

Aus dem Pathologischen Institut

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H.K. Müller-Hermelink

**BLIMP1 Expression in
diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Mindaugas Andrulis

aus Litauen

Würzburg, Oktober 2005

Referent: Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink

Koreferent: Prof. Dr. A. Greiner

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2006

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Einordnung und Charakteristika der diffusen großzelligen B Zell Lymphome	1
1.2. Genomische Instabilität und Pathogenese der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome des Magens	2
1.3. BLIMP1 als Tumor Suppressor Gen	4
1.4. Aufgabenstellung	6
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1. Untersuchungsmaterial	7
2.1.1. Primäres Lymphommaterial	7
2.1.2. Primärzellen	7
2.1.3. Zelllinien	8
2.2. Untersuchungsmethoden	8
2.2.1. Herstellung eines Tissue Microarray (TMA) Blocks	8
2.2.2. Herstellung des polyklonalen anti-BLIMP1 Antikörpers	8
2.2.3. Paraffin Immunperoxidase Färbung	8
2.2.4. Immunfluoreszenz Färbung	9
2.2.5. Mutationsanalyse	9
2.2.6. Isoforme Quantifizierung der BLIMP1 mRNA	10
3. ERGEBNISSE	10
3.1. Expression von BLIMP1 im normalen humanen lymphatischen Gewebe	10
3.2. BLIMP1 Expression in DLBCL	14
3.3. Chromosom 6q Aberrationen und BLIMP1 Mutationsanalyse	19
3.4. Expression von BLIMP1 Isoformen	22
4. DISKUSSION	24

5. SCHLUSSFOLGERUNG	28
6. ZUSAMMENFASSUNG	29
7. SUMMARY	31
8. ANHANG	32
8.1. Abkürzungen	32
8.2. Molekularbiologische Methoden	33
8.2.1. RNA/DNA-Isolation aus Zellen und gefrorenem Gewebe	33
8.2.2. RNA-Gel	33
8.2.3. Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA	34
8.2.4. Synthese von cDNA	34
8.2.5. Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) - Ansatz mit cDNA als Template	35
8.2.6. GAPDH - PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese	35
8.2.7. Agarose-Gelelektrophorese zur PCR Produkt Analyse	35
8.2.8. Reinigung von DNA aus Agarose	36
8.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten	36
8.2.10. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli	36
8.2.11. Kultivierung von prokaryontischen Zellen	37
8.2.12. Minipräparation von Plasmid-DNA aus E. coli	37
8.2.13. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	37
8.2.14. Sequenzierung	37
8.2.15. RNase Protection	38
8.3. Zellbiologische Methoden	39
8.3.1. Zellzahlbestimmung nach Neubauer	39
8.3.2. Gewinnung von Primärzellen aus Frischgewebe	39
8.3.3. Zellkulturarbeiten	39
8.4. Proteinchemische Methoden	40
8.4.1. Gesamtproteinaufschluss	40
8.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	40
8.4.3. SDS-Polyacrylamidgel	41
8.4.4. Western-Blot	41
8.4.5. Western-Blot-Hybridisierung mit Primärantikörpern und Chemilumineszent Detektion	42

8.5.	Chemikalien und Geräte	43
8.5.1.	Bakterienstämme	43
8.5.2.	Primer und Oligonukleotide	43
8.5.3.	Antikörper	45
8.5.3.1.	Antikörper für immunhistochemische Färbungen	45
8.5.3.2.	Antikörper zur Zelldepletion	45
8.5.4.	Geräte und Verbrauchsmaterial	46
8.5.5.	Chemikalien und Reaktionssysteme	48
8.5.6.	Allgemeine Puffer und Lösungen	51
8.5.7.	Nährmedien für Bakterien	52
8.5.8.	Nährmedien für eukaryontische Zellen	53
8.5.9.	Größenstandard	53
9.	LITERATURVERZEICHNIS	54

1. EINLEITUNG

1.1. ***Einordnung und Charakteristika der diffusen großzelligen B Zell Lymphome***

Diffuse großzellige B-Zell Lymphome (im nachfolgenden DLBCL genannt) sind hoch proliferierende Tumoren (daher die Bezeichnung „hochmaligne“ nach der alten Kiel-Klassifikation¹) und sind mit etwa 30-40% die größte Gruppe der malignen Non-Hodgkin Lymphome. DLBCL sind allerdings klinisch, morphologisch und molekular heterogen. DLBCLs entstehen nicht nur in Lymphknoten (LK) (so genannte nodale DLBCL) sondern treten auch primär außerhalb des LKs, vor allem in der Magenschleimhaut, auf (extranodale DLBCL). Die extranodalen DLBCLs haben eine bessere Prognose als nodale und weisen vermutlich häufiger als nodale Fälle eine sekretorische Differenzierung auf. In der gegenwärtigen WHO Klassifizierung² sind vier morphologische DLBCL Subtypen definiert (zentroblastisch- polymorph, monomorph, multilobuliert und immunoblastisch), jedoch fand diese Subgruppierung bislang kein klinisches Korrelat. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass nodale DLBCL entsprechend ihrem Genexpressionsmuster in drei biologisch und prognostisch unterschiedliche Typen unterteilt werden können^{3,4}. Die erste Gruppe (GCB-Typ) hat ein den Keimzentrums (GC) B-Zellen ähnliches Genexpressionsmuster und ist durch eine Expression u.a. von CD10 und BCL6 als typisches Merkmal von Keimzentrums-B-Zellen gekennzeichnet. Diese Lymphome haben eine bessere Prognose als die beiden anderen Untergruppen der DLBCL. GCB Lymphome entsprechen damit normalen Keimzentrums-B-Zellen, die im hochproliferierenden zentroblastischen Entwicklungsstadium durch genomische Aberrationen blockiert sind. Hier spielt BCL6 eine wichtige Rolle. BCL6 ist in etwa einem Drittel der DLBCL Fälle durch chromosomale Aberrationen^{5,6} oder Mutationen⁷ dysreguliert und überexprimiert. Der zweite, „aktivierte B-Zell Typ“ (ABC-Typ) des DLBCL weist ein den in-vitro-aktivierten normalen B-Zellen ähnliches Genexpressionmuster auf und ist durch konstitutive NF-kappa-B Aktivierung und MUM1-Überexpression gekennzeichnet.³ Der ABC-Typ und die sogenannten Typ III Lymphome, die keine typischen Genexpressionsmuster aufweisen, haben eine ähnliche Prognose und sind deswegen

zusammen auch als Non-GCB-Typ definierbar.^{3,4} Kürzlich konnte die Genexpressionsbasierte Typisierung von DLBCL auch durch Immunhistologie reproduziert werden.⁴

Die Störung der terminalen (sekretorischen) B-Zellen Reifung spielt eine erhebliche Rolle in der DLBCL Entwicklung, wobei die entsprechenden molekularen Mechanismen größtenteils unbekannt sind.⁸ Darüber hinaus bestehen Hinweise, dass einzelne Transkriptionsfaktoren, die auch die normale B-Zell Differenzierung leiten, in DLBCL Zellen durch genomische Aberrationen dysreguliert sind und damit zur Lymphomentstehung beitragen. Interessanterweise lässt sich in einem Teil der DLBCL eine ausgeprägte sekretorische Reifung zusammen mit einer hohen Proliferation in den Tumorzellen erkennen,^{9,10} wobei die molekularen Mechanismen und die klinische Bedeutung der sekretorischen Differenzierung in DLBCL bislang nicht ausführlich untersucht wurden.

1.2. Genomische Instabilität und Pathogenese der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome des Magens

Etwa 40% der DLBCL entstehen extranodal und hierbei in erster Linie im Magen¹¹. Sie unterscheiden sich molekular und in ihrem klinischen Verhalten von nodalen DLBCL und von anderen aus extranodalen Primärlokalisationen stammenden DLBCL (z.B. mediastinal, zerebral). Gastrale DLBCL können im Rahmen einer de-novo-Transformation entstehen (*primär hochmaligne*) oder sich aus Marginalzonen B-Zell Lymphomen (MZBCL) vom MALT-Typ als sekundär hochmaligne¹² DLBCL durch Tumorprogression entwickeln. In etwa 30 % der hochmalignen Magenlymphome finden sich am Rande des Haupttumors oder in seltenen Fällen auch außerhalb Anteile eines MZBCL vom MALT-Typ. In diesen Bereichen lässt sich nicht selten neben der folliculären Kolonisierung der Keimzentren durch die Tumorzellen auch eine blastäre Transformation und Infiltration der Follikelregion erkennen. Zytologisch weisen die Tumorzellen ein Spektrum B-lymphozytärer Blasten auf, mit unterschiedlichen Anteilen von Zentroblasten, Immunoblasten, Plasmoblasten und polymorphen Zellformen mit meist deutlich basophilem Zytoplasma. Allerdings trifft dieses Progressionsmodell sicher nur für einen Teil der Fälle zu, da sich die niedrigmalignen und hochmalignen Tumoranteile bei einem Patienten aus unterschiedlichen primären

Tumorzellklonen entwickeln können. Diese morphologischen Beobachtungen konnten in jüngster Zeit durch molekulare Untersuchungen zur Klonalität weiter objektiviert werden.¹³⁻¹⁶ Die Entwicklung eines gastralen DLBCL aus einem Lymphom vom MALT-Typ wird nach bisherigen Untersuchungen von verschiedenen offenbar akkumulierenden genomischen Aberrationen begleitet. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der so genannte „Tumor suppressor pathway“ für die Entwicklung dieser Tumore wichtig ist¹⁷. Dabei handelt es sich um die Inaktivierung von verschiedenen Tumorsuppressorgenen (TSG) durch Deletionen, Allelverluste, Mutationen oder Splicing-Varianten, die durch „loss of function“ zur Tumorentstehung beitragen.^{17,18} Chromosomale Instabilitäten bei DLBCL des Magens finden sich überwiegend als Genamplifikation auf Chromosom 3 und 11 und Allelverluste (Loss of Heterozygosity, LOH) auf Chromosom 5, 6, 17 und 18 gekennzeichnet. LOH auf Chromosombereich 6q21 ist in etwa 23-32% der Fälle nachweisbar und damit die häufigste genomische Alteration¹⁷. Obwohl 6q21 Aberrationen in vielen soliden¹⁹⁻²⁵ und hämatopoetischen²⁶⁻²⁹ Tumoren beschrieben wurden, deuten mehrere Arbeiten auf einen bestimmten Genomabschnitt hin, der offensichtlich für bislang nicht weiter charakterisierte Tumorsuppressorgene kodiert und für die Tumorphagenese von malignen Lymphomen wichtig zu sein scheint. Durch Vergleich von mehreren Studien²⁶⁻²⁹, die mit Mikrosatellitenanalysen Aberrationen auf 6q21 untersucht haben, konnten wir den betreffenden Genbereich weiter einengen. Die minimale Überlappungsregion ist etwa 32,6 Mb groß und enthält etwa 200 verschiedene Gene. Mindestens fünf hiervon sind putative TSG (HADC2; APGL; AIM1; PA26; PRDM1/BLIMP1), die hinsichtlich Ihrer Funktion bei diesen Lymphomen bislang jedoch noch nicht detailliert untersucht wurden.

1.3. **BLIMP1 als Tumor Suppressor Gen**

PRDM1 kodiert den Transkriptionsfaktor BLIMP1 (B-lymphocyte induced maturation protein 1) und ist das einzige Gen auf 6q21, dessen Funktion bei der B-Zell Entwicklung kürzlich beschrieben wurde. Der Transkriptionsfaktor BLIMP1 ist in der Lage, sowohl in der Maus-Tumorzelllinie BCL₁ (*B-cell Lymphoma 1*)^{30,31} als auch in primären B-Zellen aus der Mäusemilz³² die terminale Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen einzuleiten³³. In mehreren *Microarray*-Studien konnte zudem gezeigt werden, dass BLIMP1 über 200 Gene reprimiert und ca. 30 Gene induziert³⁴. Es handelt sich dabei im allgemeinen um Transkriptionsfaktoren, die allesamt während der B-Zellentwicklung eine wichtige Rolle spielen. BLIMP1 ist in Keimzentrums B-Zellen durch BCL6 reprimiert³⁵ und wird erst nach der Antigenrezeptorstimulation hochreguliert und dirigiert als negativer Regulator der Transkription ein komplexes Genexpressionsprogramm^{31,34}, das zu einem Zellzyklusarrest, einer Zellphänotypänderung und zu einer Antikörpersekretion führt^{36,37}. Im speziellen wurden bislang fünf Zielgene von BLIMP1 beschrieben (c-myc³⁸, CIITA³⁹, PAX5⁴⁰, SpiB und Id3³⁴), die unmittelbar reprimiert werden können.

Die Familie der PRDM-Gene (*positive regulatory domain*) besteht aus drei Mitgliedern, nämlich PRDM1 (BLIMP1), -2 (RIZ) und -3 (MDS1-EVI1). Bei ihren Genprodukten handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, deren Proteinprodukte sich durch fünf DNA-bindende Zinkfinger vom *Krüppel-C₂H₂*-Typ auszeichnen³⁰ sowie durch eine etwa 100 Aminosäuren (aa) lange prolinreiche PR-Domäne, die eine Untergruppe der Su(var)3-9, E(z) and Trithorax(SET)-Domäne darstellt. Für alle drei Mitglieder der PRDM Familie konnten jeweils zwei verschiedene Isoformen gezeigt werden, die sich durch Anwesenheit bzw. Abwesenheit der PR-Domäne unterscheiden⁴¹⁻⁴³. Die kurze Isoform wird von einer zweiten Promotorregion abgelesen und wird mit unvollständiger PR-Domäne exprimiert. Die genaue Funktion der PR-Domäne ist zur Zeit noch unbekannt, jedoch wird vermutet, dass alle PRDM Isoformen mit unvollständiger PR-Domäne einen signifikanten Verlust ihrer transkriptionellen Repressionsfunktion aufweisen. PRDM2 und -3 sind als humane TSG gut etabliert, da sie durch Überexpression der kürzeren Isoform ursächlich an der Pathogenese der AML-M1/2 Leukämie⁴³⁻⁴⁵ und unterschiedlicher Karzinome^{46,47} beteiligt sind. Für das

humane BLIMP1 konnten kürzlich auch zwei verschiedene Isoformen nachgewiesen werden, nämlich PRDM1 α sowie PRDM1 β , eine kurze Variante, die eine unvollständige PR-Domäne besitzt, da Exon 2 und 3, die einen Teil der PR Domäne kodieren, in dieser Isoform nicht enthalten sind (Abbildung 1).

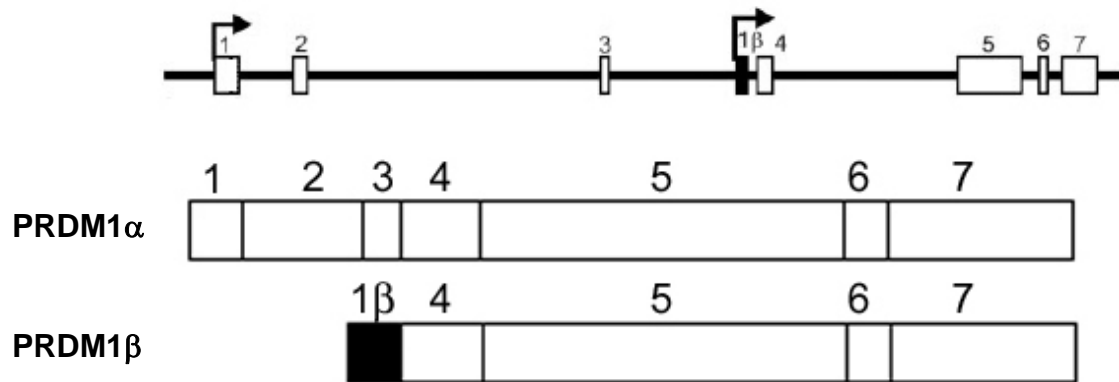


Abbildung 1. Genomische Struktur von PRDM1 (oberstes Schema) und der exprimierten mRNA-Isoformen PRDM1 α / β (untere Schemata). Gezählte offene Kästchen entsprechen den Exonen. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsanfangsstellen. Exon 1 β ist schwarz gekennzeichnet und kommt nur in PRDM1 β vor.

Kürzlich wurde die differenzielle BLIMP1 Isoformexpression als vermutlicher Mechanismus in der Pathogenese humaner multipler Myelome vorgeschlagen.⁴¹ Diese Hypothese basierte jedoch auf den Daten, die aus Untersuchungen an Zelllinien in-vitro entstanden. Primäres lymphatisches Normalgewebe sowie Tumorgewebe wurden hinsichtlich dieser Fragestellung bislang nicht untersucht. Zusätzlich ist seit kurzem bekannt, dass BLIMP1 durch Mutationen in humanen DLBCL inaktiviert werden kann⁴⁸, die Bedeutung dieser Vorgänge ist jedoch für die Lymphomentwicklung unbekannt.

1.4. Aufgabenstellung

Trotz der bislang vorliegenden Einzeluntersuchungen zu BLIMP1, die überwiegend in Mausmodellen oder in in-vitro Experimenten entstanden sind, ist immer noch wenig über die Rolle von BLIMP1 in der normalen humanen B-Zellentwicklung in-vivo bekannt. Außerdem gibt es keine ausführlichen Arbeiten über die Bedeutung von BLIMP1 in der Pathogenese humaner maligner Lymphome. Das Ziel dieser Arbeit war daher, die BLIMP1 Expression im humanen lymphatischen Normalgewebe und in einer großen Serie morphologisch, klinisch und molekular charakterisierter nodaler und extranodaler (gastraler) B-Zell Lymphome zu untersuchen. Somit sollte mit dieser Arbeit ein besseres Verständnis der BLIMP1 Rolle nicht nur in der normalen B-Zell-Reifung sondern auch in den Reifungsstörungen und der sekretorischen Differenzierung in DLBCL gewonnen werden. Zusätzlich wurde hierbei untersucht, ob es Beweise gibt für eine BLIMP1 Inaktivierung in DLBCL durch bedeutende Inaktivierungsmechanismen, die bei Tumorsuppressorgenen allgemein beschrieben wurden (wie z.B. Mutationen, alternative splice Varianten).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. *Untersuchungsmaterial*

2.1.1. Primäres Lymphommaterial

Untersucht wurden 78 DLBCL Tumoren (davon 19 extranodale) aus dem Konsultationszentrum für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg. Von allen Fällen stand formalinfixiertes Paraffinmaterial und tiefgefrorenes Frischmaterial zur Verfügung. Die Diagnose wurde entsprechend den Kriterien der WHO-Klassifikation² gestellt und alle Fälle wurden als DLBCL diagnostiziert. Darüber hinaus waren die klinischen Daten und Daten von klassischen zytogenetischen Voruntersuchungen bekannt. Außerdem war das Genexpressionsmuster für 30 Fälle, die im Rahmen des Lymphoma Leukemia Molecular Profiling Project (LLMPP) untersucht wurden, bekannt.

2.1.2. Primärzellen

Primäre B Zellen wurden aus den humanen Tonsillen isoliert und in naive B-, Keimzentrums-, Gedächtnis- und Plasmazell-Populationen getrennt. Das Tonsillengewebe von gesunden Spendern wurde durch sterile Siebe gedrückt. Makrophagen und T-Zellen wurden über an magnetische Beads direkt gekoppelte anti-CD14 und anti-CD2 Antikörper entfernt. Plasmazellen (CD138⁺) wurden durch an anti-CD138 gekoppelte Beads aus der resultierenden Zellsuspension gereinigt. Keimzentrumszellen (CD38⁺) wurden dann mit anti-CD38 Antikörper gekoppelten magnetischen Beads nachgetrennt. Die CD38⁻ B-Zellen wurden in naive (IgD⁺) B-Zellen und Gedächtnis- (IgD⁻) Zellfraktionen mit anti-IgD Antikörper gekoppelten magnetischen Beads aufgetrennt. Allgemein wurde jede Zelltrennung mit FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorter) überprüft und erst dann weiterverarbeitet, wenn die Reinheit bei über 95% in jeder Zellpopulation lag.

2.1.3. Zelllinien

Zelllinie	Tumor Typ nach WHO	Literatur
NCJ-H929	Myelom	49
L636	Myelom	50

Tabelle 1. Untersuchte Zelllinien.

2.2. Untersuchungsmethoden

2.2.1. Herstellung eines Tissue Microarray (TMA) Blocks

Aus dem Paraffinblock mit primärem Lymphommaterial wurden jeweils fünf 0.6µm Stanzen mit einem sogenannten Tissue-arrayer herausgestanzt und dann in einen neuen Rezipientenblock eingebettet. Von einem TMA-Block wurden anschließend 100 Serienschnitte hergestellt, der erste und letzte Schnitt wurde jeweils zur Qualitätskontrolle mit H&E und Ki67 gefärbt. Die Stanzen, bei denen das Gewebe im ersten und letzten Schnitt nicht gleich aussah oder bei denen die Immunreaktivität für Ki67 nicht auswertbar war, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

2.2.2. Herstellung des polyklonalen anti-BLIMP1 Antikörpers

Polyklonale affinitätsgereinigte anti-BLIMP1 Antikörper wurden im wesentlichen von PD. HM Jäck (Erlangen, Division of Molecular Immunology; Nikolaus-Fiebiger Center; Glückstraße 6; D-91054 Erlangen) generiert. Im speziellen wurde das c-terminale Ende 1-350bp von murinem BLIMP1 als Fusionsprotein mit einem His-GST Tag in einem prokaryotischen Expressionsvektor kloniert und in E. colis BL21 exprimiert. Danach wurden die Zellen in 6M Guanidin-Hydrochlorid, 100mM NaH₂PO₄ und 10mM Tris-HCl pH 8.0 lysiert und das Fusionsprotein mit Ni-NTA Agarosebeads gereinigt. Reines Protein wurde danach als Immunogen verwendet. Die Kaninchen Immunisierung wurde von Pineda Antikörperservice durchgeführt.

2.2.3. Paraffin Immunperoxidase Färbung

Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und durch eine Alkoholverdünnungsreihe rehydriert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase

wurden die Schnitte 10 min mit 30% Peroxyd behandelt und anschließend das so genannte „Heat Induced Epitope Retrieval“^{4,51,52} mit 1mM pH8.0 EDTA 5min im Schnellkochtopf durchgeführt. Die Schnitte wurden dann mit entsprechend verdünnten Primärantikörpern eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 5min in PBS gewaschen. Die Immunperoxidase-basierte Detektion wurde mit LSAB2 Kit (DakoCytomation, Hamburg) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. LSAB2 Kit verwendet das Streptavidin-Avidin-basierte Detektionssystem mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) als Chromogen.

2.2.4. Immunfluoreszenz Färbung

Nach der Entparaffinierung und Rehydratation (wie oben beschrieben) wurde das Präparat mit 10%-igem Esel-Serum inkubiert, um unspezifische Antigen-Epitope zu neutralisieren. Daraufhin wurde es mit den spezifischen Primärantikörpern in jeweils entsprechender Verdünnung für den Zeitraum einer Stunde überschichtet und dann in einer Färbungsküvette mit 1xPBS 3 x für jeweils 5 min gewaschen. Im Anschluss daran wurde der Gewebeschnitt mit den an die Fluorochrom-gekoppelten (FITC, Cy3 und Cy5) sekundären Antikörpern aus dem Esel in einer Verdünnung von 1:100 für eine weitere Stunde inkubiert. Daran schlossen sich erneut drei Waschschrte mit 1xPBS für 5 min an, bevor die Präparate mit Fluoromount G bedeckt wurden, welches das Ausbleichen der Fluorochrome verlangsamt. Abschließend wurden die Präparate mit Hilfe des konfokalen Mikroskops Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg) mit der zum Mikroskop gehörenden Confocal Software zur graphischen Darstellung gebracht.

2.2.5. Mutationsanalyse

RNA und genomische DNA wurden aus dem Gefriermaterial oder ca. 1×10^7 Gewebekulturzellen mit TRIZOL[®] (GIBCO BRL, Eggenstein) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Daraufhin folgte eine cDNA-Synthese, eine PCR-basierte BLIMP1 Klonierung sowie eine Sequenzierung (eine genauere Vorgehensweise befindet sich im Anhang).

2.2.6. Isoforme Quantifizierung der BLIMP1 mRNA

Zur isoformen Quantifizierung der BLIMP1 mRNA wurde das *RNAse Protection Assay* eingesetzt. Zur Vorbereitung der RNA-Probe wurde die 57-385bp von BLIMP1 β (insgesamt 329bp) mittels PCR amplifiziert und im pGEM-T-Easy Vektor kloniert. Danach wurde der Klon mit der richtigen Sequenzorientierung durch die MiniprÄp-Sequenzierung gefunden und überprüft. Anschließend wurde das DNA-Konstrukt mit dem Sall Restriktionsenzym linearisiert, durch die Agarosegel-Elektrophorese gereinigt und als template zur in-vitro Transkription verwendet. Die in-vitro Transkription erfolgte durch die T7 RNA-Polymerase. Schließlich wurde die neu syntheseierte RNA-Probe durch Polyacrylamid Gelelektrophorese gereinigt und mit Polynucleotid Kinase und ^{32}P - γ UTP radioaktiv markiert. Für die RNAse-Protektions-Analyse wurden das Reaktionssystem RiboQuant sowie das Protokoll der Firma BD PharMingen verwendet. Die „protected RNA“- Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Phosphor-Imagers.

3. ERGEBNISSE

3.1. Expression von BLIMP1 im normalen humanen lymphatischen Gewebe

Zumindest in der Maus ist bekannt, dass BLIMP1 in Plasmazellen und einem Teil der Lymphozyten im Keimzentrum des reaktiven lymphatischen Gewebes exprimiert wird.³⁶ Unbekannt ist jedoch das genaue Expressions- und Differenzierungsprofil im humanen Gewebe sowie die Frage nach der Expression in malignen Lymphomen. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit der AG HM Jäck (Erlangen) ein polyklonaler Antikörper gegen Maus BLIMP1 hergestellt. Zur Immunisierung wurde das Peptid aus dem BLIMP1 Protein der Maus, das eine hohe Homologie zum humanen BLIMP1 aufweist, verwendet. (Abbildung 2A). Eine Reaktivität mit dem humanen Gewebe und eine Spezifität der polyklonalen Antikörper wurde danach im Western-Blot und mittels Immunhistochemie abgesichert (Abbildung 2 B und C).

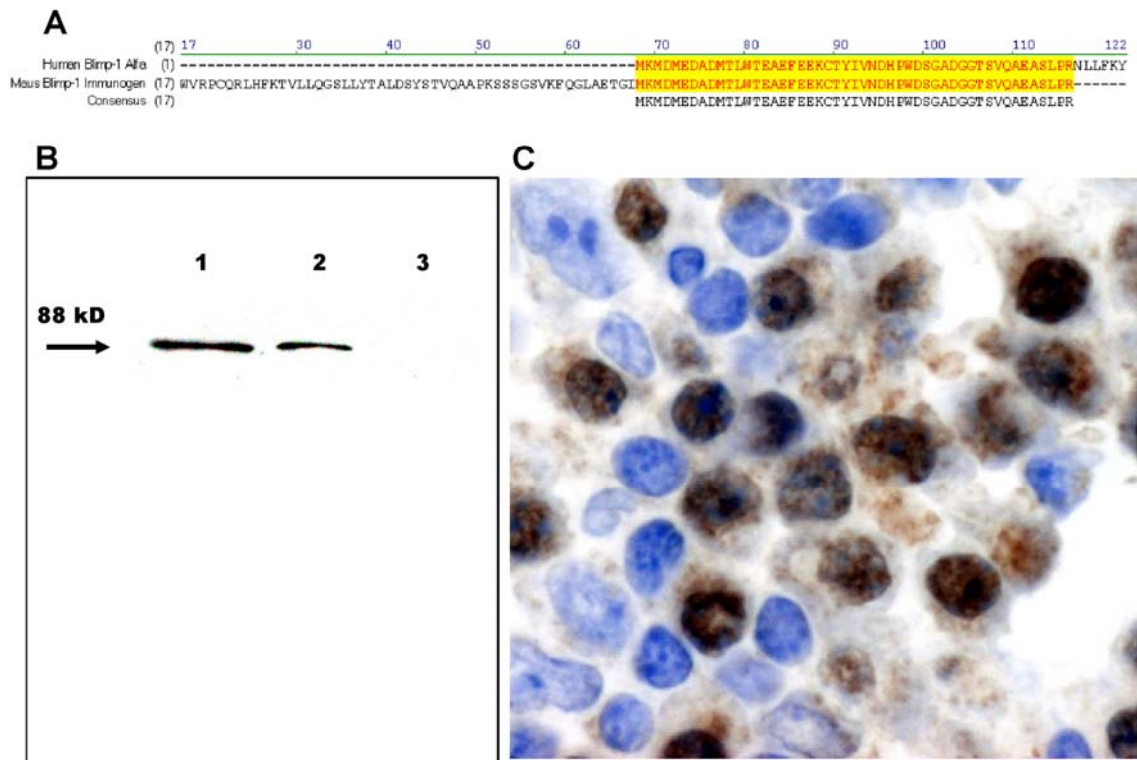


Abbildung 2. Polyklonale anti-Maus-BLIMP1 AK erkennen das spezifische humane BLIMP1 Protein. (A) Sequenzvergleich zwischen dem Maus-BLIMP1 Peptid, das als Immunogen verwendet wurde, und dem humanen BLIMP1. Die homologe Region ist gelb dargestellt. (B) Der BLIMP1 AK erkennt ein 88kDa Protein in Proteinextrakten aus reaktivem Tonsillengewebe (Spur 1) sowie in beads aufgereinigte Lymphozyten desselben Gewebes (Spur 2) im Western-Blot, nicht aber im Tumormaterial eines immunhistochemisch BLIMP1 negativen gastralen Lymphoms (Spur 3). (C) Paraffinschnitt aus der normalen humanen Tonsille mit reifen Plasmazellen, die eine ausgeprägte immunhistochemische Kernfärbung mit dem BLIMP1 Antikörper zeigen (400x).

Eine BLIMP1 Expression konnte in der normalen menschlichen Tonsille in drei verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden: 1) in reifen Plasmazellen vom Marschalko-Typ, wie sie z.B. überwiegend subepithelial in Tonsillen auftreten; 2) in einem Teil plasmazellulär differenzierter Keimzentrums B-Zellen, die in der nicht-proliferierenden hellen Zone lokalisiert waren; und 3) in extrafollikulären großen B-Immunoblasten und Plasmoblasten (im nachfolgenden extrafollikuläre große B-Zellen „EGBZ“ genannt), die vor kurzem beschrieben wurden⁵³. Eine weitergehende Phänotypisierung von BLIMP1 positiven Zellen erfolgte durch eine Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. Alle BLIMP1⁺ Zellen waren auch MUM1⁺ und nur einzelne MUM1⁺ Keimzentrumszellen waren BLIMP1 negativ. Die reifen Plasmazellen vom Marschalko-Typ waren CD138⁺CD20⁻MUM1⁺Ki67⁻BCL6⁻PAX5⁻BLIMP1⁺. Die BLIMP1 positiven Keimzentrums B-Zellen und extrafollikulären großen B-Zellen haben dabei einen ähnlichen Immunphänotyp, jedoch waren diese beiden Zelltypen CD138⁻. Zusätzlich zeigten die Keimzentrums B-Zellen keine Ki67 Expression (Abbildung 3), jedoch eine starke p27 Expression (Abbildung 5), die die Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus darstellt. Im Gegensatz hierzu waren die BLIMP1⁺ EGBZ Ki67⁺p27⁻ (Abbildungen 3 und 5).

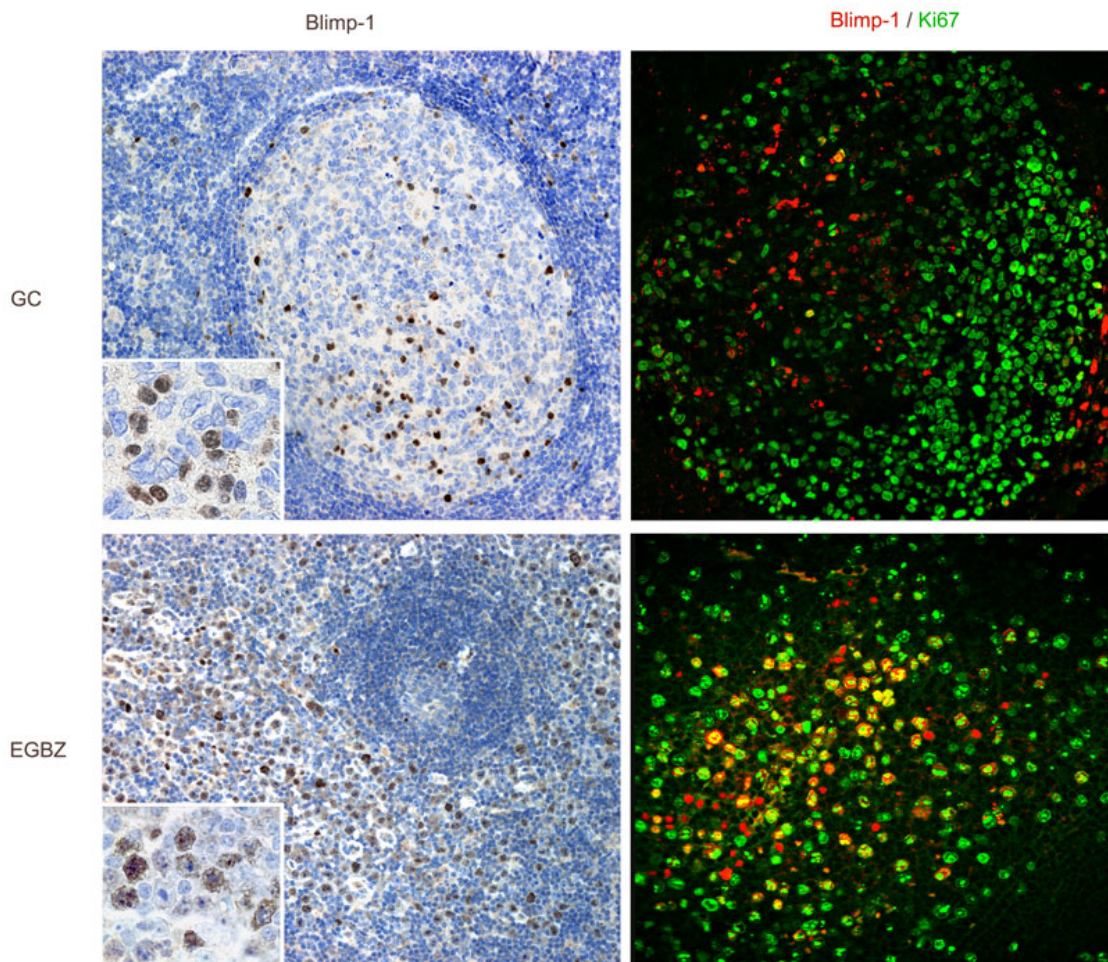


Abbildung 3. BLIMP1 Expression im normalen humanen Gewebe. BLIMP1 Immunperoxidase-Färbung (linke Spalte) und Doppelimmunfluoreszenzfärbung für BLIMP1(Cy3-Rot)/Ki67(Cy5-Grün) (rechte Spalte) auf Paraffinschnitten der normalen humanen Tonsille. Die Doppelimmunfluoreszenzbilder sind als Überlagerung dargestellt, so dass BLIMP1-exprimierende und sich teilende (Ki67⁺) Zellen in gelb erscheinen. Oben links: BLIMP1 ist in den Kernen der GC B-Zellen, die in der „hellen“ nicht proliferierenden GC-Zone lokalisiert sind, exprimiert. (100x). Insert: Morphologie der BLIMP1⁺ Zellen, die überwiegend kleinen Zentrozyten mit plasmazytischen Eigenschaften entsprechen. (400x). Oben rechts: Alle BLIMP1⁺ GC B-Zellen sind Ki67⁺. Unten links: BLIMP1 Expression in extrafollikulären großen B-Zellen (EGBZ). Insert: Morphologie der BLIMP1⁺ Zellen, die große Zentroblasten/Immunoblasten sind. Unten rechts: Fast alle BLIMP1⁺ EGBZ zeigen eine Ki67 Koexpression. (gelbe Überlagerung).

3.2. *BLIMP1 Expression in DLBCL*

Eine BLIMP1 Expression wurde in 19% (15/78) der DLBCL Fälle beobachtet (Cut-off lag bei 30% der BLIMP1 exprimierenden Tumorzellen, Tabelle 2, Abbildung 4). 8 von 15 BLIMP1⁺ DLBCL wurden auch in LLMPP untersucht. Eine BLIMP1 Expression wurde in ABC- (2/8) GCB-Lymphomen beobachtet, jedoch ließen sich die meisten (5/8) Fälle entsprechend ihres Genexpressionsmusters weder den ABC- noch den GCB-Lymphomen zuordnen und wurden daher als „unclassified“ eingestuft.

Alle DLBCL Fälle wurden auf eine Expression von CD10, BCL6, und MUM1 mittels Immunperoxidase- und Immunfluoreszenzfärbungen auf einem TMA (tissue microarray) simultan untersucht und entsprechend den Kriterien, die Hans et al. vorgeschlagen hat ⁴, in GCB- und Non-GCB- (weiter als ABC bezeichnet) Subtypen unterteilt. In diesen entsprechend der Hans Kriterien⁴ klassifizierten Fällen war eine BLIMP1 Expression im ABC- (7/15) und GCB- (8/15) Typ gleich häufig zu finden.

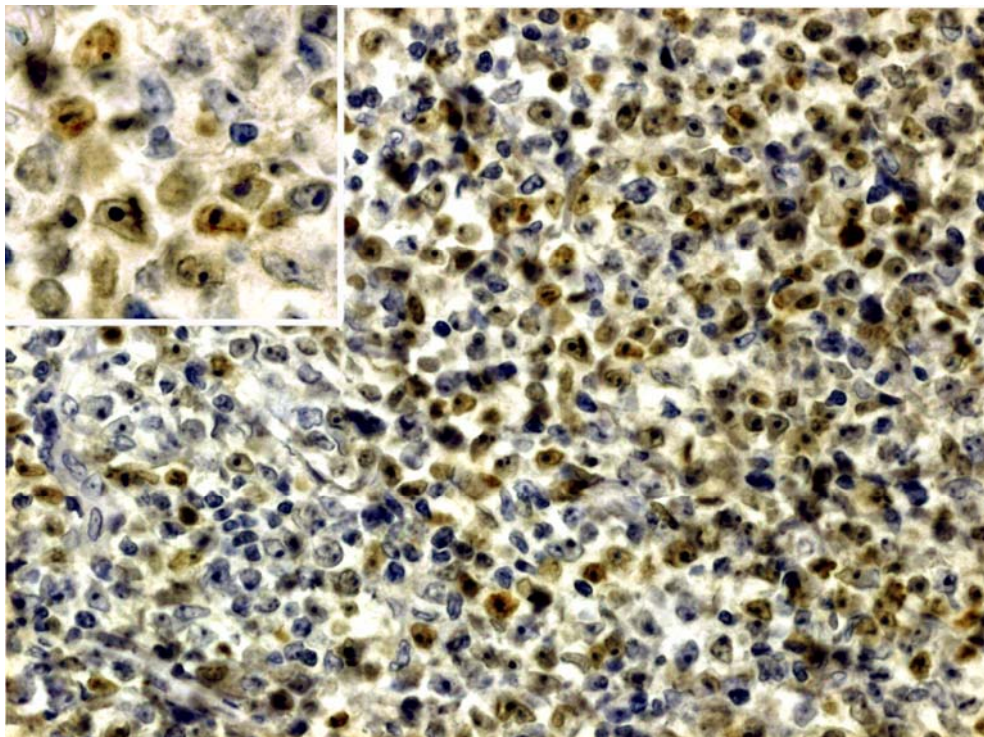


Abbildung 4. BLIMP1 Expression im DLBCL. BLIMP1 Immunperoxidase-Färbung auf Paraffinschnitten eines BLIMP1⁺ DLBCL Falles. Mehr als 30% der Tumorzellen exprimieren BLIMP1. Insert: Morphologisch entsprechen die BLIMP1⁺ Zellen großen Zentroblasten.

Nr.	Typ	BLIMP1 (%)	Diagnose	CD10	BCL6	MUM1	clg	bcl2	LLMPP Profil	IHC Profil	Chromosomale Aberrationen
1	A	30	CBpoly	-	-	+	-	+	n.u.	ABC	keine
2	A	80	EN	-	-	+	+	+	U	ABC	keine
3	A	30	EN	-	-	+	+	+	n.u.	ABC	+3
4	A	70	EN	-	-	+	+	-	U	ABC	keine
5	A	60	CBf/d	-	-	+	+	+	ABC	ABC	+3
6	A	30	CB f/d	-	-	+	-	+	n.u.	ABC	+3
7	A	40	CBmono	-	-	+	+	+	n.u.	ABC	keine
8	B	30	CBpoly	-	+	-	-	+	U	GCB	+5q
9	B	30	EN	-	+	-	-	-	GCB	GCB	keine
10	B	40	CBpoly	-	+	-	+	-	n.u.	GCB	+5q
11	B	30	CBmono	+	+	-	-	-	n.u.	GCB	+5q
12	B	30	CBmulti	-	+	-	+	-	U	GCB	+5q
13	C	30	CBf/d	+	+	+	-	-	U	GCB	t(3;14)
14	C	80	CBpoly	-	+	+	+	+	ABC	ABC	+3
15	C	50	CBmono	+	+	+	-	+	n.u.	GCB	+3q

Tabelle 2. Eigenschaften der BLIMP1⁺ DLBCL. Typ – Typ nach BLIMP1/BCL6/PAX5 Expressionsmuster; BLIMP1 (%) - Anteil (%) BLIMP1⁺ Tumorzellen; Diagnose, entsprechend den WHO-Kriterien: CBpoly-zentroblastisch polymorph; CBf/d – zentroblastisch follicular/diffuse; CBmono – zentroblastisch monomorph, CBmulti – zentroblastisch multilobuliert; EN – extranodal; LLMPP Profil – Genexpressionsmuster aus LLMPP³; IHC Profil – Lymphom-Typ nach Hans et al⁴. Hier sind nur chromosomale Aberrationen, die Chr3 und Chr5 betreffen, aufgelistet und „keine“ bedeutet lediglich, dass bei diesen Fällen Chr3 und Chr5 intakt waren.

Die weitergehende Phänotypisierung von BLIMP1 positiven Lymphomzellen erfolgte durch Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. Die Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass das BLIMP1⁺ DLBCL entsprechend dem BLIMP1, BCL6 und PAX5 Expressionsprofil in drei pathogenetisch unterschiedliche Typen unterteilt werden kann (Tabelle 3 und Abbildung 6). In den Typ A-Fällen waren die BLIMP1⁺ Tumorzellen ständig BCL6⁻/PAX⁻ (Abbildung 6; a und b) und diese Fälle waren alle vom ABC- Typ nach Hans (CD10⁻/BCL6⁻/MUM1⁺). Zusätzlich waren in den meisten Fällen BCL2 und cIg nachweisbar. Im Typ B-DLBCL waren die meisten Tumorzellen ständig BLIMP1⁻/BCL6⁺/PAX5⁺ und BLIMP1 war nur in relativ kleinen Arealen (100-200 Zellen) herdförmig exprimiert. Die BLIMP1⁺ Zellen zeigten kein BCL6 und PAX5. (Abbildung 6; c und d). Weiterhin war hier eine Expression von CD10, BCL2 und cIg in einzelnen Fällen nachweisbar, und alle Typ B-Fälle zeigten ein GCB-Profil (CD10⁺ oder BCL6⁺ und MUM1⁻). Eine Amplifikation von Chr5 war in allen nodalen Typ B-DLBCL zu finden (Tabelle 3). Die Typ C-Fälle waren durch eine gleichzeitige BLIMP1 und BCL6 und/oder PAX5 Expression gekennzeichnet, was einem aberranten und nicht in normalen B-Zellen auftretendem Immunphänotyp entspricht. Anzumerken ist, dass BCL6 in fast allen Tumorzellen mit BLIMP1 koexprimiert war, wobei BLIMP1⁺/PAX5⁺ Tumorzellen nur vereinzelt zu finden waren (Abbildung 6; e und f). Daraufhin waren die Aberrationen von Chr3, das das BCL6 Gen enthält, in allen Typ C-DLBCL nachweisbar (Tabelle 3).

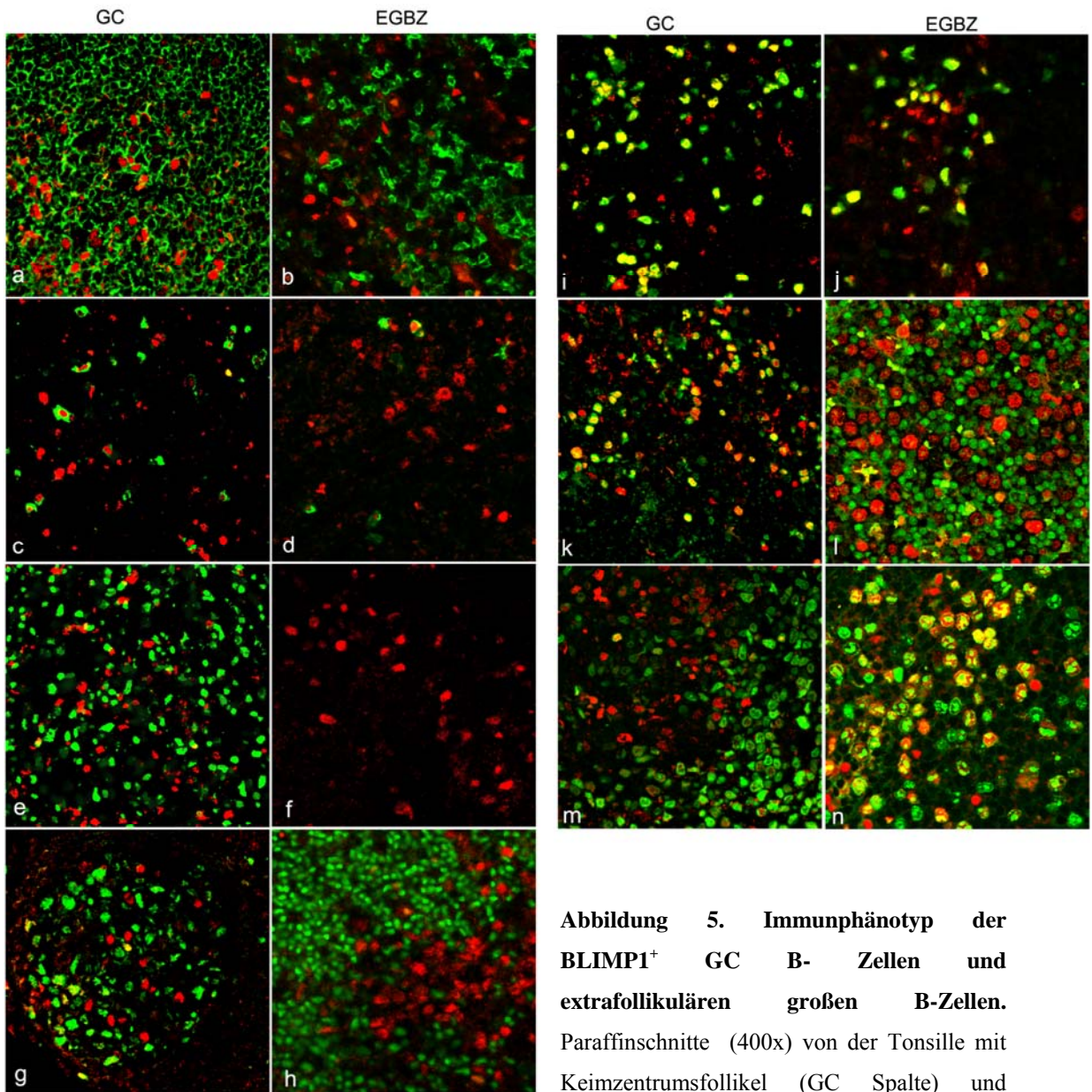


Abbildung 5. Immunphänotyp der BLIMP1⁺ GC B-Zellen und extrafollikulären großen B-Zellen.

Paraffinschnitte (400x) von der Tonsille mit Keimzentrumsfollikel (GC Spalte) und Abschnitte mit extrafollikulären großen B-Zellen (EGBZ Spalte) wurden in einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen BLIMP1 (Cy3-Rot) und CD20 (a; b), CD138 (c; d), BCL6 (e; f), PAX5 (g; h), MUM1 (i; j), p27 (k; l), Ki67 (m; n) (alle Cy5-Grün) gefärbt. Alle BLIMP1⁺ Zellen haben einen gemeinsamen CD138⁺BCL6⁺PAX5⁺MUM1⁺ Phänotyp. Im Gegensatz zu den GC B-Zellen sind fast alle BLIMP1⁺ EGZB B-Zellen CD20⁻/p27⁻ und Ki67⁺.

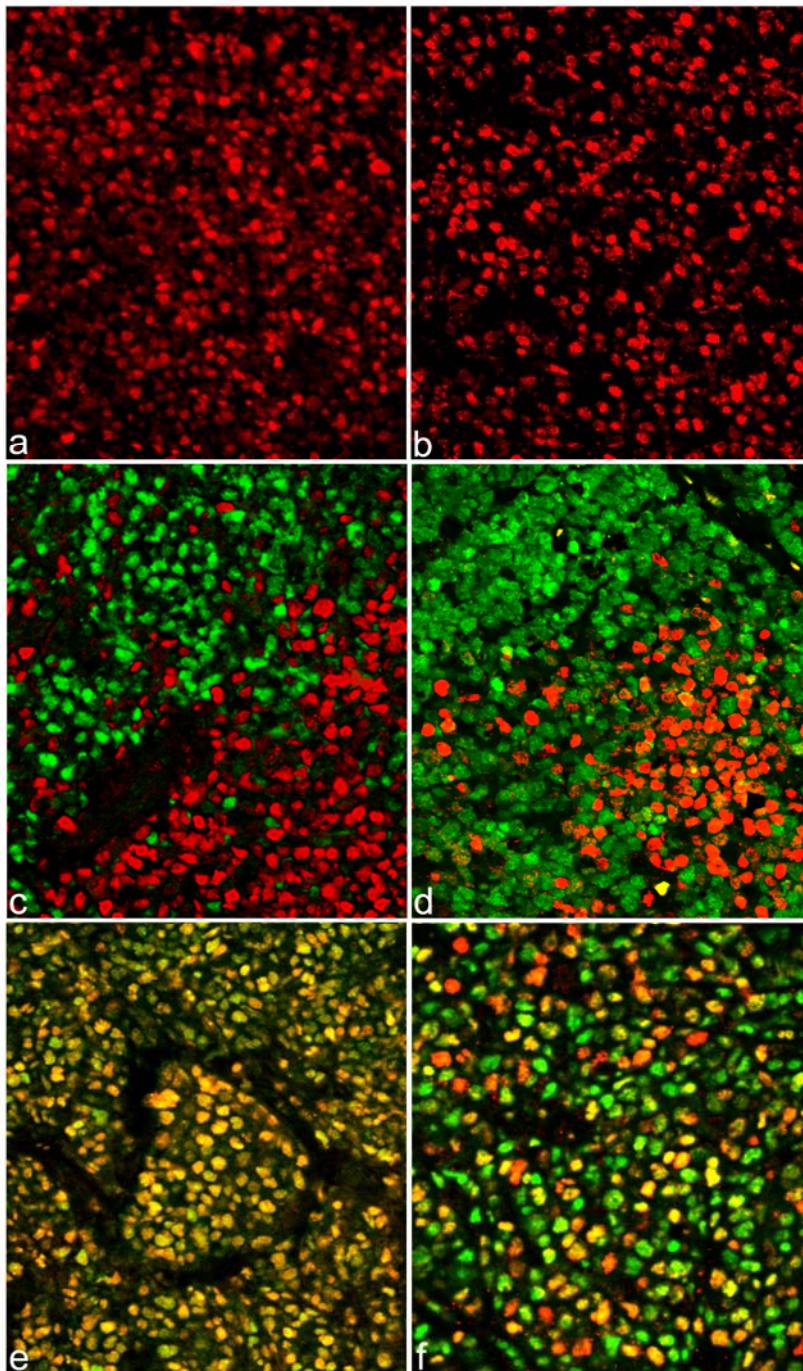


Abbildung 6. Drei pathogenetisch unterschiedliche BLIMP1⁺ DLBCL Typen. Paraffinschnitte (400x) eines DLBCL wurden in einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen BLIMP1 (Cy3-Rot) und BCL6 (a, c, e) oder PAX5 (b, d, f) (beide Cy5-grün) gefärbt. Typ A DLBCL - a und b; Typ B – b und c, Typ C – a und f (gelbe Überlagerung kennzeichnet die doppelt-positiven Tumorzellen).

3.3. Chromosom 6q Aberrationen und BLIMP1 Mutationsanalyse

Allelverluste/Deletionen vom Chromosom 6q, das das BLIMP1 kodierende Gen enthält, waren in 38% (29/78) nachweisbar. Eine BLIMP1 Expression war wesentlich häufiger in den DLBCL ohne 6q-Aberrationen zu finden (12/48), jedoch gab es Fälle, in denen BLIMP1 trotz Nachweis eines 6q-Allelverlusts exprimiert wurde. Es gab hier keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen 6q-Aberrationen und einer BLIMP1 Expression ($p=0,0986$ Fischer exact).

Alle hier untersuchten BLIMP1⁺ Fälle haben mit fortgeschrittenen B-Zell Reifungsstadien assoziierte Merkmale. Diese Beobachtung spricht stark dafür, dass BLIMP1 funktionsfähig ist, wenn sich eine BLIMP1 Expression immunhistochemisch nachweisen lässt. Daher wurde zunächst die BLIMP1 mRNA Expression in immunhistochemisch BLIMP1 negativen Fällen untersucht. Interessanterweise lag die BLIMP1 mRNA, die die lange und damit funktionsfähige BLIMP1 Isoform kodiert, auch in den Fällen vor, die 6q21 LOH aufwiesen und kein BLIMP1 Protein exprimierten. (Abbildung 7).

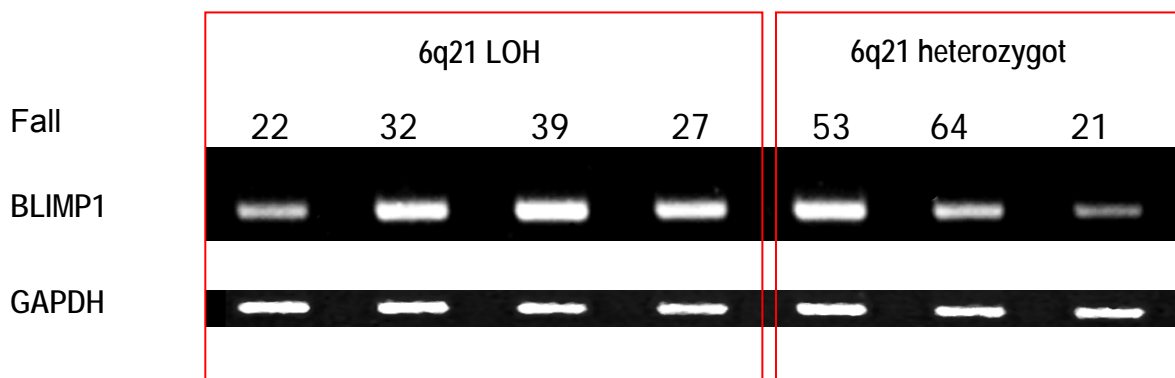


Abbildung 7. BLIMP1 cDNA ist in DLBCL Fällen trotz fehlender BLIMP1 Protein Expression nachweisbar. RT-PCR BLIMP1 und GAPDH Produkte aus sieben immunhistochemisch BLIMP1 negativen DLBCL Fällen wurden auf das 2% Agarose Gel aufgetragen. Bei allen Fällen kommt ein BLIMP1 Produkt vor.

Um nachzuweisen, dass BLIMP1 zwar auf cDNA-Ebene exprimiert wird, aber nicht durch Mutationen inaktiviert ist, wurde eine Mutationsanalyse an allen in Abbildung 7 aufgelisteten Fällen durchgeführt. Zuerst wurden die PCR Produkte in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und mindestens 10 positive Klone pro Fall mittels DNA Minipräp und Verdauanalyse isoliert. Danach wurden alle 10 Klone jeweils mit 17 unterschiedlichen Primern durchsequenziert, so dass für jeden Klon 17 überlappende Sequenzen entstanden, die anschließend mittels DNASIS (Contig Manager) zusammengefügt wurden. So entstand eine komplette Sequenz für den jeweiligen Klon. Danach wurden alle 10 Sequenzen, die einen Fall repräsentieren, mittels DNASIS Sequence Navigator parallel verglichen, wobei diejenigen Sequenzen mit nur einzelnen Veränderungen, die nicht in jedem Klon vorkamen, offensichtlich einem „fidelity error“ der Polymerase entsprachen und daher ignoriert wurden. Aus den einzelnen Klonsequenzen wurde eine Consensus Sequenz für den jeweiligen Fall generiert. Durch Vergleich der Sequenzen mit der Original BLIMP1 α mRNA Sequenz aus der GenBank (NM001198) mittels DNASIS Sequence Navigator wurde nach Mutationen gesucht. Bei Fall 12 wurde ein Basenaustausch (723C-G) gefunden, der zum Austausch von einer Aminosäure (167D-E) im Protein führt (Abbildung 8). Bei der weiteren Suche in der SNP Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) konnte geklärt werden, dass dieser Austausch mit einem schon bekannten SNP (SNP ID rs811925) übereinstimmt und daher keiner Mutation entspricht. In allen weiteren Fällen wurden keine weiteren Mutationen beobachtet.

	700	710	720	730	740	750
Blimp-1	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGACTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 10	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGACTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 6	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGACTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 1	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 2	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 3	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 4	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 5	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 7	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 8	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Clone 9	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					
Consensus	CTTCTTGTGTGGTATTGTCGGGAGTTTGCAGAAAGGCTTCACTACCCTTATCC					

Abbildung 8. Ein Beispiel der Mutationsanalyse aus Fall 12. Eine BLIMP1 Konsensussequenz wurde aus der Genbank den Sequenzdaten der jeweiligen Fälle gegenübergestellt. Die Klone 10 und 6 stellen möglicherweise Sequenzen aus dem zweiten Allel von normalen tumorinfiltrierenden B-oder T-Zellen dar. Alle anderen Klone haben G statt C in der Position 723.

3.4. Expression von BLIMP1 Isoformen

Die so genannte „alternative isoform usage“ stellt einen weiteren Mechanismus dar, der für eine mangelnde BLIMP1 Proteinexpression zuständig sein könnte. Für eine gleichzeitige Quantifizierung von beiden BLIMP1 Isoformen wurde zunächst eine RPA-Probe konstruiert. Die BLIMP1 Region wurde so gewählt, dass die gleiche Probe auf beiden BLIMP1 Isoformen hybridisieren kann. Jedoch hybridisiert die Probe komplett nur mit der BLIMP1 β Isoform, während mit BLIMP1 α die Bindung nur an einen Teil der RNA, die im Exon 4 kodiert ist, stattfindet. Dadurch entstehen zwei unterschiedlich lange doppelsträngige RNA-Fragmente, die den jeweiligen BLIMP1 Isoformen entsprechen (Abbildung 9).

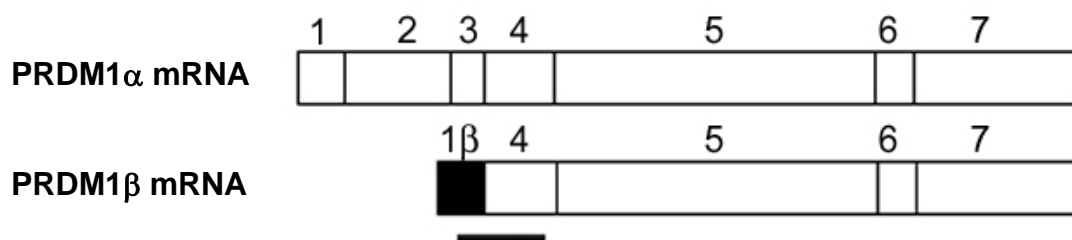


Abbildung 9. RPA Probenposition im Verhältnis zu beiden PRDM1 Isoformen. Gezählte offene Balken entsprechen den Exonen. Der schwarze Balken zeigt die Position der RPA-Probe an. Die Probe hybridisiert komplett (329bp) mit der BLIMP1 β Isoform, während bei BLIMP1 α der Teil der RNA, der im Exon 4 kodiert ist (insgesamt 230bp lang), „protected“ wird.

Zuerst wurde die RPA mit der oben genannten Probe auf sortierten normalen humanen B- Zellen, Plasmazellen und verschiedenen Myelom-Zelllinien etabliert. Beide BLIMP1 Isoformen kommen in den naiven (CD38⁻IgD⁺CD138⁻), Keimzentrums- (CD38⁺CD138⁻) und Gedächtnis- (CD38⁻IgD⁻CD138⁻) B-Zellen vor. Wie erwartet, zeigten die Plasmazellen eine 5.5 - 9.4fach stärkere Expression von beiden BLIMP1 Isoformen im Vergleich zu den anderen B-Zellen (Abbildung 10). Die beiden Myelom-Zelllinien (NCJ-H292 und L363) haben 10.8 -14.5 mal weniger BLIMP1 α mRNA im Vergleich zu den normalen Plasmazellen und zeigen eine relativ hohe BLIMP1 β Expression (wie bei Gyory⁴¹ in humanen Myelom-Zelllinien beschrieben wurde). Beide BLIMP1 Isoformen wurden in allen untersuchten DLBCL Fällen gefunden, aber nur in kleineren Mengen im Vergleich zu den normalen Plasmazellen. Es konnte kein Unterschied

zwischen den 6q21LOH⁺ und 6q21LOH⁻ Fällen festgestellt werden. Das Verhältnis zwischen BLIMP1 α und BLIMP1 β war 5.5 und war in allen untersuchten Tumorfällen in etwa gleich (Abbildung 10).

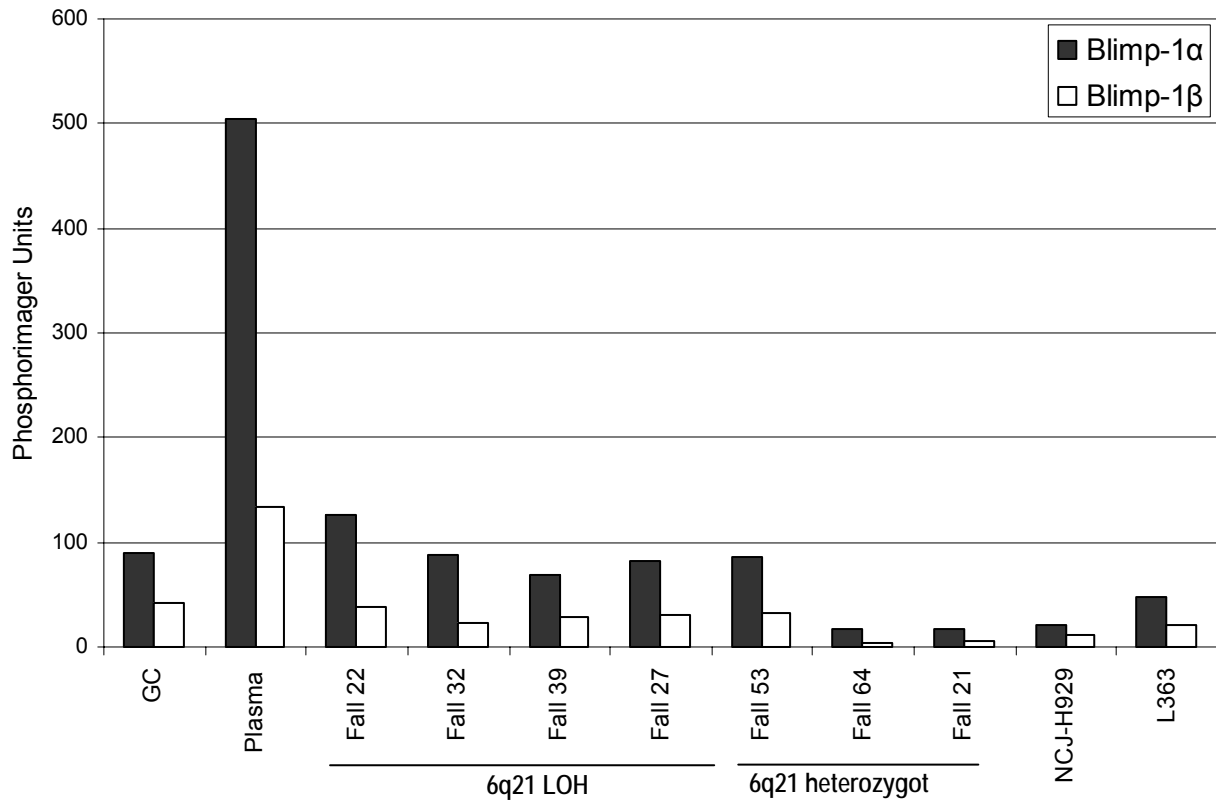


Abbildung 10. Quantifizierung von BLIMP1 Isoformen mittels RPA. Auswertung der relativen Expression von BLIMP1 Isoformen am Phosphorimager. Spuren GC und PC repräsentieren die normalen Keimzentrums-B- und Plasmazellen.

4. DISKUSSION

Viele Transkriptionsfaktoren haben einen entscheidenden Einfluss auf bestimmte Entwicklungsschritte der normalen B-Zellreifung aber auch bei Fehlfunktion eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese maligner B-Zell Lymphome.⁸ In der terminalen B-Zellentwicklung ist BLIMP1 nach bisherigen Untersuchungen in Maus und Mensch ein zentraler Regulator für die Plasmazellreifung.^{34,37,54,55} Insofern war es naheliegend, dass der gegen BLIMP1 Protein gerichtete polyklonale Antikörper reife Plasmazellen sowie lymphoplasmozytische Zellen in der hellen Zone der Keimzentren reaktiver Lymphfollikel nukleär markiert. Darüber hinaus ließ sich jedoch auch eine weitere Gruppe BLIMP1 positiver Zellen in reaktiven Geweben extrafollikulär und Sinus-assoziiert nachweisen, die morphologisch Immunoblasten oder Plasmoblasten entsprechen. Erst mit Hilfe von Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass sich der Phänotyp der GC-assoziierten und extrafollikulären BLIMP1⁺ Zellen hinsichtlich Proliferation und bestimmter Differenzierungsmerkmale deutlich unterscheidet. Im Gegensatz zu BLIMP1⁺ Keimzentrums- B-Zellen, die kein Ki67 exprimieren, können extrafollikuläre große B-Zellen gleichzeitig proliferieren und Immunglobuline produzieren. Die BLIMP1 Expression führt also nicht unbedingt zu einem unmittelbaren Zellzyklusarrest, wie am Beispiel der extrafollikulären großen B-Zellen gezeigt. Deswegen ist es möglich, dass das terminale Plasmazellentwicklungsprogramm für B-Lymphozyten im Keimzentrum und den extrafollikulären Zonen des lymphatischen Gewebes unterschiedlich reguliert ist. Dieser Befund ist auch hinsichtlich des BLIMP1 als TSG wichtig, da dadurch gezeigt wird, dass das BLIMP1 eine Plasmazelldifferenzierung induzieren kann, ohne die neoplastische Proliferation zu stoppen.

Plasmazellen sind Antikörper-produzierende reife Lymphozyten, die sich abhängig vom Antigentyp in mindestens zwei unterschiedliche Wege entwickeln können.⁵⁶ In der Maus entwickeln sich bei der Immunantwort gegen T-Zell abhängige Antigene die Plasmazellen aus den Keimzentrums-B-Zellen, die zuerst ihre Affinität durch „class switch recombination“ (CSR) und „somatic hypermutation“ (SHM) erhöhen müssen.⁵⁷ Bei der Immunantwort gegen T-Zell unabhängige Antigene handelt es sich um die schnelle Aktivierung und Vermehrung naiver Zellen oder Gedächtnis-B-

Zellen, die außerhalb des Keimzentrums in der sogenannten extrafollikulären Zone stattfindet.^{58,59} Derartig aktivierte B-Zellen differenzieren meistens ohne CSR/SHM gleich in IgM produzierende Plasmazellen.⁶⁰ BLIMP1 ist unbedingt erforderlich für die Entwicklung beider Plasmazelltypen³³ bei der Maus. Morphologisch und phänotypisch entsprechen die humanen extrafollikulären großen B-Zellen, die vor kurzem ausführlich beschrieben wurden⁵³, den extrafollikulären Plasmoblasten der Maus, die während T-Zell unabhängiger Immunantworten in der Milz zu finden sind. In Ergänzung zu den jüngsten Veröffentlichungen erscheint es somit wahrscheinlich, dass die extrafollikulären BLIMP1 positiven Zellen sowohl der T-Zell-unabhängigen B-Zellantwort, als auch dem sogenannten „activated B-cell phenotype“ zuzuordnen sind⁵³.

DLBCL Fälle mit ausgeprägter Plasmazelldifferenzierung wurden kürzlich beschrieben^{9,10,61}, wobei die molekularen Mechanismen, die eine B-Zell-Reifung im Lymphom induzieren, bislang nicht näher untersucht sind. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass BLIMP1 in einem Teil der hochmalignen Lymphome exprimiert ist. Weiterhin zeigen die BLIMP1⁺ Tumorzellen eine sekretorische Differenzierung und damit einen anderen Phänotyp, der den reiferen B-Zellen entspricht. Eine BLIMP1 Expression ist etwa gleich häufig in den beiden (ABC und GCB) DLBCL-Typen zu beobachten, laut LLMPP Daten gehören jedoch die meisten BLIMP1⁺ Fälle zum „unclassified“ Subtyp. Das bedeutet, dass das BLIMP1 in der Lage ist, den Phänotyp der Tumorzellen so stark zu verändern, dass sich die BLIMP1⁺ Fälle durch Genexpressionsmuster nicht mehr sicher in die ABC/GCB-Subtypen unterteilen lassen.

Außerdem wurde hier die Regulation von BLIMP1 und BCL6/PAX5 in DLBCL überprüft. Die B-Zell-Reifung ist zumindest im Keimzentrum wesentlich durch eine gegenseitige Kontrolle von BCL6 und BLIMP1 bestimmt.^{34,37,62} BCL6 ist in Keimzentrums-B-Zellen exprimiert und unterdrückt eine BLIMP1 Expression³⁵. Damit wird die terminale Reifung der B-Zellen so lange verzögert, bis die B-Zellen durch „Affinity Maturation“ und Selektion einen optimal zum Antigen passenden und hohe Affinität besitzenden Antikörper entwickelt haben^{62,63}. Daraufhin sind diese B-Zellen in der Lage, ein starkes Signal zu bekommen, das zur BLIMP1 Induktion vermutlich durch NFκB und Stat3 führt⁵⁴. BLIMP1 startet dann ein terminales Differenzierungsprogramm, das eine direkte PAX5⁴⁰- und auch indirekte BCL6-

Repression enthält³⁴. Dieses Modell wird weiterhin durch hier vorliegende Daten unterstützt, insofern, als innerhalb des Keimzentrums keine BLIMP1⁺/BCL6⁺/PAX5⁺ Zellen gefunden wurden. Somit kann man darauf schließen, dass die simultane BLIMP1, BCL6 und PAX5 Expressionsanalyse durch Mehrfachfärbung ein besseres Verständnis der terminalen Differenzierung in DLBCL ermöglicht. Durch Anwendung dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die BLIMP1⁺ DLBCL in drei molekularpathogenetisch unterschiedliche Typen unterteilt werden können.

Typ A-Lymphome (Blimp⁺/BCL6⁻/PAX5⁻) haben den gleichen Immunphänotyp wie die extrafollikulären großen B-Zellen und werden dem ABC-Typ nach Hans et al.⁴ zugeordnet. Diese Ähnlichkeit des Immunphänotyps lässt vermuten, dass sich Typ A-Lymphome aus den extrafollikulären großen B-Zellen entwickeln, die durch bislang nicht näher charakterisierte Mechanismen im aktivierten und proliferierenden Zustand arretiert sind.

Ein sehr ungewöhnliches Bild lässt sich beim Typ B-DLBCL erkennen. Hier handelt es sich um diejenigen Fälle, die BLIMP1 nur in relativ kleinen Arealen (100-200 Zellen) herdförmig exprimieren und keine PAX5⁺/BLIMP1⁺/BCL6⁺ Zellen enthalten. Dieser Befund beweist, dass sich die Transkriptionsfaktoren BLIMP1, BCL6 und PAX5, die in den Typ B-Lymphomen die Differenzierung leiten, genauso wie in den Keimzentrums B-Zellen gegenseitig kontrollieren. Außerdem zeigen diese Fälle, die ausschließlich dem GCB-Typ angehören und sich sehr wahrscheinlich aus den GC-Zellen entwickelt haben, dass ein Teil der Tumorzellen immer noch Kapazität besitzt, auf das Ag-Signal anzusprechen mit nachfolgender BCL6/PAX5-Herabregulierung und dass die BLIMP1 Expression die sekretorische Differenzierung offensichtlich in Tumorsubklonen induziert. Anzumerken jedoch ist, dass die Tumorzellen trotz der BLIMP1 Expression und sekretorischer Veränderungen weiter stark proliferieren und nicht völlig zu Plasmazellen ausreifen. Zusätzlich enthalten fast alle Typ B- DLBCL Chr5q-Amplifikationen, die bislang im Kontext der Lymphompathogenese nicht näher untersucht worden sind. Es ist allerdings bekannt, dass 5q-Amplifikationen häufig in malignen Myelomen⁶⁴ und Hodgkin Lymphomen⁶⁵ vom lymphozytenprädominanten Typ auftreten. Beide Entitäten sind stark mit einer Plasmazell-Reifung assoziiert, so

dass sich hier vermuten lässt, dass die Chr5q-Region bislang noch nicht identifizierte Gene, die in der Plasmazell- Reifung eine Rolle spielen, enthält.

Bei der gleichzeitigen BLIMP1 und BCL6/PAX5 Koexpression, wie sie im Typ C-DLBCL zu finden ist, handelt es sich um einen abärranten Immunphänotyp, der beweist, dass hier eine normale gegenseitige BLIMP1 und BCL6 Regulation nicht mehr stattfindet, und dass BLIMP1 zum Teil nicht mehr in der Lage ist, sein direktes Zielgen PAX5 zu reprimieren. Zur Abklärung der genaueren molekularen Defekte von BLIMP1/BCL6/PAX5 in den Typ C-Fällen sind weitere Untersuchungen notwendig. Allerdings ist dieser abärrante Immunphänotyp sehr wahrscheinlich auf Mutationen von BCL6 und/oder PAX5 zurückzuführen. Dafür sprechen auch die Daten von anderen^{7,66}, welche die zur Überexpression führenden Mutationen von PAX5 und BCL6 Genen jeweils in etwa 50% und in 40% der DLBCL nachgewiesen haben. Der Nachweis von Chromosom 3 Aberrationen in allen Typ C-Fällen und fehlende molekulare Defekte in BLIMP1 unterstützen diese Hypothese.

Es wurde ebenso untersucht, in welchem Umfang BLIMP1 an der Pathogenese der DLBCL beteiligt ist und ob es Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens besitzt. Nach der Knudsens „two-hit hypothesis“ für die Krebsentstehung müssen beide Allele des Tumorsuppressorgens inaktiviert werden. Meistens ist ein Allel durch Mutation inaktiviert und danach folgt eine Deletion des zweiten Allels. Mittlerweile sind auch andere Mechanismen, die TSGs inaktivieren können, beschrieben worden. Dazu gehören die Promoter Hypermethylierung^{67,68} und Inaktivierung der TSG durch Überexpression anderer funktionsunfähiger Isoformen.^{43,69} Dieser zweite Mechanismus wurde als bedeutend für die BLIMP1 Inaktivierung in humanen Myelom-Zelllinien vorgeschlagen.⁴¹ Typisch für TSG war, dass BLIMP1 in unseren DLBCL-Fällen mit Allelverlust auf 6q21 auf Proteinebene nicht nachweisbar war, doch konnten Mutationen im BLIMP1 kodierenden Gen PRDM1 hierbei nicht festgestellt werden. Ferner wurde keine Überexpression eines BLIMP1 β Isoforms in den Lymphomzellen gefunden. Schließlich war BLIMP1 mRNA nur auf basalem Niveau exprimiert. Daher war das BLIMP1 Protein immunhistochemisch nicht detektierbar. Eine BLIMP1 Promoter Hypermethylierung könnte hierfür eine entscheidende Rolle spielen. Der BLIMP1 Promoter ist allerdings zur Zeit nicht ausführlich charakterisiert, weshalb

dieser Mechanismus noch nicht vollständig abgeklärt werden kann. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass das BLIMP1 ein TSG ist, dessen Verlust bei der Lymphomentwicklung eine wesentliche Rolle spielt. Hierzu passen auch die Ergebnisse der BLIMP1 knock-out Mäuse, die keine spontane Lymphomentstehung aufweisen³³.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Hinsichtlich einer BLIMP1 Expression im normalen lymphatischen Gewebe konnte festgestellt werden, dass BLIMP1 nicht nur während der Plasmazell-Entwicklung aus den Keimzentrums-B-Zellen eine bedeutende Rolle spielt, sondern auch mit der Plasmazell-Differenzierung außerhalb des Keimzentrums assoziiert ist. Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass das terminale Plasmazell-Entwicklungsprogramm für B-Lymphozyten im Keimzentrum immer mit dem Zellzyklusstopp koreguliert ist, da die extrafollikulären B-Zellen eine von der sekretorischen Reifung unabhängige Zellzyklusregulierung besitzen. Die BLIMP1 Expression in EGBZ führt also nicht unbedingt zu einem unmittelbaren Zellzyklus-Arrest, wie am Beispiel der extrafollikulären großen B-Zellen gezeigt wurde. Dieser Befund ist auch hinsichtlich des BLIMP1 als TSG wichtig, da damit gezeigt wird, dass BLIMP1 eine Plasmazell-Differenzierung induzieren kann, ohne die neoplastische Proliferation zu stoppen.

Eine BLIMP1 Expression in DLBCL kennzeichnet die Fälle mit einer Plasmazell-Differenzierung und ist nicht so selten zu finden (15% der DLBCL). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die BLIMP1 Expression in den Lymphomen größtenteils wie in normalen B-Zellen reguliert ist und BLIMP1 die Kapazität besitzt, die Plasmazell-Entwicklung in den Tumorzellen zu induzieren. Jedoch reicht eine BLIMP1 Expression weder aus, den Zellzyklus aufzuhalten, noch eine komplette terminale Plasmazell-Reifung in DLBCL zu leiten. Allerdings scheint BLIMP1 nicht von den bekannten TSG Inaktivierungsmechanismen in DLBCL betroffen zu sein, wobei es sehr unwahrscheinlich ist, dass BLIMP1 ein TSG darstellt, dessen Verlust bei der Lymphomentwicklung eine wesentliche Rolle spielt.

Die simultane BLIMP1, BCL6 und PAX5 Expressionsanalyse durch Mehrfachfärbung ließ hier eine größere Erkenntnis über die defekte terminale Differenzierung in DLBCL gewinnen und unterteilt die BLIMP1⁺ DLBCL in drei molekular-pathogenetisch unterschiedliche Typen. Zusätzlich konnte hier demonstriert werden, dass die simultane in-situ Expressionsanalyse für die sich gegenseitig regulierenden Transkriptionsfaktoren ein mächtiges Werkzeug ist, das tiefere Einblicke in die molekulare Tumorphogenese gewähren lässt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

BLIMP1 ist ein Transkriptionsfaktor und Schlüsselregulator in der Plasmazell-Differenzierung. Um die Rolle des BLIMP1 in der Lymphomentstehung zu untersuchen, wurde die BLIMP1 Expression im normalen humanen lymphatischen Gewebe und in 78 diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen untersucht. BLIMP1 wurde in Plasmazellen und GC B-Zellen sowie in einer Population extrafollikulärer B-Zellen exprimiert. Die reifen Plasmazellen vom Marschalko-Typ waren CD138⁺CD20⁻MUM1⁺Ki67⁻BCL6⁻PAX5⁻BLIMP1⁺. Außerdem zeigten die Keimzentrums-B-Zellen keine Ki67-Expression. Im Gegensatz hierzu waren die BLIMP1⁺ EGBZ Ki67⁺p27⁻. BLIMP1 wurde in 19% (15/78) der DLBCL Fälle, darunter ABC- (7/15) und GCB- (8/15) Typ, exprimiert. BLIMP1⁺ DLBCL konnten entsprechend dem BLIMP1, BCL6 und PAX5 Expressionsprofil in drei pathogenetisch unterschiedliche Typen unterteilt werden. In den Typ A-Fällen waren die BLIMP1⁺ Tumorzellen ständig BCL6⁻/PAX5⁻ und waren alle vom ABC-Typ (CD10⁻/BCL6⁻/MUM1⁺). Im Typ B-DLBCL waren die meisten Tumorzellen ständig BLIMP1⁻/BCL6⁺/PAX5⁺ und BLIMP1 war nur in relativ kleinen Arealen herdförmig exprimiert. Die BLIMP1⁺ Zellen zeigten keine BCL6 und PAX5 Expression, und alle Typ B-Fälle zeigten ein GCB-Profil (CD10⁺ oder BCL6⁺ und MUM1⁻). Die Typ C-Fälle waren durch eine gleichzeitige BLIMP1 und BCL6 und/oder PAX5 Expression gekennzeichnet, was einem abärranten und nicht in normalen B-Zellen auftretenden Immunphänotyp entspricht. Weiterhin wurden in 7 Fällen mit Allelverluste auf der Genomregion 6q21, der das BLIMP1 Gen enthält, keine BLIMP1 Mutationen gefunden.

Hinsichtlich einer BLIMP1 Expression im normalen lymphatischen Gewebe konnte festgestellt werden, dass das BLIMP1 nicht nur während der Plasmazellentwicklung aus den Keimzentrums-B-Zellen eine bedeutende Rolle spielt, sondern auch mit der Plasmazell-Differenzierung außerhalb des Keimzentrums assoziiert ist. Eine BLIMP1 Expression in DLBCL kennzeichnet die Fälle mit einer Plasmazell-Differenzierung. BLIMP1 ist in den Lymphomen größtenteils wie in normalen B-Zellen reguliert und besitzt die Kapazität, die Plasmazell-Entwicklung in die Tumorzellen zu induzieren. Jedoch reicht die BLIMP1 Expression weder aus, den Zellzyklus aufzuhalten, noch eine komplette terminale Plasmazell-Reifung in den DLBCL zu leiten. Allerdings scheint BLIMP1 nicht von den bekannten TSG Inaktivierungsmechanismen in den DLBCL betroffen zu sein, wobei es sehr unwahrscheinlich ist, dass das BLIMP1 ein TSG darstellt, dessen Verlust bei der Lymphomentwicklung eine wesentliche Rolle spielt.

7. SUMMARY

BLIMP1 is a transcriptional factor that is a key regulator of plasma cell differentiation. To investigate if BLIMP1 is involved in lymphoma genesis, we studied a BLIMP1 expression in normal human lymphoid tissue and in 78 cases of human diffuse large B-cell lymphoma. We found BLIMP1 in plasma cells, a subset of lymphoplasmacytoid GC B-cells (BLIMP1⁺/Ki67⁻) and in a population of human reactive large extrafollicular B-cells (BLIMP1⁺/Ki67⁺). Generally BLIMP1⁺ B-cells were CD20⁺CD138^{-/+}BCL6⁻PAX5⁻MUM1⁺. BLIMP1 was also expressed in 19% (15/78) of DLBCL cases, with both ABC (7/15) and GCB (8/15) subtypes. Importantly, the BLIMP1 expressing lymphoma could be subclassified into molecularly different three categories according to BLIMP1 and BCL6/PAX5 expression profile. In the Type A category ABC-type DLBCL cases were positive for BLIMP1 and negative for BCL6/PAX5. Type B group contained 5 GCB-type tumors with focal BLIMP1 expression. BLIMP1 expressing cells were BCL6⁻/PAX5⁻, while remaining lymphoma cells displayed a strong BCL6 and PAX5 expression. In Type C category there were 3 cases with mutually all cells co-expressing BLIMP1 and BCL6, but not PAX5. Additionally, all Type C cases harbored chromosome 3 aberrations involving the region where BCL6 gene is mapped. Importantly, we did not observe any correlation between BLIMP1 expression and aberrations involving chromosome 6q21 – a region where BLIMP1 encoding gene PRDM is mapped. The sequence analysis of BLIMP1 gene in selected 7 cases with 6q21 LOH revealed no mutations.

Summarizing, our data suggest that the BLIMP1 induced terminal differentiation program is different in GC and extrafollicular B-cell responses to antigen and not necessarily involves cell cycle arrest in the latter. Importantly, we demonstrated that BLIMP1 is expressed in both ABC and GCB-type DLBCL cases with secretory differentiation, indicating that BLIMP1 is functional in lymphoma cells, but BLIMP1 expression is not sufficient to stop proliferation in DLBCL. Our data imply that in some DLBCL cases the lymphoma cells are able to differentiate to more mature stage and this secretory differentiation is marked by BLIMP1 expression. BLIMP1 is not affected by common TSG inactivation mechanisms in DLBCL and does not seem to play a major role in lymphoma establishment.

8. ANHANG

8.1. *Abkürzungen*

ABC	Activated B cell = Aktivierte B-Zellen
Ag	Antigen
Bp	basepairs = Basenpaare
Chr	Chromosom
cIg	Zytoplasmatische Immunoglobuline
DLBCL	Diffuse Large B-Cell Lymphoma = Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGBZ	extrafollikuläre große B-Zellen
GC	Germinal center = Keimzentrum
GCB	Germinal center B cell = Keimzentrums- B-Zellen
H.p.	Helicobacter pylori
LK	Lymphknoten
LLMPP	Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project
LOH	Loss of Heterocytosity = Verlust der Heterozygotie
LSAB	Labeled Strept-Avidin Biotin
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue = Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
Mb	Megabasen
MZBCL	Marginalzonen B-Zell-Lymphom
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
RPA	RNAse Protection Assay
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
cIg	Cytoplasmic immunoglobulin = Zytoplasmatisches Immunglobulin
TSG	Tumor-Suppressorgen
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation

8.2. Molekularbiologische Methoden

8.2.1. RNA/DNA-Isolation aus Zellen und gefrorenem Gewebe

Gefriermaterial wurde im Kryostaten in 10 µm dicke Schnitte geraspelt. Für jede RNA-Isolierung wurden rund 30 bis 40 Schnitte oder ca. 1×10^7 Gewebekulturzellen verwendet. Diese wurden in 1000 µl TRIZOL® (GIBCO BRL, Eggenstein) aufgenommen und auf Eis gestellt. Das Gewebe wurde mit unterschiedlich starken Kanülen und 1 ml Spritzen durch xxx homogenisiert, bis es problemlos durch eine Insulinkanüle aufgezogen werden konnte. Daraufhin wurden pro Ansatz 10 µg einer Glykogenlösung (20 mg/ml) hinzugegeben und der Ansatz 2 - 3 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform und 30 s vortexen. Daraufhin wurde die Probe bei 4°C und 10000 x g 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Cap überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte 10 min bei RT und einer anschließenden Zentrifugation wie im vorherigen Schritt. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und im Heizblock bei 65°C 10 min getrocknet. Die RNA wurde mit 30 µl DEPC-Wasser versetzt, 10 min bei 65°C inkubiert und 30 sec mit Vortex resuspendiert. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei 80°C. Zur unteren organischen Phase wurden 300 µl Ethanol zugegeben. Die Fällung der Gesamt-DNA erfolgte 30 min bei RT und einer Zentrifugation bei 4°C und 2000 x g 5 min. Das DNA-Pellet wurde jeweils 30min zweimal mit 1000µl 0.1M NaCitrat 10% Ethanol gewaschen und anschließend in 1000µl 75% Ethanol aufgenommen. Nach einer Zentrifugation wie im vorherigen Schritt wurde das DNA-Pellet im Heizblock bei 65°C 10 min getrocknet, im 8mM NaOH resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

8.2.2. RNA-Gel

Für ein 50 ml RNA-Gel wurden 0,75 g Agarose in 36,3 ml DEPC-H₂O aufgeköcht und der Volumenverlust nach dem Aufkochen mit DECP-H₂O ausgeglichen. Der flüssigen Agarose wurden daraufhin noch 8,7 ml Formaldehyd und 5 ml 10 x MOPS RNase-frei zugemischt. Von der zu analysierenden Gesamt-RNA wurden 2 µl mit jeweils 8 µl Denaturierungspuffer vermischt, 15 min auf 65°C

inkubiert, danach kurz auf Eis gestellt und dann auf das Gel aufgetragen. Der Laufpuffer bestand aus 1 x MOPS.

8.2.3. Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA

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

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

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

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

8.2.4. Synthese von cDNA

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

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

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

5 µl 5 x First-Strand-Puffer
2.5 µl 100 mM DTT
2.5 µl 10 mM (jedes 10 mM) dNTPs
0.8 µl RNAsin® (40000 U/ml) (PROMEGA, Mannheim)
1.0 µl mMLV-RT (200 U/ml)
bis 20µl DEPC H₂O

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

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

8.2.5. Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) - Ansatz mit cDNA als Template

Ein typischer 25 µl Reaktionsansatz auf Eis war:

120 ng DNA-template
jeweils 0,6 µl upper und lower Primer (20 pmol/µl)
2,5 µl MgSO₄ (25 mM, Endkonz. 3-3,5 mM)
2,5 µl 10 x Puffer ohne Magnesiumsulfat
4,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
1,25µl AmpliTaq Gold Polymerase (1 U/µl)
bis 25 µl H₂O

Die DNA wurde in einem PCR-Gerät mit folgendem Programm amplifiziert, wobei die Reaktionszeiten und Temperaturen je nach Länge und GC-Gehalt der verwendeten Primer und der DNA-Matrize variierten.

Hot-start 13 min 95°C, dann
35 Zyklen 15 s 94°C (Schmelzen)
30 s 55°C (Hybridisieren)
1 min / 1000Bp Produkt 72°C (Amplifikation)
Schlusszyklus 7 min 72°C, auf Eis lagern

8.2.6. GAPDH - PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese

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

8.2.7. Agarose-Gelelektrophorese zur PCR Produkt Analyse

Die Agarose wurde im Laufpuffer (1 x TAE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) durch kurzes Aufkochen gelöst, wobei 0,75%ige Gele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0,5 bis 12 kB und 2%ige Agarose-Gele zur Auftrennung von kleineren Fragmenten (50 bp bis 2 kB) verwendet wurden. Nach dem Erhärten in einer entsprechenden Form wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in einer Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer überschichtet. Das PCR-Produkt (8µl) wurde mit 1/6Vol. gel loading Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 50-100 V (20-80 mA) parallel zu DNA-Markern bekannter Größe. Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde anschließend unter UV-Bestrahlung dargestellt und fotografiert.

8.2.8. Reinigung von DNA aus Agarose

In einem Agarose-Gel separierte, mit Ethidiumbromid gefärbte und unter UV-Licht mittels einer Handlampe dargestellte, DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Isolation aus der Agarose erfolgte mit dem Gelextraktionskit Jetsorb[®] der Firma Genomed nach dem Protokoll des Herstellers. Das Schmelzen der Agarose und die Bindung der DNA an Resin erfolgte in 1,5 ml Reagiergefäßen durch eine 30-minütige Inkubation bei 60°C im Puffer A1 (alle 4 min gemischt). Das durch Zentrifugation entstehende Pellet wurde vorsichtig gelöst. Das Resin wurden durch eine 5-minütige Inkubation bei 50°C getrocknet und die DNA anschließend in 30 µl Low TE-Puffer je 100 ng Gel durch eine 20-minütige Inkubation bei 60°C eluiert (alle 3 min gemischt). Nach Sedimentation des Resin wurde die DNA-Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch gemessen.

8.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Die TA-Ligation eines PCR-Produkts erfolgte mit dem Klonierungskit pGEM-T Easy Cloning System II von Promega (Mannheim) nach folgendem Ansatz:

5 µl 2 x Rapid Ligation Puffer
1 µl pGEM-T Easy Klonierungsvektor (50 ng)
3.5 µl PCR-Produkt
1 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl)
ad 10 µl H₂O

Die Ligation wurde 1 h bei RT inkubiert.

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

Die zu transformierenden *E. coli*s wurden auf Eis aufgetaut und 40 µl in ein vorgekühltes 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die kompetenten Bakterien wurden vorsichtig resuspendiert, danach wurden 2 µl Ligationsansatz hinzupipettiert und es erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Der Transformationsansatz wurde dann für 45 sec in ein Wasserbad von 42°C und danach auf Eis gestellt. Nach 2 min wurden 450 µl 42°C warmes SOC-Medium hinzugegeben und die Bakteriensuspension 1 h bei

37°C und 250 rpm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde beim Ausplattieren auf zwei LB-Amp-Platten, die mit X-Gal/IPTG versetzt waren, ausplattiert.

8.2.11. Kultivierung von prokaryontischen Zellen

Angeimpfte LB-Amp-Platten wurden 16-20 h bei 37°C inkubiert. Für eine Minipräparation von Plasmid-DNA wurde eine weiße Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 5 ml LB-Amp Medium überimpft und anschließend 12-18 h bei 37°C und 250 rpm geschüttelt.

8.2.12. Minipräparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskultur unter Verwendung des Minipräparations-Kits der Firma Genomed nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien sowie einer anschließenden Reinigung und Fällung der Plasmid-DNA. Anschließend wurde diese DNA in 90µl Low TE-Puffer gelöst und weiter analysiert.

8.2.13. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

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

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

Der Restriktionsverdau erfolgte 1,5 h bei 37°C im Inkubator. Danach wurden die Restriktionsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

8.2.14. Sequenzierung

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

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

Der Reaktionsansatz durchlief 25 PCR-Zyklen in der PCR-Maschine Touch Down von Hybaid (Heidelberg) unter simulated Tube Control:

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

Der Sequenzieransatz wurde danach über eine Sephadex G50 Säule in einer gelben Eppendorfspitze aufgereinigt und aus dem Eluat die amplifizierte DNA mit 2,0 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,6 und 50 µl 96 % EtOH 10 min auf Eis gefällt. Die DNA wurde bei 15800 x g 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % EtOH gewaschen und bei 65°C im Thermoblock gut getrocknet. Die DNA wurde zum Auftragen auf das Sequenziergel in 3 µl Auftragspuffer (denaturierend) für Sequenziergele (Formamid und 50 mM EDTA, pH 8,0 im Verhältnis 5:1) gelöst und 2 min bei 90°C inkubiert. Bis zum Laden des Gels stand die denaturierte Probe auf Eis.

8.2.15. RNase Protection

Diese Methode ermöglicht die quantitative Analyse spezifischer RNA-Transkripte. Dabei ist doppelsträngige RNA, die aus der Hybridisierung der isolierten Gesamt-RNA mit spezifischer radioaktiv markierter, komplementärer mRNA hervorgeht, vor einem Abbau durch Einzelstrang-spezifischer RNasen geschützt. Nach Auftrennung der Ansätze auf einem 5%-igen denaturierendem PAA-Gel kann die geschützte RNA mit Hilfe des Phospho-Imagers quantifiziert werden. Für die RNase-Protektions-Analyse wurden das Reaktionssystem RiboQuant sowie das Protokoll der Firma BD PharMingen verwendet. Dabei befanden sich in den sogenannten template sets mehrere unterschiedlich lange und spezifische cDNA-Fragmente, die als Matrizen für eine in-vitro Transkription von komplementären mRNAs mit radioaktivem ³²P-γUTP dienten. Für die Hybridisierungsreaktion wurden 5-10 µg der zu untersuchenden Gesamt-RNA mit der entsprechend verdünnten radioaktiven Probe nach Denaturierung (5 min, 95°C) bei 56°C über Nacht inkubiert. Die nicht hybridisierte RNA wurde anschließend durch eine RNase-Behandlung (45 min, 30°C) verdaut, die RNase mit Proteinase K (20 min, 37°C) abgebaut sowie die verbleibende RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ammoniumacetat gefällt. Nach der Denaturierung im Probenpuffer (5 min, 95°C) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 5%igen harnstoffhaltigen PAA-Gel bei ca. 30 W. Dieses Gel

wurde zwischen zwei 30 cm lange Glasplatten in einem Abstand von 0,5 mm gegossen. Nach der Auftrennung wurde das Gel unter Vakuum getrocknet, auf einem Röntgenfilm exponiert und gegebenenfalls die Transkription der RNA mit Hilfe des Phosphor-Imagers quantifiziert.

8.3. Zellbiologische Methoden

8.3.1. Zellzahlbestimmung nach Neubauer

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

8.3.2. Gewinnung von Primärzellen aus Frischgewebe

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

8.3.3. Zellkulturarbeiten

Alle Zelllinien wurden aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank ausgeführt. Die in 2 ml-Kryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen ($6,0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ Einfriermedium) wurden in 37°C warmem Wasser aufgetaut und die Zellsuspension in ein mit 10 ml Komplettmedium gefülltes 15 ml Polypropylenröhrchen pipettiert. Nach der Zentrifugation (200g/8min, RT) wurden die Zellen im Komplettmedium resuspendiert, gezählt und in Gewebekulturgefäße überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C , 5% CO_2 -Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit in

einem Brutschrank. Das komplette Zellkulturmedium wurde wachstumsabhängig alle 2 bis 4 Tage erneuert.

8.4. Proteinchemische Methoden

8.4.1. Gesamtproteinaufschluss

1×10^6 Zellen, aus denen das Gesamtprotein isoliert werden sollte, wurden pelletiert und in je 100 μl 1x Lämmli-Puffer (0,05 M Tris/HCl, 100 mM β -ME, 2 % SDS, 10 % Glycerin) aufgenommen. Das Zellpellet wurde durch Vortexen resuspendiert und 5 min bei 100°C gekocht. Nach der Inkubation wurde mit einer Insulinkanüle die genomische DNA gesichert und danach die Lösung 10 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Gesamtproteine und wurde bei -20°C eingefroren.

8.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Das Bradfordreagenz mußte zuerst mit H_2O 1:5 verdünnt werden. Eine Standardkurve zur Proteinbestimmung wurde mit BSA vorgelegt. Dafür wurden 1, 2, 5, 10, 15 und 20 μg BSA in 1000 μl Bradfordreagenz verdünnt. Von den zu vermessenden Proben wurde jeweils 1 μl in 1000 μl vermessen. Die Bestimmung der OD erfolgte bei 595 nm.

8.4.3. SDS-Polyacrylamidgel

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

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

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

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

8.4.4. Western-Blot

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

8.4.5. Western-Blot-Hybridisierung mit Primärantikörpern und Chemilumineszent Detektion

Zu Beginn wurde die Western-Blot-Membran 1 h bei RT in 10 ml Blocking-Reagenz (1 x PBS; 0,02 % NaN_3 ; 0,1 % Tween 20; 5 % Magermilchpulver (w/v)) auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Blot 1 x 15 min und 2 x 5 min mit jeweils 10 ml frischem Waschpuffer (1 x PBS; 0,02 % NaN_3 ; 0,1 % Tween 20) bei RT gewaschen. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1-2 $\mu\text{g/ml}$ in den Waschpuffer zugegeben und ebenfalls 1 h bei RT geschüttelt. Gewaschen wurde der Blot daraufhin wie oben: 1 x 15 min und 2 x 5 min mit je 10 ml Waschpuffer. Anschließend erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers in einer Konzentration von 3 μl AK/10 ml Waschpuffer. Der Sekundärantikörper wurde 45 min bei RT inkubiert und danach 1 x 15 min und 4 x 5 min mit je 10 ml frischem Waschpuffer gewaschen. Zur nachfolgenden Entwicklung des Western-Blots fand die Chemilumineszent ECL Kit (Amersham) Verwendung. Dabei wurden die beiden Lösungen ECL1 und ECL2 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1 min auf den Blot gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurde das Entwicklungsreagenz mit Zellstoff abgesaugt und ein Filmstreifen 30 s bis zu 10 min aufgelegt und danach entwickelt.

8.5. Chemikalien und Geräte

8.5.1. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde der JM109 (Promega, Mannheim) Stamm der Spezies *Escherichia coli* verwendet.

8.5.2. Primer und Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide und Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und lyophilisiert zugesandt. Die Aufnahme erfolgte in H₂O, in der Regel in einer Stock-Konzentration von 200 pmol/μl. Für die PCR und Sequenzierung wurde eine Lösung mit 20 pmol/μl eingesetzt.

Für die PCR-basierte, zur Amplifizierung der kompletten BLIMP1α kodierenden cDNA, wurden folgende Primer eingesetzt:

Name	Sequenz (5' - 3')
BLIMP_F	GAGGATCCCCCAAGTGTA ACTC
BLIMP_R	GTGTTTTCTGAAAATCTTAAGGATCCATTG

Für die Vorbereitung der „RNase Protection Assay“ (RPA) Probe fanden folgende Oligonukleotide Verwendung:

Name	Sequenz (5' - 3')
PRDM1beta	GGTTAATCGGTTTGAGGCAGC
756r	CCGGGATAAGGGTAGTGAAGC

Für die cDNA Synthese Kontrolle fanden folgende Oligonukleotide Verwendung:

Name	Sequenz (5'-3')
GAPDH-cDNA-FOR1.1	GTGGAAGGACTCATGACCACAGTC
GAPDH-cDNA-REV	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC

Zur Sequenzierung der einzelnen pGEM-T Eeasy/BLIMP1 Konstrukte wurden folgende Primer verwendet:

Name	Sequenz (5' - 3')
BLIMP_F	GAGGATCCCCCAAGTGTAACTC
638f	GCGTGTCAGAACGGGATGAAC
midfor	CCAACCCCTCCAAAGGAAAGG
1224f	CCGGGACTCCTACGCTTACTTG
1592f	CACAGTGCCTTCTCCTTTACCG
1867f	CGGCCAGCTCTCCAATCTG
2119f	TCACCCAGTTTGTGCACCTG
2340f	TCGAGGACGTGGAGGATGAC
312r	GGGTGGTCGTTTACAATGTATG
564r	CCGTCAATGAAGTGGTGAAGC
756r	CCGGGATAAGGGTAGTGAAGC
1022r	CCCGGATGGGGTAAACGAC
1363r	GGGCAAGAGGAACTTGGGG
1709r	TGGGCTGCACCACATGTTC
1969r	AGGTGGGCGAGCTGAGTAAAG
2249r	CAGCGCAGTTCCCTTTCAG
2467r	GAGTCCATTCCCCATGTTTCTTTG
BLIMP_R	GTGTTTTCTGAAAATCTTAAGGATCCATTG

8.5.3. Antikörper

8.5.3.1. Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Antigen	Fluorochrome	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Klon
BLIMP1	-	1:2000	Kaninchen	PD. HM Jäck	polyklonal
CD20	-	1:1000	Maus	DAKO	L26
CD138	-	1:50	Maus	Cymbus Biotechnology	B-B4
Ki67	-	1:75	Maus	DAKO	MIB-1
MUM1	-	1:200	Ziege	Santa Cruz	polyklonal
Bcl-6	-	1:5	Maus	DAKO	PG-B6p
Pax-5	-	1:50	Maus	BD Transduction Labs	24
CD10	-	1:10	Maus	Novocastra	56C-6
Bcl-2	-	1:40	Maus	DAKO	124
c-myc	-	1:500	Maus	DAKO	9E10
α Kaninchen	Cy3	1:100	Esel	Jackson Immunoresearch	polyklonal
α Maus	FITC	1:100	Esel	Jackson Immunoresearch	polyklonal
α Maus	Cy5	1:100	Esel	Jackson Immunoresearch	polyklonal
α Ziege	Cy5	1:100	Esel	Jackson Immunoresearch	polyklonal

Tabelle 3. Antikörper, die für die immunhistochemische Färbung verwendet wurden

8.5.3.2. Antikörper zur Zelldepletion

Suspensionszellen wurden mit magnetischen Beads von Dynal[®] positiv oder negativ depletiert. Die Beads waren entweder schon mit den entsprechenden Primärantikörpern gekoppelt, oder konnten als unkonjugierte Beads mit Antikörpern sekundär gekoppelt werden. Hierbei wurden mit Antikörpern gegen CD14 und CD2 gekoppelte Beads (Dynal, Hamburg, Deutschland) und mit Antikörpern gegen CD138 gekoppelte Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) eingesetzt. Antikörper gegen CD38⁺ (Klon ACT 13.5, Serotec, Deutschland) und gegen IgD⁺ (Klon HJ9, Sigma, Deutschland) wurden zusammen mit den an die Anti-Mäuse-Antikörper gekoppelten magnetischen Beads (Miltenyi Biotec) verwendet.

8.5.4. Geräte und Verbrauchsmaterial

– Autoklav	Stiefenhofer
– Brutschränke	Nunc, Heraeus
– DNA-Sequenzierer 373A	Perkin Elmer
– Eismaschine	Genheimer
– Gefrierschränke (-20°C; -70°C)	Privileg, Bosch
– Gelkammern	Stratagene, Hoefer
– Gelrockner	BioRad, Hartenstein
– Heizblöcke	Hartenstein
– Kühlzentrifugen	Heraeus
– Lichtmikroskope	Olympus, Leica
– Mikroliter Pipetten	Eppendorf, Brand
– Mikrozentrifugen	Eppendorf
– PCR-Maschinen	Perkin Elmer
– pH-Meter	Hartenstein
– Phosphor-Imager	Molecular Dynamics
– Rotoren (JA-10, JA-14)	Beckman
– Schüttelinkubator	Hartenstein
– Szintillations-Meßgerät	Canberra Packard
– Spannungsquelle	Amersham Pharmacia

	Biotech
– Spektralphotometer	Amersham Pharmacia
	Biotech
– Sterilbank	Heraeus, Gelaire
– Stickstoff-Tanks	tec-lab
– Ultrazentrifuge	Beckman
– UV-Stimulationsgerät UVT-20M	Herolab
– Vortexer	Hartenstein
– Waage Precisa 300 MC	Sartorius, Hartenstein
– Wasserbäder	Hartenstein
– Wasser-Entsalzungsanlage (MilliQ-Plus)	Millipore
– Zählkammer (Neubauer improved)	Brand
– Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
– Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Nunc
– 2 ml Kryotubes	Greiner bio-one
– Einmalkanülen (26G _{3/8} ; 0,45 x 10 mm)	Hartenstein
– Einmalküvetten	Hartenstein
– Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Hartenstein
– Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner bio-one
– Gewebekulturschalen (60 mm, 90 mm)	Falcon, Greiner bio-one
– Glaswaren	Schott

– Parafilm	Hartenstein
– Pipettenspitzen	Eppendorf
– Röntgenfilme (13 x18 cm)	Kodak
– Sterilfilter (0,2 µM, 0,45 µM)	Schleicher & Schuell
– Whatman Papier	Hartenstein

8.5.5. Chemikalien und Reaktionssysteme

– 4-Hydroxytamoxifen (C ₂₆ H ₂₉ NO ₂)	Sigma-Aldrich
– β-Mercaptoethanol	Carl Roth
– Acrylamidlösung	Carl Roth
– Agar-Agar	Carl Roth
– Agarose	Sigma-Aldrich
– Ampicillin	Hoechst
– APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck Eurolab
– BioRad Protein Assay (5 x Bradford Reagenz)	BioRad
– Borsäure	Merck Eurolab
– Bromphenol Blau	Merck Eurolab
– BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Carl Roth
– Chloroform (CHCl ₃)	Carl Roth
– DEPC (Diethylpyrokarbonat)	Carl Roth
– Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O)	Merck Eurolab
– DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth

– dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI-Fermentas
– DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth
– EDTA (Na ₂ EDTA • 2H ₂ O)	Carl Roth
– EGTA (Na ₄ EGTA)	Sigma-Aldrich
– Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth
– Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Carl Roth
– Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich
– FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco BRL
– Ficoll	Amersham Pharmacia
– Gelextraktionskit <i>jetsorb</i>	Genomed
– Glycerin (87%)	Carl Roth
– HEPES, N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N'-	Carl Roth
– Ionomycin	Sigma-Aldrich
– Isoamylalkohol	Carl Roth
– Isopropanol (2-Propanol, C ₃ H ₈ O)	Carl Roth
– Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Carl Roth
– Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
– Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
– Kaliumhydrogenphosphat (KHPO ₄)	Sigma-Aldrich
– Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth
– Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth

– Magnesiumacetat ($\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
– Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth
– Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
– Manganchlorid (MnCl_2)	Fluka
– MOPS (4-Morpholinpropansulfonsäure, $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$)	Carl Roth
– Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \bullet 3\text{H}_2\text{O}$)	Merck Eurolab
– Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
– Natriumhydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$)	Merck Eurolab
– Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
– PEG (Polyethylenglykol) 4000	NEB
– Phenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$, mit TE äquilibriert)	Carl Roth
– Plasmid-DNA Isolationskit (Maxi)	Quiagen
– Plasmid-DNA Isolationskit (Mini)	Genomed
– PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva
– poly dI/dC J	Boehringer-Ingelheim
– Protease-Inhibitor-Tabletten (complete Mini)	Roche Applied Science
– radioaktive Nukleotide ($\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP)	Amersham Pharmacia
– RNase-Protektions-Analyse-Kit (RiboQuant)	BD Pharmingen
– RPMI 1640	Gibco BRL

– Rubidiumchlorid (RbCl)	Carl Roth
– Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab
– Sephadex G50	Amersham Pharmacia
– TaqDyePrimer Sequenzierungskit	Perkin Elmer
– TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
– Tris (2-Amino-2-(Hydroxylmethyl)-1,3-Propanediol)	Carl Roth
– Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Sigma-Aldrich
– Trizol-Reagenz	Gibco BRL
– Trypanblau 0,1%	Gibco BRL

8.5.6. Allgemeine Puffer und Lösungen

Low TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA
10 x TBE	3 mM Tris; 20 mM EDTA; 0,5 M Borsäure
10 x MOPS	400 mM MOPS; 1 mM Na-Acetat; 100 mM EDTA
Auftragspuffer (nativ)	50 % Sucrose; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol FF
Auftragspuffer (denaturierend)	
für RNA-Gele	10 µl 10 x MOPS; 10 µl Formaldehyd; 50 µl Formamid;
	10 µl nativer Auftragspuffer; 1 µl Ethidiumbromid
PBS	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O;
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O

FACS-Puffer	1 x PBS mit 0,01 % NaN ₃ (w/v); Lösung durch 0,1 µm Nitrozellulosemembran filtriert
FACS-Färbepuffer	FACS-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA
Citratpuffer	7,15 g/l Citronensäure, 177,99 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
EDTA-Puffer Na ₂ HPO ₄ x	0,2 g/l EDTA; 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l H ₂ O; 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O; pH7,1 - 7,3
Ethidiumbromid	40 mg/ml in H ₂ O; 40 µl ad 2 l 0,5 x TBE
Trypanblau	5 g/l Trypanblau, 9 g/l NaCl in H ₂ O gelöst
X-Gal	1 mg X-Gal in 50 µl Dimethylformamid
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O
Bradford-Reagenz (Bio-Rad) 50 ml H ₂ O	100 mg Coomassie brillant blue G-250; 30 mg SDS; 96 % EtOH; ad 200 ml H ₂ O; wird vor Gebrauch 1:5 mit verdünnt
BSA	1 µg/µl in H ₂ O

8.5.7. Nährmedien für Bakterien

Millers' LB-Boullion Basis	10 g/l SelectPepton (GIBCO BRL, Eggenstein); 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1,2% Agar (w/v)
LB _{amp} -Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
SOC-Medium Medium	2 ml sterile 20 % (w/v) Glucose ad 100 ml SOB-

8.5.8. Nährmedien für eukaryontische Zellen

Grundmedium RPMI mit 10 % Serum und 60 µg/ml Gentamycin

8.5.9. Größenstandard

Als Größenstandards für DNA-Agarosegele wurde eine 100 bp 1Kb Leiter (MBI Ferments) verwendet.

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

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lennert K. Letter: Origin of malignant lymphomas. *Lancet*. 1974;2:586.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics of Tumours of the Haemopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Classification of Tumours. 2001;3.
3. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-511.
4. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2003.
5. Chaganti SR, Chen W, Parsa N, et al. Involvement of BCL6 in chromosomal aberrations affecting band 3q27 in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;23:323-327.
6. Chaganti SR, Rao PH, Chen W, et al. Deregulation of BCL6 in non-Hodgkin lymphoma by insertion of IGH sequences in complex translocations involving band 3q27. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;23:328-336.
7. Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:2914-2923.
8. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:920-932.
9. Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:736-747.
10. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997;89:1413-1420.
11. Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer*. 1972;29:252-260.
12. Cogliatti SB, Lennert K, Hansmann ML, Zwingers TL. Monocytoid B cell lymphoma: clinical and prognostic features of 21 patients. *J Clin Pathol*. 1990;43:619-625.
13. Montalban C, Manzanal A, Castrillo JM, Escribano L, Bellas C. Low grade gastric B-cell MALT lymphoma progressing into high grade lymphoma. Clonal identity

of the two stages of the tumour, unusual bone involvement and leukemic dissemination. *Histopathology*. 1995;27:89-91.

14. Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM, Casali P. Clonal evolution of B cells in transformation from low- to high-grade lymphoma. *Eur J Immunol*. 1999;29:1253-1264.

15. Matolcsy A, Nagy M, Kisfaludy N, Kelenyi G. Distinct clonal origin of low-grade MALT-type and high-grade lesions of a multifocal gastric lymphoma. *Histopathology*. 1999;34:6-8.

16. Ott MM, Linke B, Gerhard N, et al. [Characterization of clonal B-cell populations in gastric MALT lymphomas and chronic gastritis by means of the polymerase chain reaction]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1994;78:302-304.

17. Starostik P, Greiner A, Schultz A, et al. Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;95:1180-1187.

18. Starostik P, Patzner J, Greiner A, et al. Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood*. 2002;99:3-9.

19. Orphanos V, McGown G, Hey Y, Boyle JM, Santibanez-Koref M. Proximal 6q, a region showing allele loss in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1995;71:290-293.

20. Trent JM, Rosenfeld SB, Meyskens FL. Chromosome 6q involvement in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1983;9:177-180.

21. Morita R, Saito S, Ishikawa J, et al. Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1991;51:5817-5820.

22. Stenman G, Sandros J, Mark J, Edstrom S. Partial 6q deletion in a human salivary gland adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1989;39:153-156.

23. Saito S, Saito H, Koi S, et al. Fine-scale deletion mapping of the distal long arm of chromosome 6 in 70 human ovarian cancers. *Cancer Res*. 1992;52:5815-5817.

24. Hayashi Y, Raimondi SC, Look AT, et al. Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1990;76:1626-1630.

25. Inoue M, Marx A, Zettl A, Strobel P, Muller-Hermelink HK, Starostik P. Chromosome 6 suffers frequent and multiple aberrations in thymoma. *Am J Pathol*. 2002;161:1507-1513.

26. Gaidano G, Hauptschein RS, Parsa NZ, et al. Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1992;80:1781-1787.

27. Offit K, Parsa NZ, Gaidano G, et al. 6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1993;82:2157-2162.

28. Sherratt T, Morelli C, Boyle JM, Harrison CJ. Analysis of chromosome 6 deletions in lymphoid malignancies provides evidence for a region of minimal deletion within a 2-megabase segment of 6q21. *Chromosome Res.* 1997;5:118-124.
29. Merup M, Moreno TC, Heyman M, et al. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1998;91:3397-3400.
30. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell.* 1994;77:297-306.
31. Sciammas R, Davis MM. Modular Nature of Blimp-1 in the Regulation of Gene Expression during B Cell Maturation. *J Immunol.* 2004;172:5427-5440.
32. Schliephake DE, Schimpl A. Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti-mu F(ab')₂-co-stimulated B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1996;26:268-271.
33. Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity.* 2003;19:607-620.
34. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* 2002;17:51-62.
35. Tunyaplin C, Shaffer AL, Angelin-Duclos CD, Yu X, Staudt LM, Calame KL. Direct Repression of *prdm1* by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation. *J Immunol.* 2004;173:1158-1165.
36. Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol.* 2000;165:5462-5471.
37. Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:205-230.
38. Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of *c-myc* transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science.* 1997;276:596-599.
39. Piskurich JF, Lin KI, Lin Y, Wang Y, Ting JP, Calame K. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol.* 2000;1:526-532.
40. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol.* 2002;22:4771-4780.

41. Gyory I, Fejer G, Ghosh N, Seto E, Wright KL. Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J Immunol.* 2003;170:3125-3133.
42. Liu L, Shao G, Steele-Perkins G, Huang S. The retinoblastoma interacting zinc finger gene RIZ produces a PR domain-lacking product through an internal promoter. *J Biol Chem.* 1997;272:2984-2991.
43. Fears S, Mathieu C, Zeleznik-Le N, Huang S, Rowley JD, Nucifora G. Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:1642-1647.
44. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Lowenberg B, Delwel R. Low expression of MDS1-EVI1-like-1 (MEL1) and EVI1-like-1 (EL1) genes in favorable-risk acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2003;31:1066-1072.
45. Vinatzer U, Mannhalter C, Mitterbauer M, et al. Quantitative comparison of the expression of EVI1 and its presumptive antagonist, MDS1/EVI1, in patients with myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;36:80-89.
46. Chadwick RB, Jiang GL, Bennington GA, et al. Candidate tumor suppressor RIZ is frequently involved in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2662-2667.
47. Fang W, Piao Z, Simon D, Sheu JC, Huang S. Mapping of a minimal deleted region in human hepatocellular carcinoma to 1p36.13-p36.23 and mutational analysis of the RIZ (PRDM2) gene localized to the region. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;28:269-275.
48. Tam W, Gomez MF, Chadburn A, Lee JW, Chan WC, Knowles DM. PRDM1 is a Tumor Suppressor Gene in Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Mod Pathol.* 2005;18 Suppl 1:253A.
49. Gazdar AF, Oie HK, Kirsch IR, Hollis GF. Establishment and characterization of a human plasma cell myeloma culture having a rearranged cellular myc proto-oncogene. *Blood.* 1986;67:1542-1549.
50. Diehl V, Schaadt M, Kirchner H, et al. Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study. *Blut.* 1978;36:331-338.
51. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991;39:741-748.
52. Taylor CR, Shi SR. Antigen retrieval: call for a return to first principles. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000;8:173-174.

53. Brighenti A, Andrulis M, Geissinger E, Roth S, Muller-Hermelink HK, Rudiger T. Extrafollicular proliferation of B cells in the absence of follicular hyperplasia: a distinct reaction pattern in lymph nodes correlated with primary or recall type responses. *Histopathology*. 2005;47:90-100.
54. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:230-242.
55. Johnson K, Shapiro-Shelef M, Tunyaplin C, Calame K. Regulatory events in early and late B-cell differentiation. *Mol Immunol*. 2005;42:749-761.
56. McHeyzer-Williams MG. B cells as effectors. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:354-361.
57. Kinoshita K, Lee CG, Tashiro J, et al. Molecular mechanism of immunoglobulin class switch recombination. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:217-226.
58. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol*. 1991;21:2951-2962.
59. Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med*. 1991;173:1165-1175.
60. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:165-196.
61. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:78-84.
62. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*. 2000;13:199-212.
63. Fukuda T, Yoshida T, Okada S, et al. Disruption of the Bcl6 Gene Results in an Impaired Germinal Center Formation. *J Exp Med*. 1997;186:439-448.
64. Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez JM, et al. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood*. 2004;104:2661-2666.
65. Franke S, Wlodarska I, Maes B, et al. Lymphocyte predominance Hodgkin disease is characterized by recurrent genomic imbalances. *Blood*. 2001;97:1845-1853.
66. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412:341-346.

67. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-196.
68. Issa JP, Baylin SB, Herman JG. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia.* 1997;11 Suppl 1:S7-11.
69. Jiang G, Liu L, Buyse IM, Simon D, Huang S. Decreased RIZ1 expression but not RIZ2 in hepatoma and suppression of hepatoma tumorigenicity by RIZ1. *Int J Cancer.* 1999;83:541-546.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte. An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink und Prof. Dr. A.Greiner für eine mehr als großzügig ausgestattete Arbeitsumgebung, freundliche Betreuung und vielseitige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Ein großes Dankeschön sowohl für finanzielle Unterstützung als auch für anregende und stimulierende Arbeitsatmosphäre gilt dem DFG Graduiertenkolleg 639 Tumorinstabilität.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. S. Chuvpilo bedanken, der mich mit Geduld in die Methoden der Molekularbiologie eingearbeitet hat, mir und stets mit Rat und Tat zu Seite stand. Für die kreativen Diskussionen und fachlichen Hinweise bedanke ich mich bei Dr. F. Berberich-Siebelt. Zudem gilt auch mein Dank allen Mitgliedern der „AG Greiner“, die mich in Labor jederzeit hilfsbereit unterstützten: M. Reichert, Ch. Amrehn, C. Wahlen und R. Kielenbeck.

Ganz besonders möchte ich mich bei meine Frau Elzbieta sowie Kinder Rita und Romualdas für die Geduld, Unterstützung und Verständnis bedanken.

Viele Personen, die mir bei dieser Arbeit ebenfalls geholfen haben, sind ungenannt geblieben. Auch ihnen sei an dieser Stelle Dank gesagt. Ich freue mich, daß mich eine so erstaunlich große Anzahl von Menschen unterstützt.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname:

ANDRULIS MINDAUGAS

Anschrift:

Gerbrunner Weg 2
97288 Theilheim
tel. Büro 0931 / 20147427
tel. privat 09303 / 981078
email: mindaugas.andrulis@uni-wuerzburg.de

Geburtsdatum/-ort:

25.12.1972 Siauliai, Litauen

Familienstand:

Verheiratet, 2 Kinder: Tochter und Sohn (11 und 8 Jahre)

Nationalität/Staatsangehörigkeit:

Litauisch

Schul Ausbildung:

09.1980 – 07.1991

Siauliu-14 Hauptschule und Gymnasium, Siauliai, Litauen

Abschluss: Abitur

Studium:

09.1991 – 07.1997

Humanmedizin

Medizinakademie Kaunas, Kaunas, Litauen

Abschluss: Diplom des Hochschulwesens, Qualifikation des Arztes

Berufliche Weiterbildung:

08.1997 – 07.1999

Weiterbildung in Pathologischer Anatomie

Klinikum der Pathologischen Anatomie der

Medizinischer Universität Kaunas, Litauen

Abschluss: Facharztprüfung Pathologie (sehr gut)

Berufliche Tätigkeiten:

08.1999 – 10.2001

Pathologe im Klinikum der Pathologischer Anatomie der

Medizinischer Universität Kaunas, Litauen

Fortbildung:

01.2000 – 06.2000

Hämatopathologie

Pathologisches Institut des Aarhus Universitätsklinikums, Aarhus, Dänemark

Promotionsstudium

11.2001 - 11.2004

DFG Graduiertenkolleg 639 Tumorstabilität

Institut für Pathologie der Universität Würzburg, Deutschland

Thema: BLIMP-1 Expression in diffusen großzelligen B-Zell

Lymphomen. *Eingereicht:* 10.2005

Berufliche Weiterbildung:

11.2004 – 12.2005

Weiterbildung in der Pathologie

Institut für Pathologie der Universität Würzburg

Sprachkenntnisse:

Litauisch – Muttersprache;

Deutsch, Englisch und Russisch - gut in Wort und Schrift



VERZEICHNIS BISHER VERÖFFENTLICHTER ARBEITEN

1. Berberich-Siebelt F, Berberich I, Andrulis M, et al. SUMOylation Interferes with CCAAT/Enhancer-Binding Protein beta-Mediated c-myc Repression, but Not IL-4 Activation in T Cells. *J Immunol.* 2006;176:4843-4851.
2. Brighenti A, Andrulis M, Geissinger E, Roth S, Muller-Hermelink HK, Rudiger T. Extrafollicular proliferation of B cells in the absence of follicular hyperplasia: a distinct reaction pattern in lymph nodes correlated with primary or recall type responses. *Histopathology.* 2005;47:90-100.
3. Glud SZ, Sorensen AB, Andrulis M, et al. A tumor-suppressor function for NFATc3 in T-cell lymphomagenesis by murine leukemia virus. *Blood.* 2005;106:3546-3552.
4. Schmausser B, Josenhans C, Endrich S, et al. Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* infection? *Infect Immun.* 2004;72:6773-6779.
5. Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, et al. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol.* 2004;136:521-526.
6. Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Muller-Hermelink HK, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol.* 2005;295:179-185.