laden des Gels stand die denaturierte Probe auf Eis.

5.2.2 Proteinchemische Methoden

5.2.2.1 Gesamteproteinaufschluß (Laemmli, 1970)

1 x 10⁶ Zellen aus denen Gesamtprotein isoliert werden sollte, wurden pelletiert und je 100 µl 1x Lämmli-Puffer (0,05 M Tris/HCl, 100 mM β-ME, 2 % SDS, 10 % Glycerin) dazugegeben. Das Zellpellet wurde durch Vortexen resuspendiert und 5 min bei 100°C gekocht. Nach der Inkubation wurde mit einer Insulinkanüle die genomische DNA geschert und danach die Lösung 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Gesamtproteine und wurde bei -20°C eingefroren.

5.2.2.2 Gesamteproteinaufschluß zum Nachweis von Proteinen im ELISA

Die Zellen, aus denen Gesamtprotein isoliert werden sollte, wurden pelletiert und zu 1 x 10⁷ Zellen wurden 1000 µl 1 x Lysis-Puffer (0,5 % Triton-X-100, 20 mM Tris/HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1/10 Vol. 10 x Protease Inhibitors Set in PBS (Boehringer, Mannheim)) zugegeben. Das Zellpellet wurde mit der Pipette resuspendiert und die Lösung 30 min auf Eis gestellt. Nach der erfolgten Inkubation wurden die lysierten Zellen 10 min bei 15800 x g, RT zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die erhaltene Proteinlösung wurde sofort für den ELISA eingesetzt. Der Rest wurde bei -20°C tiefgefroren.

5.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford, 1976)

Das Bradfordreagenz mußte zuerst 1:5 mit H₂O verdünnt werden. Eine Standardkurve zur Proteinbestimmung wurde mit BSA vorgelegt. Dafür wurden 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µg BSA in 1000 µl Bradfordreagenz verdünnt. Von den zu vermessenden Proben wurde jeweils 1 µl in 1000 µl vermessen. Die Bestimmung der OD erfolgte bei 595 nm.

5.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970)

Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurde ein 10 bzw. 12 % Trenngel verwendet. Das Sammelgel hatte jeweils 5 %. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, welches zum Polymerisieren mit n-Butanol überschichtet wurde. Nach 25 min wurde das Sammelgel aufgegossen.

Trenngel 10 ml:	10 %	12,5 %
H ₂ O	4000 µl	3300 µl
30 % AAM	3300 µl	4000 µl
1,5 M Tris, pH 8,8	2500 µl	2500 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Sammelgel 5 %/ 3 ml:

H ₂ O	2100 µl
30 % AAM	500 µl
1,5 M Tris, pH 8,8	380 µl
10 % SDS	30 µl
10 % APS	30 µl
TEMED	3 µl

Bei der verwendeten Gelgröße wurden maximal 150 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Der Gesamtproteinlösung wurde 1/10 Volumen 2 x Lämmli mit Bromphenolblau (BPB) (0,1 M TrisHCl, pH6,8; 200 mM β-ME; 4 % SDS; 0,2 % BPB; 20 % Glycerin) untergemischt, 5 min bei 100°C inkubiert und dann auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 10 µl Rainbow-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 2h bei 100 V und 1 x Gellaufpuffer (5 x Stock: 25 mM Tris/HCl, pH8,3; 250 mM Glycin; 0,5 % SDS).

5.2.2.5 Western-Blot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mit Hilfe eines semi-dry Elektroblots. Der Blotaufbau von Anode zu Kathode war wie folgt: 3 Bögen 3MM-Papier befeuchtet mit Transferpuffer (48 mM Tris/HCl, pH8,0; 93 mM Glycin; 0,037 % (v/v) SDS; 20% Methanol ad 11 H₂O), eine Nitrocellulosemembran, das Polyacrylamidgel und wieder drei Bögen 3MM-Papier getränkt mit Transferpuffer. Der Blot erfolgte 1,5 h bei 100 mA.

5.2.2.6 Western-Blot-Hybridisierung mit monoklonalen Antikörpern und ECL-Detektion

Zu Beginn wurde die Western-Blot-Membran für 1 h bei RT in 10 ml Blocking-Reagenz (1 x PBS; 0,02 % NaN_3 ; 0,1 % Tween 20; 5 % Magermilchpulver (w/v)) auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Blot 1 x 15 min und 2 x 5 min mit jeweils 10 ml frischem Waschpuffer (1 x PBS; 0,02 % NaN_3 ; 0,1 % Tween 20) bei RT gewaschen. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1-2 $\mu\text{g/ml}$ in Waschpuffer zugegeben und ebenfalls 1 h bei RT geschüttelt. Gewaschen wurde der Blot daraufhin wie oben: 1 x 15 min und 2 x 5 min mit je 10 ml Waschpuffer. Anschließend erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers in einer Konzentration von 3 μl AK/10 ml Waschpuffer. Der Sekundärantikörper wurde 45 min bei RT inkubiert und danach 1 x 15 min und 4 x 5 min mit je 10 ml frischem Waschpuffer gewaschen.

Zur nachfolgenden Entwicklung des Western-Blots mit ECL wurden die beiden Lösungen ECL1 und ECL2 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1 min auf den Blot gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurde das Entwicklungsreagenz mit Zellstoff abgesaugt und ein Filmstreifen für 30 s bis zu 10 min aufgelegt und danach entwickelt.

5.2.3 Zellbiologische Methoden

5.2.3.1 Einfrieren von eukaryontischen Zellen und Zelllinien

Die einzufrierenden Zellen wurden in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen RPMI/10 % Seramin/60 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin aufgenommen und auf Eis gestellt. Parallel dazu wurde das Einfriermedium (50 % (w/v) RPMI/10 % Seramin, 30 % (w/v) Seramin, 20 % (w/v) DMSO) aufgetaut und nach dem Auftauen wieder auf Eis gestellt. Die gekühlte Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Einfriermedium vermischt und in 2 ml Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Nach zwei bis drei Wochen wurden die eingefrorenen Zellen in den Stickstofftank überführt.

5.2.3.2 Auftauen von eukaryontischen Zellen und Zelllinien

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Sofort nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension mit 10 ml RPMI/10 % Seramin/60 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin versetzt und 10 min bei 480 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert.

5.2.3.3 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurden 20 μ l Zellsuspension mit 180 μ l Trypanblau gemischt und in die Neubauerzählkammer pipettiert. Es wurde die durchschnittliche Lebendzellzahl pro einem Großquadrat bestimmt und mit 10^4 (Umrechnungsfaktor von Volumen der Zählkammer pro Großquadrat (0.1 μ l) auf 1 ml Suspensionsvolumen) sowie mit dem Verdünnungsfaktor 10^1 multipliziert. Der erhaltene Wert stellte die Anzahl an Zellen/ml dar.

5.2.3.4 Gewinnung von Primärzellen aus Frischgewebe

Das Frischgewebe wurde in kleine Stücke zerteilt und mit Hilfe einer medizinischen Klammer und einer Spitzbogenpinzette durch ein 100 μ m- (Maschengröße) GazeNetz gedrückt. Die erhaltenen Primärzellen wurden dann entweder eingefroren (Einfriermedium: 50 % (w/v) RPMI/10 % Seramin, 30 % (w/v) Seramin, 20 % (w/v) DMSO) oder sofort für nachfolgende Versuche verwendet.

5.2.3.5 Lymphozytenisolierung aus Vollblut oder Buffycoat mittels Ficollgradient

Die Aufreinigung von Lymphozyten aus Vollblut oder Buffycoat erfolgte mit LeucoSep® von Greiner (Deutschland). Hierfür wurden 15 ml Ficoll (20°C) in ein 50 ml LeucoSep®-Röhrchen gegeben und 30 s bei 1000 x g zentrifugiert. Daraufhin wurden 15 - 30 ml ungeronnenes Vollblut oder Buffycoat in das Röhrchen pipettiert und 10 min bei 1000 x g, 20°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ergab sich folgende Schichtung im Reaktionsgefäß von oben nach unten: Plasma - Lymphozyten - Ficoll - Filterscheibe - Ficoll - Erythrozyten. Das Plasma wurde abpipettiert und der Lymphozytenring in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden daraufhin 3 x in 1 x PBS gewaschen und jeweils 10 min bei 480 x g zentrifugiert.

5.2.3.6 Kultivierung von Suspensionszellen

Die verwendeten Suspensionszellen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in RPMI/10 % Seramin/60 μ g/ml Gentamycin bei 37°C/5 % CO₂ kultiviert.

5.2.3.7 Kultivierung von adherenten murinen Fibroblasten

Die Mäusefibroblasten wurden nach dem Auftauen in eine 50 ml Kulturflasche mit 10 ml RPMI/10 % Seramin/60 μ g/ml Gentamycin überführt und bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. War die Zellkulturflasche konfluent mit Fibroblasten bewachsen, dann wurde diese auf drei 250 ml Kulturflaschen gesplittet. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 4 min mit 37°C warmen EDTA-Puffer bei RT inkubiert. Danach wurde der Puffer entfernt und die Flaschen

aneinander geklopft, damit sich die adherenten Zellen vom Kulturflaschenboden lösen konnten. Die Zellen wurden in 6ml RPMI/10 % Seramin/60 µg/ml Gentamycin aufgenommen und auf die drei neuen Flaschen verteilt.

5.2.3.8 Zelldepletion mit magnetischen Beads

Alle Zelldepletionen wurden ausschließlich mit dem DYNABEADS-System der Firma Dnal (Oslo) durchgeführt. Die Auftrennungen erfolgten nach den Anleitungen des Herstellers. Verwendet wurden zur Reinigung von B-Zellen: DETACHaBEAD[®] M-450 Pan-B, die das B-Zell-spezifische Oberflächenmolekül CD19 erkennen. T-Zellen wurden entweder über CD2 (DYNABEADS[®] M-450 Pan-T, Dnal[®] CD2 CELlection[™] Kit) oder über CD4/CD8 Moleküle (DETACHaBEAD[®] M-450 CD4 und CD8) depletiert. Um mit eigenen Antikörpern Zellen aufzureinigen wurde der Dnal[®] RAM IgG1 CELlection[™] Kit verwendet.

Das grundlegende Prinzip aller verwendeten Kits besteht darin, daß die zu isolierenden Zellen mit einem monoklonalen Maus-IgG- Antikörper gegen ein spezifisches Oberflächenmolekül der gewünschten Zellen, inkubiert werden. Die Mausantikörper binden an das Oberflächenmolekül und sind gleichzeitig noch an magnetische Partikel gekoppelt. Mit Hilfe eines Magnets können nun die zu depletierenden Zellen isoliert werden. Nach der Isolation werden die erhaltenen Zellen wieder von den Magnetpartikeln getrennt.

5.2.3.9 Stimulation von PBLs mit Ionomycin und TPA

Die Stimulation von peripheren Blutlymphozyten erfolgte in RPMI/10 % Seramin/60 µg/ml Gentamycin versetzt mit 500 ng/ml Ionomycin und 10 ng/ml TPA, für 6 h bei 37°C/5 % CO₂.

5.2.3.10 Proliferationstest mit H³-Thymidin in vitro

Zur Messung der Zellproliferation wurden die Zellen mit 1µCi/well in RPMI/10% Seramin H³-Thymidin für 16 h ÜN inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Versuchsansatz bei -20°C tiefgefroren. Die Auswertung konnte dann unabhängig vom Test erfolgen. Dazu wurde die Zellen bei 37°C aufgetaut, geerntet und die vorhandene Radioaktivität gemessen.

5.2.3.11 FACS-Färbung

5.2.3.11.1 Direkte FACS-Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Für eine FACS-Färbung wurden mindesten 2×10^5 Zellen/100 μl FACS-Färbepuffer benötigt. Zu dieser Zellsuspension wurde der direkt fluoreszenzmarkierte Antikörper in der richtigen Verdünnung zugegeben und gut gevortext. Die jeweiligen Antikörper lagen jeweils schon in passenden Vorverdünnung vor, so daß meist 10 μl der Vorverdünnung zu den Zellen gegeben wurden. Die Zellen mit dem Antikörper wurden auf Eis im Dunklen mind. 20 min inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden 2 ml FACS-Färbepuffer zur Zellsuspension pipettiert und die Zellen daraufhin 5 min bei $500 \times g$, 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 500 μl FACS-Färbepuffer aufgenommen. Analysiert wurden die gefärbten Zellen mit Hilfe eines FACScan[®] (Argonlaser, 488nm; Becton Dickinson) und der dazugehörigen Software LYSIS II (Becton Dickinson).

5.2.3.11.2 Indirekte und direkte FACS-Färbung von Zelloberflächenmolekülen in einem Reaktionsansatz

Pro FACS-Färbung wurden 2×10^5 Zellen in 100 μl FACS-Färbepuffer eingesetzt. Zuerst wurde der unkonjugierte Antikörper in der entsprechenden Verdünnung zu den Zellen gegeben und 20 min im Dunklen auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 2ml FACS-Färbepuffer und einer anschließenden Zentrifugation von 5 min bei $500 \times g$, 4°C . Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 μl FACS-Färbepuffer aufgenommen. Daraufhin wurde ein PE-konjugierter Antikörper gegen Maus-Immunglobulin (z.B Esel-anti-Maus-PE) in entsprechender Konzentration zugegeben. Die Inkubation und der nachfolgende Waschschrift erfolgten wie im vorherigen Schritt. Zum Abblocken der verbliebenen, ungebundenen Esel-anti-Maus-AK wurden Maus-IgGs in einer 1:50 Verdünnung zugesetzt. Inkubation und Waschschrift siehe oben. Als letzter Färbeschritt wurden die direkt-konjugierten FITC-, QR- oder TRI-Antikörper zugegeben. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 500 μl FACS-Färbepuffer resuspendiert. Analysiert wurden die gefärbten Zellen mit Hilfe eines FACScan[®] (Argonlaser, 488nm; Becton Dickinson) und der dazugehörigen Software LYSIS II (Becton Dickinson).

5.2.3.12 Kultivierung von B-Lymphozyten im „CD40-System“

Alle verwendeten murinen Ltk⁻-Zellen dienten als Feederzellen und waren mit 6000 rad Cs bestrahlt, um ihre Eigenproliferation einzuschränken. Die murinen Fibroblasten wurden am Vortag des eigentlichen Experiments, als monolayer ausplattiert und ÜN bei 37°C/5 % CO₂ bebrütet. Als Richtwerte galten für eine 96-well-Platte - Flachboden: 3 x 10⁴ Zellen/well und 96-well-Platte - Rundboden: 2 x 10⁴ Zellen/well.

5.2.3.12.1 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk⁻/huCD32 Zellen und anti-CD40-Antikörpern

Die murinen Ltk⁻/huCD32 wurden wie oben genannt ausplattiert. Am Versuchstag wurde dem Medium noch 100 ng/ml α-CD40-AK zugesetzt. Die Antikörper binden über ihren konstanten Abschnitt an das huCD32 (FcγRII) und stimulieren somit die in dem Versuch verwendeten B-Zellen über ihren CD40-Rezeptor. Dieser α-CD40-AK simuliert somit den Kontakt zwischen CD40/CD40L.

5.2.3.12.2 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk⁻/huCD32/huFas-L Zellen

Die murinen Ltk⁻/huCD32/huFas-L Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert. Über den humanen FcγRII (huCD32) konnten weitere ausgewählte Antikörper gegen B-Zell-Oberflächenmoleküle präsentiert werden.

5.2.3.12.3 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk⁻/huCD40-L/huCD32 Zellen

Die murinen Ltk⁻/huCD40-L/huCD32 Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert. Über den humanen FcγRII (huCD32) konnten weitere ausgewählte Antikörper gegen B-Zell-Oberflächenmoleküle präsentiert werden.

5.2.3.12.4 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/huFas-L Zellen

Die murinen Ltk⁻/huCD40-L/huCD32/huFas-L Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert. Über den humanen FcγRII (huCD32) konnten weitere ausgewählte Antikörper gegen B-Zell-Oberflächenmoleküle präsentiert werden.

5.2.3.12.5 Kultivierung von B-Zellen mit murinen Ltk⁻/muFas-L Zellen

Die murinen Ltk⁻/muFas-L Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert.

5.2.3.13 Austesten der G418-Konzentration zur Selektion auf stabil transfizierte murine Ltk⁻-Zellen (Southern, 1982)

Einen Tag vor Beginn des Tests wurden sechs 5 ml Zellkulturflaschen mit je 4×10^5 der zu untersuchenden Zellen in RPMI/10 % Serum/60 µg/ml Gentamycin angesetzt und ÜN bei 37°C/5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium erneuert und fünf von sechs Flaschen wurden mit ansteigenden Mengen an G418/Neomycin versetzt. Die Endkonzentration an G418 in den einzelnen Flaschen variierte zwischen 0 und 500 µg/ml (0, 250, 300, 350, 400, 450, 500). Die Zellen wurden für zwei Tage bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. Da G418 nur auf proliferierende Zellen tödlich wirkt, konnte man auch erst nach diesem Zeitraum tote Zellen erkennen. Die optimale Konzentration an G418 für die spätere Selektion auf stabile Transfektanten war die niedrigste Konzentration bei der alle Zellen nach zwei Tagen verendet waren. Für die Zelllinie Ltk⁻/huCD40-L/huCD32 waren dies 300 µg/ml und für Ltk⁻/huCD32 400 µg/ml.

5.2.3.14 Transfektion der murinen L-Zelllinie

Am Vortag der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen in 60 mm Kulturschalen zu 30 % (3×10^5 Zellen) konfluent ausplattiert und 18 h bei 37°C/5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Zu Beginn der Transfektion wurden je 5 µg/60 mm Petrischale des linearisierten Plasmids (gelöst in Low TE) in RPMI ohne Serum und ohne Gentamycin ad 150 µl aufgenommen und mit 20 µl SuperFect[®] (Qiagen, Hilden) gut vermischt. Die Lösung wurde 10 min bei RT inkubiert. Die zu transfizierenden Ltk⁻/huCD40-L/huCD32 wurden währenddessen mit je 5 ml 1 x PBS gewaschen. Nach der zehnminütigen Inkubation wurden pro Transfektionsansatz 1 ml RPMI/10 % Serum/60 µg/ml Gentamycin aufgefüllt und zu den Zellen gegeben. Zu jeder 60 mm Kulturschale wurden noch 4 ml RPMI/10 % Serum/60 µg/ml Gentamycin gegeben. Die Transfektionsansätze wurden daraufhin 2,5 h bei 37°C/5% CO₂ bebrütet. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium komplett abgesaugt und die Zellen jeweils 4 x mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Für 24 h Stunden wurden die Mäusefibroblasten nochmals mit RPMI/10% Serum/60 µg/ml Gentamycin versetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen jeweils 5 ml/60 mm Kulturschale Selektionsmedium (RPMI/10 % Serum/60ng/ml Gentamycin/300µg/ml G418) ausgetauscht. Die Zellen wurden weiterhin bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert.

Nach weiteren drei bis vier Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen nochmals mit 5 ml 1x PBS gewaschen, um die abgelösten, untransfizierten toten Zellen aus der Kultur zu entfernen. Das Medium wurde daraufhin erneuert.

Nach acht Tagen war jede der 60 mm Kulturschalen konfluent mit Transfektanten bewachsen und wurde in eine 250 ml Gewebekulturflasche überführt. Nach weiteren drei Tagen wurden die transfizierten Zellen von je einer 250 ml Kulturflasche in zwei 500 ml Kulturflaschen umgesetzt.

Nach weiteren drei bis vier Tagen wurden von jeder Ursprungstransfektionsplatte eine „limiting dilution“ in 96-well-Flachbodenplatten mit Selektionsmedium angesetzt. Pro Transfektionsansatz wurden 48 wells mit 10 Zellen/well (in 50 µl/well), 144 wells mit 1 Zelle/well und 192 wells mit 1/3 Zelle/well ausplattiert. Von den restlichen Zellen wurden FACS-Analysen, Gesamtproteinpräparationen (1×10^7 Zellen) nach Lämmli und Gesamt-RNA-Präparationen (1×10^6 Zellen) gemacht. Ein weiterer Teil der Transfektanten wurde eingefroren.

Nach sechs Tagen wurden in jedes well nochmals 50 µl des Selektionsmediums hinzupipettiert.

Vierzehn Tage nach Ansetzen der limiting-dilution wurden alle aus dem Ansatz „1/3 Zellen/well“ erhaltenen Klone in 50 ml Kulturflaschen umgesetzt.

5.2.3.15 Apoptoseassay *in vitro*

Zur funktionellen Kontrolle der mit Fas-Ligand transfizierten Zellen, wurde ein *in vitro* Apoptoseassay entwickelt. Die transfizierten Mäusefibroblasten wurden vorab mit 60 Gray bestrahlt, damit ihre Fähigkeit zur Proliferation stark eingeschränkt wurde, die Zellen aber noch für bis zu zwei Wochen lebensfähig waren. Einen Tag vor Beginn des Versuches wurden die bestrahlten, adherent wachsenden Fibroblasten in 96-well Platten zu je 3×10^4 Zellen/well ausplattiert und ÜN bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen setzte man jedem well 2×10^5 Jurkat-Zellen zu und cokultivierte die beiden Zellarten für 24 h. Da Jurkat-Zellen CD95/Fas/Apo1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und mit Fas-Ligand transfizierten Mäusefibroblasten kultiviert wurden, müßte ein erkennbarer Anteil an Jurkat-Zellen durch die Interaktionen Fas/Fas-Ligand nach 24 h in Apoptose übergehen oder schon tot sein. Um dies zu kontrollieren, wurden die Jurkat-Zellen aus der 96-well Platte entnommen, die Zellen pelletiert, in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und 10 min mit 7AAD (0,1 µg/100 µl) bei 4°C gefärbt (Philpott, 1996). Danach wurden die Zellen im FACScan aufgenommen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Induktion der Apoptose bei Jurkat-Zellen, wurden bei jedem Versuchsansatz Jurkat-Zellen mit dem monoklonalen IgM-Mausantikörper CH-11 (Immunotech) für 24 h inkubiert. Bei dem Antikörper handelt es sich um einen anti-huFas-AK, der an huFas auf der Zelloberfläche bindet, eine Kreuzvernetzung erzeugt und somit der Zelle signalisiert in Apoptose zu gehen.

5.2.4 Immunhistochemische Methoden

5.2.4.1 ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay zum Nachweis von Fas-Ligand Protein

Der ELISA zum Nachweis des Fas-Ligand Proteins wurde von Coulter-Immunotech Diagnostics (Krefeld, Hamburg) bezogen. Die kommerziell erhältliche ELISA-Platte ist mit einem Maus-anti-huFas-Ligand Antikörper Klon 4H9 beschichtet. Von der zu untersuchenden Gesamtproteinlösung wurden unverdünnt 100 µl/well auf die ELISA-Platte aufgetragen und 1 h bei RT abgedeckt inkubiert. In diesem Schritt bindet der in der aufgetragenen Proteinlösung enthaltene Fas-Ligand an den plattengekoppelten Maus-anti-huFas-Ligand AK 4H9 (capture-AK). Danach wurden die Proben abgesaugt und viermal mit 1 x Waschlösung gespült. In jedes well wurden nun 100 µl Konjugat-Lösung pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Die Konjugat-Lösung enthält den Maus-anti-hu-Fas-Ligand AK 4A5 (detection-AK) der ebenfalls huFas-Ligand erkennt, jedoch ein anderes Epitop des Proteins als der capture-AK. Zusätzlich ist der verwendete AK mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach der Inkubation wurde ebenfalls wieder viermal bei RT mit 1 x Waschlösung gewaschen. Im nachfolgenden Schritt wurden Orthophenyldiamin gelöst in Citratpuffer und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1 gemischt und je 100 µl in jedes Nöpfchen pipettiert. Die ELISA-Platte wurde 30 min im Dunklen bei RT inkubiert. Die zugegebene Substratlösung wurde nun von der Meerrettich-Peroxidase umgesetzt und es kam in positiven wells zu einer blauen Verfärbung der Lösung. Zum Beenden des enzymatischen Vorgangs wurden je 100 µl 1 M Schwefelsäure zugegeben, was zur Folge hatte, daß sich die positive Blaufärbung in gelb umwandelte. Die Proben wurden nun bei 450 nm mit dem ELISA-Reader gegen den Leerwert gemessen und mit Hilfe des Computerprogramms Curvit ausgewertet.

5.2.4.2 APAAP-Färbung (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)

Ein anti-Maus-Ig-Brückenantikörper verbindet den primären monoklonalen Antikörper mit einem Immunkomplex, der aus intestinaler alkalischer Phosphatase und einem monoklonalen Antikörper gegen dieses Enzym besteht. Die Stärke der Anfärbung kann durch Wiederholung der Inkubation mit dem APAAP-Komplex intensiviert werden.

Die Entwicklung der alkalischen Phosphatase mittels einer Substratlösung, die Neufuchsin und Naphtol-As-Bi-Phosphat enthält, färbt zu einem kräftigen Rot als Reaktionsprodukt. Ebenso gebräuchlich ist die Entwicklung des Enzyms mit Hilfe einer Substratlösung aus Fast-Red-TR-Salz und Naphtol-As-Bi-Phosphat, deren Nachteil in einer weniger intensivroten Farbreaktion besteht.

Anschließendes Färbevorgang am Beispiel eines Kryoschnittes:

Der frische oder bereits tiefgefrorene Kryoschnitt wird 10 min in Azeton fixiert und danach 15 min bei RT getrocknet. Der Objektträger wird daraufhin 3 x mit Tris/NaCl-Puffer pH 7,4 gewaschen und anschließend überschüssige Flüssigkeit abgetrocknet. 100 µl des Maus-Primärantikörpers werden in der entsprechenden Verdünnung mit 0,5 % BSA aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird wieder 3 x mit Tris/NaCl-Puffer gewaschen und abgetrocknet. Vom Sekundärantikörper werden nun 100 µl aufgetragen und 10 min inkubiert. Es wird wieder 3 x gewaschen und getrocknet. Jetzt werden je 100 µl von der APAAP-Komplexlösung aufgetragen, die bei RT 10 min einwirken sollen. Das Auftragen des Sekundärantikörpers sowie der APAAP-Lösung wird noch 3 x wiederholt.

Für den nachfolgenden Entwicklungsschritt kann zwischen folgenden Lösungen gewählt werden:

Neufuchsin-Entwicklung

25 ml H₂O
530 mg A-m-Propandiol
375 mg NaCl
75 ml Tris/NaCl-Puffer pH 9,7
40 mg Levamisole
50 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat
600 µl DMF
40 mg Natriumnitrit
200 µl Neufuchsinlösung

Fast-Red-Entwicklung

50 ml Michaelispuffer pH 9,3
10 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat
500 µl DMF
50 mg Fast-Red-TR-Salz
500 µl DMF
18 mg Levamisole

Der pH wird mittels HCl im Falle von Neufuchsinlösung auf pH 8,7 respektive der Fast-Red-Lösung auf pH 9,3 eingestellt. Anschließend wird die jeweilige Lösung filtriert, der pH nochmals kontrolliert und gegebenenfalls neu eingestellt.

Die Schnitte werden nach der APAAP-Behandlung für 20 min in der entsprechenden Entwicklerlösung 20 min schüttelnd inkubiert. Die Objektträger werden anschließend mit Tris/NaCl-Puffer pH 7,4 und H₂O gewaschen. Mit Haemalaun erfolgt nun eine Gegenfärbung und anschließend werden die Schnitte eingedeckt.

5.2.5 Sequenz- und Mutationsanalysen der variablen Region der schweren Immunglobulinketten

5.2.5.1 Sequenzauswertungen

Zur Identifizierung der erhaltenen V_H-,D- und J_H-Segmente wurden diese im Programm VBASE (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>) mit allen bekannten Keimbahngenen verglichen und dasjenige Segment mit der größten Homologie für die weiteren Auswertungen verwendet. Sequence Navigator für Macintosh und DNAMAN Version 4.0, Lynnon BioSoft wurden für die Sequenzanalysen benutzt.

5.2.5.2 Analyse der somatischen Mutationen

Die Wahrscheinlichkeit, daß somatische Mutationen in den rearrangierten V_H-Genen aufgrund von Antigenselektion entstanden sind, wurde nach (Chang, 1994) analysiert. Mit Hilfe des binominalen Verteilungsmodells wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, daß der Überschuß an Replacement-Mutationen in den CDRs oder FRs nur aufgrund von Zufall entstanden ist.

$$p = \{n! / [k!(n - k)!]\} \times q^k \times (1 - q)^{n - k}$$

Hierbei ist **n** die Gesamtzahl an beobachteten Mutationen (ausgehend von der abgeleiteten Aminosäuresequenz), **k** die Anzahl an beobachteten Replacement-Mutationen in den CDRs oder FRs und **q** die Wahrscheinlichkeit, daß eine Replacement-Mutation in den CDRs oder FRs lokalisiert ist:

$$q = \text{CDR}_{\text{rel}} \text{ (oder } \text{FR}_{\text{rel}}) \times \text{CDR}_{\text{Rf}} \text{ (oder } \text{FR}_{\text{Rf}})$$

CDR_{rel} (oder FR_{rel}) steht für die relative Länge der CDRs (oder FRs), die als Quotienten aus der Länge der CDRs im Verhältnis zur Gesamtlänge des untersuchten Keimbahngens dargestellt wird.

Die immanente Anfälligkeit der CDRs und FRs für Replacement-Mutationen, ausgedrückt in der Replacement-Frequenz (R_f) wurde, wenn vorhanden aus Chang et al. (1994) entnommen oder mit Hilfe eines Computerprogramms (Comut 1.0; Markus Roeckelein) berechnet. Hierbei wurden für jedes einzelne Codon des jeweiligen Keimbahngens, die neun möglichen Einzelbasenpaaraustausche unabhängig voneinander berechnet. Nicht gezählt wurden die Austausche, die ein STOP-Codon ergaben. Die Replacement-Frequenz R_f stellt somit den Quotienten der Summe aller möglichen Replacement-Mutationen im Verhältnis zu der Summe aller Mutationen dar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

(1982). "National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project." *Cancer* **49**(10): 2112-35.

Ashany, D., Song, X., Lacy, E., Nikolic Zujic, J., Friedman, S. M. and Elkon, K. B. (1995). "Th1 CD4+ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/APO-1 antigen pathway." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**(24): 11225-11229.

Bahler, D. W., Miklos, J. A. and Swerdlow, S. H. (1997). "Ongoing Ig gene hypermutation in salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas." *Blood* **89**(9): 3335-3344.

Bahler, D. W. and Swerdlow, S. H. (1998). "Clonal salivary gland infiltrates associated with myoepithelial sialadenitis (Sjogren's syndrome) begin as nonmalignant antigen-selected expansions." *Blood* **91**(6): 1864-1872.

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F. and Saeland, S. (1994). "The CD40 antigen and its ligand." *Annu.Rev.Immunol.* **12**: 881-922.

Banchereau, J., De Paoli, P., Valle, A., Garcia, E. and Rousset, F. (1991). "Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40." *Science* **251**(4989): 70-72.

Banchereau, J. and Rousset, F. (1991). "Growing human B lymphocytes in the CD40 system." *Nature* **353**(6345): 678-679.

Bayerdorffer, E., Neubauer, A., Rudolph, B., Thiede, C., Lehn, N., Eidt, S. and Stolte, M. (1995). "Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of Helicobacter pylori infection. MALT Lymphoma Study Group." *Lancet* **345**(8965): 1591-1594.

Berek, C., Berger, A. and Apel, M. (1991). "Maturation of the immune response in germinal centers." *Cell* **67**(6): 1121-1129.

Bernstein, P. and Ross, J. (1989). "Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability." *Trends Biochem Sci* **14**(9): 373-7.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Brezinschek, R. I., Dorner, T., Domiati Saad, R. and Lipsky, P. E. (1997). "Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells." *J.Clin.Invest.* **99**(10): 2488-2501.

Brisco, M. J., Tan, L. W., Orsborn, A. M. and Morley, A. A. (1990). "Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population." *Br J Haematol* **75**(2): 163-7.

- Brugnoni, D., Rossi, G., Tucci, A., Cattaneo, R. and Airo, P. (1995). "Study of CD40 ligand expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Haematologica* **80**(5): 440-442.
- Buchman, A. R. and Berg, P. (1988). "Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression." *Mol Cell Biol* **8**(10): 4395-405.
- Buluwela, L., Albertson, D. G., Sherrington, P., Rabbitts, P. H., Spurr, N. and Rabbitts, T. H. (1988). "The use of chromosomal translocations to study human immunoglobulin gene organization: mapping DH segments within 35 kb of the C mu gene and identification of a new DH locus." *Embo J* **7**(7): 2003-10.
- Buluwela, L. and Rabbitts, T. H. (1988). "A VH gene is located within 95 Kb of the human immunoglobulin heavy chain constant region genes." *Eur J Immunol* **18**(11): 1843-5.
- Cayeux, S., Richter, G., Noffz, G., Dorken, B. and Blankenstein, T. (1997). "Influence of gene-modified (IL-7, IL-4, and B7) tumor cell vaccines on tumor antigen presentation." *J.Immunol* **158**(6): 2834-2841.
- Chang, B. and Casali, P. (1994). "The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement." *Immunol Today* **15**(8): 367-373.
- Chapman, C. J., Zhou, J. X., Gregory, C., Rickinson, A. B. and Stevenson, F. K. (1996). "VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intracлонаl heterogeneity, and a role for antigen selection." *Blood* **88**(9): 3562-8.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Collins, R. D. (1997). "Is clonality equivalent to malignancy: specifically, is immunoglobulin gene rearrangement diagnostic of malignant lymphoma? [editorial; comment]." *Hum.Pathol.* **28**(7): 757-759.
- Cook, G. P. and Tomlinson, I. M. (1995). "The human immunoglobulin VH repertoire." *Immunol Today* **16**(5): 237-242.
- Corbett, S. J., Tomlinson, I. M., Sonnhammer, E. L. L., Buck, D. and Winter, G. (1997). "Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination." *J Mol Biol* **270**(4): 587-97.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M. and Chiorazzi, N. (1999). "Ig V gene mutation status and CD38 expression As novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia [In Process Citation]." *Blood* **94**(6): 1840-7.
- Davies, J. and Jimenez, A. (1980). "A new selective agent for eukaryotic cloning vectors." *Am J Trop Med Hyg* **29**(5 Suppl): 1089-92.

- de Jong, D., Boot, H., van Heerde, P., Hart, G. A. and Taal, B. G. (1997). "Histological grading in gastric lymphoma: pretreatment criteria and clinical relevance." *Gastroenterology* **112**(5): 1466-1474.
- Defrance, T., Carayon, P., Billian, G., Guillemot, J. C., Minty, A., Caput, D. and Ferrara, P. (1994). "Interleukin 13 is a B cell stimulating factor." *J.Exp.Med.* **179**(1): 135-143.
- D'Elios, M. M., Manghetti, M., De Carli, M., Costa, F., Baldari, C. T., Burrioni, D., Telford, J. L., Romagnani, S. and Del Prete, G. (1997). "T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease." *J Immunol* **158**(2): 962-7.
- Demagnet, C., Brissinck, J., Leo, O., Moser, M. and Thielemans, K. (1994). "Role of T-cell subsets in the bispecific antibody (anti-idiotypic x anti-CD3) treatment of the BCL1 lymphoma." *Cancer Res.* **54**(11): 2973-2978.
- Deveraux, Q. L. and Reed, J. C. (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-52.
- Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J. M., Hossfeld, D. K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H. and Marynen, P. (1999). "The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas [In Process Citation]." *Blood* **93**(11): 3601-9.
- Diss, T. C., Peng, H., Wotherspoon, A. C., Isaacson, P. G. and Pan, L. (1993). "Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type." *J.Pathol.* **169**(3): 291-295.
- Du, M., Diss, T. C., Xu, C., Peng, H., Isaacson, P. G. and Pan, L. (1996). "Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion." *Leukemia* **10**(7): 1190-1197.
- Eidt, S., Stolte, M. and Fischer, R. (1994). "Helicobacter pylori gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas." *J.Clin.Pathol.* **47**(5): 436-439.
- Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. (1989). "Introns in the 3'-untranslated region can inhibit chimeric CAT and beta-galactosidase gene expression." *Gene* **84**(1): 135-42.
- Fialkow, P. J. (1976). "Clonal origin of human tumors." *Biochim Biophys Acta* **458**(3): 283-321.
- Fischbach, W., Tacke, W., Greiner, A. and Müller-Hermelink, H. K. (1997). "Regression of immunoproliferative small intestinal disease after eradication of *Helicobacter pylori*." *Lancet* **349**(9044): 31-32.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H. and Debatin, K. M. (1996). "Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells." *Nat Med* **2**(5): 574-7.

- Galibert, L., Burdin, N., de Saint Vis, B., Garrone, P., van Kooten, C., Banchereau, J. and Rousset, F. (1996). "CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype." *J.Exp.Med.* **183**(1): 77-85.
- Garcia, B., Rodriguez, R., Angulo, I., Heath, A. W., Howard, M. C. and Subiza, J. L. (1996). "Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on IgA vs. IgG2b production by lipopolysaccharide-stimulated lymph node B cells: a comparative study with spleen B cells." *Eur.J.Immunol* **26**(10): 2364-2370.
- Grafton, G., Goodall, M., Gregory, C. D. and Gordon, J. (1997). "Mechanisms of antigen receptor-dependent apoptosis of human B lymphoma cells probed with a panel of 27 monoclonal antibodies." *Cell Immunol* **182**(1): 45-56.
- Grammer, A. C., Bergman, M. C., Miura, Y., Fujita, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. (1995). "The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses." *J.Immunol.* **154**(10): 4996-5010.
- Greiner, A., Knörr, C., Qin, Y., Schultz, A., Marx, A., Kroczeck, R. A. and Muller-Hermelink, H. K. (1998). "CD40 ligand and autoantigen are involved in the pathogenesis of low- grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue [In Process Citation]." *Dev Immunol* **6**(3-4): 187-95.
- Greiner, A., Knörr, C., Qin, Y., Sebald, W., Schimpl, A., Banchereau, J. and Müller-Hermelink, H. K. (1997). "Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for in vitro growth and differentiation." *Am.J.Pathol.* **150**(5): 1583-1593.
- Greiner, A., Marx, A., Heesemann, J., Leebmann, J., Schmausser, B. and Müller-Hermelink, H. K. (1994). "Idiotype identity in a MALT-type lymphoma and B cells in *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis." *Lab.Invest.* **70**(4): 572-578.
- Greiner, A., Marx, A., Schmausser, B. and Müller-Hermelink, H. K. (1994). "The pivotal role of the immunoglobulin receptor of tumor cells from B cell lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue (MALT)." *Adv.Exp.Med.Biol.* **355**: 189-193.
- Greiner, A. and Müller-Hermelink, H. K. (1996). "Recent advances in gastric extranodal B-cell lymphoma." *Curr Diagn Pathol* **3**: 91-98.
- Greiner, A., Seeberger, H., Knörr, C., Starostik, P. and Müller-Hermelink, H. (1998). "MALT-type B-cell lymphomas escape the censoring FAS-mediated apoptosis." *Blood* **92**: 484.
- Gronbaek, K., Straten, P. T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M. K., Hansen, N. E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K. and Guldberg, P. (1998). "Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity." *Blood* **92**(9): 3018-24.
- Gross, M. K., Kainz, M. S. and Merrill, G. F. (1987). "Introns are inconsequential to efficient formation of cellular thymidine kinase mRNA in mouse L cells." *Mol Cell Biol* **7**(12): 4576-81.

- Hallas, C., Greiner, A., Peters, K. and Müller-Hermelink, H. K. (1998). "Immunoglobulin VH genes of high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas show a high load of somatic mutations and evidence of antigen-dependent affinity maturation." *Lab. Invest.* **78**(3): 277-287.
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. and Stevenson, F. K. (1999). "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia [In Process Citation]." *Blood* **94**(6): 1848-54.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H., Banks, P. M., Chan, J. K., Cleary, M. L., Delsol, G., De Wolf Peeters, C., Falini, B., Gatter, K. C., Muller Hermelink, H. K. and al, e. (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]." *Blood* **84**(5): 1361-1392.
- Hauer, A. C., Finn, T. M., MacDonald, T. T., Spencer, J. and Isaacson, P. G. (1997). "Analysis of TH1 and TH2 cytokine production in low grade B cell gastric MALT-type lymphomas stimulated in vitro with *Helicobacter pylori*." *J. Clin. Pathol.* **50**(11): 957-959.
- Hensel, F., Knörr, C., Hermann, R., Krenn, V., Muller-Hermelink, H. K. and Vollmers, H. P. (1999). "Mitogenic autoantibodies in *Helicobacter pylori*-associated stomach cancerogenesis." *Int J Cancer* **81**(2): 229-35.
- Huang, M. T. and Gorman, C. M. (1990). "Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA." *Nucleic Acids Res* **18**(4): 937-47.
- Hussell, T., Isaacson, P. G., Crabtree, J. E., Dogan, A. and Spencer, J. (1993). "Immunoglobulin specificity of low grade B cell gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type." *Am. J. Pathol.* **142**(1): 285-292.
- Hussell, T., Isaacson, P. G., Crabtree, J. E. and Spencer, J. (1996). "Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue [see comments]." *J. Pathol.* **178**(2): 122-127.
- Ichihara, Y., Matsuoka, H. and Kurosawa, Y. (1988). "Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci." *Embo J* **7**(13): 4141-50.
- Isaacson, P. G. and Wright, D. H. (1983). "Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma." *Cancer* **52**(8): 1410-1416.
- Jackson, R. J. and Standart, N. (1990). "Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?" *Cell* **62**(1): 15-24.
- Jain, R., Roncella, S., Hashimoto, S., Carbone, A., Francia di Celle, P., Foa, R., Ferrarini, M. and Chiorazzi, N. (1994). "A potential role for antigen selection in the clonal evolution of Burkitt's lymphoma." *J Immunol* **153**(1): 45-52.
- Janeway, C. A. and Travers, P. (1997). *Immunobiology*. London, Churchill Livingstone, Edinburgh.

- Jukes, T. H. and King, J. L. (1979). "Evolutionary nucleotide replacements in DNA." *Nature* **281**(5732): 605-6.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. and Yagita, H. (1995). "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand." *J Exp Med* **182**(6): 1777-83.
- King, C., Davies, J., Mueller, R., Lee, M. S., Krahl, T., Yeung, B., O'Connor, E. and Sarvetnick, N. (1998). "TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype." *Immunity* **8**(5): 601-13.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K. and Küppers, R. (1998). "Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells." *Immunol.Rev.* **162**: 261-280.
- Klein, U., Küppers, R. and Rajewsky, K. (1994). "Variable region gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child: somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age." *J.Exp.Med.* **180**(4): 1383-1393.
- Klein, U., Küppers, R. and Rajewsky, K. (1997). "Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans." *Blood* **89**(4): 1288-1298.
- Klein, U., Rajewsky, K. and Küppers, R. (1998). "Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells." *J Exp Med* **188**(9): 1679-89.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L. and Rajewsky, K. (1993). "Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections." *EMBO J.* **12**(13): 4955-4967.
- Küppers, R., Zhao, M., Rajewsky, K. and Hansmann, M. L. (1993). "Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction." *Am.J.Pathol.* **143**(1): 230-239.
- LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G. and MacKenzie, A. E. (1998). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer." *Oncogene* **17**(25): 3247-59.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lennert, K. and Feller, A. C. (1992). *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*. New York, Springer.
- Lew, A. M. (1984). "The effect of epitope density and antibody affinity on the ELISA as analysed by monoclonal antibodies." *J Immunol Methods* **72**(1): 171-6.
- Lindhout, E., Koopman, G., Pals, S. T. and de Groot, C. (1997). "Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions." *Immunol Today* **18**(12): 573-7.

- Liu, Y. J., Oldfield, S. and MacLennan, I. C. (1988). "Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones." *Eur J Immunol* **18**(3): 355-62.
- Lukes, R. J. and Butler, J. J. (1966). "The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease." *Cancer Res* **26**(6): 1063-83.
- MacLennan, I. C. (1994). "Germinal centers." *Annu.Rev.Immunol.* **12**: 117-139.
- MacLennan, I. C., Liu, Y. J. and Johnson, G. D. (1992). "Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses." *Immunol Rev* **126**: 143-61.
- Mattila, P. S., Schugk, J., Wu, H. and Makela, O. (1995). "Extensive allelic sequence variation in the J region of the human immunoglobulin heavy chain gene locus." *Eur J Immunol* **25**(9): 2578-82.
- McCarthy, K. P., Sloane, J. P. and Wiedemann, L. M. (1990). "Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens." *J Clin Pathol* **43**(5): 429-32.
- Musshoff, K. (1977). "[Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's transl)]." *Strahlentherapie.* **153**(4): 218-221.
- Naylor, M. and Capra, J. D. (1999). "Mutational status of Ig V(H) genes provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia [In Process Citation]." *Blood* **94**(6): 1837-9.
- Ott, G., Katzenberger, T., Greiner, A., Kalla, J., Rosenwald, A., Heinrich, U., Ott, M. M. and Müller-Hermelink, H. K. (1997). "The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type." *Cancer Res.* **57**(18): 3944-3948.
- Padlan, E. A. (1994). "Anatomy of the antibody molecule." *Mol Immunol* **31**(3): 169-217.
- Philpott, N. J., Scopes, J., Marsh, J. C., Gordon Smith, E. C. and Gibson, F. M. (1995). "Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance." *Exp.Hematol.* **23**(14): 1642-1648.
- Philpott, N. J., Turner, A. J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J. C., Gordon-Smith, E. C., Dalglish, A. G. and Gibson, F. M. (1996). "The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques." *Blood* **87**(6): 2244-51.
- Plumas, J., Jacob, M. C., Chaperot, L., Molens, J. P., Sotto, J. J. and Bensa, J. C. (1998). "Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis." *Blood* **91**(8): 2875-85.
- Porter, R. R. (1991). "Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972 [classical article]." *Scand J Immunol* **34**(4): 381-9.
- Qin, Y., Greiner, A., Hallas, C., Haedicke, W. and Müller-Hermelink, H. K. (1997). "Intraclonal offspring expansion of gastric low-grade MALT-type lymphoma: evidence for the role of antigen-driven high-affinity mutation in lymphomagenesis." *Lab.Invest.* **76**(4): 477-485.

- Qin, Y., Greiner, A., Trunk, M. J., Schmausser, B., Ott, M. M. and Müller-Hermelink, H. K. (1995). "Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma." *Blood* **86**(9): 3528-3534.
- Rabbitts, T. H., Forster, A., Baer, R. and Hamlyn, P. H. (1983). "Transcription enhancer identified near the human C mu immunoglobulin heavy chain gene is unavailable to the translocated c-myc gene in a Burkitt lymphoma." *Nature* **306**(5945): 806-9.
- Racila, E., Scheuermann, R. H., Picker, L. J., Yefenof, E., Tucker, T., Chang, W., Marches, R., Street, N. E., Vitetta, E. S. and Uhr, J. W. (1995). "Tumor dormancy and cell signaling. II. Antibody as an agonist in inducing dormancy of a B cell lymphoma in SCID mice." *J.Exp.Med.* **181**(4): 1539-1550.
- Rajewsky, K. (1996). "Clonal selection and learning in the antibody system." *Nature* **381**(6585): 751-758.
- Rathmell, J. C., Cooke, M. P., Ho, W. Y., Grein, J., Townsend, S. E., Davis, M. M. and Goodnow, C. C. (1995). "CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells." *Nature* **376**(6536): 181-184.
- Ravetch, J. V. and Kinet, J. P. (1991). "Fc receptors." *Annu Rev Immunol* **9**: 457-92.
- Ravetch, J. V., Siebenlist, U., Korsmeyer, S., Waldmann, T. and Leder, P. (1981). "Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes." *Cell* **27**(3 Pt 2): 583-91.
- Schattner, E. J., Mascarenhas, J., Bishop, J., Yoo, D. H., Chadburn, A., Crow, M. K. and Friedman, S. M. (1996). "CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells." *Blood* **88**(4): 1375-1382.
- Schmidt, E. V., Christoph, G., Zeller, R. and Leder, P. (1990). "The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4406-11.
- Schroder, A. E., Greiner, A., Seyfert, C. and Berek, C. (1996). "Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**(1): 221-225.
- Siebenlist, U., Ravetch, J. V., Korsmeyer, S., Waldmann, T. and Leder, P. (1981). "Human immunoglobulin D segments encoded in tandem multigenic families." *Nature* **294**(5842): 631-5.
- Southern, P. J. and Berg, P. (1982). "Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter." *J Mol Appl Genet* **1**(4): 327-41.
- Spencer, J., Diss, T. C. and Isaacson, P. G. (1989). "Primary B cell gastric lymphoma. A genotypic analysis." *Am J Pathol* **135**(3): 557-64.
- Steward, M. W. and Lew, A. M. (1985). "The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody." *J Immunol Methods* **78**(2): 173-90.

- Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Galle, P. R. (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? [see comments]." *Nat Med* **2**(12): 1361-6.
- Tamaru, J., Hummel, M., Marafioti, T., Kalvelage, B., Leoncini, L., Minacci, C., Tosi, P., Wright, D. and Stein, H. (1995). "Burkitt's lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutations." *Am.J.Pathol.* **147**(5): 1398-1407.
- Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A. H. and Nagata, S. (1996). "Fas ligand in human serum." *Nat Med* **2**(3): 317-22.
- Tierens, A., Delabie, J., Pittaluga, S., Driessen, A. and DeWolf-Peeters, C. (1998). "Mutation analysis of the rearranged immunoglobulin heavy chain genes of marginal zone cell lymphomas indicates an origin from different marginal zone B lymphocyte subsets." *Blood* **91**(7): 2381-6.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* **302**(5909): 575-81.
- Tonegawa, S. (1993). "The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1987. Somatic generation of immune diversity [classical article]." *Scand J Immunol* **38**(4): 303-19.
- Trainor, K. J., Brisco, M. J., Story, C. J. and Morley, A. A. (1990). "Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level." *Blood* **75**(11): 2220-2.
- Trainor, K. J., Brisco, M. J., Wan, J. H., Neoh, S., Grist, S. and Morley, A. A. (1991). "Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction [see comments]." *Blood* **78**(1): 192-6.
- Trentin, L., Zambello, R., Sancetta, R., Facco, M., Cerutti, A., Perin, A., Siviero, M., Basso, U., Bortolin, M., Adami, F., Agostini, C. and Semenzato, G. (1997). "B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules." *Cancer Res.* **57**(21): 4940-4947.
- van den Oord, J. J., de Wolf-Peeters, C. and Desmet, V. J. (1986). "The marginal zone in the human reactive lymph node." *Am J Clin Pathol* **86**(4): 475-9.
- van Krieken, J. H., von Schilling, C., Kluin, P. M. and Lennert, K. (1989). "Splenic marginal zone lymphocytes and related cells in the lymph node: a morphologic and immunohistochemical study [see comments]." *Hum Pathol* **20**(4): 320-5.
- Voorzanger-Rousselot, N., Favrot, M. and Blay, J. Y. (1998). "Resistance to cytotoxic chemotherapy induced by CD40 ligand in lymphoma cells [In Process Citation]." *Blood* **92**(9): 3381-7.
- Wagner, S. D. and Neuberger, M. S. (1996). "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes." *Annu Rev Immunol* **14**: 441-57.

Waldmann, T. A. (1987). "The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders." *Adv Immunol* **40**: 247-321.

Wotherspoon, A. C., Doglioni, C., Diss, T. C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M. and Isaacson, P. G. (1993). "Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori* [see comments]." *Lancet* **342**(8871): 575-577.

7 ANHANG

7.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zu 3.1.4 und 0

Die erste Zeile entspricht jeweils dem durch Sequenzvergleich identifizierten Keimbahngen. Die nachfolgenden Sequenzen entsprechen den untersuchten Sequenzen des Tumors. Die Nummern zu Beginn jeder Zeile stellen die Bezeichnungen der einzelnen Plasmidklone dar.

Fall #1 entnommen (Qin, 1997)

```
DP-63 CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC
ACC TGC
3-1      . . . . .C . . . . . . . . . . . . . . . .C. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-3      . . . . .C . . . . . . . . . . . . . . . .C. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-4      . . . . .C . . . . . . . . . . . . . . . .C. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-5      . . . . .C . . . . . . . . . . . . . . . .C. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-2      . . . . .C . . . . . . . . . . . . . . . .C. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
```

CDRI

```
DP-63 GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG
AAG GGG
3-1      . . . . . .C. . . . . . . . .AA A. .T. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . .A
3-3      . . . . . .C. . . . . . . . .AA A. .T. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . .A
3-4      . . . . . .C. . . . . . . . .AA A. .T. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . .A
3-5      . . . . . .C. . . . . . . . .AA A. .T. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . .A
3-2      . . . . . .C. . . . . . . . .AA A. .T. . . .T . . . . . . . . . . . .
. . . .A
```

CDRII

```
DP-63 CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG
AGT CGA
3-1      . . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .A. . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-3      . . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .AT . . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-4      . . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .AT . . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-5      . . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .AT . . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
3-2      . . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .AT . . . . . . . . . . . . . . . .
. . . . .
```

```
DP-63 GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC
GCC GCG
3-1      . . . . . . . . . . . . . . .A .T . . . . . . . . .GC . . . . . . . . . .
. . . . .
3-3      . . . . . . . . . . . . . . .A .T . . . . . . . . .GC . . . . . . . . . .
. . . . .
3-4      . . . . . . . . . . . . . . .A .T . . . . . . . . .GC . . . . . . . . . .
. . . . .
3-5      . . . . . . . . . . . . . . .A .T . . . . . . . . .GC . . . . . . . . . .
. . . . .
```


Fall #3

CDRI

DP-71 TCT GGT GGC TCC ATC AGT **AGT TAC TAC TGG AGC** TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA
 CTG GAG
 827

 815

 817

 818

 819

 821

 823

 825

 826

 809 G

 824

CDRII

DP-71 TGG ATT GGG **TAT ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC** CCC TCC CTC AAG AGT CGA
 GTC ACC
 827

 815

 817

 818

 819

 821

 823

 825

 826

 809

 824 A

DP-71 ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCT GCG
 GAC ACG
 827C..A

 815C..A

 817C..A

 818C..A

 819C..A


```

821      ... ..C ..A
... ..
823      ... ..C ..A
... ..
825      ... ..C ..A
... ..
826      ... ..C ..A
... ..
809      ... ..C ..A
... ..
814      ... ..C ..A
... ..
    
```

```

DP-71  GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA
827    ... ..C
815    ... ..C
817    ... ..C
818    ... ..C
819    ... ..C
821    ... ..C
823    ... ..C
825    ... ..C
826    ... ..C
809    ... ..C
824    ... ..C
    
```

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	
DP-71	SGGSIS		SYWWS	WIRQPPGKGLEWIG		YIYYSGSTNYNPSLKS
	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR					
827	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
815	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
817	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
818	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
819	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
821	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
823	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
825	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
826	-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
809	C-----	-----	-----	-----	-----	aa-----
	-S					
824	-----	-----	-----E	-----	-----	aa-----
	-S					

Fall #13

CDRI

DP-71 TCT GGT GGC TCC ATC AGT **AGT** **TAC** **TAC** **TGG** **AGC** TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA
 CTG GAG
 1646 C ... A

 1648 C ... A

 1651 C ... A

 1654 C ... A

 1658 C ... A

 1663 C ... A

 1679 C ... A

 1681 C ... A

 1650 C ... A

 1659 C ... A C

 1680 C ... A

 1677 C ... A

 1685 G C ... A

 1661 C ... A

 1674 C ... A

 1678 C ... A

 1647 C ... A

 1656 C ... A

 1662 C ... A

 1686 C ... A C

 1655 C ... A C

 1652 G C ... A

 1653 G C ... A

 1683 C ... A

 1660 C ... A

 1668 C ... A C

 1682 CG ... A

 1684 GA C ... C T

CDRII

DP-71 TGG ATT GGG **TAT** **ATC** **TAT** **TAC** **AGT** **GCG** **AGC** **ACC** **AAC** **TAC** **AAC** **CCC** **TCC** **CTC** **AAG** **AGT** **CGA**
 GTC ACC

1646
.....
1648
.....
1651
.....
1654
.....
1658
.....
1663
.....
1679
.....
1681
.....
1650
.....
1659
.....
1680
.....
1677 <u>A</u>
.....
1685 <u>G</u>
.....
1661 <u>A</u>
.....
1674
.....
1678
.....
1647
.....
1656
.....
1662
.....
1686
.....
1655 <u>G</u>
.....
1652
.....
1653
.....
1683 <u>I</u>
.....
1660 T
.....
1668
.....T
1682
.....
1684 <u>C</u>
.....

1681
1650
1659
1680
1677
1685
1661
1674
1678
1647
1656
1662
1686
1655
1652
1653
1683
1660
1668
1682
1684

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
DP-71	SGGSIS		SYWWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIIYSGSTNYPNPSLKS
	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR				
1646	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1648	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1651	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1654	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1658	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1663	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1679	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1681	-----	--S-N	-----	-----	-----s-----
--					
1647	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----s-----
--					
1650	-----	--S-N	-----	-----	-----s--a-----
--					
1652	C-----	--S-N	-----	-----	-----L-----s-----
--					
1653	C-----	--S-N	-----	-----	-----L-----s-----
--					
1655	-----	--S-N	-----R-----	-----G-----	-----L-----s-----
--					
1656	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----s-----
--					
1659	-----	--S-N	-----R-----	-----	-----H-----s-----
--					
1660	-----	--S-N	-----	-----n-----	-----L-----s-----
--					
1661	-----	--S-N	-----	-----K-----	-----L-----s-----
--					
1662	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----s-----
--					
1668	-----	--S-N	R-----	-----	-v-----L-----s-----
--					
1674	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----s-----
--					
1677	-----	--S-N	-----	-----K-----	-----s-----
--					
1678	-----	--S-N	-----	-----	-----L-----s-----
--					
1680	-----	--S-N	-----	-----	-----R-----s-----
--					
1682	-----	--S-N	-----	-----	-----N-----
--					
1683	-----	--S-N	-----	-----S-----	-----L-----s-----
--					
1684	-----	DHS--	--r-----	-----S-----	-----v--Q-H--N-----
--					
1685	C-----	--S-N	-----	-----K-----	-----s-----A-----
--					
1686	-----	--S-N	-----R-----	-----	-----L-----s-----
--					

Fall #17**CDRI**

DP-50 TCT GGA TTC ACC TTC **AGT AGC TAT GGC ATG CAC** TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG
 CTG GAG

1058

 1056

 1060

 1063

 1159

 1160

 1062

 1163

 1164

 1165

 1166

 1162

 1161T
A.....

CDRII

DP-50 TGG GTG GCA **GTT ATA TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC**
 CGA TTC
 1058TA.....

 1056TA.....

 1060TA.....

 1063TA.....

 1159TA.....

 1160TA.....

 1062TA.....

 1163TA.....

 1164TA.....

 1165TA.....

 1166TA.....

 1162CTA.....

 1161TA.....

DP-50 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC
 GAG GAC
 1058T.....

 1056T.....

 1060T.....

 1063T.....

1159T.
....	
1160T.
....	
1062T.
....	
1163T.
....	
1164T.
....	
1165T.
....	
1166T.
....	
1162T.
....	
1161 <u>G</u>T.
....	

```

DP-50  ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA
1058   ... .. |C| .. .. .. ..
1056   ... .. |C| .. .. .. ..
1060   ... .. |C| .. .. .. ..
1063   ... .. |C| .. .. .. ..
1159   ... .. |C| .. .. .. ..
1160   ... .. |C| .. .. .. ..
1062   ... .. |C| .. .. .. ..
1163   ... .. |C| .. .. .. ..
1164   ... .. |C| .. .. .. ..
1165   ... .. |C| .. .. .. ..
1166   ... .. |C| .. .. .. ..
1162   ... .. |C| .. .. .. ..
1161   ... .. |C| .. .. .. ..
    
```

```

          FR1      CDR1      FR2      CDR2      FR3
DP-50  SGFTF      SSYGMH      WVRQAPGKGLEWVA      VIWYDGSNKYYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR
1058   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1056   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1060   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1063   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1159   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1160   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1062   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1163   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1164   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1165   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1166   --p--      -----      -----      -----t-T-----      -----V----L--
---
1162   --p--      -----      -----      ---y-----t-T-----      -----V----L--
---
1161   --p--      -----      -----M-----      -----t-T-----      -----G-----V----L--
---
    
```

Fall #18

```

                                CDRI
DP-75  TCT GGA TAC ACC TTC ACC GGC TAC TAT ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG
CTT GAG
753    ... .. GT . . . . G . C . . . . . A . . . . .
... ..
754    ... .. GT . . . . G . C . . . . . A . . . . .
... ..
755    ... .. GT . . . . G . C . . . . . A . . . . .
... ..
756    ... .. GT . . . . G . C . . . . . A . . . . .
... ..
758    ... .. GT . . . . G . C . . . . . A . . . . .
... ..
760    ... .. GT . . . . G . C . . . . . A . . . . .
... ..
765    ... .. GT . . . . G . C . . . . . A . . . . .
... ..
761    ... .. GT . . . . G . C . . . . . G . A . . . . .
... ..
    
```

CDRII

DP-75 TGG ATG GGA TGG ATC AAC CCT AAC AGT GGT GGC ACA AAC TAT GCA CAG AAG TTT CAG GGC
 AGG GTC

753 T... G... ...A...

 754 T... G... ...A...

 755 T... G... ...A...

 756 T... G... ...A...

 758 T... G... ...A...

 760 T... G... ...A...

 765 T... G... ...A...

 761 T... G... ...A...

DP-75 ACC ATG ACC AGG GAC ACG TCC ATC AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGG CTG AGA TCT
 GAC GAC

753 G... C... G... ...A... ...

 754 G... C... G... ...A... ...

 755 G... C... G... ...A... ...

 756 G... C... G... ...A... ...

 758 G... C... G... ...A... ...

 760 G... C... G... ...A... ...

 765 G... C... G... ...A... ...

 761 G... C... G... ...A... ...

DP-75 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA

753
 754
 755
 756
 758
 760
 765 C...
 761

CDRII

DP-73 AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG
TCC TTC

1000A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1009A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1013A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1014A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1016A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1024A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1001A ... G.. A.. .TA GTG
... ..

1027T.. ..A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

993A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1018A ... G.. A.. G.A A.. .. GTG
... ..

1008A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

994A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1017A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1019A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1021A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1005A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

992A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

997A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

995A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

1015A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

999A ... G.. A.. ..A GTG
... ..

DP-73	CAA	GGC	CAG	GTC	ACC	ATC	TCA	GCC	GAC	AAG	TCC	ATC	AGC	ACC	GCC	TAC	CTG	CAG	TGG	AGC
AGC	CTG																			
1000	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1009	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1013	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1014	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1016	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1024	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1001	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1027	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
993	.. <u>T</u> <u>AT</u> <u>TT</u>
...	...																			
1018	.. <u>T</u> <u>C</u> .. <u>AT</u>T
...	...																			
1008	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
994	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1017	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1019	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1021	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1005	.. <u>T</u> <u>G</u> <u>AT</u>T
...	...																			
992	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
997	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
995	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
1015	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			
999	.. <u>T</u> <u>AT</u>T
...	...																			

DP-73	AAG	GCC	TCG	GAC	ACC	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA
1000T
1009T
1013T
1014T
1016T
1024T
1001T
1027T
993T
1018T
1008T
994T
1017T
1019T
1021T
1005T
992 <u>G</u>T
997	.. <u>T</u>T
995	.. <u>T</u>T
1015T
999T

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
DP-73	SCKGSGYSFT		SYWIG	WVRQMPGKGLEWMG	I IYPGDS DTRYSPSFQG
	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR				
1000	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
1009	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
1013	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
1014	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
1016	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
1024	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
999	-----C---	N----	-----V-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-----
	---y---				
1001	-----	N----	-----g	-VNL---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
1015	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----A-----
	---y---				
1027	-----	N----	-----Tg	-VNp---V-----H-	-----N--y-----
	---y---				
993	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--F-----
	---y---				
1008	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-----
	---y---				
994	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-----
	---y---				
1017	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-----
	---y---				
1019	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-----
	---y---				
1021	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-----
	---y---				
995	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----N-N----
	---y---				
1018	-S-----	K----	-----g	-VNA--YV-----H-	-----TN--y-----
	---y---				
1005	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	--A-----N--y-----T-----
	---y---				
997	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-N----
	---y---				
992	-----	N----	-----g	-VNp---V-----H-	-----N--y-----T-----
	A---y---				

Fall #22

CDRI

DP-15 TCT GGA TAC ACC TTC ACC **AGT TAT GAT ATC AAC** TGG GTG CGA CAG GCC ACT GGA CAA GGG
 CTT GAG
 1573

 1574

 1557

 1558

 1572

 1571

 1569

CDRII

DP-15 TGG ATG GGA **TGG ATG AAC CCT AAC AGT GGT AAC ACA GGC TAT GCA CAG AAG TTC CAG GGC**
 AGA GTC
 1573

 1574

 1557

 1558

 1572

 1571

 1569

DP-15 ACC ATG ACC AGG AAC ACC TCC ATA AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT
 GAG GAC
 1573

 1574

 1557

 1558

 1572

 1571

 1569

DP-15 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA
 1573
 1574
 1557
 1558
 1572
 1571
 1569

FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3
 DP-15 SGYTFT SYDIN WVRQATGQGLE WMGWMNPNSGNTGYAQKFQG
 RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR


```

1573 -----
---
1574 -----
---
1572 -----i-----
---
1558 -----T-----
---
1557 -----
---
1569 -----e-N-G-v-
---
1571 -----L-----G-T-N-----
---

```

Fall #24

CDRI

```

DP-10 TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG
CTT GAG
1589 ... .. A ... .. T ...
... ..
1394 ... .. A ... T ... .. T ...
... ..
1591 C... .. A ... .. T ...
... ..
1590 ... .. A ... .. T ...
... ..
1580 ... .. A ... .. TT ...
... ..
1584 ... .. A ... .. T ...
... ..
1587 ... .. A ... .. T ...
... ..
1576 CT ..G ... .. AT ... .. G... .. A... .. T ...
... ..
1505 ... .. A ... .. T ...
... ..
1506 ... .. A ... .. T ...
... ..
1586 ... .. A ... .. T ...
... ..
1588 ... .. A ... .. T ...
... ..
1578 ... .. A ... .. T ...
... ..
1577 ... .. A ... .. T ...
... ..
1581 ... .. GA... .. T ...
... ..
1583 ... .. A ... .. T ...
... ..
1393 G... .. A ... T... .. T ...
... ..
1585 ... .. A ... .. T ...
... ..

```

CDRII

```

DP-10  TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC TTT GGT ACA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC
AGA GTC
1589  ... ..G ... ..
... ..
1394  ... ..G ... ..A ... ..
... ..
1591  ... ..G ... ..
... ..
1590  ... ..G ... ..
... ..
1580  ... ..G ... ..
... ..
1584  ... ..G ... ..
... ..
1587  ... ..G ... ..
... A..
1576  ... ..G ..A ... ..
... ..
1505  ... ..G ... ..
... ..
1506  ... ..G ... ..
... ..
1586  ... ..G ... ..G ... ..
... ..
1588  ... ..G ... ..G ... ..
... ..
1578  ... ..G ... ..
... ..
1577  ... ..G ... ..
... ..
1581  ... ..G ... ..
... ..
1583  ... ..G ... ..C ... ..
... ..
1393  ... ..G ... ..
... ..
1585  ... ..G ... ..
... ..

DP-10  ACG ATT ACC GCG GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT
GAG GAC
1589  ..C ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1394  ..C ... ..C ... ..A ... ..
..C ...
1591  ..C ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1590  ..C ... T.. ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1580  ..C ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1584  ..C G.. ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1587  ..C ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1576  ..C ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1505  ..C ... ..T ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1506  ..C ... ..T ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1586  ..C ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1588  ..C ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..
1578  ..T ... ..T ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
... ..

```

1577 ..CTCT.A

 1581 ..CTCA

 1583 ..CTC T... ..A

 1393 ..CTC T... ..A

 1585 ..CTCAA

DP-10 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA
 1589
 1394
 1591
 1590
 1580C
 1584A.T
 1587
 1576
 1505
 1506A
 1586A
 1588C
 1578C
 1577A
 1581A
 1583A
 1393C
 1585A

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
DP-10	SCKASGGTFS		SYAIS	WVRQAPQGLEWMG	GIIPFGTANYAQKFQG
	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR				
1589	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----t---D---l-----

1505	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----st---D---l-----

1394	-----	N-V--	-----H-----	-----a---k---	--t-----t---D---l--D--

1591	----P-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----t---D---l-----

1590	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-S-----t---D---l-----

1580	-----	N----	-----L-----	-----a-----	--t-----t---D---l-----
--y----					
1584	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--tV-----t---D---l-----
-I-----					
1587	-----	N----	-----H-----	-----a-----	-It-----t---D---l-----

1576	----Lg-----	N----	--G--H-H-----	-----aK-----	--t-----t---D---l-----

1586	-----	N----	-----H-----g	-----a-----	--t-----t---D---l-----
-v-----					
1588	-----	N----	-----H-----g	-----a-----	--t-----t---D---l-----
-v-----					
1578	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t----s--t---D---l-----
-v-----					
1506	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----st---D---l-----
-v-----					
1577	-----	N----	-----H-----	-----a-----	--t-----t---D---l-----
-v-----					
1581	-----	D----	-----H-----	-----a-----	--t-----t---D---l-----
-v-----					
1583	-----	N----	-----H-----	-----a---N---	--t-----t---Dl--l-----
-v-----					

1393 ----C----- N-V-- -----H----- -----t-----t---Dl--l-----
-v-----
1585 ----- N----- H----- -----a----- --t-----t---D-I-l-----
-v-----

Fall #11/VH1

CDRI

DP-2 TCT GGA TTC ACC TTT ACT **AGC TCT GCT GTG CAG** TGG GTG CGA CAG GCT CGT GGA CAA CGC
 CTT GAG

895 G

 889 T

 891 T

 892 T

 896 T

 899 T

 900 T

 1096 T

 1098 T

 1099 T

 1100 T

 1114 T

 1115 T

 897 T

 888 G

 1108 A G . T G . . . A G G

 898 T . . A T

 894 T

 1095 T

CDRII

DP-2 TGG ATA GGA **TGG ATC GTC GTT GGC AGT GGT AAC ACA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GAA**
 AGA GTC

895

 889 G A

 891 G A

 892 G A

 896 G A

 899 G A

 900 G A

 1096 G A

 1098 G A

 1099 G A


```

DP-2   ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG GCA
889    ... ..T ... ..
895    ... ..T ... ..
891    ... ..T ... ..
892    ... ..T ... ..
896    ... ..T ... ..
899    ... ..T ... ..
900    ... ..T ... ..
1096   ... ..T ... ..
1098   ... ..T ... ..
1099   ... ..T ... ..
1100   ... ..T ... ..
1114   ... ..T ... ..
1115   ... ..T ... ..
897    ... ..T ... ..
888    ... ..T ... ..
1108   ... ..T ... ..
898    ... ..T ... ..
894    ... ..T ... ..
1095   ... ..GT ... ..
    
```

```

          FR1      CDR1      FR2      CDR2      FR3
DP-2     SGFTFT      SSAVQ      WVRQARGQRLEWIG      WIVVGSNGNTNYAQKFQE
RVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAA
889      ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
891      ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
892      ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
896      ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
899      ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
900      ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1096     ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1098     ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1099     ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1100     ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1114     ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1115     ----- s----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1095     ----- s----- --G-----K-----q- -----N----VT---A-----
C---
898     --f-L- T----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
897     ----- s----- --G-----q- -A-----N----VT---A-----
y---
894     ----- s----- --G-----q- -----N----VT---AG-----
y---
895     ----- s----- -----N----VT---A-----
y---
888     ----- G----- --G-----q- -----N----VT---A-----
y---
1108     ----- G----- --G-----qe -----N----VT---A-----
y---
    
```

Fall #11/VH4

CDRI

DP-65 TCT GGT GGC TCC ATC AGC **AGT GGT GGT TAC TAC** TGG AGC TGG ATC CGC CAG CAC CCA GGG
 AAG GGC
 911 AA. CC.T TT.A

 912 AA. CC.T TT.A

 919 AA. CC.T TT.A

CDRII

DP-65 CTG GAG TGG ATT GGG **TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG**
AGT CGA
 911 ..AC T.TT

 912 ..AC T.TT

 919 ..AC T.TT

DP-65 GTT ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCT AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACT
 GCC GCG
 911 A..C ... T..AC ..TA T.. A..

 912 A..C ... T..AC ..TA T.. A..

 919 A..C ... T..AC ..TA T.. A..

DP-65 GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA
 911A ..C T..G..
 912A ..C T..G..
 919A ..C T..G..

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
DP-65	SGGSIS		SGGYWS	WIRQHPGKGLEWIG	YIYYSGSTYYNPSLKS
	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR				
911	s-----	--NP--s	----F-g--l--i-	--F---s---n-----	-I-i-L-t-Nn--s--lN-----
	vyF--G				
912	s-----	--NP--s	----F-g--l--i-	--F---s---n-----	-I-i-L-t-Nn--s--lN-----
	vyF--G				
919	s-----	--NP--s	----F-g--l--i-	--F---s---n-----	-I-i-L-t-Nn--s--lN-----
	vyF--G				

Fall #14/VH1

CDRI

DP-14 TCT GGT TAC ACC TTT ACC **AGC TAT GGT ATC AGC** TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG
 CTT GAG
 1201 ..G ... A.. .GT

 1198GTT

 1190GT

 1193 ..GTG

 1200TTGT T..

 1194TTGT

 1195TTGT

CDRII

DP-14 TGG ATG GGA **TGG ATC AGC GCT TAC AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG CTC CAG GGC**
 AGA GTC
 1201T .G.. T.T A T.. A..

 1198T .G.. ..TC T.T A T.. A..

 1190T .G.. ..TC T.T A T.. A..

 1193G G.. .G.. T.T G..

 1200G G..C ..C T.T C.. G.. A..

 1194G G..C ... T.T C.. G.. A..

 1195G G..C ... T.T C..A G..

DP-14 ACC ATG ACC ACA GAC ACA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT
 GAC GAC
 1201 .A..T A.. G.. C.. ... C..

 1198 .A..T A.. G.. C.. ... C..

 1190 .A..T A.. G.. C.. ... C..

 1193 C..

 1200T T..T C..

 1194T T..T C..

 1195T T..T C.. A.. A..

DP-14 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA
 1201T
 1198G ..A .TA .TG ..C .A..
 1190T
 1193
 1200
 1194
 1195 ..C .G.. ... T.. A..

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
DP-14	SGYTFT		SYGIS	WVRQAPQGQLEWMG	WISAYNGNTNYAQLQ
	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR				

```

1193  s-y--- --g-- -----g --GG---Y-----V-- -----D-----
---
1200  --y--- s-g-s -----L-----g ---G-ngY--S---V-D ----tI----s---D-----
---
1194  --y--- s-g-s -----g ---G-n-Y--S---V-D ----tI----s---D-----
---
1195  --y--- s-g-s -----g ---G-n-Y--S--kV-D ----tI----s---D-K--K---tG-F-
--K
1201  --NS-- ----- -CDRP----- --sG---Y-K---V-D --N---d---NA---D-r-----
t---
1198  ---S-- s----- ----- --sGy-gY-K---V-D --N---d---NA---D-r-----
avLLcE-
1190  ---S-- ----- ----- --sGy-gY-K---V-D --N---d---NA---D-r-----
t---
    
```

Fall #14/VH4

CDRI

```

DP-78  TCT GGT GGC TCC ATC AGC AGT GGT GAT TAC TAC TGG AGT TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG
AAG GGC
1046   ... .. A . . . . .T .T . . . . .
... ..
1047   ... .. A . . . . .T .T . . . . .
... ..
1048   ... .. A . . . . .T .T . . . . .
... ..
1050   ... .. A . . . . .T .T . . . . .
... ..
1153   ... .. A . . . . .T .T . . . . .
... ..
1154   ... .. A . . . . .T .T . . . . .
... ..
1155   ... .. A . . . . .T .T . . . . .
... ..
1049   T . . . . . A . . . . .T .T . . . . .
... ..
    
```

CDRII

```

DP-78  CTG GAG TGG ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG
AGT CGA
1046   ... .. G . . . . .
... ..
1047   ... .. G . . . . .
... ..
1048   ... .. G . . . . .
... ..
1050   ... .. G . . . . .
... ..
1153   ... .. G . . . . .
... ..
1154   ... .. G . . . . .
... ..
1155   ... .. G . . T . . G . . . . .
... ..
1049   ... .. A . . . . . G . . . . . G . . . . .
... ..
    
```

DP-78 GTT ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACT
 GCC GCA
 1046 G ..

 1047 G ..

 1048 G ..

 1050 G ..

 1153 G ..

 1154 G .. T ..

 1155 ..C .. G ..

 1049 G ..

DP-78 GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCC AGA GAA
 1046 ..
 1047 ..
 1048 ..
 1050 ..
 1153 ..
 1154 ..C ..
 1155 ..
 1049 ..

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
DP-78	SGGSIS		SGDYYS	WIRQPPGKLEWIG	YIYYSGSTYYNPSLKS
	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR				
1046	----N	---yy--	-----	-----S-----	---M-----

1047	----N	---yy--	-----	-----S-----	---M-----

1048	----N	---yy--	-----	-----S-----	---M-----

1050	----N	---yy--	-----	-----S-----	---M-----

1153	----N	---yy--	-----	-----S-----	---M-----

1155	----N	---yy--	-----	-----ty-S-----	-v-M-----

1049	F----N	---yy--	-----	-i-----t--S-----	---M-----

1154	----N	---yy--	-----	-----S-----	---M--Y-----t---

7.2 Verwendete Oligonukleotide

		T _m [°C]
Oligonukleotide zu 3.1.1		
V _H -cons-FOR	5'CTGTCGACACGGCCGTGTATTACT'3	64
J _H -cons-REV	5'AACTGCAGAGGAGACGGTGACC'3	70
Oligonukleotide zu 3.1.2		
V _H 1-FOR	5'CCTCAGTGAAGT(CT)TCCTGCAAGGC'3	
V _H 2-FOR	5'GTCCTGCGCTGGTGAAA(GC)CCACACA'3	
V _H 3- FOR	5'GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG'3	86
V _H 4- FOR	5'GACCCTGTCCCTCACCTGC(AG)CTGTC'3	
V _H 5- FOR	5'AAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGA(AG)GA'3	
V _H 6- FOR	5'ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG'3	82
J _H (1-5)-REV	5'GGTGACCAGGGT(GCT)CC(CT)TGGCCCCAG'3	88
J _H 6-REV	5'GGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG'3	92
1-CDR3-1-REV	5'AACGAGGTTAGTTAGACCGCC'3	62
3-CDR3-377-REV	5'GTATAGCAGCTGGTACTTCCG'3	64
11-CDR3-889-REV	5'GGCAAAAGATCGTAATGCGAGAC'3	66
11-CDR3-911-REV	5'GGCCCCGCCACCAGTTGATGA'3	70
13-CDR3-13-REV	5'GTAGTACCGCGTTGAAAC'3	54
14-CDR3-391-REV	5'GTAGCCGTAGCCACCCGATTC'3	68
14-CDR3-550-REV	5'GTCCCCGAACCATATCGATTG'3	64
16-CDR3-1496-REV	5'GTTCCCTCCCCGAATCACGAC'3	64
17-CDR3-662-REV	5'CTAGTAGCTCCCCCGACTGC'3	70
18-CDR3-40-REV	5'CGAGCTGCCGGCATCACGATC'3	70
19-CDR3-482-REV	5'CACCGTGCCGCCACCACTTTG'3	70
22-CDR3-1228-REV	5'CAACCGAAGCACCCCTGGCCTC'3	70
24-CDR3-431-REV	5'CACTGCAGGGCCCCCTCCC'3	68

GAPDH-cDNA-FOR	5'TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT'3	78
GAPDH-cDNA-FOR1.1	5'GTGGAAGGACTCATGACCACAGTC'3	70
GAPDH-cDNA-REV	5'CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC'3	78
huCD40-L1.1-FOR	5'CCTCAAATTGCGGCACATGT'3	60
huCD40-L-REV	5'GACAAACACCGAAGCACCTGG'3	66
huFAS-L-E1-FOR	5'GGCCTGTGTCTCCTTGTGATG'3	66
huFAS-L-E4-REV	5'CAGGTTGTTGCAAGATTGACCC'3	66
huFas-L-kompl.-FOR	5'GCTGCCATGCAGCAGCCC'3	62
huFas-L-kompl.-REV	5'CTTCTCTTAGAGCTTATATAAGCC'3	66
huCD32-cDNA-FOR	5'CAAAGGCTGTGCTGAAACTCGAG'3	70
huCD32-cDNA-REV	5'CTGCAGTAGATCAAGGCCACTAC'3	70
IFN γ -FOR	5'TTGGAAGAGAGGAGAGTGACAG'3	62
IFN γ -REV	5'TACTGGGATGCTCTTCGACCTC'3	68
IFN γ -Rezeptor-FOR	5'GCCGTCCTCAGTGCCTACACCA'3	72
IFN γ -Rezeptor-REV	5'TTATACTGGATCTCACTTCCGTTCA'3	70
IL2-FOR	5'ATGTACAGGATGCAACTCCTGT'3	64
IL2-REV	5'GTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG'3	66
IL10-FOR	5'AGACTTTCTTTCAAATGAAGGATC'3	64
IL10-REV	5'TCAGTTTCGTATCTTCATTGTCA'3	62
IL13-FOR	5'TGGCGCTTTTGTGACCACGGT'3	68
IL13-REV	5'AAGCTGGAAAACCCAGCTGAGA'3	66
TGF β 1-FOR	5'AACCCACAACGAAATCTATGAC'3	62
TGF β 1-REV	5'CTTCTCCGTGGACCTGAAGCAA'3	68

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	<u>Constanze</u> Helga Knörr
Geburtsdatum	20. Februar 1970
Geburtsort	Ansbach
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1976 - 1980	Grundschule Ansbach West
1980 - 1989	Platen-Gymnasium Ansbach
1989	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1989 - 1995	Biologiestudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
05.1994	Diplomprüfung
06.1994 - 05.1995	Diplomarbeit am Institut für Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. G.H. Fey. Thema: „Charakterisierung eines genomischen Klons des menschlichen AF-4 Gens und Konstruktion des Gen-Knock-Out-Vektors GDC2 zur Inaktivierung des ALL1/ AF-4 Fusionsgens in Leukämiezellen mit einer Translokation t(4;11)“
07.1995 - 12.1999	Dissertation am Institut für Pathologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink und PD Dr. G. Pflugfelder. Thema: „Untersuchungen zu den Mechanismen in der Entwicklung maligner B-Zell-Lymphome des mukosaassoziierten

lymphatischen Gewebe (MALT) - Typs“.

Würzburg, Februar 2000

7.4 Veröffentlichungen

Publikationen

Knörr C., Amrehn Ch., Seeberger H., Müller-Hermelink H.K., Greiner A. (1999). Expression of costimulatory molecules in low-grade MALT-type lymphomas *in vivo*. Am. J. Pathol. 1999, Dec.; 155(6): 2019-2027

Seeberger H., **Knörr C.**, Müller-Hermelink H.K., Greiner A. (2000). Impaired apoptosis in low-grade B-cell lymphomas of MALT-type. Dev. Immunol., in press

Hensel F., **Knörr C.**, Chudnoskaja N., Berek C., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P. (1999). Germline encoded autoantibodies in H. pylori associated stomach carcinogenesis. Int. J. Cancer, 1999, 81 (2), 229-235

Greiner A., **Knörr C.**, Qin Y., Schultz A., Marx A., Krozek R.A., Müller-Hermelink H.K. (1998). CD40-Ligand and Autoantigen are involved in the pathogenesis of low-grade B-cell lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue (MALT-type). Dev. Immunol., Vol. 6, 187-196

Greiner A., **Knörr C.**, Qin Y., Sebald W., Schimpl A., Banchereau J., Müller-Hermelink H.K. (1997). Low-grade B-cell lymphomas of MALT-type require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for *in vitro* growth and differentiation. Am. J. Pathol. 1997 May; 150(5): 1583-1593

Haedicke W., **Knörr C.**, Müller-Hermelink H.K., Greiner A. (1997). Receptor analysis of idiotype antibodies derived from MALT-type B-cell lymphoma hybridoma. Hum. Antibodies 1997; 8(1): 33-36

Nilson I., Reichel M., Ennas M.G., Greim R., **Knörr C.**, Siegler G., Greil J., Fey G.H., Marschalek R. (1997). Exon/Intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. Br. J. Haematol. 1997 Jul., 98(1): 157-169

Buchartikel

Greiner A., **Knörr C.**, Seeberger H., Schultz A., Müller-Hermelink H.K. (2000). Tumor biology of mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Rec. Res. Cancer Research*, Vol. 156: 18-25

Greiner A., Seeberger H., **Knörr C.**, Müller-Hermelink H.K. (1999) MALT-type B-cell lymphomas escaped the Fas-mediated apoptosis. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 83: 247-253

Greiner A., Qin Y., **Knörr C.**, Haedicke W., Kaup A., Müller-Hermelink H.K. (1996). Autoantigen receptors in extranodal Non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 80: 160-168

Haedicke W., Greiner A., **Knörr C.**, Eck M., Müller-Hermelink H.K. (1996). Hybridomas as tools for resaerch on MALT-type lymphomas. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 1996; 80: 308-311

Posterveröffent- lichungen

Knörr C., Seeberger H., Müller-Hermelink H.K., Greiner A. (1997). *In vivo* evidence that T-cell help drives the evolution of low-grade MALT-type B-cell lymphomas. *Immunbiol.* 197, No. 2-4, 1997

Knörr C., Schultz A., Müller-Hermelink H.K., Greiner A. (1996). CD40-Ligand expression in low-grade B-cell lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue. *Immunbiol.* 196, No. 1-3, 1996

Greiner A., Seeberger H., **Knörr C.**, Starostik P., Müller-Hermelink H.K. (1998). MALT-type B-cell lymphomas escape the censoring Fas-mediated apoptosis. *Blood* 92(10): 484a

Seeberger H., **Knörr C.**, Müller-Hermelink H.K., Greiner A. (1997). Fas-Ligand expression in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type is attributed to activated tumor-infiltrating T-cells. *Immunbiol.* 197, No. 2-4, 1997

Greiner A., **Knörr C.**, Bussolati G., Sack U., Müller-Hermelink H.K. (1997). Survival of thyroid low-grade MALT-type lymphoma B-cells is mediated by its (auto)antigen receptor. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 81: 383