

**Aus dem Pathologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink**

**Etablierung stabiler Transfektanten für funktionelle Analysen des MALT1-Gens  
in t(11;18)(q21;q21)-positiven MALT-Typ-Lymphomen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Ariane Maike Steinert  
aus Schluchsee**

**Würzburg, Juli 2005**

**Referent: Priv.-Doz. Dr. A. Greiner**

**Koreferent: Prof. Dr. H. Girschick**

**Dekan: Prof. Dr. G. Ertl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 2006**

**Die Promovendin ist Ärztin**

**Meiner Familie**

<b><u>I</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>II</u></b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b>II.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>6</b>
II.1.1	UNTERSUCHTE TUMORZELLEN	6
II.1.2	CHEMIKALIEN	6
II.1.3	ENZYME	7
II.1.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	7
II.1.5	PROKARYONTISCHE ZELLEN	8
II.1.6	EUKARYONTISCHE ZELLEN	8
II.1.7	PLASMIDE	9
II.1.8	ARBEITSGERÄTE UND HILFSMITTEL	10
<b>II.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>11</b>
II.2.1	TRIZOL-RNA-ISOLIERUNG	11
II.2.2	CDNA-SYNTHESE	12
II.2.3	STANDARD-POLYMERASEREAKTION (PCR) MIT CDNA ALS TEMPLATE	12
II.2.3.1	PCR-Optimierung	13
II.2.3.2	GAPDH-PCR	13
II.2.3.3	Bedingungen weiterer PCRs	14
II.2.4	GEL-ELEKTROPHORESE	14
II.2.5	AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN	14
II.2.5.1	Aufreinigung aus Agarosegel	14
II.2.5.2	Aufreinigung aus Lösungen	16
II.2.6	KLONIERUNG	16
II.2.6.1	Vorbereitung des aufgereinigten PCR-Produktes	16
II.2.6.1.1	Blunt ends	16
II.2.6.1.2	Sticky ends	16
II.2.6.2	Ligation mit dem Klonierungsvektor	17
II.2.6.2.1	pPCR-Script-Vektor	17
II.2.6.2.2	pEYZ-MCS-Virusvektor	17
II.2.6.3	Transformation in prokaryontische Zellen	18

II.2.7	MINIPRÄPARATION VON PLASMID-DNA .....	19
II.2.8	RESTRIKTIONSVERDAU .....	20
II.2.9	CYCLESEQUENCING .....	20
II.2.10	TRANSFEKTION UND INFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN .....	22
II.2.10.1	Transfektion .....	23
II.2.10.2	Infektion .....	23
II.2.11	ZELLKULTUR .....	23
II.2.12	FACS-ANALYSE .....	24
II.2.13	WACHSTUMSVERHALTEN UND ZELLZYKLUS .....	24
II.2.13.1	Wachstumsverhalten .....	24
II.2.13.2	Zellzyklus .....	25
<b>III</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b>26</b>
<b>III.1</b>	<b>ISOLIERUNG DES MALT1-GEN-BRUCHSTÜCKS</b> .....	<b>26</b>
<b>III.2</b>	<b>KLONIERUNG DES ISOLIERTEN BRUCHSTÜCKS IN DEN PPCR-SCRIPT AMP SK(+)-KLONIERUNGSVEKTOR UND SEQUENZIERUNG</b> .....	<b>30</b>
<b>III.3</b>	<b>HERSTELLUNG EINES VEKTORKONSTRUKTES UND INFEKTION EINER HUMANEN B-ZELLINIE</b> .....	<b>33</b>
III.3.1	LIGATION VON RETROVIRALEM VEKTOR MIT INSERT UND KLONIERUNG DES REKOMBINANTEN PLASMIDS .....	33
III.3.2	TRANSFEKTION UND INFEKTION .....	35
<b>III.4</b>	<b>ÜBERPRÜFUNG DER MALT1-BRUCHSTÜCK-EXPRESSION IN DEN VERSUCHSZELLEN</b> .....	<b>35</b>
<b>III.5</b>	<b>METHODEN ZUR FUNKTIONSANALYSE VON GENEN</b> .....	<b>40</b>
<b>III.6</b>	<b>WACHSTUMSVERHALTEN UND ZELLZYKLUS</b> .....	<b>42</b>
III.6.1	WACHSTUMSVERHALTEN .....	42
III.6.2	ZELLZYKLUS .....	43
<b>IV</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b> .....	<b>45</b>
<b>V</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	<b>48</b>

**VI LITERATURVERZEICHNIS..... 49**

**VII ANHANG ..... 55**

**VII.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... 55**

**VII.2 OLIGONUKLEOTIDE..... 59**

**VII.3 SEQUENZEN..... 60**

VII.3.1 MALT1-SEQUENZ ..... 60

VII.3.2 VEKTORSEQUENZEN ..... 62

VII.3.2.1 pPCR-Script Amp SK(+)-Klonierungsvektor, 2961 bp ..... 62

VII.3.2.2 pEYZ-MCS-Virusvektor, 8706 bp ..... 62

## **I      EINLEITUNG**

MALT-Typ-Lymphome (*mucosa associated lymphoid tissue*) wurden 1983 zum ersten Mal von P. G. Isaacson auf der Grundlage seiner histopathologischen Beobachtungen beschrieben<sup>1</sup>. Heute werden die MALT-Typ-Lymphome entsprechend der WHO-Klassifikation der neoplastischen Erkrankungen der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe von 2001 definiert und den Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen (MZBZL) zugerechnet<sup>2</sup>. Diese Klassifikation stützt sich auf die Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms<sup>3</sup> (REAL, 1994) der International Lymphoma Study Group, die eine Einteilung entsprechend morphologischer, immunologischer und genetischer Aspekte erarbeitete.

Die MZBZL setzen sich zusammen aus den nodalen und splenischen MZBZL sowie den extranodalen MZBZL vom MALT-Typ. Die MZBZL zeigen ein morphologisch heterogenes Bild aus Marginalzonen-B-Zellen, monozytoiden B-Zellen, kleinen Lymphozyten und Plasmazellen, sowie einigen Immuno- und Zentroblasten<sup>3</sup>.

Die Lymphome vom MALT-Typ sind die größte Entität der MZBZL und stellen außerdem die häufigste Form extranodaler Lymphome dar<sup>4</sup>. Ihr morphologisches Korrelat sind die sich aus den Zentrozyten des Keimzentrums differenzierenden Marginalzonen-B-Zellen, den sogenannten Gedächtnis-B-Zellen<sup>3</sup>. Die Mehrheit der MALT-Typ-Lymphome entwickelt sich in der Magenschleimhaut, wo sie auf dem Boden einer chronischen H.p.-assoziierten Entzündung entstehen<sup>4</sup>. MALT-Typ-Lymphome treten aber ebenso in der Lunge, der Schilddrüse, der Tränendrüse, in den Speicheldrüsen, im Thymus, der Leber, in der Haut und Bindehaut auf<sup>4-6</sup>. Auch hier sind sie regelmäßig mit einer chronischen Entzündung oder Autoimmunerkrankung assoziiert wie dem Sjögren-Syndrom der Speicheldrüsen, oder der Hashimoto-Thyreoiditis der Schilddrüse<sup>7-10</sup>. Man nimmt daher an, dass während der entzündlichen Zellproliferation das Genom der Zellen destabilisiert wird, und sich schließlich ein autonom proliferierendes, monoklonales Lymphom entwickelt<sup>11</sup>. Während anfangs die Proliferation der Tumorzellen von einer T-Helfer-Zellen induzierten Stimulation abhängig<sup>12</sup>, und durch Elimination der zugrundeliegenden Ursache (z.B. H.p.-Eradikation) reversibel ist<sup>13-15</sup>, werden die neoplasti-

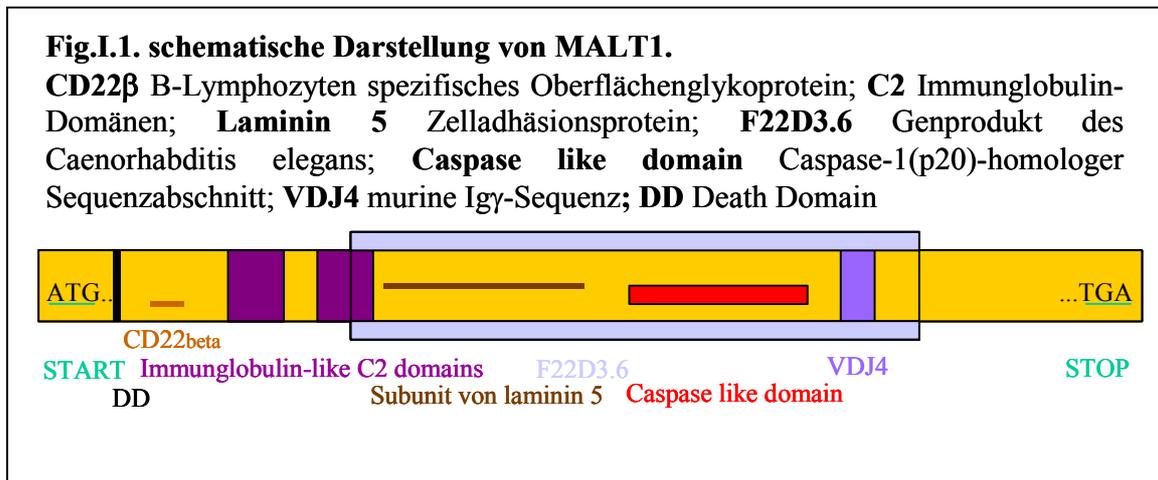
schen Zellen mit zunehmenden genetischen Alterationen von dieser Stimulation unabhängig<sup>16,17</sup>.

Im Genom der malignen MALT-Typ-Lymphomzellen fielen insbesondere drei Translokationen auf, die für die Tumorphogenese von Bedeutung sein sollen. Diese betreffen die Translokation t(1;14)(p22;q32), bei welcher das CARD-Gen Bcl-10 auf 1p22, und ein Ig heavy chain-Lokus auf 14q32 fusioniert werden<sup>18-20</sup>. Eine weitere rekurrente Aberration wurde mit der t(14;18)(q32;q21) nachgewiesen, bei der Ig heavy chain-Lokus auf 14q32 und MALT1 auf 18q21 transloziert werden<sup>21</sup>. Als häufigste Translokation in MALT-Typ-Lymphomen fand sich t(11;18)(q21;q21)<sup>22</sup>, mit einer Frequenz von 19-36%, durch welche API2, ein Apoptose inhibierendes Protein auf 11q21, und MALT1 auf 18q21 fusionieren<sup>22-25</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Translokation t(11;18)(q21;q21) ausschließlich in extranodalen MZBZL vom MALT-Typ findet<sup>22,26-28</sup>. Auffällig ist, dass diese Translokation in der Regel als exklusive Alteration in der malignen Zelle auftritt, und somit offenbar tumorigen ist<sup>26,29,30</sup>.

Ziel dieser Arbeit war es, den MALT1-Anteil der t(11;18)(q21;q21)-Translokation näher zu charakterisieren. Denn während API2 und weitere Familienmitglieder der IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) funktionell und strukturell bereits gut untersucht sind<sup>31-33</sup>, wurde erst vor wenigen Jahren die Sequenz von MALT1 beschrieben<sup>25</sup>, wobei die Funktion des Gens wird noch weitgehend unbekannt ist.

Dem Gen entsprechen 813 Aminosäuren, und es kodiert für eine humane Paracaspase<sup>34</sup>. Strukturanalysen des MALT1 zeigten Sequenzhomologien mit anderen Genen (s. Fig. I.1., S. 3). So finden sich am carboxy-terminalen Ende zunächst eine death domain, dann das B-Lymphozyten-spezifische Zelloberflächen-Glykoprotein CD22 $\beta$ , sowie zwei Immunglobulin-ähnliche C2-Domänen. Außerdem liegt ein der Laminin-5  $\alpha$ 3b Unter-einheit gleichender Abschnitt auf MALT1, welches verschiedenen Zellen zur Adhäsion an ihre Umgebung dient. Eine dem F22D3.6-Gen des *Caenorhabditis elegans* gleichende Sequenz überspannt eine weite MALT1-Region (458 Aminosäuren), dessen Funktion aber noch unbekannt ist. Weiterhin zeigt sich eine Domäne, die homolog zu der Ig $\gamma$ -Kette VDJ4 der Maus ist. Es findet sich zudem ein Abschnitt, dessen Sequenz der Caspase-1(p20) entspricht (caspase like domain). Zwar ist in diesem Bereich die Region

nicht mehr enthalten, welche für das aktive Zentrum der Caspase kodiert, eine Substratbindung ist aber dennoch möglich<sup>25,28,35,36</sup>. MALT1 wird vornehmlich in lymphopoetischen Zellen exprimiert, insbesondere in prä-B-Zellen, in Gedächtnis-B-Zellen und in Plasmazellen<sup>37</sup>.



Bei der Fusion von API2 und MALT1 durch die Translokation t(11;18) fand man bisher fünf verschiedene Varianten der beiden Partner: API2 wird in fast allen Fällen (91%) hinter den drei BIR-Domänen gebrochen und tritt nur selten in einer zweiten Form unter Beibehaltung der CARD-Sequenz auf. Von MALT1 wurden bislang vier verschiedene, hauptsächlich auftretende Varianten beschrieben (s. Fig. I.2., S. 4).

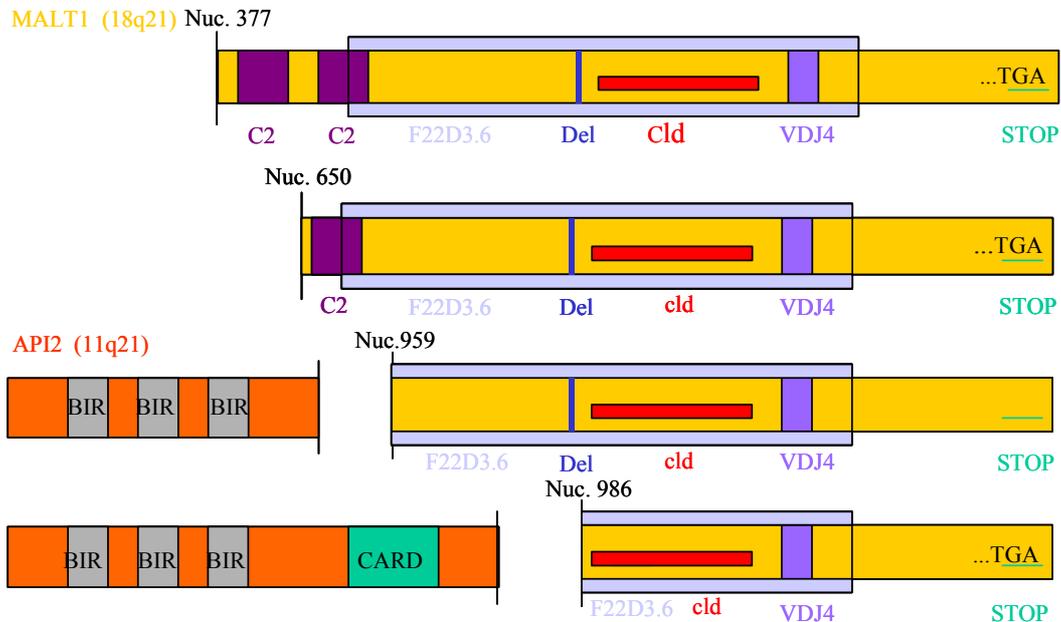
Es fand sich jeweils eine Deletion der Nukleotide 926-958 (GenBank acc. No. NM\_006785), sowie eine der Caspase-1(p20) homologe Sequenz. Nur in 39% der Fälle finden sich im MALT1-Anteil der Fusion die dem Immunglobulin C2 gleichenden Abschnitte. Das Leseraster blieb bei allen Varianten erhalten<sup>28,38</sup>.

Der Hintergrund für den in API2 relativ konstanten, und im Gegensatz dazu bei MALT1 variablen Bruchpunkt ist bislang unklar.

Dass bei API2 stets alle drei BIR-Domänen und bei MALT1 die Caspase-ähnliche Domäne konserviert bleiben, könnte ein Hinweis auf deren wichtige funktionelle Bedeutung für das Fusionsprodukt darstellen.

**Fig.I.2. schematische Darstellung der API2-MLT Bruchstückvarianten**

**C2** Immunglobulin-Domänen; **F22D3.6** Gensequenz des *Caenorhabditis elegans*; **Del** Deletion der Nukleotide 926-959 (GenBank add. No. NM\_006785); **Caspase like domain** Caspase-1(p20)-homologer Sequenzabschnitt; **VDJ4** murine Igy-Sequenz; **Nuc.** Nucleotidzahl, bei welcher der Bruchpunkt liegt; **BIR** Baculoviral inhibitor of apoptosis protein; **CARD** caspase recruitment domain



Funktionell nimmt man an, dass MALT1 infolge der Translokation überexprimiert wird und somit onkogen wirkt (Assanassen, Manuskript eingereicht). Außerdem wurde die Interaktionsfähigkeit von MALT1 mit BCL-10 festgestellt<sup>39</sup>. Bcl-10 ist ein CARD-Gen, welche als Transduktoren sowohl von Apoptose-, als auch Überlebenssignalen fungieren<sup>40</sup>. Durch Induktion von NF- $\kappa$ B kann BCL-10 solche pro-survival Signale aktivieren, welche durch Komplexierung von BCL-10 mit MALT1 die 150fache Stärke erreichen<sup>39</sup>. Bei der Fusion von MALT1 mit API2, ebenfalls ein CARD-Gen<sup>33</sup>, erwies sich API2 als Dysregulator des Zellwachstums: die BIR-Domänen des trunktierten API2-Gens autooligomerisieren die caspase-like-domain im MALT1-Bruchstück und setzen eine antiaoptotische Signalkaskade durch unkontrollierte NF- $\kappa$ B-Induktion in Gang. Weder API2 noch MALT1 konnten dies ohne den jeweiligen Fusionspartner bewirken<sup>34,39</sup>, was wiederum die Bedeutung der BIR-Domänen und der caspase like domain unterstreicht.

Bislang wurde das MALT1-Gen meist in seiner kompletten Form untersucht, nicht aber der Genabschnitt, der aus einer t(11;18)-Translokation als Bruchstück hervorgeht.

Für Analysen dieses Fragments wurden mit der vorliegenden Arbeit die Voraussetzungen geschaffen.

Bei der Wahl der zu untersuchenden Bruchstückvariante fiel die Entscheidung auf das kürzeste beschriebene MALT1-Fragment<sup>38</sup>(vgl. Fig. I.2., S. 4). Dies gründet auf der Überlegung, dass es mit einer Frequenz von etwa 19%<sup>28,38,41,42</sup> keine Ausnahme darstellt, und der Funktionalität des Fusionsproteins zu genügen scheint. Zusätzlich spricht dafür, dass die funktionell offensichtlich bedeutsame caspase like domain im verwendeten Genabschnitt enthalten ist.

Dieses MALT1-Fragment wurde daher aus den Zellen eines API2-MALT1-positiven MALT-Typ-Lymphoms isoliert und über zahlreiche Zwischenschritte in einen retroviralen Vektor kloniert. Mit diesem Vektor konnten dann Zellen einer humanen B-Zelllinie infiziert und hiermit der MALT1-Genabschnitt in das Genom dieser Zellen integriert werden.

Somit entstand ein Werkzeug für vielfältige Funktionsanalysen. Als Ausgangspunkt dafür wurden noch im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und Zellzyklus der rekombinanten Zellen angestellt.

In Zukunft können sich weitere Analysen zur Bedeutung der caspase like domain, der Wechselwirkung des MALT1-Fragments mit Bcl-10, und der Interaktion mit dem Fusionspartner API2 anschließen.

Während der Fertigstellung dieser Arbeit wurden Untersuchungsergebnisse veröffentlicht, die neue Daten zur Funktion von MALT1 lieferten. So konnten K. Izumiyama et al darstellen, dass das C-terminale Ende von MALT1 für die zytoplasmatische Lokalisation der Produkte sowohl von MALT1 und seinen Fragmenten, als auch der von der API2-MALT1-Fusion verantwortlich ist<sup>43</sup>. Zudem konnte dargelegt werden, dass durch die Trunkierung der Gene eine erhöhte Stabilität der exprimierten Proteine erreicht wird<sup>43</sup>. Diese Stabilisierung könnte zu einer bereits in anderen Arbeiten vermuteten

permanenten NF- $\kappa$ B-Induktion führen, und durch die NF- $\kappa$ B vermittelte Apoptose-Inhibition bedeutend zur MALT-Typ-Lymphomgenese beitragen<sup>34,39,43</sup>. A. A. Ruefli-Brasse et al, sowie J. Ruland et al konnten zeigen, dass MALT1 eine wichtige regulatorische Funktion bei der NF- $\kappa$ B-Induktion in B- und T-Zellen ausübt. Bei dieser Signaltransduktion operiert MALT1 hinter Bcl-10 und könnte somit das bislang unbekannte Mittlermolekül zwischen Bcl-10 und dem I $\kappa$ B-Kinase-Komplex darstellen<sup>44,45</sup>.

## **II MATERIAL UND METHODEN**

### **II.1 MATERIAL**

#### **II.1.1 UNTERSUCHTE TUMORZELLEN**

Das Ausgangsmaterial stammt von einem t(11;18)-positiven MALT-Typ-Lymphom der Schilddrüse, Fall H1851/95 EBV, B lambda. Der Bruchpunkt der Translokation liegt im MALT1-Gen (18;q21) vor dem Nukleotid 986, entsprechend der Basenzählung in der Sequenz NM\_006785 bei GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=27886564>) und entspricht der kürzesten bislang bekannten Fusionsvariante<sup>38</sup>. Die Zellen entstammen tiefgefrorenem Frischgewebe. Die Diagnose wurde entsprechend der WHO-Klassifikation von 2001 gestellt.

Das zum Vergleich verwendete gesamt-MALT1-GES-Gen wurde aus einer ECV-Zelllinie isoliert.

#### **II.1.2 CHEMIKALIEN**

Die verwendeten Chemikalien wurden bezogen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Deisenhofen), Biozym (Oldendorf), GIBCO BRL (Eggenstein), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Qiagen (Hilden) und MoBio/DiaNova (Hamburg).

### II.1.3 ENZYME

Die gebrauchten Enzyme lieferten die Firmen Stratagene (Deisenhofen), GIBCO BRL (Eggenstein), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Roche (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

### II.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

Agarose-Gel (1%) für Elektrophorese: 2g Agarose ad 200ml mit 0,5 TBE;

zuletzt 5 $\mu$ l Ethidiumbromid

Ampicillin: 50mg/ml in H<sub>2</sub>O

BSA: 1mg/ml in H<sub>2</sub>O

DEPC-H<sub>2</sub>O: 1ml DEPC auf 1l H<sub>2</sub>O, o/n schütteln, autoklavieren

DMSO: Stratagene, Deisenhofen

Ethidiumbromid: 40mg/ml in H<sub>2</sub>O

FACS-Puffer: 1 x PBS mit 0,01 % NaN<sub>3</sub>; Lösung durch 0,1 $\mu$ m Nitrozellulosemembran filtriert.

GET: 50mM Glucose; 10mM EDTA, pH 8,0; 25mM Tris-HCl, pH 8,0

IPTG: Isopropylthiogalactosid; Stratagene, Deisenhofen

KaliumAcetat (3M): 3 M Kaliumacetat; pH 4,8 (mit 5M Essigsäure austitriert)

Laufpuffer für Agarose-Gelelektrophorese: 100ml 10 x TBE ad 2l mit H<sub>2</sub>O

LB-Agar mit Ampicillin: 10g NaCl; 10g Trypton; 5g Hefe-Extrakt; 20g Agar ad 1l mit H<sub>2</sub>O. Einstellen auf pH 7,0 mit 5 N NaOH. Nach dem Autoklavieren auf 55°C abkühlen lassen, dann 5ml sterilfiltriertes Ampicillin (10mg/ml) zugeben.

LB-Medium mit Ampicillin: wie LB-Agar, ohne Verwendung von Agar

Loading buffer: 50% Sucrose; 0,1mM EDTA, pH 8,0; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % XylencyanolFF, in H<sub>2</sub>O lösen und 1:2 mit LowTE verdünnen

Low TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1mM EDTA

Lysis-Puffer für Plasmidisolierung: 0,2 M NaOH; 1 % SDS

NZY-Medium:	10g NZ-Amin (Casein-Hydrosylat); 5g Hefe-Extrakt; 5g NaCl ad 1l mit H <sub>2</sub> O. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 12,5ml MgCl <sub>2</sub> (1,0 M) und 12,5ml MgSO <sub>4</sub> (1,0 M) und 20ml einer 20%-igen Glucoselösung, anschließend sterilfiltrieren.
Puffer A, B, N:	aus dem PCR-Optimierungskit von Invitrogen, Groningen (Niederlande)
PCR-Puffer, sowie Puffer 3:	aus dem PCR-Kit von Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Pfx-Puffer:	GIBCO BRL, Eggenstein
SwaI-, BamH I-Puffer:	New England Biolabs, Schwalbach
Herculase-, Polishing-, Ligations-Puffer:	Stratagene, Deisenhofen
RPMI <sup>+</sup> -Medium	Linaris, Wertheim
Sequenzier-MasterMix:	aus dem ABI Prism Set von Applied Biosystems, Weiterstadt
10 x TBE:	1 M Tris; 20mM EDTA; 0,5 M Borat
Trypanblau:	5g/l Trypanblau; 9g/l NaCl gelöst in H <sub>2</sub> O
TE:	10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA
X-Gal:	1mg X-Gal in 50µl Dimethylformamid

## II.1.5 PROKARYONTISCHE ZELLEN

XL10-Gold Kan ultracompetent cells: Escherichia coli-Bakterien der Zelllinie XL2-BlueMRF (Stratagene, Amsterdam).

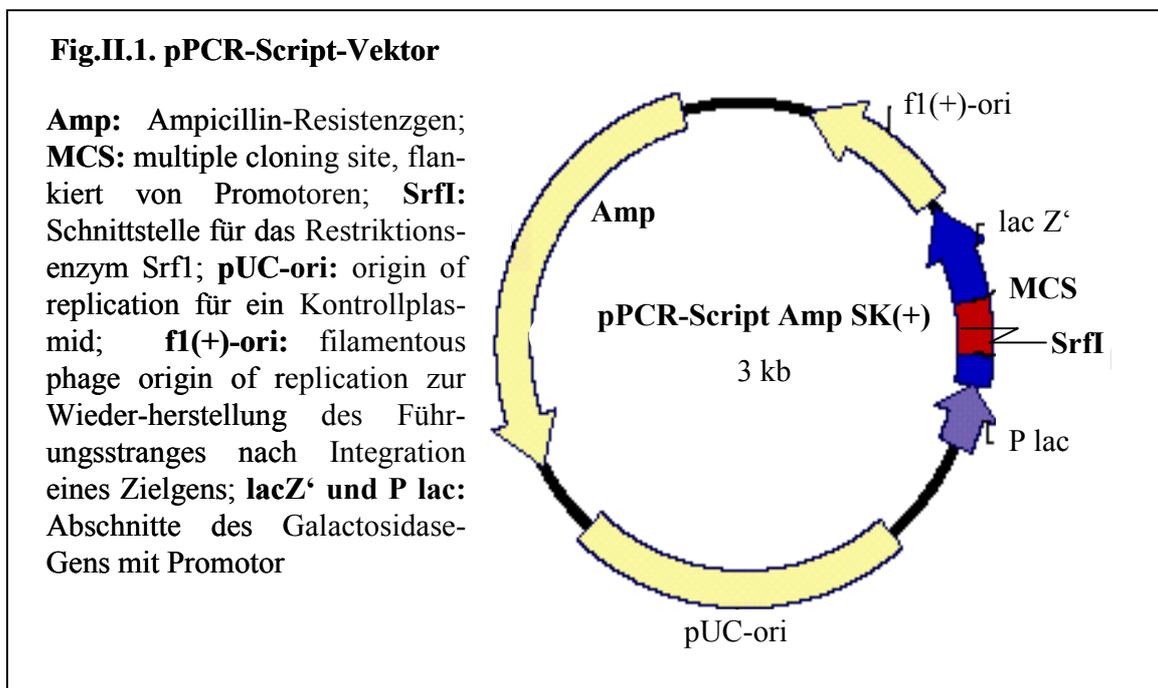
## II.1.6 EUKARYONTISCHE ZELLEN

L363-Zelllinie:	Humane Plasmazell-Leukämie; (DSMZ No.: ACC 49)
RAJI-Zelllinie:	Humanes Burkitt-Lymphom; (DSMZ No.: ACC 319)
679-Zelllinie:	Humane Vorläufer-B-Zell-Leukämie (ALL); (DSMZ No.: ACC 42)
DOHH-2-Zelllinie:	Humanes follikuläres B-Zell-Lymphom; (DSMZ No.: ACC 47)

293T-Zellen: Humane embryonale Nierenzellen (HEK-cells). Sie exprimieren das große T-Antigen SV40, das die Zahl der Plasmidkopien erhöht, welche den SV40ori enthalten.

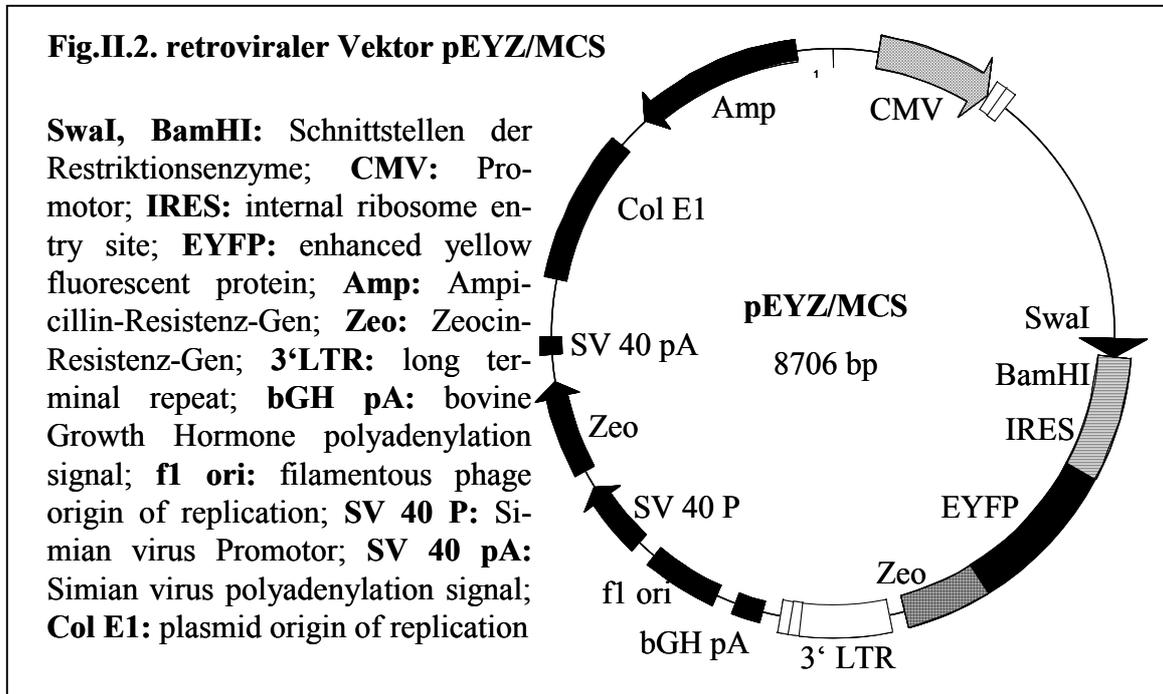
## II.1.7 PLASMIDE

pPCR-Script Amp SK(+) plasmid von Stratagene (Amsterdam); Genkarte: s. Fig. II.1.; Sequenzausschnitt: siehe VII.3.2.1, S. 62.



pEYZ-MCS: retroviraler Vektor, konstruiert im Virologischen Institut der Universität Würzburg, basierend auf pczCFG2 hCD8 IEYZ retroviral vector (Dirk Lindemann, unveröffentlicht und<sup>46</sup>). Der Vektor enthält anstelle der U3-Region am 5'LTR des murinen Leukämie-Virus (MuLV) einen stark aktiven CMV-Promotor, der das Transkriptionsergebnis deutlich verbessert. Mittels einer integrierten viralen IRES (internal ribosomal entry site) wird die koordinierte Expression der Markergene EYFP und Zeozin gemeinsam mit dem gene of interest, dem MALT1-BS, erreicht. Es finden sich zahlreiche Restriktionsstellen in der MCS, hier wurden SwaI an 2269 und BamH I an 2289 verwendet. Daran anschließend wurde zudem ein für das Flag-Tag kodierendes Oligonukleotid

am N-Terminus des gene of interest eingefügt. Der Vektor verfügt außerdem über ein Ampicillinresistenzgen (Genkarte: s. Fig. II.2.; Sequenzausschnitte: s. VII.3.2.2, S. 62).



pHIT 60: *gag-pol*-Expressionsplasmid

pHIT 456: *env*-Expressionsplasmid für humane Oberflächenantigene.

Beide enthalten einen CMV-Promotor und einen SV40 *ori*, sie exprimieren außerdem die viralen Komponenten des MuLV 5' LTR (D. Lindemann, unveröffentlicht und <sup>46</sup>).

## II.1.8 ARBEITSGERÄTE UND HILFSMITTEL

Elektrophoresekammer GNA 200 und Netzgerät EPS200: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg); PCR-Maschinen: Geneamp<sup>®</sup>PCR-System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) und Touch Down-Gerät (Hybaid, Heidelberg); Zentrifugen: Eppendorf (Hamburg), Heraeus (Hanau); Videodokumentation für Agarose-Gele und UV-Schirm von Herolab (Wiesloch); Photometer: Eppendorf; FACScan<sup>®</sup> (488nm, Argonlaser) und zugehörige Software LYSIS II von Becton Dickinson (Heidelberg); Mikroskop: Standard 20 von Zeiss (Jena); Pipetten: Eppendorf; Spritzen und Kanülen: Braun (Melsungen), bzw. Dispomed (Gelnhausen); Insulinspritzen Omnicon<sup>®</sup> 80: Braun (Melsungen).

## II.2 METHODEN

### II.2.1 TRIZOL-RNA-ISOLIERUNG

Frisches Tumormaterial wurde sogleich durch feine Netze aus Nylongaze mit einer Porengröße von 100 µm gedrückt, um die Zellen aus ihrem Gewebeverband zu lösen. Daraufhin wurden Epstein-Barr-Viren (EBV) hinzugegeben, damit die Zellen infiziert und zu beständiger Replikation angeregt (immortalisiert) würden. So vorbehandelt, konnten sie dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, oder sofort weiterverarbeitet werden: Zu  $1 \times 10^6$  Zellen wurden bei Raumtemperatur 800 µl Trizol hinzugefügt. Um das Gemisch zu homogenisieren, wurde es durch drei Kanülen mit abnehmendem Durchmesser (0,9mm; 0,55mm; 0,45mm), und zuletzt durch eine Insulinspritze (0,33mm) geschert. Anschließend wurde das Homogenisat 15 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, da dies erfahrungsgemäß eine bessere Isolation möglich machte. Nach erneutem Auftauen wurden der Suspension 0,5 µl Glykogen (20mg/ml) zugegeben und die Lösung fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, 15 Sekunden gevortext und weitere zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 15 Minuten Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 rpm. Dabei bildeten sich drei Schichten aus, wobei die oberste, wässrige Phase die Gesamt-RNA enthält, die mittlere, weiße Lage aus DNA, und die unterste, rosafarbene Schicht aus dem restlichen Trizol besteht. Die aquatische Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und sogleich 500 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte während zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für zehn Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 rpm. Der entstehende Überstand wurde abpipettiert, das verbleibende RNA-Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation wie im vorherigen Schritt. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet etwa fünf Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  im Thermoblock getrocknet. Zur Resuspension wurde die RNA mit 20-30 µl DEPC-Wasser versetzt, bei  $65^{\circ}\text{C}$  zehn Minuten im Thermoblock gehalten, anschließend 30 Sekunden gevortext und auf Eis gestellt.

Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## II.2.2 cDNA-SYNTHESE

Für die reverse Transkription von cDNA wurden 5µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Diese wurde aufgetaut, zehn Minuten bei 65°C inkubiert und gevortext. Es wurden 2µl Oligo-dT 15 (1µl/µg), sowie 1µl 50nM Random-Primer hinzupipettiert und resuspendiert. Der Ansatz wurde zehn Minuten bei 65°C gehalten, anschließend auf Eis abgekühlt und kurz herunterzentrifugiert. Nachfolgend wurde eine Mischung aus folgenden Chemikalien zugegeben:

- 5,2µl DEPC-H<sub>2</sub>O
- 5µl 5 x First-Strand-Buffer
- 2,5µl 100mM DTT
- 2,5µl dNTPs (je 10mM)
- 0,8µl RNAsin (4000 U/ml)
- 1µl Mu-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ml).

Der Ansatz wurde dann für 70 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend während vier Minuten auf 98°C erhitzt, um die Transkriptase zu inaktivieren, und auf Eis gestellt. Die cDNA wurde bei -20°C verwahrt.

## II.2.3 STANDARD-POLYMERASEREAKTION (PCR) MIT cDNA ALS TEMPLATE

- 1-2µl cDNA
- 2,5µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>
- 0,5-2,0µl 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,5µl 10mM dNTPs (je dNTP 2,5mM)
- 0,5µl 20pmol FORWARD-Primer
- 0,5µl 20pmol REVERSE-Primer
- 0,1µl Taq-Polymerase (5U/µl)
- ad 25µl H<sub>2</sub>O

Die anschließende Analyse erfolgte auf einem 2%-igen Agarosegel in 0,5 x TBE-Laufpuffer.

### II.2.3.1 PCR-Optimierung

Bei der Verwendung neuer Primerpaare wurden zunächst die Bedingungen der PCR-Reaktion optimiert. Zur Amplifikation wurde cDNA des MALT-Typ-Tumors H1851/95 eingesetzt. Der Ansatz wurde, wie oben beschrieben, pipettiert, und die MgCl<sub>2</sub>-Endkonzentration von 1,5mM bis 3,5mM in 0,5-er Schritten ausgetestet. Als erste Annealingtemperatur wurde diejenige verwendet, die 5°C unter der wie folgt ermittelten Primerschmelztemperatur lag:

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

Ergab sich hiermit kein zufriedenstellendes Ergebnis, wurde die Temperatur schrittweise erhöht, maximal jedoch bis zur errechneten Schmelztemperatur der Primer. Außerdem wurde mit dem PCR-Optimierungskit von Invitrogen (Groningen, Niederlande) gearbeitet, der Puffer unterschiedlichen pH-Wertes, bzw. MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen enthält.

### II.2.3.2 GAPDH-PCR

Zur Kontrolle, ob die cDNA-Synthese erfolgreich verlaufen ist, wurde stets eine Test-PCR zur Amplifikation des Gens für Glycerinaldehyd-3phosphat-dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Dieses Gen wird in allen Zellen konstitutiv stark exprimiert.

Folgender Ansatz wurde zu einem Gesamtvolumen von 25µl pipettiert:

<b>Ansatz:</b> 1µl cDNA 19,4µl H <sub>2</sub> O 2,5µl 10 x PCR-Puffer 0,5µl 25mM MgCl <sub>2</sub> 0,5µl 10mM dNTPs (je 2,5mM) 0,5µl 20pmol GAPDH-FOR 0,5µl 20pmol GAPDH-REV 0,1µl Taq-Polymerase	<b>Reaktionsprogramm:</b> Denaturierung: 94°C, 60 Sekunden 25 Zyklen mit Denaturierung: 94°C, 30 Sekunden Annealing: 60°C, 30 Sekunden Elongation: 72°C, 60 Sekunden. Abschließende Elongation: 72°C, 120 s Beendigung der Reaktion und Kühlung bei 4°C.
---	--

### II.2.3.3 Bedingungen weiterer PCRs

Bezeichnung	Annealing-Temp. (°C)	Puffer	Produktgröße (bp)	Zyklen
GAPDH	60	PCR-Puffer	1000	25
API1203For x MLT1797Rev	53	Puffer B	926	40
CD71 1441For x CD71Rev	55	PCR-Puffer	1800	40
API1203For x MLTRevBam	56	PCR-Puffer	1701	40
MLT1043ForSwaTag x MLTRevBamTag	56	Herculase-Puffer	1521	30
CFGpsiFor x MLT1797Rev	61	PCR-Puffer	770	30
MLT1682For x MLT2191Rev	53	PCR-Puffer	509	35
MLT408For x MLT906Rev	56	Puffer A	501	30
MLT1229For x MLT2191Rev	55	PCR-Puffer	962	30
pEYZFor x pEYZRev	53	PCR-Puffer	1780	30

### II.2.4 GEL-ELEKTROPHORESE

Die Amplifikationsprodukte einer PCR wurden zur Analyse auf ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel (1%) aufgetragen. Dazu wurde das PCR-Reaktionsprodukt 10:1 mit loading buffer gemischt und 10µl davon in eine Geltasche gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 130-190V in 0,5 x TBE. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

### II.2.5 AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

#### II.2.5.1 Aufreinigung aus Agarosegel

Eine Aufreinigung der DNA-Fragmente aus einem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraction-Kits (50) (Qiagen, Hilden). Hierzu wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Dem Gewicht ent-

sprechend wurde das dreifache Volumen des Puffers QG\* hinzugefügt und die Mischung für etwa zehn Minuten unter wiederholtem Vortexen bei 50°C inkubiert, um das Gel aufzulösen. Danach wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben und gemischt. Um die DNA zu binden, wurde die Suspension auf eine mitgelieferte QIAquick-Säule gegeben und eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und 0,5ml QG-Puffer auf die Säule gegeben, danach erneut eine Minute zentrifugiert. Mit 0,75ml PE\*- wurde die DNA anschließend gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein 1,5ml-Tube gestellt und, um die DNA zu eluieren, 50µl Puffer EB\* (10mM Tris-Cl, pH 8,5) darauf getropft. Bei höchster Geschwindigkeit folgte eine einminütige Zentrifugation. Die Säule wurde entfernt, und die herausgelöste DNA im Tube in 30µl Puffer EB aufgenommen.

Alternativ wurde die DNA mittels des MO BIO UltraClean 15 DNA Purification Kits aufgereinigt. Auch hier wurde die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragment aus dem Gel herausgeschnitten und gewogen. Es wurde ein halbes Volumen ULTRA TBE MELT\*, sowie 4,5 Volumina ULTRA SALT\* hinzugegeben und gemischt. Das Gel wurde unter mehrmaligem Schütteln bei 65°C geschmolzen. Anschließend wurden 6µl von zuvor resuspendiertem ULTRA BIND\* zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde die Bindungsreaktion durch wiederholtes Schütteln des Reaktionsgefäßes unterstützt. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Sekunden. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 1ml ULTRA WASH\* mittels fünf- bis zehn Sekunden langem Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde erneut für fünf Sekunden zentrifugiert, der Überstand verworfen, nochmals zentrifugiert und die restlichen Tropfen ULTRA WASH\* entfernt. Das verbliebene DNA-Pellet wurde in 12µl LowTE aufgenommen und homogenisiert. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension eine Minute lang zentrifugiert, und der Überstand mit DNA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Aufbewahrung bei -20°C.

\* mitgelieferte Produkte aus dem entsprechenden Kit der jeweiligen Firma

## II.2.5.2      Aufreinigung aus Lösungen

Um DNA-Fragmente direkt aus dem PCR-Reaktionsgemisch zu isolieren, wurde ebenfalls der MO BIO UltraClean 15 DNA Purification Kit verwendet. Hierzu wurde lediglich der Schmelzschrift weggelassen, ansonsten verlief die Aufreinigung wie oben beschrieben.

## II.2.6      KLONIERUNG

### II.2.6.1      Vorbereitung des aufgereinigten PCR-Produktes

#### II.2.6.1.1    Blunt ends

Da die Taq-Polymerase eine terminale Deoxynucleotidyltransferase-Aktivität zeigt, müssen mit diesem Enzym hergestellte PCR-Produkte von den ihnen angehängten Poly-A-, „Schwänzen“ am 3'-Ende befreit werden, um eine erfolgreiche Ligation anzuschließen. Dazu wurden folgende Substanzen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend für 30 Minuten bei 72°C inkubiert:

10µl des aufgereinigten PCR-Produktes

1µl 10mM dNTPs (je 2,5mM)

1,3µl 10 x Polishing Buffer

1µl Pfu-DNA-Polymerase (0,5U)

Das so vorbereitete Insert konnte bei 4°C aufbewahrt, oder sofort in der Ligation weiterverarbeitet werden.

#### II.2.6.1.2    Sticky ends

Bestand die Notwendigkeit, ein Insert mit Sicherheit in 5'→3'-Richtung mit einem Plasmid zu ligieren, wurden sowohl Plasmid als auch das aufgereinigte PCR-Produkt mit denselben Restriktionsenzymen verdaut, welche sticky ends erzeugen.

## II.2.6.2 Ligation mit dem Klonierungsvektor

### II.2.6.2.1 pPCR-Script-Vektor

Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des Stratagene PCR-Script Amp Cloning Kits. Folgende Komponenten wurden zusammenpipettiert:

1  $\mu$ l pPCR-Script Amp SK(+) Klonierungsvektor (10ng/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l PCR-Script Reaktionspuffer (10 x)

0,5  $\mu$ l 10mM rATP

2,4  $\mu$ l des „geblutendeten“ PCR-Produktes

1  $\mu$ l SrfI Restriktionsenzym (5U/ $\mu$ l)

3,1  $\mu$ l destilliertes H<sub>2</sub>O

Die Ligationsreaktion wurde gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend das Enzym während zehn Minuten bei 65°C inaktiviert. Bis zur Weiterverarbeitung in der Transformation wurde das Produkt auf Eis aufbewahrt.

Zum Farbscreening:

Auf dem pPCR-Script-Klonierungsvektor ist eine für beta-Galaktosidase kodierende Region (lacZ-gene) durch die multiple cloning site unterbrochen. Nimmt also ein Bakterium ein mit dem PCR-Produkt ligiertes Plasmid auf, kann beta-Galaktosidase nicht transkribiert und exprimiert, und somit kein Substrat (X-Gal) umgesetzt werden; die Kolonien bleiben weiß. Wird hingegen ein unveränderter Vektor (z.B. die Religationskontrolle oder das unligierte Plasmid) aufgenommen, ist die Genregion intakt, beta-Galaktosidase kann produziert und X-Gal enzymatisch in einen blauen Farbstoff umgesetzt werden.

### II.2.6.2.2 pEYZ-MCS-Virusvektor

Zunächst wurde der retrovirale Vektor für die Ligation mit dem MALT1-BS vorbereitet: Hierfür wurde eine Maxi-Präparation des pEYZ-MCS-Flag-Vektors (nach dem EndoFree Plasmid Maxi-Protokoll von Qiagen, Hilden) mit SmaI und BamH I verdaut

(vgl. II.2.8, S. 20) um das Plasmid zu eröffnen, und die dem MALT1-BS-,Insert' entsprechenden sticky-ends zu erzeugen. Anschließend wurde der so präparierte Vektor mit 1µl CIAP versetzt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert, um die Enden zu dephosphorylieren und damit eine Religation zu verhindern.

Nun konnte die Ligation mit dem ebenfalls SwaI- und BamH I-verdauten und aufgereinigten MALT1-BS-,Insert' erfolgen.

Reaktionsansatz:

2,4µl sticky-end-MALT1-BS-Insert (SwaI / BamH I)

4µl pEYZ-MCS-Vektor mit sticky ends (SwaI / BamH I)

1µl Ligase-Puffer

1µl T4-Ligase

1,6µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde anschließend für 12 Stunden bei 4°C inkubiert, dann zehn Minuten auf 65°C erhitzt um die Ligase zu inaktivieren und bei -20°C aufbewahrt.

### II.2.6.3 Transformation in prokaryontische Zellen

Die bei -80°C gelagerten E. coli-Bakterien (XL10-Gold Kan ultracompetent cells von Stratagene) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und schließlich pro Ansatz (Ligation, Religationskontrolle, Transformationskontrolle) 40µl der Zellen in ein vorgekühltes 15ml Falcon-Röhrchen gegeben. 1,6µl XL10-Gold beta-Mercaptoethanol-Mix (Stratagene) wurden untergemischt, und der Ansatz zehn Minuten auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde das Reaktionsgefäß etwa alle zwei Minuten geschwenkt. Anschließend wurden 10µl der Ligationsreaktion, bzw. zur Transformationskontrolle das pUC18-Plasmid, zur Religationskontrolle keine weitere Substanz, hinzugefügt und die Röhrchen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Ansätze für exakt 30 Sekunden in 42°C warmem Wasser gepulst und erneut für zwei Minuten auf Eis gestellt. Es wurden danach je 0,45ml auf 42°C vorgewärmtes NZY+-Medium zugegeben, und die Falcons für eine Stunde bei 37°C geschüttelt (250 rpm). Währenddessen wurden Agarplatten mit X-Gal und IPTG präpariert, sofern ein Farbscreening (vgl. II.2.6.2.1; S.17) auf positive

Klone mit dem pPCR-Script-Vektor erwünscht war. Hierfür wurden pro Platte 100µl 2%-iges X-Gal und 10µl 100mM IPTG (Isopropylthiogalactosid, ein Promotionsinduktor) mit 100µl NZY+-Medium gemischt und gleichmäßig aufgetragen. Schließlich wurden die Reaktionsansätze in unterschiedlichen Volumina von 50-250µl, je nach erwarteter Ausbeute, unter sterilen Bedingungen auf die vorbereiteten Agarplatten ausgestrichen. (Von der Transformationskontrolle wurde jedoch ein Gemisch aus 10µl des Ansatzes mit 100µl NZY+-Medium verwendet.) Diese Platten wurden dann über Nacht bei 37°C im Inkubator gehalten. Das im Agar enthaltene Ampicillin bewirkte, dass nur Bakterien wachsen konnten, die den Klonierungsvektor aufgenommen hatten, da dieser ein Ampicillin-Resistenzgen enthält (vgl. II.1.7, S. 9).

Die bewachsenen Platten wurden im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

## II.2.7 MINIPRÄPARATION VON PLASMID-DNA

Für diese Isolierung des Klonierungsvektors inklusive Insert wurden mit sterilen Zahnstochern einzelne Bakterienkolonien von der Agarplatte gepickt und in ein Reagenzglas mit 3ml mit Ampicillin versetzten LB-Flüssigmedium gegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 1,5ml davon in ein Eppendorf-Cap gegeben und fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, der Niederschlag mit 100µl GET versetzt und gründlich resuspendiert. Dem wurden 200µl frisch angesetzter Lysispuffer hinzugefügt, alles gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 150µl 4°C kaltes Kaliumacetat dazugegeben, gemischt, erneut fünf Minuten auf Eis inkubiert und schließlich zehn Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der sich bildende Überstand wurde in ein neues Cap überführt, das verbleibende Pellet verworfen. Der Flüssigkeit wurden 700µl 100%-iges Ethanol beigemischt, um das enthaltene Plasmid zu fällen. Hierzu wurde die Mischung zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, dem Niederschlag noch einmal Ethanol (70%-ig, 400µl) hinzugegeben, gut gemischt und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das gereinigte Plasmid-Pellet im Heizblock bei 65°C für etwa fünf Minuten getrocknet. Zuletzt wurden zur Resuspension 40µl LowTE mit RNase hinzugegeben, und durch Vortexen gemischt.

3µl hiervon wurden für den anschließenden Kontroll-Restriktionsverdau verwendet, der Rest bei -20°C eingefroren.

## II.2.8 RESTRIKTIONSVERDAU

Für den Verdau aus dem pPCR-Script-Vektor, als auch für jenen aus dem pEYZ-MCS-Vektor wurden verwendet:

3µl Plasmid-DNA  
1µl 10 x Puffer 3  
0,1µl 100 x BSA  
0,1µl SwaI-Restriktionsenzym  
5,8µl H<sub>2</sub>O

Es folgte eine Stunde Inkubation bei 25 °C, danach eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C während 20 Minuten. Da die jeweils optimale Arbeitstemperatur der beiden Enzyme schlecht kompatibel war, mussten diese dem Ansatz getrennt zugesetzt werden. So erfolgte anschließend die Zugabe von je 0,05µl BamH I und eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Inaktivierung des Enzyms bei 65°C, zehn Minuten.

## II.2.9 CYCLESEQUENCING

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem ‚ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit‘ (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Kettenabbruchmethode<sup>47</sup>.

<p>Reaktionsansatz:</p> <p>3µl Plasmid-DNA aus Minipräparation, bzw. 6 µl PCR-cDNA</p> <p>5µl Sequenzier-Master-Mix</p> <p>1µl 3,2 pmol/µl Primer</p> <p>ad 20µl H<sub>2</sub>O</p>	<p>Sequenzierungsreaktion, durchgeführt in einer PCR-Maschine:</p> <p>30 Zyklen mit</p> <p style="padding-left: 40px;">Denaturierung: 96°C, 10 Sekunden</p> <p style="padding-left: 40px;">Annealing: X°C*; 5 Sekunden</p> <p style="padding-left: 40px;">Elongation: 60°C, 4 Minuten.</p> <p>Beendigung der Reaktion bei 4°C.</p>
---	--

Zwischenzeitlich wurden gestopfte 300µl-Pipettenspitzen mit 200µl Sephadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gefüllt, in Schraubröhrchen gestellt, und bei 720 rcf eine Minute lang zentrifugiert. Die Ansätze wurden anschließend mittig auf diese Säulen gegeben und drei Minuten bei 8,8 rpm zentrifugiert. Hierbei wurden unerwünschte Bestandteile wie Primer und dNTPs im Sephadex zurückgehalten. Das Eluat wurde dann mit 2µl 3M NaAc (pH 4,6), sowie 50µl 96%-igem Ethanol versetzt, um die DNA zu fällen. Nach zehn Minuten Inkubation auf Eis folgten 20 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 200µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut für fünf Minuten unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand sodann verworfen und das Pellet bei 65°C im Thermoblock getrocknet.

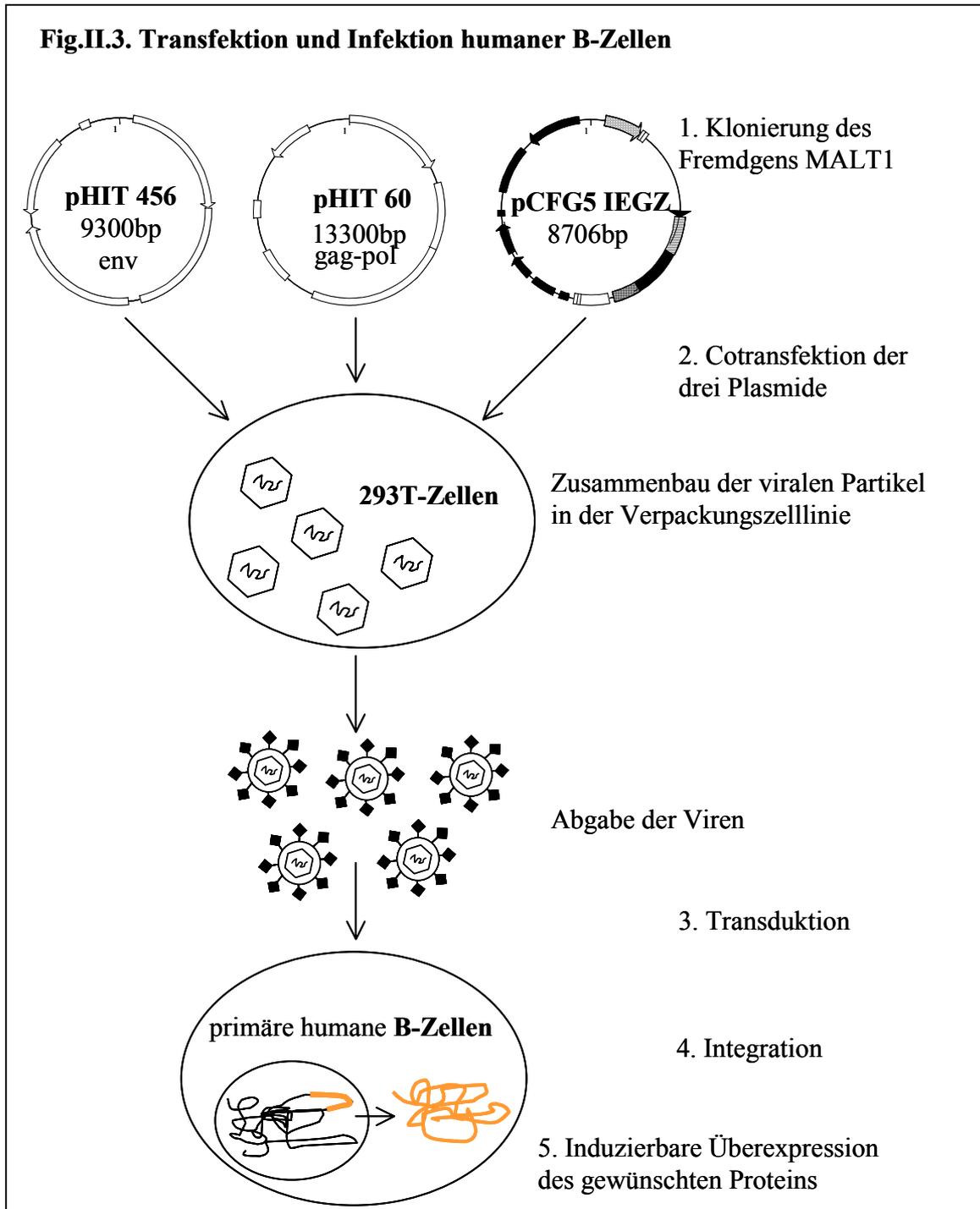
Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

Sequenzgellauf und Sequenzauswertung erfolgten auf dem Sequenzierautomaten ABI 373A (Applied Biosystems, Weiterstadt).

\*Annealingtemperatur entsprechend den Enzymen: Schmelztemperatur -5°C (vgl. II.2.3.1, S. 13).

## II.2.10 TRANSFEKTION UND INFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN

Rekombinante, replikationsdefiziente retrovirale Partikel wurden unter Benutzung des pHIT Verpackungssystems nach der Methode von Soneoka et al hergestellt<sup>48</sup>. (s. Fig. II.3.)



### II.2.10.1 Transfektion

Für die Transfektion wurden 293T-Zellen (human embryonal kidney cells) transient mit dem Expressionskonstrukt für Gag/Pol (pHIT 60) und Env (pHIT 456) des murinen Leukämie-Virus (MuLV) kotransfiziert. Diese erfolgte zusammen entweder mit dem unveränderten Vektorplasmid als Kontrolle, oder mit dem Vektor inklusive der MALT1-BS-cDNA. Es wurde die Standard Calciumphosphat-Methode verwendet. Nach 16 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die viralen Überstände wurden 24 und 48 Stunden später abgenommen und filtriert (0,45µm). Zum Filtrat wurde Polybren (Sigma) zugegeben (Endkonzentration  $\leq 10\mu\text{g/ml}$ ).

### II.2.10.2 Infektion

$1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^5$  L363-Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase für 3-4 Stunden mit 5ml des infektiösen Überstandes inkubiert, mit RPMI<sup>+</sup> gewaschen und wieder in Kultur genommen. Um hohe Infektionsraten zu erzielen, wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösen Überstand 3-4 Stunden bei 32°C und 2200rpm zentrifugiert. Die Identifizierung EYFP exprimierender, d.h. erfolgreich infizierter Zellen, erfolgte mittels Durchflußzytometrie.

### II.2.11 ZELLKULTUR

Die Zellen werden in RPMI<sup>+</sup>-Medium mit 10% FCS (fetal calv serum) gezüchtet, welches mit Zeozin und gegebenenfalls weiteren Antibiotika wie Gentamycin zur Sterilhaltung versetzt wurde. Die Kulturflaschen werden bei 37°C in einem Milieu von 7,5% CO<sub>2</sub> gehalten.

## II.2.12 FACS-ANALYSE

Zur Quantifizierung der EYFP-Expression wurde die Zellsuspension mit ca. 20 000 Zellen im FACS-Scan (Becton Dickinson, Heidelberg) aufgenommen und mit LysisII-Software ausgewertet, wie zuvor beschrieben<sup>49</sup>.

## II.2.13 WACHSTUMSVERHALTEN UND ZELLYKLUS

Es wurden Wildtyp-Zellen (L363), Zellen mit in das Genom integriertem unverändertem Vektor (nachfolgend als L363-EYZ bezeichnet) und die Zellen mit der jetzt in ihrer genomischen DNA vorfindbaren MALT1-BS Sequenz (im folgenden L363-MALT1-BS genannt), sowie Zellklone mit integriertem, vollständigem MALT1-Gen (als L363-MALT1-GES bezeichnet) in Kultur gehalten (vgl. II.2.11, S. 23). Die Zellsuspensionen wurden verdünnt, um so statistisch gesehen Fraktionen von zehn / einer / eindrittel Zelle zu erhalten, aus welchen dann Zellklone hervorgehen konnten. Von den L363-MALT1-BS-Klonen wurden die Nummern 8/4; 8/7; 8/8; und 8/16 für anschließende Versuche ausgewählt, da sich diese unter dem Mikroskop am vitalsten zeigten.

### II.2.13.1 Wachstumsverhalten

Nach je 3-4 Tagen Wachstum wurden die Zellen mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer unter dem Mikroskop gezählt, wobei tote und lebende Zellen durch Färbung mit Trypanblau unterschieden wurden (die Zellkerne der toten Zellen färben sich blau).

### II.2.13.2 Zellzyklus

Zur Darstellung des Zellzyklus wurden dieselben Zellen ebenso alle 3-4 Tage per FACS mit Hilfe des Testkits „Cycle TEST™ PLUS, DNA Reagent Kit“ von Becton Dickinson analysiert. Hierfür wurde jeweils eine Zellsuspension mit etwa 30000 Zellen aufgenommen und für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Anschließend wurden 250µl Trypsinpuffer des Kits zum enzymatischen Verdau der Zellmembranen und des Zytoskeletts zugegeben und per Hand gemischt. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden 200µl Trypsininhibitor mit RNase-Puffer hinzugefügt, um die Trypsinaktivität zu beenden und RNA zu verdauen. Die Mischung wurde wieder zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zuletzt Propidiumjodid als DNA-Farbstoff dazugegeben und leicht gevortext. Zuletzt folgte eine weitere Inkubation für zehn Minuten auf Eis und in Dunkelheit. Anschließend konnten die gefärbten Zellen eingelesen werden, wofür der zweite Kanal des FACS-Gerätes verwendet wurde. Um ausnahmslos alle Zellen in der Analyse zu berücksichtigen, wurden bei der Auswertung der Histogramme keine life gates gesetzt.

### **III   ERGEBNISSE**

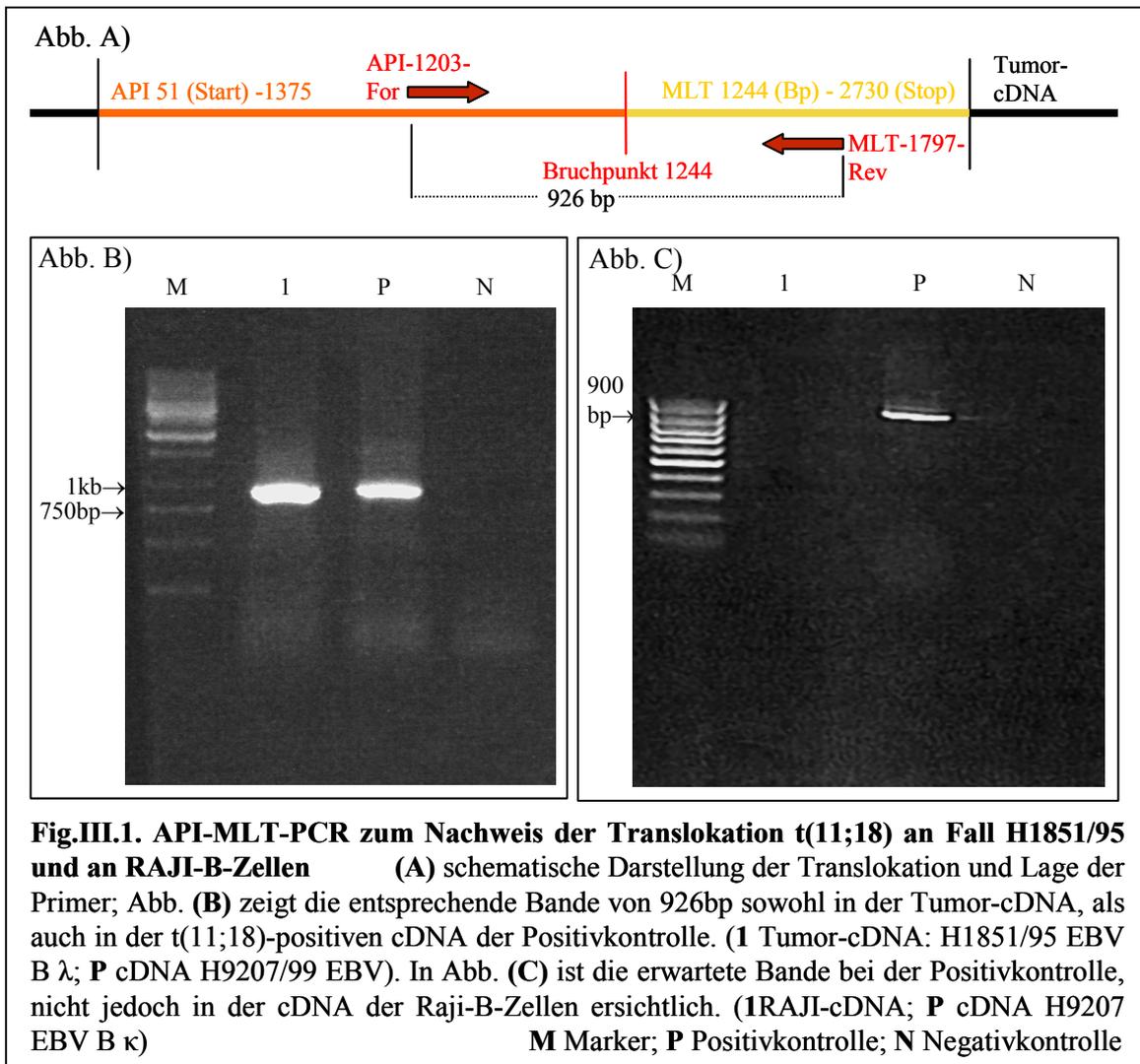
Die Rolle, die das MALT1-Gen in der Onkogenese von MALT-Typ-Lymphomen spielt, bei welchen API2 und MALT1 durch die Translokation t(11;18)(q21;q21) fusioniert werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Um die Funktion des durch die Translokation trunkierten Gens zu untersuchen, wurde bei dieser Arbeit ein entsprechendes MALT-Typ-Lymphom ausgewählt, und die darin vorliegende MALT1-Bruchstück-Variante mittels eines retroviralen Vektorsystems in eine humane Zelllinie transfiziert. Hiermit wurde ein Werkzeug geschaffen, um funktionelle Untersuchungen des Genbruchstücks zu unternehmen.

#### **III.1   ISOLIERUNG DES MALT1-GEN-BRUCHSTÜCKS**

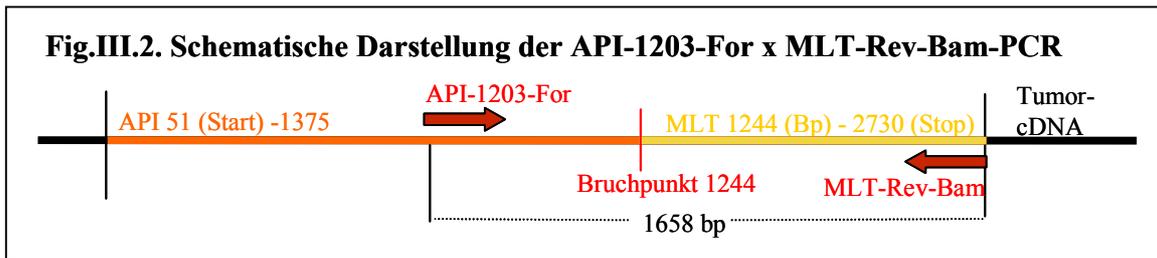
Es wurde primär ein MALT-Typ-Tumor der Thyreoidea herausgegriffen, bei dem durch *fluorescence in situ hybridisation* (FISH) die Translokation t(11;18) detektiert werden konnte<sup>38</sup>. Aus diesem Tumormaterial wurde die RNA isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA übersetzt. Zur Erfolgskontrolle dieser Synthese wurde eine Glycerinaldehyd-3Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-PCR durchgeführt. Der Nachweis von GAPDH bedeutet eine gelungene RNA-Isolation und cDNA-Synthese, da dieses Gen konstitutiv in allen Zellen exprimiert wird.

Die Beteiligung des Zielgens MALT1 an der Translokation konnte aber erst mittels PCR, Klonierung und Sequenzanalyse zuverlässig und spezifisch nachgewiesen werden. Daher wurde eine spezielle RT-PCR durchgeführt, deren Primer vor dem Bruchpunkt im API2-Anteil der Fusion und hinter dem Bruchpunkt in der MALT1-Sequenz lagen (s. Fig. III.1., Abb. A, S. 27; Primer, s. VII.2, S. 59). Sie umschlossen somit die Fusionsstelle. Fig. III.1., Abb. B, S. 27 zeigte deutlich die Bande des entstandenen Amplifikationsproduktes, womit die Beteiligung von API2 und MALT1 an der Translokation t(11;18) nachgewiesen war.

Das konstitutive Vorliegen dieser Fusion in allen B-Zellen konnte durch den Vergleich mit RAJI-B-Zellen<sup>50</sup> als Negativkontrolle ausgeschlossen werden. Hier ließ sich das entsprechende Amplifikationsprodukt nicht nachweisen (s. Fig. III.1., Abb. C).



Bei der Isolierung des Bruchstücks sollte gewährleistet werden, dass es ausschließlich aberranten Chromosomen entstammte und nicht an dem in jeder Zelle vorliegenden nicht translozierten MALT1-Gen amplifiziert wurde. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Amplifikation des Fusionsgens vorgenommen (s. Fig. III.2., S. 28), um an diesem Material eine nested-PCR durchzuführen (s. Fig. III.3., S. 29).



Für die PCR des Fusionsgens API2-MALT1 wurde der noch vor der Verknüpfungsstelle liegende Forward-Primer API-1203-For gewählt (vgl. VII.2, S. 59). Für die Reverse-Elongation wurde folgender Primer konstruiert:

MLT-Reverse-Bam-Tag:

3' CGC GGA TCC CG TTT TTC AGA AAT TCT GAG CCT GTC 5'  
 Überhang BamH I frame *kein Stop!* MALT1

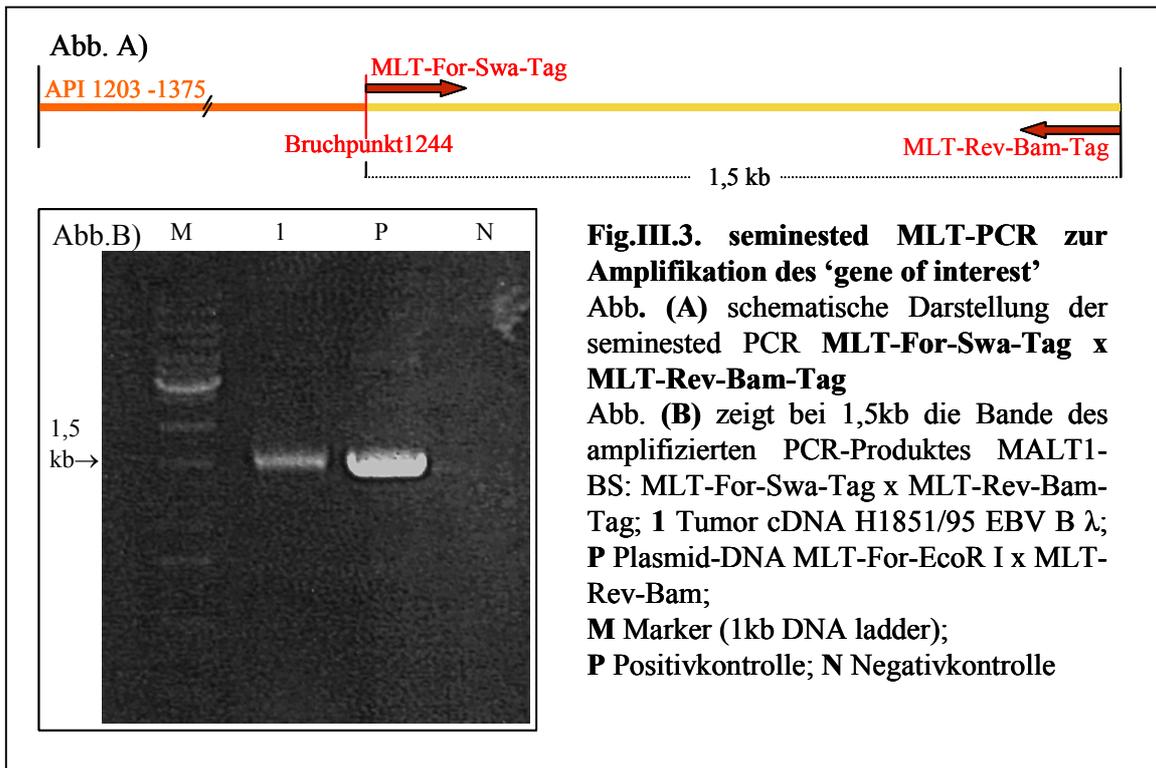
Dem CGC-Überhang folgt eine BamH I-Schnittstelle, die für einen späteren Verdau eingesetzt wurde. Danach wurden zwei Basen, Cytosin und Guanin, integriert, um einen frame-shift zu vermeiden. Bei der anschließenden, dem 3'-Ende des MALT1-Gens komplementären Basenfolge, wurde das im Original vorliegende Stop-Codon ausgelassen und stattdessen ein Stop-Codon im Virusvektor hinter der dort vorhandenen flag site eingefügt. Hiermit wurde eine kontinuierliche Transkription in den Zelllinien und eine Verbindung des MALT1-BS-Gens mit dem Marker-Gen Flag-Tag ermöglicht (vgl. Fig. III.7, S. 33).

Dieser API-MALT1-PCR konnte nun die semi-nested MALT1-PCR zur Isolation des MALT1-Fragments folgen (s. Fig. III.3., S. 29). Das Produkt sollte exakt mit dem ersten kodierenden Basentriplett nach der Fusionsstelle beginnen, und mit der letzten Base von MALT1 enden. Als Reverse-Primer wurde der bereits entsprechend vorbereitete MLT-Reverse-Bam-Tag-Primer verwendet. Für die Forward-Elongation wurde ein neuer Primer konstruiert:

MLT-1043-Forward-Swa-Tag:

5' CCG C AT TTA AAT GGC GCC ACC ATG AAT AAA GAG CAA ACA ACT GAC CAG 3'  
 Überhang SwaI Kozak Start MALT1-BS

Durch die Translokation wurde das Start-Codon (ATG) des Original-MALT1-Gens vom Bruchstück getrennt. Daher musste für die Vorwärtselongation des Bruchstücks ein Start-Codon integriert werden. Es wurden außerdem eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SwaI und eine Kozak-site (Kosak's consensus, ein Initiationscodon) eingefügt. Letztere erleichtert Ribosomen die Anbindung an Nukleinsäuren. Zuletzt wurde die dem MALT1-Gen nach dem Bruchpunkt komplementäre Basensequenz angehängt.



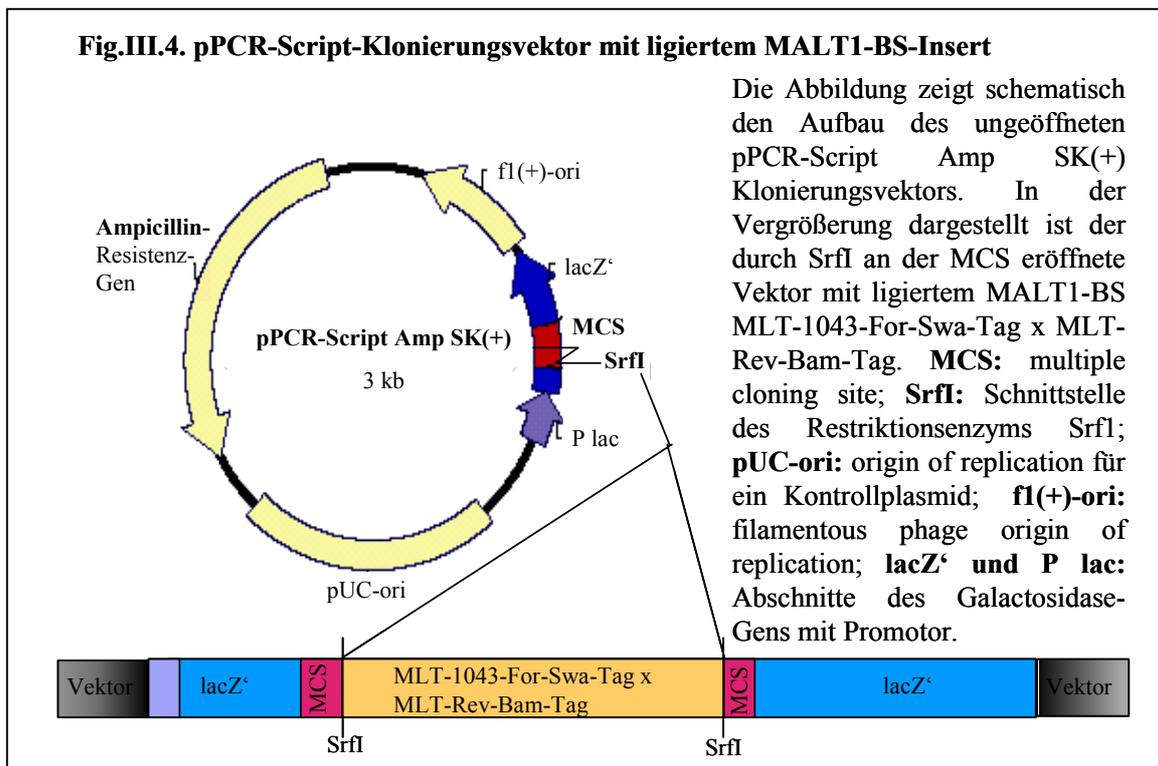
Für die Polymerase-Reaktion wurde das high-fidelity-Enzymgemisch ‚Herculase‘ verwendet. Dieses zeigt eine hohe Genauigkeit in seinen Amplifikationsprodukten, so dass keine Mutationen und Deletionen vorzufinden sein sollten.

Dieselbe PCR wurde nun mit vier Ansätzen wiederholt und gepoolt. Am Ende dieser Arbeitsschritte lag das isolierte, mit spezifischen Schnittstellen und funktionellen Codons versehene MALT1-Fragment vor.

### III.2 KLONIERUNG DES ISOLIERTEN BRUCHSTÜCKS IN DEN pPCR-SCRIPT AMP SK(+)-KLONIERUNGSVEKTOR UND SEQUENZIERUNG

Zunächst wurde das aufgereinigte PCR-Produkt MLT-1043-For-Swa-Tag x MLT-Rev-Bam-Tag (im folgenden ‚Insert‘ genannt) von seinen Poly-A-„Schwänzen“ am 3’-Ende befreit. Diese entstehen durch die terminale Deoxynucleotidyltransferase-Aktivität der Taq-Polymerase, welche im Herculase-Enzymgemisch enthalten ist (vgl. II.2.6.1.1, S. 16).

Anschließend folgte die Ligation des Inserts mit dem pPCR-Script-Klonierungsvektor. Der Vektor wurde während des Ligationsvorgangs mit Hilfe des SrfI-Restriktionsenzym in der multiple cloning site (MCS) blunt-end eröffnet und das ebenso mit blunt-ends vorliegende Insert integriert (s. Fig. III.4., Vektorsequenzausschnitt in VII.3.2.1, S. 62).

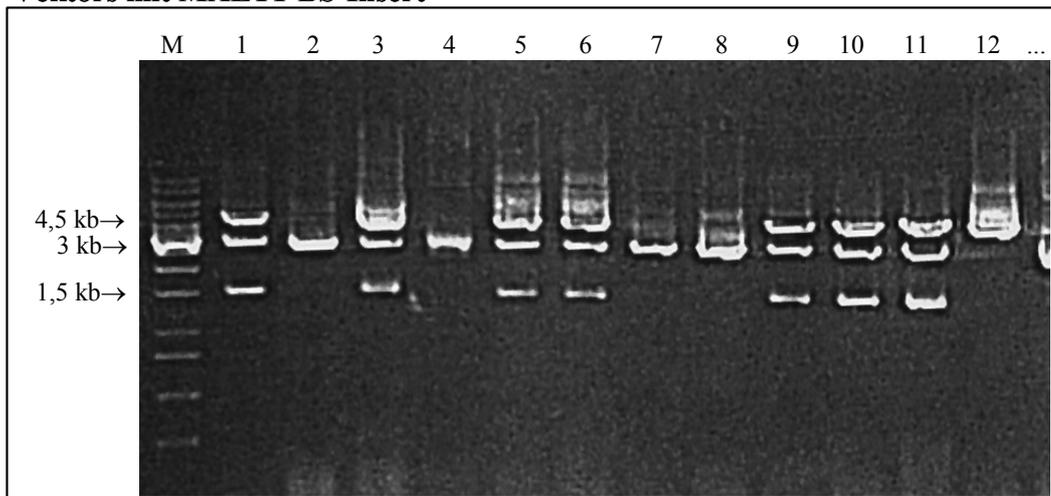


Nun folgte die Transformation des rekombinanten Plasmids in prokaryontische Zellen. Hierfür wurden E. coli-Bakterien (XL 10-Gold Kann ultracompetent cells von Stratagene) verwendet. Der Ablauf des Transformationsvorgangs ist in II.2.6.3, S. 18, beschrieben.

ben. Die transformierten Zellen wurden auf mit Ampicillin und X-Gal versetzten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. In den Vektor waren ein Ampicillin-Resistenz-Gen, sowie ein lacZ-Gen integriert. Letzteres kodiert für das Enzym Galaktosidase. Auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten konnten somit nur Bakterien wachsen, die den Vektor aufgenommen hatten und dadurch resistent gegen das Antibiotikum waren. Aus diesen Kolonien konnten wiederum mittels blue/white-screening gemäß der Galaktosidase-Aktivität (vgl. II.2.6.2.1, S. 17) die das Insert enthaltenden Prokaryonten selektiert werden.

Von 20 dieser ausgesuchten Kolonien wurden Mini-Präparationen angefertigt und zur Kontrolle mit SwaI und BamH I verdaut. Dadurch wurde das eben integrierte Insert wieder aus dem Vektor herausgetrennt und konnte in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden (s. Fig. III.5.).

**Fig.III.5. SwaI/BamHI-verdaute Mini-Präparationen des pPCR-Script-Vektors mit MALT1-BS-Insert**



Ausschnitt der mit SwaI/BamHI-verdauten Mini-Präparationen (Nr. 1-12) des pPCR-Script-Klonierungsvektors mit MALT1-BS-Insert. Die Banden bei 1,5kb entsprechen dem herausgeschnittenen Insert, bei 3kb liegt der Vektor (2961bp), nicht verdaute Vektor-Insert-Konstrukte erscheinen bei 4,5kb. Die Banden bei 3kb auf Spur 2, 4, 7, und 8 entsprechen einem unveränderten Vektor, bei dem die Ligation nicht erfolgreich verlief. **M** Marker (1kb DNA ladder)

Vier dieser Präparationen wurden ausgewählt und die Ligationsstellen des Inserts mit dem Vektor sequenziert (M13-20-For (=Uni) und T3-Rev), um Mutationen in diesen Bereichen auszuschließen und das Vorliegen des integrierten Start-Codons zu prüfen. Der Sequenzausschnitt einer dieser Präparationen ist in Fig. III.6. dargestellt und erläutert.

**Fig.III.6. Sequenzausschnitte der Ligationsstellen von MALT1-BS mit pPCR-Script-Vektor einer Mini-Präparation im Vergleich mit der MALT1-Sequenz**

```

MALT1-Sequenz          .....TTA AAT AAT CTT GGT CAT CCT GAT AAT AAA GAG CAA
Sequenz Mini 10       ..... TT CCG CCCCCG CAT TTA AAT GGC GCC ACC ATG AAT AAA GAG CAA
.....pPCR-Script-Vektor> <MLT-For-Swa-tag.....Start><1244...MALT1-BS.....
ACA ACT GAC CAG CCT TTG GCG AAG GAC AAG GTT GCC CTT TTG .....
ACA ACT GAC CAG CCT TTG GCG AAG GAC AAG GTT GCC CTT TTG.....
.....MALT1-BS.....
.....G ACA ACT GAT GAA ATA CCA TTT AGT TTC TCT GAC AGG CTC AGA
.....G ACA ACT GAT GAA ATA CCA TTT AGT TTC TCT GAC AGG CTC AGA
.....MALT1-BS.....<MLT-Rev-Bam-tag.....
ATT TCT CAA AAA TGA CCT CCT TGT TTT TGA AAG TTA GCA TAA T..... MALT1-Sequenz
ATT TCT GAA AAA CG GGA TCC GCG GGC TAG AGC GGC CGC CAC C..... Sequenz Mini 10
.....ohne Stop!.....2730><.....pPCR-Script-Vektor.....

```

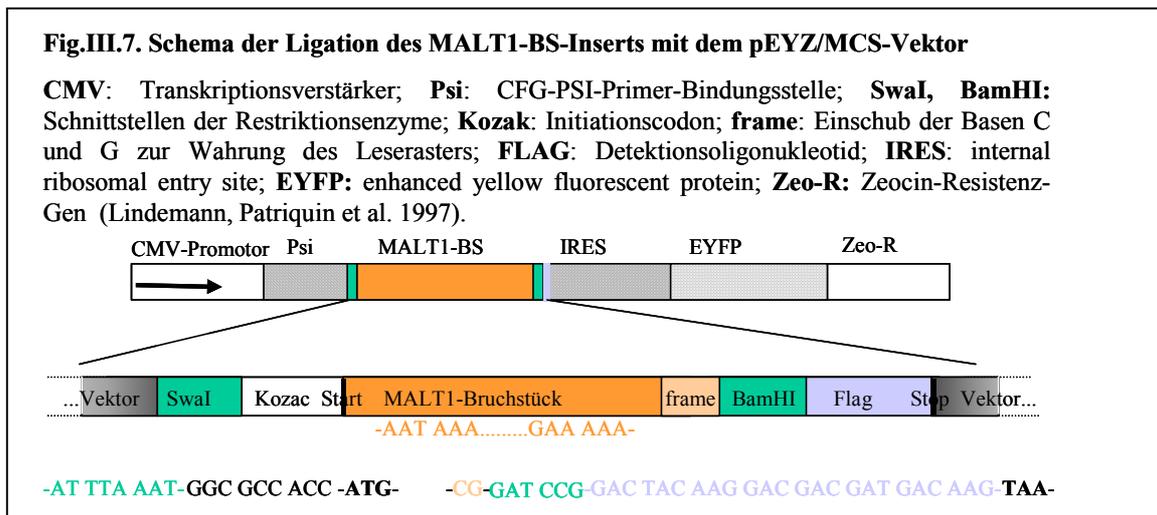
**Erste Zeile:** MALT1-Sequenz (Gene Banc Accession Number NM\_006785); **zweite Zeile:** Sequenz der Mini-Präparation Nr. 10; **dritte Zeile:** Erläuterung der Mini-Sequenzen. Beachte das eingefügte *Start*-Codon, das in der Original-MALT1-Sequenz nicht enthalten ist, sowie das zur Fortsetzung der Transkription in den Zielzellen entfernte *Stop*-Codon, welches im Original vorhanden ist! MLT-For-Swa-tag, MLT1-Rev-Bam-tag: Primer.

Die Präparation eines dieser zweifach kontrollierten Klone wurde wiederholt, um einen großen Pool des Plasmids zu erhalten. Mit den Restriktionsenzymen *Swa*I und *Bam*H I wurde das Insert aus den Plasmiden herausgeschnitten und der gesamte Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt. Die dem Insert entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (vgl. II.2.5.1, S. 14).

### III.3 HERSTELLUNG EINES VEKTORKONSTRUKTES UND INFEKTION EINER HUMANEN B-ZELLINIE

#### III.3.1 LIGATION VON RETROVIRALEM VEKTOR MIT INSERT UND KLONIERUNG DES REKOMBINANTEN PLASMIDS

Der retrovirale Vektor wurde mit *SwaI* und *BamH I* verdaut. Man machte sich zunutze, dass sowohl *SwaI*, als auch *BamH I* bei der enzymatischen Spaltung von Nukleinsäure-Doppelsträngen voneinander verschiedene ‚sticky ends‘ erzeugen. Die entstandenen überhängenden Nukleinsäure-Einzelstränge konnten sich nur mit der ihnen komplementären Basensequenz ligieren, wodurch sich das ebenfalls *SwaI*-*BamH I*-verdaute Insert nur in der korrekten 5'→3'Richtung mit dem Vektor verbinden konnte. Schema der Ligation in Fig. III.7.

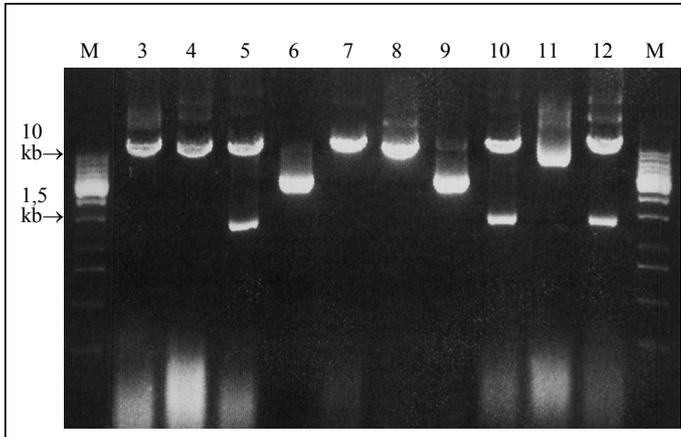


Anschließend wurde der rekombinante Vektor in ultrakompetente *E. coli*-Bakterien (XL10-GoldKan ultracompetent cells von Stratagene) transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten ausgestrichen und von zwölf der gewachsenen Kolonien Mini-Präparationen angefertigt.

Fig. III.8., S. 34 zeigt die Präparationen nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *SwaI* und *BamH I*. Drei positive Präparationen wurden ausgewählt und komplett sequenziert (s. Fig. III.9., S. 34). Mutationen wurden ausgeschlossen und die Identität des Gens nochmals verifiziert. Dabei wurde jede Base durch mindestens zwei Sequenz-Abschnitte mit unterschiedlichen Anfangs- und Endpunkten abgedeckt und mit der un-

ter der Zugangsnummer NM\_006785 in der GenBank hinterlegten MALT1-Sequenz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=27886564>) verglichen.

**Fig.III.8. MALT1-BS-Insert und pEYZ-Vektor aus SwaI-BamHI-verdauten Mini-Präparationen**



Die Abbildung zeigt bei 1,5kb die dem Insert entsprechenden Banden; nicht verdauten pEYZ-MCS-Flag-Vektoren mit Insert liegen bei 10,2kb (8,7kb Vektor + 1,5kb Insert). Auf den Spuren 6 und 9 laufende Banden entsprechen unveränderten Vektoren (8,7kb), die kein Insert ligiert haben. **M** Marker (1kb DNA ladder); **3-12** Mini-Präparationen Nr. 3-12

**Fig.III.9. Sequenzausschnitte einer Mini-Präparation des MALT1-BS im pEYZ/MCS-Virusvektor im Vergleich mit der MALT1-Sequenz**

```

MALT1-Sequenz ..... TTA AAT AAT CTT GGT CAT CCT GAT AAT AAA GAG CAA
Sequenz Mini 5 ..... GA ATT CAA TAT TTA AAT GGC GCC ACC ATG AAT AAA GAG CAA
..... pEYZ-MCS-Vektor.....<SwaI.....<Kozak.....<Start><1244...MLT-BS.....
ACA ACT GAC CAG CCT TTG GCG AAG GAC AAG GTT GCC CTT TTG .....
ACA ACT GAC CAG CCT TTG GCG AAG GAC AAG GTT GCC CTT TTG.....
..... MALT1-BS.....
..... TTT AGT TTC TCT GAC AGG CTC AGA ATT TCT CAA AAA TGA CCT CCT TGT TTT TGA AAG
.....TTT AGT TTC TCT GAC AGG CTC AGA ATT TCT GAA AAA CGG GAT CCG GAC TAC AAG GAC
.....MLT-BS..... <MLT-Rev-Bam-tag.....ohne Stop!.....<Flag-site.....
TTA GCA TAA TTT TAG ATG CCT GTG AAA TAG TAC TGC ACT TAC ATA AAG.....MALT1-Sequenz
GAC GAT GAC AAG TAA GGC GCG CC.....Sequenz Mini 5
.....<Stop><pEYZ-MCS-Vektor.....

```

Sequenzausschnitte einer Mini-Präparation des rekombinanten Virusvektors mit den Ligationsstellen des Virusvektors und dem MALT1-BS-Insert im Vergleich mit der MALT1-Sequenz (Gene Bank Accession number NM\_006785). **Erste Zeile:** MALT1-Sequenz; **zweite Zeile:** Sequenz der Mini-Präparation Nr. 5; **dritte Zeile:** Erläuterung der Mini-Sequenzen. Beachte das eingefügte *Start*-Codon, das in der Original-MALT1-Sequenz nicht enthalten ist, sowie das zur Fortsetzung der Transkription in den Zielzellen entfernte *Stop*-Codon, welches im Original vorhanden ist! Die Flag-site entstammt dem Vektor und dient der Proteindetektion im Western-Blot. Anschließend folgt ein Stop-Codon zur Beendigung der Transkription, dann die Fortsetzung des pEYZ/MCS-Vektors. **MLT-For-Swa-tag, MLT1-Rev-Bam-tag:** Primer.

### III.3.2 TRANSFEKTION UND INFEKTION

Die Transfektion des Plasmids und die Infektion humaner B-Zellen erfolgte im Virologischen Institut der Universität Würzburg nach der Methode von Soneoka<sup>48</sup>. Vier verschiedene B-Zelllinien wurden zuvor durch Testinfektionen auf ihre Eignung für die Infektion geprüft: L363, RAJI, DOHH-2, und 687 (vgl. II.1.6, S. 8). Sowohl die RAJI-Zellen, als auch die Zelllinie 687 zeigten nach der Infektion unbefriedigende Ergebnisse hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens. Sie waren nach der Klonierung schlecht kultivierbar und wurden bald apoptotisch. Die DOHH-2-Zellen erwiesen sich im Weiteren ebenfalls als unbrauchbar. Für die endgültige Infektion wurde somit die Zelllinie L363 ausgewählt.

Für die Herstellung der infektiösen Partikel erwies sich das für humane Oberflächenantigene kodierende pHIT 456-Plasmid empirisch als am geeignetsten als Env-Vektor. Für Gag und Pol wurde das Plasmid pHIT 60 verwendet und beide zusätzlich zum replikationsdefizienten retroviralen pEYZ-MCS-Vektor in 293T-Zellen als Verpackungszelllinie transfiziert (vgl. II.2.10.1, S. 23 und<sup>48</sup>).

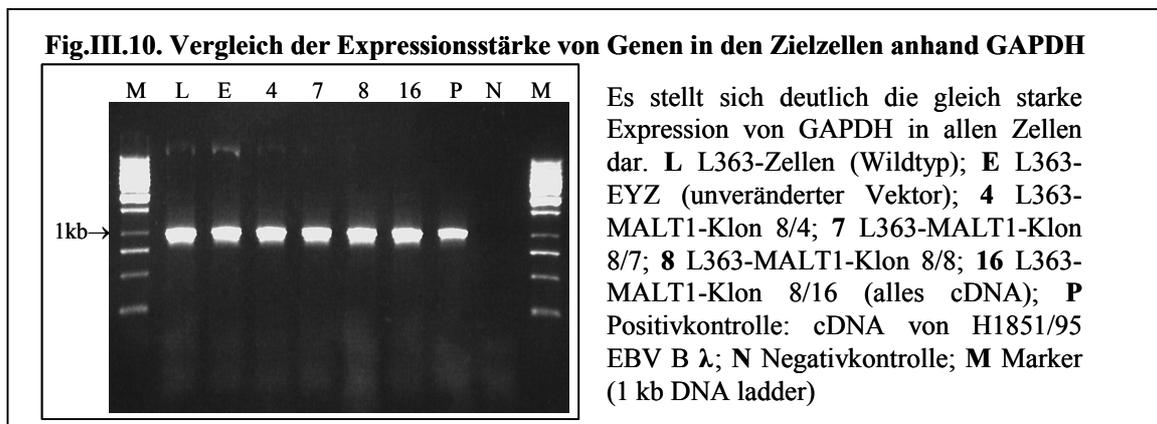
Die L363-B-Zellen wurden sowohl mit dem rekombinanten retroviralen Plasmid (pEYZ-MCS-Flag x MALT1-BS), als auch mit dem unveränderten Vektor (pEYZ-MCS-Flag) zur Negativkontrolle infiziert.

### III.4 ÜBERPRÜFUNG DER MALT1-BS-EXPRESSION IN DEN VERSUCHSZELLEN

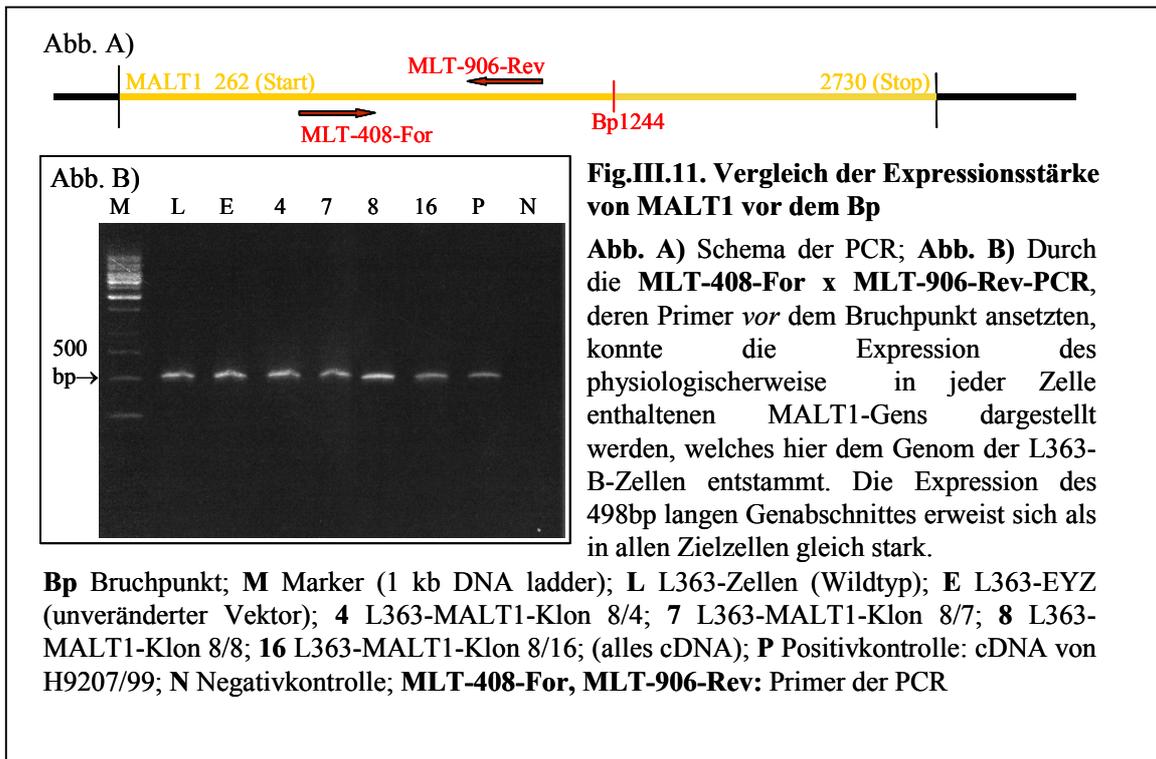
Da der Vektor für ein gelb fluoreszierendes Protein (*yellow fluorescent protein*) kodiert (vgl. II.1.7, S. 9), konnten infizierte L363-BS-Zellen mittels FACS von solchen unterschieden und sortiert werden, die den Vektor nicht aufgenommen hatten. Erfolgreich infizierte Zellen fluoreszierten deutlich gelb. L363-Wildtyp-Klone fluoreszierten erwartungsgemäß nicht. Mit dieser Methode konnte allerdings nicht unterschieden werden, ob die fluoreszierende Zellen einen unveränderten, oder den rekombinanten Vektor enthielten. Die Kontrollzellen (Zellen mit unverändertem Vektor, L363-EYZ) fluoreszierten jedoch leicht stärker, als die L363-BS-Zellen (vgl. Fig. III.14., S. 40).

Um eine Expression des MALT1-Bruchstücks durch die L363-Zellen nachzuweisen, wurden sukzessive verschiedene RT-PCRs durchgeführt (vgl. Fig. III.10., S. 36 - Fig. III.14., S. 40). Hierbei wurden vier Versuchszelllinien, die den rekombinanten Vektor enthielten (L363-MALT1-BS 4/4; 4/7; 4/8; 4/16), eine Wildtypzelllinie (L363) und eine Zelllinie, in die der unveränderte Vektor transfiziert wurde (L363-EYZ), miteinander verglichen.

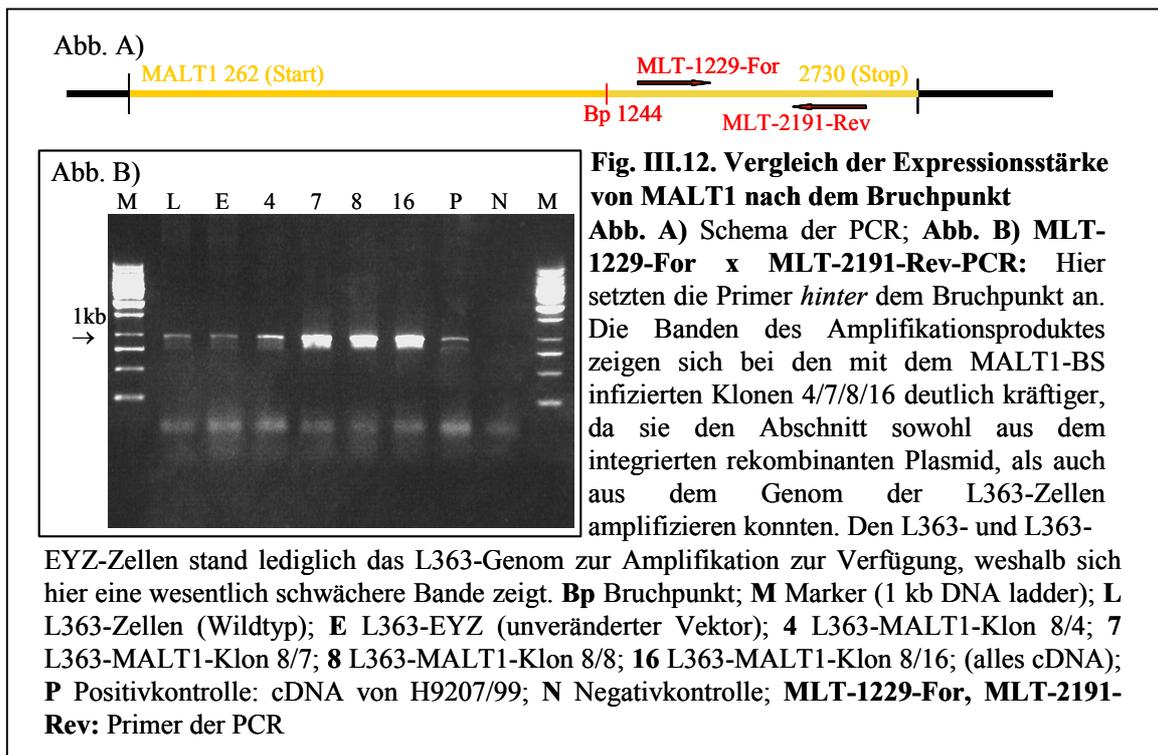
Da die Versuchsergebnisse anschließend semiquantitativ anhand der Bandenstärke des Amplifikationsprodukts im Elektrophoresegegel ausgewertet werden sollten, musste für jeden Versuchsansatz jeweils dieselbe Ausgangsmenge an Gesamt-DNA verwendet werden. Daher wurde die cDNA der verschiedenen Zelllinien photometrisch gemessen. Zur Kontrolle wurde dann die Expressionsstärke der konstitutiv in jeder Zelle vorliegenden GAPDH der Zellen verglichen, nachdem die nach der Photometrie berechneten gleichen Ausgangsmengen an cDNA verwendet wurden. Die erwarteten gleich starken Banden der GAPDH-Amplifikation sind in Fig. III.10. dargestellt.



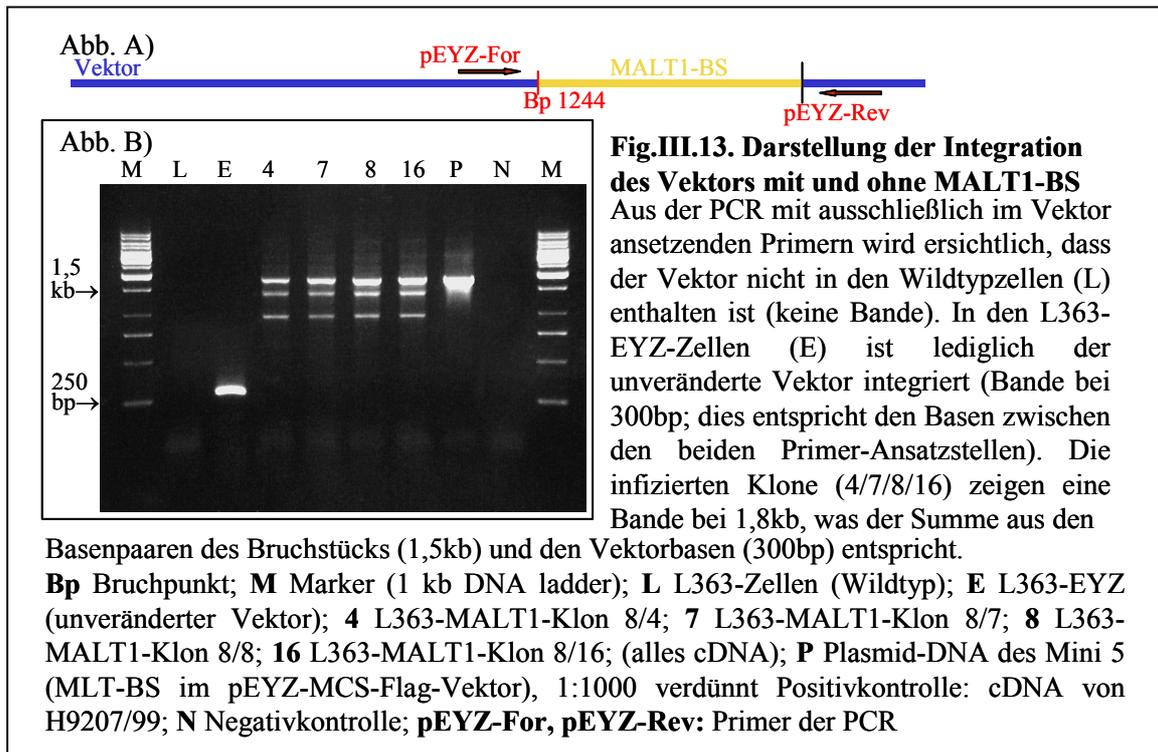
Zunächst wurde ein MALT1-Abschnitt amplifiziert, der *vor* dem Bruchstück liegt (MLT-408-For x MLT-906-Rev). Damit konnte gezeigt werden, dass das komplette MALT1 in allen Transfektanten in gleicher Menge vorhanden war, also die Expression des ‚physiologischen‘ MALT1-Gens in den transfizierten Klonen, den L363-EYZ-Zellen, als auch in den Wildtyp-Zellen (L363) erwartungsgemäß gleich stark war (Fig. III.11.).



Die Vervielfachung einer Sequenz, die *innerhalb* des Bruchstücks lag (MLT-1229-For x MLT-2191-Rev), zeigte unterschiedlich starke Banden auf dem Agarosegel (Fig. III.12., S. 38): die Banden der Transfektanten *mit* MALT1-Bruchstück (L363-MALT1-BS-8/4; -8/7; -8/8; -8/16) waren deutlich kräftiger als die der Wildtypzellen und jene der Zellen mit unverändertem Vektor. Da jeweils dieselbe Ausgangsmenge an Gesamt-cDNA verwendet wurde und dargestellt werden konnte, dass auch das komplette MALT1 in derselben Menge in allen Zelllinien vorlag, bedeutete dies, dass das amplifizierte ‚gene of interest‘ in unterschiedlichen Quantitäten in den Zellen vorliegen musste. D.h., dass in den MALT1-BS-Transfektanten außer dem physiologischen MALT1 zusätzliche MALT1-Anteile vorhanden waren, nämlich das transfizierte Bruchstück im retroviralen Vektor.



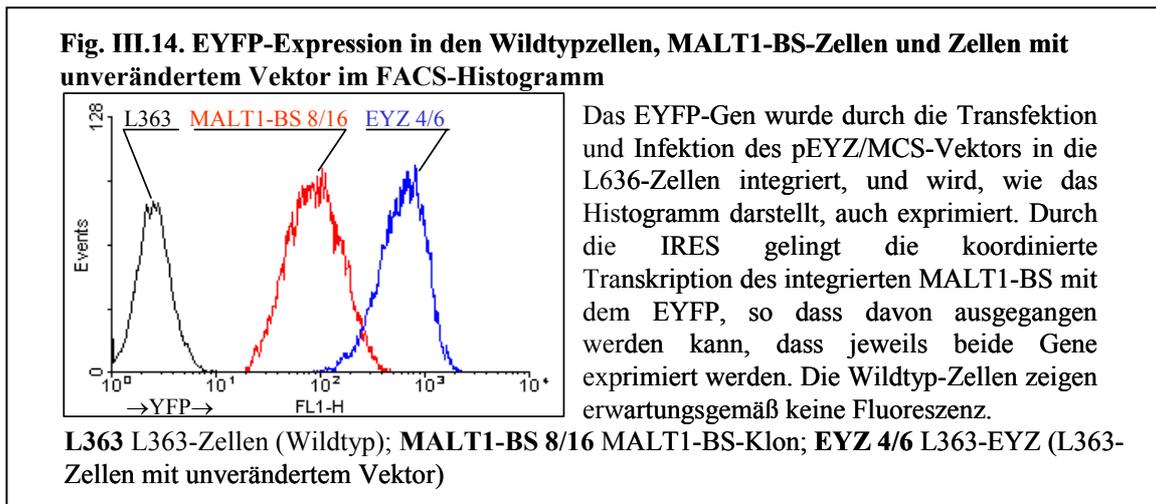
Dies konnte mit einer weiteren PCR bestätigt werden. Es wurden Primer verwendet, die im Vektor unmittelbar vor, bzw. nach den Ligationsstellen ansetzten (pEYZ-For x pEYZ-Rev; s. Fig. III.13., S. 39). Die verschieden langen Banden stellen bei den L363-MALT1-BS-Klonen das amplifizierte Vektorteilstück von 300 bp plus dem MALT1-BS von 1,5 kb dar, zusammen 1,8 kb. In den EYZ-Zellen konnte nur der vektorielle Abschnitt (300 bp) multipliziert werden, da nur der unveränderte Vektor in die Zellen eingeschleust wurde. Wie erwartet zeigte sich bei den Wildtypzellen keinerlei Amplifikationsprodukt, da sie weder mit dem rekombinanten, noch dem unveränderten Vektor infiziert worden waren.



Bei diesen Reaktionen wurde mit cDNA gearbeitet, also DNA, die mit Hilfe einer Reversen Transkriptase aus der in der Zelle enthaltenen mRNA hergestellt wurde. Da die mRNA den in der Zelle synthetisierten Proteinen entspricht, ist die Expression des transfizierten MALT1-Bruchstücks als Proteinstruktur auf indirektem Weg dargestellt worden. Doch auch die Selektion der Zellen anhand ihrer EYFP-Expression ist dem direkten Proteinnachweis nahezu gleichwertig, denn im Vektorkonstrukt wurde das ‚gene of interest‘ MALT1-BS durch eine IRES mit EYFP gekoppelt (vgl. II.1.7, S. 9; Fig. II.2., S. 10; Fig. III.7., S. 33). Hornung et al zeigten, dass praktisch alle Zellen, die EYFP exprimieren, auch das daran gekoppelte ‚gene of interest‘ exprimieren<sup>51</sup> (FACS-Histogramm der mittels EYFP-sortierten Zellen, s. Fig. III.14., S. 40).

Für einen direkten Proteinnachweis ist ein Western Blot nötig. Daher wurde in den retroviralen Vektor eine flag-site integriert, für welche Antikörper vorliegen. Durch die Ligation von Vektor und Insert wurde die flag-site direkt mit dem MALT1-BS gekoppelt. Da die Transkription des Zielgens erst durch das Stop-Codon nach der flag-site beendet wird, entsteht stets eine Fusion aus MALT1-BS mit dem Flag-Tag, so dass mit den Flag-Tag-Antikörpern ein MALT1-Proteinnachweis geführt werden kann. Ein solcher Proteinnachweis gelang im Rahmen dieser Arbeiten nicht. Ursächlich lag dem möglicherweise ein frameshift durch die Deletion einer Base am 3'Ende des MALT1-Bruchstücks zugrunde. Aus diesem Grund konnte das Flag-Tag nicht korrekt transkri-

biert werden, und das veränderte Protein ließ keine Antikörper-Antigen-Erkennung zu. Ein Western Blot war nicht möglich. Dass dieser frameshift eine Funktionsänderung des MALT1-Bruchstücks bewirken könnte ist unwahrscheinlich, da lediglich die drei letzten Aminosäuren des exprimierten Gens durch die Deletion verändert wurden (die Base entsprach dem ersten Nukleotid der drittletzten Aminosäure (Serin) des MALT1-Fragments). Ob das 3' Ende des Gens für funktionell wichtige Strukturen kodiert ist bislang nicht bekannt.



### III.5 METHODEN ZUR FUNKTIONSANALYSE VON GENEN

Für funktionelle Analysen eines Gens stehen heute prinzipiell vier Möglichkeiten zur Verfügung:

Man kann zum einen das zu untersuchende Gen ausschalten, um so im Vergleich mit unveränderten Zellen oder Organismen eine Funktionsänderung zu beobachten. Dies lässt sich durch Herstellung von knock-out-Zellen oder –Organismen erreichen, indem mit Hilfe von Vektoren das entsprechende Gen aus dem Genom der Zelle, oder des Organismus, entfernt wird. Diese Methode wurde beispielsweise in den kürzlich veröffentlichten Untersuchungen von J. Ruland<sup>44</sup> und A. A. Ruefli-Brasse<sup>45</sup> angewendet, die damit zeigen konnten, dass MALT1 essentiell für die normale Entwicklung und das Überleben von Marginalzonen-B-Zellen ist.

Oder aber man bewerkstelligt ein ‚knockdown‘ des Gens mit Hilfe von si-RNA (small interfering RNA)<sup>52-54</sup>, welche die Transkription des interessierenden Gens unterbindet. Dies sind sozusagen ‚Minusvarianten‘ für funktionelle Genanalysen.

Andererseits kann man ein Überexpression des ‚gene of interest‘ anstreben. Dies lässt sich durch eine transiente Transfektion eines Plasmids bewerkstelligen, das das Gen und entsprechende funktionelle Stellen enthält. Die Transfektion kann durch physikochemische Methoden erfolgen, z.B. durch Mikroinjektion, Elektroporation, oder aber effizienter durch Komplexierung der DNA mit Calciumphosphat. Ein Nachteil dieser Techniken jedoch ist, dass nur etwa eine von  $10^3$ - $10^7$  Zielzellen die transfizierte DNA stabil in ihr Genom einbaut und exprimiert<sup>55,56</sup>. Die Selektion stabiler Transfektanten wird damit ausgesprochen schwierig und aufwändig.

Eine wesentlich effektivere Methode wurde bei dieser Arbeit verwendet: Mit Hilfe retroviraler Partikel wurden L363-Zielzellen mit dem ‚gene of interest‘ infiziert. Hierbei liegt die Ausbeute an stabilen Zellen 10-50 mal höher<sup>55</sup>. Ein retroviraler, replikationsdefizienter Vektor, hier pEYZ-MCS, wurde in 293T-Zellen als Verpackungszelllinie eingebracht, gemeinsam mit Plasmiden, die die Gene für Gag, Pol und Env enthielten<sup>48</sup> (vgl. II.2.10.1., S. 23). Hierdurch wurden dem replikationsdefizienten Vektor die fehlenden Proteine zur Replikation bereitgestellt und es konnten sich infektiöse Viren generieren, die den Vektor mit dem ‚gene of interest‘ enthielten. Mit diesen Viren infizierte man dann L363-Zellen, wobei die Viren den Vektor in die Zellen einbrachten und das ‚Minigenom‘ in die DNA der Zielzellen integrierten. Das für die Transkriptions-Initiation und den Einbau des viralen Genoms in die Wirts-DNA funktionell wichtige 5'-LTR wurde bei dem verwendeten Vektor durch einen CMV-Promoter ersetzt, der noch effektiver und aktiver funktioniert. Zudem befand sich im selben Vektor ein Zeozin-Resistenzgen, sowie ein Selektionsgen für EYFP<sup>46</sup>. So konnten das gewünschte Gen enthaltende Zellen anhand ihrer Fluoreszenz und Zeozinresistenz selektiert werden. Auch die Arbeitsgruppe um K. Izumiyama verwandte diese Methode, um die subzelluläre Lokalisation und Stabilität der exprimierten Proteine von MALT1, API2 und des Fusionsgens API2-MALT1 zu untersuchen<sup>43</sup>.

Mit Hilfe solcher Vektorkonstrukte können nun verschiedenste Untersuchungen zur Beteiligung von MALT1 und den MALT1-Bruchstücken im Kontext der Onkogenese von MALT-Typ-Lymphomen durchgeführt werden. Man kann mit einer allgemeinen

Analyse des Zellzyklus, des Wachstumsverhaltens und des Apoptoseverhaltens der rekombinanten Zellen beginnen, und spezieller untersuchen, inwiefern das vollständige MALT1, bzw. das MALT1-BS in die molekularen Mechanismen des Signaltransduktionsweges der NF- $\kappa$ B-Induktion eingebunden ist. Darüber hinaus bietet sich die Herstellung von Gen-Chips für eine Subtraktionsanalyse zur Suche bisher unbekannter Fusions- und Interaktionspartner, sowie die gezielte Analyse Zellzyklusgebundener Proteine wie p53, RB, und der Cyclin-abhängigen Kinasen an.

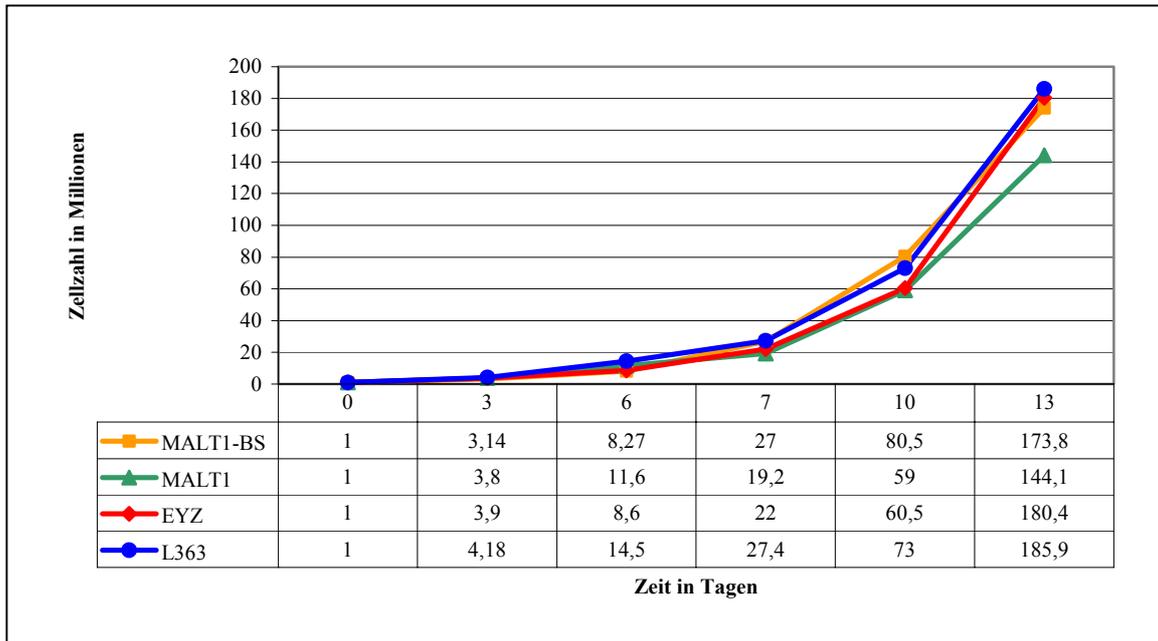
### **III.6 WACHSTUMSVERHALTEN UND ZELLYKLUS**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten und der Zellzyklus der hergestellten Zelllinien untersucht. Verglichen wurden hierzu L363-Wildtypzellen (L363), L363-Zellen mit unverändertem Vektor (L363-EYZ), L363-Zellen, die mit dem Vektor-MALT1-Bruchstück-Konstrukt infiziert waren (L363-MALT1-BS), sowie L363-Zellen, in welche das komplette MALT1-Gen (L363-MALT1-GES) integriert wurde (s. II.1.1, S. 6). Die Zelllinien wurden jeweils unter gleichen Bedingungen (vgl. II.2.11, S. 23) nach 0, 3, 6, 7, 10 und 13 Tagen gezählt, und mittels FACS an den Tagen 0, 5, 6, 7 und 11 analysiert.

#### **III.6.1 WACHSTUMSVERHALTEN**

Trotz des begrenzten Beobachtungszeitraums lässt sich eine Tendenz verzeichnen. Nach 13 Tagen Kultivierung der Zellen zeigte sich, dass die Bruchstück-Transfektanten den Wildtyp- und L363-EYZ-Zellen ähnlich proliferiert waren. Die L363-MALT1-GES-Zellen blieben hingegen im Wachstum zurück und erreichten nur eine Gesamtzahl von  $144,1 \times 10^6$  Zellen, was 77,5% der Wildtypzellen entspricht (s. Fig. III.15., S. 43). Hieraus könnte man rückschließen, dass in MALT1 vor dem Bruchpunkt proliferationsinhibierende Sequenzen liegen und daher allein die MALT1-GES überexprimierenden Zellen in ihrem Wachstum gebremst werden. Ohne diese regulatorischen Einheiten, wie im Falle des MALT1-BS, kann der verbleibende Anteil des Gens keinen Einfluss mehr

auf das Proliferationsverhalten der Zellen nehmen, weshalb sie entsprechend den Kontrollzellen L363 und L363-EYZ wuchsen.



### III.6.2 ZELLZYKLUS

Auch hier verhalten sich die MALT1-BS-Zellen tendenziell wie die L363- und L363-EYZ-Zellen, wohingegen die MALT1-GES-Zellen leicht abweichen. Der ruhende Zellpool nimmt bis zum Endpunkt hin in allen Zelllinien zu, bei den MALT1-GES-Zellen jedoch stärker, von annähernd 4% auf 27%, ein Zuwachs also von 23%. Am deutlichsten wird dieser Unterschied im Vergleich zu den MALT1-BS-Zellen, deren Anteil im  $G_0$ -Pool nur um etwa 16% von 4% auf 20,5% anstieg (vgl. Fig. III.16., Abb. B, S. 44).

Umgekehrt zeigte sich das Ergebnis im Proliferationspool, wo die Abnahme der MALT1-GES-Zellen 6,5 Prozentpunkte mehr beträgt als die der MALT1-BS-Zellen (vgl. Fig. III.16., Abb. C, S. 44).

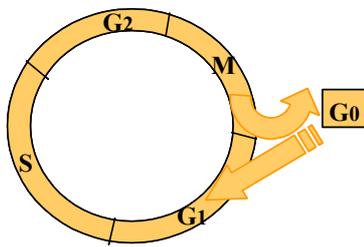
Dieses Ergebnis unterstreicht die Beobachtungen zum Wachstumsverhalten. Strukturen, die im MALT1-Gen vor dem Bruchpunkt liegen, also nur in der MALT1-GES-Zelllinie stärker exprimiert werden, bewirken einen vermehrten Übergang der Zellen in die  $G_0$ -Phase, der Anteil der Zellen im Proliferationspool nimmt somit ab. Ohne diese Struktu-

ren, wie im Falle der MALT1-BS-Transfektanten, verbleibt ein größerer Anteil der Zellen im Proliferationspool.

Auf die MALT-Typ-Lymphomgenese bezogen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass aufgrund des Verlusts des N-terminalen MALT1-Anteils durch die Translokation solche Eigenschaften des Gens verloren gehen, welche die Genprodukte destabilisieren, die Zellen im Wachstum hemmen und somit die Tumorprogression fördern. Diese Ergebnisse sind konkordant zu denen anderer Arbeitsgruppen<sup>43</sup>.

**Fig.III.16. FACS-Analysen zum Zellzyklus**

Abb.A) Zellzyklus



**Abb.A)** Schema des Zellzyklus. **G1** präsynthetische Phase; **S** DNA-Synthesephase; **G2** post-synthetische Phase; **M** Mitosephase; **G0** ruhender Zellpool. **Abb.B)** ruhender Zellpool: Zellen in der G0-Phase, die vorübergehend aus dem Zellzyklus ausgeschieden sind. **Abb.C)** Proliferationspool, „growth fraction“: der Zellanteil, der sich gerade aktiv im Zellzyklus befindet; zusammengesetzt aus den Zellen in der G1-, S-, G2- und M-Phase. **MALT1-BS** L363-MALT1-BS-Klon 8/8; **MALT1** L363-MALT1-GES; **EYZ** L363-EYZ-Klon 4/6; **L363** Wildtypzellen

Abb.B) ruhender Zellpool, G0

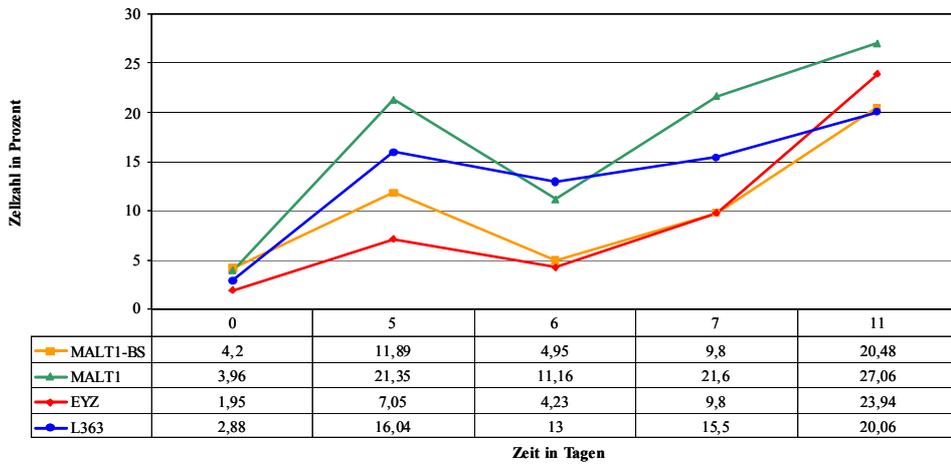
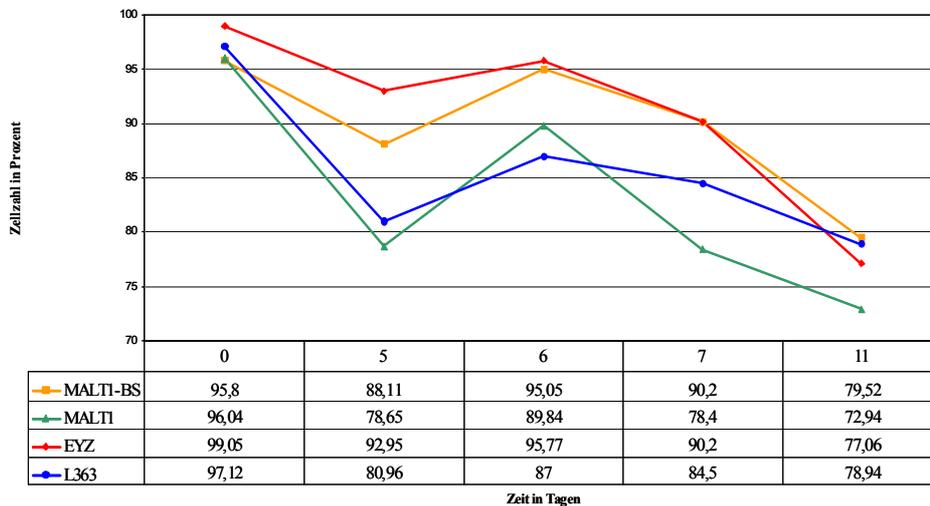


Abb.C) Proliferationspool, G1/S/G2/M



## IV DISKUSSION

Unter Annahme der Onkogenität von MALT1 wurde eine Vektorkonstruktion etabliert, die die stabile Transfektion eines MALT1-Bruchstücks in eine humane B-Zelllinie, und somit weitreichende funktionelle Untersuchungen dieses Gens ermöglicht. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass MALT1 an verschiedenen Stellen gebrochen wird<sup>38</sup>, wurde für die vorliegende Arbeit der bislang kürzeste identifizierte MALT1-Genabschnitt einer API2-MALT1-Fusion<sup>27,28,38</sup> ausgesucht. Die Sequenz dieses Bruchstücks ist Teil aller t(11;18)(q21;q21)-Translokationen und stellt somit den kleinsten gemeinsamen Nenner aller Varianten dar.

Als wichtige funktionelle Komponente in MALT1 hat sich die caspase like domain (vgl. Fig. I.1., S. 3) erwiesen, die trotz der Variabilität des Bruchpunkts in allen Fällen, so auch im untersuchten Bruchstück, konserviert blieb<sup>27,28,38</sup> (vgl. Fig. I.2., S. 4). Es ist bekannt, dass Kaspasen eine bedeutende Rolle in apoptotischen Signalwegen, mit zum Teil pro- und antiapoptotischer Wirkung, spielen<sup>57</sup>. Lucas et al<sup>39</sup>, sowie Uren et al<sup>34</sup> konnten darstellen, dass die Oligomerisation der caspase like domain in MALT1 eine NF- $\kappa$ B-Induktion bewirkt, ein pro-survival-Signal in B-Zellen. Sowohl Bcl-10, als auch API2 in der t(11;18)-Fusion konnten eine solche Oligomerisation der caspase like domain bewirken<sup>34,39</sup>. Bcl-10 interagiert hierfür mit zwei Ig-Domänen des MALT1. Diese sind in der hier untersuchten Bruchstück-Sequenz nicht enthalten, da sie vor dem Bruchpunkt liegen. Auch API2 ist es nur in der Fusion mit MALT1 möglich, eine Oligomerisation der caspase like domain zu induzieren. Isoliert können weder MALT1 noch API2 NF- $\kappa$ B aktivieren<sup>34,39</sup>. Stoffel et al<sup>59</sup> gelang es darzustellen, dass die Ig-Domänen des MALT1 in der API2-MALT1-Fusion die NF- $\kappa$ B-Aktivierung verstärken können, aber nicht essentiell für die Induktion selbst sind.

Dies ließ die Hypothese zu, dass die MALT1-GES-Zellen im Vergleich zu MALT1-BS-Zellen ein unterschiedliches Proliferationsverhalten aufweisen müssten, da sie über jene Ig-Domänen zur Bcl-10-MALT1-Interaktion verfügen, und somit NF- $\kappa$ B als Survival-Signal induzieren könnten. Auch hier nicht untersuchte Zellen mit dem API2-MALT1-Fusionsgen würden unter dieser Annahme stärkere antiapoptotische Eigenschaften als MALT1-BS-Zellen aufweisen, da hier API2 die Autooligomerisation der caspase like domain, und somit NF- $\kappa$ B induzieren könnte. K. Izumiyama<sup>43</sup> konnten zeigen, dass das

Fusionsprodukt API2-MALT1 im Gegensatz zu den einzelnen Partnern der Translokation in der Zelle stabil bleibt. Dieses Protein kann nun permanent und unabhängig von zusätzlichen costimulierenden Molekülen wie Bcl-10 NF- $\kappa$ B aktivieren<sup>34,39,60</sup>. Zusätzlich zur Apoptoseinhibition über den NF- $\kappa$ B-pathway beschleunigt API2-MALT1 die Zellproliferation und maligne Transformation, wie Stoffel et al<sup>59</sup> kürzlich darstellen konnten.

J. Ruland<sup>44</sup> und A. A. Ruefli-Brasse<sup>55</sup> zeigten, dass MALT1 essentiell für die normale Entwicklung und das Überleben von Marginalzonen-B-Zellen (MZBC) ist: MALT1-defiziente Mäuse waren in der Antigen-Rezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, Cytokin-Produktion und Lymphozytenproliferation gestört.

Wie in III.6 S. 42 ff beschrieben, zeigten die hier untersuchten MALT1-GES-Zellen im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zelllinien jedoch ein protrahiertes Wachstum, und auch bei den Zellzyklusanalysen verblieb die Mehrzahl der MALT1-GES-Zellen im ruhenden Zellpool, G<sub>0</sub>. Im Gegensatz dazu proliferierten die L363-MALT1-BS-Zellen deutlich stärker, analog fand sich auch ein zunehmender Anteil dieser Zelllinie in der G<sub>1</sub>-Phase. In der Tendenz verhielten sich die MALT1-BS-Zellen wie die Wildtyp-Zelllinie, so dass man postulieren kann, dass die für dieses unterschiedliche Wachstumsmuster der MALT1-BS-, und MALT1-GES-Zellen verantwortlichen Genabschnitte vor dem Bruchpunkt liegen.

Die vergleichsweise geringe Proliferation der hier untersuchten MALT1-GES-Zellen lässt sich am ehesten auf die verminderte Stabilität des Genproduktes zurückführen<sup>43</sup>. Möglicherweise liegen neben den destabilisierenden auch noch nicht bekannte proliferationsinhibierende Domänen vor dem Bruchpunkt in MALT1, die zu dem hier beobachteten gebremsten Wachstumsverhalten der MALT1-GES-Zellen führten. Der bedeutende Unterschied zwischen diesen Untersuchungen mit verminderter Proliferation der MALT1-GES-Zellen und jenen von Ruefli-Brasse<sup>45</sup> und Ruland<sup>44</sup> mit der Feststellung der Notwendigkeit von MALT1 für das MZBC-Wachstum ist, dass diese Arbeitsgruppen mit MALT1-defizienten Mäusen gearbeitet haben. Diese Organismen waren nicht zur normalen MZBC-Entwicklung und –Proliferation befähigt. Im vorliegenden Fall wurden MALT1 überexprimierende Zellen untersucht. Möglicherweise existieren tatsächlich das Wachstum bremsende Domänen vor dem Bruchpunkt in MALT1, die die geringere Wachstumsrate im Vergleich zu den MALT1-BS-Transfektanten bedingen.

Oder eine MALT1-Expression ist zwar Bedingung für die physiologische Entwicklung der MZBC, aber eine Überexpression des Gens stimuliert nicht zusätzlich eine vermehrte B-Zell-Proliferation.

Beide Arbeitsgruppen zeigten mit diesen<sup>44,45</sup> und neueren Ergebnissen<sup>61</sup> zusätzlich, dass MALT1 ein wichtiges, bislang nicht bekanntes Bindeglied im NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg darstellt. Hierbei agiert MALT1 zwischen Bcl10 und dem IKK-Komplex, was zur Proliferation und zum Überleben der B-Lymphozyten durch NF- $\kappa$ B-Induktion im entzündlichen Kontext mit T- und B-Zell-Interaktion führt.

Wiederholt zeigen verschiedene Studien den immensen Funktionszuwachs, der durch die Fusion von MALT1 und API2 durch t(11;18)(q21;q21) vermittelt wird. Zum einen gewinnt das Protein Stabilität gegenüber intrazellulärer Degradierung<sup>43</sup>. Außerdem bewirkt das Fusionsgen eine Autooligomerisierung der caspase like domain des MALT1 und dadurch eine unregulierte NF- $\kappa$ B-Induktion<sup>34,39</sup>. API2 und MALT1 werden unter den Bedingungen einer Entzündung mit T- und B-Zell-Interaktion hochreguliert<sup>49,62</sup>, und Bcl-10 beständig exprimiert. Dies hat zur Folge, dass MALT1 und Bcl10 einen Komplex bilden, der NF- $\kappa$ B aktiviert<sup>34,39</sup>. Kommt es jedoch zur t(11;18)(q21;q21)-Translokation, die ein stabiles Protein produziert<sup>43</sup>, ist die NF- $\kappa$ B-Induktion von umgebenden Bedingungen und zusätzlichen Molekülen wie Bcl-10 unabhängig.

Aktuelle Arbeiten zeigen weitere antiapoptotische Funktionsweisen von API2-MALT1 auf. Zum einen wurde die Bindungsfähigkeit des API2-MALT1-Fusionsproduktes mit Smac (second mitochondria-derived factor of caspase) und weiteren potentiellen Bindeproteinen wie TRAF2 (Tumour necrosis factor receptor-associated factor 2) und HtrA2 (high temperature requirement A2) festgestellt<sup>58</sup>. Durch die Bindung dieser Apoptose vermittelnden Proteine wird deren Funktion neutralisiert und der programmierte Zelltod verhindert. Zudem gelang es nachzuweisen, dass API2-MALT1 aufgrund der Inhibition von p53 Apoptose zu verhindern vermag<sup>59</sup>.

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, welche die Zellen zur unkontrollierten, tumortypischen Proliferation und der Apoptoseinhibition anregen, trägt letztlich dazu bei, spezifische und selektive Therapeutika zu entwickeln, um die Onkogenese von MALT-Typ-Lymphomen zu hemmen.

## **V      ZUSAMMENFASSUNG**

Unter den primär extranodalen Lymphomen stellen die MALT-Typ-Lymphome die häufigste Form dar. Die dabei regelmäßig zu beobachtende Translokation t(11;18)(q21;q21) bewirkt die Fusion des Apoptoseinhibitorgens API2 mit MALT1, einer humanen Paracaspase. Noch sind die Schritte der Lymphomgenese nicht bis ins Einzelne bekannt. Um die Rolle näher beleuchten zu können, die dabei der translozierte MALT1-Genabschnitt spielt, wurde in dieser Arbeit ein Vektorsystem konstruiert, mit welchem das MALT1-Bruchstück (MALT1-BS) stabil in eine humane B-Zelllinie (L363) transfiziert werden konnte. Dabei wurde mittels nested PCRs reines Fusionsmaterial gewonnen und amplifiziert. Als Voraussetzung zur Transkription in den Zielzellen wurden dem isolierten Genabschnitt ein Initiationskodon (Kozak-site) und eine Startcodon angefügt. Schließlich wurde das MALT1-BS mit Hilfe des retroviralen Vektorsystems in humane B-Zellen transfiziert. Mit diesem Vektor wurden ebenso Marker- und Selektionsgene (Flagtag, EYFP, Zeozin-, und Ampicillinresistenzgene) in die Zielzellen integriert. Mit zahlreichen PCRs konnte bestätigt werden, dass diese das Genbruchstück stabil exprimierten. Mit den Transfektanten war es nun möglich, Vergleichsstudien mit unveränderten Zellen und solchen, die das komplette MALT1-Gen überexprimierten, zu unternehmen. Hieraus ließen sich Schlüsse ziehen, welchen Einfluss das MALT1-BS auf den Zellzyklus und das Wachstumsverhalten der Zellen hat. Es zeigte sich, dass das kompletten MALT1-Gen überexprimierende Zellen im Vergleich zu Zellen mit dem MALT1-BS weniger proliferierten. Analog konnte bei Zellzyklusanalysen festgestellt werden, dass Zellen mit dem kompletten MALT1-Gen vermehrt in den ruhenden Zellpool übergangen, wohingegen die MALT1-BS-Zellen eher im Proliferationspool verharrten. Dies deutet darauf hin, dass vor dem Bruchpunkt des Gens liegende Domänen, die durch die Translokation von dem MALT1-Gen entfernt wurden, die Proliferation bremsende Funktion haben. Inwiefern Strukturen des MALT1-Bruchstücks die molekularen Mechanismen der Lymphomgenese beeinflussen, kann mit den entwickelten Transfektanten weiter beleuchtet werden.

Durch die Generierung des Fusionsproteins API2-MALT1 gewinnt die Zelle an antiapoptotischen Eigenschaften, sei es durch Neutralisierung apoptoseinduzierender Proteine oder durch NF- $\kappa$ B-Aktivierung und gelangt so zu unkontrolliertem, tumortypischem Wachstum.

## VI LITERATURVERZEICHNIS

1. Isaacson, P. & Wright, D. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinct type of B-cell lymphoma. *Cancer* **52**, 1410-1416 (1983).
2. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., Vardiman, J. W., editors. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics. Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2001. p. 121-126
3. Harris, N. L. et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361-92 (1994).
4. Isaacson, P., Stencer, J. Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. *Histopathology*, 445-462 (1987).
5. Isaacson, P. G. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol* **36**, 139-47 (1999).
6. Dierlamm, J. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica* **88**, 8-12 (2003).
7. Greiner, A. & Müller-Hermelink, H. Recent advances in gastric extranodal B-cell lymphoma. *Current Diagnostics in Pathology*, 91-98 (1996).
8. Greiner, A. et al. Idiotypic identity in a MALT-type lymphoma and B cells in Helicobacter pylori associated chronic gastritis. *Lab Invest* **70**, 572-8 (1994).
9. Hussell, T., Isaacson, P. G., Crabtree, J. E. & Spencer, J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to Helicobacter pylori. *Lancet* **342**, 571-4 (1993).
10. Muller-Hermelink, H. K. & Greiner, A. [Autoimmune diseases and malignant lymphoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **76**, 96-109 (1992).
11. Greiner, A. Pathogenese der MALT-Typ Lymphome. *Verh Dtsch Ges Pathol* **86**, 145-152 (2002).
12. Knorr, C. et al. Expression of costimulatory molecules in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas in vivo. *Am J Pathol* **155**, 2019-27 (1999).
13. Wotherspoon, A. C. et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* **342**, 575-7 (1993).

14. Bayerdorffer, E. et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* **345**, 1591-4 (1995).
15. Fischbach, W., Tacke, W., Greiner, A., Konrad, H. & Muller, H. Regression of immunoproliferative small intestinal disease after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **349**, 31-2 (1997).
16. Alpen, B. et al. Translocation t(11;18) absent in early gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type responding to eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Blood* **95**, 4014-5 (2000).
17. Thiede, C. et al. Long-term persistence of monoclonal B-cells after cure of *Helicobacter pylori* infection and complete histologic remission in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma. *Journal of clinical Oncology* **19**, 1600-1609 (2001).
18. Wotherspoon, A., Pan, L., Diss, T. C. & Isaacson, P. G. Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer Genet Cytogenet* **58**, 35-38 (1992).
19. Willis, T. G. et al. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumour types. *Cell* **96**, 35-45 (1999).
20. Zhang, Q. et al. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* **22**, 63-8 (1999).
21. Streubel, B. et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* **101**, 2335-2339 (2003).
22. Ott, G. et al. 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**, 3944-8 (1997).
23. Horsman, D., Gascoyne, R. D., Klasa, R. & Coupland, R. W. t(11;18)(q21;q21): a recurring translocation in lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)? *Genes Chromosomes Cancer* **4**, 183-187 (1992).
24. Auer, I. A. et al. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* **8**, 979-85 (1997).

25. Dierlamm, J. et al. 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. *Blood* **93**, 3601-9 (1999).
26. Rosenwald, A. et al. Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol* **155**, 1817-21 (1999).
27. Remstein, E. D., James, C. D. & Kurtin, P. J. Incidence and subtype specificity of API2-MALT1 fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *Am J Pathol* **156**, 1183-8 (2000).
28. Motegi, M. et al. API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. *Am J Pathol* **156**, 807-12 (2000).
29. Remstein, E. D. et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with t(11;18)(q21;q21) and mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with aneuploidy develop along different pathogenetic pathways. *Am J Pathol* **161**, 63-71 (2002).
30. Starostik, P. et al. Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood* **99**, 3-9 (2002).
31. Deveraux, Q. L. et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* **17**, 2215-23 (1998).
32. Deveraux, Q. L. & Reed, J. C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-52 (1999).
33. Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* **16**, 6914-25 (1997).
34. Uren, A. G. et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* **6**, 961-7 (2000).
35. Akagi, T. et al. A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18)(q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* **18**, 5785-94 (1999).

36. Morgan, J. A. et al. Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18. *Cancer Res* **59**, 6205-13 (1999).
37. Stoffel, A. & Le Beau, M. M. The API2/MALT1 fusion product may lead to germinal center B cell lymphomas by suppression of apoptosis. *Hum Hered* **51**, 1-7 (2001).
38. Kalla, J. et al. Heterogeneity of the API2-MALT1 gene rearrangement in MALT-type lymphoma. *Leukemia* **14**, 1967-74 (2000).
39. Lucas, P. C. et al. Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* **276**, 19012-9 (2001).
40. Hofmann, K., Bucher, P. & Tschopp, J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in biochemical science* **22**, 155-156 (1997).
41. Wotherspoon, A. C., Dogan, A. & Du, M. Q. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Curr Opin Hematol* **9**, 50-5 (2002).
42. Baens, M. et al. The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol* **156**, 1433-9 (2000).
43. Izumiya, K. et al. Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. *Oncogene* **22**, 8085-8092 (2003).
44. Ruland, J., Duncan, G. S., Wakeham, A. & Mak, T. W. Differential requirement for MALT1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* **19**, 749-758 (2003).
45. Ruefli-Brasse, A. A., French, D. M. & Dixit, V. M. Regulation of NF-kB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* **302**, 1581-1584 (2003).
46. Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S. & Mulligan, R. C. Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol Med* **3**, 466-76 (1997).
47. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467 (1977).

48. Soneoka, Y. et al. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* **23**, 628-33 (1995).
49. Greiner, A. et al. 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**, 1583-93 (1997).
50. Pulvertaft, J. Cytology of Burkitt's tumour (african lymphoma). *Lancet* **39**, 238-240 (1964).
51. Hornung, M., Lindemann, D., Kraus, C., Peters, A. & Berberich, I. The CD40 TRAF family member interacting motif carries the information to rescue WEHI 231 cells from anti-IgM-induced growth arrest. *European Journal of Immunology* **28**, 3812-3823 (1998).
52. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811 (1998).
53. Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
54. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296 (2000).
55. Hwang, L. G., E. Expression of genes introduced into cells by retroviral infection is more efficient than that of genes introduced into cells by DNA transfection. *Journal of Virology* **50**(2), 417-424 (1984).
56. Graham FL, v. d. E. A. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2), 456-67 (1973).
57. Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. Review. *Trends in biochemical science* **22**, 299-306 (1997).
58. Hosokawa, Y., Suzuki, H., Suzuki, Y., Takahashi, R. & Seto, M. Antiapoptotic function of apoptosis inhibitor 2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Research* **64**, 3452-3457 (2004).
59. Stoffel, A., Chaurushiya, M., Singh, B. & Levine, A. J. Activation of NF-kappaB and inhibition of p53-mediated apoptosis by API2/mucosa-associated lymphoid tissue 1 fusions promote oncogenesis. *PNAS* **101**, 9079-9084 (2004).

60. Seto, M. Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. Review. *Cancer Sci* **95** (9); 704-710 (2004).
61. Zhou, H. et al. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* **427**, 167-171 (2004).

## **VII ANHANG**

### **VII.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
3'	downstream
5'	upstream
A	Adenin
Abb.	Abbildung
acc. No.	Accession Number
Amp	Ampicillin
API	= IAP, inhibitor of apoptosis protein
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BIR	baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis protein) repeat
Bp	Bruchpunkt
bp	Basenpaare
BS	Bruchstück
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation, immunphänotypisches Zelloberflächenmerkmal
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
CMV	Cytomegalie-Virus
DD	death domain
Del	Deletion, deletierter Nukleinsäurenabschnitt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	1,4-Dithiothreitol

E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECV	endothelial cell adapted human Cytomegalie-Virus strains
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Env	Hüllprotein
EtBr	Ethidiumbromid
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
EYZ	enhanced yellow Zeocin
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
ff	folgende
Fig.	Figur
FISH	fluorescence in situ hybridisation
FOR	FORWARD bezüglich der Orientierung eines Primers bei einer PCR
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ), oder Gramm
gag	gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
HEK	human embryonal kidney
H.p.	Helicobacter pylori
IAP	inhibitor of apoptosis protein
Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
IRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
L363	Zellen der Zelllinie L363. Wildtyp der verwendeten Versuchszellen.
L363-EYZ	Versuchszellen mit integriertem unveränderten EYZ-MCS-Virusvektor
L363-MALT1-BS 8/4; 8/7; 8/8 und 8/16	Versuchszellen mit integriertem MALT1-BS
L363-MALT1-GES	Versuchszellen mit integriertem vollständigen MALT1-Gen

LB	Luria-Broth
LTR	long terminal repeat
M	Mol
MALT	mucosa associated lymphoid tissue- Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MALT1	MALT-lymphoma associated translocation gene 1
MALT1-BS	MALT1-Bruchstück
MALT1-GES	vollständiges MALT1-Gen
MCS	multiple coning site
μ	mikro
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
MuLV	murines Leukämie-Virus
MZBC	Marginalzonen-B-Zellen
MZBCL	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
n	nano
NF-κB	nuclear factor-κB
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Nuc.	Nukleinsäure
o/n	über Nacht
Ori	origin of replication, Ort des Replikationsbeginns in bakteriellen Plasmiden
p	Plasmid oder kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffprotonenkonzentration
pol	Polymerasen
q	langer Arm eines Chromosoms
Rb	Retinoblastom-Gen
rcf	relative centrifugal force

REAL	Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms
REV	REVERSE bezüglich der Orientierung eines Primers bei einer PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
Smac	supramolecular activation cluster
SV	Simian Virus, Papovavirus
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-C-Thiogalactopyranoside
YFP	yellow fluorescent protein

## VII.2 OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemp. (°C)
GAPDH-FOR	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	78
GAPDH-REV	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	78
CD71-1441-FOR	GTGCCACTGAATGGCTAGAG	62
CD71-REV	TTATGGAAGGCACTGCTTCC	60
API-1203-FOR	GCCGTGGAAATGGGCTTT	56
MLT-408-FOR	AGTTCTTCAGCTTCTCAGCCC	64
MLT-1043-FOR-Swa-tag	CCGCATTTAAATGGCGCCACCATGAATAAAGAG- CAAACAACCTGACCAG	66
MLT-1229-FOR	TGCGTAATGCTGTGGATGAGT	62
MLT-1682-FOR	CCAAAGGCAAACAGGCTCT	58
MLT-2037-FOR	AAAGGATCTTCCCAAGCATTG	60
MLT-2412-FOR	ATTTATTTCAAGTTTCGCTCACC	62
MLT-906-REV	TTCCAAATCCACATAAGGCACC	64
MLT-1356-REV	TGGATTTGGAGCATCG	44
MLT-1797-REV	CCACTGTAGATTCCGCACAAG	64
MLT-2191-REV	TGAGAGGTTTCCCAACATTCA	60
MLT-REV-Bam-tag	CGCGGATCCCGTTTTTCAGAAATTCTGAGCCTGTC	66
pEYZ-FOR	CGCTGGAAAGGACCTTACAC	62
pEYZ-REV	CCAAAAGACGGCAATATGGT	58
Uni = M13-20	GTAAAACGACGGCCAGT	52
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	56
CFG-psi	CACGTGAAGGCTGCCGACC	64
CFG-Ires-REV	CTTCGGCCAGTAACGTTAGG	62

Anmerkung: Die Zahlen der Primer entsprechen nicht der Basenpaarnummerierung aus NM\_006785!

## VII.3 SEQUENZEN

### VII.3.1 MALT1-SEQUENZ

Entnommen aus der GenBank, Accession number NM\_006785 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=27886564>).

Unterstrichen und fett markiert sind die für die Sequenzierungen verwendeten Primerbindungsstellen, Start- und Stop-Codon, sowie der Bruchpunkt im verwendeten Fall H1851.

5'.....

181 AGCGGAAGGT GCCCCGGGGC CGAGGCCCGT GACGGGGCGG GCGGGAGCCC  
231 CGGCAGTCCG GGGTCGCCGG CGAGGGCCAT **GGTCGCTGTTG** GGGGACCCGC  
*START*

281 TACAGGCCCT GCCGCCCTCG GCCGCCCCCA CGGGGCCGCT GCTCGCCCCT  
331 CCGGCCGGCG CGACCTCAA CCGCCTGCGG GAGCCGCTGC TCGGGAGGCT  
381 CAGCGAGCTC CTGGATCAGG CGCCCGAGGG CCGGGGCTGG AGGAGACTGG  
431 CGGAGCTGGC GGGGAGTCGC GGGCGCCTCC GCCTCAGTTG CCTAGACCTG  
481 GAGCAGTGTT CTCTTAAGGT ACTGGAGCCT GAAGGAAGCC CCAGCCTGTG  
531 TCTGCTGAAG TTAATGGGTG AAAAAGGTTG CACAGTCACA GAATTGAGTG  
581 ATTCCTGCA GGCTATGGAA CACACTGA**AG TTCTTCAGCT TCTCAGCCCC**  
*MLT-408-For*

631 CCAGGAATAA AGATTACTGT AAACCCAGAG TCAAAGGCAG TCTTGGCTGG  
681 ACAGTTTGTG AAAGTGTGTT GCCGGGCAAC TGGACATCCT TTTGTTCAAT  
731 ATCAGTGGTT CAAAATGAAT AAAGAGATTC CAAATGGAAA TACATCAGAG  
781 CTTATTTTTA ATGCAGTGCA TGTAAGAT GCAGGCTTTT ATGTCTGTGC  
831 AGTTAATAAC AATTTACCT TTGAATTCAG CCAGTGGTCA CAGCTGGATG  
881 TTTGCGACAT CCCAGAGAGC TTCCAGAGAA GTGTTGATGG CGTCTCTGAA  
931 TCCAAGTTGC AAATCTGTGT TGAACCAACT TCCAAAAGC TGATGCCAGG  
981 CAGCACATTG GTTTTACAGT GTGTTGCTGT TGGAAGCCCT ATTCCTCACT  
1031 ACCAGTGGTT CAAAAATGAA TAACCATTAA CACATGAGAC CAAAAAGCTA  
1081 TACAT**GGTGC CTTATGTGGA TTTGGAAC**CAC CAAGGAACCT ACTGGGTGCA  
*MLT-906-Rev*

1131 TGTATATAAT GATCGAGACA GTCAAGATAG CAAGAAGGTA GAAATCATCA  
1181 TAGGAAGAAC AGATGAGGCA GTGGAGTGCA CTGAAGATGA ATTAATAAAT

BRUCHPUNKT ↓  
1231 CTTGGTCATC CTGAT**AATAA AGAGCAAACA ACTGACCAGC** CTTTGGCGAA  
↑ *MLT-1043-For-Swa-tag\**

1281 GGACAAGGTT GCCCTTTTGA TAGGAAATAT GAATTACCGG GAGCACCCCA  
1331 AGCTCAAAGC TGGTTTGGTG GATGTGTACG AATTGACTAA CTTACTGAGA  
1381 CAGCTGGACT TCAAAGTGGT TTCACTGTTG GATCTTACTG AATATGAGAT

1431 CGGTAATGCT GTGGATGAGT TTTTACTCCA TTTAGACAAG GGAGTATATG  
*MLT-1229-For*

1481 GGTTATTATA TTATGCAGGA CATGGTTATG AAAATTTTGG GAACAGCTTC

1531 ATGGTCCCCG TGATGCTCC AAATCCATAT AGGTCTGAAA ATTGTCTGTG  
*MLT-1356-Rev*

1581 TGTACAAAAT AACTGAAAT TGATGCAAGA AAAAGAAACT GGACTIONAATG

1631 TGTTCTTATT GGATATGTGT AGGAAAAGAA ATGACTACGA TGATACCATT

1681 CCAATCTTGG ATGCACTAAA AGTCACCGCC AATATTGTGT TTGGATATGC

1731 CACGTGTCAA GGAGCAGAAG CTTTTGAAAT CCAGCATTCT GGATTGGCAA

1781 ATCCAATCTT TATGAAATTT TAAAAGACA GATTATTAGA AGATAAGAAA

1831 ATCACTGTGT TACTGGATGA AGTTGCAGAA GATATGGGTA AGTGTCACCT

1881 TACCAAAGGC AAACAGGCTC TAGAGTTCCG AAGTAGTTTA TCTGAGAAGA  
*MLT-1682-For*

1931 GAGCACTTAC TGATCCAATA CAGGGAACAG AATATTCTGC TGAATCTCTT

1981 GTGCGGAATC TACAGTGGGC CAAGGCTCAT GAACTTCCAG AAAGTATGTG  
*MLT-1797-Rev*

2031 TCTTAAGTTT GACTGTGGTG TTCAGATTCA ATTAGGATTT GCAGCTGAGT

2081 TTTCCAATGT CATGATCATC TATAACAAGTA TAGTTTACAA ACCACCGGAG

2131 ATAATAATGT GTGATGCCTA CGTACTGAT TTTCCACTTG ATCTAGATAT

2181 TGATCCAAAA GATGCAAATA AAGGCACACC TGAAGAAACT GGCAGCTACT

2231 TGGTATCAAA GGATCTTCCC AAGCATTGCC TCTATACCAG ACTCAGTTCA  
*MLT-2037-For*

2281 CTGCAAAAAT TAAAGGAACA TCTAGTCTTC ACAGTATGTT TATCATATCA

2331 GTACTCAGGA TTGGAAGATA CTGTAGAGGA CAAGCAGGAA GTGAATGTTG  
*MLT-2192-Rev*

2381 GGAAACCTCT CATGCTAAA TTAGACATGC ATCGAGGTTT GGAAGGAAG

2431 ACTTGCTTTC AAACCTGTCT TATGTCTAAT GGTCCTTACC AGAGTTCTGC

2481 AGCCACCTCA GGAGGAGCAG GGCATTATCA CTCATTGCAA GACCCATTCC

2531 ATGGTGTTTA CCATTCACAT CCTGGTAATC CAAGTAATGT TACACCAGCA

2581 GATAGCTGTC ATTGCAGCCG GACTCCAGAT GCATTTATTT CAAGTTTCGC  
*MLT-2412-For*

2631 TCACCATGCT TCATGTCATT TTAGTAGAAG TAATGTGCCA GTAGAGACAA

2681 CTGATGAAAT ACCATTTAGT TTCTCTGACA GGCTCAGAAT TTCTGAAAA  
*MLT-Rev-Bam-tag\**

2731 TGACCTCCTT GTTTTGAAA GTTAGCATAA TTTTAGATGC CTGTGAAATA  
*STOP*

2781 GTACTGCACT TACATAAAGT GAGACATTGT GAAAAGGCAA ATTTGTATAT

2831 GTAGAGAAAG AATAGTAGTA ACTGTTTCAT AGCAAACCTC AGGACTTTGA  
.....3'

\*nur der Anteil des Primers, der auf MALT1-Sequenz liegt. Vollständig im Verzeichnis der Oligonukleotide (VII.2, S. 59) ersichtlich.

## VII.3.2 VEKTORSEQUENZEN

### VII.3.2.1 pPCR-Script Amp SK(+)-Klonierungsvektor, 2961 bp

Aus dem PCR-Script AmpCloningKit von Stratagene, Amsterdam. Die vollständige Sequenz ist ersichtlich in der GenBank-Datenbank, Accession Number #U46017.

Der Ausschnitt, welcher die verwendeten Sequenzierprimer Uni (M13-20) und T3 (vgl. VII.2, S. 59) enthält, sowie die SrfI-Schnittstelle, die dem Eröffnen des Plasmids dient, sind hier aufgeführt:

```
5'.....  
GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAAG CGCGCAATTA ACCCTCACTA  
T3-For  
AAGGGAACAA AAGCTGGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC TCTAGCCCCG  
SrfI  
GCGGATCCCC CGGGCTGCAG GAATTCGATA TCAAGCTTAT CGATACCGTC  
GACCTCGAGG GGGGGCCCGG TACCAATTC GCCCTATAGT GAGTCGTATT  
ACGCGCGCTC ACTGGCCGTC GTTTACAA..... 3'  
Uni (M13-20)
```

### VII.3.2.2 pEYZ-MCS-Virusvektor, 8706 bp

Modifizierter retroviraler Vektor aus dem Virologischen Institut der Universität Würzburg (Ingolf Berberich, Dieter Lindemann), auf der Grundlage des pczCFG2 hCD8 IE-YZ retroviral vector (Dirk Lindemann, unveröffentlicht und <sup>46</sup>).

Hier ausschnittsweise dargestellt sind die Multiple Cloning Site (MCS), Schnittstellen der Restriktionsenzyme SwaI und BamH I, sowie Bindungsstellen der verwendeten Sequenzier-Primer.

```
5'.....  
2081 GAGTCGGCGA CACAGTGTGG GTCCGCCGAC ACCAGACTAA GAACCTAGAA  
2131 CCTCGCTGGA AAGGACCTTA CACAGTCCTC CTGACCACCC CCACCGCCCT  
pEYZ-FOR  
2181 CAAAGTAGAC GGCATCGCAG CTTGGATACA CGCCGCCCAC GTGAAGGCTG  
CFG-PSI  
2231 CCGACCCCGG GGGTGGACCA TCCTCTAGAG AATTCAATAT TAAATGGAT  
SwaI BamH I
```

2281 CCGGACTACA AGGACGACGA TGACAAGTAA GCGCGCCAG ATCCCCCTCT  
2331 CCCTCCCCC CCCTAACGT TACTGGCCGA AGCCGCTTGG AATAAGGCCG  
CFG-IRES-REV  
2381 GTGTGCGTTT GTCTATATGT TATTTTCCAC CATATTGCCG TCTTTTGGCA  
pEYZ-Rev  
2431 ATGTGAGGGC CCGGAAACCT GGCCCTGTCT TCTTGACGAG CATTCTAGG.....3'

## **DANKSAGUNG**

Diese Arbeit entstand im Institut für Pathologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink, in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. A. Greiner. Ihm möchte ich danken für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Begleitung und Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. H. Girschick danke ich sehr für die Übernahme des Korreferats.

Ganz besonders möchte ich mich bei C. Wahlen bedanken, die mich mit unendlicher Geduld in die Methoden der Molekularbiologie eingearbeitet hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und auch für ihre Freundschaft. Zudem gilt mein Dank allen anderen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der „AG Greiner“, die viele Fragen klärten und mich jederzeit hilfsbereit unterstützten: Dr. H. Seeberger, M. Reichert, Ch. Amrehn und Dr. M. Andrulis. Danken möchte ich auch allen weiteren Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

M. Herold, Ch. Kraus und Priv.-Doz. Dr. I. Berberich des Virologischen Institutes der Universität Würzburg sei ebenfalls sehr gedankt für die Transfektion und Infektion der Versuchszellen, sowie ihre vielfältigen Tipps und Überlegungen zur Methodik und Problemlösung.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Freunde, die mich stets unterstützt und aufgemuntert haben, und besonders an meine Familie für ihren Rückhalt und ihr Vertrauen.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Angaben

Name Ariane Maike Steinert  
Geburtsdatum 09. Mai 1977  
Geburtsort Schluchsee

## Schul Ausbildung

1983-1987 Grundschule Schluchsee  
1987-1996 Kreisgymnasium Hochschwarzwald, Titisee-Neustadt  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
  
1996-1997 12 Monate AuPair in Milwaukee, Wisconsin, USA

## Studium

1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
04/2000 ärztliche Vorprüfung  
05-10/2000 Aufenthalt in Brasilien, davon drei Monate Famulatur (Hospital e Maternidade Santa Maria in Araripina, Pernambuco), anschließend Projektbesuche und Reise  
10/2000 Fortführung des Medizinstudiums in Würzburg  
08/2001 Erstes Staatsexamen  
03/2004 Zweites Staatsexamen  
04/2004-04/2005 Praktisches Jahr:  
Tertial Innere Medizin in der Ninewells Medical School, Dundee, Schottland, und im Missionsärztlichen Institut, Würzburg  
Tertial Gynäkologie (Wahlfach) im Oberwalliser Spitalzentrum Visp/Brig, Schweiz  
Tertial Chirurgie in der Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasilien  
06/2005 Drittes Staatsexamen

### **Kongressbeitrag**

Posterpräsentation auf dem Promomed Kongress Würzburg am 30.11.2002:

A. Steinert, C. Heitzig, M. Andrulis, H. Seeberger, I. Berberich, P. Starostik, H. K. Müller-Hermelink, A. Greiner: „Etablierung eines Vektorkonstruktes zur Erforschung der Pathogenese t(11;18)-positiver MALT-Typ Lymphome“

Verleihung des ersten Preises der Jury für Posterbeiträge.

*Aniane Herberich*